

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

PROTEİN ADSORPSİYONU

İMREN EKİNGEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD.DOÇ. DR. ÖZLEM DOĞAN**

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİN ADSORPSİYONU

İmren tarafından hazırlanan tez çalışması 13.06.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Elektronik ve Haberleşme Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd.Doç. Dr.Özlem DOĞAN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd.Doç. Dr.Özlem DOĞAN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Mualla ÖNER
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Fatma KARACA ALBAYRAK
Marmara Üniversitesi

ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesi, çalışmanın yürütülmesi süresince tecrübesini, bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen, görüş ve önerileriyle beni yönlendiren danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem Doğan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışmam boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen görüş ve önerileriyle çalışmama büyük katkı sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mualla Öner başta olmak üzere yardımlarını gördüğüm tüm hocalarıma gösterdikleri ilgi ve sabırları için teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam boyunca hidroksiapatit malzemesinin üretilmesinde yardımlarını esirgemeyen Büşra Bodur'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında benden manevi desteklerini esirgemeyen Elso Kimya çalışanlarına ve patronlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışmamda da beni destekleyen, bana güvenen ve her zaman yanımda olan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2012

İmren EKİNGEN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTIMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	8
1.3 Hipotez.....	8
BÖLÜM 2	
PROTEİN.....	9
2.1 Protein Tanımı ve Proteinlerin Yapılarındaki Bağlar.....	9
2.2 Protein Moleküllerinin Yapısı ve Konformasyonu.....	10
2.3 Proteinlerin Sentezi ve Özellikleri.....	12
2.4 Proteinlerin Önemi ve Görevleri.....	12
2.5 Proteinlerin Saflaştırılması ve Saflaştırılma Metodları.....	17
2.5.1 Kromatografik Yöntemler.....	18
2.5.1.1 Jel Filtrasyonu.....	18
2.5.1.2 İyon Değişirici (ion-exchange) Kromatografisi.....	18
2.5.1.3 Affinite Kromatografisi.....	19
2.5.2 Elektroforetik Yöntemleri.....	20
2.5.2.1 Elektroforez.....	20
2.5.2.2 İzoelektrik Fokuslama.....	21
2.5.3 Santrifügasyon Yöntemleri.....	21
2.5.3.1 Densiti Gradient (zonal) Santrifügasyon.....	21
2.5.3.2 Differansiyel Santrifügasyon.....	22
2.5.4 Dializ ve Ultrafiltrasyon.....	22

2.6	Protein Tayin Yöntemleri.....	22
2.6.1	UV Bölgedeki Ölçümler.....	24
2.6.1.1	280 nm’de Ölçümler.....	24
2.6.1.2	Uzak Ultraviyole Bölgedeki Ölçümler.....	24
2.6.2	Görünür Bölgedeki Spektrofotometrik Ölçümler.....	24
2.6.2.1	Biüre Metodu.....	24
2.6.2.2	Lowry Yöntemi.....	25
2.6.2.3	Bradford (Coomassie Blue) Yöntemi.....	25
2.6.2.4	Warburg-Christian Yöntemi.....	25
BÖLÜM 3		
	BOVİNE SERUM ALBUMİN (BSA).....	27
3.1	Bovine Serum Albumin (BSA)’in Genel Özellikleri.....	27
3.2	Bovine Serum Albumin Proteinin Fizikokimyasal Özellikleri.....	28
3.3	BSA’nın işlevsel özellikleri.....	31
3.3.1	Köpürme	31
3.3.2	BSA’nın Jelleşme Özellikleri	31
3.3.3	Ligand -Bağlayıcı	31
3.4	BSA’yı Etkileyen Faktörler.....	32
3.4.1	Viskozite	32
3.4.2	pH etkisi.....	32
3.4.3	Sıcaklık Etkisi.....	33
BÖLÜM 4		
	HİDROKSİAPATİT	34
4.1	Hidroksiapatitin Genel Özellikleri ve Yapısı.....	34
4.2	Hidroksiapatitin Kullanımı ve Önemi.....	35
4.3	Hidroksiapatit Hazırlama Yöntemleri.....	36
BÖLÜM 5		
	ADSORPSİYON.....	38
5.1	Adsorpsiyon Oluşumu.....	39
5.2	Adsorpsiyon Türleri.....	40
5.2.1	Fiziksel Adsorpsiyon	40
5.2.2	Kimyasal Adsorpsiyon.....	41
5.2.3	Değişim Adsorpsiyonu	41
5.3	Adsorpsiyonu Etkileyen Faktörler.....	42
5.3.1	Adsorbatın Yapısının Etkisi.....	42
5.3.2	Adsorbanın Yapısının Etkisi.....	42
5.3.3	pH’nin Etkisi.....	43
5.3.4	Sıcaklığın Etkisi.....	43
5.3.5	Temas Süresinin Etkisi	43
5.4	Adsorpsiyon İzotermi.....	43
5.4.1	Langmuir Adsorpsiyon İzotermi.....	45
5.4.2	Freundlich Adsorpsiyon İzotermi	47
5.5	Adsorpsiyon Kinetikleri.....	49
5.6	Protein Adsorpsiyonu.....	52

BÖLÜM 6

DENEYSEL ÇALIŞMALAR	56
6.1 Materyal ve Yöntem.....	56
6.2 Kullanılan Kimyasallar.....	56
6.3 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	56
6.4 Adsorban (HAP) Üretimi.....	57
6.5 Adsorpsiyon Deneyleri.....	58
6.5.1 Tampon Çözeltiler	58
6.5.2 BSA Stok Çözeltisinin Hazırlanması.....	58
6.5.3 Deneyin Yapılışı	58
6.5.4 BSA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	58

BÖLÜM 7

SONUÇLAR	60
7.1 HAP Kristallerinin Karakterizasyonu.....	60
7.2 pH 7.4 Tampon Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Adsorpsiyon Deneyleri	62
7.2.1 BSA Proteini Kalibrasyon Grafiğinin Çizilmesi	62
7.2.2 HAP Üzerine BSA Proteini Adsorpsiyonunun Etkisinin İncelenmesi	63
7.3 pH 6.0 Tampon Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Adsorpsiyon Deneyleri	78
7.3.1 BSA Proteini Kalibrasyon Grafiğinin Çizilmesi	78
7.3.2 HAP Üzerine BSA Proteini Adsorpsiyonunun Etkisinin İncelenmesi	79
7.4 HAP Üretim Sıcaklığının Adsorpsiyona Etkisi.....	91
7.5 HAP Sinterleme Sıcaklığının Adsorpsiyona Etkisi.....	92
7.6 HAP Üretiminde Kullanılan Katkı Maddesi Konsantrasyonunun Adsorpsiyona Etkisi.....	94
7.7 pH'ın Adsorpsiyona Etkisi.....	95
7.8 Adsorpsiyon İzotermlerinin İncelenmesi.....	99
7.9 Adsorpsiyon Kinetiklerinin İncelenmesi.....	100

BÖLÜM 8

SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	105
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	111

SİMGE LİSTESİ

A_{280}	280 nm'de ölçülen absorbans değeri
C_e	Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan madde konsantrasyonu (mg/mL)
C_0	Başlangıçta çözeltide bulunan madde konsantrasyonu (mg/mL)
C_t	Herhangi bir zamandaki çözelti konsantrasyonu (mg/ml)
K_F	Adsorpsiyon kapasitesi (ml/mg)
K_L	Adsorbatın adsorplanma kapasitesine bağlı olan sabit (ml/mg)
k_1	Adsorpsiyon için birinci derece reaksiyon hız sabiti (dk^{-1})
k_2	Adsorpsiyon için ikinci derece reaksiyon hız sabiti (g/mg.dk)
n	Adsorpsiyon yoğunluğu (birimsiz)
R_L	Dağılma sabiti (birimsiz)
R^2	Korelasyon katsayısı
q_e	Denge halinde birim adsorban üzerinde adsorplanan madde miktarı (mg/g)
q_t	Herhangi bir zamanda (dk^{-1}) adsorbe edilen madde miktarı (mg/g).
Q_{max}	Adsorbanın maksimum adsorplama kapasitesi (mg/g)
T	Temas süresi (dk)
V	Çözelti hacmi (ml)
w	Kuru haldeki adsorban ağırlığı (g)

KISALTMA LİSTESİ

AFP	alpha-fetoprotein
B-LG	β -lactoglobulin
BET	Spesifik yüzey alanı ölçümü
BSA	Sığır Serum Albumin
CD	Dairesel Dikronizm Spektrofotometresi
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Differansiyal Taramalı Kalorimetre
FT-IR	Kızıl ötesi absorpsiyon spektrofotometresi
HAP	Hidroksiapatit
HSA	Human Serum Albumin
ICP	Endüktif Eşleşmiş Plazma
IR	Kızıl Ötesi Spektrofotometresi
LSZ	Lizozom
MGB	Miyoglobin
OVA	Ovalbumin
PMA	Polimetakrilik Asit
PSS	Polisodyum Sitrensülfonat
RNA	Ribonükneikasit
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskopu
UV	Ultraviöle Görünür Spektrofotometresi
XRD	X-Işını Analizi
VDP	D vitamini bağlayıcı proteini

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Aminoasidin yapısı.....	11
Şekil 2.2 Proteinin denatürasyonu.....	14
Şekil 2.3 Jel filtrasyonu.....	18
Şekil 2.4 Affinite kromatografisi.....	20
Şekil 2.5 Elektroforez yöntemi.....	20
Şekil 2.6 İzoelektrik fokuslama.....	21
Şekil 2.7 Spektrofotometrenin çalışma prensibi.....	23
Şekil 3.1 Albüminin polielektrolitler ile kompleks oluşturmasının şematik gösterimi.....	29
Şekil 3.2 BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi.....	30
Şekil 3.3 Bovine serum albuminin izomerik formları.....	32
Şekil 3.4 BSA'nın izomerik formlarının yapısı.....	33
Şekil 4.1 Hidroksiapatitin yapısı.....	34
Şekil 4.2 Hidroksiapatitin kristalize yapısı.....	35
Şekil 4.3 Kemik Dokusu Hidroksiapatitin Yapısı.....	36
Şekil 5.1 Katı faz üzerinde adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri.....	39
Şekil 5.2 Fiziksel ve kimyasal adsorpsiyonun potansiyel eğrileri.....	41
Şekil 5.3 Adsorbat ile katı faz arasındaki ilişki.....	44
Şekil 5.4 Langmuir izotermi.....	47
Şekil 5.5 Freundlich izotermi.....	49
Şekil 5.6 Dört yüzeyli proteinin şematik gösterimi.....	54
Şekil 7.1 Farklı sıcaklıklarda üretilen HAP numunelerinin FT-IR spektrumları.....	61
Şekil 7.2 650°C'de sinterlenen HAP numunelerinin FT-IR spektrumları.....	61
Şekil 7.3 Kalibrasyon grafiği (pH 7.4).....	63
Şekil 7.4 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-70).....	64
Şekil 7.5 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-70).....	65
Şekil 7.6 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-70).....	65
Şekil 7.7 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-50).....	66
Şekil 7.8 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-50).....	67
Şekil 7.9 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-50).....	67
Şekil 7.10 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-25).....	68
Şekil 7.11 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-25).....	69
Şekil 7.12 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban : H-25).....	69

Şekil 7.13	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-S)	70
Şekil 7.14	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban H-S)	71
Şekil 7.15	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban : H-S)	71
Şekil 7.16	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)	72
Şekil 7.17	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban H-P7500)	73
Şekil 7.18	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)	73
Şekil 7.19	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P7500-II)	74
Şekil 7.20	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500-II)	75
Şekil 7.21	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500-II)	75
Şekil 7.22	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)	76
Şekil 7.23	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)	77
Şekil 7.24	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)	77
Şekil 7.25	Kalibrasyon Grafiği (pH 6.0)	79
Şekil 7.26	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-70)	80
Şekil 7.27	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-70)	80
Şekil 7.28	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-70)	81
Şekil 7.29	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-50)	82
Şekil 7.30	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-50)	82
Şekil 7.31	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-50)	83
Şekil 7.32	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-25)	84
Şekil 7.33	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-25)	84
Şekil 7.34	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-25)	85
Şekil 7.35	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-S)	86
Şekil 7.36	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)	86
Şekil 7.37	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)	87
Şekil 7.38	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)	88
Şekil 7.39	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)	88
Şekil 7.40	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)	89
Şekil 7.41	BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)	90
Şekil 7.42	Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)	90
Şekil 7.43	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)	91
Şekil 7.44	Adsorban üretim sıcaklığının pH 7.4'de BSA adsorpsiyonuna etkisi.....	91
Şekil 7.45	Adsorban üretim sıcaklığının pH 6.0'da BSA adsorpsiyonuna etkisi.....	92
Şekil 7.46	Sinterleme sıcaklığının pH 7.4'de BSA adsorpsiyonuna etkisi	93
Şekil 7.47	Sinterleme sıcaklığının pH 6.0'da BSA adsorpsiyonuna etkisi	93
Şekil 7.48	Sinterleme sıcaklığının pH 7.4'de BSA adsorpsiyonuna etkisi	94
Şekil 7.49	Katkı maddesi konsantrasyonunun pH 7.4'de BSA adsorpsiyonuna etkisi .	95
Şekil 7.50	Katkı maddesi konsantrasyonunun pH 6.0'da BSA adsorpsiyonuna etkisi .	95
Şekil 7.51	Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-70)	96
Şekil 7.52	Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-50)	96

Şekil 7.53	Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-25)	97
Şekil 7.54	Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-S).....	97
Şekil 7.55	Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-P7500).....	98
Şekil 7.56	Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-P15000).....	98
Şekil 7.57	Adsorpsiyon İzotermi	99
Şekil 7.58	Yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece reaksiyon kinetikleri (pH 7.4).	101
Şekil 7.59	Yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece reaksiyon kinetikleri (pH 6.0)	103

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1	BSA'nın fizikokimyasal özellikleri.....28
Çizelge 4.1	HAP'in özellikleri.36
Çizelge 5.1	RL değerleri ve izoterm tipleri47
Çizelge 7.1	HAP numunelerinin spesifik yüzey alanları.....60
Çizelge 7.2	BSA protein çözeltisi için konsantrasyon değerleri ve bunlara karşılık gelen absorbans değerleri62
Çizelge 7.3	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-70).....64
Çizelge 7.4	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban H-50).....66
Çizelge 7.5	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban H-25).....68
Çizelge 7.6	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)70
Çizelge 7.7	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)72
Çizelge 7.8	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500-II).....74
Çizelge 7.9	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000).....76
Çizelge 7.10	BSA protein çözeltisi için konsantrasyon değerleri ve bunlara karşılık gelen absorbans değerleri78
Çizelge 7.11	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-70).....79
Çizelge 7.12	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban:H-50).....81
Çizelge 7.13	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-25).....83
Çizelge 7.14	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)85
Çizelge 7.15	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500).87
Çizelge 7.16	1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)89
Çizelge 7.17	Denge değerleri.99

Çizelge 7.18	Langmuir ve Freundlich sabitleri	100
Çizelge 7.19	pH 7.4 yalancı birinci adsorpsiyon kinetik parametreleri	101
Çizelge 7.20	pH 7.4 yalancı ikinci derece adsorpsiyon kinetik parametreleri	102
Çizelge 7.21	pH 6.0 yalancı birinci derece adsorpsiyon kinetik parametreleri	103
Çizelge 7.22	pH 6.0 yalancı ikinci derece adsorpsiyon kinetik parametreleri.....	104

PROTEİN ADSORPSİYONU

İmren EKİNGEN

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd.Doç. Dr.Özlem DOĞAN

Protein moleküllerinin adsorpsiyonu son yıllarda biyoloji, biyoteknoloji, biyokimya mühendisliği ve çevre bilimi gibi daha birçok alanda önemli rol oynamaya başlamıştır. Protein adsorpsiyonunda kullanılacak biyouyumlu malzemelerin en önemlisi hidroksiapatitdir (HAP). Biyolojik moleküllerin ayrılmasında yaygın olarak kullanılan HAP, biyouyumluluğu, kemikle olan kimyasal ve yapısal benzerlikleri nedeniyle tercih edilmektedir.

Bu çalışmada farklı koşullarda üretilen ve BET ve FTIR analizleri ile karakterize edilen hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, HAP) üzerine BSA (bovine serum albumin) proteininin adsorpsiyonunun uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Adsorpsiyon deneyleri 37°C 'de, pH 7.4 ve pH 6.0'da gerçekleştirilmiştir. Deneylerde denge süresi yaklaşık 20 saat olarak alınmıştır. Endüstriyel polimer katkılı üretilen ve sinterlenen adsorbanların adsorpsiyon kapasitesi artan polimer konsantrasyonu ile azalmıştır. Sinterleme sıcaklığının artırılması da adsorpsiyon kapasitesini azaltmıştır. Diğer yandan adsorbanın üretim sıcaklığının düşürülmesi adsorpsiyon kapasitesini arttırmıştır.

Denge verilerinin Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermlerine uygunluğu araştırılmıştır. Çalışma şartlarında BSA'nın adsorpsiyon izoterminin Langmuir adsorpsiyon izotermine daha uygun olduğu bulunmuştur.

BSA adsorpsiyonu yalancı birinci derece (pseudo first order) ve yalancı ikinci derece (pseudo second order) kinetik modelleriyle açıklanmıştır. Deneysel sonuçlara göre BSA

adsorpsiyon kinetiğinin yalancı ikinci derece kinetiğine daha fazla uygun olduğu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Adsorption, hidroksiapatit, BSA, protein, izoterm.

ADSORPTION OF PROTEIN

İmren EKİNGEN

Department of Chemical Engineering

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Özlem DOĞAN

In recent years, adsorption of protein molecules has begun to play an important role in many other areas such as biology, biotechnology, biochemical and environmental science. The most important biocompatible materials that can be used in protein adsorption is hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, HAP). HAP that is widely used in separation of biological molecules is preferred because of the biocompatibility, chemical and structural similarities as bone.

In this study, HAP crystals produced under different conditions and characterized by BET and FT-IR methods were investigated the applicability of protein adsorption on the BSA (bovin serum albumine).

Adsorption experiments was carried out in pH 7.4 and pH 6.0 at 37°C. As a result of the experiments performed, the equilibrium time was taken as approximately 20 hours. Adsorption capacity of adsorbents produced with industrial polymer and sintered decreased with increasing polymer concentration. Increasing the sintering temperature decreased the adsorption capacity. On the other hand the adsorption capacity of adsorbent increased with the lowering of production temperature of the adsorbent.

The convenience of the equilibrium data to the Freundlich and Langmuir adsorption isotherms were analyzed. It was determined that Langmuir isotherm fit well the adsorption isotherm of BSA.

Pseudo-first-order and pseudo-second-order adsorption kinetic models were used to establish BSA adsorption. Evaluation of the data showed that the pseudo-second-order kinetic model is the most convenient model to represent the adsorption kinetic

Keyword: Adsorption, hydroxyapatite, BSA, protein, isotherm.

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Protein moleküllerinin adsorpsiyonu son yıllarda oldukça kapsamlı bir biçimde inceleme ve uygulama alanına sahip olmuştur. Medikal bilimi ile birlikte protein adsorpsiyonu protein saflaştırma gibi alanlarda, biyomateryallerde, biyosensörlerde, ilaç salınım sistemleri ve daha birçok alanda önemli rol oynamaya başlamıştır.

Protein moleküllerinin adsorpsiyonunda kullanılan biyoyumlu malzemelerin en önemlilerinden olan hidroksiapatit (HAP)'in kristal yüzeyinde bulunan gözenek boyutunun ve bu yüzey ile protein molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimin adsorpsiyon prosesinde baskın faktör olduğu düşünülmektedir. Adsorban olarak HAP kullanılarak yapılan birçok çalışma bulunmaktadır.

Kawasaki, Kambara, Matsumura ve Norde (2003) yaptıkları çalışmada, saliva proteinlerin HAP üzerine olan adsorpsiyon davranışını farklı elektrik yüklerine sahip olan lizozom (LSZ), Human serum albumin (HSA), β -lactoglobulin (β -LG) ve ovalbumin (OVA) proteinlerinin HAP üzerine olan adsorpsiyon davranışlarıyla karşılaştırarak araştırmışlardır. Adsorpsiyon çalışmaları, β -LG, LSZ ve HSA proteinlerinin HAP üzerinde OVA proteine ve saliva proteine göre adsorbe olan miktarının daha fazla olduğunu göstermiştir. Proteinlerin HAP üzerine adsorpsiyonundan sonra; proteinle kaplı HAP adsorbanının elektroforetik mobiliteleri ölçülmüştür ve genelde pozitif yüklü proteinlerin daha fazla adsorbe olduğu bulunmuştur. Bunun sonucunda proteinlerin negatif yüklü HAP üzerine adsorpsiyonun proteinlerin elektrik yükleri, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin bir fonksiyonu olduğu görülmüştür. Proteinlerin elektrik yüklerinin konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiği ve bu durumun adsorpsiyonu etkilediği bulunmuştur. Ayrıca bi- veya multivalent

iyonların varlığında adsorpsiyonu güçlü bir şekilde etkilediği belirtilmiştir. Örneği; Ca^{2+} iyonu varlığında saliva proteininin adsorpsiyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Ca^{2+} negatif yüklü proteinlerin adsorpsiyonunu olumlu; pozitif yüklü proteinlerin adsorpsiyonunu da olumsuz yönde etkilediği bulunmuştur.

Gang Yin vd. (2002) protein adsorpsiyonuna HAP yüzeyinin fizikokimyasal özelliklerinin etkisini araştırmışlardır. HAP yüzeyinin fizikokimyasal özelliklerinin protein adsorpsiyonundaki rolünü göstermek için Bovine Serum Albumin (BSA) model sistem olarak seçilmiştir. Çalışma fosfat tamponu varlığında pH 6.8 de gerçekleştirilmiştir. Fosfat konsantrasyonu arttıkça adsorsiyonun azaldığı, sodyum iyonu konsantrasyonu arttıkça arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, pH değeri düştükçe ve BSA konsantrasyonu arttıkça adsorpsiyon kapasitesinin arttığı görülmüştür. Maksimum adsorsiyon kapasitesine pH 3 ve BSA 3 mg/ml değerlerinde ulaşılmıştır. Adsorpsiyon kinetiği farklı sıcaklıklarda incelenmiş ve Langmuir izotermi modeline uyduğu görülmüştür. Adsorpsiyon proseslerinde BSA ve HAP arasındaki elektrostatik çekimin ana faktör olduğu belirtilmiştir.

Kazuhiko Kandori vd. (2000) Çeşitli sentetik HAP parçalarına (CaHap, SrHap ve CaSrHap) Miyogloblin (MGB) proteininin adsorpsiyonunu incelemişlerdir ve MGB'nin adsorpsiyon kapasitesini daha önce yaptıkları BSA ve LSZ çalışmalarıyla karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Çalışma $15^{\circ}C$ 'de, pH 6'da KCl varlığında çeşitli konsantrasyonlarda MGB çözeltileri hazırlanarak gerçekleştirilmesine rağmen adsorpsiyonun konsantrasyondan bağımsız olduğu görülmüştür. Proteinlerin CaHAP üzerine olan adsorpsiyon hızları karşılaştırıldığında; MGB'nin düşük molekül ağırlığı ve stabilitesi adsorpsiyon hızının LSZ ile aynı büyüklükte ve BSA'dan ise yüksek olduğu gözlemlenmiştir. BSA adsorpsiyonunun HAP parçalarının Ca:PO₄ oranı arttıkça arttığı, LSZ adsorpsiyonunun azaldığı ve MGB adsorpsiyonunun ise Ca:PO₄ oranından bağımsız olduğu görülmüştür. Bu durumun asidik BSA ve bazik LSZ ile sentetik HAP parçaları arasındaki elektrostatik etkileşimin varlığından; nötr MGB ile sentetik HAP parçaları arasında elektrostatik etkileşimin olmamasından kaynaklandığı belirtilmiştir.

Shintaro Tsuyama vd. (2007) yaptıkları çalışmada, çeşitli oranlarda pirofosforik asitle modifiye edilmiş CaHAP parçaları üzerine BSA, LSZ ve MGB proteinlerinin adsorpsiyonunu ele almışlardır. Modifiye edilen HAP parçalarının yüzey özellikleri, şekli ve yapısı TEM ve XRD analizleriyle incelenmiştir. CaHAP parçalarının pirofosforik asitle modifiye edilmesiyle HAP parçaları üzerinde bulunan P-OH

gruplarıyla etkileşerek HAP parçaları yüzeyinde PP-dalları gelişerek proteinlerin bağlanma yüzeyini arttırdığı görülmüştür. Sonuçlara baktığımızda; pirofosforik asitle modifiye olan HAP parçalarına adsorbe olan BSA miktarı modifiye olmayan HAP parçalarına adsorbe olan BSA miktarına göre 3 kat, adsorbe olan LSZ miktarının 9 kat arttığı ve adsorbe olan MGB miktarının ise değişmediği belirtilmiştir. Ayrıca adsorbe olan BSA ve MGB miktarının pirofosforik asit konsantrasyonu (2-4 mmol/dm³) artışıyla değişmediği; adsorbe olan LSZ miktarının ise azaldığı gözlemlenmiştir.

Aya Fudo vd. (2001) tarafından yapılan çalışma; sentetik mikroyüzlü CaHAP parçaları yüzeyine BSA ve LSZ proteinlerinin adsorpsiyonuna parçaların yapısının etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, 85°C ve pH 7.4'de Ca(CH₃COO)₂ ve NH₄H₂PO₄ çözeltilerinin CH₃COONH₄ çözeltilisine çeşitli besleme hızlarında eklenmesiyle çubuk şeklindeki mikro boyutlu HAP'lar elde edilmiştir. Elde edilen 9 çeşit HAP parçalarının boyutları (0.12 – 5.21 µm) beslenme zamanının artmasıyla artış göstermiştir ve HAP parçalarının Ca/P molar oranı 1.50-1.59 arasında değişmektedir. Çalışmada kullanılan mikro boyutlu HAP parçalarının yapısı TEM, X-ray ve ICP spektroskopisi analizleri yapılarak karakterize edilmiştir. Adsorbe olan BSA miktarı Ca/P molar oranına büyük oranda bağlı olduğu gözlemlenmiştir ve HAP parçalarının Ca/P molar oranı arttıkça arttığı belirtilmiştir. Adsorbe olan LSZ miktarı ise Ca/P oranına daha az bağlı olduğu görülmüştür. Bu durumun nedeni; HAP parçalarında Ca miktarının artmasıyla HAP'in pozitifliğinin artış göstermesi ve negatif BSA ile arasındaki elektrostatik çekimin artışı; pozitif LSZ ile ise arasında olan elektrostatik çekimin azalışı olarak belirtilmiştir. Ayrıca HAP parçalarının uzunluğu arttıkça adsorbe olan BSA miktarında (max;2.30 mg/m²) artış gözlenmiştir; adsorbe olan LSZ miktarının (max;0.47) ise HAP parçalarının uzunluğuna daha az bağlı olduğu görülmüştür.

Masao Fukusumi (1999) tarafından yapılan çalışmada, BSA ve LSZ proteinlerinin hidrofobikliği etkileyen farklı oranlarda oleyl fosfat katkılı CaHAP parçaları üzerine olan adsorpsiyonu incelenmiştir. Bu çalışmada; oleyl fosfat oranları (n_o) 0-2.6 unit/nm² arasında değişen sekiz çeşit kolloidal CaHAP parçaları kullanılmıştır. Çalışma pH 6 ve 15°C de gerçekleştirilmiştir. Adsorbe olan BSA miktarının (n_s) büyük oranda oleyl fosfat oranına bağlı olduğu ve n_o=0.6'ya kadar arttığı; n_o≥1.3 olduğunda ise azaldığı görülmüştür. Adsorbe olan LSZ miktarının ise n_o değeri arttıkça artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca adsorbentin hidrofobik neminin protein ve CaHAP arasında

oluşan elektrostatik çekimi etkileyerek protein adsorpsiyonunda önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir.

Berit Mueller ve arkadaşları (2010) asidik BSA ve bazik LSZ proteinlerinin HAP ve β -TCP parçaları üzerine olan adsorpsiyon davranışlarını karşılaştıran bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma; 25-800 ng/cm² protein konsantrasyonlarında ve UV/Vis spektroskopisi kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada kullanılan HAP 100 nm parçacık boyutuna, 58 m²/g spesifik yüzey alanına ve β -TCP ise 4.56 parçacık boyutuna, 1.4 m²/g spesifik yüzey alanına sahip olduğu bulunmuştur. 16 saat sonundaki adsorplanan miktarlara bakıldığında; HAP üzerine 104 ng/cm² BSA ve 78 ng/cm² LSZ adsorplandığı; β -TCP üzerine ise 162 ng/cm² BSA ve 171 ng/cm² LSZ adsorplandığı görülmüştür. Düşük BSA konsantrasyonlarında (100 ng/cm² 'ye kadar) HAP ve β -TCP adsorbentlerinin adsorpladıkları BSA miktarının %85 oranında olduğu bulunmuştur; BSA konsantrasyonu arttıkça HAP üzerine olan BSA adsorpsiyonu değişmediği, β -TCP üzerine olan BSA adsorpsiyonunda ise az bir artış gözlemlenmiştir. Düşük LSZ konsantrasyonlarında (50 ng/cm² 'ye kadar) HAP ve β -TCP üzerine olan adsorsiyon miktarları %55 civarında olduğu bulunmuştur; yüksek LSZ konsantrasyonlarında ise β -TCP üzerine adsorbe olan LSZ miktarının HAP üzerine adsorbe olan LSZ miktarından fazla olduğu görülmüştür. Maksimum adsorpsiyon kapasitesinin 800 ng/cm² LSZ proteini konsantrasyonunda β -TCP üzerinde ve 176 ng/cm² değerinde adsorpsiyonu olduğu bulunmuştur.

A.P.Serro vd. (2004) çalışmalarında, Titania ve HAP biyomateryallerinin minerilizasyonunda proteinin oynadığı farklı rolleri ve adsorpsiyon sonucu BSA da meydana gelen konformasyonel değişimleri incelemek amacıyla BSA'nın bu parçalar üzerine olan adsorpsiyonunu araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan HAP ve Titania adsorbentlerinin spesifik yüzey alanları sırasıyla 16 m²/g ve 47m²/g'dır. Ayrıca çalışma sırasında çeşitli BSA konsantrasyonlarındaki adsorpsiyonun neden olduğu konformasyonel değişimler CD spektroskopisi ve DSC cihazlarıyla değerlendirilmiştir. Deneysel çalışma sonucunda; Titanium üzerine adsorbe olan maksimum BSA miktarı 2 mg/m², HAP üzerine adsorbe olan maksimum BSA miktarının ise 1.4 mg/m² olduğu bulunmuştur. Düşük BSA konsantrasyonlarında HAP adsorbentinden desorbe olan miktarın % 6.7; yüksek konsantrasyonda ise %8.8 olduğu görülmüştür. Titanium'dan desorbe olan miktar ise belirlenememiştir. Düşük BSA konsantrasyonlarda HAP üzerine gerçekleşen adsorpsiyon sırasında BSA'nın yapısında bulunan α -heliks'in β -sheet'e

dönüşümü yüksek BSA konsantrasyonlarda oluşandan daha fazladır ve titaniumda oluşan dönüşümün ise daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Protein ve adsorbent yüzeyi arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşimler ve proteinin yapısında meydana gelen konformasyonel değişimlerin adsorpsiyon prosesinin itici gücü olduğu belirtilmiştir. BSA'nın yapısında meydana gelen konformasyonel değişimler proteinin yükünü değiştirerek HAP ve titanium'un minerilizasyonu etkilediği bulunmuştur.

