T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALSİYUM BENTONİT ÜZERİNE BSA ADSORPSİYONUNUN İNCELENMESİ

MAYA KUMCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. DİLEK DURANOĞLU

İSTANBUL, 2016

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİN ADSORPSİYONUNUN DENGE VE KİNETİK AÇIDAN İNCELENMESİ

Maya KUMCU tarafından hazırlanan tez çalışması 22.04.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Dilek DURANOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Dilek DURANOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Neşet KADIRGAN

Marmara Üniversitesi _____

Yrd. Doç. Dr. Dilek KILIÇ APAR

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2014-07-01-YL08 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince laboratuvar çalışmalarımda ve tez yazımında her konuda bilgi ve desteğiyle yardımlarını esirgemeyen, yol gösteren, her zaman içtenlikle yaklaşan değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Dilek DURANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans'a başlamama destek olan, tez konumun belirlenmesinde ve deneysel çalışmalarımı yürütmemde yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem DOĞAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında özellikle kinetik çalışmalarda bana destek olan kimya mühendisleri Begüm BARDA ve Gizem BAYRAKTAR'a teşekkür ederim.

Burada yer veremediğim çalışmalarım sırasında yardımda bulunan diğer arkadaşlarıma ve Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda olan ve maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım AİLEME sonsuz teşekkür ederim.

Nisan, 2016

Maya KUMCU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ x

ÇİZELGE LİSTESİ xii

ÖZET xiii

ABSTRACT xv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 5
1.3 Hipotez 5

BÖLÜM 2

PROTEİN-ADSORPSİYON-BENTONİT-DENEYSEL TASARIM 6

2.1 Proteinler 6
2.1.1 Proteinlerin Yapısı 8
2.2 Sığır Serum Albumin (BSA) 10
2.3 Protein Adsorpsiyonu 10
2.3.1 Yüzey Yükleri 12
2.4 Adsorpsiyon 12
2.4.1 Adsorpsiyon Çeşitleri 13
2.4.1.1 Fiziksel Adsorpsiyon 13
2.4.1.2 Kimyasal Adsorpsiyon 13
2.4.1.3 İyonik Adsorpsiyon 13
2.4.2 Adsorpsiyon İzotermleri 14
2.4.2.1 Langmuir İzotermi 15
2.4.2.2 Freundlich İzotermi 16

2.4.2.3 Redlich-Peterson İzotermi (R-P) 16
2.4.3 Adsorpsiyon Kinetik Modelleri 17
2.4.3.1 Yalancı (Pseudo) Birinci Derece Kinetik Model 17
2.4.3.2 Yalancı (Pseudo) İkinci Derece Kinetik Model 18
2.4.3.3 Partikül İçi Difüzyon Modeli 18
2.4.4 Adsorban Malzemeler ve Özellikleri 18
2.4.4.1 Yapay Adsorbanlar 18
2.4.4.2 Doğal Adsorbanlar 19
2.5 Bentonit 21
2.5.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 22
2.5.1.1 Şişme Özelliği 22
2.5.1.2 Katyon Değiştirme Özelliği 22
2.5.1.3 Reolojik Özelliği 23
2.5.1.4 Adsorplama Özelliği 23
2.5.2 Kullanım Alanları 23
2.6 Deneysel Tasarım 24
2.6.1 Box Behnken Deneysel Tasarımı 25
2.6.2 Cevap Yüzey Analizi 26

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR 27

3.1 Kimyasal Maddeler 27
3.1.1 Sığır Proteini (Bovine Serum Albumin, BSA) 27
3.1.2 Kalsiyum Bentonit (CaB) 28
3.2 Kullanılan Cihazlar 29
3.3 Kalsiyum Bentonitin Karakterizasyonu 29
3.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri 30
3.3.2 X-Işını Kırınımı (XRD) Ölçümleri 30
3.3.3 Termogravimetrik Analiz (TGA) 30
3.3.4 FT-IR Analizi 30
3.3.5 pH Titrasyonu Ölçümleri 30
3.3.6 Zeta Potansiyeli Ölçümleri 31
3.3.7 Asidik ve Bazik Grupların Tayini 32
3.4 Protein Adsorpsiyonu Deneyleri 32
3.4.1 Tampon Çözeltilerin Hazırlanması 33
3.4.2 BSA Analizi 33
3.5 Deneysel Tasarımın BSA Adsorpsiyonuna Uygulanması 33
3.6 BSA Adsorpsiyonunun Kinetik İncelemesi 35
3.7 Adsorpsiyon İzotermlerinin Oluşturulması 35
3.7.1 Deneysel Verilerin Teorik Adsorpsiyon İzoterm Modellerine Uygunluğunun İncelenmesi 36

BÖLÜM 4

DENEYSEL ÇALIŞMALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ 38

4.1 Kalsiyum Bentonitin Karakterizasyonu 38

4.1.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri 38
4.1.2 X-Işını Kırınımı (XRD) Görüntüleri 39
4.1.3 TG/DTA Analizi 39
4.1.4 FT-IR Analizi 40
4.1.5 pH Titrasyonu Ölçümleri 41
4.1.6 Zeta Potansiyel Ölçümleri 41
4.1.7 Asidik ve Bazik Grupların Tayini 42
4.2 BSA Adsorpsiyonunun Deneysel Tasarımla İncelenmesi 43
4.2.1 Model Denklemin Geliştirilmesi 44
4.2.2 Proses Parametrelerinin Optimizasyonu 48
4.3 Cevap Yüzey Grafikleri 48
4.4 Adsorpsiyon Kinetiği 51
4.4.1 Kinetik Modelleme 51
4.5 BSA Proteininin Adsorpsiyon İzotermlerinin Değerlendirilmesi 53
4.5.1 Sıcaklığın Etkisi 53
4.5.2 pH Etkisi 55
4.5.3 Başlangıç Konsantrasyonunun Etkisi 58
4.5.4 Deneysel Adsorpsiyon Verilerinin Teorik Modellere Uyguluğunun İncelenmesi 59

BÖLÜM 5

SONUÇLAR 64

KAYNAKLAR 66

EK-A

ADSORPSİYON İZOTERMLERİ VE KALANLARIN NORMAL OLASILIK DAĞILIM EĞRİLERİ 70

EK-B

ANOVA TABLOLARI 80

ÖZGEÇMİŞ 84

SİMGE LİSTESİ

C	Adsorpsiyon sınır tabakası hakkında bilgi veren sabit
C_0	Başlangıç BSA konsantrasyonu
C_e	Denge durumundaki BSA konsantrasyonu
k	Deneysel tasarım faktör sayısı
k_1	Yalancı birinci derece adsorpsiyon hız sabiti
k_2	Yalancı ikinci derece adsorpsiyon hız sabiti
k_i	Parçacık içi difüzyon hız sabiti
m	Adsorban miktarı
N	Toplam deney sayısı
n_0	Tekrarlanan deney sayısı
pI	İzoelektrik nokta
q_e	Denge halinde birim adsorban başına adsorplanan madde miktarı
q_t	Herhangi bir zamanda birim adsorban başına adsorplanan madde miktarı
R^2	Korelasyon katsayısı
t	Temas süresi
$t^{1/2}$	Yarılanma zamanı
V	BSA çözeltisinin hacmi
X^2	Ki-kare

KISALTMA LİSTESİ

BSA	Sığır Proteini (Bovine Serum Albumin)
CaB	Kalsiyum Bentonit
NaB	Sodyum Bentonit
PZC	Sıfır yük noktası (Point of Zero Charge)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
XRD	X Işınları Kırınımı Spektrometresi

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Amino asidin yapısı 6
Şekil 2. 2 Peptit bağı 7
Şekil 2. 3 Disülfit ve hidrojen bağı 8
Şekil 2. 4 Proteinlerin yapısı 9
Şekil 2. 5 IUPAC sınıflandırmasına göre adsorpsiyon izotermleri 14
Şekil 2. 6 Bir tetrahedron ve silika tabakası 20
Şekil 2. 7 Bir oktahedron ve alümina tabakası 20
Şekil 2. 8 Montmorillonitin kristal yapısı 21
Şekil 2. 9 Üç faktörlü Box-Behnken Tasarımı örnek gösterimi 25
Şekil 3. 1 Zeta potansiyelin şematik gösterimi 31
Şekil 4. 1 CaB'in SEM görüntüleri (a:1000x; b:20000x) 38
Şekil 4. 2 Kalsiyum bentonitin XRD grafiği 39
Şekil 4. 3 Kalsiyum bentonitin TG grafiği 40
Şekil 4. 4 Kalsiyum bentonitin FT-IR spektrumu 40
Şekil 4. 5 Kalsiyum bentonitin proton bağlama eğrisi 41
Şekil 4. 6 Kalsiyum bentonitin zeta potansiyel eğrisi 42
Şekil 4. 7 Kalsiyum bentonit yapısında bulunan asidik ve bazik gruplar 42
Şekil 4. 8 pH ve başlangıç konsantrasyonuna bağlı cevap yüzey grafiği 49
Şekil 4. 9 pH ve sıcaklığa bağlı cevap yüzey grafiği 50
Şekil 4. 10 Sıcaklık ve başlangıç konsantrasyonuna bağlı cevap yüzey grafiği 50
Şekil 4. 11 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi 51
Şekil 4. 12 BSA adsorpsiyonunun yalancı ikinci derece kinetik modele uydurulması 52
Şekil 4. 13 pH 2,8'de başlangıç konsantrasyonuna karşı denge adsorpsiyon kapasiteleri. 53
Şekil 4. 14 pH 4,8'de başlangıç konsantrasyonuna karşı denge adsorpsiyon kapasiteleri. 54
Şekil 4. 15 pH 6,8'de başlangıç konsantrasyonuna karşı denge adsorpsiyon kapasiteleri. 54
Şekil 4. 16 25℃'de pH'ın BSA adsorpsiyon kapasitesine etkisi 55
Şekil 4. 17 32,5℃'de pH'ın BSA adsorpsiyon kapasitesine etkisi 56
Şekil 4. 18 40℃'de pH'ın BSA adsorpsiyon kapasitesine etkisi 56
Şekil 4. 19 Tampon çözeltiler ile hazırlanan CaB ve CaB-BSA çözeltilerinin pH değerlerine karşı oluşturulan zeta potansiyel ölçümleri 58

Şekil A. 1 pH 2,8 ve 25℃'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•: deneysel, -- : model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P..... 71
Şekil A. 2 pH 2,8 ve 32,5℃'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•:deneysel, --:model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P 72
Şekil A. 3 pH 2,8 ve 40℃'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•:deneysel, --:model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P.....73
Şekil A. 4 pH 4,8 ve 25℃'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•:deneysel, --:model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P..... 74
Şekil A. 5 pH 4,8 ve 32,5℃'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•:deneysel, --:model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P.....75
Şekil A. 6 pH 4,8 ve 40℃'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•:deneysel, --:model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P.....76
Şekil A. 7 pH 6,8 ve 25℃'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•:deneysel, --:model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P..... 77
Şekil A. 8 pH 6,8 ve 32,5℃'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•:deneysel, --:model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P..... 78
Şekil A. 9 pH 6,8 ve 40℃'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•:deneysel, --:model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P..... 79

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3. 1 BSA'nın genel özellikleri..28
Çizelge 3. 2 Kalsiyum bentonit (CaB) içeriği..28
Çizelge 3. 3 CaB genel özellikleri..29
Çizelge 3. 4 Box-Behnken tasarımı için faktör ve seviyeler..34
Çizelge 3. 5 Box-Behnken tasarımı deney planı..34
Çizelge 4. 1 Box Behnken tasarımı BSA adsorpsiyon deney sonuçları..43
Çizelge 4. 2 Kübik modele ait ANOVA analizi sonuçları..44
Çizelge 4. 3 Geliştirilen model denkleme ait katsayılar..45
Çizelge 4. 4 Box Behnken tasarım sonuçları ve hata değerleri..47
Çizelge 4. 5 Optimum proses parametreleri..48
Çizelge 4. 6 Kinetik modelleme sonuçları..52
Çizelge 4. 7 pH 2,8'de model denklemlere ait katsayılar..60
Çizelge 4. 8 pH 4,8'de model denklemlere ait katsayılar..61
Çizelge 4. 9 pH 6,8'de model denklemlere ait katsayılar..62
Çizelge B. 1 pH 2,8'de her üç sıcaklık için elde edilen ANOVA tabloları..81
Çizelge B. 2 pH 4,8'de her üç sıcaklık için elde edilen ANOVA tabloları..82
Çizelge B. 3 pH 6,8'de her üç sıcaklık için elde edilen ANOVA tabloları..83

ÖZET

KALSİYUM BENTONİT ÜZERİNE BSA ADSORPSİYONUNUN İNCELENMESİ

Maya KUMCU

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Dilek DURANOĞLU

Protein adsorpsiyonu son yıllarda biyoloji, biyomedikal mühendisliği, biyoteknoloji ve çevre bilimleri gibi birçok alanda önemli rol oynamaya başlamıştır. Kardiyovasküler cerrahide ve kontak lensler ile hemodiyaliz membranlarda, implant malzemelerde, biyomedikal uygulamalarda ilaç salınım sistemlerinin tasarlanmasında protein adsorpsiyonu olgusundan yararlanılmaktadır.

Bu çalışmada kalsiyum bentonit (CaB) üzerine sığır proteini (BSA) adsorpsiyonu denge ve kinetik açıdan incelenmiştir. Kalsiyum bentonit FT-IR, TG-DTA, Boehm titrasyonu, SEM ve XRD analizleri ile karakterize edilmiştir.

Adsorpsiyon çalışmaları üç farklı pH (2,8; 4,8 ve 6,8) ve sıcaklık değerinde (25℃; 32,5℃ ve 40℃), 0,1-1,2 mg/mL konsatrasyon aralığında gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyonu etkileyen proses parametreleri (pH, sıcaklık ve başlangıç konsantrasyonu) Box Behnken Deneysel Tasarım metodu uygulanarak incelenmiş; en etkili parametrenin başlangıç konsantrasyonu ve sonrasında pH ve sıcaklık olduğu geliştirilen model denklemle belirlenmiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1 mg/mL başlangıç konsantrasyonunda, pH 4.8'de ve 40℃ sıcaklıkta yaklaşık olarak 171 mg/g olarak elde edilmiştir. Ayrıca adsorpsiyonun yalancı ikinci derece kinetik modele uyduğu belirlenmiştir.

Deneysel adsorpsiyon verilerinin iki parametreli Freundlich, Langmuir ve üç parametreli Redlich-Peterson adsorpsiyon izoterm modellerine uygunluğu doğrusal olmayan regresyon yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen modellerin istatiksel

anlamlılığı ANOVA analizi ve kalanların normal olasılık dağılım grafikleri ile yorumlanmıştır. BSA'nın CaB üzerine adsorpsiyonu için en uygun modelin Langmuir izoterm modeli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: BSA, kalsiyum bentonit, adsorpsiyon, Box Behnken deneysel tasarımı, non lineer regresyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BSA ADSORPTION ONTO CALCIUM BENTONITE

Maya KUMCU

Department of Chemical Engineering

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Dilek DURANOĞLU

In recent years, adsorption of protein has begun to play an important role in many fields such as biology, biomedical engineering, biotechnology and environmental science. Protein adsorption phenomenon is utilized in the design of drug delivery systems in biomedical applications, cardiovascular surgery, contact lenses, hemodialysis membranes and the implant materials.

In this study, bovine serum albumine (BSA) adsorption onto calcium bentonite (CaB) was examined. Calcium bentonite, which was used as adsorbent, was characterized by FT-IR, TG-DTA, Boehm titration, SEM and XRD analysis.

Adsorption experiments were carried out at differet pHs (2,8; 4,8 and 6,8), temperatures (25℃; 32,5℃ and 40℃) and initial protein concentrations (0,1-1,2 mg/mL). Effects of process parameters on adsorption were examined by using Box Behnken Experimental Design Method. As a result of the experimental design, the developed model showed that the most effective parameter on adsorption is initial protein concentration. Maximum adsorption capacity was obtained as 171 mg/g at pH 4,8, 40℃ and 1 mg/mL of initial protein concentration. In addition, protein adsorption kinetic data fitted to the pseudo-second-order kinetic model.

Two parameter (Langmuir and Freundlich) and three parameter (Redlich-Peterson) adsorption isotherm models were applied to the experimental data by using non-linear regression method. Statistical significancy was evaluated with ANOVA analysis and the

rest of the normal probability distribution plots. As a result, it was found that BSA adsorption onto calcium bentonite fitted Langmuir isotherm model.

Keywords: BSA, calcium bentonite, adsorption, Box Behnken experimental design, nonlinear regression

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Literatürde protein adsorpsiyonu konusunda farklı protein ve adsorbanlar kullanılarak yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Burada BSA proteini ve montmorillonitin kullanıldığı çalışmalar incelenmiş ve aşağıda özetlenmiştir.

Lepoitevin ve arkadaşları [1], montmorillonitin (MMT) protein adsorpsiyonu üzerindeki ara katman (IC) etkisini araştırmışlardır. Katyon alkali metal serileri (Li^+, Na^+, K^+, Rb^+, Cs^+) ve alkali toprak metalleri (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}) katmanlarının lizozim (LYS) ve sığır serum albümin (BSA) proteinlerinin adsorpsiyonu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Her iki proteinin yerleşimi ve MMT ara yüzey boşlukları içindeki konformasyonel modifikasyonları XRF, TEM ve Floresans cihazları ile gözlemlenmiştir. Protein adsorpsiyonu LYS için pH 8.8, BSA için pH 4.5 değerlerinde gerçekleşmiş ve proteinler pozitif yüklenmiştir. Başlangıçta adsorpsiyonda hızlı bir artış gözlemlenirken LYS ile 30, BSA ilen 90 dakika sonunda kararlılığa ulaşılmıştır. İki proteinin adsorpsiyonunda da IC etkisi görülmüştür. IC, iç kararlılığı düşük yumuşak protein BSA üzerinde denatürasyona neden olurken; iç kararlılığı yüksek sert protein LYS üzerinde bu etki görülmemiştir. BSA ve LYS için gözlemlenen IC simetrik etkisi MMT üzerine adsorbe olduklarında proteinlerin boyutu ve denatürasyon özellikleri ile açıklanmıştır. Langmuir izotermlerine dayanarak, maksimum adsorbe edilen miktar ve adsorpsiyon denge sabiti üzerine, ara yüzey katyonunun güçlü etkisi gözlemlenmiştir [1].

Kaygusuz ve Erim [2], pH duyarlı alginat-protein-kil kompozit küreciklerini BSA model proteinin ağız yoluyla yapılan uygulamalarını incelemişlerdir. Bu çalışmada MMT;

matriksten proteinin bağırsak içinde kontrollü salınımını sağlamak ve kompozit matriks içindeki proteini yakalamak için aljinat hidrojel içerisine dahil edilmiştir. Aljinat kürecikleri ile karşılaştırıldığında protein adsorpsiyonu verimliliği %40 iken, montmorillonitin dahil edilmesiyle protein adsorpsiyonu verimliliği %78 olmuştur. Mide çözeltisi ile küreciklerin ilk temasından sonra 60-90 dakikaya kadar hiçbir BSA salınımı tespit edilmemiştir. BSA, kilin katmanlarına girerek MMT'ye karşı güçlü bir etkileşim göstermiştir. Bu yöntemle saf alginat kullanımına kıyasla kompozit kürecikler asidik mide ve bağırsak ortamında daha yüksek BSA yükleme verimliliğini sergilemiştir. Asidik ortamda proteinin bozulması, mide ortamı içindeki proteinin çok düşük salınım oranı ile önlenmiştir. Öte yandan saf alginat küreciklerinden BSA salınımının aksine MMT'nin dahil edilmesiyle bağırsak ortamındaki kontrollü salınım sistemi sağlanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma, alginat-MMT küreciklerinin proteinin bağırsak içindeki kontrollü salınımı için potansiyel bir matriks olarak kullanılabileceğini göstermiştir [2].

Tran ve arkadaşları [3], polisülfon (PSf) içine MMT sabitlenmesi ile oluşan karışık matriks membranın (PSf/MMT), şarap çözeltisinde bulunan BSA proteinlerinin adsorpsiyonunda adsorban olarak kullanılmasının uygunluğunu incelemişlerdir. Faz değiştirme yöntemi ile sentezlenen, %10 PSf ve %10 MMT içeren, PSf/MMT kompozit membranın yapısı ve adsorpsiyon kabiliyeti sistematik olarak incelenmiş ve modifiye edilmemiş PSf membran ile karşılaştırılmıştır. PSf/MMT membranında gözenekli yapı ve hidrofilik yüzey özelliği sağlayan MMT partiküller, yüzeydeki hidrofobik etkileşimi azaltmış ve daha düşük basınç ile geçirgenlik sağlamıştır. MMT partiküller, yüksek uygulama basıncı altında zarın mekanik stabilitesinin iyileştirilmesine katkıda bulunmuş ve membran boyunca iyi bir şekilde dağıtılmıştır. Çalışmada şarabın lezzet ve dokusunda problem yaratan ve istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlayacak gözenekli yapıya sahip membran sistem yapmamın mümkün olduğu gözlemlenmiştir [3].

Tran ve James [4], farklı pH ve etanol konsatrasyonlarında, BSA proteini ve MMT yüzeyi arasındaki adezyon kuvvetlerini incelemişlerdir. AFM cihazı kullanarak fiziksel etkileşimlerin ve pH ile alkol bileşimi içindeki etkileşimlerin anlaşılmasını amaçlamışlardır. Elektrostatik kuvvet, hidrofobik kuvvet ve protein yapısının yeniden düzenlenmesi izlenmiştir. Farklı pH değerlerinde ve etanol bileşimlerinde BSA ve

adezyon kuvveti üzerinde pH'ın daha büyük bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. En yüksek adezyon kuvveti izoelektrik noktaya yakın pH 4.6'da görülmüştür. Bu noktadaki maksimum adezyon kuvveti, protein içindeki daha kompakt bir yapı ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. Adezyon kuvveti lineer olarak pH'ın artması ve azalması gibi her iki durumda da azalmıştır. İzoelektrik noktanın altında BSA pozitif, MMT negatif yüklenmiştir. İzoelektrik noktanın üzerindeki değerlerde adezyon kuvvetinde hidrofobik etkileşimlerin hakim olduğu görülmüştür. MMT katyon değişim malzemesi olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Şaraptaki maksimum protein adsorpsiyonu pH 3.8 ile etanol konsatrasyonunun %20 olduğu araklıkta görülmüştür [4].

Anirudhan ve arkadaşları [5], süperadsorban bileşiğin üzerine BSA adsorpsiyonu davranışını incelemişlerdir. Bu çalışmada, poli(metakrilik asit)-selüloz/bentonit (PMAAg-Cell/Bent) süper adsorban bileşik; N-NO-metilenbisakrilamid çapraz bağlayıcısı kullanılarak bentonit varlığında selüloz üzerine metakrilik asidin kopolimerizasyon reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Bileşik FTIR, XRD, SEM, TG, yüzey alanı analizörü ve potansiyometrik titrasyon kullanılarak karakterize edilmiştir. PMAA-g-Cell/Bent üzerine BSA adsorpsiyonunda adsorban kütlesini incelemek için, 0,2 g ile 1,6 g arasında değişen adsorban miktarları ile deneyler yapılmıştır. Bu çalışmada adsorban kütlesindeki artışla birlikte adsorpsiyon kapasitesinde bir artış olduğu görülmüştür. pH etkisi incelendiğinde; BSA adsorpsiyonunun pH arttıkça arttığı görülmüştür. Adsorpsiyon, pH 4.5 değerinde maksimuma ulaşmış ve adsorpsiyon denge süresi 180 dakika olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada Langmuir, Freundlich ve Sips izotermlerinin uygulanabilinirliği araştırılmıştır. BSA adsorpsiyon izotermi en iyi Sips modelinin uygun olduğu görülmüştür [5].

Shamsuddin ve arkadaşları [6], protein ara katkılı kalsiyum bentonit (CaB), sodyum bentonit (NaB) ve oktadesilamin modifiye bentonit (Amin B) ile jelatin üretmişlerdir. Bu çalışmada Langmuir, Freundlich, Langmuir-Freundlich ve Temkin izotermleri kullanılarak adsorpsiyon modellenmiştir. En iyi deneysel sonuçlar ve kinetik datalar CaB ve NaB için Langmuir-Freundlich izoterminde sağlanırken, Amin B için Freundlich izotermi ile elde edilmiştir. Adsorpsiyon 10-20 dakika içinde dengeye ulaşmıştır. Jelatinin %80'i bentonit kullanılarak tek aşamada çözeltiden başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Adsorsiyon oranları başlangıç jelatin konsantrasyonunun artması ile

azalmıştır. Bunun nedeni çözelti viskozitesinin artmasından ötürü protein difüzyonunun azalması ile açıklanmıştır. Adsorpsiyon izotermleri ve hızları pH 3, pH 4 ve pH 9'da 100 mL çözeltide 3 gr adsorban kullanılarak 20 mg/mL jelatin konsantrasyonu ile oluşturulmuştur. 20 mg/mL jelatin çözeltisinde CaB kullanılarak en yüksek jelatin adsorpsiyonu pH 3 ve pH 5,23 arasında 372 mg/g (%58,9) bulunurken, NaB kullanılarak en yüksek jelatin adsorpsiyonu pH 7 ve pH 9 arasında 405 mg/g (%60,4) olarak elde edilmiştir. Amin B kullanılarak gerçekleştirilen protein adsorpsiyonunda en yüksek adsorpsiyon kapasitesi pH 3'te 222 mg/g (%33,5) olarak belirlenmiştir [6].

Maeda ve arkadaşları [7], Tris ve fosfat tampon çözeltilerinden BSA, Miyoglobin (MYO) ve Lizozim (LSZ) proteinlerinin adsorpsiyonunu CaO polihedral ve silikat tetrahedral katmanlardan oluşan tobermorit kullanarak incelemişlerdir. Tampon çözeltiler pH 7,4'te hazırlanmıştır. Adsorpsiyon her protein için 10 dakika sonunda dengeye gelmiştir. Her bir proteinin elektroforetik mobilitesi iki tampon içerisinde benzer eğilim gösterirken, Tris tampon çözeltisi içindeki proteinlerin mobilitesinin mutlak değerleri fosfat tampon çözeltisi içindekinden daha büyük olduğu görülmüştür. BSA proteini MYO ve LSZ ile karşılaştırıldığında Tris tampon çözeltisinden tobermorit üzerine kolay adsorbe olur. Elektrostatik etkileşimler göz önüne alındığında tobermorit yüzeyi üzerine BSA ve LSZ'nin adsorsiyonunun uygun olduğu görülmüştür [7].

1.2 Tezin Amacı

BSA proteininin, biyouyumlu ve doğal bir madde olan kalsiyum bentonit kili üzerine adsorpsiyonunun denge ve kinetik açıdan incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda farklı pH, sıcaklık ve konsantrasyon değerlerinin adsorpsiyona etkisi deneysel tasarım yöntemi uygulanarak incelenmiş ve optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Deneysel adsorpsiyon verileri teorik adsorpsiyon izoterm modelleri ile modellenmeye ve adsorpsiyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Benzer şekilde adsorpsiyon kinetiği teorik modeller kullanılarak incelenmiştir.

1.3 Hipotez

BSA proteini, yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip, doğal, biyouyumlu kalsiyum bentonit üzerine adsorbe edilebilir ve böylece gerek biyolojik sistemlerde gerekse kromatografi alanında uygulama sahası bulabilir. Adsorpsiyon proseslerinde maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşmak hedeflenir. Bu çalışmada, deneysel tasarım yöntemleri ile daha az deney yaparak maksimum adsorpsiyon kapasitesini veren optimum proses şartlarının (pH, sıcaklık ve başlangıç konsantrasyonu) belirlenebileceği düşünülmüştür. Ayrıca adsorpsiyonun denge ve kinetik açıdan incelenmesi ve modellenmesi adsorpsiyon mekanizmasının aydınlatılması hususunda önemli bilgiler sağlar.

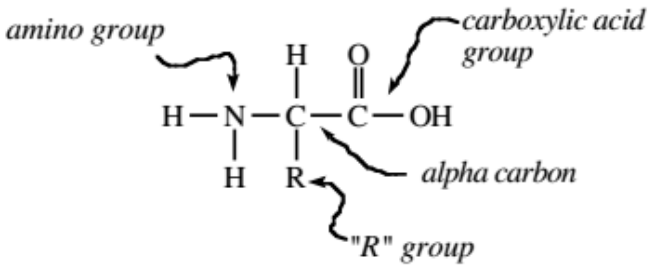
BÖLÜM 2

PROTEİN-ADSORPSİYON-BENTONİT-DENEYSEL TASARIM

2.1 Proteinler

Proteinler, canlıların yaşamla ilgili birçok fonksiyonunda görev alan önemli biyomoleküllerdir. Membranların, kas ve bağ dokusunun yapısal elemanlarıdır. Birçok molekülün vücut içinde taşınmasında ve depolanmasında görev alırlar.

Proteinler, hücrenin yapısında yer alan C, H, O, N ve S içeren zincir şeklindeki amino asitlerin belirli türde, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasında karakteristik düz zincirde birbirlerine kovalent bağlanmasıyla oluşmuş büyük organik bileşiklerdir. Proteinlerin tümü DNA üzerinde kodlanmış olan 20 standart amino asitten oluşur. Tüm amino asitler ortak bir yapıya sahiptir. Asit (-COOH) ve amino grupları ($-NH_2$) aynı karbon atomu olan α-karbon atomuna bağlanırlar. α-karbonu bir hidrojen atomu ve yan zincir grubu olan R'ye bağlanır. Amino asidin kimliği ve özellikleri R grubunun yapısına bağlıdır [8].

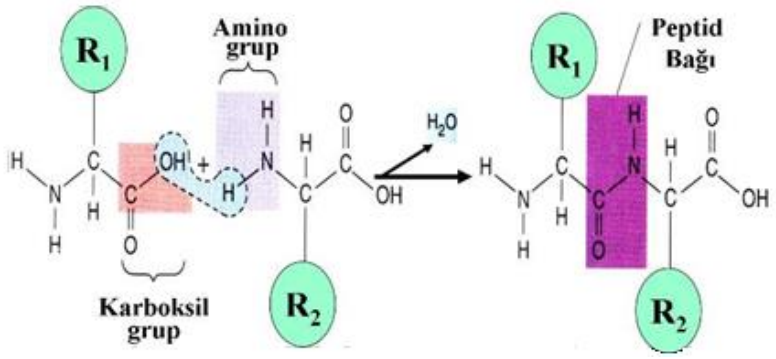


Şekil 2.1 Amino asidin yapısı [9]

Proteinler canlı hücrelerin büyük bir kısmını oluştururlar; enzim olarak hücre içindeki tüm metabolik reaksiyonları gerçekleştirirler; reseptörler ve iyon kanalları olarak hücre membranı boyunca iyonların ve küçük moleküllerin akışına izin verirler; yapısal proteinler olarak bağ doku, kas ve kemikleri oluştururlar; bağışıklık sisteminin temeli olarak antikorların oluşumu içindedirler; RNA, DNA ve karbonhidrat molekülleri ile makromoleküler kompleksler içinde de proteinler yer almaktadırlar [8].

Proteinlerin yapılarında kovalent bağlar ve kovalent olmayan bağlar vardır. Kovalent bağlar; peptit bağları ve disülfid bağlarıdır; kovalent olmayan bağlar ise hidrojen bağları, iyon bağları ve apolar bağlardır [10].

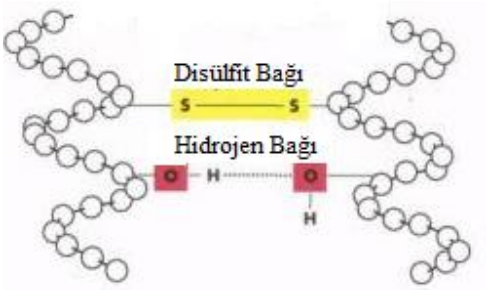
Peptit bağları; bir amino asidin α-karboksil karbonu ile bir başka amino asidin α-amino azotu arasında oluşan C-N bağlarıdır. Bağlanma sırasında bir su molekülü serbest kalır. İki aminoasidin yan yana gelmesiyle oluşan peptid bağına "dipeptid", üç veya daha fazla (yüzlerce ya da binlerce) aminoasidin yan yana gelmesiyle oluşan zincirdeki peptid bağlarına ise "polipeptid" adı verilir. Proteinler düz aminoasit zincirlerinden meydana gelmesine rağmen oldukça karmaşık yapılara sahiptirler. Bunun nedeni ise zincirdeki bazı aminoasitlerin birbirleriyle ikinci veya üçüncü bir bağ yapmasındandır [10].



Şekil 2.2 Peptit bağı [11]

Disülfid bağları; iki sistein kalıntısı arasında, sülfhidril (tiyol, -SH) gruplarının H kaybetmeleri sonucu oluşan S-S bağlarıdır. Disülfid bağlarının bir protein molekülünün şeklinin oluşmasında ve korunmasında önemli etkisi vardır. Disülfid bağları, bir polipeptit zinciri içerisinde kurulabilir veya çeşitli polipeptit zincirlerinin birbirine bağlanmasını sağlayabilir. Disülfid bağları, ribonükleaz ve oksitosin aynı polipeptit zincirinde bulunur; insülinde ise iki ayrı polipeptit zincirini birbirine bağlar.

Hidrojen bağları; polipeptit zinciri oluşturan peptit özelliklerinden kaynaklanan durumundan dolayı, oksijenlerin negatif, azotların ise pozitif özellik taşımasının sonucu olarak, bir polipeptit zincirdeki bir peptit düzleminde bulunan oksijen atomu ile bir başka peptit bağı veya düzlemindeki azot atomu arasında, oluşan bağlardır [10].



Şekil 2.3 Disülfit ve hidrojen bağı [12]

İyon bağları; polipeptit zincirlerindeki asidik ve bazik amino asit kalıntılarının fonksiyonel gruplarının fizyolojik pH'da tamamen veya kısmen iyonlaşmış halde bulunmalarının sonucu olarak, elektronegatif ve elektropozitif gruplar arasında gelişen elektrostatik çekim kuvveti ile ($COO^{-}\cdots\cdots H_3N^{+}$) oluşan bağlardır [10].

2.1.1 Proteinlerin Yapısı

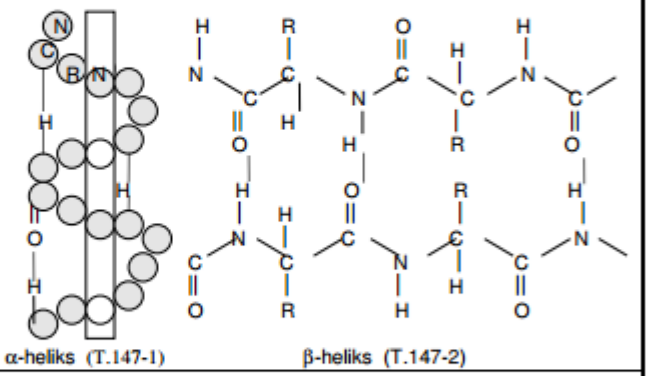
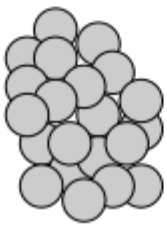
Proteinler dört yapıdan oluşmaktadır. Bu yapılar; primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuarterner (dördüncül) yapılarıdır. Primer yapıyı oluşturan bağ peptit bağlarıyken diğer yapıları hidrojen bağları ve diğer zayıf bağlar oluşturur [13].

Primer yapı; belirli bir türde, sayıda ve diziliş sırasında aminoasitlerin birbirlerine peptit bağlarıyla bağlanarak oluşturdukları bir polipeptit zinciri biçimindeki yapıdır. Peptit zinciri düz olabileceği gibi dallanmış ya da halka biçiminde de olabilir. Dallanma ya da halkalaşma, iki karboksilli amino asitlerin fazla karboksil grupları ile diamino asitlerin fazla amino grupları aracılığı ile olur [13].

Sekonder yapı; polipeptit zincirinin katlanmasıyla oluşan özel bir yapıdır ve bu yapı lineer yapıdaki yakın aminoasit arasında bağ güçlerinden oluşur: Bu bağlar; zayıf H bağları, elektrostatik güçler ve Van der Waals bağlarıdır. En genel tipleri ise α- heliks ve β-plakalı yapılardır. Aynı protein bu yapılardan birini ya da her ikisini de içerebilir [13].

Tersiyer yapı; sekonder yapıya sahip polipeptit zinciri katmanları ile küresel bir şekil alır ve üç boyutlu bir yapı kazanır. Bir proteinin tersiyer yapısının oluşmasına ve bu yapının sürdürülmesine, primer ve sekonder yapının oluşmasına katılan bağlardan başka Van der Waals çekimleri ve iyon bağları da katılır. Böylece, üç boyutlu, tam konformasyonlu ve yoğunlaşmış protein molekülü meydana gelir [13].

Kuarterner yapı; primer, sekonder ve tersiyer yapıya sahip polipeptit zincirlerinin daha büyük yapılı agregatlar halinde biraraya gelmesiyle oluşan yapıdır [13].

1-Primer Yapı	S – S Cy – tyr – ile – gln – asn – Cy – pro – leu – gly
2-Sekonder yapı	 α-heliks (T.147-1) β-heliks (T.147-2)
3-Tersiyer yapı	• Heliks yapılar, –S –S – köprüleri ile katlanarak globüler ve elipsoidal hale geçmesidir.
4-Kuarterner yapı	

Şekil 2.4 Proteinlerin yapısı [14]

2.2 Sığır Serum Albumin (BSA)

Albumin toplam plazma proteinleri içerisinde oranı en yüksek olan proteindir. Yapısı 580 dolayında aminoasidin bulunduğu tek bir polipeptit zincirinden meydana gelir. Molekül ağırlığı 60-70 bin Dalton (1 D=1,67x10^{-24} g) arasında değişir [15]. Albumin 'genel nakledici' ya da 'taşıyıcı protein'dir. Birçok organik ve inorganik ligand (tiroksin, bilirubin, penisilin, kortizol, östrojen, serbest yağ asitleri, kumadin, kalsiyum, magnezyum), albumin molekülünün değişik bölgelerine kovalent ya da ayrılabilen bağlar aracılığıyla bağlanabilmektedir. Kanda pek çok ilaç albumine bağlı olarak taşınır ve ayrıca plazma kalsiyumunun bir kısmı albumine bağlı olarak bulunur [16].

Sığır endüstrisinin bir yan ürünü olarak sığır kanından büyük miktarlarda elde edilebilen BSA stabilitesi ve düşük maliyet özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. BSA, DNA sindirimi sırasında reaksiyon tüpüne ve bazı kanallara enzimin çökmesini engellemek amacıyla bazı enzimleri stabilize etmek için de kullanılır [15].

Albumin genelde serum albumini veya plazma albumini anlamında kullanılır. Bir kan proteini olan albuminin izoelektrik noktası 4.7-4.9 arasında olup izoelektrik noktanın altında pozitif, üstünde negatif yüklüdür [15].

2.3 Protein Adsorpsiyonu

Protein adsorpsiyonu biyoloji, biyomedikal mühendisliği, biyoteknoloji ve çevre bilimleri gibi birçok alanda önemli rol oynamaktadır. Kardiyovasküler cerrahide ve kontak lensler ile hemodiyaliz membranlar gibi ekstrakorporel yardımcı aparatlarda, implant malzemeleri üzerinde proteinlerin adsorpsiyonundan yararlanılmaktadır. Tıpta kullanılan diğer bir uygulama da ilaç salınım sistemlerinin tasarlanmasında adsorpsiyon olgusu olarak kullanılmasıdır [17]. Protein adsorpsiyonu Van der Waals, elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağı etkileşimleri dahil olmak üzere farklı protein-yüzey, protein-protein etkileşimlerini de kapsayan çok yönlü bir süreçtir.

Çoğu proteinler heterojen yüzeylere sahiptirler ve bu nedenle adsorban yüzeyi ile birden fazla şekilde etkileşim gösterebilirler. Bu etkileşimlerde sıcaklık, pH, iyonik güç ve protein konsantrasyonu gibi faktörler önemli bir etkiye sahiptir [18].

Proteinler hava-su ya da yağ-su yüzeyleri arasındaki hidrofobik özelliklerden dolayı sulu çözeltilerde kendiliğinden adsorbe olurlar. Burada asıl itici güç protein yüzeyindeki

hidrofobik alanların ve hidrofobik ara yüzeylerin dehidratasyonu ile entropinin artmasıdır. Entropi, elektrostatik itmeyi yendiğinde adsorpsiyon meydana gelir. Bu durum adsorpsiyon ara yüzey gerilimin ve ara yüzey Gibbs serbest enerjinin azalması ile sonuçlanır. Yüzey geriliminin azalması köpükler ve emülsiyonlar içindeki geniş bir ara yüzey oluşumunu kolaylaştırır [19].

Adsorpsiyonu yöneten asıl güçler protein ve katı yüzeyler arasındaki elektrostatik etkileşimler ve hidrofobikliktir. Genel olarak protein molekülleri oluşumları esnasında hidrofilik yüzeylerden daha çok hidrofobik yüzeyler üzerinde değişirler. Bunun nedeni proteinin hidrofobik kısmı ile yüzeyin hidrofobik kısmının birlikte etkileşim halinde olmasıdır. Bazı çalışmalarda konsantrasyon arttığında hidrofilik yüzeyde adsorpsiyonun yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum konsantrasyon artışının protein üzerinde farklı etkilere neden olduğunu göstermiştir [20].

Katı/sıvı yüzeyler arasında protein adsorpsiyonu, biyomalzemelerin amaçlanan kullanım sonuçlarında kritik rol oynar. Böyle büyük bir öneme sahip olmasına rağmen katı yüzeyler üzerindeki protein adsorpsiyon mekanizması günümüze kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Protein adsorpsiyonu çalışmalarında yaşanan zorluklardan biri de protein adsorpsiyonu ile ilgili etkileşimler için uygun modellerin eksikliği olmuştur. Protein adsorpsiyonu birçok nedenden dolayı deneysel gözlemlerle açıklanamamaktadır. Adsorpsiyonun boyutu ve kinetiği proteinlerin ve daha çok katı yüzeylerin doğal yapısına bağlıdır [20].

Protein adsorpsiyonunu anlamak için protein kararlılığını bilmek gerekir. Proteinler genellikle iki gruba ayrılır. Yumuşak protein olarak bilinen proteinler iç kararlılığı düşük; sert protein olarak bilinen proteinler iç kararlılığı yüksektirler. Yumuşak ve bazı zamanlar sert (hidrofobik yüzeyler üzerinde) proteinler yapısal değişikliklere uğrarlar. Bu yapısal değişiklikler de entropi artışı elektrostatik itme gibi olumsuz durumları aşarak adsorpsiyonu gerçekleştirebilir [21].

Adsorpsiyonu gerçekleştiren faktörler arasında protein ve yüzey arasındaki eletrostatik etkileşim kuvvetleri vardır. Yüzey yüklendiğinde, elektrostatik etkileşim önemli bir rol oynar (çözelti pH'ına bağlı olarak). Sorbent yüzeyi tipine bağlı olarak negatif ya da pozitif yüklenebilir. Protein üzerindeki yükler grupların ayrılması ya da bağlanması ile

artar ya da azalırlar. Yapılan çalışmalarda izoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde protein adsorpsiyonunun maksimum değerde olduğu görülmüştür [21].

Sulu çözelti içindeki proteinlerde bulunan yüklü gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimleri anlamak ve ölçmek zordur. Elektrostatik etkileşimler uzun sürelidir. Bir proteinin elektrostatik serbest enerjisi yüklü gruplar arasındaki etkileşimleri içerir [21].

2.3.1 Yüzey Yükleri

Aminoasitlerinin yapısında bulunan amin ($-NH_2$) ve karboksil (-COOH) grupları; sulu çözeltilerinin asidik, bazik ya da amfoter karakter (bileşiğin hem asit hem de baz özelliği taşıması yani asidik ortamda baz, bazik ortamda asit gibi davranması) kazanmalarına neden olur [22].

Proteinler aminoasit kompozisonlarına bağlı olarak farklı izoelektrik nokta değerlerine sahiptirler ve pH=pI (izoelektrik pH) değerinde iyonlaşmış olmalarına rağmen dış ortama karşı nötral yapıda bulunmaktadırlar. Proteinler izoelektrik noktalarında çok düşük çözünürlük özelliği gösterirler. Proteinler izoelektrik nokta pH'ında yüksüz olup elektriksel bir alanda kutuplara hareket edemez durumdadırlar. İzoelektrik noktalarından daha düşük pH ortamında net pozitif yüke (H_3N^+-……-COOH) sahip olduklarından; anyonik polielektrolitlerle, izoelektrik noktalarından daha yüksek pH ortamında ise net negatif yüke (H_2N^- ……-COO−) sahip olduklarından katyonik polielektrolitlerle kuvvetli olarak etkileşirler [22].

2.4 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon bir yüzey ve ara kesit üzerinde madde birikimi ve derişiminin arttırılması veya gaz fazında çözünmüş halde bulunan maddelerin katı bir yüzey üzerinde kimyasal ve fiziksel kuvvetlerle tutunmaları işlemidir [23]. Adsorpsiyon olayı yüzeyi ilgilendiren bir olay olduğu için, bir katı veya bir sıvının yüzeyindeki konsantrasyon değişmesi olarak da tanımlanır [24]. Adsorplayıcı faz adsorban, adsorplanan faz ise adsorbat olarak adlandırılmaktadır [25].

Adsorpsiyon, maddenin sınır yüzeyinde moleküller arasındaki kuvvetlerin denkleşmemiş olmasından ileri gelir. Adsorbat molekülleri adsorban yüzeyindeki

atomların doyurulmamış kuvvetleri tarafından katı yüzeyine doğru çekilmektedir ve böylece dengelenmemiş yüzey kuvvetleri gaz veya çözünmüş adsorbat molekülleri tarafından dengelenmektedir. Bu olay, sistemin yüzey enerjisini azaltır ve yüzey enerjisini azaltma kendiliğinden gerçekleşen bir olaydır. Dolayısıyla adsorpsiyon olayı ile sistemin serbest enerjisinde bir azalma meydana gelir. Yani adsorpsiyon genellikle kendiliğinden gerçekleşen bir olaydır [26].

2.4.1 Adsorpsiyon Çeşitleri

Adsorplanan moleküller ile adsorplayıcı yüzey arasındaki çekim kuvvetlerinin türüne bağlı olarak üç farklı adsorpsiyon tipi bulunmaktadır; bunlar fiziksel, kimyasal ve değişim adsorpsiyonudur.

2.4.1.1 **Fiziksel Adsorpsiyon**

Fiziksel adsorpsiyon, katı yüzey ile adsorplanan madde molekülleri arasındaki fiziksel çekim kuvvetleri sonucu oluşan adsorpsiyon şeklidir. Zayıf Van der Waals kuvvetlerin etkisiyle meydana gelmektedir. Van der Waals kuvvetlerinin yanı sıra elektrostatik çekim kuvvetleri adsorpsiyon üzerinde etkilidir. Fiziksel adsorpsiyon tamamen tersinir olup, desorpsiyon söz konusudur. Fiziksel adsorpsiyon genellikle düşük sıcaklıkta gözlenir ve bağlı olarak düşük enerjili bir adsorpsiyon ile karakterize edilir. Sıcaklık arttıkça fiziksel adsorpsiyon genellikle azalmaktadır [27].

2.4.1.2 **Kimyasal Adsorpsiyon**

Adsorplanan maddenin, adsorban yüzeyindeki atomlar tarafından kimyasal bağ ile tutunması sonucu oluşur. Bununla beraber oluşan bağlar fiziksel adsorpsiyondaki bağlardan kuvvetlidir. Kimyasal adsorpsiyon yalnızca tek tabakalı olabilirken, fiziksel adsorpsiyon tek tabakalı veya çok tabakalı olabilir. Kimyasal adsorpsiyonda kuvvetli bağ oluşumu söz konusu olduğu için daha az tersinirdir ve desorpsiyon oldukça zordur [27].

2.4.1.3 **İyonik Adsorpsiyon**

Yüzeydeki yüklü bölgelere elektrostatik kuvvetler ile çözeltideki iyonik karakterde adsorplananların çekilmesi sonucu oluşur. Adsorpsiyon, adsorban ve adsorplananların

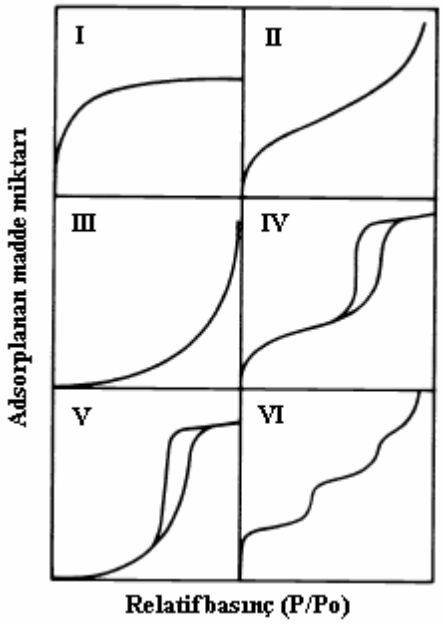
iyonik güçleri ve moleküler büyüklüklerine göre seçimli olarak oluşur eş yüklü iyon durumunda küçük iyon tercih sebebidir. Yüzeye tutunan iyonlara eş yüklü başka iyonların aynı anda yüzeyi terketmesi halinde ise sürece iyon değişimi adı verilir [28].

2.4.2 Adsorpsiyon İzotermleri

Adsorplanan madde miktarının basınç ya da derişim ile değişimini veren eğrilere adsorpsiyon izotermi denir. Adsorpsiyon izotermi, sabit sıcaklıkta denge koşullarının grafiğidir. Bir adsorbanın yüzey alanı ve gözenekliliğini anlama açısından adsorpsiyon izotermlerinden yararlanılır [29].

İzotermler gazlar için, kısmi basınca karşı mol yüzdesi şeklinde ifade edilir. Sıvılar konsantrasyon, ppm gibi bir kütle birimiyle gösterilirken, katı yüzeydeki konsantrasyon ise adsorbanın birim kütlesi başına adsorplanmış madde miktarı olarak ifade edilir [29].

IUPAC sınıflandırmasına göre belirlenmiş adsorpsiyon izoterm tipleri Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.5 IUPAC sınıflandırmasına göre adsorpsiyon izotermleri [27]

Tip I adsorpsiyon izotermi, aktif karbon, zeolit gibi mikrogözenekli katılarda görülmektedir. Katı yüzey ile adsorplanan moleküller arasındaki ilginin büyük olması sebebiyle, tek tabakalı adsorpsiyon çok düşük bağıl basınçlarda tamamlanmaktadır. Tip II adsorpsiyon izoterminde, tek tabakalı adsorpsiyon düşük bağıl basınçlarda

tamamlanırken, yüksek bağıl basınçlarda çok tabakalı adsropsiyon meydana gelmektedir. Bu tip izoterm daha çok mikrogözeneklerle birlikte açık yüzeyler içeren katılarda görülmektedir. Tip III adsorpsiyon izotermine katı ile adsorplanan madde arasındaki ilginin zayıf olduğu durumlarda rastlanmaktadır. Tip IV adsorpsiyon izotermi, Tip II izotermine benzerlik göstermekte, ancak, yüksek bağıl basınçlardaki adsorpsiyon, açık yüzeylerde değil, mezogözeneklerde meydana gelmektedir. Bu tip katılarda, kapiler kondenzasyonla (yoğuşma) mezogözeneklerin dolması ve boşalması arasında izlenen yolun farklı olması sebebiyle, histerisiz oluşumu gözlenmektedir. Tip V adsorpsiyon izotermi, mezogözenekler içeren homojen katı yüzeylerde düşük enerjili adsopsiyonda görülmekte, Tip VI adsorpsiyon izotermine ise, gözeneksiz yapıdaki katılarda rastlanmaktadır (30).

Adsorpsiyon izotermlerinin matematik açıdan uygun formüllerle ifadesi için farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu çalışmada yaygın olarak kullanılan Langmuir, Freundlich ve R-P modelleri incelenmiştir.

2.4.2.1 **Langmuir İzotermi**

Langmuir teorisi, 1918 yılında kinetik bakış açısı temelinde ortaya konmuş en eski adsorpsiyon izoterm modelidir [31]. Langmuir modeli homojen yüzeyler üzerinde adsorpsiyona uygulanır ve aşağıdaki kabullere dayanır;

- Adsorplanan moleküller arasında herhangi bir etkileşim yoktur.
- Adsorpsiyon tersinirdir.
- Adsorplayıcı yüzey homojendir ve adsorpsiyon enerjisi sabittir.
- Katı yüzeyine adsorplanan moleküller tek tabaka şeklindedir.

Langmuir izotermi aşağıdaki model denklemi ile ifade edilir;

$$q_e = \frac{Q.b.C_e}{1+b.C_e} \quad (2.1)$$

q_e: Birim adsorban üzerine adsorplanan madde miktarı (mg/g)

Q: Maksimum kapasite

b: Entalpi ile ilgili Lagmuir sabiti

C_e: Dengedeki adsorbat konsantrasyonu (mg/L)

Denklem (2.1)'de her iki tarafın tersi alınırsa;

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q.b.C_e} + \frac{1}{Q} \quad (2.2)$$

elde edilir ve bu denklem Langmuir denkleminin doğrusallaştırılmış şeklidir.

Deneysel olarak elde edilmiş $1/C_e$ değerlerine karşı çizilen $1/q_e$ grafiği bir doğru veriyorsa, adsorpsiyonun Langmuir modeline uyduğu söylenebilir. Langmuir izoterm sabitleri, Q ve b değerleri sırasıyla bu doğrunun kesim noktası ve eğiminden hesaplanabilir [27].

2.4.2.2 **Freundlich İzotermi**

Freundlich adsorpsiyon modeli en eski ampirik bağıntılardandır. Bu ampirik model birçok araştırmacı tarafından kullanılmış olsa da, 1932 yılında Freundlich tarafından kapsamlı bir şekilde kullanıldığı için bu ismi almıştır [31]. Freundlich modelinde adsorpsiyon tek tabakayla sınırlı değildir. Heterojen yüzey ve homojen olmayan adsorpsiyon ısısı temeline dayanan Freundlich izotermi aşağıdaki model denklemi ile ifade edilir;

$$q_e = K_F . C_e^{1/n} \quad (2.3)$$

Burada, K_F ve n değerleri sırasıyla adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon verimi hakkında bilgiler veren Freundlich izoterm sabitleridir.

(2.3)'te eşitliğin her iki tarafının doğal logaritması alındığında;

$$lnq_e = lnK_F + (1/n) lnC_e \quad (2.4)$$

elde edilir ve bu denklem Freundlich denkleminin doğrusallaştırılmış şeklidir. Deneysel olarak elde edilmiş lnC_e değerlerine karşı çizilen ln qe grafiği bir doğru veriyorsa, adsorpsiyonun Freundlich modeline uyduğu söylenebilir. Freundlich izoterm sabitleri, K_F ve n değerleri sırasıyla bu doğrunun kesim noktası ve eğiminden hesaplanabilir [27].

2.4.2.3 **Redlich-Peterson İzotermi (R-P)**

Redlich-Peterson (R-P) izotermi üç parametreli deneysel bir izoterm modelidir. Redlich-Peterson izotermi hem Langmuir hem de Freundlich izotermlerinin özelliklerini taşıyan hibrit bir adsorpsiyon modelidir ve ideal tek tabakalı bir adsorpsiyon mekanizmasını takip etmez. İzoterm denkleminde hem lineer hem de üstel bir ilişki olmasından ötürü adsorpsiyon modeli homojen ve heterojen sistemlerin ikisine de uygunluk

göstermektedir. Redlich-Peterson izotermi aşağıdaki model denklemi ile ifade edilir [32];

$$qe = \frac{KC_e}{1+\alpha C_e^{\beta}} \quad (2.5)$$

C_e: Dengedeki adsorbat konsantrasyonu (mg/L)

q_e: Birim adsorban üzerine adsorplanan madde miktarı (mg/g)

Burada K ve a izoterm sabitlerini, β ise 0 ile 1 arasında değişen katsayıyı ifade etmektedir. β= 1 olması durumunda denklem Langmuir izotermine indirgenir β= 0 olması durumunda ise Henry kanununa indirgenmiş olur [32].

2.4.3 Adsorpsiyon Kinetik Modelleri

Adsorpsiyon mekanizmasının aydınlatılabilmesinde deneysel verilerin yorumlanması oldukça önemlidir. Bu mekanizmanın anlaşılmasında adsorpsiyon kinetik modellerinden faydalanılması gerekmektedir.

Adsorpsiyon sistemlerinin reaksiyon derecelerini belirlemede birçok kinetik model kullanılmaktadır. Yalancı (pseudo) birinci derece ve yalancı (pseudo) ikinci derece kinetik modeller genel olarak uygulanan kinetik modellerdir. Her iki model denklem de dış film difüzyonu, yüzeyde tutunma ve partikül içi difüzyon gibi adsorpsiyonun tüm adımlarını kapsamaktadır ve bu nedenle yalancı modeller olarak adlandırılır [33].

2.4.3.1 **Yalancı (Pseudo) Birinci Derece Kinetik Model**

Yalancı (pseudo) birinci derece kinetik model denklemi Lagergren tarafından aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$\frac{dqt}{dt} = k_1.(q_e - q_t) \quad (2.6)$$

Burada k_1, birinci derece hız sabitini (dak^{-1}), q_e ve q_t ise sırasıyla dengedeki ve t anındaki kapasiteleri (mg/g) göstermektedir. Denklem (2.9)'unn t = 0 → q_t = 0 ve t = t → q_t = q_t sınır koşullarında entegre edilmesiyle; Denklem (2.7) elde edilir [27].

$$\log\left(\frac{q_e}{q_e - q_t}\right) = \frac{k_1.t}{2.203} \quad (2.7)$$

2.4.3.2 **Yalancı (Pseudo) İkinci Derece Kinetik Model**

Yalancı (pseudo) ikinci derece kinetik model denklemi adsorpsiyonun kimyasal sorpsiyonu da kapsadığı temelindedir [33] ve matematiksel denklemi;

$$\frac{dqt}{dt} = k_2.(q_e - q_t)^2 \quad (2.8)$$

şeklindedir. Burada k_2, ikinci derece hız sabitini (g/mg.dak), q_e ve q_t ise sırasıyla dengedeki ve t anındaki kapasiteleri (mg/g) göstermektedir. Denklem 2.8'in t = 0 → q_t = 0 ve t = t→ q_t= q_t sınır koşullarında entegre edilmesiyle; Denklem (2.9) elde edilir [34].

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2.q_e^2} + \frac{1}{q_e}t \quad (2.9)$$

2.4.3.3 **Partikül İçi Difüzyon Modeli**

Partikül içi difüzyon modeli Weber ve Morris tarafından geliştirilmiştir ve aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$q_t = k_i.t^{1/2} + C \quad (2.10)$$

Burada, k_i: Partikül içi difüzyon hız sabiti (mg/g. min^2), C: Adsorban ile adsorbat arasında oluşan tabakanın kalınlığı hakkında bilgi veren bir sabittir. Hız sabiti k_i, q_t'nin $t^{1/2}$ karşı çizilen grafiğinin eğiminden hesaplanır. C ise kesim noktası değerine eşittir [35].

2.4.4 Adsorban Malzemeler ve Özellikleri

Metaller ve plastikler de dahil olmak üzere, bir kristal yapıya sahip olsun ya da olmasın tüm katılar az veya çok adsorplama gücüne sahiptirler. Adsorplama gücü yüksek olan katılar gözenekli yapıdadırlar. Endüstride farklı kullanım alanlarına göre çok sayıda adsorban çeşidi bulunmaktadır. Genel olarak adsorbanlar yapay ve doğal olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

2.4.4.1 **Yapay Adsorbanlar**

Yapay adsorbanlar, maliyeti doğal adsorbanlara göre daha yüksek olan, ihtiyaca ve kullanım alanına göre istenilen özelliklerde (yüzey özellikleri) üretilebilen maddelerdir.