Michele Lafisco ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışma; Farklı boyut, yüzey alanı, kristallik derecesi ve yüzey özelliklerine sahip olan iki biyomimetik karbonat-HAP ile HSA ve BSA proteinleri arasında meydana gelen yüzey etkileşimleri ve bu proteinlerin adsorpsiyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada adsorpsiyon fizikokimyasal özellikleri farklı olan CHAps (Ca/P:1.45) ve CHAns (Ca/P:1.30) nano kristalleri üzerinde ve çeşitli protein (0.5, 1.0 ve 4.0 mg/ml) konsantrasyonlarında pH 7.4'de gerçekleştirilmiştir. Adsorbe olan max. BSA miktarları sırasıyla; CHAps 0.60 mg/m² ve CHAns 0.30 mg/m²'dir. Adsorbe olan max. HSA miktarı ise CHAps ve CHAns için 0.35 mg/m²'dir. Serum albumin proteinleri ve CHA yüzeyleri arasında oluşan hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerin adsorpsiyonu etkilediği belirtilmiştir. Adsorbe olan proteinlerin ikincil yapı değişimleri FT-IR spektrofotometresiyle incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre; adsorbe olan BSA'nın yapısında bulunan α -heliks'lerin β -sheet'e dönüşümünde bir artış görüldüğü ; adsorbe olan HSA'nın yapısının β -sheet'e dönüşümünde ise önemli bir artış görülmediği bulunmuştur. Ayrıca CD spektrofotometresi de süzünite bulunan BSA ve HSA proteinlerinin ikincil yapı değişimleri incelenmiştir ve α -heliks de gözle görülür bir düşüş olurken; β -sheet de artış olduğu gözlemlenmiştir. Proteinin düşük başlangıç konsantrasyonlarında CHA yüzeyleri ile oluşan güçlü etkileşimler yapısal değişimlerin önemli bir kanıtıdır. Proteinlerin farklı CHA yüzeylerine olan adsorpsiyonu birbirine yakın olmasına rağmen; her iki proteinin en iyi Chaps adsorbentine adsorbe olduğu bulunmuştur. Adsorpsiyon kinetiklerinin de Langmuir ve Freundlich modellerine uyduğu bulunmuştur.

Aya Fujiwara ve arkadaşları (1998) BSA ve LSZ proteinlerinin CaHAP adsorbenti üzerine olan adsorpsiyon eğilimlerini desorpsiyon ve iki adımlı adsorpsiyon methoduyla incelemişlerdir. Bu çalışma 15°C de, Ph 6.0'da KCI tamponu varlığında yürütülmüştür ve çalışmada Ca/P oranı 1.61-1.67 arasında değişen 5 çeşit CaHAP kullanılmıştır. Ayrıca BSA ve LSZ proteinlerinin başlangıç konsantrasyonları sırasıyla

0-10 ve 0-2 mg/cm³ arasında çeşitlilik göstermektedir. Adsorbe olan BSA miktarının HAP 'in Ca/P oranı arttıkça yükseldiği; nerdeyse desorbe olmayan BSA'nın desorpsiyon miktarının ise azaldığı görülmüştür. Adsorbe olan LSZ miktarının ise Ca/P oranına daha az bağlı olduğu ve bu oran arttıkça adsorpsiyonun az miktarda yükseldiği bulunmuştur. Desorbe olan LSZ miktarın ise BSA'ya göre daha çok arttığı görülmüştür. Bu çalışmada ayrıca diğer proteinle kaplı HAP yüzeylerine bir diğer proteinin adsorbe olması olarak bilinen pre-adsorpsiyon metodu da incelenmiştir. Pre-adsorpsiyon metodunda BSA kaplı HAP yüzeyine adsorbe olan LSZ miktarının klasik adsorsiyonla adsorbe olan LSZ miktarından daha yüksek olduğu bulunmuştur. Diğer yandan LSZ kaplı HAP yüzeyine adsorbe olan BSA miktarının klasik adsorpsiyonla adsorbe olan BSA miktarıyla aynı olduğu görülmüştür. Adsorbe olan miktarların değişmesinin nedeni proteinler ve CaHAP yüzeyleri arasında meydana gelen elektrostatik çekim kuvvetinin değişmesi olduğu belirtilmiştir.

Keishiro vd. (2010) çalışmalarında, farklı şekil, boyut ve yüzey özelliklerine sahip HAP parçalarının hazırlanması, parçacıkların değişen özelliklerine göre gerçekleşen protein adsorpsiyon miktarının değerlendirilmesi ve proteinlerin ilaç taşıyıcısı olarak kullanımı için desorpsiyonu incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan küresel HAP'lar, gözenekli HAP mikrogranüllerinin sinterlenmesiyle oluşan solvent difüzyon methodu ve değişen miktarlarda EDTA ilavesiyle hazırlanan homojen çökme metodları kullanılarak elde edilmiştir. Ancak kristal büyümenin en iyi kontrol edildiği metod homojen çökme metodur ve HAP parçacıklarının boyutunu, şeklini ve yüzey özelliklerini üre konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi ve reaksiyon hacmi etkilemesine rağmen en önemli etkiyi EDTA (0, 0.01, 0.05, 0.1, ve 0.5) konsantrasyonundaki değişimin gösterdiği bulunmuştur. Model protein olarak BSA ve LSZ proteinleri kullanılmıştır. Üre konsantrasyonu arttıkça küresel HAP parçalarının boyutunun küçüldüğü, reaksiyon sıcaklığı arttıkça ve reaksiyon süresi 10 dakikanın altında olduğunda HAP parçalarının daha da küreselleştiği, EDTA konsantrasyonu yükseldikçe HAP parçalarının yüzey alanının arttığı; boyutlarının ise küçüldüğü görülmüştür. Adsorpsiyon sonuçlarına göre; BSA proteini maksimum adsorpsiyonu EDTA 0.1 mM olduğunda göstermiştir. LSZ proteinin adsorpsiyonu EDTA konsantrasyonu ile artış göstermektedir ve maksimum adsorpsiyon EDTA 0.5 mM olduğu durumda elde edilmiştir. İlaç taşıyıcısı olarak kullanılan HAP'ın yüzeyinden

adsorbe olan proteinlerin salınımının difüzyonla, iyon değişimiyle, HAP taşıyıcısının degrasyonuyla ve HAP parçalarıyla kontrol edildiği belirtilmektedir.

Yumi Uoya vd. (2002) yaptıkları çalışmada, CaHAP üzerine BSA'nın adsorpsiyon davranışına acetonitrilin (AN) etkisini UV ve CD spektrofotometreleri kullanarak incelemiştirlerdir. Acetonitril eklemelerinin BSA proteinin birincil, ikincil ve üçüncül yapılarında değişikliğe sebep olarak adsorpsiyonu etkilediği görülmüştür. Çalışmada boyutları 29-108 nm arasında değişen ve farklı Ca/PO₄ atomik oranlarına sahip 3 çeşit kolloidal HAP parçaları kullanılmıştır ve BSA protein konsantrasyonu 0-10 mg/ml; eklenen AN miktarları ise hacimce %0-50 arasında değişiklik göstermektedir. Adsorpsiyon sonuçlarına bakıldığında; AN eklentisi olmadan BSA tampon çözeltisinin HAP-I (en kısa parça) adsorbentine olan adsorpsiyon miktarının %16 olduğu bulunmuştur. %10 oranında AN eklendiğinde adsorpsiyon miktarı düşüş göstermiştir. Adsorpsiyon miktarının AN %20 oranında eklendiğinde maksimum olduğu görülmüştür. %30-50 arasında artış gösterdikçe adsorbe olan BSA miktarının ise azaldığı bulunmuştur. HAP-II (orta uzunlukta) ise adsorpsiyon miktarı AN miktarı arttıkça düşüş göstermiştir. HAP-III (en uzun) adsorbenti diğer adsorbentlerden farklı bir davranış göstererek AN miktarı arttıkça adsorpsiyonun yükseldiği gözlemlenmiştir. HAP-III'ün diğerlerinden farklı adsorpsiyon davranışı göstermesinin nedeni parçacık boyutlarının farklılığı olarak belirtilmiştir. Ayrıca adsorpsiyon kapasitesinin düşük BSA konsantrasyonlarında arttığı görülmüştür.

Saki Mizumoto ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada, Çeşitli sıcaklıklarda (250°C -800°C) sinterlenen CaHAP adsorbentlerinin BSA, LSZ ve MGB proteinlerinin adsorpsiyon davranışı üzerine olan etkisini incelemiştirlerdir. HAP parçalarının TEM, XRD, FTIR ve gaz adsorpsiyonu ölçümleri sonucunda yüksek derecede kristalize, çubuk şeklinde ve gözeneksiz olduğu görülmüştür. Kesikli yapılan adsorpsiyon sonuçlarına göre; 200°C ve 400°C ısı işlem görmüş HAP parçacıklarına adsorbe olan BSA ve LSZ miktarında çok bir değişiklik görülmemiştir; 600°C'den itibaren ise ısı artışıyla adsorbe olan BSA ve LSZ miktarlarında artış gözlemlenmiştir. MGB, LSZ ve BSA protein sistemlerinden tamamen farklı bir adsorpsiyon davranışı göstermiştir ve HAP parçalarının sinterleme sıcaklığının artışı adsorbe olan MGB miktarında değişikliğe sebep olmamıştır. 1000°C'de adsorbe olan protein miktarlarına bakıldığında; adsorbe olan BSA miktarının 5.5 kat, LSZ miktarının 3 kat arttığı ve MGB miktarının ise değişmediği görülmüştür. Isı işlemi HAP parçalarının C ve P bölgelerinde

değişikliğe sebep olmuştur. Bu durum adsorbe olan asidik BSA ve bazik LSZ miktarlarında değişikliğe sebep olmuştur; adsorbe olan MGB miktarında ise MGB nötr olduğundan bir değişiklik görülmemiştir.

Shohei Oda ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2008) BSA, MGB ve LSZ proteinlerinin CaHap üzerine olan adsorpsiyonuna pirfosfat (PP) iyonlarının etkisini ele almışlardır. Çubuk şeklinde olan HAP parçacıklarının özellikleri TEM, XRD ve ICP-AES cihazları kullanılarak incelemiştir. Çalışma KCl çözeltisiyle 15°C'de yürütülmüştür ve proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarının çeşitli oranlarda olan PP (0-1.5 mmol/dm³) varlığında değişmediği belirlenmiştir. Adsorbe olan BSA miktarının PP eklentisi arttıkça azaldığı; adsorbe olan MGB miktarının PP konsantrasyonu arttıkça azaldığı görülmüştür. Adsorbe olan miktarın azalmasının sebebi PP'lerin HAP üzerinde BSA ve MGB proteinlerinin adsorbe olduğu bölgeye daha çabuk adsorbe olmasıdır. Adsorbe olan LSZ miktarı ise PP konsantrasyonu arttıkça artış göstermiştir. LSZ adsorpsiyonunda PP ve LSZ proteini arasında bulunan elektrostatik çekim nedeniyle artış gözlemlenmiştir.

1.2 Tezin Amacı

HAP mükemmel biyouyumluluğu, toksik olmaması ve proteinler ve enzimler gibi biyomoleküllere yüksek benzeşmesi nedeniyle büyük ilgi çekmektedir.

Proteinlerin çözüldüden katı yüzeylere adsorpsiyonu bilimsel önemi olduğu kadar biyokirlenme, gıda üretimi, biyosensör geliştirilmesi ve biyouyumlu malzeme yapımı gibi uygulamalar için de büyük öneme sahiptir. Bu çalışmanın amacı toksik olmayan ve kemik mineraline benzer kristalografik yapıya sahip HAP üzerine olan BSA adsorpsiyonuna temas süresinin, pH'ın polimer katkısının, HAP üretimi esnasında katılan katkı maddesinin ve HAP'ın sinterleme sıcaklığının etkilerinin incelenmesidir.

1.3 Orjinal Katkı

Bu çalışmada biyokimya ve çevre bilimi başta olmak üzere pek çok alanda önemli olan protein adsorpsiyonu konusuna katkı sağlamak amacıyla farklı üretim şartlarında üretilmiş HAP üzerine BSA proteini adsorpsiyonu incelenmiştir.

BÖLÜM 2

PROTEİN

Proteinler, canlıların yaşamla ilgili birçok fonksiyonunda görev alan önemli biyomoleküllerdir. Proteinler membranların, kas ve bağ dokusunun yapısal elemanlarıdır. Birçok molekülün vücut içinde taşınmasında ve depolanmasında görev alırlar [15].

2.1 Protein Tanımı ve Proteinlerin Yapılarındaki Bağlar

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 [16]. Diğer bir deyişle; hücre yapısının temel organik maddesi olan ve yaşamla ilgili tepkimelerde doğrudan ya da dolaylı olarak rol oynayan proteinler büyüme, gelişme ve dokuların onarımı gibi pek çok biyolojik olayı düzenleyen kompleks öğelerdir. Proteinler, tabiatta 300 civarında bulunan amino asitlerin yalnızca 20 tanesinin farklı sıralamayla bir zincir üzerinde kondenzasyon polimerizasyonu ile birleşmesi sonucu oluşur [15]. Bu standart 20 amino asidin farklı sayıda dizilişleri neticesi yüzbinlerce farklı yapı ve vazifede proteinler oluşmaktadır. Proteinlerin işlevlerinin çoğu, kendisini oluşturan amino asitlerin özelliklerinin tayin edilmesiyle anlaşılabilir. Her proteindeki amino asit dizisinin sırası bir gen tarafından tanımlanır ve genetik kod ile kodlanmıştır. Genetik kod 20 standart amino asit tanımlasa da proteinlerdeki amino asitler çevrim sonrası değişimle kimyasal olarak değişikliğe uğrarlar. Bu değişimler ya proteinin işlev görmeye başlamasından önce gerçekleşir ya da kontrol mekanizmalarının parçası olarak, proteinin işlevini değiştirmek için oluşmaktadır. Proteinler belli işlevleri yerine

getirmek için beraberce de çalışabilirler ve bazıları bir araya gelip kararlı kompleksler oluşturabilir [17].

Proteinler, bütün hücrelerde ve hücrelerin bütün kısımlarında bulunurlar ve hücrelerdeki bütün biyolojik olayların yapı taşıdır. Hücreler içerisinde gerçekleşen olaylar; yüz binlerce farklı proteinin kendilerine verilmiş olan vazifeleri yerine getirmeleri ile gerçekleşmektedir. Proteinler, inanılmaz derecede birçok işlev görürler ve yaşamsal bütün işlevler proteinlere bağlıdır. Vücudun çalışmasında düzenleyici olarak görev alan bazı enzim (amilaz, lipaz, laktat dehidrogenaz vb.) ve hormonların (insülin, büyüme hormonu vb.) yapılarında protein vardır. Alyuvarlara rengini veren hemoglobin bir protein bileşimidir. Kasların büyük kısmı miyozin ve aktin diye adlandırılan protein türlerinden meydana gelmiştir. Kastaki kontraktıl proteinler hareketi sağlamaktadırlar. Vücudun mikroplara karşı savunmasında görev alan antikor dediğimiz koruyucu maddeler ile bazı vitaminlerin yapımında proteinin etkinliği bulunmaktadır. Kemikte kollajen, kalsiyum fosfat kristallerinin depolanmasını sağlar. Kanda albümin ve hemoglobin taşıma görevi alırken; immünoglobülinler bakteri ve virüslerin yıkılmasında görev alırlar. Aynı zamanda proteinler bir enerji kaynağıdır ve 1 gram protein vücutta 4 kcal. enerji oluşturur [18].

Protein sağlığımız için en önemli bileşiklerden biridir. Hayvansal kaynaklardan alınabildiği gibi birçok farklı yollarla beslenmemizde protein almamız mümkündür. Proteinler kemikten saça, kandan beyine tüm dokularda bulunurlar; dokuların yenilenmesinde ve onarımında kullanılırlar. Organizmada çok değişik proteinler bulunur. Bunlar yalnız cinse özel değil aynı cinsler arasında organlara da özeldir. Yani aynı organizmada çeşitli organlardaki proteinler birbirlerinden farklıdır [19].

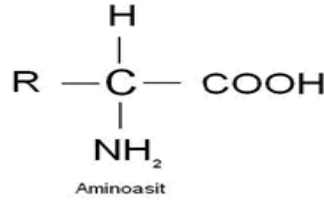
Proteinlerin yapılarında kovalent bağlar ve kovalent olmayan bağlar vardır. Proteinlerin yapılarındaki kovalent bağlar, peptit bağları ve disülfid bağlarıdır; kovalent olmayan bağlar ise hidrojen bağları, iyon bağları ve hidrofob bağlar (apolar bağlar)'dır [16].

2.2 Protein Moleküllerinin Yapısı ve Konformasyonu

Proteinler bilinen biyokimyasal maddeler arasında yapısı en karmaşık olanlardır. Bir proteinin yapısındaki amino asitlerin sırası ve sayısı, o proteinin üç boyutlu yapısını ve fonksiyonunu tayin eder.

Proteinler, 20 farklı L-alfa-amino asitten oluşmuş lineer polimerlerdir. Tüm amino asitler, bir alfa karbonuna birer karboksil, amino grubu ve bir yan zincirin bağlanıyor olması gibi ortak yapısal özelliklere sahiptir. Yan zincirlerin farklı kimyasal özellikleri proteinlerin üç boyutlu yapısını belirlemekte ve dolayısıyla protein işlevine etki etmektedir. Bir polipeptit zincirdeki amino asitler bir dehidrasyon tepkimesi sonucu oluşan peptit bağı ile birbirlerine bağlanmaktadır. Protein zincirine dahil olmuş amino asit birimlerine kalıntı; karbon, azot ve oksijen atomlarından oluşan tekrarlayan diziye de ana zincir ya da protein omurgası denir [17].

Proteinlerin kimyasal yapısını incelediğinde merkezde bir karbon (C) atomu ve bu atoma bağlı bir karboksil (-COOH) grubu ve amino (-NH₂) grubu vardır. Bu iki yapı amino asitlerin ortak temel yapısını teşkil eder. Amino asitler arasındaki farklılığı ise karbon (C) atomuna bağlı R grubu (yan zincir) sağlar. Amino asitler R grubunun kimyasal özelliklerine göre suda eriyenler ve suda erimeyenler olmak üzere iki gruba ayrılır. Karboksil grubu (-COOH) asidik, amino grubu (-NH₂) bazik özellik gösterir ve bu sebeple hücrede meydana gelebilecek pH değişimlerinde tampon görevi üstlenirler [20]. Amino asidin yapısı Şekil 2.1’de gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Aminoasidin yapısı [20]

Her bir amino asitin kimyasal yapısı nedeniyle, protein zincirinin bir yönü vardır. Proteinin serbest bir karboksil grubuna sahip olan ucu, karboksi ucu (C ucu) ya da karboksi terminali (C terminali); serbest bir amino grubu olan ucu ise amino ucu (N ucu) ya da amino terminali (N terminali) olarak adlandırılır [17].

Protein moleküllerinin yapısı rastlantıya bağlı bir dizilim göstermemektedir. Her molekülün özgün kimyasal bileşimi, molekül ağırlığı ve amino asit dizilimi vardır. Protein moleküllerinin üç boyutlu biçimleri de karakteristik özellikler taşımaktadır. Çoğu protein katlanarak kendine has üç boyutlu bir yapıyla şekil alır. Proteinin doğal olarak katlanıp oluşturduğu şekle onun doğal hali denilmektedir. Çoğu protein kendini oluşturan amino asitlerin yapısal eğilimleri yoluyla yardım görmeden katlanabilirse de, diğerleri doğal hallerine elde edecek şekilde katlanabilmek için moleküler şaperonlara

gereksinim duyarlar. Proteinler genel anlamda dörtlü bir yapı gösterirler: birincil yapı, aminoasitlerin peptit bağlarıyla birbirlerine bağlanarak oluşturdukları zincir yapı; ikincil yapı, fibröz proteinlerde olduğu gibi bir eksen çevresinde oluşturdukları sarmal yapı; üçüncül yapı, polipeptit zincirinin globüler proteinlerde olduğu gibi kıvrılarak ya da bükülerek oluşturduğu yapı ve dördüncü yapı, birden fazla polipeptit zinciri içeren proteinlerdir ve uzaysal dizilim ilişkileri vardır [21].

2.3 Proteinlerin Sentezi ve zellikleri

Canlıların yapısındaki proteinlere 20 çeşit amino asit katılır. Bu 20 çeşit amino asitten 12 tanesi insanlarda sentezlenebilirken 8 tanesi dışarıdan hazır olarak alınmaktadır. Yapay olarak ise sentezlenebilen 70 kadar amino asit vardır. Proteinler her canlıda farklı olduğu gibi her canlının farklı dokularında da birbirinden farklıdır. Bu farklılık proteinleri oluşturan amino asitlerin çeşidi, sayısı, sırası ve dizilişinden kaynaklanır. Bunun nedeni de her canlı ve dokudaki proteinlerin sentezlenmesini sağlayan genlerin farklı olmasıdır. Proteinlerin sentezlenmesi için gerekli olan amino asit çeşitlerinden bir tanesi bile eksik olsa protein sentezlenemez. Proteinlerdeki aminoasitlerden bir tanesinin bile çeşidi, sırası veya sayısı değişirse proteinin yapısı ve özelliği değişmektedir [22].

Protein sentezi DNA sayesinde oluşmaktadır. DNA 4 harfli bir alfabeden (4 çeşit nükleotid) oluşurken protein 20 harfli bir alfabeden (20 çeşit aa) oluşur. Bunun için bu iki alfabe arasında eviri yapılması gerekmektedir [22]. Bu olay kısaca řu şekilde olmaktadır. Vücudumuzda DNA molekülleri ile depolanan genetik bilgiler, translasyon dediğimiz bir olay ile amino grup asitlerden oluşan protein haline gelmektedir. Bu olay sırasında önce belirli bir miktar DNA'dan buna karşılık gelen RNA dizisi oluşur. Transkripsiyon denilen bu olaydan sonra RNA yapısında bulunan ve aktif protein sentezine katılmayan intron dediğimiz RNA dizileri ortadan kaldırılır. İnransuz RNA'ya mRNA denir ve bu mRNA, ribozomlarda birçok karmaşık olaydan sonra amino grup asit haline çevrilir ve değişik amino asitlerin birleşmesiyle proteinler meydana gelmektedir. Bu sayede DNA'larda hazır bulunan bilgiler protein formunda dokularda ve hücrelerde faaliyet göstermeye başlar. Proteinin yanlış sentezlenmesinin ana nedeni DNA'nın yapısında olabilecek bir değişikliktir ve buna mutasyon denilir. Ayrıca çeşitli proteinler sentezlendikten sonra bazı modifikasyonlara uğrarlar. Bunlar;

proteinin bir kısmının kopması, fosfor, şeker karbonhidrat molekülleri eklenmesi gibi olaylardır. Bu aşamalarda olabilecek bir bozukluk proteinin gerçek fonksiyonunu göstermesine engel olmaktadır [22].

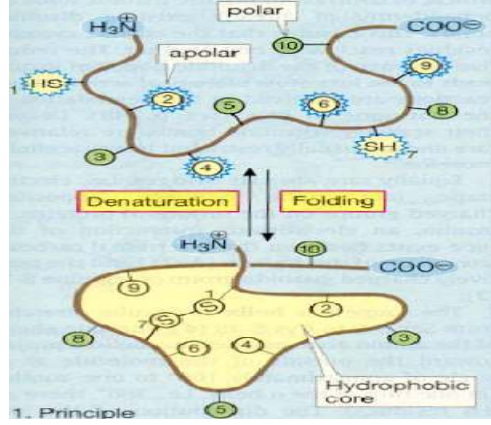
Protein yanlış sentezlendiğinde proteinin fonksiyonu bozulmaktadır. Söz konusu proteinin fonksiyonu örneğin hücrelerin bölünmesine yardımcı olmaksı, bu proteinin sentezindeki bozukluk hücrelerin bölünmesinde sorun çıkartacaktır. Günümüzde birçok proteinin yanlış ya da eksik sentezlenmesinin bazı hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Bazı tip kanserlerde örneğin çok özel proteinlerde mutasyon olduğu hem deney hayvanlarında hem de insanlarda gösterilmiştir. Tümör oluşumunu önleyen bazı proteinlerde olabilecek sentez hatalarının organizmaları kanser gelişimine daha hassas hale getirdiği bilinmektedir. Yanlış protein sentezi sadece kanserli kişilerde görülmez. Yapılan çalışmalar birçok hastalıkta spesifik protein veya proteinlerde yanlış sentezlenme olduğunu göstermiştir. Uzayıp giden bu hastalıklara birkaç örnek vermek gerekirse, şeker hastalığı, bazı akciğer hastalıkları, alzheimer hastalığı ve birçok bağ dokusu hastalığı sayılabilir [22].

Ayrıca yanlış sentezlenen her proteinin mutlaka bir hastalığa neden olması gerekmez. Bazı sentezlenme hataları proteinin fonksiyonunda çok önemli bir değişikliğe neden olmaz. Yine aynı şekilde bazı durumlarda yanlış sentezlenme sonucu fonksiyonunu bozulan proteinin görevi ona benzer bir başka protein tarafından üstlenilebilir ve organizmada olabilecek herhangi bir fonksiyon eksikliği önlenmiş olur [22].

Hücre içi ve hücre dışında önemli yapı maddeleri olan proteinlerin özellikleri aşağıdaki gibidir;

Proteinler çeşitli etkilerle denatüre olurlar; protein denatürasyonu peptit bağları hidroliz olmadan proteinin yapısını çözülüp disorganize olması sonucunda meydana gelmektedir [22]. Denatürasyon sırasında kovalent bağlar korunur. Ancak disülfid bağları kırılarak çok sayıda sülfidril grubu açığa çıkarır. Yani molekül yumak şeklini koruyamayıp açılmaya, düz şekil almaya başlar [23].

Bir proteinin denatürasyonu, proteinin tersiyer yapısının bozulması, sekonder ve primer yapısının korunması biçiminde olursa reversible (geri dönüşümlü)'dür. Denatüre olmuş bir proteinin tekrar eski haline dönmesine renatürasyon denir [16]. Proteinin denatürasyonu Şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2.2 Proteinin denatürasyonu [16]

Bir proteinin denatürasyonu, proteinin tersiyer ve sekonder yapısının bozulması, yalnızca primer yapısının korunması biçiminde olursa irreversibl (geri dönüşümsüz)'dür [16].

Bir proteinin denatüre olmasıyla fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişimler görülür. Proteinin çözünürlüğü çok azalır ve biyolojik aktivitesi kaybolur. Bir proteinin denatürasyonuna neden olan etkiler şunlardır: Isı, X-ışını ve UV ışınlar, ultrason, uzun süreli çalkalamalar, tekrar tekrar dondurup eritmeler, asit etkisi, alkali etkisi, organik çözücülerin etkisi, derişik üre ve guanidin-HCl etkisi, salisilik asit gibi aromatik asitlerin etkisi, dodesil sülfat gibi deterjanların etkisi [16].

Proteinler, amfoter maddeler yani amfoter elektrolit veya amfolittirler; hem asit hem baz gibi davranma özellikleri vardır. Bir protein molekülü, her protein için farklı ve karakteristik olan, proteindeki elektriksel yüke sahip R gruplarının sayıları ve elektriksel yüklerinin çeşidi tarafından belirlenen ve izoelektrik nokta diye tanımlanan bir pH değerinde iyonlaşmış fakat dış ortama karşı elektriksel yönden nötral bir yapıdadır [16]:



Bir protein molekülü, izoelektrik noktasından düşük pH ortamında pozitif yüklü katyon $(H_3N^+ \cdots\cdots\text{COOH})$ şeklinde bulunur; izoelektrik noktasından yüksek pH ortamında ise negatif yüklü anyon $(H_2N\cdots\cdots\text{COO}^-)$ şeklinde bulunur [16].

Proteinler, amfolit olma özellikleriyle ilgili olarak da çeşitli özelliklere sahiptirler [16]:

a) Proteinlerin hem baz hem asit bağlama özellikleri vardır. Bir proteinin baz bağlama yeteneği, amino asit kalıntılarının R yan zincirlerindeki asidik grupların sayısına

bağlıdır; asit bağlama yeteneği de amino asit kalıntılarının R yan zincirlerindeki bazı grupların sayısına bağlıdır.

b) Proteinlerin hem negatif iyon hem pozitif iyon bağlama özellikleri vardır. Proteinlere bağlanan birçok iyon suda çözünmez tuz oluşturur ve protein çöktürücü olarak etkilidirler. Triklor asetik asit, pikrik asit, tungstik asit gibi çok kullanılan protein çöktürücülerinde asitlerin anyonu, katyonlaşmış proteinlerle birleşir.

Hg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} gibi ağır metal katyonları anyonlaşmış proteinlerle birleşir ve protein çöktürücü olarak etki ederler. Cu^{2+} , Ni^{2+} gibi bazı ağır metal katyonları, geleneksel tuz oluşumu yerine proteinle koordinasyon kompleksleri oluştururlar.

c) Proteinlerin su bağlama ve bağlı suyu verme yetenekleri vardır. 1g protein, yaklaşık 0.3-0.5 g su bağlar. Etanol, aseton ve nötral tuzlar gibi çok hidrofil maddeler bir proteinin bağladığı suyu çekerek protein çöktürücü olarak etki ederler.

d) Proteinler, elektriksel alanda farklı hızlarda göç ederler. Bu göç, izoelektrik noktalarından düşük pH'larda katoda; izoelektrik noktalarından yüksek pH'larda anodadır. Proteinlerin elektriksel alanda göçme hızı, net elektrik yüklerine ve ortamın pH değerine bağlıdır. Bir protein, elektriksel alanda, izoelektrik noktasına eşit pH ortamında her iki kutup tarafından eşit kuvvetlerle çekilir; hiç bir kutba göç etmez; hareketsiz kalır.

Proteinler, polipeptit zincirindeki peptid bağlarının su girişi ile yıkılması sonucu hidroliz olurlar. Polipeptid zincirleri çok uzun olup yıkılmaları yine enzimler vasıtasıyla olmaktadır. Peptid bağlarını kıran enzim ise peptidaz enzimidir. Proteinlerin kısmi hidrolizi ile proteozlar, peptonlar ve peptitler oluşur; tam hidrolizi ile amino asitler oluşur. Proteinlerin hidrolizi, kaynatma, asit etkisi ve enzim etkisiyle olabilmektedir [16].

2.4 Proteinlerin Önemi ve Görevleri

Polisakkaritler, nükleik asitler ve yağlar gibi biyolojik makromoleküllere benzer şekilde proteinler de canlı organizmaların temel bileşenlerindedir ve hücrelerin içindeki her süreçte yer alırlar [17]. Öyleki metabolizmada düzenleyici uyarıcı görevler üstlenen çeşitli enzimler, hormonlar ve salgılar başlı başına birer proteindir ve metabolizma için yaşamsal bir role sahiptirler. Örneğin; enzimlerden sükröz, düzenleyici proteinlerden

yumurta akı, kandaki antikorlar canlılarda direkt biyolojik fonksiyonlara sahip olan protein çeşitleridir [20].