Bazı endüstriyel ve tarımsal atıklar (kül, atık çamur, talaş v.b.) dışında aktif karbon, silika jel, aktif alumina ve reçine belli başlı yapay adsorbanlardır [30].

- **Aktif Karbon**

Aktif karbon; odun, kömür gibi maddelerin pirolizi sonucu meydana gelir. Moleküler yapısı grafite benzer altıgen şekilde paralel yapılardan oluşsa da grafitteki gibi düzgün şekilde dizilmemiş olması adsorban özellik göstermesini sağlayan boşlukları (gözenekleri) meydana getirmektedir. Gözeneklerin yük yoğunluğu sıfırdır fakat adsorpsiyondan sorumlu olan Van der Waals kuvvetlerine sahiptirler [27].

Aktif karbon endüstride kullanılan önemli adsorbanlardan biridir. Geniş spesifik yüzey alanı, yüzeyinin yüksek derecede reaktivitesi ve uygun gözenek boyut dağılımı gibi spesifik özellikleri onu diğer adsorbanlardan farklı kılar. Aktif karbon üretiminde kullanılabilecek çok geniş aralıkta organik madde grubu vardır. Karbon olabilecek maddeler arasında bitkisel kökenli (odun, tarımsal atıklar, hindistan cevizi kabukları, meyve çekirdekleri v.b), mineral kökenli (kömür, linyit, turba, petrol koku) veya polimerik maddelere (plastikler, eskimiş lastikler) rastlanabilmektedir. Aktif karbonların spesifik özelliği, kullanılan ham maddeye ve üretim yöntemine bağlı olarak değişmektedir [30].

2.4.4.2 **Doğal Adsorbanlar**

Doğal adsorbanlar, kolay elde edilebilen, maliyeti düşük maddelerdir. Doğal adsorbanlara, kitosan, kil, zeolit, selüloz, kolajen, kömür ve doğal polimerik adsorbanlar örnek verilebilir.

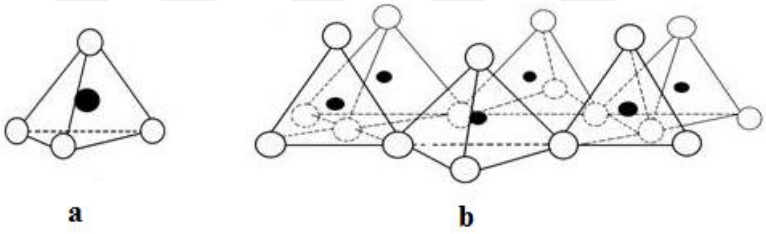
- **Kitosan**

Doğal bir biyopoliaminosakkarit olan kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Kitosan, pozitif yüklü ve yüksek yükleme özelliğine sahip bir polimer olduğundan dolayı günümüzde ilaç etken madde salım çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Kitosan, biyouyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan bir polimerdir [36]. Ağır metaller için etkin bir tutucudur. Ayrıca kitosan, selüloz gibi polimerlere eklenerek ağır metal iyonlarına karşı iyi adsorpsiyon özellikleri göstermiştir [37].

- **Killer**

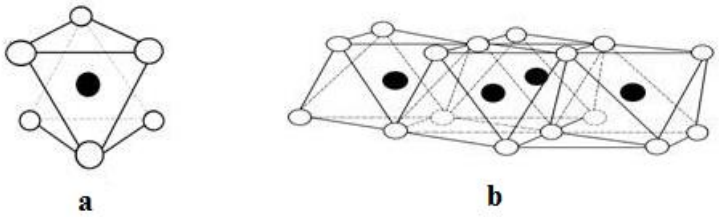
Killer doğada bol miktarda bulunan minerallerdir. Kili meydana getiren maddeler sulu alüminyum silikatlardır. Kil tanecik büyüklüğü 2 μ'den küçük olanların çoğunlukta olduğu, ısıtıldığında plastik, pişirildiğinde sürekli sert kalan hidrat alüminyum silikatların oluşturduğu karışımlardır [25]. Ağır metal gideriminde etkindirler. Killerin su tutma ve iyon değiştirme kapasiteleri yüksektir ve önemli miktarda demir ve alkali oksitler içerirler [38].

Killerin esas yapı taşları, Si, Al, Fe, Mg gibi iyonları ile oksijen atomları ve hidroksil gruplarıdır. Değişik iklim koşulları altında ayrışma ve parçalanma olaylarına bağlı olarak ortaya çıkan değişik kil tiplerinin yapı şekilleri başlıca iki temel üniteden kaynaklanmaktadır. Bunlardan birincisi, bir Si atomunun etrafına dizilmiş dört oksijen atomunun oluşturduğu Si tetrahedronudur [38].



Şekil 2.6 Bir tetrahedron ve silika tabakası [38]

İkinci ünite, bir Al atomu etrafında eşit uzaklıkta dizilmiş altı hidroksil iyonu ve/veya oksijen atomunun oluşturduğu Al-oktahedronudur [38]

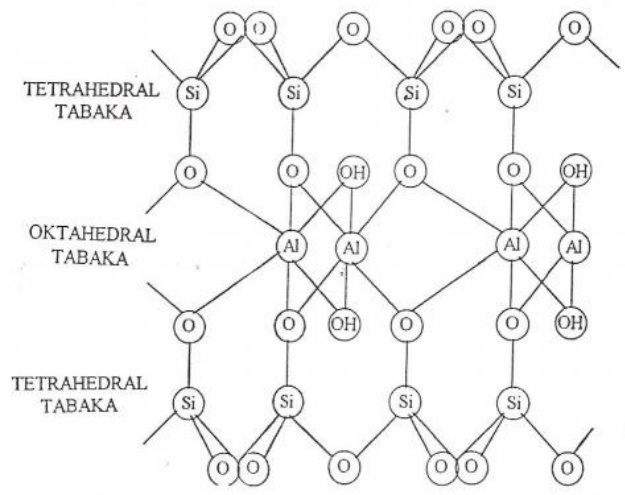


Şekil 2.7 Bir oktahedron ve alümina tabakası [38]

Kil mineralleri kilce zengin olan topraklara, plastiklik, şişebilme ve büzülebilme, iyonları ve molekülleri adsorbe ve desorbe etme yeteneği kazandırırlar. Yapısında kil bulunan smektit, sepiyolit ve kaolin gibi çok çeşitli sayıda toprak türü bulunmaktadır. Bunların arasında endüstride yaygın olarak kullanılan ve ülkemizde bol miktarda bulunan bentonit toprağı, yapısında %60-80 oranında montmorillonit kili bulundurmaktadır.

2.5 Bentonit

Bentonit esas minerali montmorillonit olan killer için yaygın ve ticari olarak kullanılan bir terim olup %60-80 oranında montmorillonit içeren yumuşak kolloidal özellikli bir alüminyum hidrosilikattır. Bentonit, suyla temasa geçince şişebilen, asitle aktiflendirilebilen geniş yüzey alanına sahip bir kil mineralidir. Bentonit 2:1 (tetrahedral-oktahedral-tetrahedral) yapılı simektit aile grubuna ait bir kil olup, doğada genellikle sodyum (Na) veya kalsiyum (Ca) bentonit halinde bulunur. Bentonit, geniş spesifik yüzey alanı, yüksek adsorpsiyon ve katyon değiştirme kapasitesine sahiptir. Ana minerali sodyum montmorillonit olan killere sodyum bentonit (NaB) kalsiyum montmorillonit olan killere ise kalsiyum bentonit (CaB) denir. NaB ve CaB karışımı olan bentonitlere de " Ara bentonit " olarak adlandırılır. Montmorillonit (MMT), bentonit kilinin bir minerali olup, smektit ailesinin (genişleyen kafes yapılı killer) bir üyesidir. Bazı bentonitlerin MMT oranı %90'a kadar çıkmaktadır. MMT'in genel formülü, $(Na,Ca)0,3(Al,Mg)_2(Si_4O_{10})(OH)2nH_2O$ şeklindedir. Montmorillonitin kimyasal yapısını alüminyum hidrosilikatlar oluşturmaktadır. MMT kil mineralinde, bir yapısal ünite 3 tabakadan meydana gelir. Ortada alüminyum iyonlarının yer aldığı oktahedral tabaka, her iki uçta, silisyum dioksidin oluşturduğu tetrahedral tabakalar tarafından sandviçlenmiştir. Tetrahedral ve oktahedral tabakalar arasında kuvvetli bir iyonik bağ olmasına karşın, kil minerallerinin üst üste gelmesiyle oluşan birim tabakalar birbirlerine zayıf bağlarla bağlanmıştır [38].



Şekil 2.8 Montmorillonitin kristal yapısı [38]

Bir MMT mineral taneciği, suyu giderilmiş halde yaklaşık 20 tane birim ünite içerir. MMT, negatif yüklü silikat tabakaları arasında değiştirilebilir katyonik türleri içeren tabakalı bir yapıya sahiptir. MMT'in negatif yükü, tabakalardaki Si atomunun Al atomuyla ya da Al atomunun Mg atomuyla yer değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. Bu negatif yük tabakalar arası bölgede bulunan katyonik türlerle (Ca^{+2}, Na^{+} gibi) dengelenmektedir. Killer, yüksek yüzey alanlarıyla adsorplama, negatif elektrik yükleri ile katyon değiştirme kapasitesine sahiptirler. Bir değişikliğe uğratılmamış kilin termal kararlığı 200^{o}C'ye kadar, yüzey alanı 30-70 m^2/g, tabakalar arası uzaklık 10-20 Å, asitlik 30 mmol/100 g'dır [38].

2.5.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

2.5.1.1 **Şişme Özelliği**

Bentonitleri diğer kil minerallerinden ayıran en önemli özeliktir. Şişme, bentonitin bünyesine fiziksel suyu alarak kristal yapısının genişlemesi olayıdır. Bentonit yaklaşık olarak kendi kütlesinin beş katı kadar suyu adsorbe edebilir ve bu suyu 100- 150°C gibi düşük sıcaklıklarda kaybeder. Bentonitler, kurutulduğu zaman ilk hacmine geri döner. Bentonitin bünyesindeki fiziksel su, kilin fiziksel ve kimyasal özeliğini kontrol eden en önemli faktördür [25].

2.5.1.2 **Katyon Değiştirme Özelliği**

Bentonitlerin yapısında bulunan Na\Ca^{++}, Mg^{++}, K^{+}, Al^{+++} gibi katyonlar inorganik ve organik katyonlarla yerdeğiştirme yeteneğine sahiptir. Bentonitlerin katyon değiştirme kapasiteleri ve hızları, iyon değiştirme ortamının koşullarına (sıcaklık, basınç, konsantrasyon, karışım vs), bentonit cinsine ve tane boyutuna bağlıdır. Katyon cinsine göre iyon değişim hızları aşağıda verilmektedir:

$Na^{+} < K^{+} < Ca^{++} < Mg^{++} < NH_4^{+}$

Bentonit kil mineralleri içinde kaolinitin iyon değişimi hızlı iken, Semektit/ Attapulgit ve illitin iyon değişimi oldukça yavaştır [39].

2.5.1.3 **Reolojik Özelliği**

Bentonitler akma noktası, akış tipi, viskozite gibi reolojik özeliğe sahiptir. Bu özelik kilin su içeriği ile değişir. Bentonitlerin bir çok kullanımının temelinde, katkı maddelerinin eklenmesi ile viskozite ve tiksotropi (görünür viskozitenin belli bir kayma hızında zamanla değişmesi) özeliklerindeki değişim gelmektedir [25].

2.5.1.4 **Adsorplama Özelliği**

Montmorillonit kil minerali diğer kil minerallerine göre daha yüksek yüzey alanına sahiptir (≈800 m^2/g). Yüzey alanının büyük kısmını mikro ve mezo gözenek duvarları oluşturmaktadır. Bu özeliğinden dolayı adsorplama kapasitesi oldukça yüksektir [25].

2.5.2 Kullanım Alanları

Bentonitlerin teknolojik önemi ana kil minerali simektitin türü ve çokluğu yanında değişebilen katyonların türü, değerliği ve miktarına, adsorpsiyon ve su tutma kapasitesine bağlıdır. Bentonitler doğal olarak kullanıldığı gibi asit aktivasyonu, iyon değişimi ve ısıtma işlemlerinden biri ya da birkaçı kullanılarak yeni ürünlere dönüştürülebilmektedir.

Bentonitlerin adsorplama özelikleri asit aktivasyonu ve organik maddeler ile etkileştirilerek artırılır. Bentonitler simektit mineralinin gözenekli yapısına, iyon değiştirme ve yüzey özeliklerine bağlı olarak seçici adsorplayıcı, ağartma toprağı, katalizör, katalizör yatağı, karbonsuz kopya kağıdı, iyon değiştirici, ağartma maddesi, ilaç endüstrisinde, membran, su ile plastikliği yüksek çamur oluşturduğundan seramik ve döküm endüstrisinde bağlayıcı olarak, delme akışkanının hazırlanmasında, demir cevherini paletlemede, suyun temizlenmesinde, inşaat alanındaki uygulamalarda, evcil hayvan toprağı üretiminde, organokil, polimerik kil, nanokil üretiminde olmak üzere 25'ten fazla alanda kullanılmaktadır. Bentonitin fizikokimyasal özelikleri bu uygulama alanlarında önemli rol oynamaktadır. Bentonitler ayrıca yüksek sıcaklık gerektiren döküm ve seramik endüstrisinde, sütunlaşmış killerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Termal işleme maruz bırakılan bentonitlerin şişme, plastiklik, kohesyon, katyon değiştirme kapasitesi, partikül büyüklüğü, adsorplama özelikleri, yüzey alanı, yüzey

asitliği, gözenek yapısı, katalitik aktivitesi ve minerolojisi gibi fizikokimyasal özelikleri değişmektedir [40].

2.6 Deneysel Tasarım

Deneysel tasarım, deneysel süreci etkileyen faktörlerin belirlenmesi, tanımlanması ve tasarımın deneysel modelinin geliştirilmesi amacıyla kullanılan önemli istatistiksel bir analiz metodudur. Deneysel tasarımın en temel amaçlarından biri deney hatalarını minimuma indirmektir [41]. Deneysel tasarım sayesinde minimum deney sayısı ile maksimum bilgi sağlanır. Deneysel tasarım metodu ile daha az deney yapılarak kullanılan malzemeden ve en önemlisi de zamandan büyük ölçüde tasarruf sağlanabilmektedir [34].

Deneysel tasarım ilk olarak 1920'lerde ünlü İngiliz istatistikçi R.A. Fisher ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Fisher aynı zamanda gözlemlenen veri gruplarının ortalamaları arasında önemli farklılıklarının olup olmadığının ölçülmesinde kullanılan varyans analizi (ANOVA) tekniğini de geliştirmiştir. Fisher aritmetik düzenlemenin en uygun yolunun varyans analizi olduğunu söylemiştir [42].

Varyans analizi (ANOVA), test edilen parça gruplarının ortalama performansları arasındaki farklılığı ortaya koymak için kullanılan istatistik temelli bir metottur. Deneysel tasarım temelde varyans analizine dayanmaktadır. Bu metot Fisher tarafından geliştirildiği için isminin baş harfinden dolayı F testi de denmektedir. Varyans analizinde, deneysel tasarımın bütün noktalarında değişkenliğin aynı olduğu varsayılmaktadır. Deney tasarımında istatistiksel analizin en önemli safhası varyans analizi tablosunun oluşturulmasıdır. Varyans analizi tablosunda yer alan istatistikleri teorik olarak hesaplamak zordur; bunun için de çaba gerektirir. Tablonun oluşturulmasında zor olan kısımlarından birisi, kareler ortalamalarının beklenen değerlerini bulunduran sütundaki hesaplamalardır. Bununla ilgili olarak tablonun hazırlanmasını kolaylaştıran pratik kurallar ve fomüller geliştirilmiştir [43]. Bunun yanı sıra pekçok bilgisayar programı ANOVA tablolarının oluşturulması için gerekli yazılıma sahiptir.

Çok sayıda deneysel tasarım yöntemi olmasına rağmen yaygın olarak kullanılan yöntemler dört başlık altında toplanabilir:

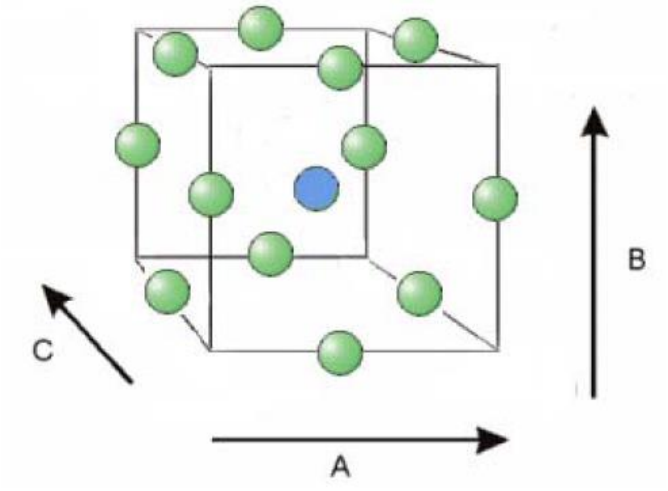
- Tam Faktöriyel Deneysel Tasarım
- Merkezi Bileşik Tasarım
- Box-Behnken Tasarımı
- Üç Seviyeli Faktöriyel Tasarım

Bu çalışmada Box Behnken Deneysel Tasarımı uygulanmıştır.

2.6.1 Box Behnken Deneysel Tasarımı

Box-Behnken Tasarımı üç seviyeli tamamlanmamış faktöriyel tasarım üzerinden oluşturulmuş ikinci dereceden çok değişkenli bir tasarım yöntemidir ve cevap yüzeylerinin maksimum ya da minimum noktalarının belirlenmesinde yaygınca kullanılmaktadır [44].

Box-Behnken tasarımları bağımsız, dönebilir ya da dönebilire yakın tasarımlardır. Bu tasarımların önemli avantajı, tüm faktörlerin eşzamanlı olarak en yüksek ya da en düşük seviyede oldukları deneyleri içermemeleridir. Üç faktörlü Box-Behnken Tasarımı örnek gösterimi Şekil 2.9'da gösterilmektedir. Yapılması gereken deneyler, küpün her bir kenarının ortasında ve merkezde yapılan tekrar deneylerinden oluşmaktadır. Böylelikle istenmeyen sonuçların elde edildiği sınır şartlar tasarımda yer almaz.



Şekil 2.9 Üç faktörlü Box-Behnken Tasarımı örnek gösterimi [44]

Box-Behnken Tasarımı üç seviyeli tasarımdır ve kodlama -1, 0 ve +1 olarak yapılır. Tasarım için gerekli olan deney sayısı (N), k faktör sayısı ve n_0 merkezde tekrarlanan deney sayısı olmak üzere $N = 2k(k\text{-}1)$ olarak hesaplanır [44].

2.6.2 Cevap Yüzey Analizi

Cevap Yüzey Analizi, ilk olarak Box ve Wilson tarafından endüstriyel deneyler için geliştirilmiş olup deneylerin tasarlanmasında, bunlara modeller türetilmesinde ve bu deneylerden alınacak cevaplar için en iyi şartların belirlenmesinde kullanılan istatistiksel ve matematiksel metotlardan derlenmiş bir yöntemdir [44]. Cevap Yüzey Analizi'nde ilk adım cevap değişkeni üzerinde etkisi olduğu düşünülen etkenleri (bağımsız değişkenler) belirlemektir [45]. Cevap yüzey analizi ile sınırlı sayıda deneyle sürece etki eden faktörlerin optimize edilmesi sağlanır. Tek değişkenli metotta bağımsız parametreler arasındaki etkileşimler incelenemezken Cevap Yüzey Analizi'nde bağımsız parametreler arasındaki etkileşimin cevap üzerindeki etkisini incelemek mümkündür [34].

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kimyasal Maddeler

Deneylerde Sigma-Aldrich markalı, sığır proteini (bovine serum albumin, BSA) ve Ordu ili Ünye/Fatsa yöresine ait kalsiyum bentonit (CaB) kullanılmıştır.

Tampon çözeltileri hazırlamak için Sigma-Aldrich markalı, analitik saflıkta sodyum klorür (NaCl), monosodyum fosfat (H_2NaO_4P), disodyum hidrojen fosfat (HNa_2O_4P), fosforik asit (H_3PO_4), sodyum asetat ($CH_3COONa.3H_2O$) ve glacial asetik asit (CH_3COOH) kullanılmıştır.

3.1.1 Sığır Proteini (Bovine Serum Albumin, BSA)

Adsorpsiyon deneylerinde kullanılan Sigma Aldrich markalı sığır proteini (bovine serum albumin, BSA) 6-8℃'de buzdolabında saklanmıştır. BSA çözeltileri haftalık olarak taze hazırlanmış ve bu süreçte buzdolabında bekletilmiştir. BSA proteininin genel özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 BSA'nın genel özellikleri [15]

Molekül ağırlığı (Da)	66430
Aminoasit sayısı	585
İzoelektirik noktası (pI)	4,7-4.9
Difüzyon katsayısı (m^2/s)	$5,9x10^{-11}$
Hacmi (Protein kristal yapı, υ_c, nm^3)	84,5
1% çözelti pH'ı	5,2-7
Görünüşü	Soluk sarı

3.1.2 Kalsiyum Bentonit (CaB)

Protein adsorpsiyonunda adsorban olarak kullanılan, Ordu ili Ünye/Fatsa yöresine ait bentonit toprağı Ünye Madencilik'ten temin edilmiştir. Montmorillonit içeriği %80-85 arasında olan, saflığı ve beyazlığı son derece yüksek CaB'in içeriği ve genel özellikleri Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te verilmiştir. CaB parçacık boyutu 150-500 µm olacak şekilde elenip 105^oC'de etüvde nemi giderildikten sonra adsorpsiyon deneylerinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Kalsiyum bentonit (CaB) içeriği [46]

	SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	TiO	CaO	MgO	Na_2O	K_2O	P_2O_5
Bileşim (%)	73,5	13,5	0,76	0,13	1,72	1,67	0,32	1,17	0,02

Çizelge 3.3 Kalsiyum bentonitin genel özellikleri [47]

Kimyasal formül	$Ca_{0.33}(Al,Mg)_2(Si_4O_{10})(OH)_2 \cdot nH_2O$
Yüzey alanı	749 m^2/g [48]
Özgül ağırlık	2,51 g/cm^3
pH	8,5-10,5
Kil grubu	Smektit
Katyon değişim kapasitesi	78,6 meq/100g
Erime noktası	> 450 ^oC
Çözünürlük	< 0,9 mg/L (20 ^oC, su içerisinde)

3.2 Kullanılan Cihazlar

Kalsiyum bentonitin karakterizasyonu ve protein adsorpsiyonu deneylerinde aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır.

- UV spektrofotometre (ANALYTIC JENA SPECORD 200)
- pH metre (EUTECH αlpha-pH1000)
- Hassas terazi (OHAUS Pioneer)
- Çalkalamalı su banyosu (GFL 1083)
- Etüv (MMM Ecocell)
- FT-IR (NICOLET iS50)
- Zetasizer (MALVERN 3000 HSA)
- XRD(Philips Panalytical X'Pert Pro)
- SEM (CamScan Announces the Apollo 300)
- TGA/DTA (SII TG/DTA7200 EXSTAR)

3.3 Kalsiyum Bentonitin Karakterizasyonu

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve X-Işını Kırınımı (XRD) Spektroskopisi kullanılarak kalsiyum bentonitin yapısı incelenmiştir. Boehm titrasyonu ve FTIR analizleri ile yapıdaki fonksiyonel gruplar belirlenmiştir. Yapıda bulunan su miktarı ve sıcaklığın yükselmesiyle yapıdaki diğer bileşenlerin uzaklaşması TG/DTA analizleri ile tespit edilmiştir. Ayrıca, adsorpsiyon mekanizmasının açıklanmasında yararlanılacak zeta potansiyeli ölçümleri ve pH titrasyonu analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri

CaB'in yapısı CamScan Announce the Apollo 300 markalı Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. SEM analizi için numuneler N_2 atmosferinde otomatik püskürtmeli kaplayıcı yardımıyla ince bir altın tabaka ile kaplanmıştır.

3.3.2 X-Işını Kırınımı (XRD) Ölçümleri

CaB numunesinin kristal yapısı, X ışınlarının 45 kV ve 40 mA değerlerinde CuKα tüpünde üretildiği Philips Panalytical X'Pert Pro X-Işını Difraktometre cihazıyla incelenmiştir.

3.3.3 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Termogravimetrik analiz, numunenin inert atmosferde belirli bir ısıtma hızı ile ısıtılırken zamanla kütle kaybının kaydedilmesi prensibine dayanmaktadır. Kütle kaybının sebebi su ve benzeri uçucu bileşenlerin artan sıcaklıkla beraber yapıdan uzaklaşmasıdır. Gözenekli malzemelerin üretilebilmesi için uçucu bileşenlerin yapıdan uzaklaştırılması gerekir [32]. Termogravimetrik analiz SII TG/DTA7200 EXSTAR marka TGA cihazı kullanılarak 25℃-1100℃ sıcaklık aralığında 4 mg CaB miktarı ile platin kroze içinde 30℃/dakika ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir.

3.3.4 FT-IR Analizi

FT-IR cihazı ile kimyasal bağ analizi ve madde içerisindeki fonksiyonel grupların saptanması sağlanmaktadır. NICOLET iS50 markalı Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi, CaB'in yapısında bulunan fonksiyonel grupların tayin edilmesinde kullanılmıştır.

3.3.5 pH Titrasyonu Ölçümleri

pH titrasyonu analizleri aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir. Her birinde 10 mL hacminde 0,1 M NaCl elektrolit çözeltisi bulunan 21 adet erlen içine 0,1 ila 4 mL arasında değişen hacimlerde 0,1 N NaOH veya 0,1 N HCl eklenmiştir. Hazırlanan çözeltilerin hacmi destile su ile 15 ml'ye tamamlandıktan sonra, çözelti pH'ları ölçülmüştür. Hazırlanan çözeltilerin içine 120^{o}C'de 2 saat tutularak nemi giderilmiş

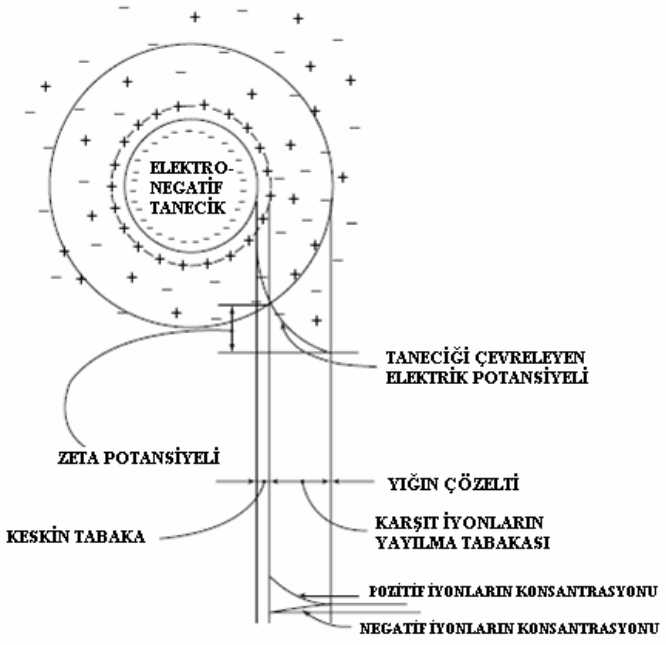
numuneden 75 mg eklenip, pH'ları tekrar ölçülmüştür. Kaydedilen her iki pH değeri, eklenen asit ve baz hacimlerine karşı çizilmiş ve bu eğriler arasındaki fark alınarak pH titrasyonu eğrileri oluşturulmuştur [27].

3.3.6 Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Kolloidal tanecikler dispersiyon ortamında iyon adsorbe ederler. Pozitif ve negatif olarak yüklenirler. Her tanecik pozitif ve negatif yüklü oluşuna göre aksi yöndeki iyonlarla çevrelenebilir ve tek tabakalı bir yapı oluşur (Şekil 3.1). Bu tabakanın etrafında da taneciğe bağlı olmayan, hareketli ikinci iyon tabakası yer almaktadır. Bu tabakaya Helmholtz çift tabakası denir. Çift tabakanın dışında da pozitif iyonların negatif iyonlara eşit olduğu nötral bir bölge vardır. Taneciğin yüzeyi ile bu nötral bölge arasındaki potansiyel farkına zeta potansiyel denir. Diğer bir deyişle, zeta potansiyeli taneciğin yüzeyi üzerindeki net etkili yükü göstermektedir. Zeta potansiyeli, kolloidal dağılımların stabilitesinin değerlendirilmesinde önemlidir ve Denklem (3.1) ile hesaplanabilir.

$$\xi = \frac{V}{E}\frac{4\pi\eta}{\varepsilon} \times (9 \times 10^4) \qquad (3.1)$$

ξ, zeta potansiyeli (volt); V, göç etme hızı (cm/sn); η, dispersiyon ortamının viskozitesi (poise); E, potansiyel farkı (volt/cm) [27].



Şekil 3.1 Zeta potansiyelinin şematik gösterimi [27]

Zeta potansiyeli ölçümleri Malvern firması tarafından üretilmiş Zetasizer 3000 HSA marka cihazda gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.3.5'te anlatılan pH titrasyonu analizleri için hazırlanan örnekler son pH değerleri okunduktan sonra plastik şırınga yardımıyla cihaza enjekte edilmiş ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Her bir örnek için iki ayrı enjeksiyon ve her seferinde üç ayrı okuma yapılmıştır. pH ile zeta potansiyeli değişimi grafiksel olarak incelenmiştir.

3.3.7 Asidik ve Bazik Grupların Tayini

Adsorbanların iyon değişim ve adsorpsiyon özelliklerinin belirlenebilmesi için yapısındaki fonksiyonel grupların tayin edilmesi son derece önemlidir. CaB yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları belirlemek amacıyla Boehm (1966 ve 2002) tarafından belirlenmiş ve kendi adıyla anılan titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Boehm titrasyonuna göre asidik ve bazik yüzey gruplarının tayini, farklı kuvvetlerdeki alkali çözeltileri ile nötralizasyon temeline dayanır [27]. Boehm titrasyonu için, partikül boyutu 150-500 µm olacak şekilde elenip 105^{o}C'de etüvde nemi giderilen CaB numunesinden 0,2 g kadarı 100 mL'lik erlenlere tartılmış ve üzerlerine 20 mL hacminde 0,1 N konsantrasyonunda NaOH çözeltisinden eklenmiştir. Karışımlar çalkalayıcıda 130 devir/dak hızla 24 saat süreyle çalkalandıktan sonra süzülmüştür. Fonksiyonel grupları tayin etmek için süzüntüden 5 mL alınarak metil kırmızı indikatörü kullanılarak 0,1 N HCl ile titre edilmiştir.

Çalışma kapsamında CaB'in yapısındaki bazik yüzey gruplarının konsantrasyonu benzer şekilde 0,1 N HCl çözeltisi ile nötralize edildikten sonra fenolftalein indikatörü kullanılarak 0,1 N NaOH ile titre edilmesiyle tayin edilmiştir. Tüm analizler iki defa tekrar edilerek hatalar en aza indirgenmiştir.

3.4 Protein Adsorpsiyonu Deneyleri

BSA proteininin CaB üzerine adsorpsiyonunda çalışma pH'sı, başlangıç konsantrasyonu ve sıcaklık gibi parametrelerin etkisi deneysel adsorpsiyon izotermleri ile incelenmiştir. Bu amaçla deneysel çalışmalarda 0,1-1,2 mg/mL konsantrasyon aralığında; 25℃, 32,5℃, 40℃ sıcaklıklarda, pH 2,8, 4,8, ve 6,8 değerlerindeki tampon çözeltilerle

çalışılmıştır. Adsorpsiyon deneylerinde 150-500 μm aralığına öğütülmüş ve 105℃'de bir gece tutularak nemi giderilmiş CaB kullanılmıştır.

3.4.1 Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

50mM Sodyum Fosfat Tamponu (pH 2,8): 4,79 g NaH_2PO_4 tartılıp, bir miktar 0,01 M NaCl çözeltisinde çözülmüştür. Üzerine 0,68 mL H_3PO_4 (saflık %85) eklenip, 0,01 M NaCl çözeltisiyle 1 L'ye tamamlanmıştır.

10mM Sodyum Asetat Tamponu (pH 4,8): Glacial asetik asitten (saflık %99,5) 0,287 mL ve 0,68 g $CH_3COONa.3H_2O$ alınarak, 0,01 M NaCl ile çözülmüş ve 1 L'ye tamamlanmıştır.

100mM Sodyum Fosfat Tamponu (pH 6,8): 5,99 g NaH_2PO_4 ve 7,098 g Na_2HPO_4 tartılarak, 0,01 M NaCl ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 0,05 M'lik çözelti elde edilmiştir.

3.4.2 BSA Analizi

BSA konsantrasyonu UV Spektrofotometre'de 280 nm dalga boyunda 1cm'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülmüştür. Belirlenen her bir pH değeri için kalibrasyon eğrileri ayrı ayrı oluşturulmuştur. Hazırlanan 2 mg/mL stok BSA çözeltileri uygun tampon çözelti içinde 0-1,2 mg/mL konsantrasyon aralığına seyreltilmiştir. Kalibrasyon eğrileri 0-0,2-0,5-0,8-1-1,2 mg/mL BSA çözeltileri kullanılarak oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin R^2 değerleri pH 2,8; 4,8 ve 6,8 için sırasıyla 0,9995; 0,9999 ve 1,0 şeklindedir.

3.5 Deneysel Tasarımın BSA Adsorpsiyonuna Uygulanması

BSA adsorpsiyonuna pH, sıcaklık ve başlangıç konsantrasyonu parametrelerinin etkisi Box-Behnken deneysel tasarım metodu uygulanarak incelenmiştir. Elde edilen deneysel veriler Design Expert yazılım programına aktarılarak model denklemler geliştirilmiştir. Elde edilen deneysel veriler Statistica 13.0 yazılım programına aktarılarak üç boyutlu yüzey grafikleri elde edilmiştir. Geliştirilen model denklemler ve üç boyutlu yüzey grafikleri kullanılarak pH, sıcaklık ve başlangıç konsantrasyonunun BSA adsorpsiyonuna etkileri incelenmiş ve en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir.

Box-Behnken üç seviyeli bir deneysel tasarımdır ve kodlama -1, 0 ve +1 olarak yapılır. Tasarım için gerekli olan deney sayısı (*N*), *k* faktör sayısı ve n_0 merkezde tekrarlanan deney sayısı olmak üzere $N = 2k(k\text{-}1)+n_0$ olarak hesaplanır [44]. Deneysel tasarım için 12 adet deney ve deneysel hataları belirlemek amacıyla orta noktada gerçekleştirilen 3 adet tekrar deneyi olmak üzere 15 adet deneyden oluşan bir deney planı oluşturulmuştur. Deneysel tasarım için seçilen faktör ve seviyeler ile deney planı sırasıyla Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 Box-Behnken tasarımı için faktör ve seviyeler

	Faktör		
Seviye	**X_1 (pH)**	**X_2 (C_0, mg/mL)**	**X_3 (T, ℃)**
-1	2,8	0,2	25
0	4,8	0,6	32,5
1	6,8	1	40

Çizelge 3.5 Box-Behnken tasarımı deney planı

Deney No	**X_1 (pH)**	**X_2 (C_0, mg/mL)**	**X_3 (T, ℃)**
1	-1	1	0
2	0	1	1
3	0	0	0
4	0	0	0
5	1	0	1
6	0	-1	-1
7	1	0	-1
8	0	0	0
9	-1	0	1
10	-1	0	-1
11	1	1	0
12	0	-1	1
13	0	1	-1
14	-1	-1	0
15	1	-1	0

3.6 BSA Adsorpsiyonunun Kinetik İncelemesi

Kinetik çalışma için 0,5 mg/mL konsantrasyonunda BSA çözeltisi kullanılmıştır. Hazırlanan 100 mL BSA çözeltisi içine 0,42 g adsorban eklenmiş ve kinetik çalışma başlatılmıştır. Kinetik çalışma boyunca karışımlar çalkalayıcıda 130 rpm'de çalkalanmıştır. Kinetik çalışmanın 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90 ve 120. dakikalarında karışımlardan enjektörler yardımıyla örnekler alınmış ve 0,45 µm membran filtreden süzülmüştür. Alınan her 1 mL örnek çalışma pH'ındaki tampon çözeltiden 5 mL ilave edilerek seyreltilmiş ve daha sonra BSA konsantrasyonu ölçülmüştür.

BSA adsorpsiyon kapasiteleri (q_t) Denklem (3.2)'deki gibi hesaplanmıştır.

$$q_t = (C_0 - C_t)\frac{V}{m} \tag{3.2}$$

Burada q_t, t anındaki adsorpsiyon kapasitesini (mg/g); C_0 başlangıçtaki BSA konsantrasyonunu (mg/mL); C_t, t anındaki BSA konsantrasyonunu (mg/mL); V, BSA çözeltisinin hacmini (mL) ve m, adsorban miktarını (g) ifade etmektedir.

Adsorpsiyon prosesinin hız ifadesinin belirlenmesinde yalancı (pseudo) birinci derecede, yalancı (pseudo) ikinci derece ve parçacık içi difüzyon kinetik modelleri kullanılmıştır.

3.7 Adsorpsiyon İzotermlerinin Oluşturulması

Deneysel adsorpsiyon izotermlerini oluşturmak için öncelikle seçilen pH (2,8, 4,8 ve 6,8) değerlerindeki tampon çözeltiler içinde 500 mL 1 mg/mL'lik stok BSA çözeltileri ve bu stok çözeltiler kullanılarak 0,1; 02; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; ve 1,2 mg/mL BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA çözeltilerinden 20 mL alınmış ve her birine 0,1 g CaB ilave edildikten sonra 1 saat boyunca belirlenen sıcaklıklarda (25℃, 32,5℃ ve 40℃) çalkalayıcıda 130 rpm'de çalkalanarak adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon sonrası karışımlar mavi bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzülmüş ve süzüntüdeki BSA konsantrasyonu ölçülmüştür.

Adsorpsiyon izotermleri denge BSA konsantrasyonlarına karşı adsorpsiyon kapasite değerleri çizilerek elde edilmiş ve adsorpsiyon kapasiteleri (q_e) Denklem (3.3)'teki bağıntı ile hesaplanmıştır.

$$q_e = (C_0 - C_e)\frac{V}{m} \tag{3.3}$$

Burada q_e, denge durumundaki adsorpsiyon kapasitesini (mg/g); C_0 başlangıçtaki BSA konsantrasyonunu (mg/mL); Ce, denge durumundaki BSA konsantrasyonunu (mg/mL); V, BSA çözeltisinin hacmini (mL) ve m, adsorban miktarını (g) ifade etmektedir.

3.7.1 Deneysel Verilerin Teorik Adsorpsiyon İzoterm Modellerine Uygunluğunun İncelenmesi

İki parametreli Freundlich ve Langmuir; üç parametreli Rendlich-Peterson (R-P) izoterm modellerinin deneysel verilere uygunlukları doğrusal olmayan regresyon (nonlinear regression) ile incelenmiştir.

Deneysel adsorpsiyon verilerinin teorik modellere uygunluğu *STATISTICA 13.0* programı kullanılarak incelenmiştir. *STATISTICA 13.0* programı; veri analizi, veri yönetimi, veri görselleştirme gibi konularla ilgili çözümler için kapsamlı bir alan oluşturur. Program ile deneysel verilere uygun model tahminleri yapılabilmektedir. *STATISTICA 13.0* programında doğrusal olmayan regresyon yöntemi kullanılarak teorik modellerin katsayıları hesaplanmıştır.

Geliştirilen model denklemlerin istatistiksel açıdan anlamlılığı varyans (ANOVA) analizi ve kalanların (teorik değerler ile deneysel değerler arasındaki fark) normal olasılık dağılım grafikleri ile incelenmiştir. Varyans analizi için güvenilirlik %95 alınmıştır. ANOVA tablosunda F değerinin büyük, p değerinin ise 0,05'ten küçük olması geliştirilen modelin %95 güvenilirlik seviyesinin üstünde olduğunu gösterir. Kalanların normal olasılık dağılım eğrilerinin düz çizgi etrafında dağılması varyansın homojenliğinin bir göstergesidir.

Deneysel verilerin adsorpsiyon izoterm modellerine uygunlukları ki-kare (χ^2) , yüzde hata ve korelasyon katsayıları (R^2) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlerin hesaplannması için Denklem (3.4), (3.5) ve (3.6) kullanılmıştır.

$$\chi^2 = \frac{\sum_1^N \left[\frac{(q_e - q_m)^2}{q_m}\right]}{N} \quad (3.4)$$

$$Hata\ (\%) = \frac{\sum_1^N \left[100.\frac{(q_e - q_m)}{q_e}\right]}{N} \quad (3.5)$$

$$R^2 = \frac{\sum[(q_m - q_{e,ort})^2]}{\sum(q_m - q_{e,ort})^2 + (q_m - q_e)^2} \quad (3.6)$$

Burada q_e, $q_{e,ort}$ ve q_m sırasıyla deneysel denge adsorpsiyon kapasitesi (mg/g), deneysel denge adsorpsiyon kapasitelerinin ortalaması (mg/g) ve teorik denge adsorpsiyon kapasitesi (mg/g) değerlerini, *N* ise toplam deneysel veri sayısını ifade etmektedir. Deneysel verilerin adsorpsiyon izoterm modellerine uygunluğu yüksek korelasyon katsayısı, düşük ki-kare ve düşük yüzde hata değerleri ile belirlenebilir.

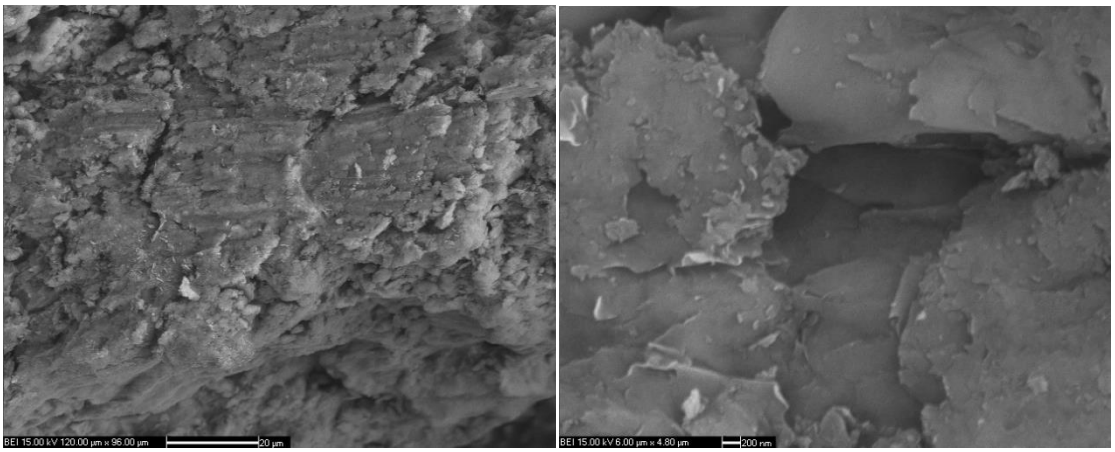
BÖLÜM 4

DENEYSEL ÇALIŞMALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.1 Kalsiyum Bentonitin Karakterizasyonu

4.1.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

Kalsiyum bentonitin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntülerine bakıldığında (Şekil 4.1-a) gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Yapısında bulunan silikat tabakaları Şekil 4.1-b'de belirgin olarak gözükmektedir. Bu tabakalı yapının adsorpsiyonda etkili olduğu düşünülmektedir.

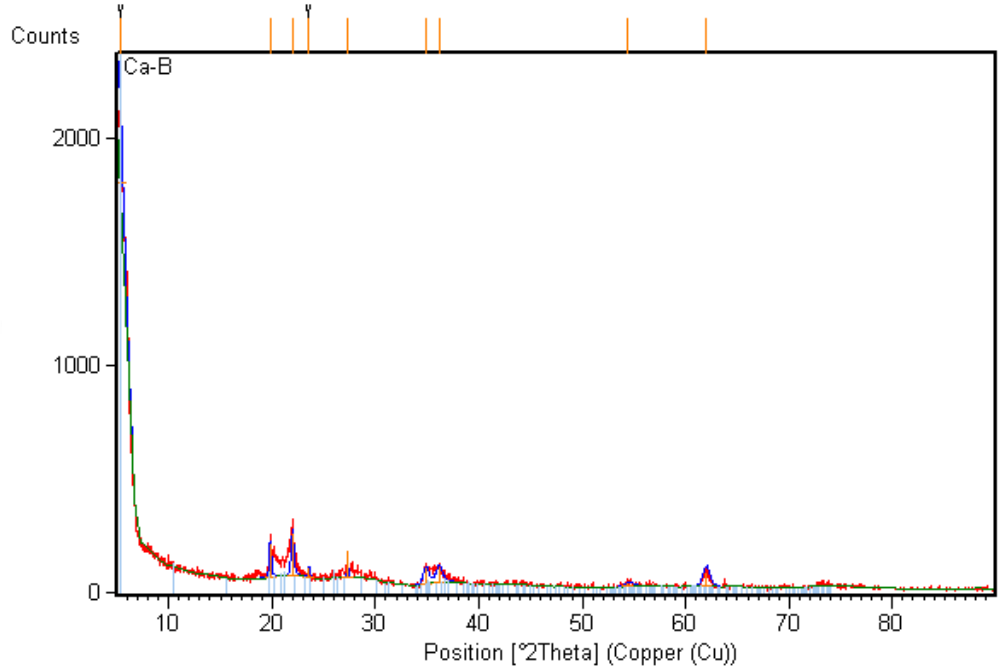


a b

Şekil 4.1 Kalsiyum bentonitin SEM görüntüleri (a:1000x; b:20000x)

4.1.2 X-Işını Kırınımı (XRD) Görüntüleri

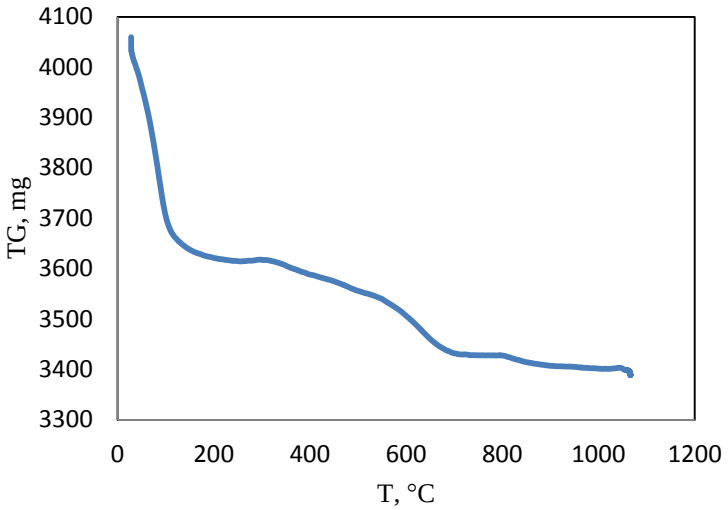
Kalsiyum bentonite ait XRD grafiği Şekil 4.2'de görülmektedir. XRD cihazının kütüphanesinden yararlanılarak CaB'in büyük oranda montmorillonit yapıda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2 Kalsiyum bentonitin XRD grafiği

4.1.3 TG/DTA Analizi

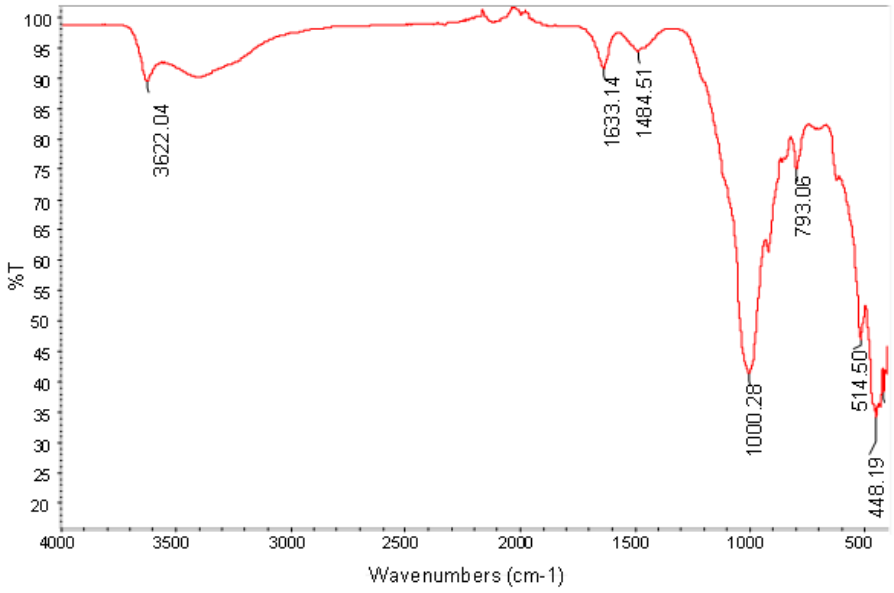
Kalsiyum bentonite ait TG eğrisi incelendiğinde (Şekil 4.3), 100-200°C sıcaklık aralığında adsorplanmış suyun uzaklaşmasından kaynaklanan kütle kaybı (%6,23) görülmektedir. 600-800°C sıcaklık aralığındaki kütle kaybı (%5,80) ise yapıdaki –OH gruplarının uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.3 Kalsiyum bentonitin TG grafiği

4.1.4 FT-IR Analizi

Kalsiyum bentonitin FTIR spektrumunda (Şekil 4.4) 3622 cm^{-1}'de Si–O yüzeyine zayıf hidrojen bağı ile bağlı su moleküllerinin gerilim titreşim bandı gözlenmiştir. 3402 cm^{-1}'de ise adsorplanan su moleküllerinin yayvan bandı gözlenmiştir. 1633 cm^{-1}'de gözlenen band suyun hidroksilinin deformasyon bandıdır. 1000 cm^{-1} dolaylarında gözlenen oldukça büyük pik, tetrahedral tabakadaki Si–O–Si gruplarının Si–O gerilim titreşimiyle ilgilidir. Son olarak 514 cm^{-1} ile 448 cm^{-1}'de gözlenen bantlar sırasıyla oktahedral Si–O–Al ve Si–O–Si bükülme titreşimlerinin varlığını göstermektedir [49].

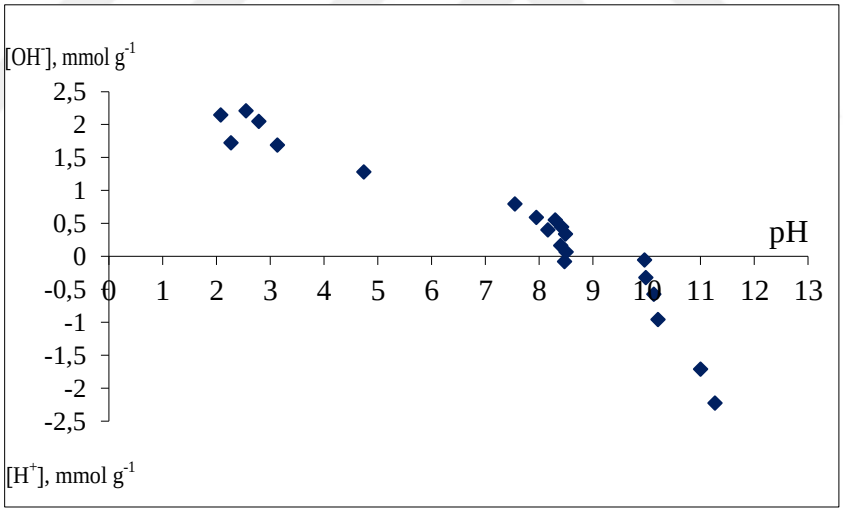


Şekil 4.4 Kalsiyum bentonitin FT-IR spektrumu

4.1.5 pH Titrasyonu Ölçümleri

Ortam pH'ı ile yüzey yükünün değişimini gösteren proton bağlama eğrilerinin şekli adsorban üzerindeki fonksiyonel grupların tipi ve iyonlaşma kabiliyetleri hakkında fikir verir.

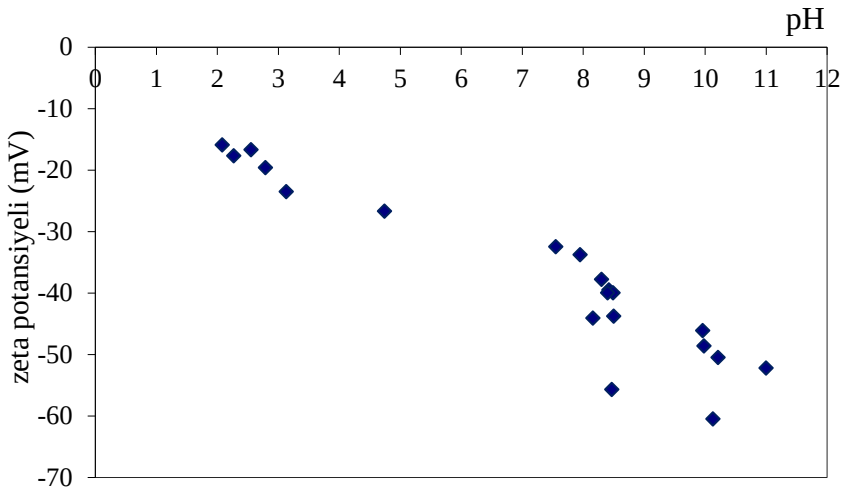
Kalsiyum bentonit numunesine ait proton bağlama eğrisi Şekil 4.5'te görülmektedir. Şekil 4.5 incelendiğinde CaB'in pH 2 ile pH 8,4 değerleri arasında pozitif; pH 10 değerini geçtikten sonra ise negatif yüzey yüküne sahip olduğu görülmektedir. CaB yüzeyinin nötr olduğu pH aralığı 8,4 –10'dur. Proton bağlama eğrisinin x eksenini kestiği nokta "sıfır yük noktası" (point of zero charge, PZC) olarak bilinir [27]. CaB'in proton bağlama eğrisi incelendiğinde sıfır yük noktasının bir aralık şeklinde olduğu görülmektedir. Buna göre CaB'in sıfır yük noktası pH 8,4-10 aralığıdır denilebilir. CaB pH 8,4 değerine kadar protonlanmıştır ve pozitif yüzey yüküne sahiptir, dolayısıyla anyonlara karşı çekiciliği fazladır. Sıfır yük noktasının üzerindeki pH'larda ise (pH >10) yapıdaki asidik yüzey gruplarının iyonlaşması nedeniyle yüzey negatif yüklenir ve katyonlara karşı ilgisi artar.



Şekil 4.5 Kalsiyum bentonitin proton bağlama eğrisi

4.1.6 Zeta Potansiyel Ölçümleri

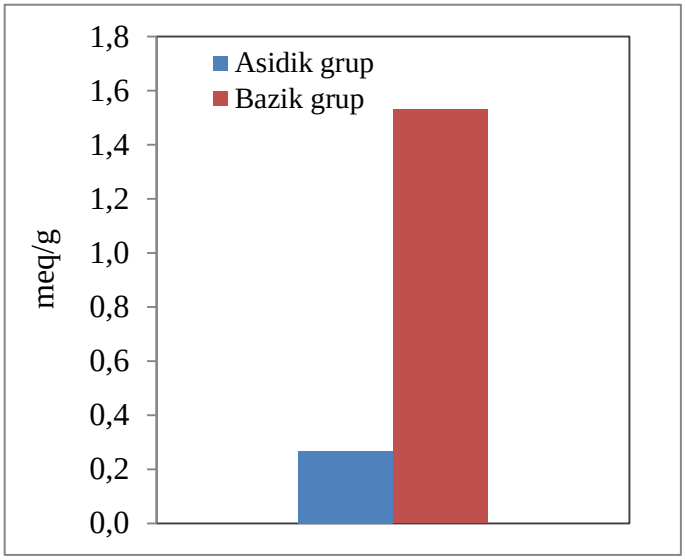
Kalsiyum bentonitin pH ile zeta potansiyeli değişimi grafiksel olarak incelenmiştir (Şekil 4.6). Şekil 4.6 incelendiğinde CaB'in çalışılan pH aralığında (2,8-6,8) negatif zeta potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6 Kalsiyum bentonitin zeta potansiyel eğrisi

4.1.7 Asidik ve Bazik Grupların Tayini

Kalsiyum bentonitin yapısında bulunan asidik ve bazik gruplar Şekil 4.7'de verilmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde CaB yapısında bulunan toplam bazik yüzey gruplarının konsantrasyonu asidik gruplara kıyasla çok daha fazladır. Toplam bazik gruplar 1,5 meq/g iken, toplam asidik gruplar 0,3 meq/g'dır. Bu veriler ışığında CaB'in bazik yapıda olduğu söylenebilir.



Şekil 4.7 Kalsiyum bentonit yapısında bulunan asidik ve bazik gruplar

4.2 BSA Adsorpsiyonunun Deneysel Tasarımla İncelenmesi

Box-Behnken uygulanarak gerçekleştirilen BSA adsorpsiyon deneyleri sonucu elde edilen deneysel adsorpsiyon kapasiteleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1 incelendiğinde en yüksek kapasite değeri pH 4,8 değerinde, 1 mg/mL BSA konsantrasyon ve 40°C sıcaklıkta 171,226 mg/g elde edilirken, en düşük kapasite değeri ise pH 6,8 değerinde 0,2 mg/mL konsantrasyon ve 32,5°C sıcaklıkta 3,000 mg/g olarak elde edilmiştir. Orta noktalarda yapılan 3 tekrar deneyi sonucu elde edilen kapasite değerleri 91,808 mg/g ile 87,956 mg/g değerleri arasında değişmektedir.