Yetişkinlerin vücut ağırlığının %16-18 kadarı proteindir. Vücuttaki toplam proteinin %45'i kaslarda, kalanı diğer dokulardadır. Protein; büyüme, gelişme, sağlıklı yaşama ve zeka gelişimi gibi insan hayatıyla ilgili her türlü olayda rol oynar. Proteinler besinlerle alınır, fazla alınırsa bile vücutta depolanmaz. Ancak kısa süreli yetersizliklerde kullanılabilir kadar yedek protein birikebilir. Karbonhidrat ve yağlardan protein yapılmaz. Vücudun çalışması için sürekli protein harcanır. Besinlerle yeteri kadar alınmazsa yedek protein tükendikten sonra, hücredeki yapısal proteinler yıkılmaya başlar ve sağlık bozulur. Bunun için günlük protein ihtiyacının düzenli karşılanması gerekmektedir. Proteinler enzimlerle hidrolize olup, parçalanırlar ve amino asitleri küçük moleküller halinde açığa çıkarırlar. Protein yetersizliğinde büyüme yavaşlamakta ve zihinsel gelişimde gerileme görülmektedir. Ayrıca vücudun hastalıklara karşı direnci azalmaktadır. Proteinlerin yapılarının değişmesi, bozulması durumunda insan hayatı tehlikeye girer [24].

Proteinler, canlıda hem yapının oluşmasında hem de pek çok görevin yapılmasında doğrudan etkilidir. Hücrelerin kendine özgü özelliklerini kazandıran maddeler, yapılarını oluşturan protein çeşitleridir. Hücrede gerçekleşen hücreyel olayların yapılması da proteinlerle sağlanır. Proteinlerin başlıca görevleri aşağıdaki gibi sıralanır [19]:

- Proteinler hayvan vücudunda organların ve yumuşak dokuların yapı unsurudur.
- Büyüme ve erginlik dönemlerinde yeni dokuların yapılmasında etkindirler.
- Yıpranan dokuların onarılması işlevine sahiptirler.
- Enzimlerin ve hormonların yapımında görev alıp yapılarında bulunurlar.
- Sinirsel uyarıların iletiminde rol oynarlar.
- Canlıya destek olma ve hareket olanağı sağlamada görev alırlar.
- Vücudun hastalıklara karşı dayanıklılığında ve hastalık etkenlerine karşı korunmada kullanılırlar.
- Oksijen ve diğer maddelerin vasküler yolla taşınmasında görev alırlar.
- Kanın pıhtılaşmasında rol oynarlar.
- Su ve elektrolit dengesinin korunmasında doğrudan yada dolaylı olarak görevleri vardır.

- Vücuttaki asit baz dengesini normal dengede tutmak için tampon vazifesi görürler.
- Kalıtsal faktörler için kromozom ve genlerin yapısında bulunurlar.
- Kasların kontraksiyonunda görev alırlar.
- Hücrelerle hücreler arası sıvılar arasında besin unsurlarının değişimine yardım ederek ödemlere sebebiyet veren sıvıların anormal bir şekilde toplanmasına engel olurlar.
- Enerji veren diğer besin unsurları (karbonhidrat ve yağ) yeteri kadar alınmazsa veya diyetle fazla protein alınırsa enerji sağlarlar.
- İştahı kontrol altına almak yani yeteri kadar protein alındığında açlık hissini bastırılmış olunur. Örneğin; et ve et ürünleri yediğimiz zaman kolay kolay acıkmayız bunun sebebi etde bulunan hayvansal proteindir.

2.5 Proteinlerin Saflaştırılması ve Saflaştırılma Metodları

Proteinlerin yapısının çözümlenmesi birçok hastalığın teşhisi, tedavisi ve ilaç üretimi için çok önemlidir. Bir proteinin amino asit kompozisyonunu ve dizilişini, molekül ağırlığını ve diğer fiziksel özelliklerini araştırmak için öncelikle proteinin saflaştırılması gereklidir. Bir hücre ve dokudan istenilen bir proteinin saf halde izole edilmesi oldukça güç bir olaydır. Bu proteinin konsantrasyonu düşük ise binlerce farklı protein arasından ayırmak ve saf halde elde etmek için bu proteine uygun olan saflaştırma tekniklerinin seçilmesi gerekir. Proteinlerin saflaştırılmasında bugün kullanılan yöntemler oldukça gelişmiştir. Saflaştırmada kullanılan yöntemlerden bir veya birkaçı arka arkaya kullanılarak protein saf halde veya safa yakın bir şekilde elde edilmektedir. Bugün pekçok enzim ve enzim olmayan proteinin saf ve kristal halde izole edilmesi başarılmıştır. Bir proteinin amino asit kompozisyonunu ve dizilişini, molekül ağırlığını ve diğer fiziksel özelliklerini çalışmak için öncelikle proteinin saflaştırılması gereklidir [25].

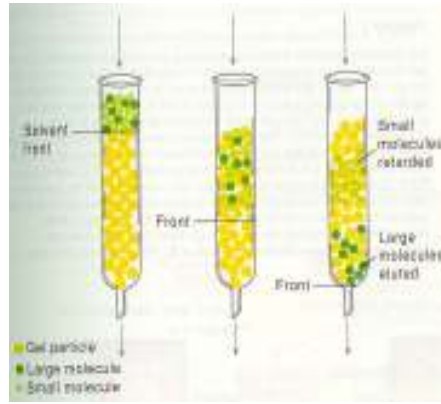
Bir doku ve hücre grubundan proteinleri izole edebilmek için öncelikle yapılması gereken bazı işlemler vardır. İlk safhada çalışmak istediğimiz proteinin en fazla bulunduğu doku veya hücre grubu seçilir. İlgilendiğimiz proteini dayanıklı tutacak tampon çözeltiler kullanılarak doku ve hücreler homojenize edilir. Hücre membranının ve nükleus membranının parçalanması gerekir. Daha sonra bu homojenat belirli hızlarda santrifügasyona tabi tutularak hücre partiküllerinden arındırılır. Böylece elde edilen

protein karışımı süpernatant halinde alınarak saflaştırma yöntemlerinden biri veya birkaçı kullanılarak proteinlerin saf halde izole edilmesi sağlanmaktadır [25].

2.5.1 Kromatografik Yöntemler

2.5.1.1. Jel Filtrasyonu

Jel filtrasyonu proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlar. Bu yöntemde proteinlerin birbirinden ayrılması, sabit fazdaki jelin oluşturduğu porların çapına göre moleküllerin belirli derecede engellenmesine dayanır. Sabit faz olarak kullanılan sefadeks, biojel, agaroz gibi dolgu maddeleri kolona doldurulduktan sonra uygun bir tampon ile yıkanır ve kararlı hale geçirilir. Daha sonra protein çözeltisi tampon ile birlikte kolonun üzerinden yavaş yavaş ilave edilir. Yer çekimine göre aşağı doğru hareket eden protein çözeltisi içerisinde bulunan küçük protein molekülleri kolon dolgu maddesinin küçük oyuklarına girerken, büyük proteinler bu oyuklara hiç girmeden kolondan ilk çıkan moleküller halinde ayrılırlar [26]. Şekil 2.3’de jel filtrasyonu gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Jel filtrasyonu [16]

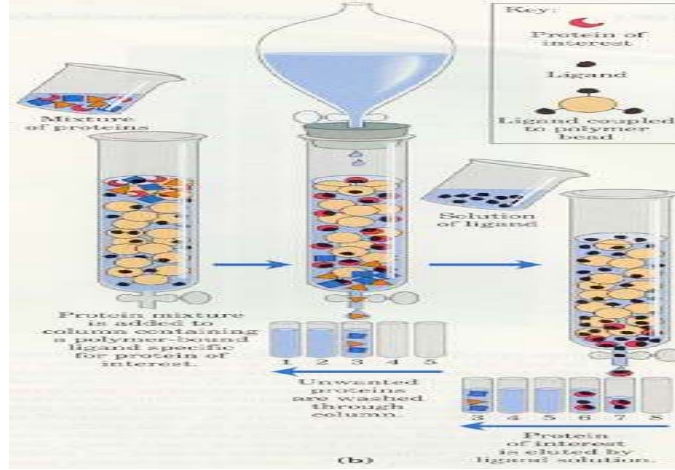
2.5.1.2 İyon Değişirici (Ion-Exchange) Kromatografisi

Proteinleri asit ve baz özelliklerine göre ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde kolon içine pH 7.0’de pozitif yük taşıyan bir selüloz türevi olan DEAE-selüloz (dietil aminoetil selüloz) konur. Bu bileşiğe negatif yük taşıyan proteinler bağlanırken diğer proteinler kolondan çıkarlar. Kolonun içerisine konan diğer bir bileşik ise pH 7.0’de negatif yük taşıyan CM-selüloz (karboksimetil selüloz) dur. Bu bileşiğe de pozitif yük taşıyan proteinler bağlanır. Diğer proteinler ise kolon dolgu maddesine

bağlanmadan kolondan çıkar. Daha sonra kullanılan tamponların iyonik kuvveti değiştirilerek kolon materyaline geçici olarak bağlanmış olan bu proteinler kolonun dolgu maddesinden ayrılarak kolondan çıkmaya başlarlar. Fraksiyon toplayıcısı ile küçük miktarlar halinde tüplerde toplanan proteinler asidik yada bazik özelliğine göre diğer proteinlerden ayrılmış olur. İyon değiştirici kromatografi aynı zamanda amino asitlerin ve peptitlerin de birbirinden ayrılmasını sağlar. Bu tip kromatografi özellikle molekül ağırlıkları birbirine çok yakın olan molekülleri ayırmak için kullanılmaktadır [26].

2.5.1.3 Affinite Kromatografisi

Proteinlerin çok küçük molekülleri çok spesifik bir şekilde bağlamaları özelliklerine dayanan ayırma yöntemidir [26]. Çok kompleks bir karışım içinde bulunan bazı proteinler affinite kromatografisi sayesinde tek basamakta oldukça saf halde elde edilirler. Affinite kromatografisi için polisakkarit yapısındaki agaroz taneciklerine kimyasal bir reaksiyon ile bir enzimin koenzimi bağlanır. Üzerine koenzim bağlanmış olan agaroz tanecikleri kolon dolgu maddesi olarak kullanılır. Protein karışımı bu kolona uygulandığı zaman yalnız ilgili enzim proteinleri koenzimin serbest ucuna spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma kovalent bir bağlanma değildir. Diğer proteinler koenzimin serbest ucuna bağlanma özelliğine sahip olmadıkları için kolondan ayrılırlar. Daha sonra serbest koenzim içeren çözelti kolona ilave edildiğinde, agaroz taneciklerine bağlı koenzime bağlanmış olan enzim molekülleri bu defa rekabetten dolayı çözelti ile birlikte gelen serbest koenzime bağlanarak kolondan çıkar. Böylece koenzime spesifik olarak enzim proteini diğer yüzlerce proteinden affinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırılmış olmaktadır. [26]. Affinite kromatografisi Şekil 2.4’de görülmektedir.

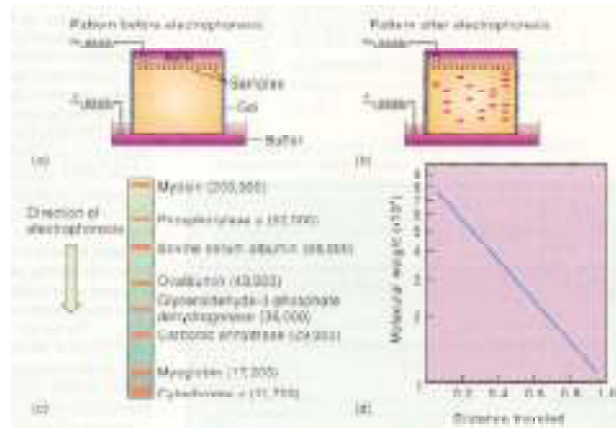


Şekil 2.4 Affinite kromatografisi [16]

2.5.2 Elektroforetik Yöntemler

2.5.2.1 Elektroforez

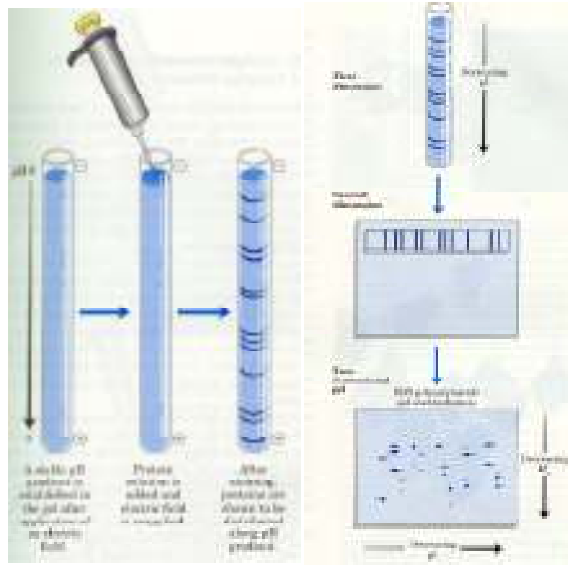
Proteinleri, izoelektrik noktalarından farklı bir pH değerine sahip elektriksel bir alanda farklı göçme hızlarına dayanarak ayırma yöntemidir [16]. Elektroforezde bir hareketli bir de hareketsiz faz vardır. Sabit faz olarak kağıt, asetat, selüloz, poliakrilamid, agaroz gibi dolgu maddeleri kullanılır. Sabit ortamdaki en önemli özellik moleküllerin porlardan kolaylıkla geçmesine dayanır. Hareketli faz olarak genellikle tamponlar kullanılır. Elektroforezin diğer yöntemlerden farkı bir elektriksel alan yaratılmasıdır. Protein çözeltisi bu elektriksel alanda farklı hızlarla bir elektrottan diğerine hareket ederek molekül ağırlıklarına ve taşıdıkları elektrik yüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Daha sonra boyama yaparak protein bantları görünür hale gelmektedir [26]. Elektroforez yöntemi Şekil 2.5’de gösterilmektedir.



Şekil 2.5 Elektroforez yöntemi [16]

2.5.2.2 İzoelektrik Fokuslama

İzoelektrik fokuslama, proteinlerin bir pH gradientinde izoelektrik noktalarına göre ayrılması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde; yüksek mobiliteye sahip sentetik poliamino-polikarboksilik asitlerin karışımları olan amfoterik bileşikler içeren jel polimerleştirilir. pH gradienti oluşturmak için sisteme akım verilir ve amfolitler izoelektrik noktalarına göre jelde düzenlenirler. En asidik olan anoda, en bazik olanda katoda doğru ilerlerler. Daha sonra örnek proteinler jele uygulanır ve yüklerine göre anoda ve katoda doğru hareket ederler. Proteinler jel üzerinde net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine (pI) kadar göç ederler ve bu noktada hareketsiz kalarak dururlar. En son aşamada protein bantlarının gözlenmesi için boyama yapılır fakat boyamanın olması için öncelikle jelden amfolitlerin uzaklaştırılması gerekir. Çünkü amfolitler jelin tamamen boyanmasına neden olurlar [26]. İzoelektrik fokuslama Şekil 2.6'da görülmektedir.



Şekil 2.6 İzoelektrik fokuslama [16]

2.5.3 Santrifügasyon Yöntemleri

2.5.3.1 Densiti Gradient (zonal) Santrifügasyon

Bir protein karışımını santrifügasyon yöntemi ile ayırmak için tüp içerisinde sükröz gibi bileşiklerle bir konsantrasyon gradienti yaratılır. Bunun için plastik tüp içerisinde en yoğunundan en az yoğununa doğru bir sükröz gradienti meydana getirildikten sonra tüpün en üzerine protein karışımı ilave edilir. Bu şekilde hazırlanmış olan tüp yüksek devirde

santrifüj edilecek olursa her bir protein kendi dansitesi ile aynı olan sükröz bölgesine toplanmaktadır. Tüp içerisinde farklı bantlar halinde ayrılmış olan proteinler daha sonra tüpün altı iğne ile delinip toplanarak veya tüp dondurulduktan sonra bu bantlar buz halinde kesilerek çözdürülür ve bu şekilde proteinler birbirlerinden ayrılmış olur [26].

2.5.3.2 Differansiyel Santrifügasyon

Differansiyel santrifügasyon ile bir karışımda bulunan partiküller boyutlarındaki farklılıklara bağlı olarak ayrılmaktadır. Homojenat relatif santrifügal kuvvet (RCF) arttırıldıkça fraksiyonlarına ayrılmaktadır [26].

2.5.4 Dializ ve Ultrafiltrasyon

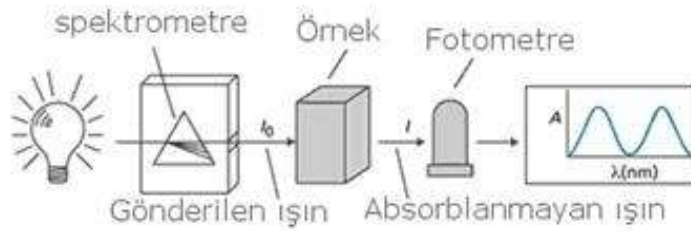
Proteinleri daha küçük molekül ağırlığına sahip moleküllerden ayırmak için diyaliz yöntemi kullanılır. Bu yöntem yarıgeçirgen bir membran içerisine konan protein çözeltisi içerisinden küçük moleküllerin membranın ultramikroskopik porlarından suyla ve tamponla ortam suyuna geçirilmesi tekniğine göre çalışır. Glukoz ve NaCl gibi küçük moleküller membrandan geçerken büyük protein molekülleri diyaliz porlarından geçemediği için içeride kalır. Ortam suyunun birkaç kez değiştirilmesi ile küçük moleküllerin protein çözeltisi içerisinden uzaklaştırılması mümkün hale gelmektedir [26].

Ultrafiltrasyon yöntemi de diyaliz tekniğine göre çalışır. Aradaki fark, diyaliz tüpünden küçük moleküllerin çıkması için hidrostatik basınç veya santrifüj gibi transmembran kuvvetlerinin etkisiyle proteinleri molekül büyüklüklerine göre diyalize göre daha hızlı ve daha yüksek verimlilikte ayrılmasını sağlar. Bu basınç sayesinde küçük moleküllerle birlikte bir miktar sıvı kaybedildiği için protein daha konsantre bir şekilde elde edilir [26].

2.6 Protein Tayin Yöntemleri

Protein çözeltilerinin konsantrasyonlarını belirlemede kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur. Yöntemlerin bu derece çokluğuna karşın, genelde herhangi bir örnekteki protein miktarını en iyi saptayan ve tam istediğimiz sonucu veren bir yol yoktur. Ancak protein miktarını en iyi şekilde saptayabilmek için proteinin ve örnekteki diğer bileşiklerin yapısına, deneyin hassasiyetine göre metod seçilmelidir [26].

Protein tayin yöntemlerinde tanımlanan tüm metotlar spektrofotometrik yöntemlere dayanmaktadır. Fotometrik tayinler bir numuneye giren ışıkla, çıkan ışığın şiddeti arasındaki oranın ölçülmesine dayanır. Bir kaynaktan çıkan ışık paralel bir demet haline getirilir, bir monokromatörden (prizma) geçirilir ve absorpsiyonun meydana geldiği küvete girer. Küvetten çıkan ışık demeti, gelen ışık demetinin şiddeti ile orantılı bir elektrik sinyal oluşturan fotoelektrik dedektöre çarpar. Her atom, molekül veya kimyasal bağın kendine özel spesifik bir ışık dalga boyu absorpsiyonu vardır. Spektrofotometre çözeltiye bilinen spesifik bir dalga boyu ışığını gönderip, bu ışığın ne kadarının absorbe olduğunu ve ne kadarının yayıldığını ölçen bir alettir. Bu ölçümlerde bir kimyasalın ne miktarda bulunduğunu hesaplayabiliriz. [27]. Spektrofotometrenin çalışma prensibi Şekil 2.7’de gösterilmektedir.



Şekil 2.7 Spektrofotometrenin çalışma prensibi [27]

Spektrofotometre ile absorbansın (A) ölçümleri yapılırken içinde absorblayıcı özelliği olmayan çözücü (kör-maddeden başka her şey içerir) küvete konularak uygun dalga boyunda sıfır ayarı yapılır ve örnek küvete yerleştirilerek absorbans değeri okunur [27].

Protein miktar tayini denemelerinde çoğu zaman protein karışımlarının veya etkisizlik katsayısı bilinmeyen proteinlerin miktarları tayin edilmek istenir. Bu durumda miktarı bilinen saf bir protein “standart” olarak kullanılmak suretiyle bir standart eğri oluşturulur. Standart eğri oluşturmak için miktarı bilinen standart proteinin çeşitli konsantrasyonlarda absorbansı ölçülür ve miktarı bilinmeyen protein örneğinin absorbansı standart proteinin absorbansı ile karşılaştırılır. Farklı proteinler farklı absorpsiyon spektrumu gösterirler ve hiç bir protein standardı tüm proteinler için gerekli görevi yerine getiremez. En iyi uygulama şekli, çalışılacak olan her protein için bir standart eğri çizmektir. Fakat bu her zaman olası değildir. Çünkü; protein saf olarak elde edilmeyebilir. Bu durumlarda ticari olarak satılan saf proteinler standart olarak kullanılır. En yaygın kullanılan protein standardı bovin serum albuminidir (BSA) [27].

2.6.1 UV Bölgedeki Ölçümler

2.6.1.1 280 nm'de Ölçümler

Pek çok protein içerdiği tirozin (fenol) ve triptofan (indol) amino asitlerden dolayı 280 nm'de maksimum absorbansa sahiptirler. İncelenecek protein saf olmadıkça ve genel özellikleri bilinmedikçe bu yöntemle doğru sonuçlar alınamaz. Yöntem nispeten duyarsız olup 0.05-2 mg protein/ml aralığında tayine imkan verir ve 280 nm'de absorpsiyon veren çeşitli maddelerin girişim etkilerine açıktır [27]. Ancak protein örneğinde bir ön işleme gerek olmadan yapılan hızlı bir yöntem olması nedeniyle çok kullanılır [28].

2.6.1.2 Uzak Ultraviyole Bölgedeki Ölçümler

Proteinlerdeki peptit bağları 191-194 nm de bir maksimum absorbans gösterirler. Bu teknik protein örneğinde herhangi bir işleme gerek olmayan pratik ve kolay bir yöntem olmasına rağmen kullanılan tamponlarla girişim söz konusu olabilir. Çünkü bu dalga boyunda alkoller, kullanılan tamponlardaki iyonlar ve karboksilik asitler de absorbans verir. Bu nedenle protein tayini için fazla kullanılmaz. Bu yöntem proteinlerin amino asit bileşimine bağlı olmadığı için 280 nm deki ölçümlere göre daha başarılıdır. Ancak oksijen bu bölgede absorpsiyon yaptığı için bu amaçla rutin spektrofotometreler dışında özel cihazlar kullanılmalıdır [28].

2.6.2 Görünür Bölgedeki Spektrofotometrik Ölçümler

2.6.2.1 Biüre Metodu

1-20 mg/ml hassasiyette çalışan bu yöntem, alkali koşullar altında Cu^{2+} iyonlarının amonyum, aminoasitler, protein ve peptid moleküllerindeki peptid bağı azotuyla bağ oluşturmasıyla mavi-mor renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan bu kompleks 540-560 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Yöntemin en önemli dezavantajı, duyarlılığının düşük olmasıdır (1-6 mg protein/ml) [27]. Ancak kullanılan reaktiflerin ucuz, kullanımının kolay olması ve diğer yöntemlere göre girişim etkilerinin daha az olmasından dolayı kullanılmaktadır [28].

2.6.2.2 Lowry Yöntemi

Protein tayininde en yaygın kullanılan metod Folin-Lowry yöntemidir. Metod alkali koşullar altında fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltilisinin (Folin-Ciocalteu reaktifi) proteinlerdeki fenolik amino asitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır [27]. Bu yöntemde alkali koşullarda iki farklı reaksiyon gerçekleşmektedir. Birinci reaksiyonda peptit bağları ile Cu^{2+} arasında biüre reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır oluşur. İkinci reaksiyonda ise Folin-Ciocalteu ayırıcı, tirozin ve triptofan amino asitleri ile tepkimeye girerek indirgenir ve mavi renkli heteropolimolibden kompleksi meydana getirir [28]. Koyu mavi renk oluşumu karakteristikdir ve 750 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Yöntem çok duyarlıdır (0.1-1 mg protein/ml) ancak pH'a bağımlıdır (pH:10.0-10.5) [26]. Lowry yöntemi, tirozin ve triptofan içeriği fazla olan proteinlerle daha fazla hassasiyet gösterdiği için bu amino asitler açısından zengin olan proteinlerde oldukça iyi sonuçlar alınmaktadır [28].

2.6.2.3 Bradford (Coomassie Blue) Yöntemi

Yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmasını esas alır. Boya-bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı metoddur. Yöntem oldukça duyarlıdır (5-100 μ g protein/ml). Renk oluşumunda proteinin amino asit bileşiminin (özellikle arginin gibi bazik amino asitler ile aromatik amino asitler) reaksiyon üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bradford yönteminde 595 nm'de absorbans veren mavi rengin ölçümü esnasında cam ve polistiren küvetler kullanılabilir olmakla beraber cam küvetlerde rengin absorpsiyonu bir kullanımlık polistiren küvetlerin tercih edilmesine yol açar [26]. Cam küvetlerin kullanılması durumunda 0.1 M HCl de bekletme işleminin ardından su ve asetonla yıkama gerekmektedir [26, 27, 28].

2.6.2.4 Warburg-Christian Yöntemi

Diyaliz ya da fraksinasyon yoluyla protein olmayan maddelerin uzaklaştırılmasından sonra 260-280 nm'de UV absorpsiyon analizleri yapılır. Proteinlerin triptofon ve tirozin reziduları 275-280 nm'de UV absorpsiyonunu artırır. Çünkü beraber durumdaki bu iki aminoasitin saf bir protein çözeltilisindeki derişimleri birçok proteinde genellikle sabittir.

260/280 nm yönteminde duyarlılık 0.05-210 mg/ml dir. 1 ml.'deki 1mg protein = A280 - A260 dir [26].

BOVİNE SERUM ALBUMİN (BSA)

3.1 Bovine Serum Albumin (BSA)'in Genel Özellikleri

Albumin plazmada en fazla bulunan proteindir. Su ve seyreltik tuz çözeltilerinde çözünen albüminler 580 dolayında amino asitten oluşan tek bir polipeptid zincirinden ibaret proteinlerdir ve ikincil yapısı çoğunlukla α -heliks'dir (≈ 54) [15]. Molekül kütleleri 60-70 bin arasında değişir ve 20 farklı çeşitleri vardır. Birçok nakil ve düzenleme işlemlerine önemli şekilde katkıda bulunurlar. Albuminin en önemli fizyolojik işlevi; yağ asitlerine bağlanmak ve onları taşımaktır. Albuminin görevi aynı zamanda lisesitin (lysolecithin), bilirubin, triptofan (tryptophan), steroidler ve ilaçlar gibi diğer birçok hidrofobik ligandlara da bağlanarak metabolizmada gerekli yerlere taşımaktır. Ayrıca hücre ve mikrobiyal kültüründe bir besin olarak kullanılmaktadır [29].

Albuminlerin düşük seviyede triptofan, metiyonin ve yüksek seviyede sistein, yüklü aminoasitler olan aspartik ve glutamik asid, lizin ve arginin içerdikleri bilinmektedir [29]. BSA'nın glisin ve isolösin içeriği ortalama bir proteinden daha düşüktür. BSA, sığır endüstrisinin bir yan ürünü olarak sığır kanından büyük miktarlarda arttırılabildiğinden beri stabilitesi, etki eksikliği ve düşük maliyeti nedeniyle kullanılmaktadır. Tam uzunluktaki BSA proteini 607 aminoasidi uzunluğundadır. Başlangıç protein ürünü 589 asit içerir. BSA genellikle bilinen BSA miktarıyla bilinmeyen protein miktarını karşılaştırarak diğer proteinlerin miktarını belirlemek için kullanılır. Ayrıca, BSA DNA sindirimi sırasında reaksiyon tüpüne ve bazı kanallara enzimin çökmesini engellemek amacıyla bazı enzimleri stabilize etmek için kullanılır. Bu protein stabilizasyon için ihtiyaç olmayan diğer enzimleri etkilememektedir [23].

3.2 Bovine Serum Albumin Proteinin Fizikokimyasal Özellikleri

Proteinler poliamfolit sınıfına girerler ve poliamit yapısındadırlar. Proteinlerin yapısında asidik ve bazik aminoasitler vardır. Bundan dolayı da amfoterik özellik göstermektedirler [29]. Proteinler proton verirler veya proton alırlar. Asidik ortamlarda proteinler ekstra protona sahip olduklarından net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise net bir negatif yüke sahip olmaktadır. Aminoasitlerin net elektrik yüklerinin sıfır olduğu pH derecesine ise izoelektrik nokta adı verilmektedir. İzoelektrik noktası nötral pH civarında bulunan pek çok proteinde asidik ve bazik amino asit sayısı birbirine eşit durumda demektir. BSA proteini de bir poliamfolittir ve birçok özelliğe sahiptir [15]. BSA'nın fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1 BSA'nın fizikokimyasal özellikleri [15]

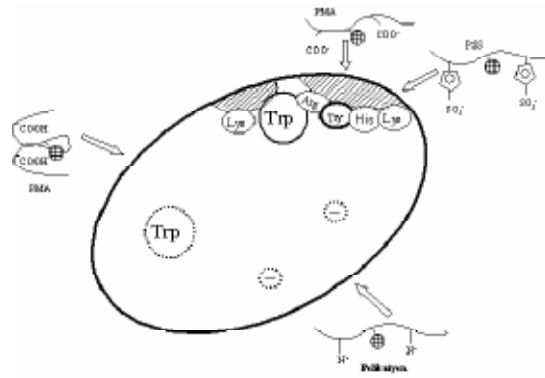
Özellikler	
Moleküler Ağırlık, MA (Da)	66430
İzoelektrik Nokta (pI)	4.8
Difüzyon Katsayısı (m^2/s)	5.9×10^{-11}
Optik Absorbans $A^{1g/l 279nm}$	0.63
Hacim (Protein kristal yapı) v_c (nm^3)	84.5
Herbir BSA molekülünde yük sayısı	
pH 4.0	+25
pH 5.0	~ 0
pH 7.5	-7.5

Albumin genelde serum albumini veya plazma albumini anlamında kullanılır. Plazmadaki derişimleri yaklaşık 50 mg/ml olan albüminlerin en önemli görevlerinden biri osmatik basınç yaparak kılcal damarlardan kanın geri toplanmasını sağlamaktır. Albumin kan dolaşımında en çok bulunan proteindir ve kanın kolloid osmotik basıncının %80'ini oluşturmaktadır. Molekül başına 18 eksi yük taşıdıklarından Na^+ derişimini çok etkiler ve suyun plazma ile hücre dışı arasındaki hareketini ayarlar. Eğer su damarlara geri alınamazsa dokularda ödem meydana gelir. Albümin iki nedenle osmatik basıncı büyük ölçüde etkiler; Ağırlık temelinde en bol bulunan proteindir ve diğer önemli proteinlere oranla düşük molekül ağırlığına sahiptir. Osmatik basıncın çözeltildeki tanecik sayısına göre değişmesi ve moleküllerin bağlanması gibi özellikler göz önünde bulundurulduğunda pH 7.4'de albüminin negatif yükünün yüksek olması, çözeltilde bulunan taneciklerin sayısına göre tahmin edilenden daha büyük bir osmatik etki meydana getirerek yüzeylelerinde su kümeleri oluşumuna neden olur. Bir kan proteini olan albüminin izoelektrik noktası 4.8 olup fizyolojik pH'da önemli derecede

negatif yüklüdür [15]. Serum albuminin kan pH'ını ayarlayan başlıca sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kan dolaşımına verilen albuminin yarılanma ömrü 19 gündür [29].

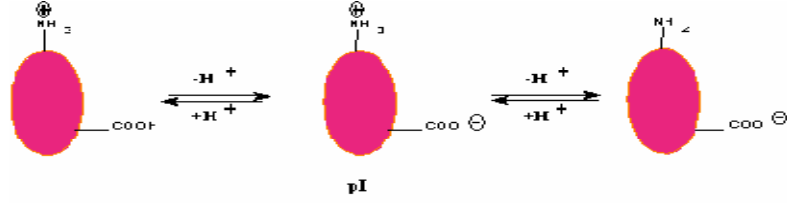
Albuminlerin %40'ı dolaşım sisteminde, geriye kalanı ise deri, kas ve bağırsaklarda bulunur. Osmatik basınç ayarlanması dışında taşıma görevi yaparlar. Albuminlerle taşınan maddeler, yağ asitleri, alkil sülfatlar, steroid hormonlar, Ca^{++} iyonları, tiroksin hormonu, billirubin, aspirin, digitalis, penisillin G ve sülfonamidler gibi bazı ilaçlardır [15].

Albumin molekülünün birincil yapısında yükler tek dağılım göstermezler. Nötral pH'de BSA'nın I, II ve III numaralı "domain"leri sırasıyla -10, -8 ve 0 net yüke sahiptirler. Birincil yapıdaki asimetric yük dağılımına karşın, üçüncül yapıdaki yükler uniform özellik gösterirler. Şekil 3.1'de Albuminin polielektrolitler ile kompleks oluşumu görülmektedir [29].



Şekil 3.1 Albuminin polielektrolitler ile kompleks oluşturmasının şematik gösterimi PMA (polimetakrilik asit), PSS (polisodyum sitrensülfonat) [29]

Polikasyonlar çoğunlukla ilaç bağlanma yerlerinden uzak durumdaki elektrostatik etkileşimler sayesinde sadece izoelektrik noktasından ($pI=4.3$) daha büyük pH bölgesinde albumin ile etkileşebilirler. Albuminin Trp'i çevresindeki konformasyonel değişim küçüktür. Polianyonlar çok geniş bir pH bölgesinde albumin ile etkileşebilirler. Nötralde alkalın pH bölgelerine doğru polianyonlar, albuminin ilaç bağlanma yerlerine özellikle bağlanma bölgesi II'ye belirli bir şekilde bağlanabilir. Bölge II ile PSS'nin etkileşim gücü PMA'ninkinden daha güçlüdür. Çünkü; PSS iyonik belge ve benzen halkası gibi her iki sülfonik asit rezüdüsüne sahiptir [29]. BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2 BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi [29]

Bunların sonucunda yaklaşık olarak, 46 kg/m^3 toplam protein konsantrasyonuna sahip olan plazmada, albumin yüzdesi %70 olarak belirlenmiştir. Bir plazma proteini olan serum albumin, toplam molekül kütlesi ve plazma konsantrasyonu ile 25 mmHg'lık normal kolloid onkotik basınca %80 oranında katkıda bulunmaktadır. Albuminin ilaçların bağlanması ve salınmasında önemli bir role sahiptir [30].

Bunların dışında BSA, pipet ve reaksiyon tüpünün yüzeylerine enzimin yapışmasını engellemek için bazı sınırlı enzimlerle beraber verilmektedir. BSA bekleme esnasında bazı proteinleri stabilize eder. BSA proteininin ısı bozunmasını değiştirebilen serbest yağ asitleri, diğer yağlar ve aroma bileşikleri bağlar. Fosfolipid protein-kalsiyum kompleksleri BSA'nın izoelektrik noktasının altındaki pH seviyelerinde oluşur. Bu etkileşimlerin herhangi bir biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir. Birincil biyolojik fonksiyonu lipid bağlama özellikleriyle ilgilidir. Fakat bu işlemin mekanizması açıkça aydınlatılmamıştır. BSA, fenolik uyarılmaya bağlı oksidasyona karşı lipidleri korumak için invitro gösterildiğinden beri; lipid oksidasyonunda arabuluculuk rolü oynayabilmektedir. BSA, bitkileri kültürlü koruma hücrelerinden yeniden üretmek ve plazminojen aktivatörü üretimi arttırmayı sağlamak için hücre ortamının bir bileşeni olarak kullanılmaktadır [16].

Protein çözeltisinin viskozitesi; proteinin molekül kütlesi, boyutu, hacmi, yüzey yükü ve deforme olma gibi karakteristik özelliklerine bağlıdır. Ayrıca, viskozite pH, sıcaklık, iyonik şiddet, iyon tipi, shear şartları ve ısı değişimi gibi çevresel etkenlere de bağlıdır. Serum albuminin 3.7-4.2 ml/g intrinsik viskozite değerlerine sahiptir. BSA'nın disülfid bağları kırıldığında viskozitesi artmaktadır. BSA çözeltilerinin viskozitesi 65 mg/ml'ye kadar doğrusal olarak artar ve daha büyük derişim değerlerinde üstel olarak artar [16].

3.3 BSA'nın işlevsel özellikleri

3.3.1 Köpürme

Köpük oluşumu, bir sıvıdaki gaz kabarcıklarının stabilizasyonu ve oluşumu olarak tanımlanabilir. Proteinler su-hava arayüzeyine yayılır ve yüzey gerilimini azaltırlar. Arayüzeyde kısmen yayılırlar ve bir ölçüde esneklikle intermoleküler bir yapışkan film üretmek için birleştirilirler. Arayüzeyde BSA ve lizozom arasında oluşan çapraz bağlar nedeniyle BSA, lizozom ve clupeine gibi basit proteinlerle etkileştiğinde köpük yayılması ve stabilizasyonu gelişmektedir. BSA'nın elektrostatik itme kuvveti minimum olduğu zaman BSA kendi izoelektrik noktasının yakınında iyi bir performans sergiler. BSA lizozomla etkileştiğinde büyük yayılma ve stabilizasyon pH 8 ile 9 arasında bulunur. Bu pH değeri proteinler zıt yüklü olduğunda BSA (4.8) ve lizozomun (10.7) izoelektrik noktaları arasındadır. Lipidler sıvı-hava ara yüzeyinden proteinlerin yerini değiştirerek ve protein filminin bütünlüğünü bozarak köpük oluşumunu engellerler. BSA sıvı-hava arayüzeyinde clupeinle etkileştiğinde; lipid inhibisyonu etkisiz hale gelir [31].

3.3.2 BSA'nın Jelleşme Özellikleri

BSA ısıtıldığında disülfid ve kovalent olmayan bağlar sayesinde çözülebilir birikintiler oluşturur. Alpha-lactalbumin, diğer yandan kendi kendine çözünen birikintiler şeklinde değil ama; çözülebilir birikintiler oluşturmak için disülfid değişimi sayesinde BSA ile etkileşir. Polimerize moleküllerin çözülebilir birikintileri proteinlerin ısıya bağlı jelleşmesinin erken aşamaları sırasında oluşur ve onu takiben polimerizasyon katı bir jel ağının oluşumuyla sonuçlanır. Alpha-lactalbumin BSA'ya eklenmesi BSA'nın jelleşme yeteneğini azaltır [31].

3.3.3 Ligand -Bağlayıcı

Albuminin en önemli özelliklerinden biri çok sayıda çeşidi bulunan ligandlara karşı tersinir bağlama kabiliyetinin olmasıdır. BSA plazma taşımınımında bulunan çözünmez yağ asitlerinin başlıca taşıyıcısıdır. BSA; serbest oksijen radikallerinin ayrılması ve billirubin gibi çeşitli toksik lipofilik metabolitlerin inaktivite edilmesi gibi pek çok

işlevleri de gerçekleştirir. Albumin; yağ asitleri, hematin, billirubin için yüksek bir benzeşmeye ve küçük negatif yüklü aromatik bileşikler için göze çarpan bir bağlayıcı özelliğe sahiptir. Pyridoxyl fosfat, sistein, glutatyon ve Cu (II), Ni (II), Hg (II), Ag (II) ve Au (I) gibi çeşitli metaller ile kovalent bağlar oluşturur. Çok fonksiyonlu bir taşıyıcı protein olarak albumin; nörotransmisyon dahil olmak üzere bir dizi önemli fizyolojik süreçleri içeren nitrik asidin rezarvuvar veya anahtar taşıyıcısıdır. BSA aynı zamanda G tamamlayıcı proteini olarak bilinen D vitamini bağlayıcı proteini (VDP) ve alpha-fetoprotein (AFP)'ni içeren bir multigen protein ailesine aittir. AFP albumin fetal muadili olarak düşünülmesine rağmen, bağlama özellikleri farklıdır ve farklı olan bu AFP fetal gelişimi için önemli olan bilinmeyen bazı ligandlar için yüksek bir bağlayıcı özelliğe sahip olduğu ileri sürülmüştür. VDP kalsiyum düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. ADP ve VDP'nin II sınıf önemli doku uyumu kompleksiyle (MHC) olan etkileşimi; bu proteinlerin modüle bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Plazma dolaşımında serbest sülfidrilin (Cys 34) yaklaşık %30'u sistein ve glutatyon tarafından oksitlenir [31].

3.4 BSA'yı Etkileyen Faktörler

3.4.1 Viskozite

Protein çözeltilerinin viskoziteleri; moleküler kütle, boyut, hacim, yüzey yükü ve deformasyon kolaylığı gibi intrinsik özelliklerine bağlıdır. Buna ek olarak viskozite pH, sıcaklık, iyonik güç, iyon tipi, kesme şartları ve ısıl işlemler gibi çevresel faktörlerden etkilenir. BSA'nın 3.7-4.2 ml/gr değerleri arasında intrinsik viskoziteye sahip olduğu bilinmektedir. BSA'nın disülfid bağlarının bölünmesindeki artışla viskozitenin arttığı rapor edilmiştir. BSA çözeltisinin viskozitesi yüksek konsantrasyonlarla uyumlu şekilde katlanarak 65 mg/ml konsantrasyona kadar lineer olarak artmaktadır [31].

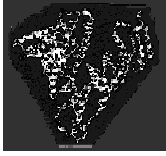
3.4.2 pH etkisi

Serum albümin pH değişiklikleri ile geridöndürülebilir konformasyonel izomerizasyon uğrar ve BSA'nın izomerik formları Şekil 3.3'de görülmektedir.

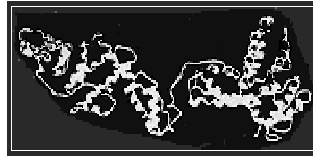


Şekil 3.3 Bovine serum albuminin izomerik formları [31]

N-F geçiş alanı etki alanı III'ün açılmasını içerir. F oluşumu viskozitedeki dramatik bir artışla, çok dūřuk çözünürlükle ve sarmal içerikteki önemli bir kayıpla karakterize edilmektedir. 4'ün altındaki pH değerlerinde; albumin etki alanı II'nin heliksine bağlı olan etki alanı I'in etki alanı içindeki heliksin kaybı ile başka bir genişlemeye uğrar. Bu genişlemiş form (E) yüksek bir intrinsik viskoziteye sahip form olarak bilinir ve hidrodinamik aksenal oranında ortalama 4'ten 9'a olan bir artıştır. pH 9'da; albumin temel form (B) biçimine dōnūřür. Albumin özeltisi pH 9'da ve dūřuk iyonik gücü 3 C'de 3-4 gün için korunursa, (A) formu olarak bilinen başka bir izomerizasyon oluşur. Őekil 3.4'de BSA'nın izomerik formlarının yapısı gōsterilmektedir [31].



a. BSA'nın N formu



b. BSA'nın F formu



c. BSA'nın E formu

Şekil 3.4 BSA'nın izomerik formlarının yapısı [15]

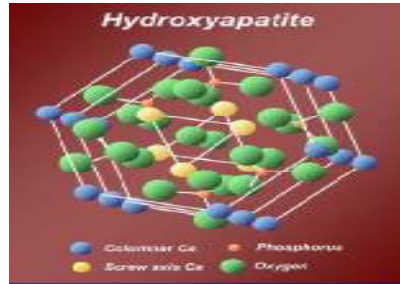
3.4.3 Sıcaklık Etkisi

Serum albumin ısıtılma işlem gōrdüğünde iki yapısal aşamadan geçer. İkinci aşama tersinmez iken birinci aşama tersinirdir ancak; sıralı yapının tam bir yıkımına yol açmaz. 65°C'ye kadar ısıtma birinci aşama; sonradan gelen bu sıcaklığın üstü ikinci aşama olarak dūřünülebilir. Őekil değişikliği için başlangıç sıcaklığı 58,1°C ve denatürasyon sıcaklığı ise 62°C olduğu Differansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile bulunmuştur [31].

HİDROKSİAPATİT

4.1 Hidroksiapatitin Genel Özellikleri ve Yapısı

Apatitlerin genel formülü $Ca_{10}(PO_4)_6X_2$ şeklindedir (X: F^- , Cl^- ve OH^- olabilir). Hidroksiapatit apatit mineral sınıfının bir üyesidir ve formülü $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$ şeklindedir. Hidroksiapatit (HAP) genel olarak hegzonal kristal yapıda bulunur ve birim hücre boyutları; $a=b=9.432^{\circ}A$ ve $c=6.881^{\circ}A$ 'dur [3]. İdeal Ca/P oranı 10/6 ve hesaplanan yoğunluğu 3.219 gr/cm^3 'tür [32, 33, 34]. Hidroksiapatitin yapısı şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1 Hidroksiapatitin yapısı [35]

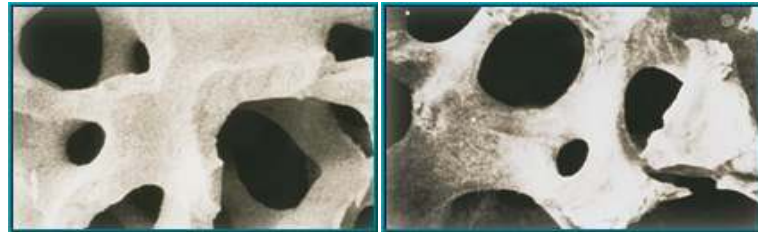
Ayrıca oksijen ile tepkimeye girmediği için yanmaz. Doğada elmastan sonra bilinen en sert moleküldür. Çelik burlarla veya zımparalamayla aşındırılmaz. Sadece elmas ile aşındırılabilir. Esnekliği az, neredeyse tamamen kırılgandır. Biyoaktif yapıda bir biyomateryaldir. Tatsız ve kokusuzdur. Organik çözücülerde çözünmez. Asit çözücüler hariç inorganik çözücülerde de çözünmez. Hidroksil iyonlarıyla (asit) yapı taşlarına ayrışabilir. [17]. Şekil 4.2'de HAP'ın kristalize yapısı gösterilmektedir.

HAP ile bağlanarak yapışır ve implantın kaymasını engeller. Aynı zamanda vücut implantı yabancı madde olarak algılamaz. Hidroksiapatit kemik dolgu materyali olarak toz ya da poröz (gözenekli) blok şeklinde kullanılır. Hidroksiapatit aynı zamanda kemikteki boşluğu doldurarak boşlukta ödem oluşumunu ve yumuşak dokunun boşluğa girmesini engeller. Bir başka önemli görevi ise kalsiyum ve fosfat kaynağı olmasıdır. HAP'ın yüksek osteoiletkenliği (yüzeyinde kemik oluşumuna izin verme) ve düşük bozunma hızı vardır. [35]. HAP'ın biyouyumluluk özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 HAP'in özellikleri [34]

Elastise modülü (GPa)	4.0-117
Bası mukavemeti (MPa)	294
Eğilme mukavemeti (M,Pa)	147
Sertlik (Vickers, GPa)	3.43
Poisson oranı	0.27
Yoğunluk (teorik, g/cm ³)	3.16

Ancak hidroksiapatit de sağlık sorunlarına neden olabilir. Bazen moleküller grup birlikte kristaller oluşturur. Bunlar veya eklem çevresinde oluşabilir ve eklem tendon veya bağların şişmesine neden olabilir. Bu durum soğuk kompres uygulayarak ve iltihap için kortizon tipi enjeksiyon ilaç olarak tedavi edilebilir [37]. HAP'ın kemik dokusuna olan benzerliği Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



a)Kemik

b)HAP

Şekil 4.3 Kemik Dokusu Hidroksiapatitin Yapısı [34]

4.3 Hidroksiapatit Hazırlama Yöntemleri

Hidroksiapatitlerdeki gözenek miktarı, kristallik derecesi gibi gibi fiziksel özellikler hidroksiapatit tozlarının farklı üretim metotlarıyla sentezlenmesi yoluyla kontrol edilebilir. Hidroksiapatitler değişik yollarla amorf ve kristal yapıda; kaplama, toz veya jel olarak üretilebilir. Ancak; mekanik olarak yüksek kırılabilirlik ve düşük esneklik gibi istenmeyen özellikleri kompozit ve polimer katkılarıyla giderilmeye çalışılır [38].

Hidroksiapatit tozları, kalsiyum-iyon içeren bir çözelti ile fosfat içeren bir çözeltinin karışımından kimyasal çökeltme yöntemi ile elde edilir ve sonrasında kalsinasyon işlemine geçilir. Üretilen HAP partiküllerinin çapı ve boyut dağılımı kaplama verimi ve yoğunluğu açısından oldukça önemlidir. Plazma sprey yöntemiyle üretilen HAP kaplamalarda, plazma arkının merkezinden geçen partiküller aşırı ısınarak tam ergime sağlarken, arkın çevresinden geçen partiküller yeterince ergimez. Bu nedenle partikül boyutuna bağlı olarak hız ve ark içerisinde kalma süresi değişeceğinden kaplama özellikleri de değişmektedir. Püskürtülen HAP tozlarının altlık malzeme üzerinde farklı ergimesi ve soğuması aynı zamanda kaplamanın mikroyapısını da değiştirmektedir. Maksimum küreselleşme çapından daha küçük boyutta olan partiküller tamamen ergir ve altlık malzemeye çarpmadan küresel veya damlacık şeklini alır. Bu damlacıklar, daha iri partiküllere oranla daha sağlam, daha uyumlu ve lamelli bir mikroyapı oluştururlar [34].

HAP tozlarının hazırlanması için temelde kuru metot ve yaş metot olmak üzere iki metot uygulanır. HAP üretiminde kullanılan yaş metotlar kendi içinde de çöktürme ve diğer kalsiyum fosforların hidrolizi gibi farklı yöntemlere ayrılabilir. Çeşitli ıslak kimya tekniklerine rağmen bazı HAP sentez teknikleri son yıllarda geliştirilmiştir. Bunlardan sulu çözeltiden direkt çöktürme, elektrokimyasal biriktirme, sol gel yöntemler, hidrotermal sentez ve emülsiyon veya mikroemülsiyon yöntemleri de yaygın olarak kullanılmaktadır [38].

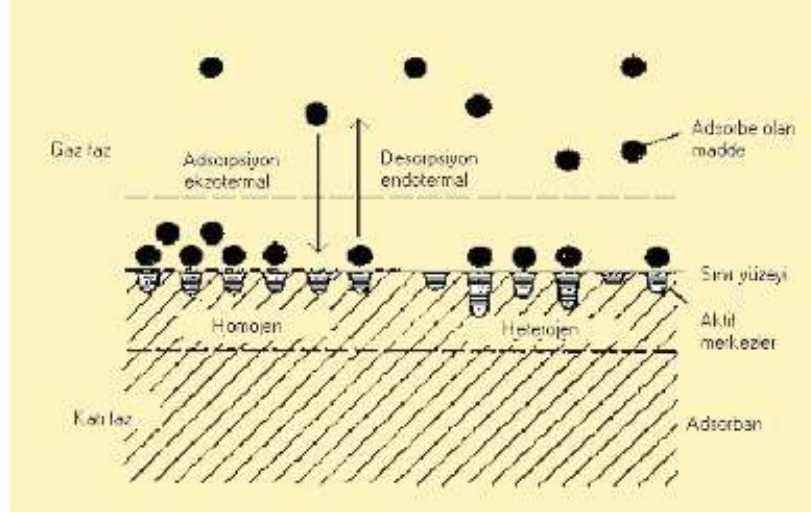
BÖLÜM 5

ADSORPSİYON

Katı veya akışkanlar içinde moleküller her yönden çekildikleri için bu çekim kuvvetleri dengededir. Oysa fazlar arası yüzeyde, moleküllere etki eden çekim kuvvetleri farklılık göstermektedir. Bu yüzden katı yüzeyindeki atomların dengelenmemiş kuvvetleri, çözültideki maddeleri katı yüzeyine çekerler ve yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur. Bu şekilde çözültideki maddelerin katı yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşir [39].

Adsorpsiyon bir sıvı veya gaz fazın belirli bileşenlerinin katı bir adsorbanın yüzeyine transfer edildiği bir ayırma prosesidir. Katı yüzeyindeki atom veya moleküllerin etkileşim kuvvetlerinden dolayı adsorpsiyon katı yüzeyinde meydana gelir. Yüzey tarafından tutulan gaz veya sıvı olabilir. Adsorpsiyon bir katının sınır yüzeyindeki derişim değışmesi olarak da tanımlanabilir. Sınır yüzeyindeki derişimin artması halinde pozitif adsorpsiyon, azalışı halinde ise negatif adsorpsiyon meydana gelir [40]. Tutulan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına desorpsiyon, yüzeyde tutulan maddeye adsorplanan (adsorbat), gaz ya da çözünen maddeyi adsorplayan katıya ise adsorban ismi verilmektedir [41].

Adsorpsiyon ile absorpsiyonu birbirine karıştırmamak gerekir. Adsorpsiyonda adsorplanan madde katı yüzeyine tutunur. Absorpsiyon olayında ise çözünen madde ya da gaz molekülleri katının içine yayılır. Adsorsiyon ve adsorsiyon olaylarının ikisi birden meydana geliyorsa olay, sorpsiyon olarak isimlendirilmektedir [42]. Katı faz üzerine gerçekleşen adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri Şekil 5.1'de görülmektedir.



Şekil 5.1 Katı faz üzerinde adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri [43]

5.1 Adsorpsiyon Oluşumu

Adsorpsiyon adsorplanan ve adsorplayan yüzey arasında kimyasal bağlanma, elektrostatik ve fiziksel etkileşimler gibi adsorplayanı harekete geçiren itici güç yada yüzey gerilimi ile ilişkili çözücünün itici gücünün bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Genelde adsorpsiyon her iki gücün ortaklaşa etkisi ile gerçekleşir. Proses, fazlardan birindeki bir maddenin (çözeltideki molekül) diğer fazdaki maddenin (katı faz) yüzeyinde birikerek tutulmasını amaçlamaktadır [44]. Difüzyon mekanizmasının dışında, adhezyon kuvvetleri de katı maddenin yüzeyine tutunmada etkilidir. Böylece moleküllerin adsorpsiyonu temel olarak film difüzyonu, por difüzyonu ve adhezyon kuvvetleri olarak üç etki ile gerçekleşir [45]. Bir adsorpsiyon olayında adsorbent kimyasal yapısı, yüzey alanı, tanecik boyutu, üretim sırasında yüzeyde oluşan fonksiyonel gruplar, gözeneklerin yapısı ve gözenek boyut dağılımı oldukça önemlidir. Diğer taraftan adsorplanan maddenin türü, molekül büyüklüğü, molekülün yapısı ortamın sıcaklığı, pH, iyonik güç, adsorbant konsantrasyonu ve temas süresi gibi parametreler de adsorpsiyonu etkiler. Adsorpsiyon bu tür parametrelerin bir fonksiyonu olarak adsorbent ve adsorbant molekülleri arasındaki etkileşimin tür ve derecesine göre değişir [41].

Çözelti içindeki maddelerin adsorpsiyonu çözücü-çözünen-katı ilişkisine bağlıdır. Adsorpsiyonu etkileyen en önemli faktörlerden biri çözünenin liyofobik-hidrofobik (çözücünden-sudan hoşlanmama) karakteri veya çözünenin katı faza daha fazla geçme isteğidir. Adsorpsiyon genellikle bu iki kuvvetin birarada bulunmasının sonucunda meydana gelmektedir. Adsorpsiyona etki eden bu iki kuvvetten her biri değişen

derecelerde etkili olabilir. Her iki kuvveti de etkileyen faktörler vardır. Maddenin çözünürlüğü, maddenin hidrofilik veya hidrofobik yapıya sahip olması ve maddenin amfoterik-çözünürlük karakterine sahip olması liyofobik karakterini etkileyen faktörlerdir. Adsorban ile sıvı içindeki çözünmüş madde arasındaki elektriksel çekim kuvveti, fiziksel çekim kuvvetleri ve kimyasal yapı ise katı faza geçme yatkınlığını etkileyen faktörlerdir [46].

Adsorpsiyon bir fazdan madde çıkarıp diğerinin yüzeyinde yoğunlaştırmak için kullanılan bir temel işlemdir. Yüzeyde egemen olan yüzey enerjilerinden etkilenir ve onları etkiler. Yüzey özellikleri faza ait kütleyle değil yüzeyin kendisiyle ilgilidir. Böyle yüzey gerilimlerini düşüren maddeler su içinde bulunduğunda su moleküllerinin birbirlerine karşı ilgisi, bu maddelere ilgisinden fazla olacağı için kolayca yüzeyde birikirler. Bu birikme yüzeyde bir derişim artışına yol açmaktadır. Yani, hidrofobik yapıdaki madde suda kalmaya eğilimli olmadığı için adsorbe olması kolaydır. Tam tersine suyun gerilimini artıran maddeler ise yüzeyden kurtulup suya karışırlar. Yani, hidrofilik yapıdaki madde sıvının içinde kalmaya eğilimlidir; bu yüzden adsorpsiyonu zordur. Yapısında hidrofilik ve hidrofobik gruplar içeren moleküllerde, molekülün hidrofobik ucu yüzeye tutunma eğilimi göstermektedir. Eğer madde amfoterik çözünürlüğe sahip ise hidrofobik kısmı sıvının ara yüzeyinde adsorplanacak, hidrofilik kısmı ise sıvıda kalacaktır [47].

5.2 Adsorpsiyon Türleri

Çözünmüş parçacıklar ile adsorplayan yüzey arasındaki çekim kuvvetlerinin türüne bağlı olarak üç değişik adsorpsiyon türü vardır; bunlar fiziksel, kimyasal ve değişim adsorpsiyondur.

5.2.1 Fiziksel Adsorpsiyon

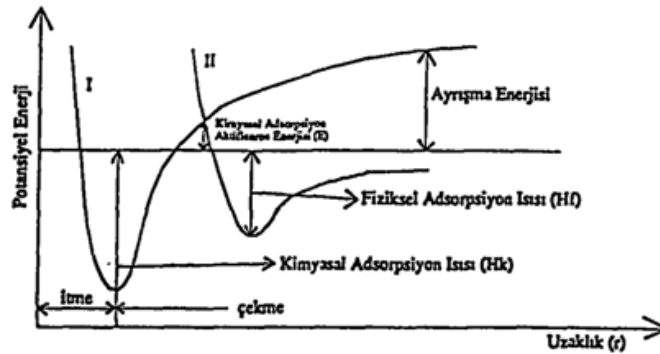
Yüzeye tutunmayı sağlayan, adsorplanan madde ile adsorplayıcı arasındaki bağlantıyı sağlayan zayıf vander waals kuvvetleridir [48]. Bu adsorpsiyon türü, katı yüzey ile adsorplanan madde molekülleri arasındaki çekim kuvvetlerinin etkisiyle gerçekleşir. Adsorbent ve çözünen arasındaki çekim kuvvetleri moleküler olduğu zaman çözücü ve çözünen arasındaki çekim kuvvetinden daha fazla olacağından çözünen, adsorbent yüzeyine adsorplanacaktır. Fiziksel adsorpsiyonda adsorbent katının kristal örgüsü içine

girmez ve çözünmez fakat yüzeyi tamamen kaplar. Düşük sıcaklık aralığında oluşabildiği gibi çok tabakalı ve rejenerasyonu kolay bir adsorpsiyon türüdür [41].

5.2.2 Kimyasal Adsorpsiyon

Adsorplanan madde ile katı yüzey arasındaki fonksiyonel grupların kimyasal etkileşimi ile oluşan adsorpsiyondur. Kimyasal adsorpsiyonda (kemisorpsiyon), adsorplanan moleküller adsorbanın yüzeyine tıpkı moleküllerde atomları bir arada tutan kuvvet gibi kovalent bağlarla tutunurlar. Kimyasal adsorpsiyon, tersinmez ve tek tabakalı olup genellikle yüksek sıcaklık aralığında gerçekleşir. Ayrıca rejenerasyonda oldukça zordur [41]. Kimyasal adsorpsiyonda adsorbatla adsorbent arasındaki bağlanma çok kuvvetli olduğundan olay tersine çevrilemez. Adsorpsiyon sırasında açığa çıkan ısı, reaksiyon ısısından daha büyüktür ve aktivasyon enerjiside yüksektir [48].

Fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon arasındaki fark potansiyel enerji eğrisiyle gösterilmiştir.



Şekil 5.2 Fiziksel ve kimyasal adsorpsiyonun potansiyel eğrileri [49]

Şekil 5.2’de adsorplayıcı yüzeyle adsorplanan molekül arasındaki uzaklık gösterilmektedir. Bu eğrilerden I-eğrisi kimyasal adsorpsiyon, II-eğrisi ise fiziksel adsorpsiyon eğrisini göstermektedir.

5.2.3 Değişim Adsorpsiyonu

Değişim adsorpsiyonu, elektrostatik çekim kuvvetlerinin etkisiyle yüzeydeki yüklü bölgelere iyonik özelliklere sahip adsorbatların tutunması olarak tanımlanabilir. İyon değişimi bu sınıfa dahil edilebilir. Burada zıt elektrik yüklerine sahip olan adsorbat ile adsorban yüzeyinin birbirlerini çekmesi önem kazanmaktadır. Adsorplayan ile

adsorplananın iyonik güçleri ve moleküler büyüklükleri önemlidir. İyonlar eş yüklü ise daha küçük olan tercihli olarak yüzeye tutulmaktadır [48].

Ayrıca negatif yüklü karbon partikülleri ile pozitif yüklü adsorplanan moleküller veya iyonlar arasındaki elektriksel çekim difüzyon sırasında ortaya çıkan engelleri azaltır ve bu durum adsorpsiyonun verimliliğini arttırmaktadır. Fiziksel, kimyasal ve değişim adsorpsiyonu arasında kesin bir ayırım yapılamaz, üçü aynı anda veya ardarda görülebilir [41].

5.3 Adsorpsiyonu Etkileyen Faktörler

5.3.1 Adsorbatın Yapısının Etkisi

Adsorpsiyon olayında en önemli etkenlerden biri adsorpsiyon dengesini kontrol eden adsorbatın çözünürlüğüdür. Maddenin adsorpsiyonun gerçekleştiği ortamdaki çözünürlüğü ile maddenin adsorpsiyonu arasında ters bir ilişki vardır. Adsorpsiyon, adsorbat-çözücü arasındaki bağların kırılmasına bağlı olarak gerçekleşir. Yani; çözünürlük ne kadar büyükse adsorbat-çözelti arasındaki bağ o kadar kuvvetli olmakta ve adsorpsiyon miktarı azalmaktadır. Çoğu zaman, herhangi bir organik bileşiğin zincir uzunluğu arttıkça sudaki çözünürlüğü azalır. Çünkü; karbon sayısı arttıkça bileşik hidrokarbona daha fazla benzer. Hidrokarbon yapısı ağır bastıkça da adsorbatın hidrofob özelliği artar. Hidrofob maddeler tercihli olarak adsorplanmaktadır. Adsorbatın molekül büyüklüğü de adsorpsiyonu etkiler. Adsorbat moleküllerinin, adsorban gözeneklerine göre büyük olması gözeneklerin tıkanmasına ve bu gözeneklerdeki aktif merkezlerin işlev görmemesine neden olabilir. Bu durumda adsorpsiyon azalmaktadır. Adsorpsiyona etki eden diğer bir özellik ise adsorbatın iyonizasyonudur. İyonize olmuş maddeler nötral maddelere göre daha az adsorbe olmaktadır. Adsorpsiyonun polaritesi de adsorpsiyon üzerinde etkilidir. Polar bir adsorban, polar olmayan bir çözelti içerisindeki polar bir maddeyi daha kuvvetli şekilde adsorplamaktadır [39, 46].