Çizelge 4.1 Box Behnken tasarımı BSA adsorpsiyon deney sonuçları

Deney No	X_1 (pH)	X_2 (C_0, mg/mL)	X_3 (T, ℃)	qe (mg/g)
1	-1	1	0	67,6938
2	0	1	1	171,2263
3	0	0	0	87,9568
4	0	0	0	88,9640
5	1	0	1	46,0318
6	0	-1	-1	31,2402
7	1	0	-1	7,4609
8	0	0	0	91,8080
9	-1	0	1	50,4995
10	-1	0	-1	56,4504
11	1	1	0	26,5005
12	0	-1	1	30,8044
13	0	1	-1	144,3602
14	-1	-1	0	27,2016
15	1	-1	0	3,0000

4.2.1 Model Denklemin Geliştirilmesi

Box-Behnken uygulanarak farklı pH, sıcaklık ve başlangıç konsantrasyonu değerleri için elde edilen BSA adsorpsiyon kapasiteleri Design-Expert programına aktarılarak model denklem geliştirilmiştir. Model denklemlerin anlamlılığı Design-Expert programı kullanılarak gerçekleştirilen ANOVA analiziyle incelenmiştir. Öncelikle Box-Benkhen tasarımına uygun olarak program tarafından önerilen kuadratik model denenmiştir. Ancak kuadratik model uygulandığında modele ait p-değeri değeri 0,0955 bulunmuştur. Bilindiği gibi elde edilen modelin anlamlı olabilmesi için p-değeri değerinin seçilen güveilirlik sınırının %95'in üstünde yani 0,05'ten küçük olması beklenir. Ayrıca R^2 değeri 0,8596 ve deneysel kapasite değerleri ile teorik kapasite değerleri arasındaki hataların ortalaması %77,13 bulunmuştur. Dolayısıyla bu deneysel veriler için kuadratik modelin kullanılmasının anlamsız ve hatalı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kuadratik modelden sonra kullanılabilecek, ikili etkileşimleri de içeren kübik model uygulandığında ise model denkleme ait p-değeri (Prob > F) değeri 0,0015 bulunmuştur. Bu değer 0,01'den küçük olduğu için %99 önem seviyesi şartını sağlamaktadır ve kübik modelin istatistiksel olarak %99'un üzerinde anlamlı olduğunu gösterir. Seçilen kübik modele ve katsayılara ait ANOVA analizi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Kübik modele ait ANOVA analizi sonuçları

	Kareler Toplamı	Sebestlik Derecesi	Karelerin Ortalaması	F-Değeri	P-Değeri Prob > F
Model	32288,08	12	2690,67	674,56	0,0015
X_1	714,41	1	714,41	179,11	0,0055
X_2	16070,89	1	16070,89	4029,04	0,0002
X_3	174,64	1	174,64	43,78	0,0221
X_1X_2	69,66	1	69,66	17,46	0,0528
X_1X_3	495,57	1	495,57	124,24	0,008
X_2X_3	186,35	1	186,35	46,72	0,0207
X_1^2	11755,41	1	11755,41	2947,13	0,0003
X_2^2	16,71	1	16,71	4,19	0,1773
X_3^2	178,79	1	178,79	44,82	0,0216
$X_1^2X_2$	4505,38	1	4505,38	1129,52	0,0009
$X_1^2X_3$	4,79	1	4,79	1,20	0,3874
$X_1X_2^2$	16,93	1	16,93	4,25	0,1755

Kübik model ile geliştirilen model denklemin korelasyon katsayısı (R^2) 0,9998 değeri ile 1'e oldukça yakın bulunmuştur. Seçilen deneysel tasarım yöntemi kübik modeldeki üçlü etkileşimleri içerecek şekilde tasarlanmadığından, Design Expert programı model denklemi geliştirirken model denklemdeki bazı ikili ve üçlü etkileşimleri diğer terimlerin içinde ifade etmiştir. Buna göre; $X_1X_3^2$ ikili etkileşimi X_1 ve $X_1X_2^2$ parametrelerinin katsayıları içinde; $X_2^2X_3$ ikili etkileşimi X_3 ve $X_1^2X_3$'ün katsayıları içinde; $X_2X_3^2$ ikili etkileşimi X_2 ve $X_1^2X_2$'nin katsayıları içinde; X_1^3 etkileşimi X_1 katsayısı içinde; X_2^3 etkileşimi X_2 katsayısı içinde; X_3^3 etkileşimi X_3 katsayısı içinde gösterilerek modele eklenmiştir. $X_1X_2X_3$ değeri kesim noktası içinde denklemde ifade edilmektedir.
Kübik model ile geliştirilen model denkleme ait katsayılar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 Geliştirilen model denkleme ait katsayılar

Parametre	**Katsayı**
	89,5763
X_1	-13,3643
X_2	63,3855
X_3	6,6075
X_1X_2	-4,1730
X_1X_3	11,1308
X_2X_3	6,8255
X_1^2	-56,4248
X_2^2	-2,1275
X_3^2	6,9587
$X_1^2X_2$	-47,4625
$X_1^2X_3$	1,5478
$X_1X_2^2$	-2,9098

Çizelge 4.3'te verilen katsayılar model denklem olarak ifade edildiğinde aşağıdaki polinom elde edilir.

$$Y = 89{,}5763 - 13{,}3643X_1 + 63{,}3855X_2 + 6{,}6075X_3 - 4{,}1730X_1X_2 + 11{,}1308X_1X_3 + 6{,}8255X_2X_3 - 56{,}4248X_1^2 - 2{,}1275X_2^2 + 6{,}9587X_3^2 - 47{,}4625X_1^2X_2 + 1{,}5478X_1^2X_3 - 2{,}9098X_1X_2^2 \quad (4.1)$$

Elde edilen model denklemde sistem üzerinde hangi parametrenin daha etkili hangisinin daha az etkili olduğu, katsayıların mutlak değerlerine bakılarak karar verilir. Katsayılara ait negatif ve pozitif işaretler ise parametrelerin (X_1, X_2 ve X_3) cevabı (Y) hangi yönde etkilediğini gösterir.

Denklem (4.1) incelendiğinde, en büyük katsayı ile başlangıç konsantrasyonu (X_2) en etkili parametre iken, en küçük katsayı ile sıcaklığın (X_3) en az etkili parametre olduğu görülmektedir. Başlangıç konsantrasyonuna ve sıcaklığa ait katsayının pozitif olması başlangıç konsantrasyonunun ve sıcaklığın artmasıyla birlikte adsorpsiyon kapasitesinin arttığını; çözelti pH'ına (X_1) ait katsayının negatif olması ise pH'ın artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin azaldığını göstermektedir.

Seçilen model denklemin deneysel verilere uygunluğu % hata ve X^2 değerleri ile incelenmiştir (Çizelge 4.4). ki-kare (X^2) ve hata (%) değerleri Denklem (3.4)-(3.5) kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4 Box Behnken tasarım sonuçları ve hata değerleri

Deney No	X_1 pH	X_2 (mg/mL)	X_3 (℃)	qe, deneysel (mg/g)	qe, model (mg/g)	Hata (%)	X^2
1	-1	1	0	67,6938	67,3940	0,44286	$1,33x10^{-3}$
2	0	1	1	171,2263	171,2260	0,00018	$5,25x10^{-10}$
3	0	0	0	87,9568	89,5763	1,84131	$2,92x10^{-2}$
4	0	0	0	88,9640	89,5763	0,68829	$4,18x10^{-3}$
5	1	0	1	46,0318	46,0319	0,00043	$8,68x10^{-10}$
6	0	-1	-1	31,2402	31,2400	0,00051	$8,19x10^{-10}$
7	1	0	-1	7,4609	7,4599	0,01273	$1,20x10^{-7}$
8	0	0	0	91,8080	89,5763	2,43080	$5,55x10^{-2}$
9	-1	0	1	50,4995	50,4990	0,00091	$4,19x10^{-9}$
10	-1	0	-1	56,4504	56,4500	0,00058	$1,92x10^{-9}$
11	1	1	0	26,5005	26,4999	0,00208	$1,14x10^{-8}$
12	0	-1	1	30,8044	30,8040	0,00120	$4,44x10^{-9}$
13	0	1	-1	144,3602	144,3600	0,00014	$2,77x10^{-10}$
14	-1	-1	0	27,2016	27,2020	0,00176	$8,46x10^{-9}$
15	1	-1	0	3,0000	2,9999	0,00167	$8,33x10^{-10}$

Çizelge 4.4 incelendiğinde en düşük hata değeri (%0,00014) pH 4,8'de başlangıç konsantrasyonunun en yüksek olduğu (1,0 mg/mL) ve sıcaklığın en düşük olduğu (25℃) deneyden elde edilmiştir. En yüksek hata değeri ise (%2,43080) orta noktada yapılan tekrar deneylerinden elde edilmiştir. Ortalama hata değeri %0,36169 olarak bulunmuştur. Hata değerlerinin küçük olması BSA protein adsorpsiyon kapasitesini belirlemek için geliştirilen model denklemin seçilen çalışma aralıklarında uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

4.2.2 Proses Parametrelerinin Optimizasyonu

Optimum proses parametrelerin belirlenmesi için Design-Expert programı menüsünde bulunan Optimizasyon işleminden yararlanılmıştır. Optimizasyon işleminde çekicilik fonksiyonları elde edilerek BSA adsorpsiyon kapasitesinin maksimum olması hedeflenmiştir. Box-Behnken deney tasarımı temelinde yapılan optimizasyonda pH (X_1) değeri (0) olarak belirlenirken, başlangıç konsantrasyonu (X_2) ve sıcaklık (X_3) için normal çalışma aralığı (X_2, X_3 = (-1) – (+1)) seçilmiştir. Belirtilen çalışma aralıkları çerçevesinde Design-Expert tarafından önerilen çözümler arasında en yüksek çekicilik fonksiyonu değerine sahip olan seçenek seçilmiş ve optimum proses parametreleri belirlenmiştir. Elde edilen optimum proses parametreleri ve adsorpsiyon kapasitesi Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5 Optimum proses parametreleri

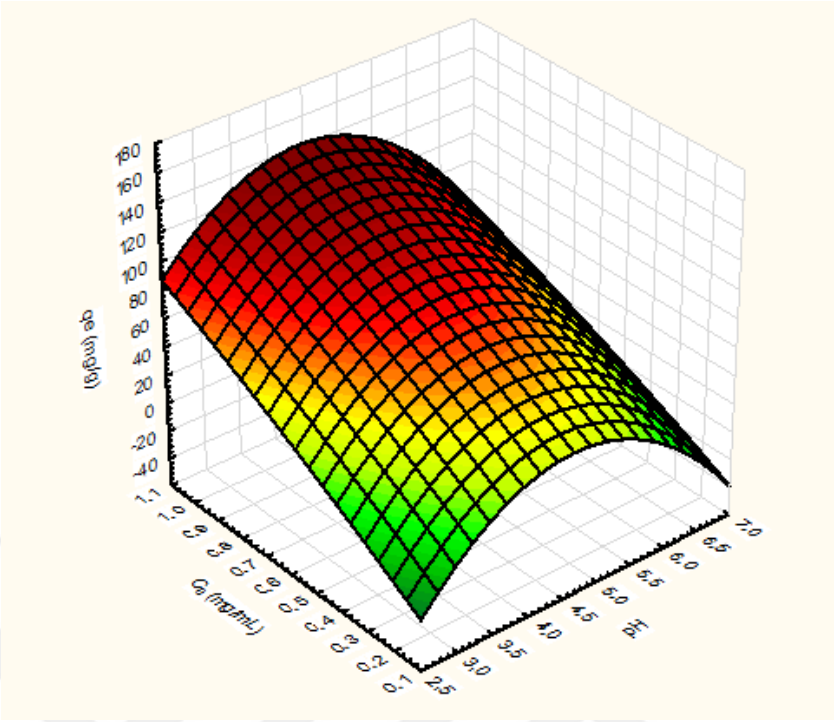
	X_1 (pH)	X_2 (C_0, mg/mL)	X_3 (T, °C)	qe, model (mg/g)	qe, deneysel (mg/g)
Box-Behnken Tasarım	4,8 (0)	1,0 (1)	40 (1)	171,225	170, 351

Çizelge 4.5 incelendiğinde maksimum adsorpsiyon kapasitesi, belirlenen pH değeri 4,8'de optimum başlangıç konsantrasyonu ve optimum sıcaklık her ikisi için de maksimum değerde elde edilmiştir.

4.3 Cevap Yüzey Grafikleri

CaB üzerine BSA adsorpsiyonunu etkileyen parametrelerin (başlangıç konsantrasyonu, pH ve sıcaklık) etkisinin daha net bir şekilde gözlemlenebilmesi için yüzey grafikleri Statistica 13.0 programı kullanılarak oluşturulmuştur.

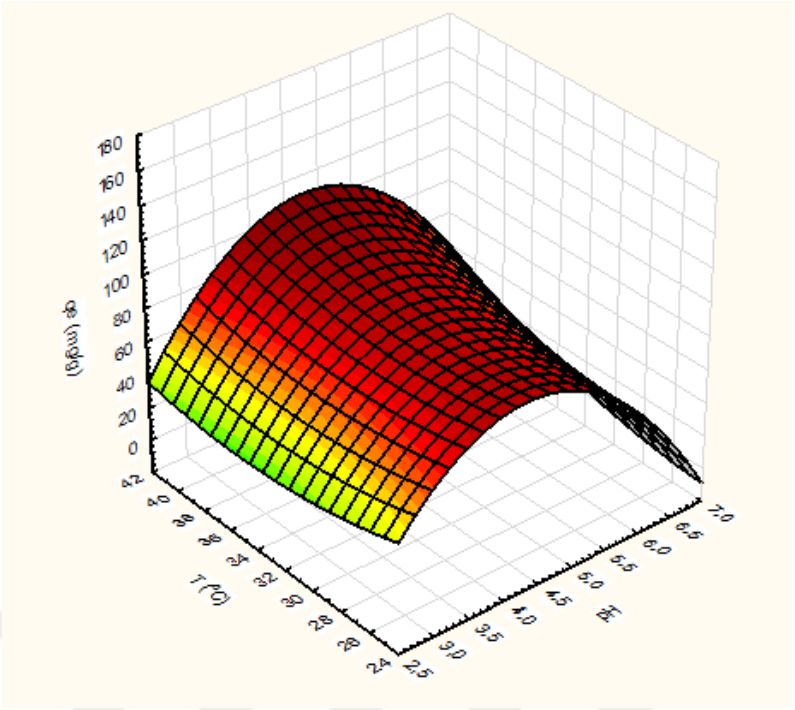
BSA adsorpsiyon kapasitesini pH ve başlangıç konsantasyonuyla ilişkilendiren yüzey grafiği Şekil 4.8'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi adsorpsiyon kapasitesi pH 4,8 değerine kadar artış gösterirken, pH 4,8'de maksimum değerine ulaşmış, sonrasında ise azalmaya başlamıştır. Adsorpsiyon kapasitesi konsantrasyonun artmasıyla birlikte doğrusal bir artış göstermiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi 144,36 mg/g değeri ile pH 4.8'de ve 1 mg/mL başlangıç konsantrasyonunda görülmüştür.



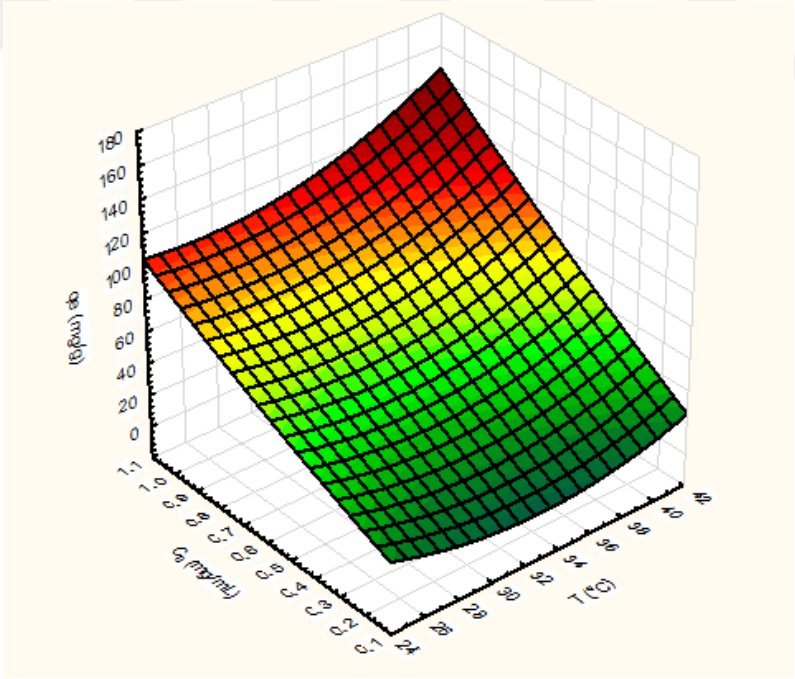
Şekil 4.8 pH ve başlangıç konsantrasyonuna bağlı cevap yüzey grafiği

BSA adsorpsiyon kapasitesini pH ve sıcaklıkla ilişkilendiren cevap yüzey grafiği Şekil 4.9'da gösterilmektedir. Adsorpsiyon kapasitesi başlangıçta sıcaklığın artmasıyla birlikte azalırken 32.5℃'den itibaren tekrar artmaya başlamıştır ve 40℃'de maksimum değerine ulaşmıştır. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (qe= 171,2263 mg/g) pH 4,8'de ve sıcaklığın en yüksek olduğu değerde (40℃) elde edilmiştir.

BSA adsorpsiyon kapasitesini sıcaklık ve başlangıç konsantrasyonu ile ilişkilendiren cevap yüzey grafiği Şekil 4.10'da gösterilmektedir. En yüksek BSA adsorpsiyon kapasitesi (qe= 171,2263 mg/g) sıcaklığın (40℃) ve başlangıç konsantrasyonunun (1 mg/mL) en yüksek olduğu noktada elde edilmiştir.



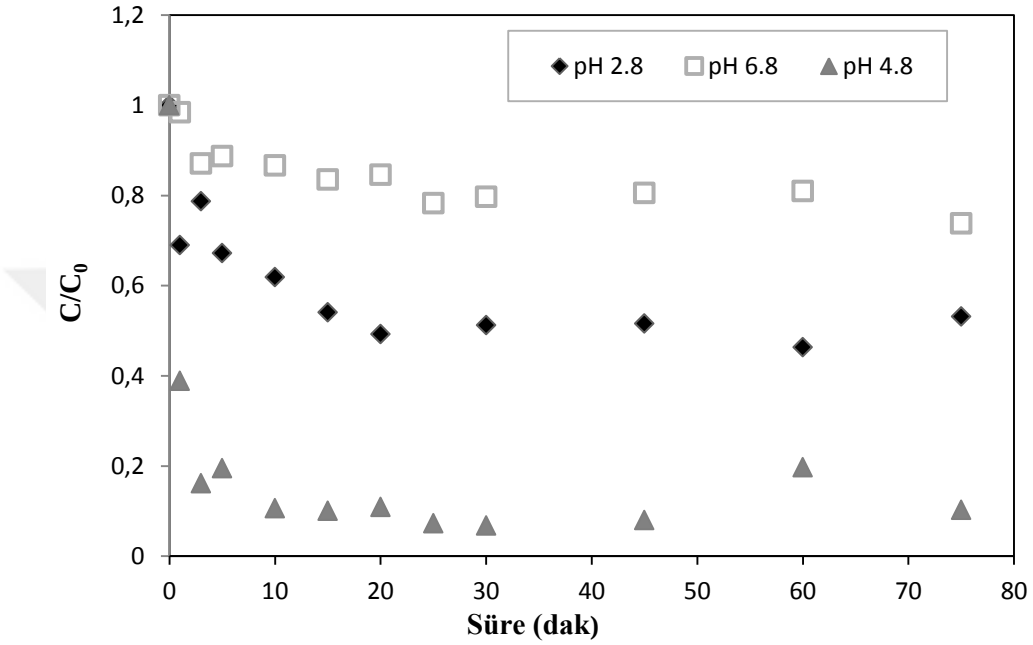
Şekil 4.9 pH ve sıcaklığa bağlı cevap yüzey grafiği



Şekil 4.10 Sıcaklık ve başlangıç konsantrasyonuna bağlı cevap yüzey grafiği

4.4 Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon işlemi boyunca, BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 4.11'de görülmektedir. Şekil 4.11 incelendiğinde, pH 2,8'de 15. dakikada; pH 4,8'de 10. dakikada; pH 6,8'de ise 5. dakikada adsorpsiyon işleminin tamamlandığı görülmektedir. pH arttıkça dengeye ulaşma süresi azalmıştır.



Şekil 4.11 BSA konsatrasyonunun zamanla değişimi

4.4.1 Kinetik Modelleme

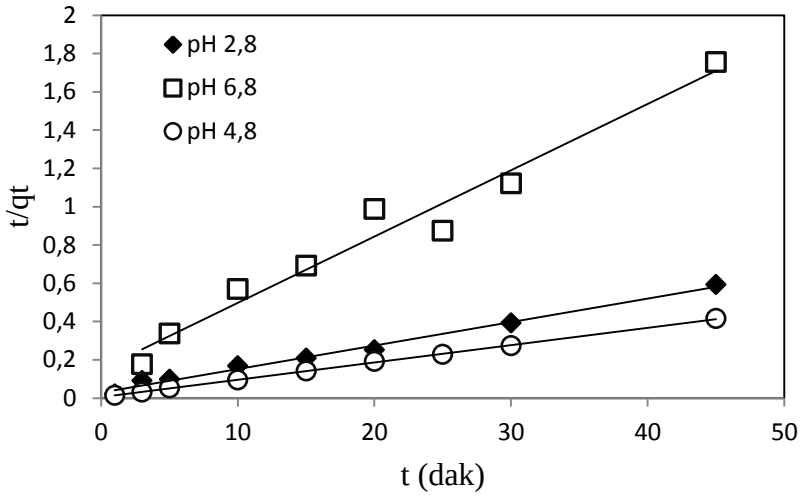
Kinetik adsorpsiyon deneyleri sonucu elde edilen deneysel veriler yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece kinetik modellerine ve parçacık içi difüzyon modeline uygulanmıştır.

BSA'nın CaB üzerine adsorpsiyon kinetiğinin yalancı (pseudo) birinci derece kinetik modele uyup uymadığı zamana karşı log (qe-qt) grafikleri çizilerek incelenmiştir. Ancak tüm deneysel koşullar için ayrı ayrı çizilen eğrilerin hiçbiri bir doğru denklemi vermemiştir. Çizelge 4.6'da verilen doğrusallaştırılmış Lagergren denklemine ait korelasyon katsayısı değerleri incelendiğinde deneysel sonuçların birinci derece kinetik modele kesinlikle uymadığı görülmektedir.

BSA'nın CaB üzerine adsorpsiyon kinetiğinin parçacık içi difüzyon modeline uygunluğu zamana karşı çizilen $t^{1/2}$-qt grafiği ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen

deneysel veriler ışığında adsorpsiyon kinetiğinin parçacık içi difüzyon modeline uymadığı görülmektedir.

BSA'nın CaB üzerine adsorpsiyon kinetiğinin yalancı (pseudo) ikinci derece kinetik modele uygunluğu zamana karşı çizilen t/qt grafiği ile incelenmiştir (Şekil 4.12). Tüm deneysel koşullar için çizilen eğrilerin her biri ayrı bir doğru denklemi vermiştir. Bu doğru denklemlerinden hesaplanan ikinci derece hız sabiti (k2) ve teorik denge kapasitesi (qe) değerleri ile korelasyon katsayıları Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.12 BSA adsorpsiyonunun yalancı ikinci derece kinetik modele uydurulması

Kinetik modellere uygunluk R^2 değerlerine bakılarak anlaşılabilmektedir. CaB'in tüm pH değerlerinde yalancı ikinci derece kinetik modeline uyduğu 0,95 ile 0,99 arasında değişen R^2 değerlerine bakılarak izlenebilir. Çizelge 4.6'da verilen adsorpsiyon hız sabiti değerleri incelendiğinde CaB için artan pH ile hız sabitlerinin arttığı açıkça görülmektedir.

Çizelge 4.6 Kinetik modelleme sonuçları

pH	**Yalancı birinci derece**	**Yalancı ikinci derece**		**Parçacık içi difüzyon**
	R^2	k_2 (g/mg.dak)	R^2	R^2
2,8	0,6039	0,0051	0,9917	0,727
4,8	0,3455	0,00797	0,9942	0,7175
6,8	0,727	0,0166	0,9652	0,7388

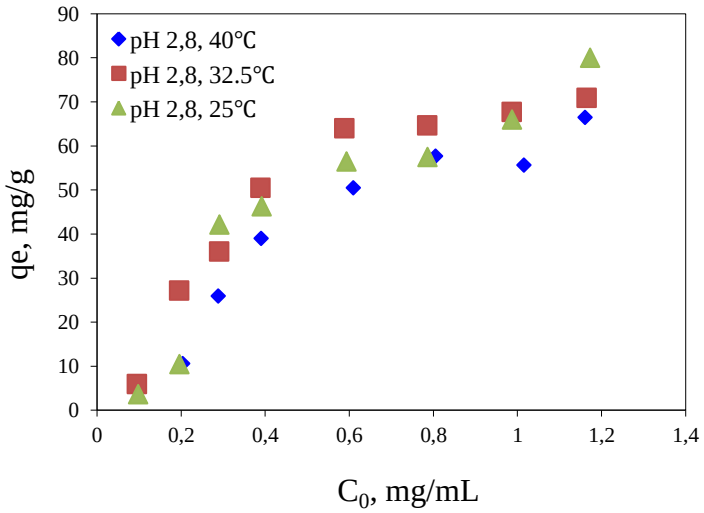
Yalancı ikinci dereceden kinetik modele uygunluk, adsorpsiyonda kimyasal ve/veya güçlü etkileşimlerin etkili olduğununun bir ifadesidir. CaB'in yapısının büyük gözeneklerden oluşan katmanlar olması dolayısıyla BSA'nın kolay adsorplandığı düşünülmektedir.

4.5 BSA Proteininin Adsorpsiyon İzotermlerinin Değerlendirilmesi

4.5.1 Sıcaklığın Etkisi

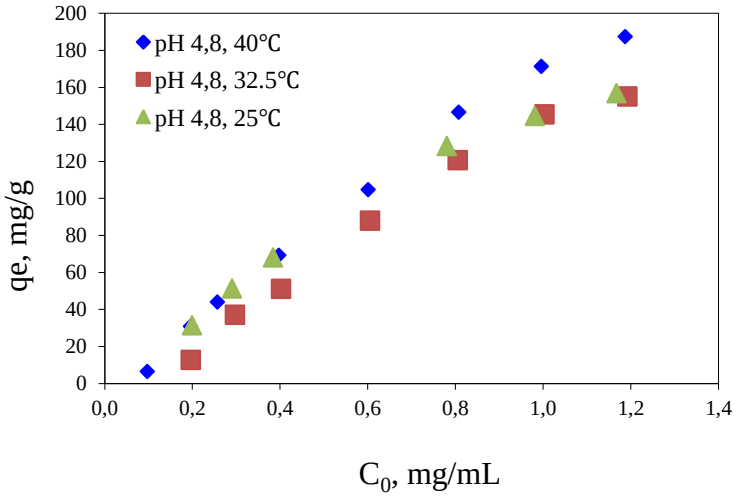
Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda sabit pH'da farklı sıcaklık değerlerinde, başlangıç konsantrasyonuna (C_0) karşılık denge adsorpsiyon kapasiteleri (qe) elde edilmiştir.

pH 2,8'de belirlenen sıcaklık değerlerinde (25°C, 32,5°C ve 40°C) başlangıç konsatrasyonuna (C_0) karşılık denge adsorpsiyon kapasite (qe) değerleri Şekil 4.13'te verilmiştir. Çalışılan her üç sıcaklık değerinde de 0-0,6mg/mL konsantrasyon aralığında adsorpsiyon kapasitesinde hızlı bir artış gözlemlenirken, 0,6-1,2mg/mL konsantrasyon aralığında adsorpsiyon kapasitesi azalan bir hızla artmaya devam etmiştir.



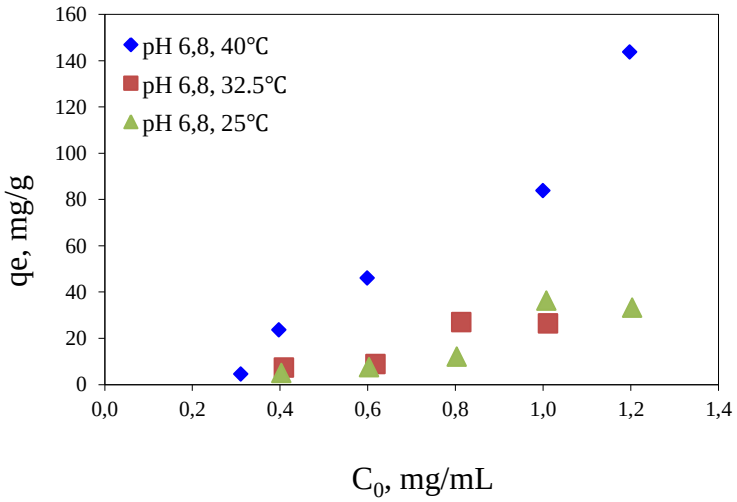
Şekil 4.13 pH 2,8'de başlangıç konsantrasyonuna karşı denge adsorpsiyon kapasiteleri

pH 4,8'de belirlenen sıcaklık değerlerinde (25°C, 32,5°C ve 40°C) başlangıç konsatrasyonuna karşılık adsorpsiyon kapasitesi değerleri Şekil 4.14'te verilmiştir. Çalışılan her üç sıcaklık değerinde de konsantrasyon arttıkça denge adsorpsiyon kapasitesi sürekli bir artış göstermiştir.



Şekil 4.14 pH 4,8'de başlangıç konsantrasyonuna karşı denge adsorpsiyon kapasiteleri

pH 6,8'de belirlenen sıcaklık değerlerinde (25°C, 32,5°C ve 40°C) başlangıç konsatrasyonuna karşılık adsorpsiyon kapasite değerleri Şekil 4.15'te verilmiştir. pH 6.8'de en yüksek adsorpsiyon kapasitesi 40°C'de görülmüştür.



Şekil 4.15 pH 6,8'de başlangıç konsantrasyonuna karşı denge adsorpsiyon kapasiteleri

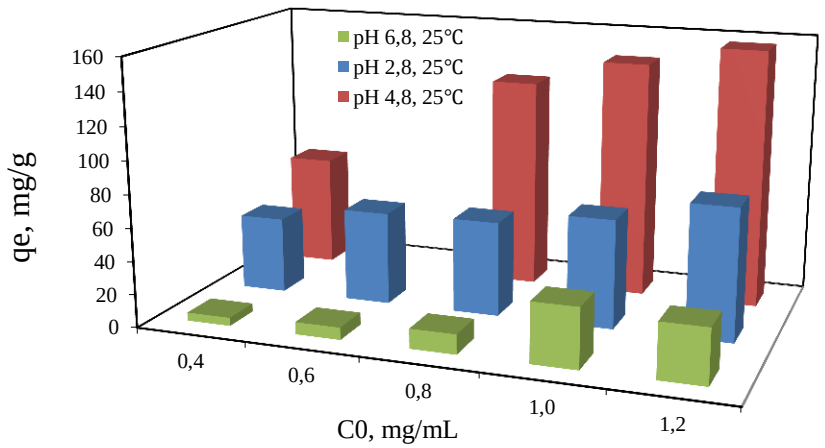
Her üç şekil incelendiğinde pH 4,8 ve pH 6,8'de en yüksek adsorpsiyon kapasitesi 40°C'de görülmüştür. pH 2,8'de ise sıcaklığın artmasıyla adsorsiyon kapasitesi azalmış ve en düşük adsorpsiyon kapasitesi 40°C'de görülmüştür. İzoelektrik noktanın altında adsorpsiyon kapasitesi sıcaklığın artması ile azalırken, izoelektrik noktanın üzerindeki

pH değerlerinde sıcaklığın artması ile artmıştır. Bu durum pH 6,8'de BSA ve CaB arasında farklı bir etkileşimin gerçekleştiğini düşündürtmektedir.