5.3.2 Adsorbanın Yapısının Etkisi

Adsorpsiyon bir yüzey olayı olduğu için adsorbanın en önemli özelliği yüzey alanıdır. Her katı madde adsorban olabilir; ancak adsorbanın yüzey yapısı adsorpsiyon kapasitesini değiştirmektedir. Uygun adsorban, yüzey alanı geniş ve boşluklu yapıya sahip maddedir. Gözeneklilik arttıkça adsorpsiyon da artış gösterir. Adsorbanın yüzey

alanını tahmin etmek kolay olmadığından adsorbanın birim ağırlığı başına adsorplanan madde miktarı alınır. Adsorpsiyona etki eden diğer önemli bir özellik de adsorbanın parçacık boyutudur. Birçok çalışma parçacık boyutunun azalması ile adsorpsiyonun kapasitesinin arttığını göstermektedir. Bunu dışında adsorpsiyon hızı çözünen adsorban konsantrasyonu ile orantılıdır [39, 46].

5.3.3 pH'm Etkisi

Birbiri ile temas eden iki fazdan sıvı olanın asidik, bazik veya nötral olması adsorpsiyonu etkileyen faktörlerden biridir. Çözünmüş maddenin pH'ı iyonlaşma derecesini ve iyon yüklerini etkilemektedir; dolayısıyla adsorban yüzeyinde elektriksel çekim kuvvetinin değişmesine neden olmaktadır. Her iyonun maksimum adsorplandığı pH değeri ya da değerler aralığı vardır [41, 46].

5.3.4 Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık adsorpsiyonda önemli bir etkidir. Genellikle adsorpsiyon reaksiyonları ekzotermik reaksiyonlardır. Adsorpsiyon miktarı genellikle azalan sıcaklıkla artış gösterir [41]. Açığa çıkan ısının genellikle fiziksel adsorpsiyonda yoğunlaşma veya kristalizasyon ısıları mertebesinde; kimyasal adsorpsiyonda ise kimyasal reaksiyon ısısı mertebesinde olduğu bilinmektedir. Sıcaklıktaki küçük değişimler adsorpsiyon olayını çok etkilememektedir [43, 46].

5.3.5 Temas Süresinin Etkisi

Adsorban ile çözeltinin temas süresi önemlidir. Adsorban, etrafını çevreleyen sıvı filmdeki maddeyi hızla adsorplamaktadır. İlk temas anında adsorpsiyon hızı yüksektir. Süre ilerledikçe adsorpsiyon hızında azalma görülmektedir. Adsorbanın adsorplama işlemini en iyi yaptığı zaman aralığı denge süresini ortaya çıkarır [39, 46].

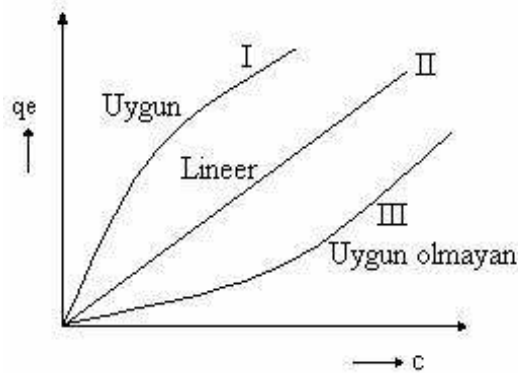
5.4 Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon işlemini daha etkin ve az maliyetli bir hale getirmek için bir çok araştırmacı ucuz ve yenilenebilir adsorbanlar bulmaya çalışmaktadırlar [50].

Adsorpsiyon izotermi, adsorbant üzerinde adsorplanan madde miktarı ile sıvı içerisinde çözünmüş halde bulunan madde miktarı veya gazın basıncı arasındaki ilişkinin açıklanmasında kullanılırlar. Sabit sıcaklıkta yürütülen adsorpsiyon

çalışmalarında adsorplanmadan kalan adsorplananın denge derişimine ya da denge basıncına karşı adsorplanan madde miktarının grafiğe geçirilmesiyle adsorpsiyon izotermi elde edilmektedir. Adsorpsiyon izotermi bir yüzeye adsorbe olan madde için denge şartlarını gösterir. Genel olarak, adsorbe olan madde miktarı sabit bir sıcaklıkta adsorplayan maddenin konsantrasyonunun kompleks bir fonksiyonudur. Adsorpsiyon izotermi, bilinen miktardaki bir adsorplayan ile adsorplanan maddenin konsantrasyonunu dengeye ulaştırarak elde edilmektedir [48]. Adsorpsiyon, adsorban yüzeyinde biriken madde konsantrasyonu ve çözeltide kalan madde konsantrasyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eder [50]. Adsorpsiyon dengesi kurulduktan sonra adsorpsiyon miktarında ve çözelti konsantrasyonunda bir değişiklik olmamaktadır. Adsorpsiyon izotermi adsorplanan madde konsantrasyonu ile değişim gösteren fonksiyonlardır. Denge izotermi modellerin oluşturulmasında ve adsorpsiyon sistemlerinin tasarlanmasında çok önemli bir rol oynamaktadır [48].

Ölçümler sabit sıcaklıkta yapılmaktadır. Deney sonunda çözeltideki adsorbat konsantrasyonları adsorbent fazındaki adsorbat konsantrasyonlarına karşı noktalanır. Bu şekilde elde edilen izoterm üç tipte olabilmektedir. Birinci tipteki izoterm dışbükey (konveks) şeklinde olan izotermeldir. Bu izotermde bir adsorplanan maddenin denge katı faz konsantrasyonu, düşük denge konsantrasyonundan yüksek denge konsantrasyonuna keskin bir şekilde artar. Bu tip adsorpsiyona uygun adsorpsiyon denir. Eğer adsorplanan maddenin denge katı faz konsantrasyonu sıvı fazdaki bir adsorplanan maddenin denge konsantrasyonu ile doğrusal olarak artıyorsa, izoterm doğrusal izoterm olarak adlandırılır. Buna ikinci tip izoterm de denir. İzoterm iç bükey (konkav) şeklinde olduğu zaman adsorpsiyon uygun değildir ve bu izoterm üçüncü tip izoterm olarak adlandırılır [45]. Bu izoterm Şekil 5.3'de gösterilmiştir.



Şekil 5.3 Adsorbat ile katı faz arasındaki ilişki [45]

Belli bir şarttaki izoterm bir modele uyarken başka şartlarda ise bu modele uymamaktadır. Bu nedenle genelde uygulanabilir tek bir model bulunmamaktadır. Zaman içerisinde Jaeger ve Erdős tarafından oluşturulan genel bir formülden yola çıkarak birçok araştırmacı farklı izoterm denklemleri ortaya koymuşlardır. Bulunan modellerde bazı varsayımlar yapılarak yeni modeller geliştirilebilir. Günümüzdeki çalışmalar genellikle belirlenmiş modeller kullanılarak, bu modeller yardımıyla adsorban veya adsorplanan maddenin (adsorbat) değiştirilmesi üzerinedir. En genel kullanım gören izoterm Langmuir ve Freundlich denklemleridir [48].

5.4.1 Langmuir Adsorpsiyon İzotermi

Langmuir izotermi çok sayıda sistemin denge adsorpsiyon davranışını yorumlamak için ve katı yüzeylerin toplam yüzey alanını belirlemek için kullanılmaktadır.

Langmuir izotermi adsorbent yüzeyinde alıcı noktaların olduğunu kabul eder. Burada her alıcı noktanın sadece bir molekül adsorplayacağı kabul edilmiştir. Bu şekilde oluşan tabaka bir molekül kalınlığında olur. Ayrıca, adsorpsiyon olayının izotermal olarak meydana geldiğini ve adsorbent yüzeyinin adsorbatın tek tabakası ile kaplandığını farz eder [51]. Bunun yanında, tüm adsorpsiyon alanları adsorplanan moleküllere karşı eşit miktarda çekim uygular ve adsorbe olan bir molekül bitişik alandaki bir başka molekül ile herhangi bir etkileşim içinde olmamaktadır. Langmuir izotermi, katı yüzeyler üzerinde aktif adsorpsiyon alanlarında meydana gelen tutulmanın fiziksel yada kimyasal adsorpsiyon olup olmadığını diğer izotermelere göre daha iyi açıklamaktadır [52].

Langmuir izoterminde adsorpsiyon, adsorplanan maddenin başlangıç konsantrasyonu ile birlikte doğrusal olarak artar. Maksimum doyma noktasında, yüzey tek tabaka ile kaplanmakta ve yüzeyde tutulmuş madde miktarı sabit kalmaktadır. Langmuir izoterminde adsorpsiyon enerjisi tüm yüzey boyunca ünitardır. Adsorpsiyon hızı, adsorplanacak madde konsantrasyonu ve yüzey üzerinde bulunan boş adsorpsiyon alanları ile doğru orantılıdır. Desorpsiyon hızı ise yüzeydeki adsorplanmış molekül sayısı ile doğru orantılıdır [39].

Langmuir İzotermi için yapılan kabuller aşağıda sıralanmıştır [39];

- Adsorplayan materyalin tüm yüzeyi aynı adsorpsiyon aktivitesine sahiptir ve enerji bakımından ünitardır.
- Adsorbe edilen moleküller arasında herhangi bir etkileşim ve rekabet yoktur.

- Tüm adsorpsiyon aynı mekanizma ile gerçekleşir ve her adsorbe edilen kompleksin aynı yapıya sahip olduğu kabul edilir.
- Adsorpsiyonun derecesi yüzey üzerindeki tek moleküler tabakadan büyük olamaz.
- Adsorpsiyon ilk başladığında yüzeye çarpan her molekül yüzeyde tutulabilir. Fakat adsorpsiyon ilerledikçe ancak yüzeyin örtülmemiş kısmına çarpan moleküller adsorbe edilebilir [42].
- Desorpsiyon hızı yalnızca adsorplanmış madde miktarına bağlıdır [42].

Langmuir izotermi, adsorban yüzeyinin enerji açısından benzer olduğu varsayımıyla, tek tabakalı homojen adsorpsiyonu açıklamak için kullanılmaktadır. Bu izotermi açıklayan bir çok kaynak vardır ve kaynaklardaki terimsel ifadeler farklılık göstermelerine rağmen işaret ettikleri sonuç aynıdır [50]. Langmuir adsorpsiyon izotermi ampiriktir ve bu kabullerden yola çıkarak aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir.

$$q_e = \frac{Q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (5.1)$$

Langmuir denklemi lineer formda yazılırsa 5.2 eşitliği elde edilir.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L Q_m} + \frac{C_e}{Q_m} \quad (5.2)$$

Burada;

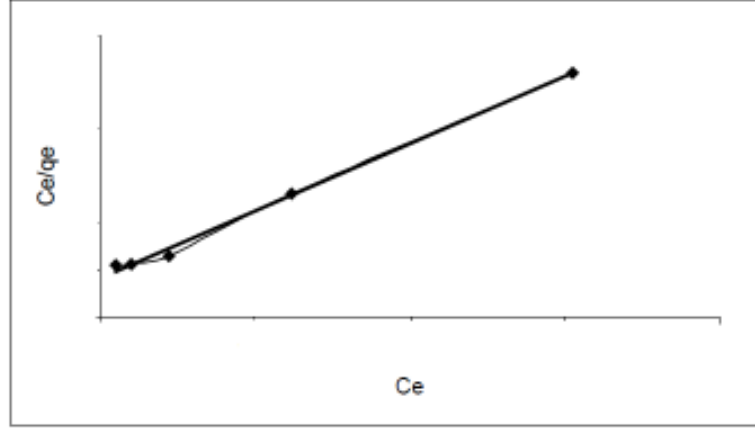
C_e : Adsorpsiyon sonrası çözeltilde kalan maddenin konsantrasyonu (mg/mL)

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

K_L : Adsorbatın adsorptivitesine bağlı olan sabit (ml/mg)

Q_{max} : Adsorbanın maksimum adsorplama kapasitesi (mg/g)

Q_{max} tek tabakalı adsorban kapasitesini göstermektedir. C_e/q_e değerinin C_e değerine göre değişimi grafiğe dökülmesiyle ortaya çıkan doğrunun eğimi ve kesim noktası sırasıyla $1/Q_m$ ve $1/K_L Q_m$ sabitlerinin değerini verecektir. Burada Q_{max} değeri adsorbanın maksimum adsorplama kapasitesini verecektir [50]. Özellikle tek tabakalı adsorpsiyonun meydana geldiği heterojen adsorpsiyon sistemlerinde bu izoterm denge durumunu net olarak açıklayamaz. Langmuir izotermi homojen bir adsorpsiyon olduğu için her molekülün aktivasyon enerjisi aynıdır [45]. Langmuir izotermi Şekil 5.4'de gösterilmiştir.



Şekil 5.4 Langmuir izoterminin grafiği [50]

Adsorpsiyonun elverişliliğini bulmak için boyutsuz R_L (dağılım) sabiti hesaplanır ve bu sabitin 0 ile 1 arasında değerler alması elverişlilik durumunun sağlandığına işaret eder [48]. R_L değerleri ve izoterm tipleri Çizelge 5.1’de verilmiştir.

$$R_L = \frac{1}{(1 + K_L C_0)} \quad (5.3)$$

K_L : Adsorbatın adsorplanma kapasitesine bağlı olan Langmuir sabiti (ml/mg)

C_0 : Maddenin çözeltideki başlangıç derişimi (mg/ml)

Çizelge 5.1 R_L değerleri ve izoterm tipleri [48]

R_L Değerleri	İzoterm tipi
$R_L > 1$	Elverişli olmayan
$R_L = 1$	Lineer
$0 < R_L < 1$	Elverişli
$R_L = 0$	Tersinmez

R_L değerleri yardımı ile izotermin tipi belirlenebilir.

5.4.2 Freundlich Adsorpsiyon İzoterminin

Çoğu sistem, Langmuir denkleminde sapmalar göstermektedir. Bunun sebebi çoğunlukla yüzeylerin homojen olmaması ve adsorplanmış moleküller arasında

etkileşmelerin meydana gelmesidir. İdeal olmayan sistemler bazı ampirik izotermelere uyabilirler. Bunlardan biri Freundlich adsorpsiyon izotermidir. Çözeltilerden adsorpsiyon için kullanılan fakat gazların adsorpsiyonu için de başarılı bir şekilde kullanılan bir izotermidir. İlk kez 1907 yılında H.Freundlich tarafından verilmiştir.

Freundlich'e göre bir adsorplayıcı maddenin yüzeyi üzerinde bulunan adsorpsiyon alanları heterojendir. Diğer bir ifade ile farklı türdeki adsorpsiyon alanlarından oluşmaktadır. Freundlich izotermine ana fikir olarak Langmuir izoterminden yola çıkılmış, bazı varsayımlar ve gelişimler yapılarak Freundlich eşitliği elde edilmiştir. Bu eşitlik Langmuir eşitliğinden farklı olarak düşük konsantrasyonlarda Henry kanunu uygulamaz ve dengeden sonra tam sabit bir adsorbat değeri elde edilmez [39].

Freundlich adsorpsiyon izotermi, sınırlı bir konsantrasyon aralığında adsorplanmış miktar ile konsantrasyon arasındaki ilişkiyi temsil eder ve çözeltilerin adsorpsiyonunu açıklamak için 5.4 eşitliğini türetmiştir.

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (5.4)$$

Burada;

C_e: Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu (mg/mL)

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

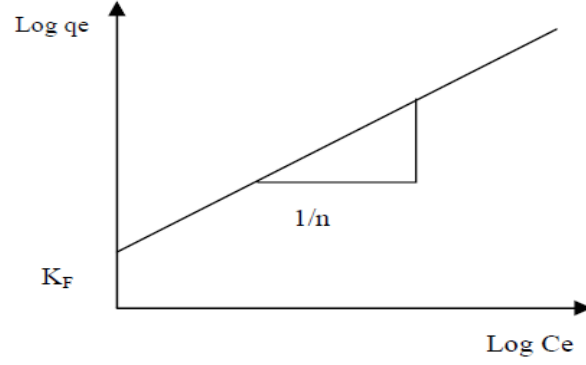
K_F: Adsorpsiyon kapasitesi (ml/mg)

n: Adsorpsiyon yoğunluğu (birimsiz)

Freundlich izoterm denkleminde 5.4 eşitliğinin her iki tarafının da logaritması alınarak lineer hale getirilir.

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (5.5)$$

Log q_e'nin log C_e'ye karşı değişimi grafiğe dökülmesiyle K_F ve n sabitleri bulunur. Grafikten elde edilen doğrunun y eksenini kesim noktası log K_F'yi ve eğimi de 1/n'i vermektedir. n>1 değeri adsorpsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir [50]. Freundlich izotermi Şekil 5.5'de görülmektedir.



Şekil 5.5 Freundlich izotermi [50]

Özel durumlarda kullanılan bazı izotermlere örnek olarak aşağıdaki izotermler verilebilir [48] :

- Temkin: Sorpsiyon ısısındaki düşüşün logaritmik yerine lineer düşüş gösterdiği sistemler için.
- Dubinin-Radushkevich: Karakteristik sorpsiyon eğrisinin adsorbanın gözenekli yüzeyine bağlı olduğu sistemler için.
- Toth: Örneğin karbon üzerindeki fenolik bileşikler gibi heterojen sistemler için.
- Sips: Bir molekülün iki siteyi de kapsadığı durumlarda.

5.5 Adsorpsiyon Kinetikleri

Bir olayın mekanizmasının aydınlatılabilmesinde deneysel verilerin yorumlanması oldukça önemlidir. Bunun için olayın hız belirleme basamağının bulunması gereklidir. Kinetik çalışma adsorpsiyon hızına etki eden adsorpsiyon basamaklarının anlaşılması için önemlidir [39].

Adsorpsiyon gerçekleşirken, dinamik dengeye ulaşana kadar çözültide arta kalan adsorplanan maddenin konsantrasyonu azalır. Bir noktadan sonra adsorplayan yüzeyinde adsorplanan madde adsorpsiyonu devam etmemektedir. Bu dengeye ulaşınca kadar geçen süreye denge süresi denilmektedir. Denge süresi deneysel çalışmalar ile belirlenir [53]. Yani adsorpsiyon kinetiğinin anlaşılması ile etkin adsorban-adsorbat temas süresi yani alıkoyma süresi bulunur [50].

Bir çözültide bulunan adsorbatın adsorban tarafından adsorplanması işlemi başlıca dört aşamada gerçekleşmektedir [50]:

1. Gaz ya da sıvı fazda bulunan adsorbat, adsorbanı kapsayan bir film tabakası sınırına doğru difüze olur.
2. Film tabakasına gelen adsorbat burdaki durgun kısımdan geçerek adsorbanın gözeneklerine doğru ilerler.
3. Adsorbat adsorbanın gözenek boşluklarında hareket ederek adsorpsiyonun meydana geleceği yüzeye doğru ilerler.
4. En son olarak da adsorbatın adsorbanın gözenek yüzeyine tutunması meydana gelir.

Eğer adsorbanın bulunduğu faz hareketsiz ise, 1. basamak en yavaş ve adsorpsiyon hızını belirleyen basamak olabilmektedir. Bu nedenle, eğer akışkan hareket ettirilse yüzey tabakasının kalınlığı azalacağı için adsorpsiyon hızı artacaktır. Son basamak ölçülemeyecek kadar hızlı olduğundan ve ilk basamak da iyi bir karıştırma olduğu düşünülerek adsorpsiyon hızına aksi bir etki yapmayacakları için 2. ve 3. basamaklar hız belirleyicidir [48]. 2. basamak adsorpsiyon işleminin ilk birkaç dakikasında; 3. basamak ise adsorpsiyon işleminin geri kalan daha uzun bir süresinde meydana geldiği için adsorpsiyon hızını tam olarak etkileyen basamağın 3. basamak olduğunu söylenebilir [50]. Bazı kaynaklara göre 2. ve 3. basamakların çok hızlı gerçekleşmelerinden dolayı her iki basamağı tek basamakta göstermek mümkündür. Buna göre ilk basamak makrotaşınım, ikinci ve üçüncü basamaklar mikrotaşınım, son basamak ise sorpsiyon ismini almaktadır. Adsorbanın yüzeyinde yer alan merkezlerde yüzey fonksiyonel gruplarının elektronlarını adsorbat moleküller ile paylaşımları ya da moleküllerle etkileşimi sonucu adsorpsiyon gerçekleşmektedir. Sorpsiyon terimi, çoğunlukla fiziksel ve kimyasal adsorpsiyonun bir arada gerçekleşmesi ve birbirinden zor ayırt edilebilmeleri dolayısıyla kullanılmaktadır [48, 50].

Adsorpsiyon sistemlerinin reaksiyon derecelerini belirlemede birçok kinetik model kullanılmaktadır. Adsorpsiyon kinetik parametrelerinin belirlenmesi için yalancı birinci derece (Pseudo first order) ve yalancı ikinci derece (Pseudo second order) reaksiyon hız modelleri denge süresine kadar gerçekleşen adsorpsiyon hızını açıklamada kullanılabilir.

Yalancı birinci derece reaksiyon hızını temel alarak adsorpsiyon kinetiği için bir model geliştirmiştir. Bu model Eşitlik 5.6 ile verilmiştir.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (5.6)$$

Eşitlik 5.6, t=0 ile t aralığında ve $q_t=0$, $q_t=q_t$ sınırları dahilinde integrali alınırsa aşağıdaki ifade elde edilir.

$$\log\left(1 - \frac{q_t}{q_e}\right) = -\frac{k_1}{2.3} t \quad (5.7)$$

Eşitlik 5.7 doğrusal ve doğrusal olmayan durumlar için yeniden düzenlenebilir. Doğrusal olmayan durumlar için bu eşitlik aşağıdaki biçimde olur.

$$q_t = q_e - q_t \exp(-k_1 t) \quad (5.8)$$

Doğrusal durumlar için ise eşitlik 5.9 şeklinde düzenlenebilir.

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2.3} t \quad (5.9)$$

Yalancı birinci derece kinetik modelinin eşitliği aşağıdaki şekilde belirtilir:

$$\frac{1}{(q_e - q_t)} = \frac{1}{q_e} + k_1 t \quad (5.10)$$

Burada;

k_1 : Adsorpsiyon için denge hız sabiti (dk^{-1}).

q_e : Denge halinde adsorbe edilen madde miktarı (mg/g).

q_t : Herhangi bir zamanda (dk) adsorbe edilen madde miktarı (mg/g).

t: Temas süresi (dk).

Ho tarafından 1995 yılında geliştirilen yalancı ikinci dereceden hız denklemi hızın adsorbat konsantrasyonundan bağımsız; katı fazdaki adsorpsiyon kapasitesine ve zaman bağlı olduğunu göstermiştir [48].

Yalancı ikinci derece reaksiyon hız eşitliği denklemi eşitlik 5.11'de verilmiştir.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t)^2 \quad (5.11)$$

Eşitlik 5.11 integre edilirse eşitlik 5.12 halini alır.

$$q_t = \frac{k_2 q_e t}{(1 + k_2 q_e t)} \quad (5.12)$$

Burada;

k_2 : ikinci dereceden adsorpsiyon hız sabiti (g/mg.dk)

q_e : Denge meydana geldiği zaman adsorbe edilen madde miktarı (mg/g)

q_t : Herhangi bir zamandaki adsorbe edilmiş olan madde miktarı (mg/g)

t : Temas süresi (dk)'dır.

$\log(q_e - q_t)$, $\frac{t}{q_t}$ ve $\frac{1}{(q_e - q_t)}$ değerlerinin t değerine karşı ayrı ayrı grafiğe

konulmalarıyla k_1 ve k_2 değerleri hesaplanır.

Deneylerden elde edilen veriler grafikler yardımıyla değerlendirilerek adsorpsiyona en uygun izoterm ve adsorpsiyon hızının derecesi bulunur [48].

Adsorpsiyon çalışmalarında dikkat edilmesi gereken en önemli faktörler [50]:

- Sıcaklığın etkisi
- Çözeltinin ilk pH'sı
- Başlangıç adsorbat derişimi
- Çalkalama hızı
- Çalkalama zamanı

5.6 Protein Adsorpsiyonu

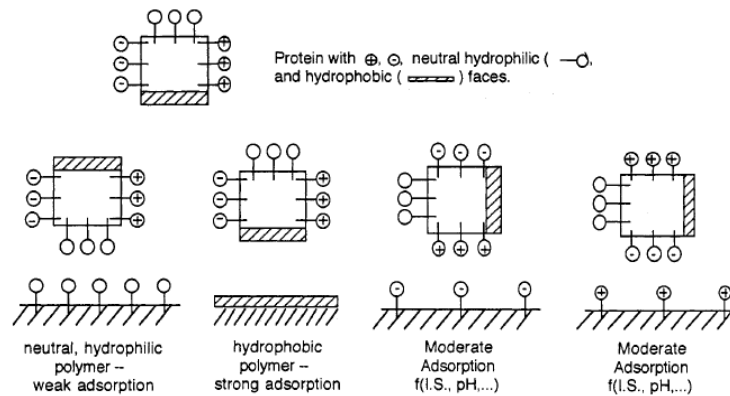
Biyoteknoloji, biyoloji, biyokimya mühendisliği, biyomedikal ve çevre bilimi gibi bir dizi disiplin, protein ve sorbent yüzeyi arasındaki adsorpsiyon davranışı ve etkileşim önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin biyomedikalde; implantlara kan proteinlerinin adsorpsiyonunu anlamak için önemlidir. Bazı durumlarda; protein adsorpsiyonu ultrafiltrasyon membranlarına adsorpsiyon için veya ısı eşanjörlerinin kirlenmesiyle minimize edilmeye ihtiyaç duyar. Protein adsorpsiyonu muhtemelen karasal yaşamın başlangıcının biyotik aşamasında da önemli bir rol oynar. Çevre bilimlerinde katı parçalara protein adsorpsiyonu, stabilizasyonu ve genetiği değiştirilmiş bitkiler tarafından yayımlanan transgen proteinlerin çevresel akıbetini tayin etmekle ilişkilidir.

Eğer protein katı parçalara adsorbe olmazsa protein çözeltide kalır ve yıkanıp gidebilir; yani başarısız olunur [54].

Çoğu protein/yüzey kombinasyonları adsorpsiyonla sonuçlanmaktadır. Protein adsorpsiyonu van der Waals, hidrofobik ve elektrostatik kuvvetleri gibi farklı protein yüzey kuvvetleri tarafından yürütülen çok karmaşık bir süreçtir. Protein adsorpsiyonunun anlaşılması için protein stabilizasyonunun bilinmesi gereklidir. Proteinler globüler ve fibröz olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Çoğu proteinler heterojen yüzeylere sahiptirler ve bu nedenle adsorbe yüzeyi ile birden fazla modda etkileşim gösterebilirler [55]. Adsorpsiyonu yöneten asıl güçler protein ve katı yüzeyler arasındaki elektrostatik etkileşimler ve hidrofobikliklerdir. Ayrıca proteinin yapısal stabilizasyonunda adsorpsiyon olayında büyük önem taşımaktadır. Adsorpsiyon esnasında veya protein yüzeye tutunduktan sonra proteinler yapısal değişikliğe uğramaktadırlar. Bu reaksiyon oluşan entropi elektrostatik itmeyi yenersen adsorpsiyon meydana gelir. Proteinlerin katı yüzeylere doğru olan hareketi çevresel faktörlere (pH, T, iyonik güç), protein özelliklerine ve sorbent kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Katı sorbent yüzeyi hidrofobik, hidrofilik, yüklü ve yüksüz olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Fibröz proteinler hidrofilik yüzeylerde bioaktiftir. Bu nedenle konformasyonel değişimler daha düşüktür. Globüler proteinler ise her iki yüzey türünde de az biyoaktiftir ve konformasyonel değişikliklere uğrarlar. Konformasyonel değişikliklerin derecesi proteinin stabilizasyonu, hidrofobikliği, protein yükü ve yüzeyin yüküyle belirlenmektedir. Proteinin özelliklerine ve sorbent yüzeyinin hidrofobik veya hidrofilik olmasına göre adsorpsiyon oluşmaktadır. Sorbent yüzeyini işgal eden proteinler ayak izi olarak adlandırılırlar. Protein adsorpsiyonu tersinirdir ve çevresel değişiklikler sonucunda protein desorbe olur. Maksimum adsorpsiyon proteinin izoelektrik noktasına yakın yerde meydana gelmektedir [39]. Adsorpsiyon esnasında yüklü yüzeyler sulu çözeltideki karşı iyonlar tarafından çevrelenir. Bu karşı iyonlar yüzeyin her tarafına yayılırlar. Yüzey ve protein birbirine yaklaşır. Yüzeyin polaritesi kaplanmış tabakaların yüzeydeki yüklerinin tekrar dağılıp düzenlenmesiyle değişmektedir. Bu yüklerin tekrar dağılımı elektrostatik etkiden kaynaklanır. Protein moleküllerinin yapısal değişiklikleri hidrofobik yüzeylerde hidrofiliklere göre daha yaygındır. Hidrofobik yüzeylerde oluşan adsorpsiyon miktarı daha yüksektir. Çünkü yüzeyin hidrofobik kısmıyla yüzeyin hidrofobik kısmı birbirini etkilemektedir. Oda sıcaklığının üstündeki sıcaklıklarda protein adsorpsiyon daha yüksektir. Katı yüzeyler

üzerine protein adsorpsiyon çalışması teorik olarak ilginçtir ve malzemelerin biyoyumluluğu, biyolojik çözümlerin ayrılması ve biyoanalitik algılama gibi alanlarda pratik olarak önemlidir [55]. Proteindeki yapısal tekrar düzenlemeler, yüzeylerin parçalarının ve proteinin dehidrasyonu, interfasiyal arayüzeyindeki yüklü grupların yeniden dağıtımı ve genel adsorpsiyon prosesindeki küçük iyonların rolü gibi alt proseslere dikkat gerektirmektedir.

Bir yüzeye adsorplanan protein miktarının tahmin edilebilmesi yüzey özelliklerinin, belirli proteinin ve zamanın bir fonksiyonudur. Yapılan deneylerde protein molekülleri yüzeye doğru konvektif difüzyona uğrarlar. Bu kritik konsantrasyon yüzeye yakın yerde kurulana kadar sınırlayıcı mekanizma hızıdır. Ancak, transport sınırlama yokluğunda yüzeye adsorpsiyonda hız sınırlayıcı süreç oluşmaktadır [55]. Ara yüzeydeki protein varışının, yığın konsantrasyonuyla ve difüzyon katsayısına bağlı olan difüzyon süreçleriyle yürütüldüğü varsayılmaktadır. Proteinin ve yüzeyin belirli yüzey kimyası başlangıç etkileşim enerjisi nedeniyle kalma süresini belirler. Kalma süresiyle birlikte proteinin kendisinin yüzey dinamikleri muhtemelen proteinin yüzey denatürasyonunu kontrol etmektedir. Protein arayüzeyde zamanla denatüre olmaya eğilimlidir. Kalma süresinin yükselmesiyle, denatürasyon maksimuma ulaşır. Denatürasyonun artmasıyla, adsorpsiyon durumundaki etkileşim enerjisi artar ve desorpsiyon için olasılık azalmaktadır. Süreç işleminin gerçekliği proteinlerin homojen parçacıklar olmayışıdır. Tüm çarpışmalar adsorpsiyonda eşit etkiye sahip değildir ve farklı protein yüzeyleri proteinle farklı etkileşim enerjileriyle sonuçlanır. Bu nedenle yüzey denatürasyonu için farklı eğilimler bulunmaktadır [56]. Şekil 5.6 de 4 tane yüzeye sahip olan protein gösterilmektedir; bir hidrofobik yüzey, bir pozitif yüklü yüzey, bir negatif yüklü yüzey, bir nötral hidrofilik yüzey.



Şekil 5.6 Dört yüzeyli proteinin şematik gösterimi [56]

Bütün çarpışmalar muhtemelen eşit olmasına rağmen, meydana gelen sonraki arayüzey işlemleri için gerekli olan kalma süresini sağlayacak kT aralığında etkileşim enerjileriyle sonuçlanan sadece bu çarpışmalardır. Nötral hidrofilik yüzeydeki protein adsorpsiyonu oldukça zayıf olmaya eğilimlidir. Oysa hidrofobik yüzeylere protein adsorpsiyonu çok sert olmaya eğilimlidir ve genellikle kısmen tersinmezdir. Yüklü yüzeylere adsorpsiyon, proteinin yük karakterinin, ortamın pH'nın ve iyonik gücün güçlü bir fonksiyonu olmaya eğilimlidir. Başlangıç temas olayını veya maksimum etkileşimi başlatan protein adsorpsiyon oryantasyonunu tahmin etmek için, proteinlerin dış yüzey kimyasıyla ilgili bişeyler bilmek gerekmektedir [56].

Kalsiyum hidroksiapatit; mükemmel biyouyumluluğu ve toksik olmamasıyla birlikte proteinler ve enzimler gibi biyopolimerlere yüksek benzeşmesi nedeniyle büyük ilgi çekmektedir. HAP $P6_3/m$ alan uzay grubunda ve kristal yüzeylerinde C ve P bölgeleri olarak adlandırılan iki farklı bağlayıcı bölgeye sahip olan HAP hücre boyutları $a=b=0.943$ nm ve $c=0.688$ nm olduğundan beri, HAP proteinler için bağlayıcı karakteri olan birçok bölge içerir. C bölgeleri, $0.943'$ e eşit olan a ve b yönlerinden ve $0.344'$ e eşit olan c yönünden belirli mesafe ile ac veya bc kristal yüzeyleri üzerinde dikdörtgen bir şekilde dizilmektedir. P bölgeleri, 0.943 nm gibi minimal bir uzaklık ile ab kristal yüzeyi üzerinde altıgen bir şekilde dizilmektedir. C bölgeleri kalsiyum iyonları ve pozitif yük açısından zengindir ve böylece asidik gruplarını bağlar. Ancak P bölgeleri ise kalsiyum iyonları ve pozitif yük açısından eksiktir ve böylece proteinlerin bazik grupları bağlanır. HAP'ın kristal yüzeyine karşı HAP yapısının belirli bir bölümünde ortaya çıkan HAP, kristal yüzeyi ile biyolojik moleküller arasındaki etkileşimle temelleştirilmektedir ve böylece HAP konformasyonlarını adsorpsiyon için düzenlemek açısından uygundur. Bu durum, HAP ve protein molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimin adsorpsiyon prosesinde baskın faktör olduğu kanıtlayabilmektedir. Ayrıca HAP'in Ca/P oranı $10/6'$ dir [3]. Böylece asidik protein olan BSA'ya karşı daha fazla benzeşme göstermektedir ve aralarında olan elektrostatik etkileşim daha fazladır. Bunun sonucunda BSA, HAP yüzeyine diğer proteinlere göre daha kolay ve fazla miktarda adsorbe olmaktadır.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

6.1 Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada yüksek yüzey etkileşim özellikleri, mükemmel biyouyumluluğu ve toksik olmaması nedeniyle diş bilimi, gıda bilimi ve ilaç gibi çeşitli alanlarda birçok çalışma yapılan ve biyomoleküllere yüksek benzerlik gösteren hidroksiapatit (HAP, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) üzerine biyomoleküllerin adsorpsiyonu araştırılmıştır.

Farklı üretim şartlarında üretilen HAP'lerin adsorban olarak kullanıldığı adsorpsiyon deneyleri için, laboratuvar ortamında hazırlanan BSA protein çözeltileri kullanılmıştır. Sentetik HAP üzerine BSA proteinin adsorpsiyonu incelenmiştir. Adsorplanan BSA proteini miktarının ölçülmesinde UV Spektrofotometresi kullanılmıştır. Bu bölümde deneylerde kullanılan kimyasal madde ve cihazlar ile deneylerde izlenen yöntem açıklanmıştır.

6.2 Kullanılan Kimyasallar

Bovin serum albumin (BSA) (Sigma); Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Sigma); Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) (Sigma); Etil Alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck); Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck); Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich); Potasyum hidroksit (Sigma-Aldrich), Endüstriyel polimer (stiren akrilik kopolimeri).

6.3 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Spektrofotometre: Specord 50 Analytik Jena UVS

Santrifüj Cihazı: Sigma Santrifüj

Etüv: MMM Ecocell

Analitik Terazî: Ohaus Pioner

Fırın: Lenton

Su Banyosu: Polyscience

pH Kontrol Ünitesi: Radiometer pH-Stat Titratör PHM290

BET Yüzey Alanı Tayin Cihazı: Contech Sorptometer 1042

FT-IR Cihazı: Bruker Alpha P spektrometre

Çalkalamalı Su Banyosu: GFL 1083

Su Banyosu: Polyscience

Manyetik Karıştırıcı: Heidolp MR Hei-Standart

Peristaltik Pompa: Cole Parmer Instrument 7518-00

6.4 Adsorban (HAP) Üretimi

Bu çalışmada kullanılan HAP numunelerinin üretimi, ıslak çöktürme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. 0.5 M kalsiyum klorür (CaCl_2) ve 0.3 M potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) çözeltilerinin miktarları $\text{Ca/P}=1.67$ oranına uygun olacak şekilde ayarlanmıştır. Su banyosuna bağlı çift cidarlı reaktöre CaCl_2 çözeltisi konulurken, KH_2PO_4 çözeltisi peristaltik pompa ile 1 ml/dak hızla sisteme beslenmiştir. Çözelti 300 rpm'de manyetik karıştırıcıyla karıştırılmıştır. CO_2 gazını uzaklaştırmak için sistemden sürekli azot geçişi sağlanmıştır. Çözeltide sabit pH değeri, pH kontrol ünitesine bağlı peristaltik pompa vasıtasıyla sisteme eklenen 0.1 M KOH çözeltisi ile sağlanmıştır. Çözelti pH'ı 9-9.3 aralığında sabit tutulmuştur. İşlem tamamlandıktan sonra elde edilen kristaller kendi doygun çözeltisi ile 24 saat riflaks edilmiştir. Sentezlenen kristaller filtre edilip destile suyla yıkandıktan sonra 100°C 'de kurutulmuş ve oda sıcaklığında desikatörde saklanmıştır.

Polimer katkı maddesi ilave edilen örneklerin sentezinde yukarıda anlatılan üretim yöntemi uygulanmış, polimer CaCl_2 ve $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ çözeltileri ile birlikte sisteme ilave edilmiştir. Üretilen HAP numuneleri, 650°C ve 800°C 'de kül fırınında $10^\circ\text{C}/\text{dak}$ ısıtma hızıyla 3 saat organik bileşenlerin uzaklaşması için sinterlenmiştir. Daha sonra üretilen numunelerin karakterizasyonu için BET analizi ve FTIR analizi yapılmıştır.

6.5 Adsorpsiyon Deneyleleri

6.5.1 Tampon Çözeltiler

pH 7.4 ve pH 6.0 tampon çözeltileri 0.2 M disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) çözeltilisinden ve 0.2 M sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄) çözeltileri kullanılarak pH metre yardımıyla hazırlanmıştır.

6.5.2 BSA Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

Hazırlanan pH 7.4 ve pH 6.0 tampon çözeltileri kullanılarak 0.5 mg/ml BSA stok çözeltileri hazırlanmıştır.

6.5.3 Deneylein Yapılışı

Adsorpsiyon deneylelerinde pH 7.4 ve pH 6.0 tampon çözeltileri kullanılarak hazırlanan 0.5 mg/ml konsantrasyonunda BSA protein stok çözeltileri kullanılmıştır. Laboratuvar ortamında üretilen adsorbanlardan 0.075 g tartılarak 10 ml hacminde polipropilen tüplere konulmuştur. Tüplere konulan adsorbanların üzerine hazırlanan BSA çözeltilisinden 5'er ml ilave edilmiş ve tüpler 37°C çalkalamalı su banyosunda belirli sürelerde bekletilmiştir. Tüpler sırasıyla alınmış 6000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süzüntüde kalan BSA konsantrasyonu hazırlanan kalibrasyon grafiğı vasıtasıyla UV'de ölçülmüştür.

6.5.4 BSA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

BSA protein çözeltilisi konsantrasyonları, UV-Görünür Alan Spektrofotometresinde daha önce belirlenmiş 280 nm sabit dalga boyunda çözeltili absorbansı ölçülerek ve kalibrasyon grafiğı kullanılarak belirlenmiştir.

Adsorban üzerine temas süresince (t) adsorplanan BSA miktarı q_t (mg/g) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$q_t = \frac{C_0 - C_t}{w} \quad (6.1)$$

C₀: Başlangıç anındaki çözeltili konsantrasyonu (mg/ml)

C_t: t anındaki çözeltili konsantrasyonu (mg/ml)

V: Çözeltili hacmi (ml)

w: Kuru haldeki adsorban ağırlığı (g)

q_t : t anında 1 gr adsorban tarafından adsorplanan miktar (mg/g)

t anında adsorban yüzeyindeki % adsorpsiyon miktarını hesaplamak için ise:

$$\%adsorpsiyon = \frac{(C_0 - C_t)100}{C_0} \quad \text{eşitliği kullanılır.} \quad (6.2)$$

C_0 : Başlangıç anındaki çözelti konsantrasyonu (mg/ml)

C_t : t anındaki çözelti konsantrasyonu (mg/ml)

%adsorpsiyon: Adsorban tarafından adsorplanan % adsorban miktarı

BÖLÜM 7

SONUÇLAR

7.1 HAP Kristallerinin Karakterizasyonu

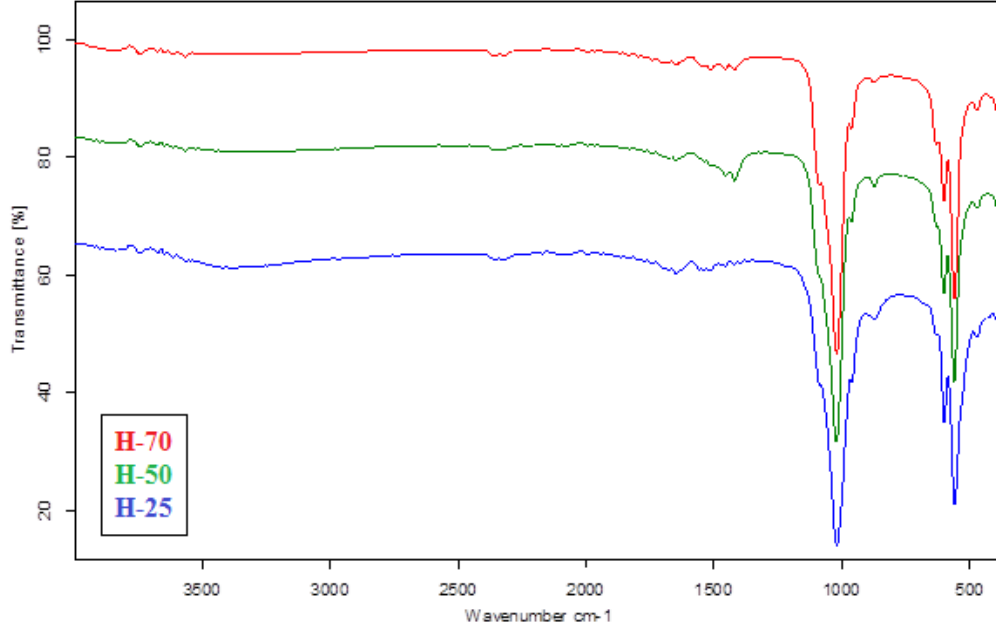
Toz halindeki HAP numunelerinin BET yüzey analiz cihazı (Costech Sorptometer) ile belirlenen spesifik yüzey alanları Çizelge 7.1’de verilmiştir.

Çizelge 7.1 HAP numunelerinin spesifik yüzey alanları

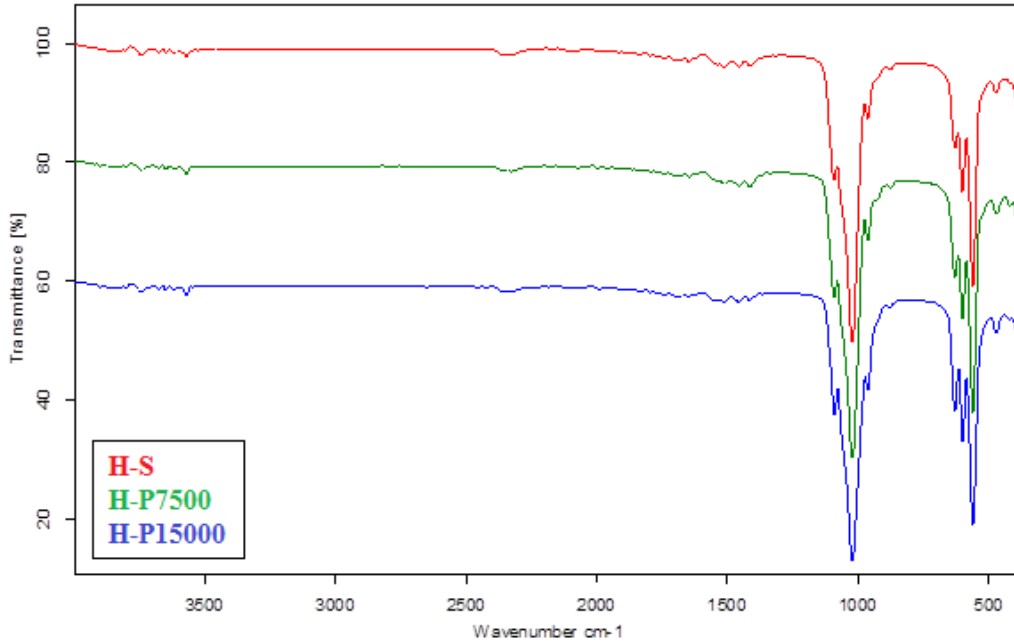
HAP Numuneleri	Üretim Sıcaklığı (°C)	Sinterleme Sıcaklığı (°C)	Spesifik Yüzey Alanı (m ² /g)
H-25	25	-	80.30
H-50	50	-	62.25
H-70	70	-	30.04
H-S	70	650	21.22
H-P7500	70	650	22.10
H-P15000	70	650	11.17

Üretilen HAP kristallerinin Bruker Alpha P Spektrometre cihazı kullanılarak FT-IR analizleri yapılmış ve numunelerin HAP olduğu doğrulanmıştır. Elde edilen veriler mevcut yazılım programı kullanılarak grafik hale dönüştürülüp değerlendirilmiştir. Şekil 7.1’de farklı sıcaklıklarda üretilmiş HAP numunelerinin, Şekil 7.2’de ise 650°C sıcaklıkta sinterlenmiş HAP numunelerinin FT-IR spektrumları görülmektedir. Spektrumlar incelendiğinde 3400 cm⁻¹ civarında su moleküllerinden kaynaklanan zayıf pikler görülmektedir. Yaklaşık 3570 cm⁻¹ civarındaki zayıf pik ise HAP kristalindeki O-H grubunu göstermektedir. 1090 cm⁻¹-1022 cm⁻¹ arasında PO₄⁻³ grubunun titreşimi ve 600-560 cm⁻¹ arasında orta şiddette O-P-O bağının üçlü bir deformasyon titreşimi görülmektedir. 962 cm⁻¹ ve 877 cm⁻¹ civarındaki zayıf pikler ise HPO₄⁻² grubunu belirtmektedir. 630 cm⁻¹ civarında görülen pik, OH⁻ grubuna ait titreşimdir. 1650 cm⁻¹ ve

1415-1420 cm^{-1} civarında görülen zayıf titreşim CO_3^{-2} gruplarının varlığını gösterir. Bu ortamdaki CO_2^{-2} 'nin tam olarak uzaklaştırılmadığını belirtmektedir (Gomez-Morales, vd., 2001, Koutsopoulos, 2002).



Şekil 7.1 Farklı sıcaklıklarda üretilen HAP numunelerinin FT-IR spektrumları



Şekil 7.2 650°C'de sinterlenen HAP numunelerinin FT-IR spektrumları

7.2 pH 7.4 Tampon Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Adsorpsiyon Deneyleri

7.2.1 BSA Proteini Kalibrasyon Grafiğinin Çizilmesi

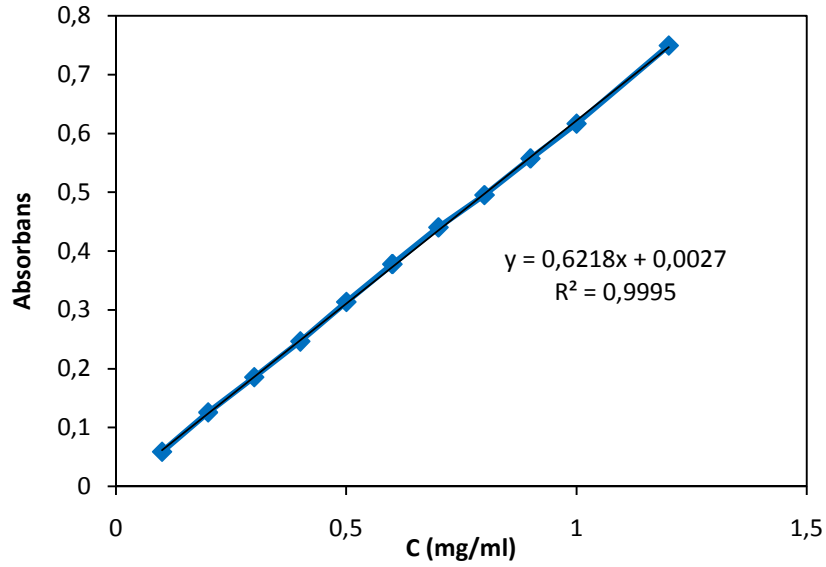
BSA proteinin kalibrasyon grafiğini çizebilmek için pH 7.4 tampon çözeltisi kullanılarak BSA stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan BSA stok çözeltisinden sırasıyla 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; 1.0 ve 1.2 mg/ml konsantrasyonlarında örnekler hazırlanmıştır. Referans olarak tampon çözelti kullanılarak 280 nm dalga boyunda hazırlanan çözeltilerin absorbans değerleri okunmuş ve BSA proteini konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri arasında bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 7.2’de, kalibrasyon grafiği ise Şekil 7.3’de verilmektedir. Çizilen grafikten doğrunun denklemi aşağıdaki gibi bulunur.

$$A_{280} = 0.6218 \cdot C_{BSA} \quad (R^2=0.9995) \quad (7.1)$$

Bu doğrunun eğiminden molar absorpsiyon katsayısı $0.6218 \text{ (L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 7.2 BSA protein çözeltisi için konsantrasyon değerleri ve bunlara karşılık gelen absorbans değerleri

C (mg/ml)	Abs ($\lambda=280 \text{ nm}$)
0.1	0.0610
0.2	0.1243
0.3	0.1883
0.4	0.2550
0.5	0.3227
0.6	0.3739
0.7	0.4364
0.8	0.4985
0.9	0.5632
1.0	0.6302
1.2	0.7426



Şekil 7.3 Kalibrasyon grafiği (pH 7.4)

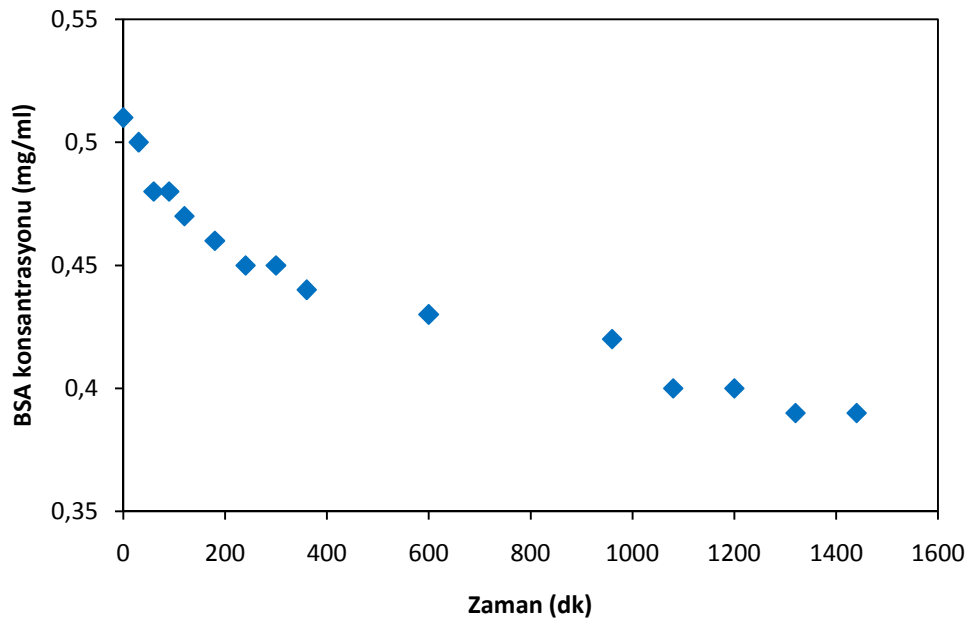
7.2.2 HAP Üzerine BSA Proteini Adsorpsiyonunun Etkisinin İncelenmesi

Farklı adsorbanların pH 7.4 ve 37°C’de BSA adsorpsiyonuna etkisinin incelendiği deneylerde, adsorban olarak kullanılan HAP numunelerinin özellikleri Çizelge 8.1’de verilmiştir. Deneylerde BSA çözeltilerinin başlangıç konsantrasyonu 0.5 mg/ml, adsorban miktarı 0.075 g ve temas süresi 24 saat olarak alınmıştır.

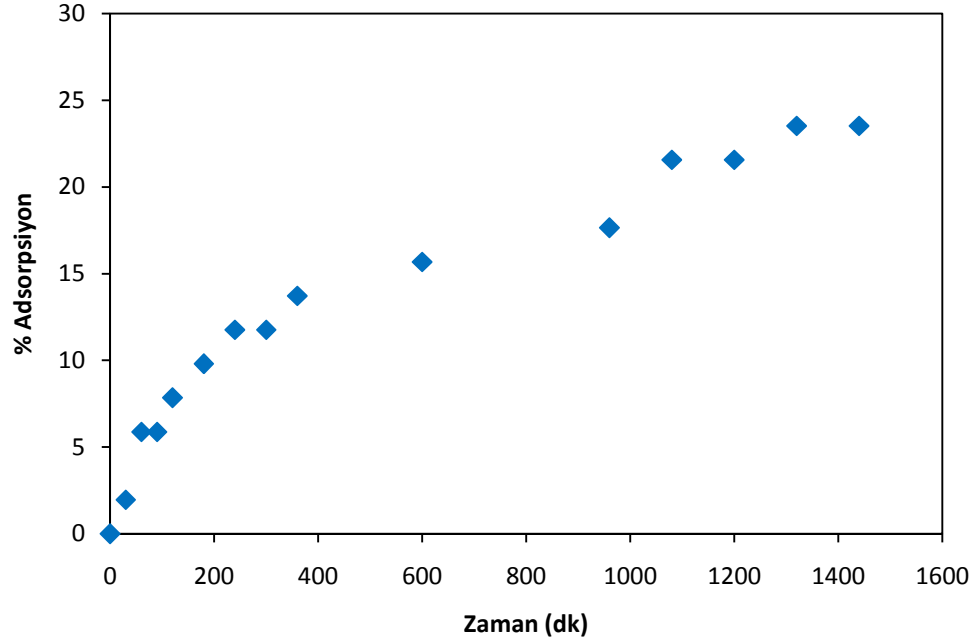
Adsorban olarak 70°C’de elde edilen saf sinterlenmemiş HAP (H-70) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.3’de verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.4’de, BSA’nın % adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.5’te ve 1 g adsorbanın adsorbladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 7.3 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-70)

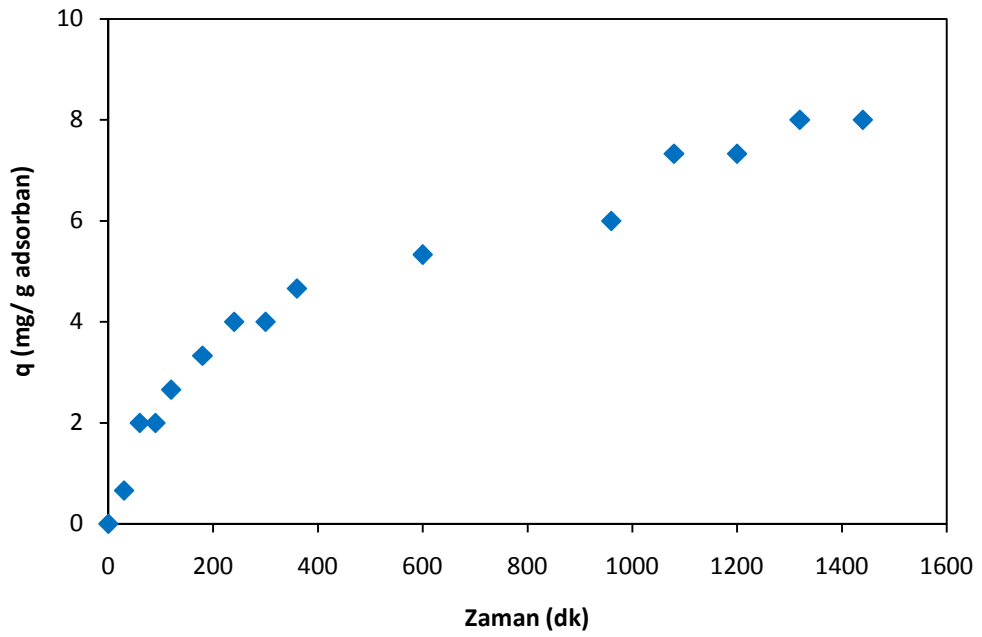
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorban)	Adsorpsiyon (%)
0	0.51	0.00	0.00
30	0.50	0.66	1.96
60	0.48	2.00	5.88
90	0.48	2.00	5.88
120	0.47	2.66	7.84
180	0.46	3.33	9.80
240	0.45	4.00	11.76
300	0.45	4.00	11.76
360	0.44	4.66	13.72
600	0.43	5.33	15.68
960	0.42	6.00	17.64
1080	0.40	7.33	21.56
1200	0.40	7.33	21.56
1320	0.39	8.00	23.52
1440	0.39	8.00	23.52



Şekil 7.4 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-70)



Şekil 7.5 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-70)



Şekil 7.6 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-70)

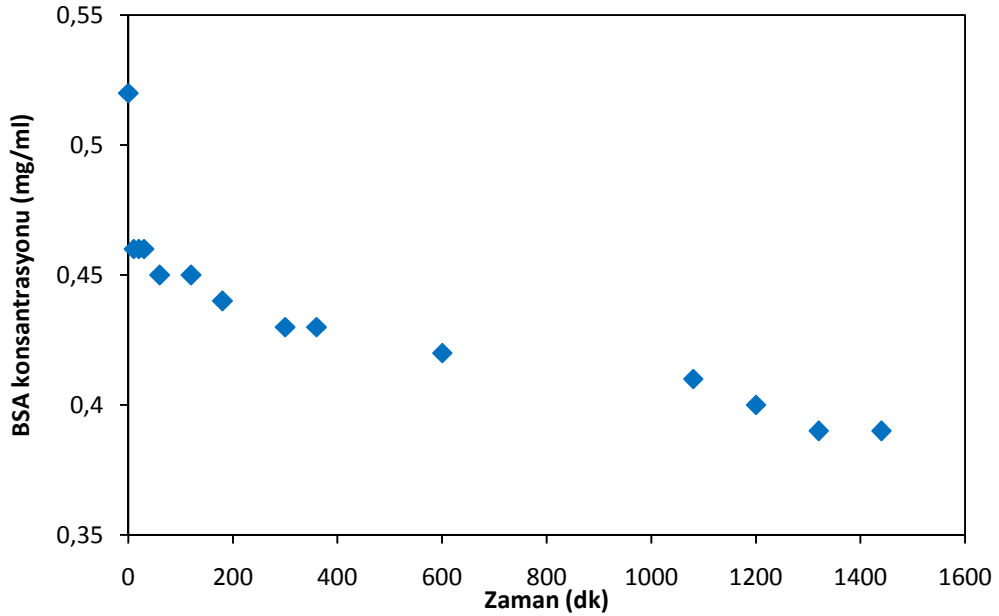
Şekil 7.4, Şekil 7.5 ve Şekil 7.6'ten görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1320 dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

Adsorban olarak 50°C'de elde edilen saf sinterlenmemiş HAP (H-50) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.4'de verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.7'de, BSA'nın % adsorpsiyonunun

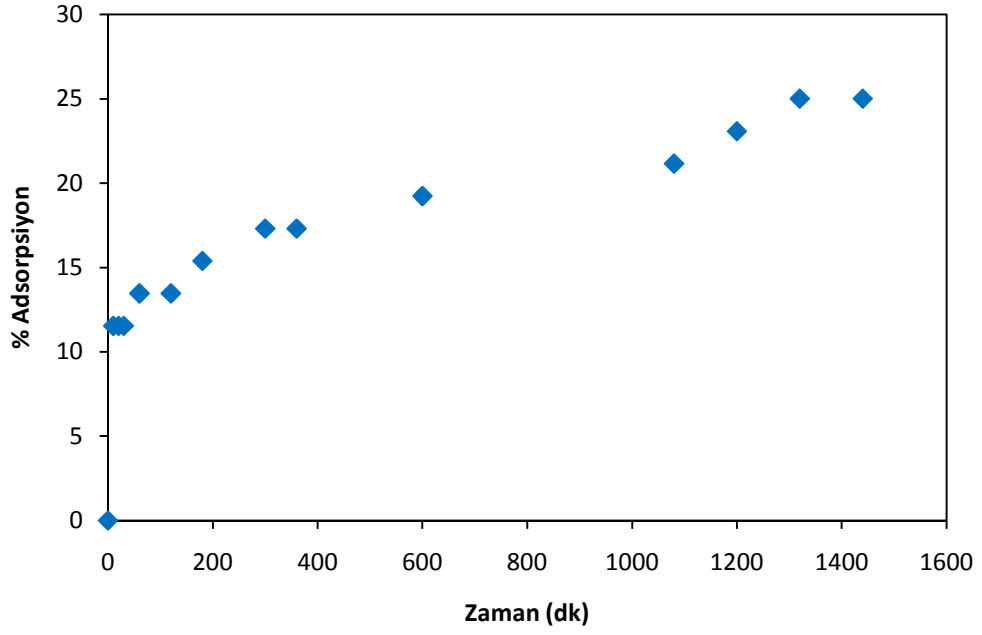
zamanla değişimi Şekil 7.8’de ve 1 g adsorbanın adsorbladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 7.4 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi
(adsorban: H-50)