4.5.2 pH Etkisi

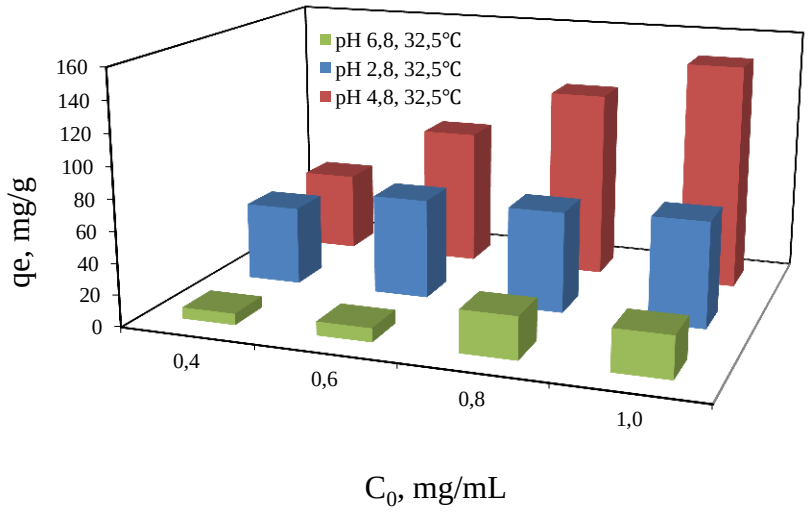
Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda sabit sıcaklıkta farklı pH değerlerinde, başlangıç konsantrasyonuna (C_0) karşılık denge adsorpsiyon kapasiteleri (qe) elde edilmiştir.

25°C'de farklı pH değerlerinde (2,8, 4,8 ve 6,8) başlangıç konsatrasyonuna (C_0) karşılık denge adsorpsiyon kapasitesi (qe) değerleri Şekil 4.16 verilmiştir. Şekil 4.16 incelendiğinde en düşük adsorpsiyon kapasitesi değeri pH 6,8'de 4,98 mg/g değerinde elde edilirken en yüksek kapasite değeri pH 4,8'de 156,71 mg/g değerinde elde edilmiştir. pH 2,8'de azalan ivmeyle, başlangıç konsantrasyonunun artmasıyla adsorpsiyon kapasitesi artmıştır. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi değerleri pH 4,8'de görülürken, en düşük adsorpsiyon kapasitesi pH 6,8'de görülmüştür.



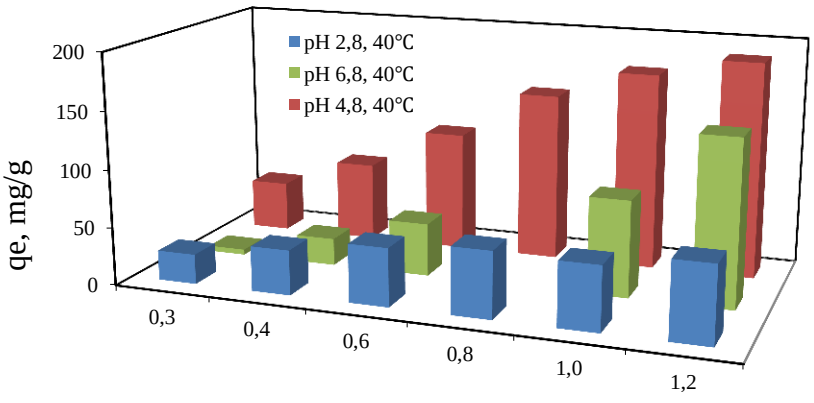
Şekil 4.16 25°C'de pH'ın BSA adsorpsiyon kapasitesine etkisi

32,5°C'de belirlenen pH değerlerinde (2,8, 4,8 ve 6,8) başlangıç konsatrasyonuna (C_0) karşılık denge adsorpsiyon kapasite (qe) değerleri Şekil 4.17'de verilmiştir. Şekil 4.17 incelendiğinde en düşük adsorpsiyon kapasitesi değeri pH 6,8'de 7,29 mg/g elde edilirken en yüksek kapasite değeri pH 4,8'de 145,39 mg/g olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.17 32,5°C'de pH'ın BSA adsorpsiyon kapasitesine etkisi

40°C'de belirlenen pH değerlerinde (2,8, 4,8 ve 6,8) başlangıç konsatrasyonuna (C_0) karşılık denge adsorpsiyon kapasitesi (qe) değerleri Şekil 4.18'de verilmiştir. Şekil 4.18 incelendiğinde en düşük adsorpsiyon kapasitesi değeri pH 6,8'de 4,63 mg/g elde edilirken en yüksek kapasite değeri pH 4,8'de 187,39 mg/g olarak elde edilmiştir. En yüksek adsorpsiyon kapasite değerleri pH 4,8'de görülürken, pH 6,8'de artan bir ivmeyle başlangıç konsantrasyonunun artmasıyla adsorpsiyon kapasitesi artmıştır. pH 2,8'de ise azalan bir ivmeyle artış söz konusudur.



Şekil 4.18 40°C'de pH'ın BSA adsorpsiyon kapasitesine etkisi

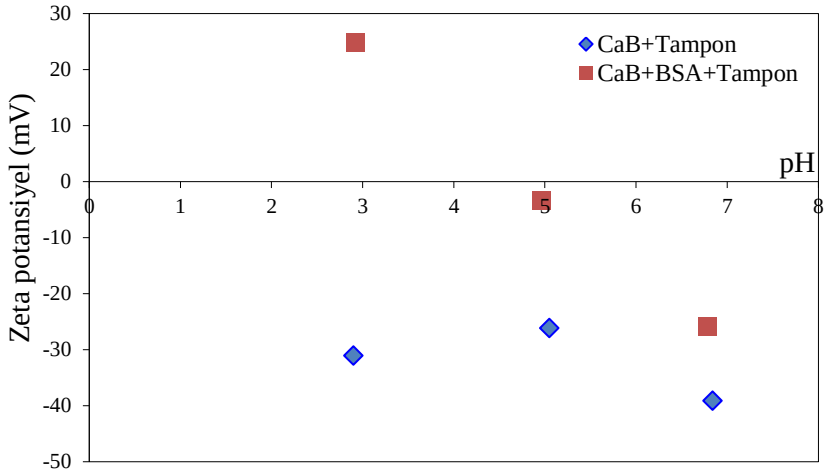
Her üç grafik incelendiğinde CaB'in protein adsorpsiyon kapasitesi artan pH değeri ile önce artmakta sonra önemli bir oranda düşmektedir. Buna göre en yüksek kapasite 40℃'de 187,39 mg/g değerinde pH 4,8'de elde edilirken en düşük kapasite 40℃'de 4,63 mg/g değeri ile pH 6,8'de elde edilmiştir.

En yüksek kapasite değerleri BSA'nın yaklaşık 4,8 olan izoelektrik noktasında (pI) görülmektedir. pH değeri izoelektrik noktasının (pI) altında olduğunda BSA'nın pozitif yüklendiği, üzerinde olduğunda ise negatif yüklendiği bilinmektedir. CaB'in yüzeyi, pH 2,8'de pozitif yüklüdür. Bu durumda pozitif yüklü olan protein ile CaB arasında elektrostatik itme kuvvetlerinin etkili olması beklenirken nispeten yüksek adsorpsiyon kapasitesi elde edilmiştir. Bu durum zeta potansiyel ölçümleri ile açıklanabilir. CaB negatif zeta potansiyele sahiptir. Bu nedenle protein ve adsorban sıvı ara yüzeyi arasında elektrostatik çekim oluşur. Protein büyük bir molekül olduğu için katı sıvı ara yüzeydeki yüklerin adsorban yüzeyindeki yüklerden daha etkin olabileceği düşünülmektedir.

Bu durumun tam tersine pH 6,8'de BSA negatif yüklü ve CaB de negatif zeta potansiyele sahiptir. Bu durum pH 6,8'de görülen adsorpsiyon kapasitesinin düşüşünü açıklamaktadır. Ayrıca pH 6,8'de hidrofobik etkileşimlerin baskın olduğu düşünülmektedir ki artan sıcaklıkla adsorpsiyonun artması da bu durumu desteklemektedir. Maksimum protein adsorpsiyonun pH 4,8'de elde edilmesi bu pH değerinin BSA'nın izoelektrik noktasına (4,8) oldukça yakın olmasıyla açıklanabilir. Literatürde de benzer şekilde izoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde protein adsorpsiyonun daha iyi olduğu bildirilmiştir [4, 21]. İzoelektrik noktada proteinin yüzey yükü nötr olduğundan elektrostatik kuvvetlerin etkisinin olmadığı adsorpsiyonun Van der Waals kuvvetleriyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu durumda molekül boyutu ve gözenek çapı etkilidir. Ayrıca Whitesides ve arkadaşları [21] yaptıkları çalışmada izoelektrik noktada protein ile adsorban arasındaki adhezyon kuvvetlerinin arttığını bildirmiştir ki bu da adsorpsiyon kapasitesindeki artış sonucunu destekler.

Bu durumu daha iyi yorumlayabilmek için BSA varlığında CaB'in zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.19). Çalışılan pH değerlerinde BSA çözeltileri içinde CaB hazırlanmış ve 1 saat bekletildikten sonra zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.19 incelendiğinde pH 2.8'de CaB negatif zeta potansiyele sahipken BSA varlığında

zeta potansiyeli değişerek pozitif alana kaymıştır. Bu durum izoelektrik noktanın altında BSA'nn pozitif yüklenmesi ile açıklanabilir. CaB yapısına tutunmuş BSA ara yüzeydeki yükleri değiştirmiştir. Benzer şekilde pH 6.8'de hem BSA hem CaB negatif yüklü olduğu için adsorpsiyon sonrası zeta potansiyelleri ciddi bir değişim göstermemiştir.



Şekil 4.19 Tampon çözeltiler ile hazırlanan CaB ve CaB-BSA çözeltilerinin pH değerlerine karşı oluşturulan zeta potansiyel ölçümleri

4.5.3 Başlangıç Konsantrasyonunun Etkisi

Protein adsorpsiyonu farklı başlangıç konsantrasyonlarında, pH ve sıcaklığın değişimiyle birlikte incelenmiştir. Sıcaklık ve pH değişiminin protein adsorpsiyonuna etkileri Bölüm 4.4.1 ve 4.4.2'de artan konsantrasyon değerlerinde elde edilen grafikler ile yorumlanmıştır. Grafikler incelendiğinde adsorpsiyon kapasitesinin artan başlangıç konsantrasyonu ile birlikte artmakta olduğu görülmektedir. Başlangıç konsantrasyonunun artmasıyla birlikte başlangıçta adsorpsiyon kapasitesinde hızlı bir artış gözlemlenirken zamanla azalan bir ivmeyle artış devam etmiştir. Yüksek başlangıç konsantrasyonu sulu fazla katı faz arasındaki kütle transfer direncinin üstesinden gelmek için bir itici kuvvet oluşturur ve böylece BSA moleküllerinin CaB yüzeyine difüzyonunu kolaylaştırır [27].

4.5.4 Deneysel Adsorpsiyon Verilerinin Teorik Modellere Uyguluğunun İncelenmesi

Geliştirilen adsorpsiyon izotermi model denklemlerinin istatiksel açıdan anlamlılığını incelemek için yapılan varyans analizi sonucu elde edilen ANOVA tabloları EK-B'de (Şekil EK-B 1 - Şekil EK-B 3) verilmiştir. Yüksek F değeri istatistiksel açıdan anlamlılığın bir göstergesidir. Elde edilen p değerlerinin 0,05'ten küçük olması tüm deney şartları için tüm modellerin istatistiksel açıdan %95 güvenilirlik sınırında anlamlı olduğunu göstermektedir.

Belirlenen sıcaklık ve pH değerlerinde yapılan deneyler sonucu elde edilen verilerin üç farklı adsorpsiyon izoterm model denklemine uygulanması sonucu oluşturulmuş kalanların normal olasılık dağılım eğrileri EK-A'da (Şekil EK-A 1-Şekil EK-A) gösterilmiştir. Kalanların normal olasılık dağılım eğrilerinin düz çizgi etrafında dağılması, varyansın homojenliğinin bir göstergesidir.

Doğrusal olmayan regresyon yöntemliyle hesaplanan parametreler kullanılarak her bir modele (Freundlich, Langmuir, R-P) ait adsorpsiyon izotermi eğrileri (C_e-q_e) STATISTICA 13.0 programı ile elde edilmiş ve deneysel verilerle birlikte EK-A'da (Şekil EK-A 1-Şekil EK-A 9) gösterilmiştir.

pH 2,8'de elde edilen ANOVA tabloları (Çizelge EK-B 1) incelendiğinde her üç model denklem için çalışılan tüm sıcaklık değerlerinde p değerinin güvenilirlik sınırı olan %95'ten yüksek olması tüm modellerin istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu ifade etmektedir. En küçük p değeri ve en büyük F değeri Langmuir izotermi ile elde edilmiştir.

pH 2,8'deki deneysel değerler kullanılarak geliştirilen model denklemlere ait katsayılar Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelge 4.7 incelendiğinde 25°C'de en yüksek R^2 (0,9328) ve en küçük % hata (28,7228) değeri Langmuir izoterm modelinde görülmüştür. 32,5°C'de en yüksek R^2 (0,9931) ve en düşük % hata (6,3378) değeri Langmuir izoterm modelinde görülmüştür. 40°C'de elde edilen veriler incelendiğinde R-P izoterm modeline ait R^2 değerinin (0,9539) yüksek olduğu görülmektedir. Ancak R-P izoterm modelinin daha iyi gözükmesine rağmen % hata değeri (8,6337) Langmuir izoterm modelinde daha düşük olduğundan Langmuir izoterminin daha uygun olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.7 pH 2,8'de model denklemlere ait katsayılar

		25℃	**32,5**℃	**40**℃
Freundlich	K_f	100,5188	79,7933	70,6533
	1/n	0,8071	0,2897	0,4084
	R^2	0,9253	0,8776	0,8278
	% hata	30,1928	10,9591	10,0845
	χ2 hata	3,5714	0,7541	0,5491
Langmuir	Q	199,5174	80,3196	83,8525
	b	0,8499	10,2502	3,8425
	R^2	0,9328	0,9931	0,9049
	% hata	28,7228	6,3378	8,6337
	χ2 hata	3,1458	0,2615	0,3912
R-P	K	149,758	$-13,43.10^9$	$-35,6.10^8$
	a	0,8679	$-16,84.10^7$	$-50,38.10^6$
	β	2,0371	0,7102	0,5916
	R^2	0,6772	0,9561	0,9539
	% hata	28,8236	10,9591	10,0844
	χ2 hata	0,0453	0,0003	$9,162.10^{-5}$

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde pH 2,8'de EK A'da (Şekil EK-A 1-Şekil EK-A 3) verilen adsorpsiyon izoterm eğrileri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrilerinde de görüldüğü gibi diğer modellere oranla Langmuir izoterminin deneysel verilerle daha iyi örtüştüğü söylenebilir.

pH 4,8'de elde edilen ANOVA tabloları (Çizelge EK-B 2) incelendiğinde 40℃'de R-P model denklemine ait p değeri (0,163) dışında tüm sıcaklık değerlerinde p değerlerinin 0,05'ten küçük bulunmuştur. İstatistiksel açıdan anlamlılığın bir göstergesi olan yüksek F değerleri her üç sıcaklık için de Langmuir izoterm modelinde elde edilmiştir.

pH 4,8'de elde edilen deneysel veriler kullanılarak geliştirilen model denklemlere ait katsayılar Çizelge 4.8'de verilmiştir. Çizelge 4.8 incelendiğinde 25℃'de en yüksek R^2 değerleri Langmuir (0,9748) ve R-P (0,9848) izoterm modellerinde elde edilirken aynı şekilde en düşük % hata değerleri Langmuir (5,6267) ve R-P (5,1791) izoterm

modellerinde görülmektedir. 32,5℃'de en yüksek R^2 değeri (0,8688) ve en düşük % hata değeri (16,9258) R-P izoterm modelinde görülmektedir. 40℃'de ise en yüksek R^2 (0,9361) ve en düşük % hata (11,8997) Langmuir izoterm modelinde görülmüştür.

Çizelge 4.8 pH 4,8'de model denklemlere ait katsayılar

		25℃	**32,5**℃	**40**℃
Freundlich	K_f	241,9091	347,9631	386,8596
	1/n	0,3727	0,7811	0,4694
	R^2	0,8987	0,6796	0,8569
	% hata	9,6014	23,7809	17,2718
	χ2 hata	1,2769	5,8169	3,4213
Langmuir	Q	186,5597	470,2961	256,1912
	b	15,4730	1,3762	12,7278
	R^2	0,9748	0,6843	0,9361
	% hata	5,6267	22,2918	11,8997
	χ2 hata	0,3834	5,3159	1,6546
R-P	K	2522,74	545,528	$-268{,}24.10^{8}$
	a	14,923	5037,29	$-693{,}36.10^{5}$
	β	1,104	10,382	0,5306
	R^2	0,9848	0,8688	0,8887
	% hata	5,1791	16,9258	17,272
	χ2 hata	$2{,}36.10^{-5}$	0,1	0,0074

Elde edilen tüm sonuçlar ile birlikte pH 4,8'e ait EK A'da (Şekil EK-A 4-Şekil EK-6) verilen adsorpsiyon izoterm eğrileri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrilerinden de görüldüğü gibi Langmuir ve R-P izotermlerinin deneysel verilerle büyük oranda örtüştüğü söylenebilir.

pH 6,8'de elde edilen ANOVA tabloları (Çizelge EK-B 3) incelendiğinde çalışılan tüm sıcaklık değerinde de R-P izoterm modeline ait p değerlerinin 0,05'ten büyük olduğu görülmektedir. Langmuir ve Freundlich izoterm modellerinde ise p değerleri 40℃'de 0,05'ten küçük iken diğer sıcaklıklarda 0,05'ten büyüktür. pH 6,8'de elde edilen p ve F

değerleri incelendiğinde izoterm modellerinin istatistiksel açıdan anlamlılığını yorumlamak için değerlerin yetersiz olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.9 pH 6,8'de model denklemlere ait katsayılar

		25℃	**32,5**℃	**40**℃
Freundlich	K_f	29,9356	35,0122	258,9672
	1/n	2,5793	1,5556	2,0128
	R^2	0,9567	0,9995	0,5644
	% hata	32,1239	22,7785	33,5287
	χ2 hata	0,7459	1,4224	4,3817
Langmuir	Q	-10,3793	-41,2032	-48,9512
	b	-0,7359	-0,4634	-1,0993
	R^2	0,9911	0,9789	0,4743
	% hata	7,4712	26,1497	32,4381
	χ2 hata	0,0658	1,5497	4,8864
R-P	K	12,1671	$-18,59.10^6$	0,0122
	a	-0,5631	$-52,83.10^4$	-1,0000
	β	2,8450	-0,5556	0,0001
	R^2	0,9979	0,9990	0,6160
	% hata	2,1889	22,7784	32,4503
	χ2 hata	$7,092^{-6}$	0,0007	0,0179

pH 6,8'de elde edilen deneysel veriler kullanılarak geliştirilen model denklemlere ait katsayılar Çizelge 4.9'da verilmiştir. Çizelge 4.9 incelendiğinde her üç sıcaklık değerinde de en yüksek R^2 ve en düşük % hata değerleri R-P izoterm modelinde görülmüştür. Ancak 25℃'de en yüksek R^2 (0,9979) ve en düşük % hata (2,1889) R-P izoterm modelinde görülürken, Langmuir izoterm modeline ait değerler de bu sonuçlara yakındır. 32,5℃'de izoterm modellerine ait R^2 ve % hata değerleri genel olarak birbirine yakın çıkmıştır. En yüksek R^2 (0,999) ve en düşük % hata (22,7784) değeri R-P izoterm modelinde elde edilmiştir. 40℃'de en yüksek R^2 (0,6160) ve en düşük % hata

(32,4503) değeri R-P izoterm modelinde görülmüştür. pH 6,8'e ait tüm veriler incelendiğinde genel olarak izoterm modellerinin uyguluğu ile ilgili yorumlar sağlıklı yapılamamaktadır.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde BSA'nın kalsiyum bentonit üzerine adsorpsiyonu R-P ve Langmuir izoterm modelleriyle ifade edilebilir.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR

Çalışmada kalsiyum Bentonit (CaB) üzerine BSA adsorpsiyonu farklı deneysel koşullarda denge ve kinetik açıdan incelenmiştir. Çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Box-Behnken tasarımı uygulanarak farklı pH, sıcaklık ve başlangıç konsantrasyonu parametreleri ile elde edilen adsorpsiyon kapasitesi değerleri Design-Expert programına aktarılarak model denklem geliştirilmiştir. Kübik model kullanılarak geliştirilen model denklemin korelasyon katsayısı (R^2) 0,9998 bulunmuştur. Geliştirilen model denklem sonucunda en büyük katsayı ile başlangıç konsantrasyonu en etkili parametre iken, en küçük katsayı ile sıcaklık en az etkili parametredir.
2. Design-Expert programı kullanılarak optimum proses parametreleri belirlenmiştir. Buna göre maksimum adsorpsiyon kapasitesi (171,23 mg/g) için optimum sıcaklık 40℃ ve optimum pH 4,8'dir. CaB'in katmanlı ve gözenekli yapısının yüksek BSA adsorpsiyon kapasitesi elde etmede etkili olduğu düşünülmektedir.
3. Parametrelerin etkisi cevap yüzey grafikleri ile incelenmiştir. Adsorpsiyon kapasitesi BSA'nın izoelektrik noktası olan pH 4,8 değerinde maksimum değere ulaşmıştır. Adsorpsiyon kapasitesi konsantrasyonun artmasıyla birlikte doğrusal artış gösterirken; sıcaklığın artmasıyla birlikte önce azalmış sonra tekrar artmaya başlamıştır.
4. Adsorpsiyon kinetiği incelendiğinde pH arttıkça adsorpsiyonun daha hızlı dengeye ulaştığı görülmüştür. Deneysel kinetik verileri yalancı birinci derece, yalancı ikinci

derece ve parçacık içi difüzyon modeline uygulanmış; CaB üzerine BSA adsorpsiyonunun yalancı ikinci derece kinetik modeline uyduğu görülmüştür.

5. CaB üzerine BSA adsorpsiyonu üzerinde en etkili parametrenin pH olduğu görülmüştür. En yüksek kapasite değerleri BSA'nın izoelektrik noktası olan pH 4,8'de elde edilmiştir. Bu noktada protein nötr yüzey yüküne sahip olduğundan Van der Waals kuvvetlerinin adsorpsiyonda etkili olduğu düşünülmektedir. Literatürde verilen izoelektrik noktada protein ile adsorban arasındaki adhezyon kuvvetlerinin artması bilgisi bu sonucu desteklemektedir.
6. Deneysel verilerin iki parametreli Freundlich, Langmuir ve üç parametreli R-P izoterm modellerine uygunluğu doğrusal olmayan regresyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. BSA'nın CaB üzerine adsorpsiyonunu en iyi ifade eden modelin çalışma pH'ı ve sıcaklığına bağlı olarak Langmuir ve/veya R-P modelleri olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak; BSA proteini, yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip, katmanlı ve gözenekli yapıdaki, doğal ve biyouyumlu bir malzeme olan kalsiyum bentonit üzerine yüksek miktarlarda adsorbe edilebilir. Böylece gerek biyolojik sistemlerde gerekse kromatografi alanında uygulama sahası bulabilir.

KAYNAKLAR

[1] Lepoitevin, M., Jaber, M., Guégan, R., Janot, J., Dejardin, P., Henn, F., Balme, S., (2014). "BSA and Lysozyme Adsorption on Homoionic Montmorillonite: Influence of the Interlayer Cation", Applied Clay Science, 95: 396-402.

[2] Kaygusuz, H., Erim, F.B., (2013). "Alginate/BSA/Montmorillonite Composites with Enhanced Protein Entrapment and Controlled Release Efficiency", Reactive & Functional Polymers, 73: 1420-1425.

[3] Tran, A.T.T., Patterson, D.A., James, B.J., (2012). "Investigating the Feasibility of Using Polysulfone–Montmorillonite Composite Membranes for Protein Adsorption", Journal of Food Engineering, 112: 38-49.

[4] Tran, A.T.T., James, B.J., (2012). "A Study the Interaction Forces Between the Bovine Serum Albumin Protein and Montmorillonite Surface", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 414: 104-114.

[5] Anirudhan, T.S., Tharun, A.R., Rejeena S.R., (2011). "Investigation on Poly(methacrylic acid)-Grafted Cellulose/Bentonite Superabsorbent Composite: Synthesis, Characterization, and Adsorption Characteristics of Bovine Serum Albumin", Industrial and Engineering Chemical Research, 50: 1866-1874.

[6] Shamsuddin, R.M., Verbeek, C.J.R., Lay, M.C., (2014). "Producing Protein Intercalated Bentonite-Equilibrium, Kinetics and Physical Properties of Gelatin-Bentonite System", Applied Clay Science, 87: 52-60.

[7] Maeda, H., Kato, K., Kasuga, T., (2016). "Adsorption Behavior of Proteins on Calcium Silicate Hydrate in Tris and Phosphate Buffer Solutions", Materials Letters, 167: 112-114.

[8] Littlechild, J.A., (2013). "Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development", Chapter 2, Exeter Biocatalysis Centre, Biosciences, College of Life and Enviromental Sciences, United Kingdom.

[9] Gallagher, W., FTIR Analysis of Protein Structure, http://www.chem.uwec.edu/Chem455_S05/Pages/Manuals/FTIR_of_proteins.pdf, 29 Mart 2015.

[10] http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-07.pdf, 29 Mart 2015.

[11] http://www.fenodevi.com/10sinif-kimya-konulari/sindirim-sistemi-kimyas, 29 Mart 2015.

[12] http://www.dermatorium.net/kategoriler.asp?id=192&katid=5, 21 Haziran 2015.

[13] MEB, (2006). Proteinlerin Özellikleri, Ankara.

[14] Ası, T., (1996). Tablolarla Biyokimya, Cilt 1, İstanbul.

[15] Ekingen, İ., (2012). Protein Adsorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[16] Günsev, Ç., (2008). Ankara Keçisi Tekelerinde Serum Albumin-Globulin Oranı ve Sialik Asit Düzeyleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[17] Veen, M.V.D., Norde, W., Stuart, M.C., (2004), "Electrostatic Interactions in Protein Adsorption Probed by Comparing Lysozyme and Succinylated Lysozyme", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 35: 33-40.

[18] Han, J., Silcock, P., McQuillan, A.J., Bremer, P., (2009), "Bovine Serum Albumin Adsorption on N-methyl-d-glucamine Modified Colloidal Silica", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 349: 207-213.

[19] Pezennec, S., Grauthier, F., Alonso, C., Graner, F., Croguennec, T., Brule, G., Renault, A., (2000), "The Protein Net Electric Charge Determines the Surface Rheological Properties of Ovalbumin Adsorbed at the Air-Water Interface", Food Hydrocolloids, 14: 463-472.

[20] Alkan, M., Demirbaş, Ö., Doğan, M., Arslan, O., (2006), "Surface Properties of Bovine Serum Albumin – Adsorbed Oxides: Adsorption, Adsorption Kinetics and Electrokinetic Properties", Microporous and Mesoporous Materials, 96: 331–340.

[21] Whitesides, G.M., Gitlin, I., Carbeck, D.J., (2006), "Why Are Proteins Charged? Networks of Charge–Charge Interactions in Proteins Measured by Charge Ladders and Capillary Electrophoresis", Angew. Chem. Int. Ed., 45: 3022-3060.

[22] Mansuroğlu, B., Kızılbey, K., Derman, S., Mustafaeva, Z., (2011). "Protein-Polielektrolit Kompleks ve Konjugatlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi ile İncelenmesi", Türk Biyokimya Dergisi, 36 (1): 21-28.

[23] Ketizmen, S., (2008). Islak Hava Oksidasyonu ve Adsorpsiyon Yöntemleri ile Selüloz Ağartma Atıksuyunun Arıtabilirliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli.

[24] Choy, K., Mckay, G., Porter, J.F., (1999), "Sorption of Acid Dyes from Effluents Using Activated Carbon", Resources Conservation and Recycling, 27: 57-71.

[25] Yıldız, N., (2002). Süperkritik Akışkan Ortamında Adsorbantların Rejenerasyonu, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara.

[26] Özer, A., (2004). Adsorpsiyon Kinetikleri Ders Notları, Mersin Üniversitesi Kimya Bölümü, Mersin.

[27] Duranoğlu Gülbayır, D., (2008). Şeftali Çekirdeği ve Polimer Esaslı Aktif Karbon ile Sulu Çözeltilerden Krom (VI) Giderimi, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[28] Kutsal, T., (1995). Atık Sulardaki Ağır Metal İyonlarının Giderilmesinde Aljinat ve Aljinat Mikroorganizma Sistemlerinin Dolgulu Kolon Reaktörlerde Kullanılması, TÜBİTAK, KTÇAG-63, Proje Raporu.

[29] McCabe, S.H., Smith, J.C., Harriott, P., (1988). Unit Operations of Chemical, Mc Graw-Hill, Singapore.

[30] Gürten, İ.I., (2008). Çay Atığından Adsorbent Üretimi ve Üretilen Adsorbentin Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[31] Do, D.D., (1998). Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics, Imperial College, Singapore.

[32] Erkurt, F.E., Balcı, B., (2015). "Reaktif Black 5 Boyar Maddesinin Aktif Karbon Üzerine Adsorpsiyonunun Kinetik ve Adsorpsiyon Modelleri Kullanılarak İncelenmesi", Çukurova Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 30: 257-269.

[33] Aksu, Z., Balibek, E., (2007), "Chromium (VI) Biosorption by Dried Rhizopus Arrhizus: Effect of Salt (NaCl) Concentration on Equilibrium and Kinetic Parameters", Journal of Hazardous Materials, 145: 210-220.