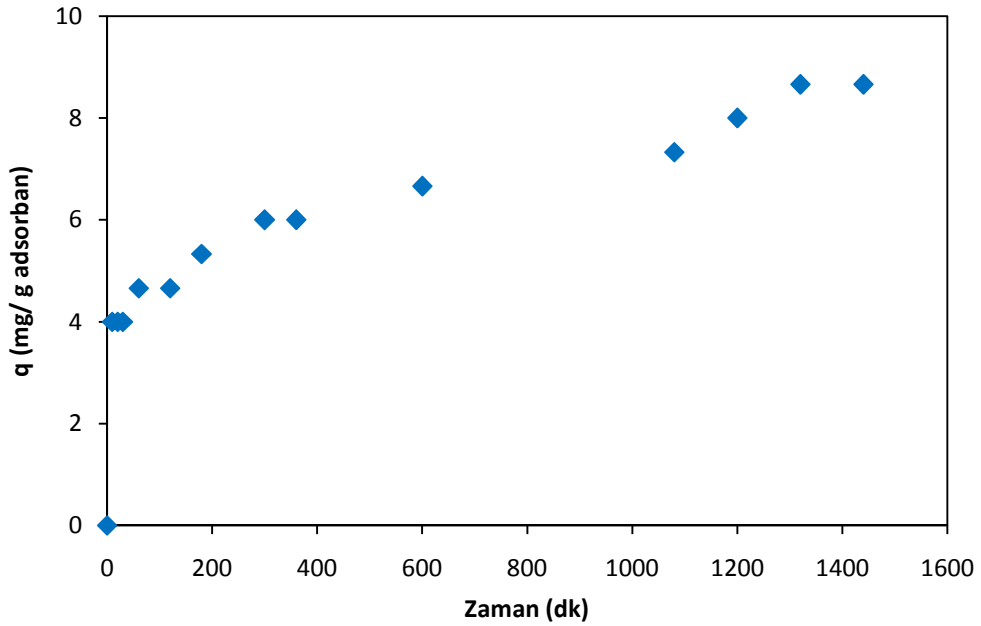
Zaman (dk)	BSA Konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorban)	Adsorpsiyon (%)
0	0.52	0.00	0.00
10	0.46	4.00	11.53
20	0.46	4.00	11.53
30	0.46	4.00	11.53
60	0.45	4.66	13.46
120	0.45	4.66	13.46
180	0.44	5.33	15.38
300	0.43	6.00	17.30
360	0.43	6.00	17.30
600	0.42	6.66	19.23
1080	0.41	7.33	21.15
1200	0.40	8.00	23.07
1320	0.39	8.66	25.00
1440	0.39	8.66	25.00



Şekil 7.7 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-50)



Şekil 7.8 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-50)



Şekil 7.9 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-50)

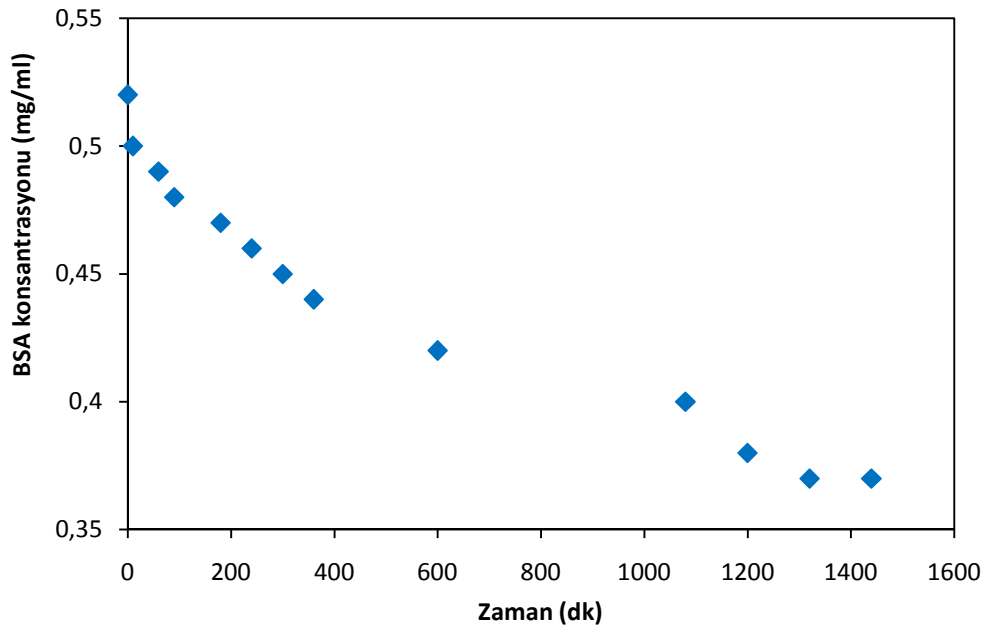
Şekil 7.7, Şekil 7.8 ve Şekil 7.9'dan görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1320. dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

Adsorban olarak 25°C'de elde edilen saf sinterlenmemiş HAP (H-25) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.5'de verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.10'da, BSA'nın % adsorpsiyonunun

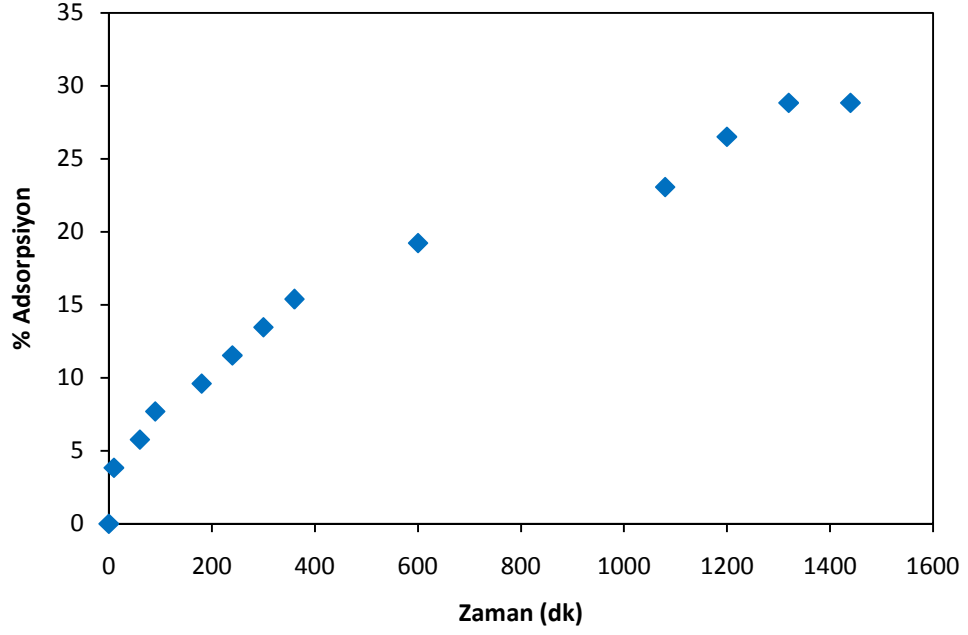
zamanla değişimi Şekil 7.11’de ve 1 g adsorbanın adsorbladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.12’de gösterilmiştir.

Çizelge 7.5 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi
(adsorban: H-25)

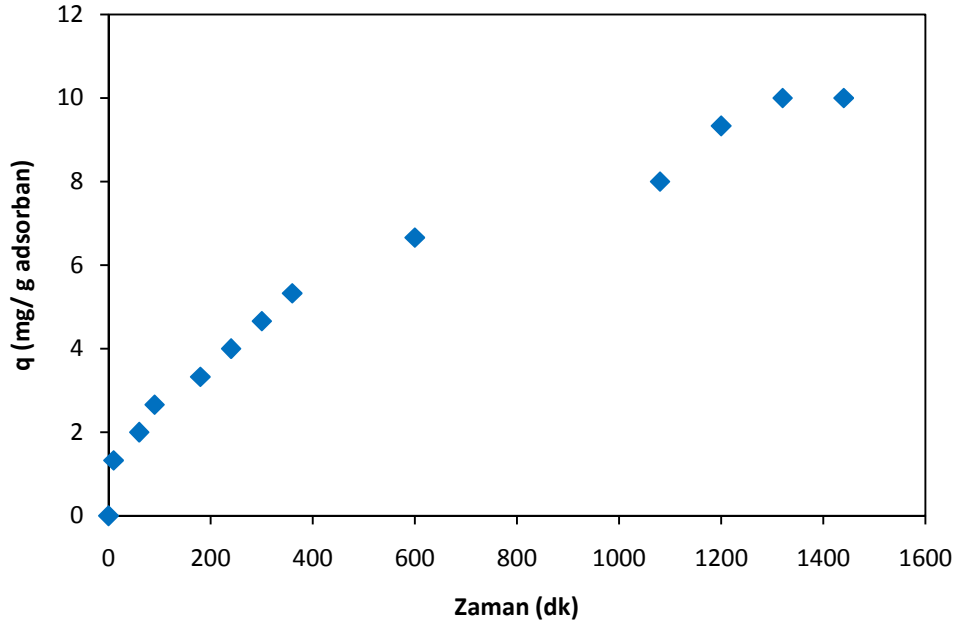
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorban)	Adsorpsiyon (%)
0	0.52	0.00	0.00
10	0.50	1.33	3.84
60	0.49	2.00	5.76
90	0.48	2.66	7.69
180	0.47	3.33	9.61
240	0.46	4.00	11.53
300	0.45	4.66	13.46
360	0.44	5.33	15.38
600	0.42	6.66	19.23
1080	0.40	8.00	23.07
1200	0.38	9.33	26.52
1320	0.37	10.00	28.84
1440	0.37	10.00	28.84



Şekil 7.10 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-25)



Şekil 7.11 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-25)



Şekil 7.12 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-25)

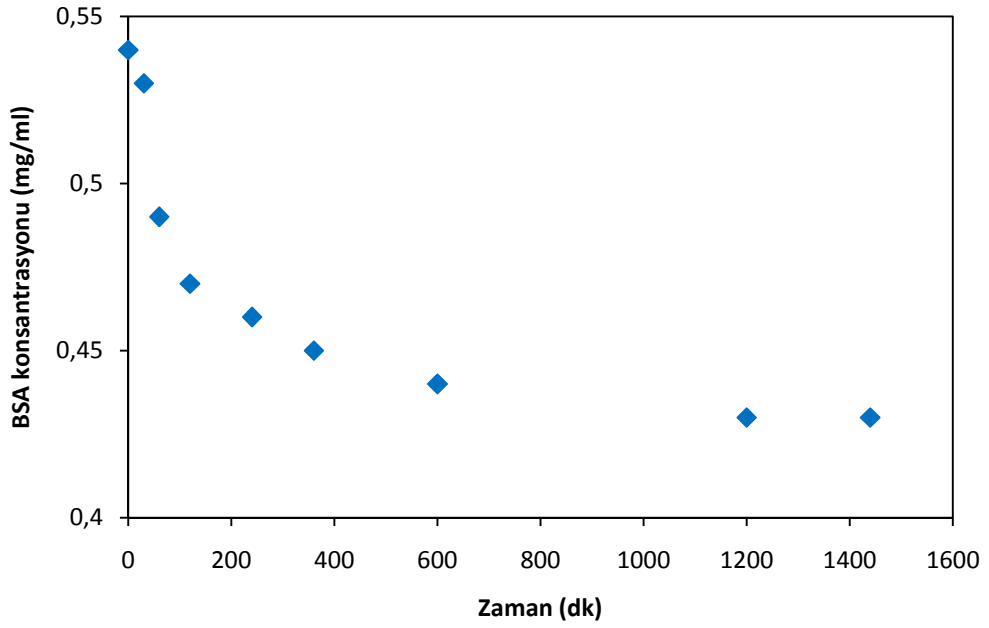
Şekil 7.10, Şekil 7.11 ve Şekil 7.12'dan görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1320 dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

Adsorban olarak 650°C'de sinterlenmiş ve saf olarak elde edilen HAP (H-S) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.6'da verilmiştir.

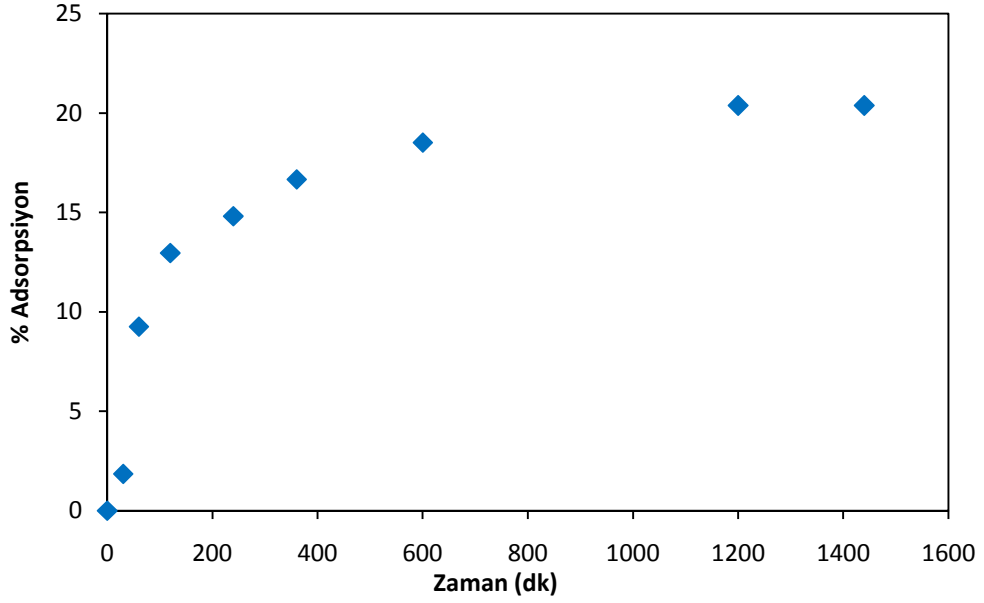
Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.13’de, BSA’nın % adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.14’de ve 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.15’de gösterilmiştir.

Çizelge 7.6 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)

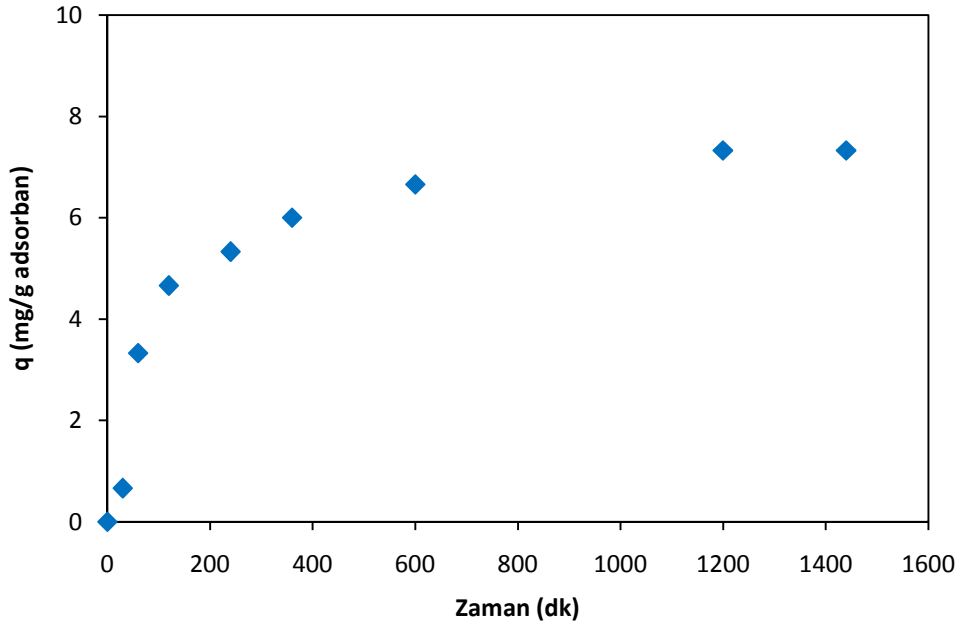
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorban)	Adsorpsiyon (%)
0	0.54	0.00	0.00
30	0.53	0.66	1.85
60	0.49	3.33	9.25
120	0.47	4.66	12.96
240	0.46	5.33	14.81
360	0.45	6.00	16.66
600	0.44	6.66	18.51
1200	0.43	7.33	20.37
1440	0.43	7.33	20.37



Şekil 7.13 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-S)



Şekil 7.14 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)



Şekil 7.15 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)

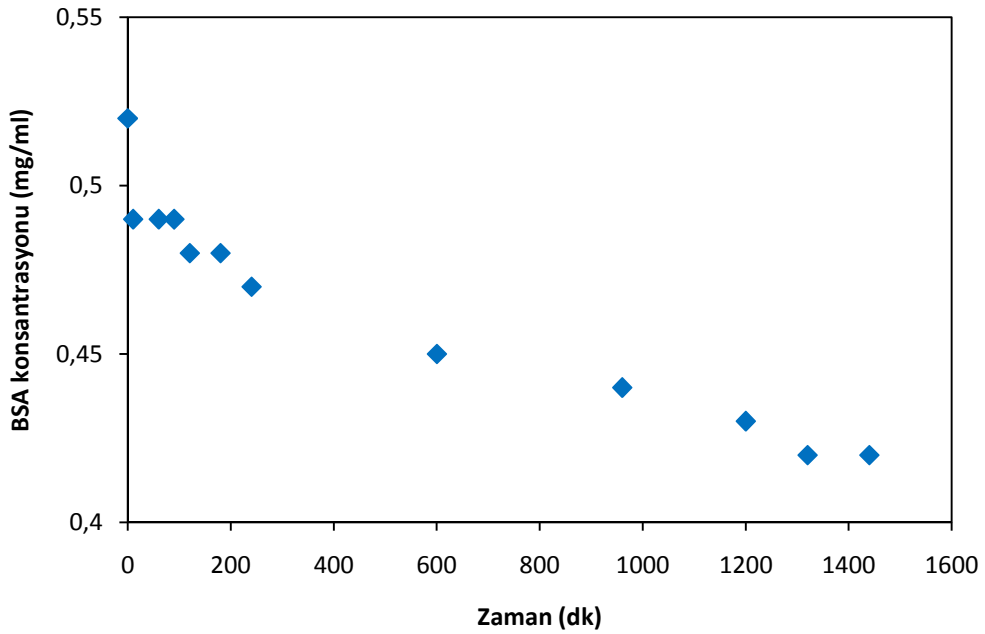
Şekil 7.13, Şekil 7.14 ve Şekil 7.15'den görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1200 dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

Adsorban olarak 650°C'de sinterlenmiş ve 7500 mg/mL polimer katkıli olarak elde edilen HAP (H-P7500) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.7'de verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.16'da,

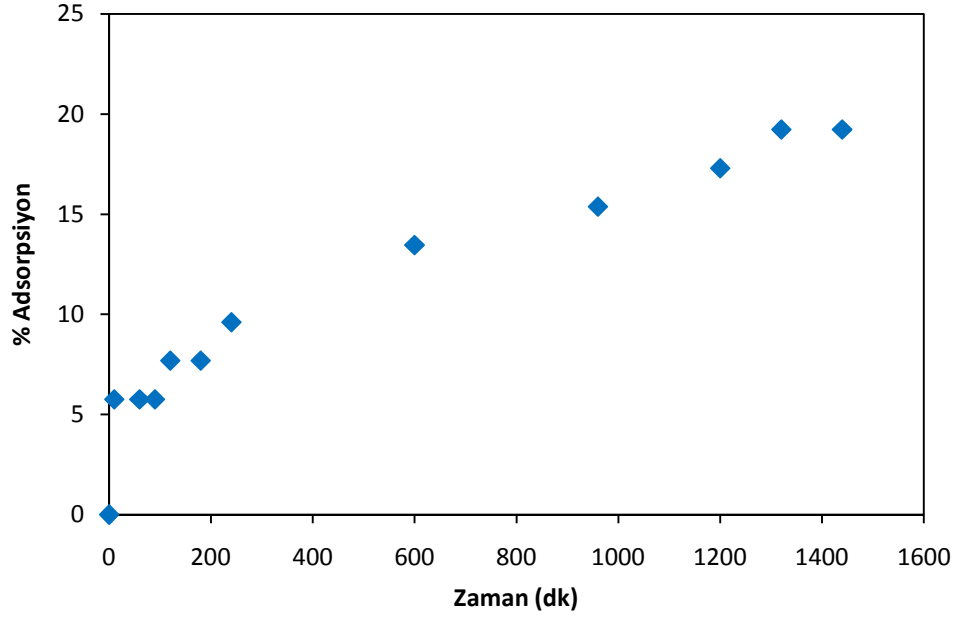
BSA'nın % adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.17'de ve 1 g adsorbanın adsorbladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.18'de gsterilmiştir.

Çizelge 7.7 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)

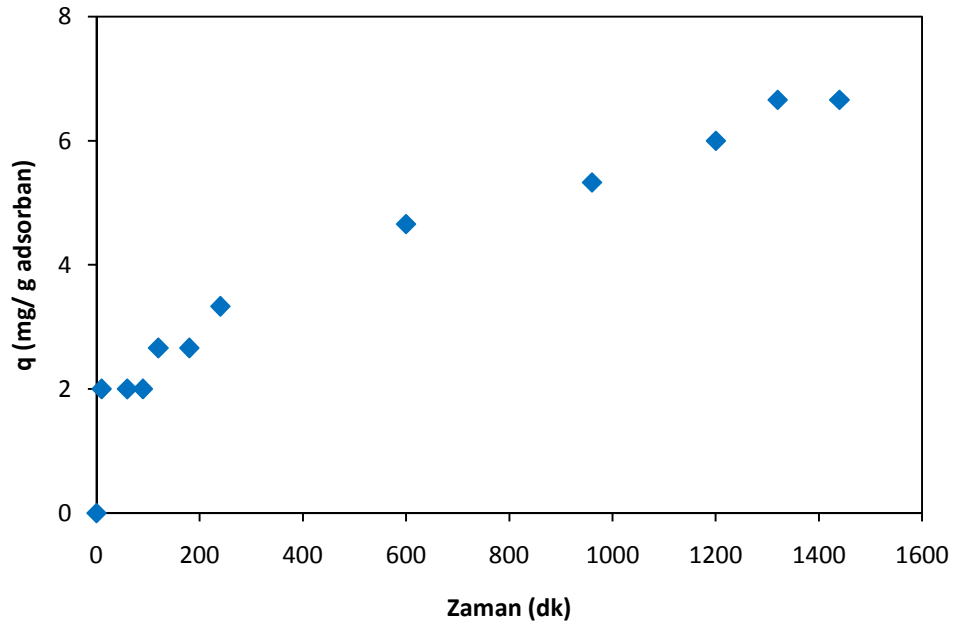
Zaman (dk)	BSA Konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorban)	Adsorpsiyon (%)
0	0.52	0.00	0.00
10	0.49	2.00	5.76
60	0.49	2.00	5.76
90	0.49	2.00	5.76
120	0.48	2.66	7.69
180	0.48	2.66	7.69
240	0.47	3.33	9.61
600	0.45	4.66	13.46
960	0.44	5.33	15.38
1200	0.43	6.00	17.30
1320	0.42	6.66	19.23
1440	0.42	6.66	19.23



Şekil 7.16 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)



Şekil 7.17 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)



Şekil 7.18 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)

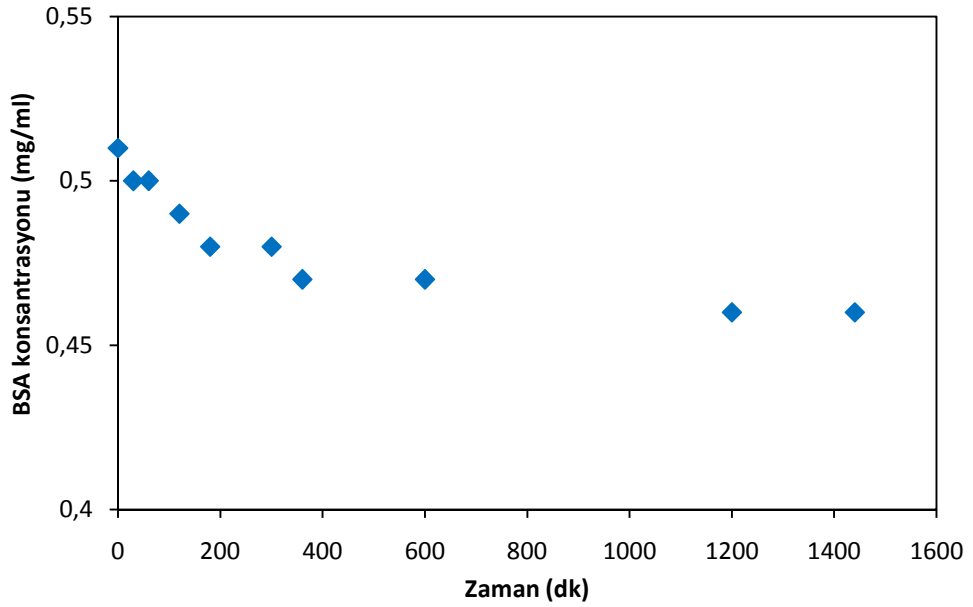
Şekil 7.16, Şekil 7.17 ve Şekil 7.18'den görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1320. dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

Adsorban olarak 800°C'de sinterlenmiş ve 7500 mg/mL polimer katkılı olarak elde edilen HAP (H-P7500-II) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.8'de verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.19'da,

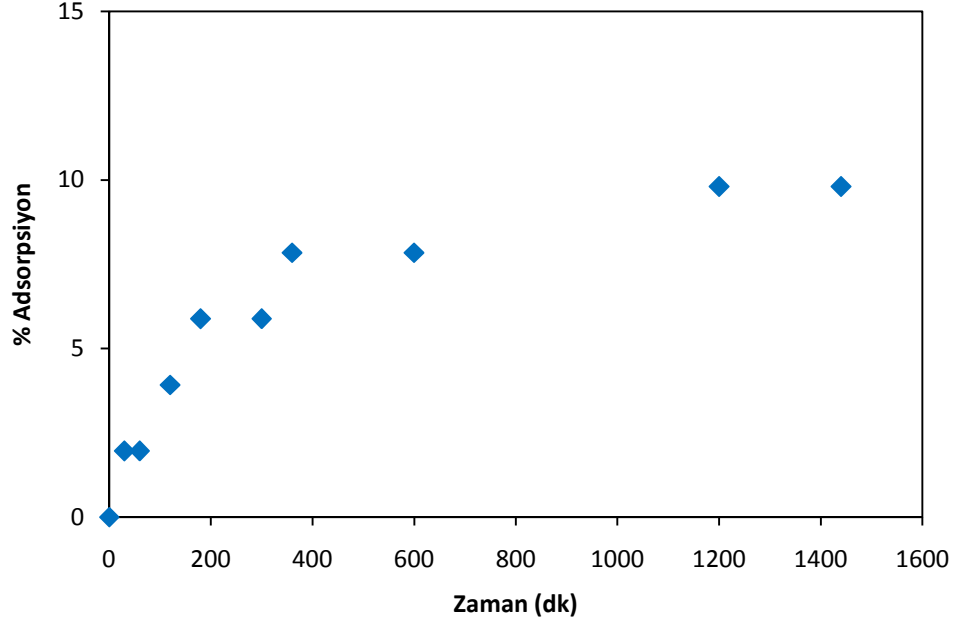
BSA'nın % adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.20'de ve 1 g adsorbanın adsorbladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.21'de gsterilmiştir.

Çizelge 7.8 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500-II)

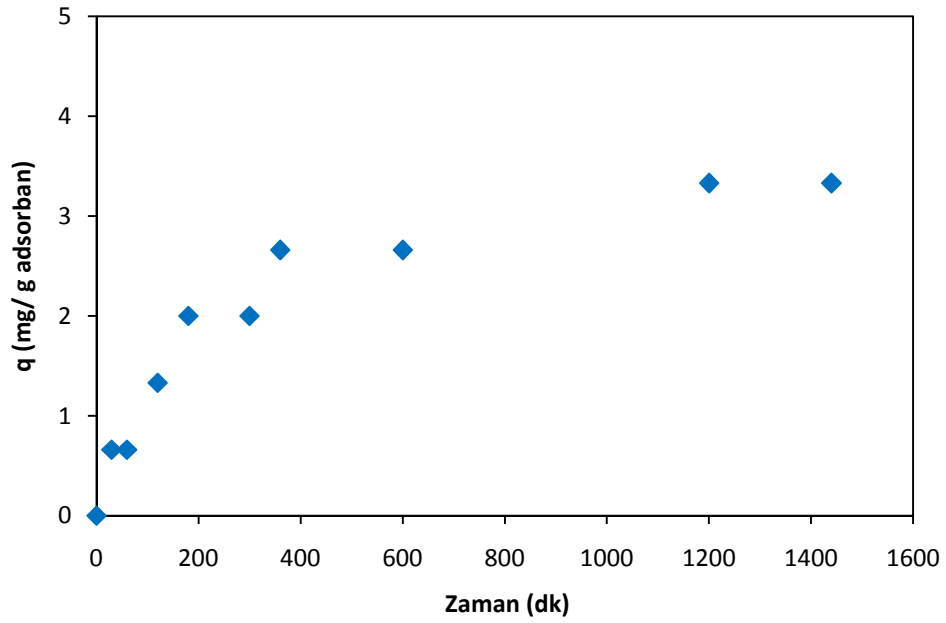
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorban)	Adsorpsiyon (%)
0	0.51	0.00	0.00
30	0.50	0.66	1.96
60	0.50	0.66	1.96
120	0.49	1.33	3.92
180	0.48	2.00	5.88
300	0.48	2.00	5.88
360	0.47	2.66	7.84
600	0.47	2.66	7.84
1200	0.46	3.33	9.80
1440	0.46	3.33	9.80



Şekil 7.19 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P7500-II)



Şekil 7.20 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500-II)



Şekil 7.21 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500-II)

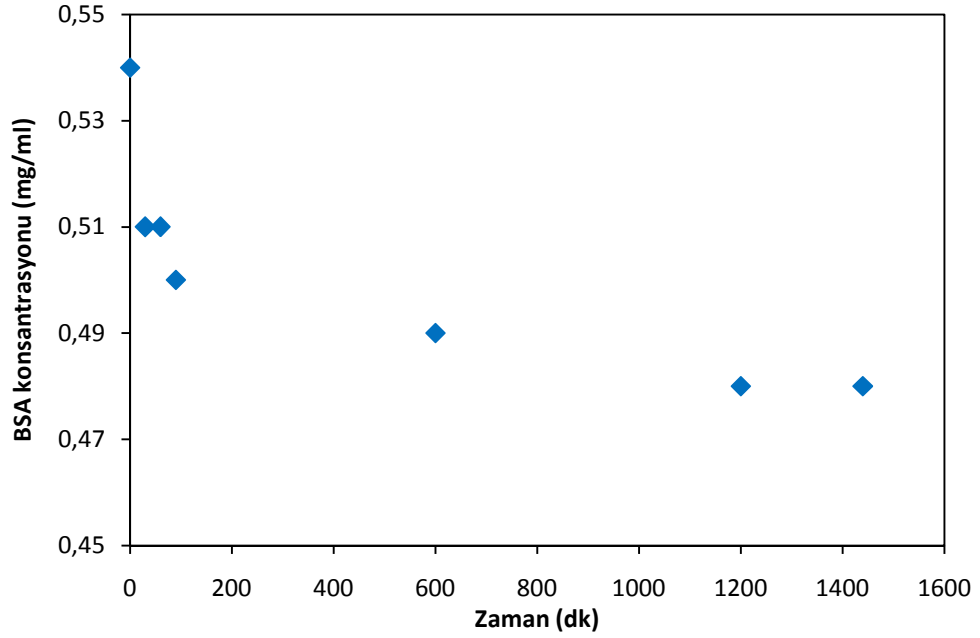
Şekil 7.19, Şekil 7.20 ve Şekil 7.21'den görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1200 dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

Adsorban olarak 650°C'de sinterlenmiş ve 15000 mg/mL polimer katkıli olarak elde edilen HAP (H-P15000) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.9'da verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.22'de,

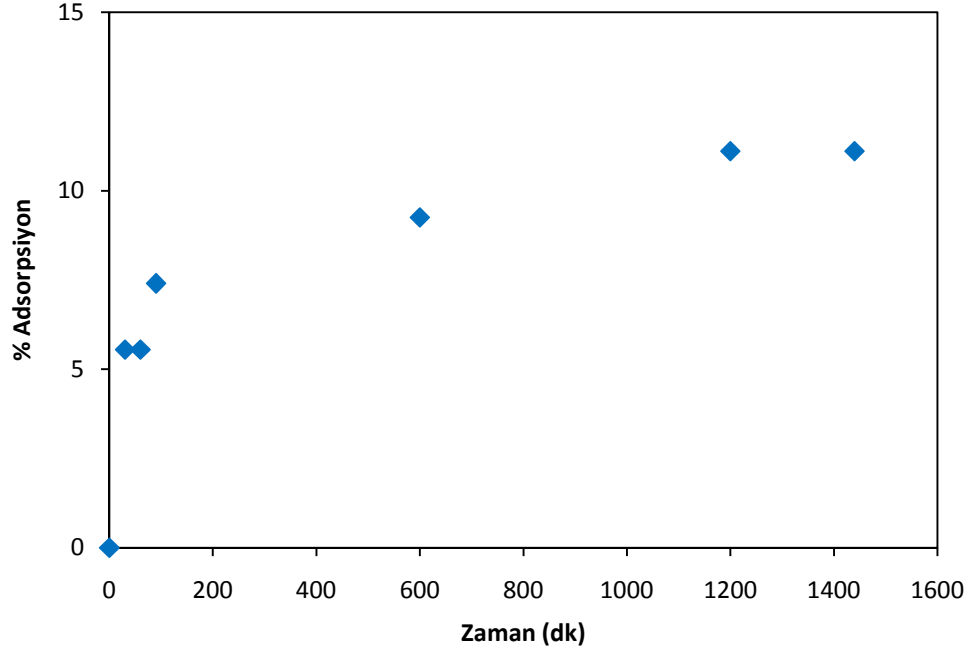
BSA'nın % adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.23'de ve 1 g adsorbanın adsorbladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.24'de gsterilmiştir.