[34] Bakkal, C., (2012). Gıda Endüstrisi Atığından Üretilen Aktif Karbon ile Arsenik Adsorpsiyonunun Denge ve Kinetik Açıdan İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[35] Dağdelen, S., (2012). Remozal Brillant Blue R Boyasının Sulu Çözeltiden Uzaklaştırılması İçin Zeytin Posasının (Pirina) Adsorbent Olarak Kullanımının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kilis.

[36] Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S., (2004), "Chitosan Microspheres as a Potentiel Carrier for Drugs", International Journal of Pharmaceutics, Cilt 274, Sayı 1-2, 1-33.

[37] Zhang, G., Qu, R., Sun, C., Ji, C., Chen, H., Wang, C., Niu, Y., (2008). "Adsorption for Metal Ions of Chitosan Coated Cotton Fiber", J. Appl. Pol. Sci., 110: 2321-2327.

[38] İdiz, N., (2008). Montmorillonit Kilinin Değişik Metaller ile Desteklenmesi ve Oluşan Katalizörün Kullanım Alanlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

[39] İpekoğlu, B., Kurşun, İ., Bilge, Y., Barut, A., (1997). Türkiye Bentonit Potansiyeline Genel Bir Bakış, 2. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, İzmir.

[40] Kahraman, S., (2008), Bir Simektit Mineralinin Kristalliği, Yüzey Alanı ve Gözenekliliği Üzerine Asit Aktivasyonunun Etkisi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[41] Hinkelmann, K., Kempthorne, O., (2005). “Design and Analysis of Experiments Volume 2 Advanced Experimental Design”, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New Jersey.

[42] Lazic, Z.R., (2004). “Design of Experiments in Chemical Engineering a Practical Guide”, Wiley-VCH, 157-165.

[43] Baynal, K., Sultan Altuğ, G., Ünal, H.İ., (2012). “Ortodontik Tellerin Korozyon Davranışının Klasik Deney Tasarım Yöntemi ile Belirlenmesi”, TMMOB MMO Mühendis ve Makina Dergisi, Cilt 53, 629: 48-54.

[44] Açıkalın, K., (2010). Çeşitli Biyokütle Atık Maddelerinin Pirolizi ve Elde Edilen Ürünlerin Analizi, Enstitüsü Doktora Tezi, YTÜ Fen Bilimleri, İstanbul.

[45] Baş, C., (2010). Cevap Yüzeyi Tasarımları ve Sinir Ağları Yaklaşımı, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[46] http://unyemaden.com/urun-ve-hizmetler-4/urunle/kalsiyum-bentonit, 15 Kasım 2011.

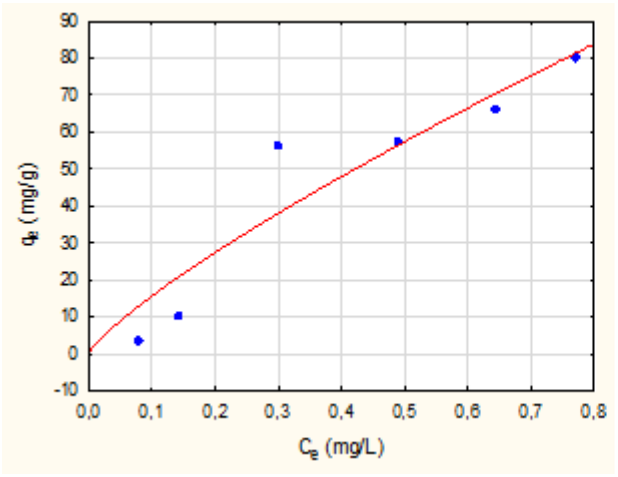
[47] http://www.reade.com/Products/Minerals_and_Ores/bentonite.html, 8 Mart 2016.

[48] Muurinen, A., Carlsson, T., (2013). “Bentonite Pore Structure Based on Saxs, Chloride Exclusion and NMR Studies”, Working Report 2013-53.

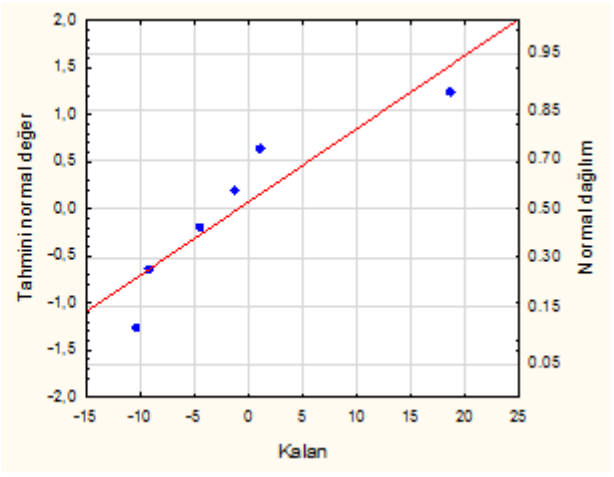
[49] Safa Özcan, A., (2010). Doğal Bentonitin Karakterizasyonu ve Kurşun (II) İyonlarını Adsorpsiyon Yeteneği, BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi, Cilt 12 (2): 85-97.

EK-A

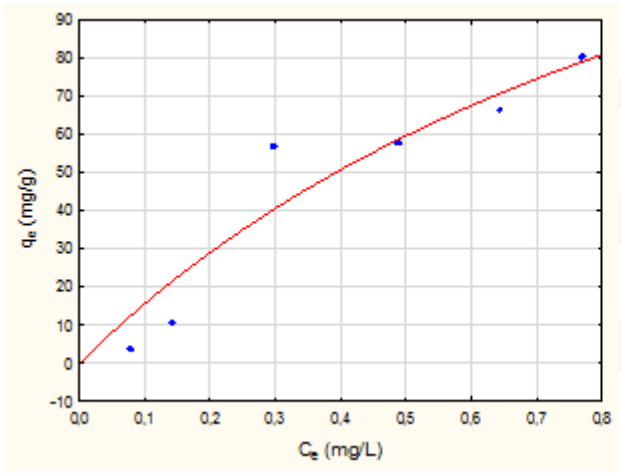
ADSORPSİYON İZOTERMLERİ VE KALANLARIN NORMAL OLASILIK DAĞILIM EĞRİLERİ



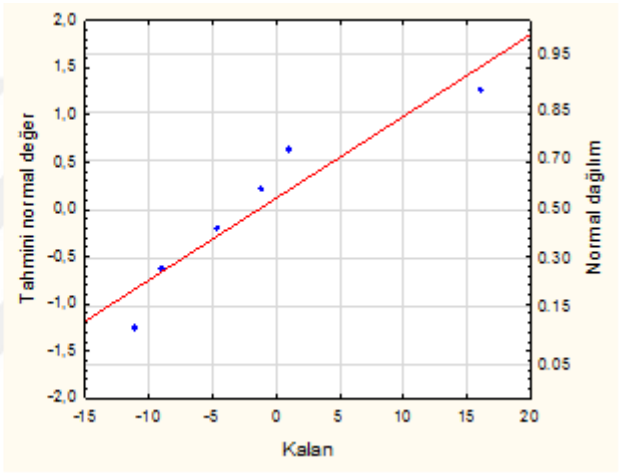
(a)



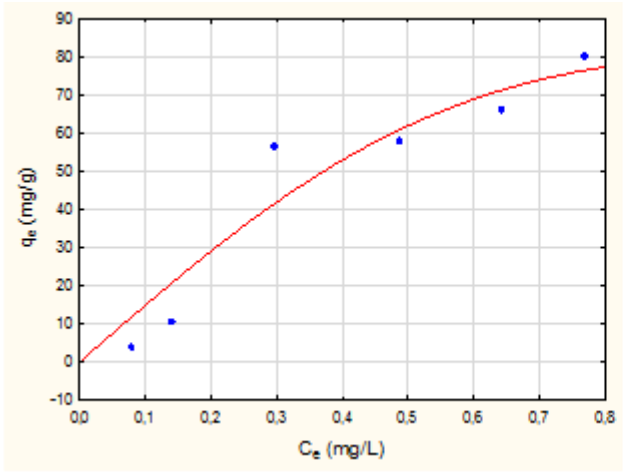
(b)



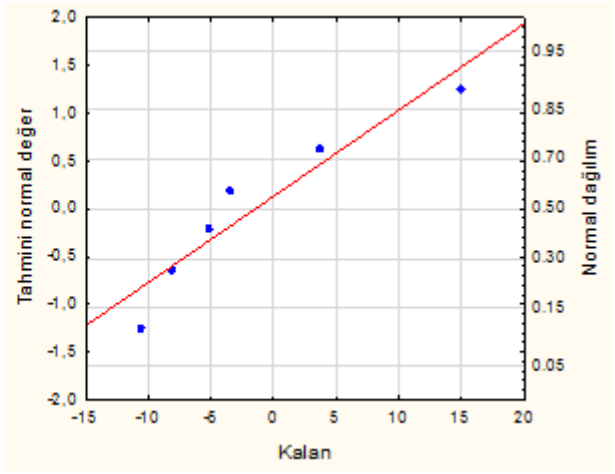
(c)



(d)

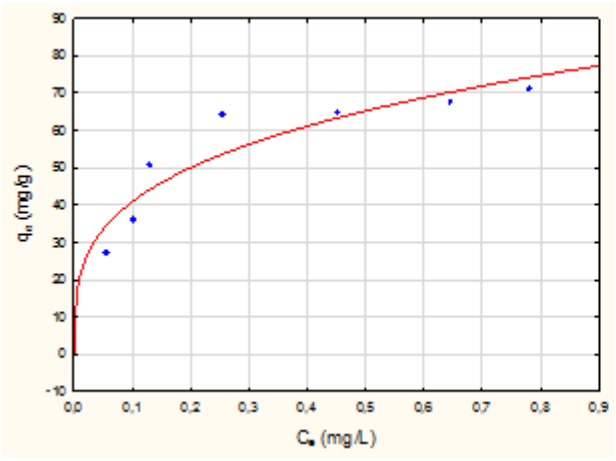


(e)

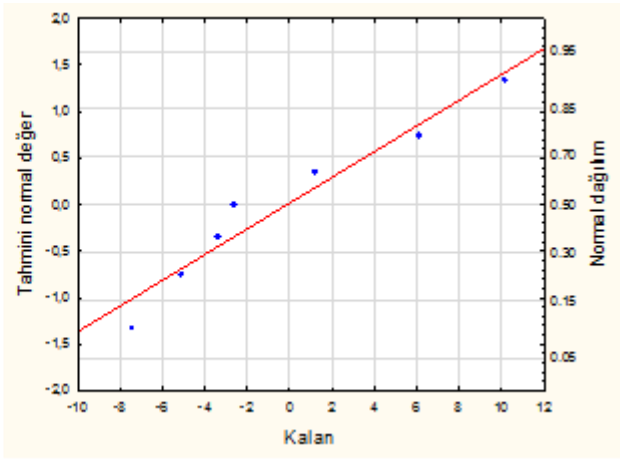


(f)

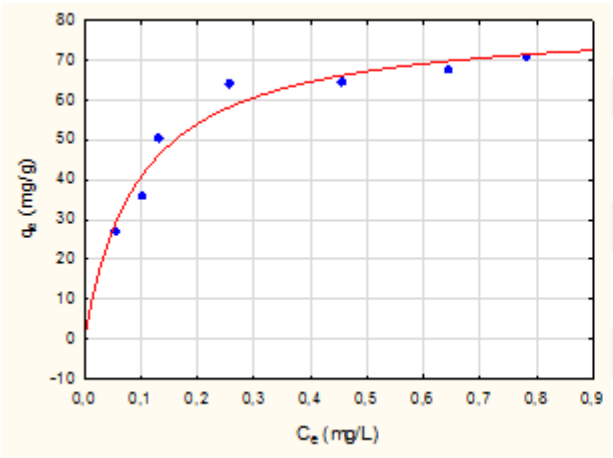
Şekil A.1 pH 2,8 ve 25°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•: deneysel, -- : model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P



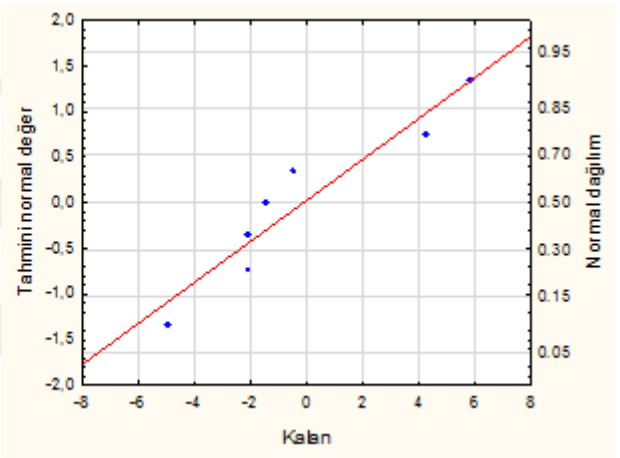
(a)



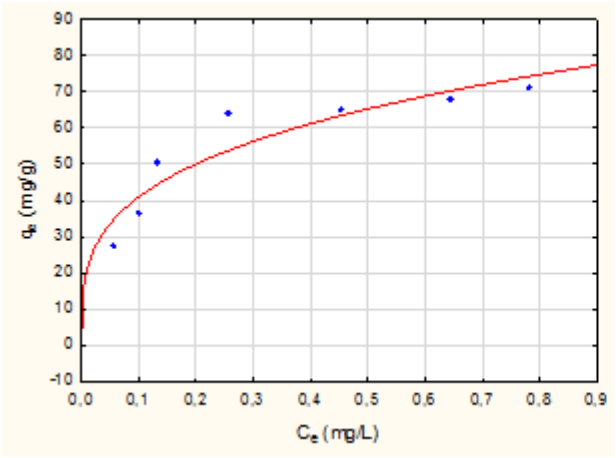
(b)



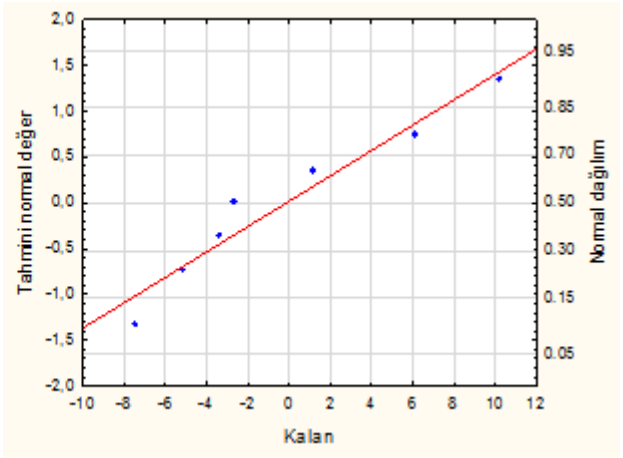
(c)



(d)

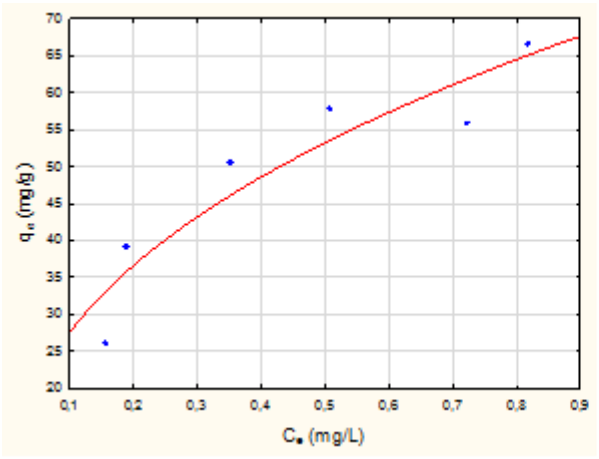


(e)

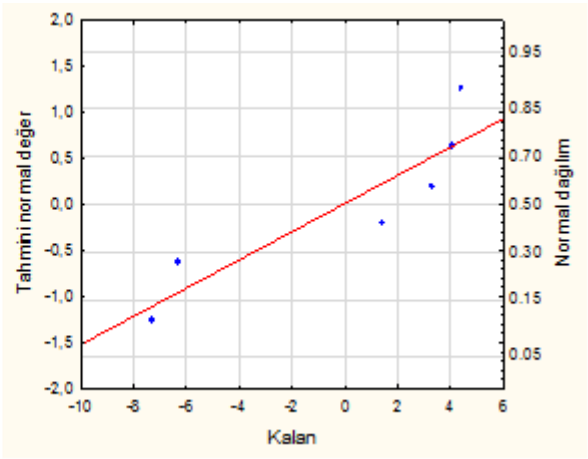


(f)

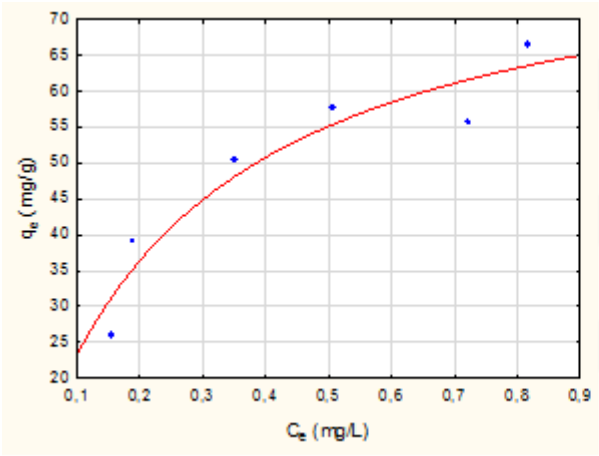
Şekil A.2 pH 2,8 ve 32,5°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (●:deneysel, --:model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P



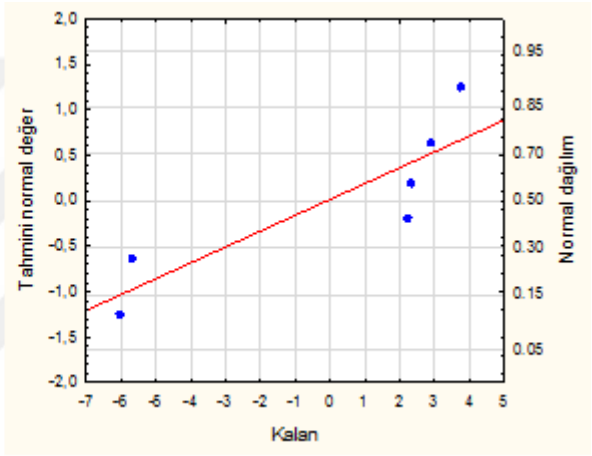
(a)



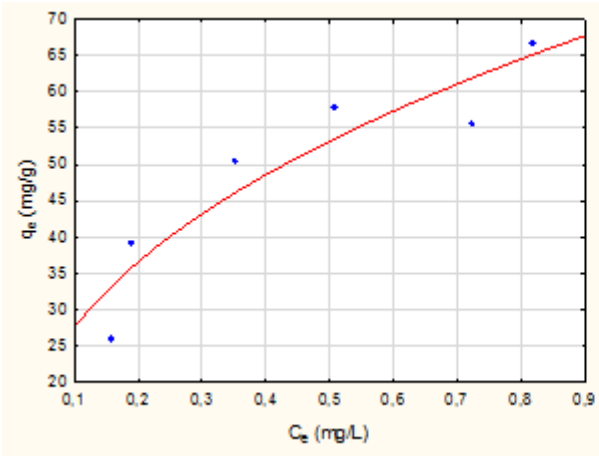
(b)



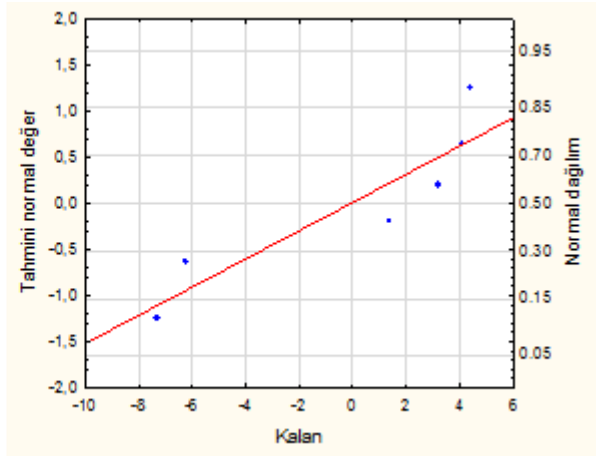
(c)



(d)

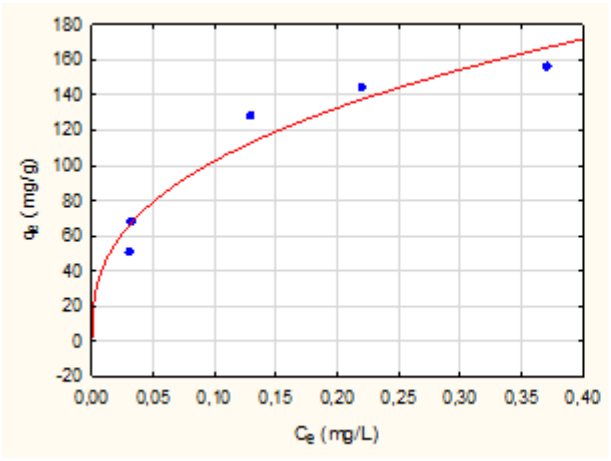


(e)

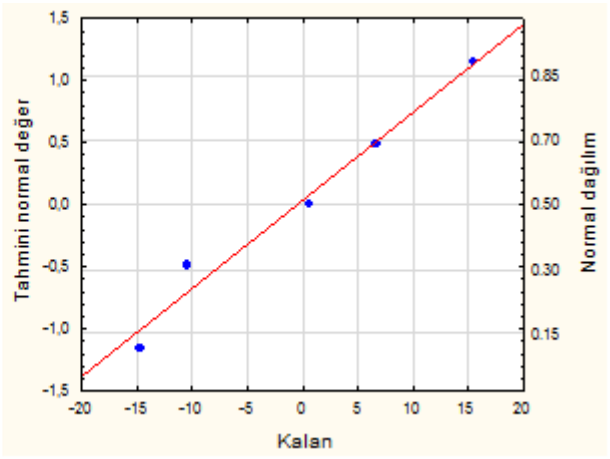


(f)

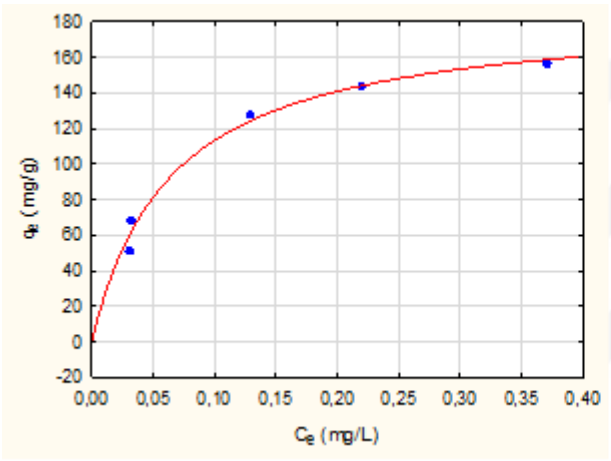
Şekil A.3 pH 2,8 ve 40°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•: deneysel, -- : model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P



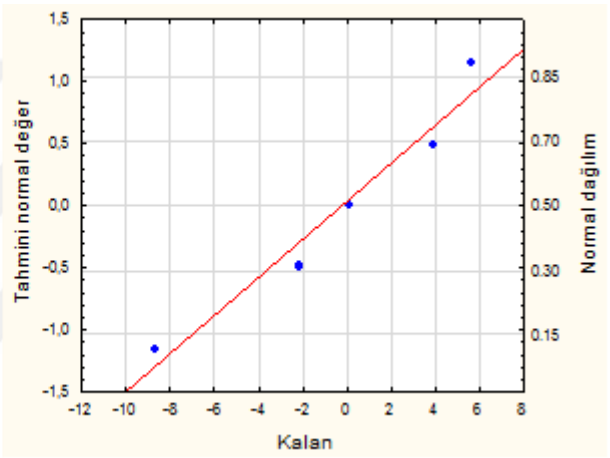
(a)



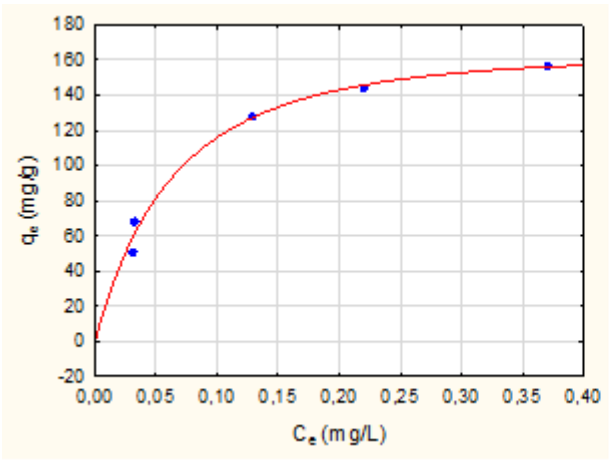
(b)



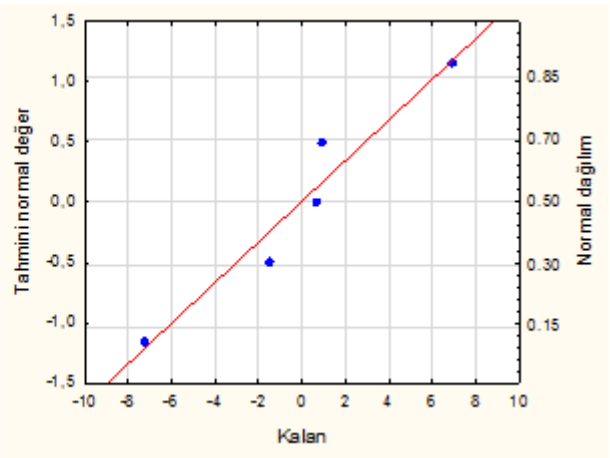
(c)



(d)

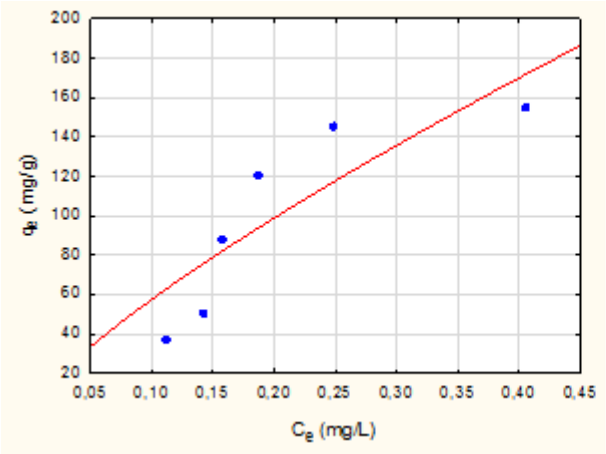


(e)

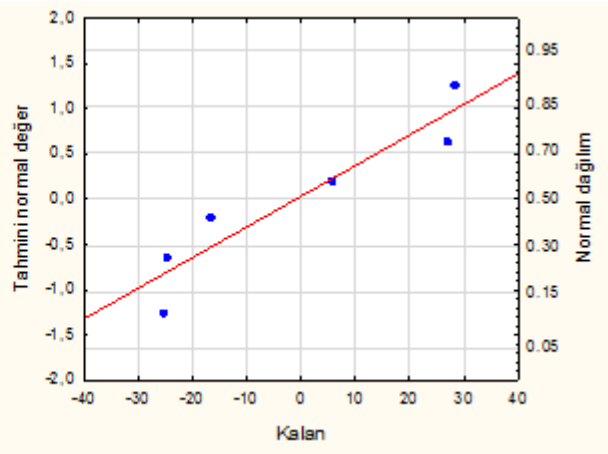


(f)

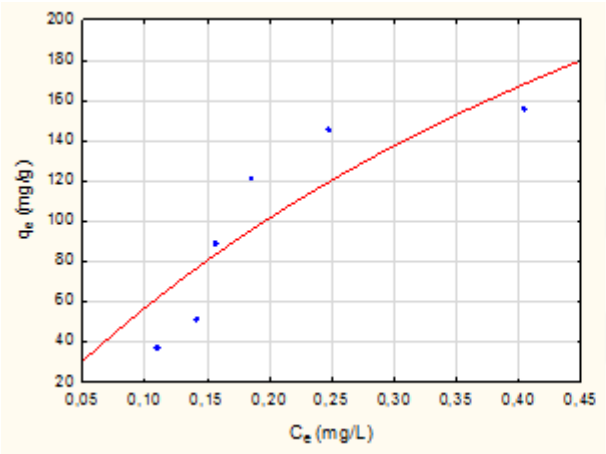
Şekil A.4 pH 4,8 ve 25°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (• : deneysel, -- : model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P



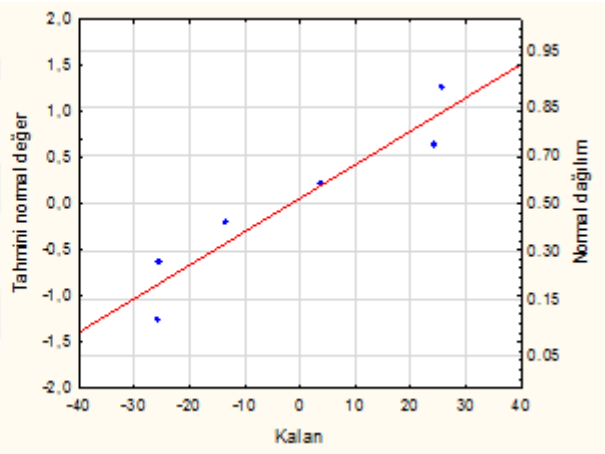
(a)



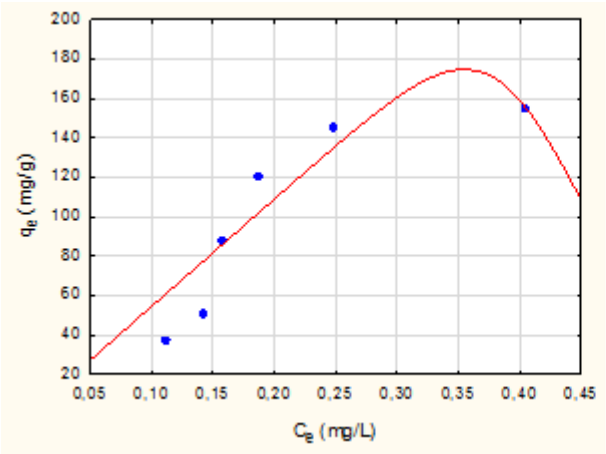
(b)



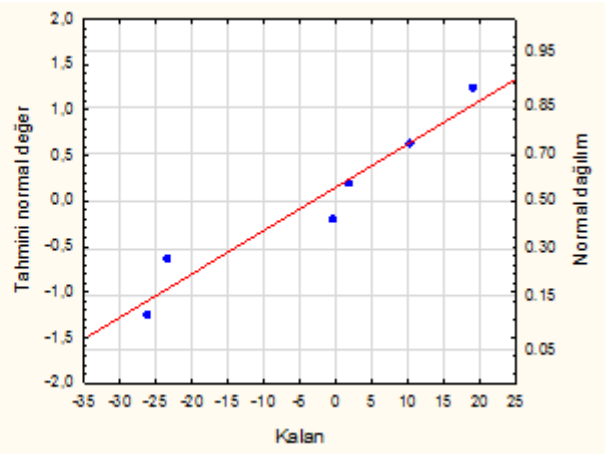
(c)



(d)

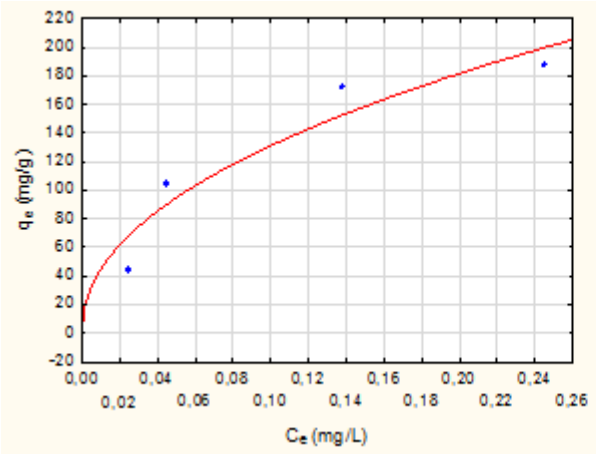


(e)

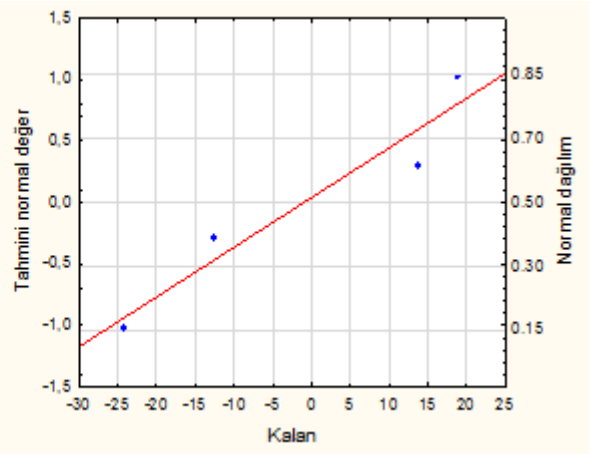


(f)

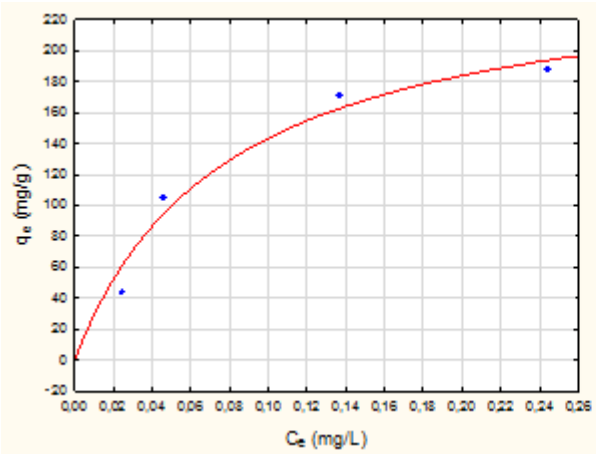
Şekil A.5 pH 4,8 ve 32,5°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•: deneysel, -- : model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P



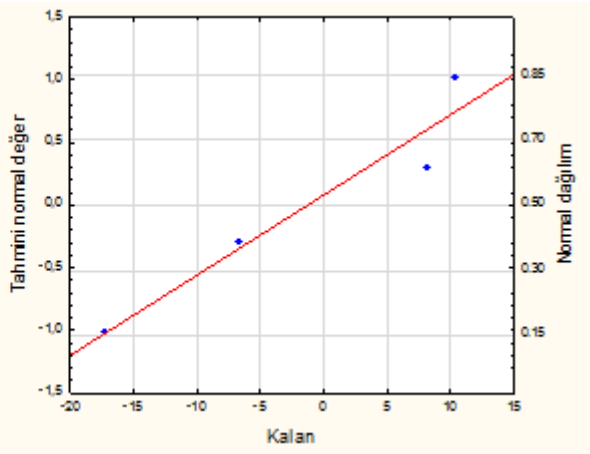
(a)



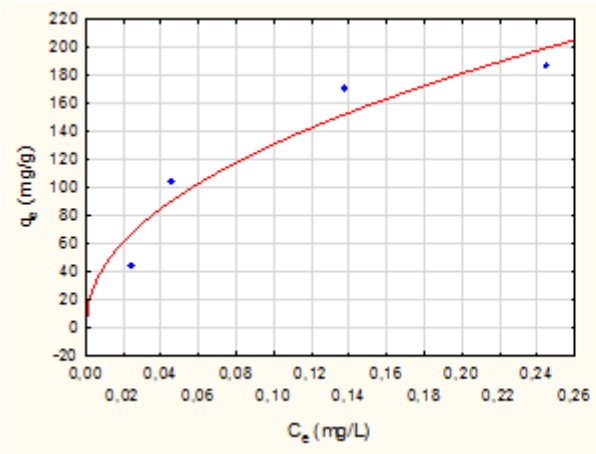
(b)



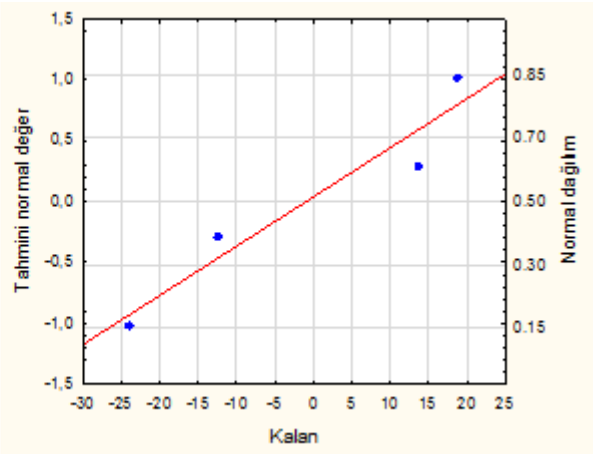
(c)



(d)

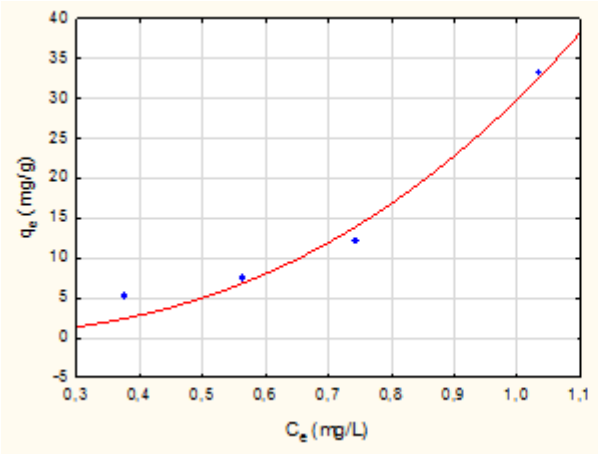


(e)

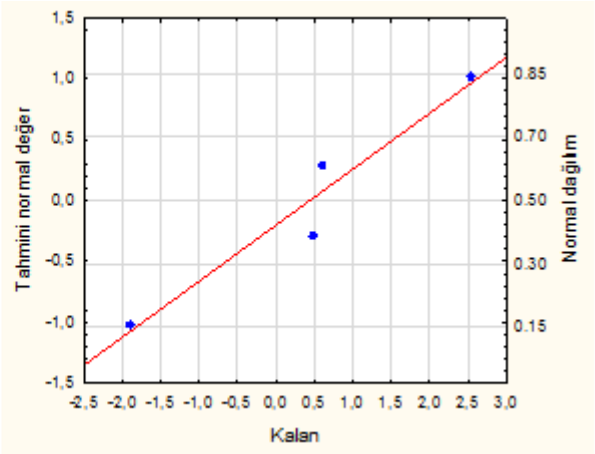


(f)

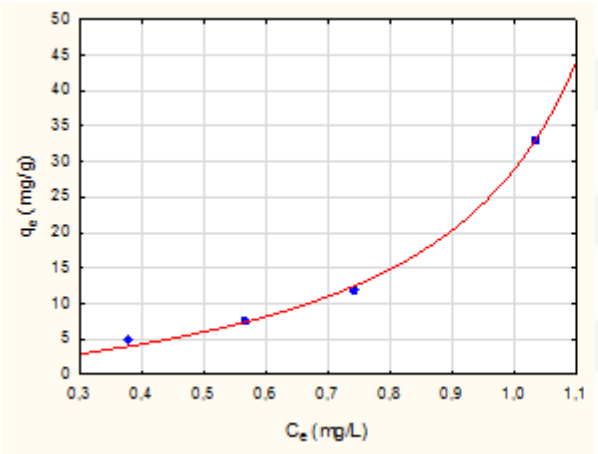
Şekil A.6 pH 4,8 ve 40°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•: deneysel, -- : model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P



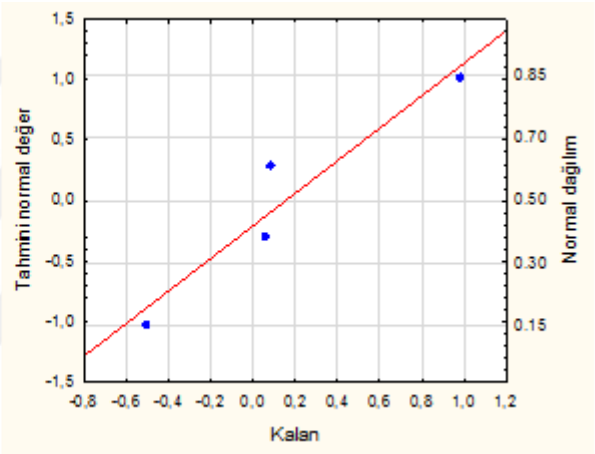
(a)



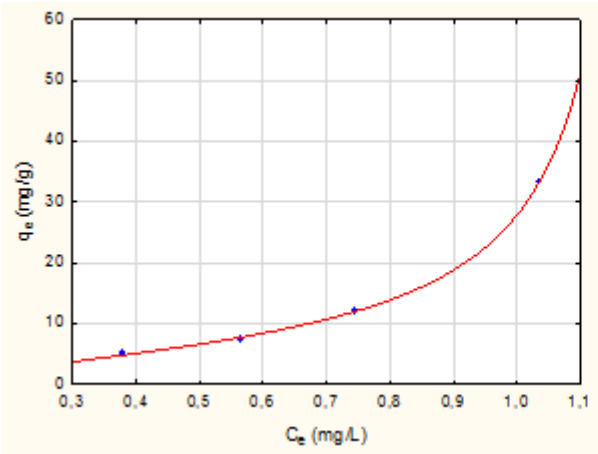
(b)



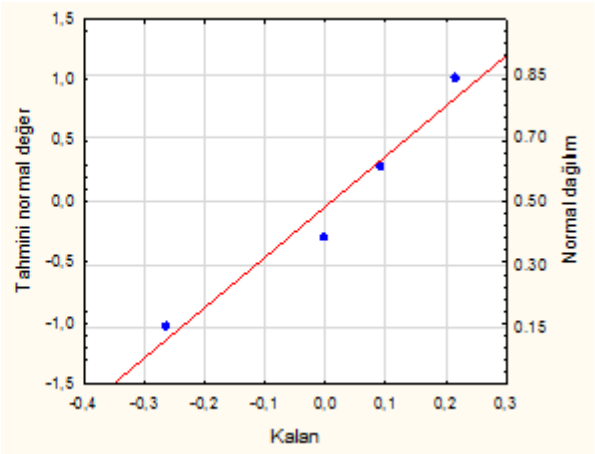
(c)



(d)

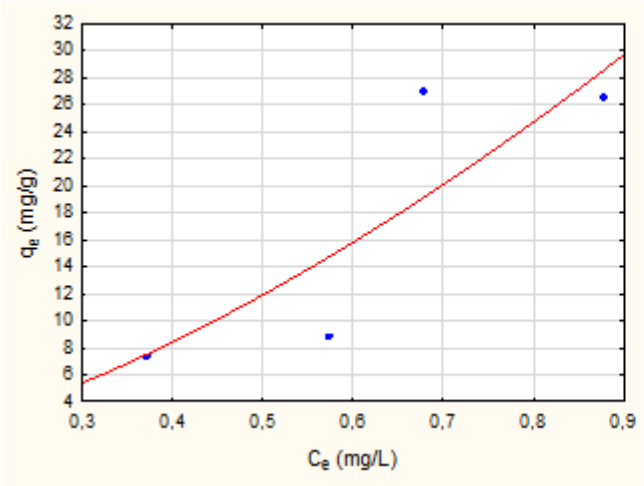


(e)

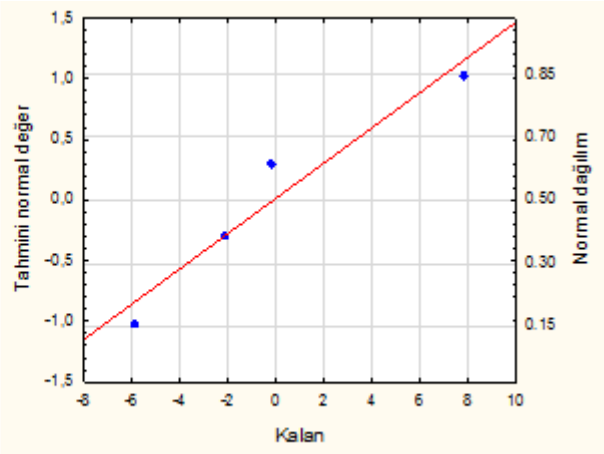


(f)

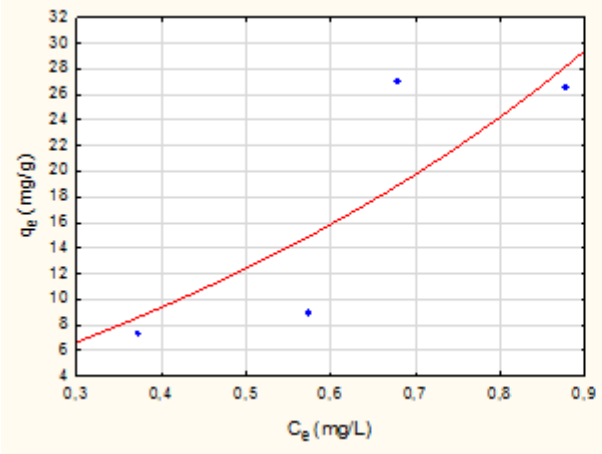
Şekil A.7 pH 6,8 ve 25°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (●: deneysel, -- : model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P



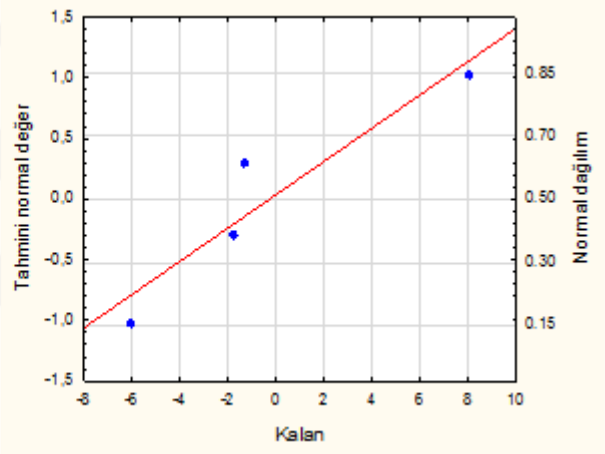
(a)



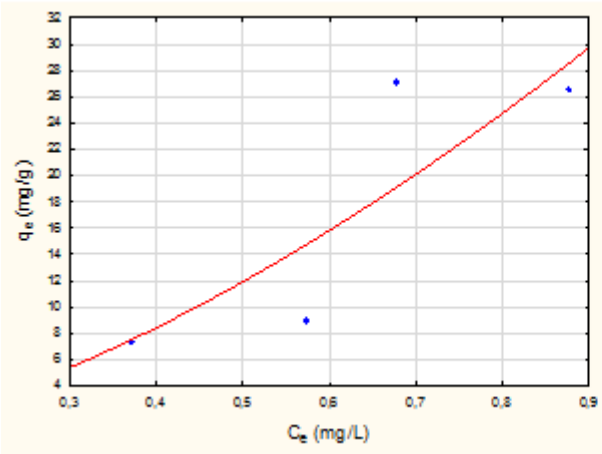
(b)



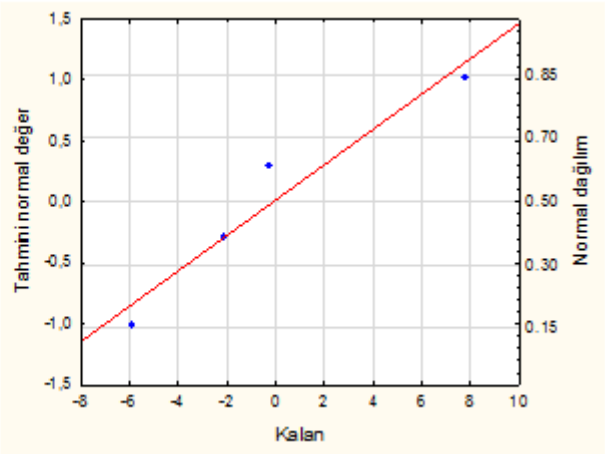
(c)



(d)

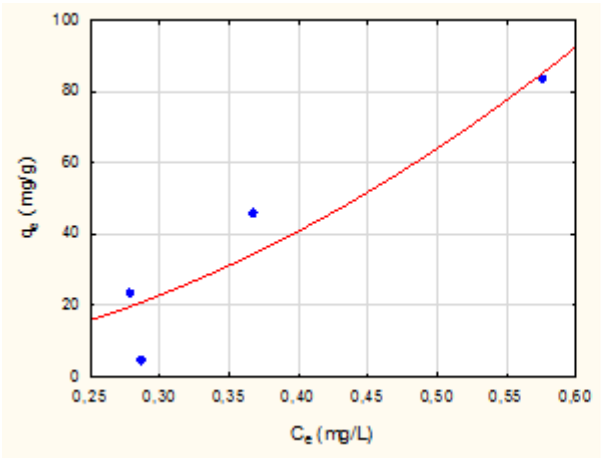


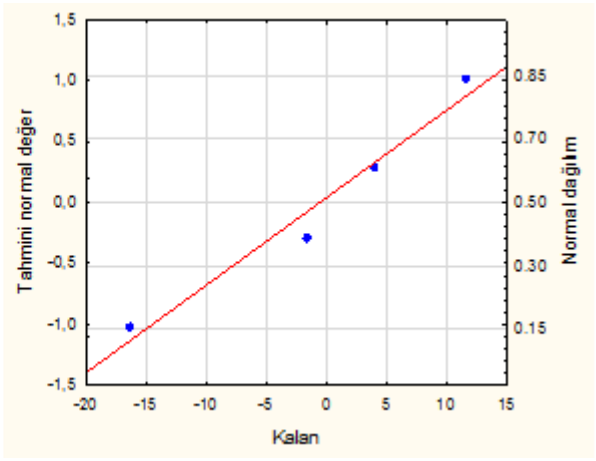
(e)



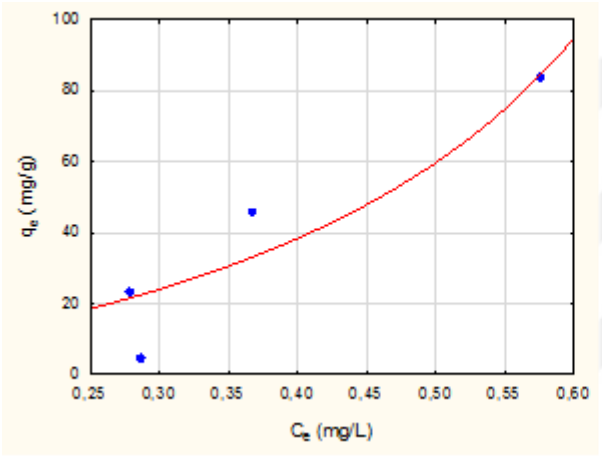
(f)

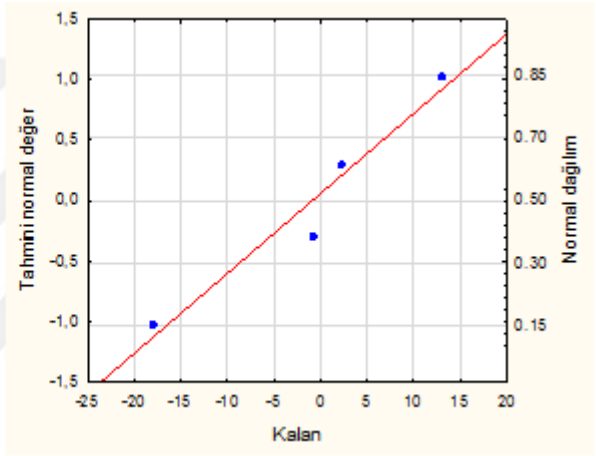
Şekil A.8 pH 6,8 ve 32,5°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (•: deneysel, -- : model) (a)- (b) Freundlich, (c)-(d) Langmiur, (e)-(f) R-P



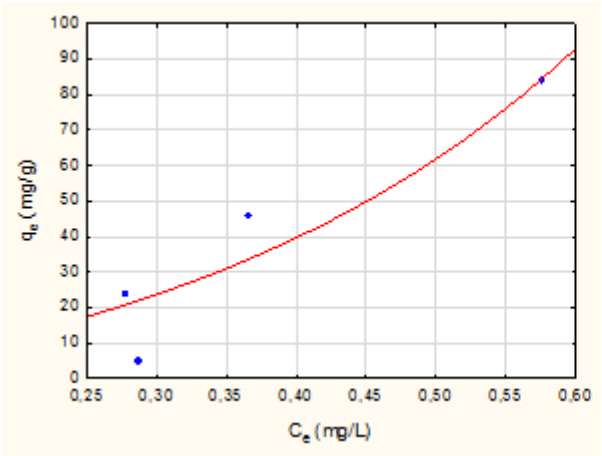


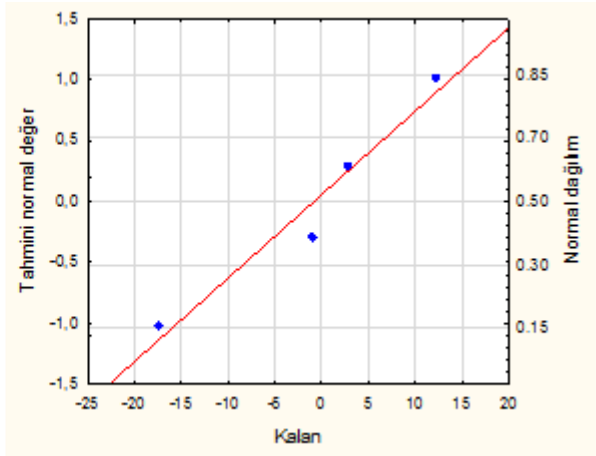
(a) **(b)**





(c) **(d)**





(e) **(f)**

Şekil A.9 pH 6,8 ve 40°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermleri ve kalanların normal olasılık dağılım eğrileri (●: deneysel, -- : model) (a)-(b) Freundlich, (c)-(d) Langmuir, (e)-(f) R-P

EK-B

ANOVA TABLOLARI

Çizelge B.1 pH 2,8'de her üç sıcaklık için elde edilen ANOVA tabloları

pH 2,8 (25℃)		Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalama Kare (MS)	F-değeri	p-değeri
Freundlich	Regresyon	16807,33	2	8403,667	59,350	0,001063
	Kalan	566,38	4	141,595		
	Toplam	17373,71	6			
Langmuir	Regresyon	16,885	2	8442,986	69,242	0,000788
	Kalan	487,74	4	121,935		
	Toplam	17373,71	6			
R-P	Regresyon	16921,12	3	5640,373	37,387	0,007082
	Kalan	452,59	3	150,865		
	Toplam	17373,71	6			

pH 2,8 (32,5℃)		Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalama Kare (MS)	F-değeri	p-değeri
Freundlich	Regresyon	22250,78	2	11125,390	229,353	0,000012
	Kalan	242,54	5	48,510		
	Toplam	22493,32	7			
Langmuir	Regresyon	22405,2	2	11202,600	635,638	0,000001
	Kalan	88,12	5	17,620		
	Toplam	22493,32	7			
R-P	Regresyon	22250,78	3	7416,927	122,322	0,000217
	Kalan	242,54	4	60,635		
	Toplam	22493,32	7			

pH 2,8 (40℃)		Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalama Kare (MS)	F-değeri	p-değeri
Freundlich	Regresyon	15453,71	2	7726,856	219,045	0,000082
	Kalan	141,1	4	35,275		
	Toplam	15594,81	6			
Langmuir	Regresyon	15493,31	2	7746,655	305,274	0,000042
	Kalan	101,5	4	25,376		
	Toplam	15594,81	6			
R-P	Regresyon	15453,71	3	5151,238	109,522	0,001457
	Kalan	141,1	3	47,034		
	Toplam	15594,81	6			

Çizelge B.2 pH 4,8'de her üç sıcaklık için elde edilen ANOVA tabloları

pH 4,8 (25℃)		Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalama Kare (MS)	F-değeri	p-değeri
Freundlich	Regresyon	68452,12	2	34226,06	168,606	0,000828
	Kalan	608,98	3	202,99		
	Toplam	69061,11	5			
Langmuir	Regresyon	68934,27	2	34467,13	815,211	0,000079
	Kalan	126,84	3	42,28		
	Toplam	69061,11	5			
R-P	Regresyon	68957,31	3	22985,77	442,908	0,002254
	Kalan	103,79	2	51,9		
	Toplam	69061,11	2			

pH 4,8 (32,5℃)		Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalama Kare (MS)	F-değeri	p-değeri
Freundlich	Regresyon	68327,85	2	34163,92	44,359	0,001861
	Kalan	3080,69	4	770,17		
	Toplam	71408,54	6			
Langmuir	Regresyon	68656,53	2	34328,26	49,895	0,001485
	Kalan	2752,01	4	688		
	Toplam	71408,54	6			
R-P	Regresyon	69697,65	3	23232,55	40,738	0,00625
	Kalan	1710,89	3	570,3		
	Toplam	71408,54	6			

pH 4,8 (40℃)		Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalama Kare (MS)	F-değeri	p-değeri
Freundlich	Regresyon	76041,13	2	38020,56	59,608	0,016499
	Kalan	1275,68	2	637,84		
	Toplam	77316,8	4			
Langmuir	Regresyon	76802,8	2	38401,4	149,422	0,006648
	Kalan	514	2	257		
	Toplam	77316,8	4			
R-P	Regresyon	76041,12	3	25347,04	19,869	0,163097
	Kalan	1275,68	1	1275,68		
	Toplam	77316,8	4			

Çizelge B.3 pH 6,8'de her üç sıcaklık için elde edilen ANOVA tabloları

pH 6,8 (25℃)		Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalama Kare (MS)	F-değeri	p-değeri
Freundlich	Regresyon	1315,795	2	657,897	122,869	0,008073
	Kalan	10,709	2	5,355		
	Toplam	1326,504	4			
Langmuir	Regresyon	1325,271	2	662,636	1075,567	0,000929
	Kalan	1,232	2	0,616		
	Toplam	1326,504	4			
R-P	Regresyon	1326,378	3	442,126	3509,548	0,012408
	Kalan	0,126	1	0,126		
	Toplam	1326,504	4			

pH 6,8 (32,5℃)		Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalama Kare (MS)	F-değeri	p-değeri
Freundlich	Regresyon	1460,332	2	730,166	14,601	0,064099
	Kalan	100,016	2	50,008		
	Toplam	1560,348	4			
Langmuir	Regresyon	1453,939	2	726,970	13,664	0,068196
	Kalan	106,409	2	53,205		
	Toplam	1560,348	4			
R-P	Regresyon	1460,332	3	486,777	4,867	0,318877
	Kalan	100,016	1	100,016		
	Toplam	1560,348	4			

pH 6,8 (40℃)		Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalama Kare (MS)	F-değeri	p-değeri
Freundlich	Regresyon	9308,015	2	4654,007	22,092	0,043304
	Kalan	421,322	2	210,661		
	Toplam	9729,337	4			
Langmuir	Regresyon	9234,92	2	4617,460	18,678	0,050817
	Kalan	494,417	2	247,209		
	Toplam	9729,337	4			
R-P	Regresyon	9269,766	3	3089,922	6,723	0,274528
	Kalan	459,571	1	459,571		
	Toplam	9729,337	4			

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : MAYA KUMCU

Doğum Tarihi ve Yeri : 05/03/1988 / GİRESUN (ALUCRA)

Yabancı Dili : İNGİLİZCE

E-posta : mayakumcu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lise	Fen Bilimleri	Halil Akkanat Ç.P.L	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2014 -	Flokser A.Ş. (Poliser PU)	Arge Mühendisi
2009-2012	YTÜ Merkez Laboratuvar	Asistan Öğrenci

YAYINLARI

Bildiri

1. Kumcu, M. ve Duranoğlu, D., (2015). “Kalsiyum Bentonit Üzerine BSA Proteininin Adsorpsiyonu”, 27. Ulusal Kimya Kongresi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.