Çizelge 7.9 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)

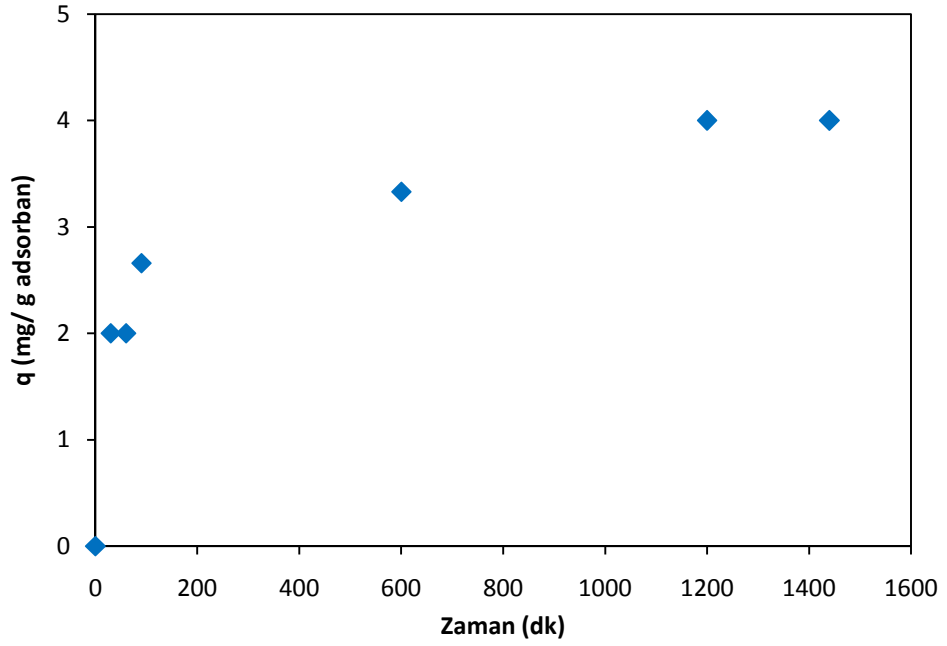
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorban)	Adsorpsiyon (%)
0	0.54	0.00	0.00
30	0.51	2.00	5.55
60	0.51	2.00	5.55
90	0.51	2.66	7.40
600	0.49	3.33	9.25
1200	0.48	4.00	11.11
1440	0.48	4.00	11.11



Şekil 7.22 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)



Şekil 7.23 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)



Şekil 7.24 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)

Şekil 7.22, Şekil 7.23 ve Şekil 7.24'den görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1200. dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

7.3 pH 6.0 Tampon Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Adsorpsiyon Deneyleri

7.3.1 BSA Proteini Kalibrasyon Grafiğinin Çizilmesi

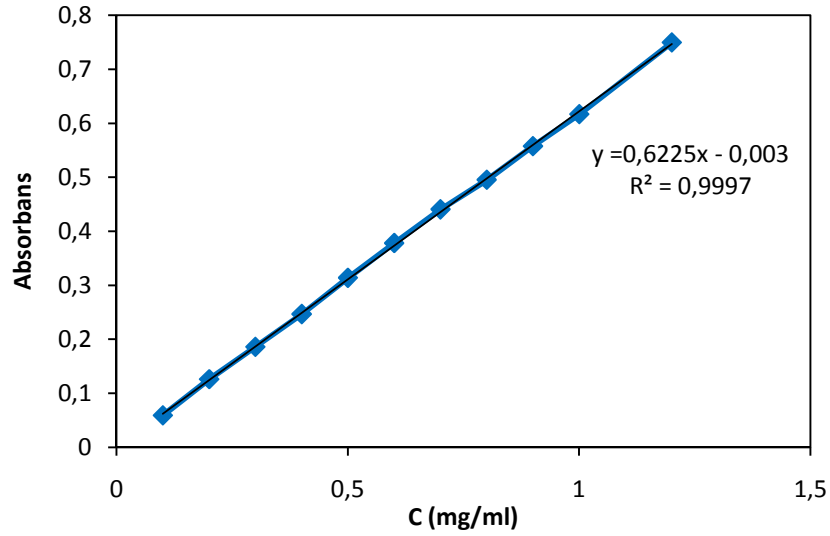
BSA proteinin kalibrasyon grafiğini çizebilmek için pH 6.0 tampon çözeltisi kullanılarak BSA stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan BSA stok çözeltisinden sırasıyla 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; 1.0 ve 1.2 mg/ml konsantrasyonlarında örnekler hazırlanmıştır. Referans olarak tampon çözelti kullanılarak 280 nm dalga boyunda hazırlanan çözeltilerin absorbans değerleri okunmuş ve BSA proteini konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri arasında bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 7.10'da, kalibrasyon grafiği ise Şekil 7.25'de verilmiştir. Çizilen grafikten doğrunun denklemi aşağıdaki gibi bulunur.

$$A_{280} = 0.6225 \cdot C_{BSA} \quad (R^2=0.9997) \quad (7.2)$$

Bu doğrunun eğiminden molar absorpsiyon katsayısı $0.6225 \text{ (L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 7.10 BSA protein çözeltisi için konsantrasyon değerleri ve bunlara karşılık gelen absorbans değerleri

C (mg/ml)	Abs ($\lambda=280 \text{ nm}$)
0.1	0.0588
0.2	0.1257
0.3	0.1856
0.4	0.2463
0.5	0.3135
0.6	0.3778
0.7	0.4403
0.8	0.4951
0.9	0.5574
1.0	0.6165
1.2	0.7493



Şekil 7.25 Kalibrasyon Grafiği (pH 6.0)

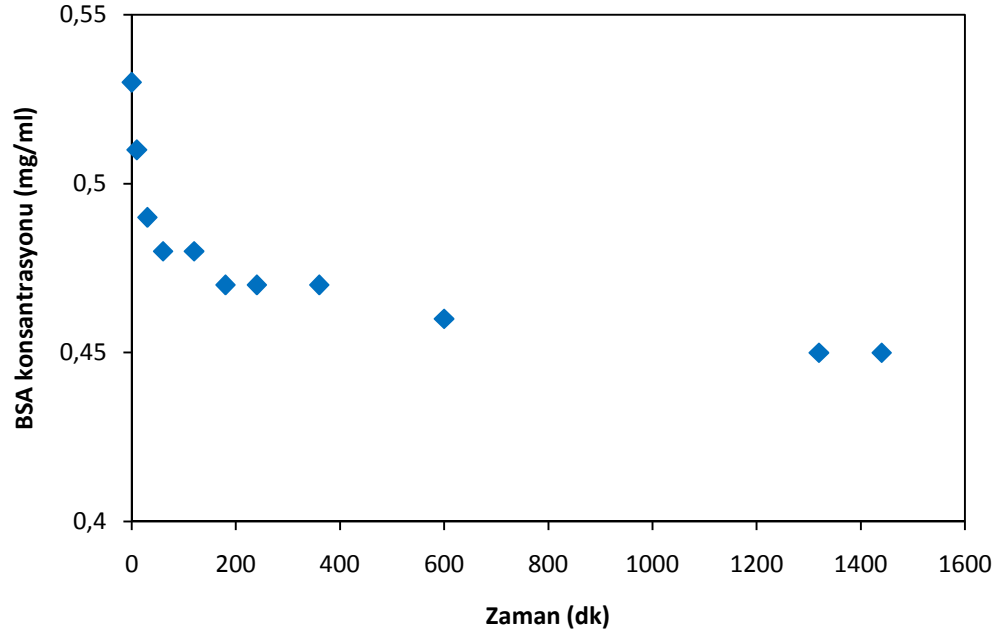
7.3.2 HAP Üzerine BSA Proteini Adsorpsiyonunun Etkisinin İncelenmesi

Farklı adsorbanların pH 6.0 ve 37°C’de BSA adsorpsiyonuna etkisinin incelendiği deneylerde, adsorban olarak kullanılan HAP numunelerinin özellikleri Çizelge 7.1’de verilmiştir.

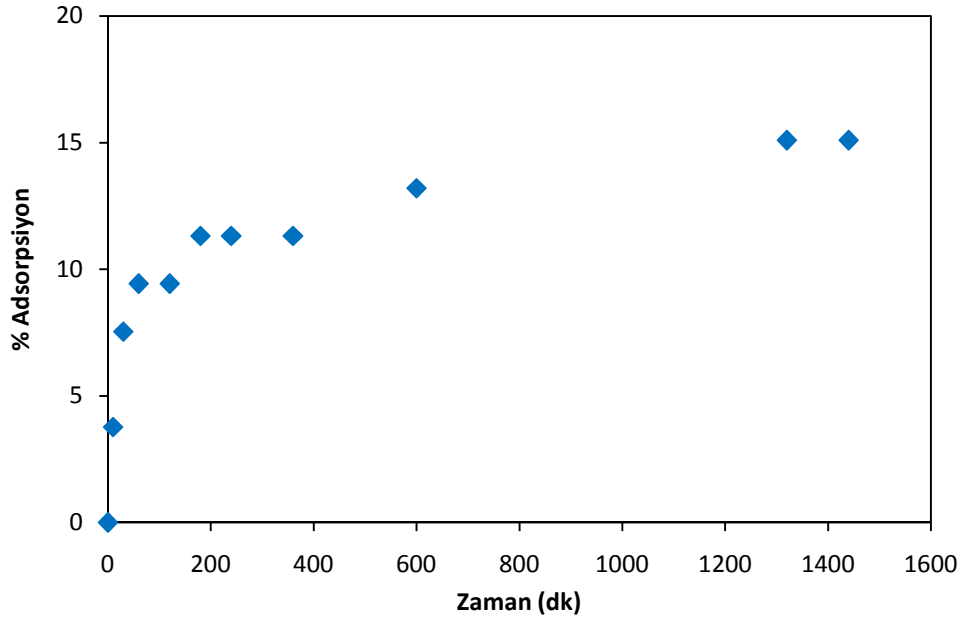
Adsorban olarak 70°C’de elde edilen saf sinterlenmemiş HAP (H-70) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.11’de verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.26’da, BSA’nın % adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.27’de ve 1 g adsorbanın adsorbladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.28’de gösterilmiştir.

Çizelge 7.11 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-70)

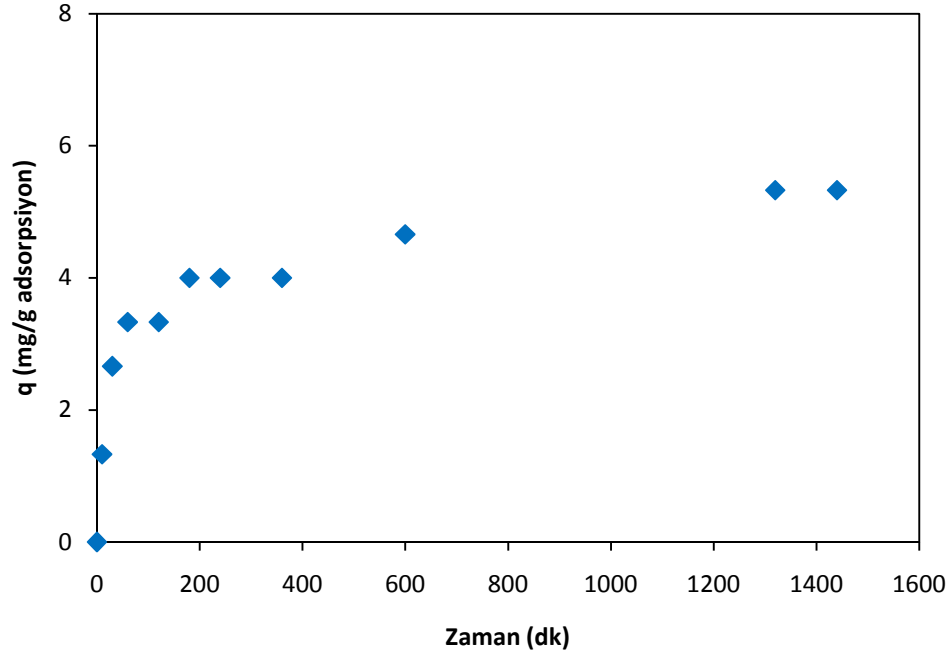
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorban)	Adsorpsiyon (%)
0	0.53	0.00	0.00
10	0.51	1.33	3.77
30	0.49	2.66	7.54
60	0.48	3.33	9.43
120	0.48	3.33	9.43
180	0.47	4.00	11.32
240	0.47	4.00	11.32
360	0.47	4.00	11.32
600	0.46	4.66	13.20
1320	0.45	5.33	15.09
1440	0.45	5.33	15.09



Şekil 7.26 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-70)



Şekil 7.27 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-70)



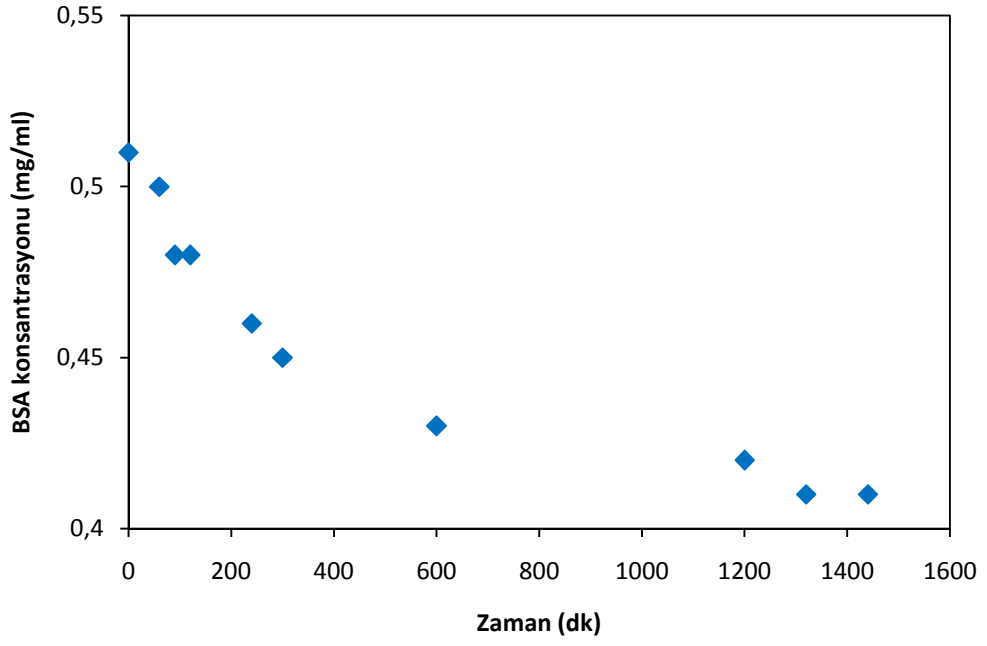
Şekil 7.28 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-70)

Şekil 7.26, Şekil 7.27 ve Şekil 7.28'den görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1320 dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

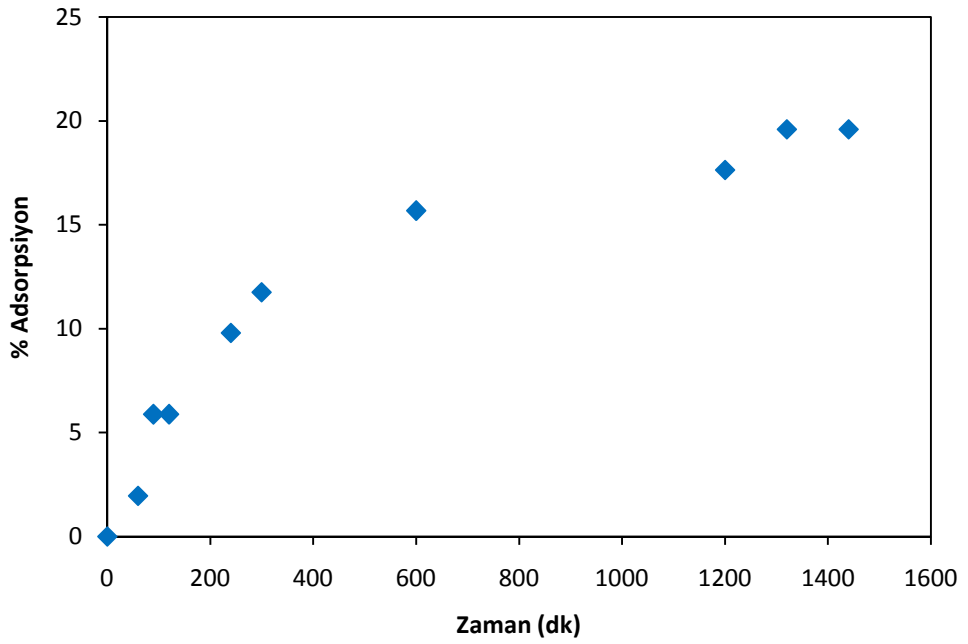
Adsorban olarak 50°C'de elde edilen saf sinterlenmemiş HAP (H-50) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.12'de verilmiştir. Çözeltildeki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.29'da, BSA'nın % adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.30'da ve 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.31'de gösterilmiştir.

Çizelge 7.12 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-50)

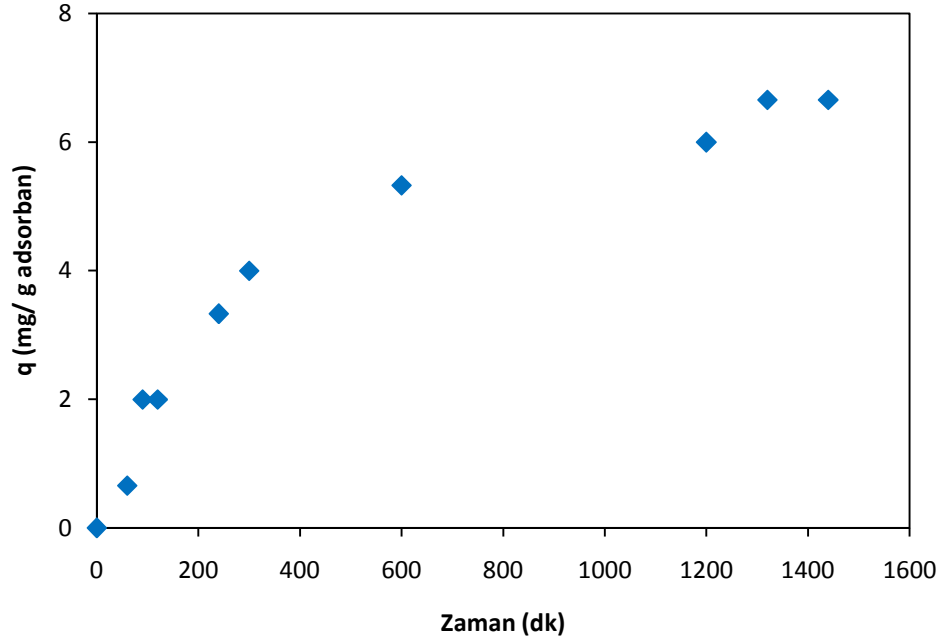
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorban)	Adsorpsiyon (%)
0	0.51	0.00	0.00
60	0.50	0.66	1.96
90	0.48	2.00	5.88
120	0.48	2.00	5.88
240	0.46	3.33	9.80
300	0.45	4.00	11.76
600	0.43	5.33	15.68
1200	0.42	6.00	17.64
1320	0.41	6.66	19.60
1440	0.41	6.66	19.60



Şekil 7.29 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-50)



Şekil 7.30 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-50)



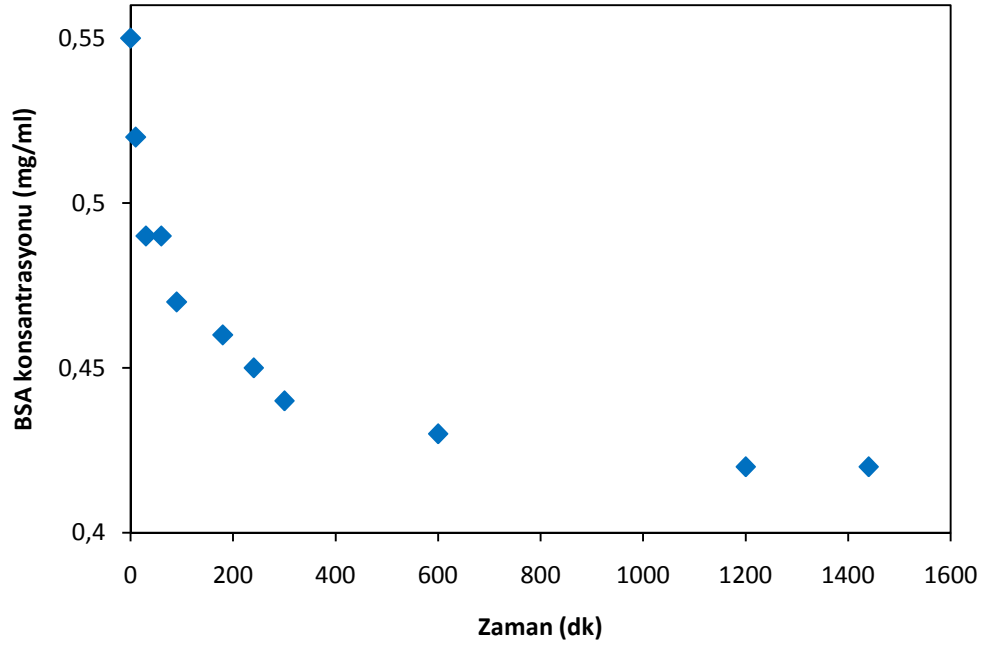
Şekil 7.31 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-50)

Şekil 7.29, Şekil 7.30 ve Şekil 7.31'den görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1320. dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

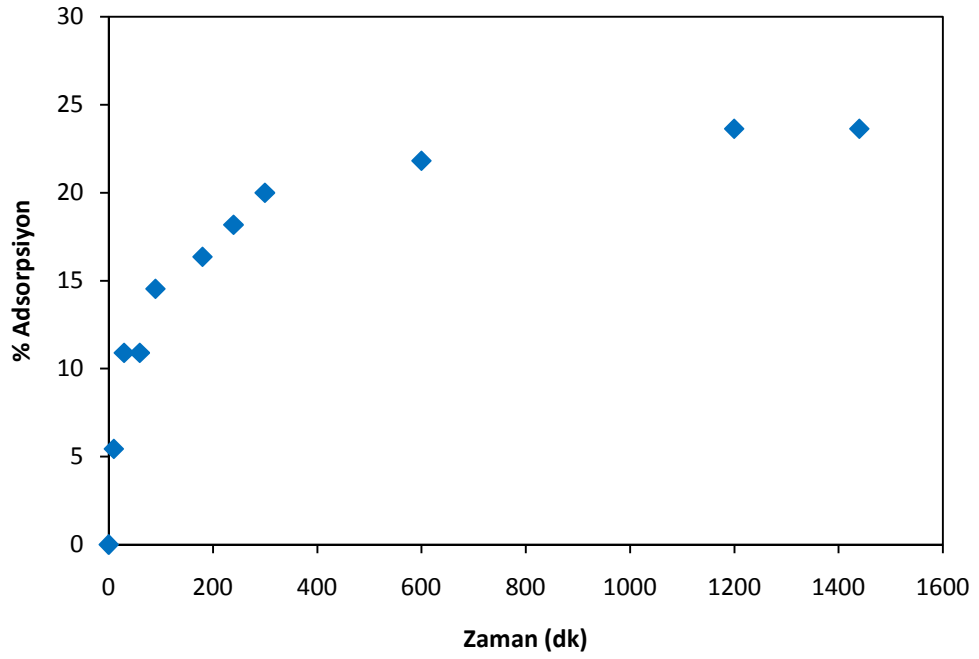
Adsorban olarak 25°C'de elde edilen saf sinterlenmemiş HAP (H-25) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.13'de verilmiştir. Çözültedeki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.32'de, BSA'nın % adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.33'de ve 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.34'de gösterilmiştir.

Çizelge 7.13 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-25)

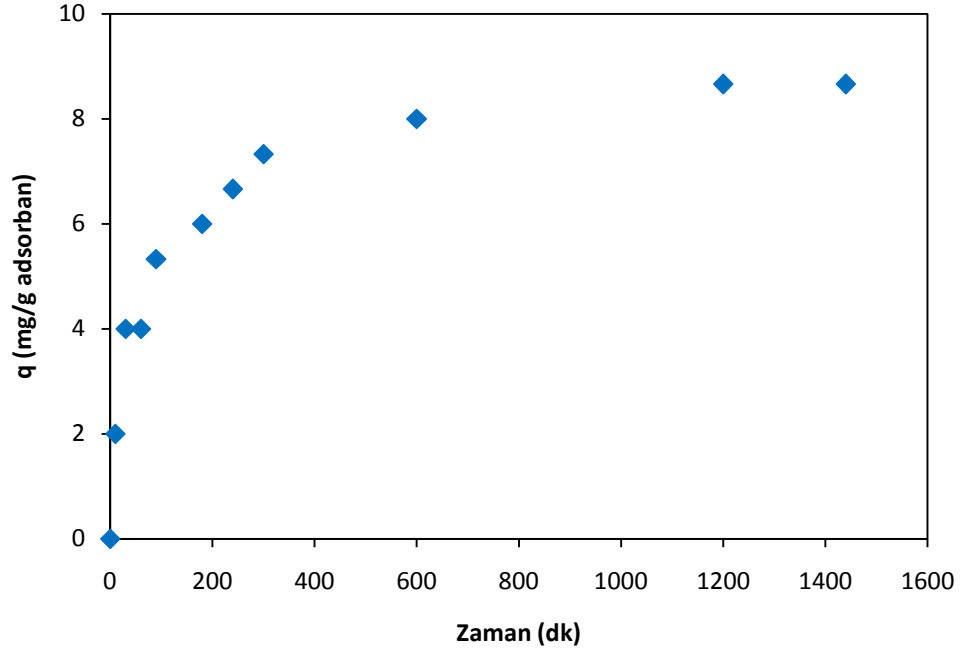
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorbent)	Adsorpsiyon (%)
0	0.55	0.00	0.00
10	0.52	2.00	5.45
30	0.49	4.00	10.90
60	0.49	4.00	10.90
90	0.47	5.33	14.54
180	0.46	6.00	16.36
240	0.45	6.66	18.18
300	0.44	7.33	20.00
600	0.43	8.00	21.81
1200	0.42	8.66	23.63
1440	0.42	8.66	23.63



Şekil 7.32 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-25)



Şekil 7.33 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-25)



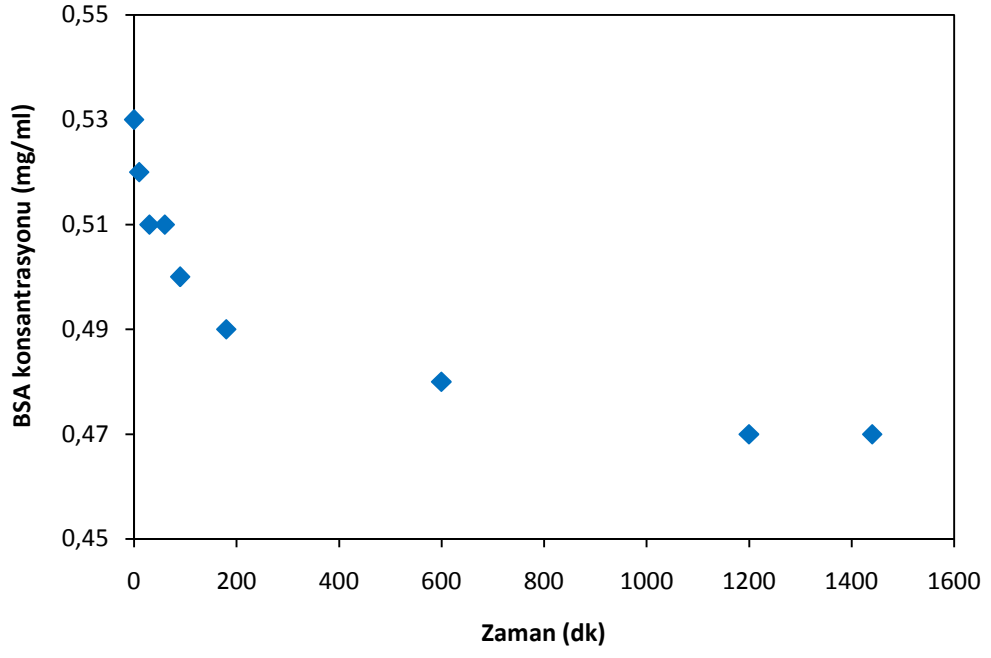
Şekil 7.34 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-25)

Şekil 7.32, Şekil 7.33 ve Şekil 7.34'den görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1200 dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

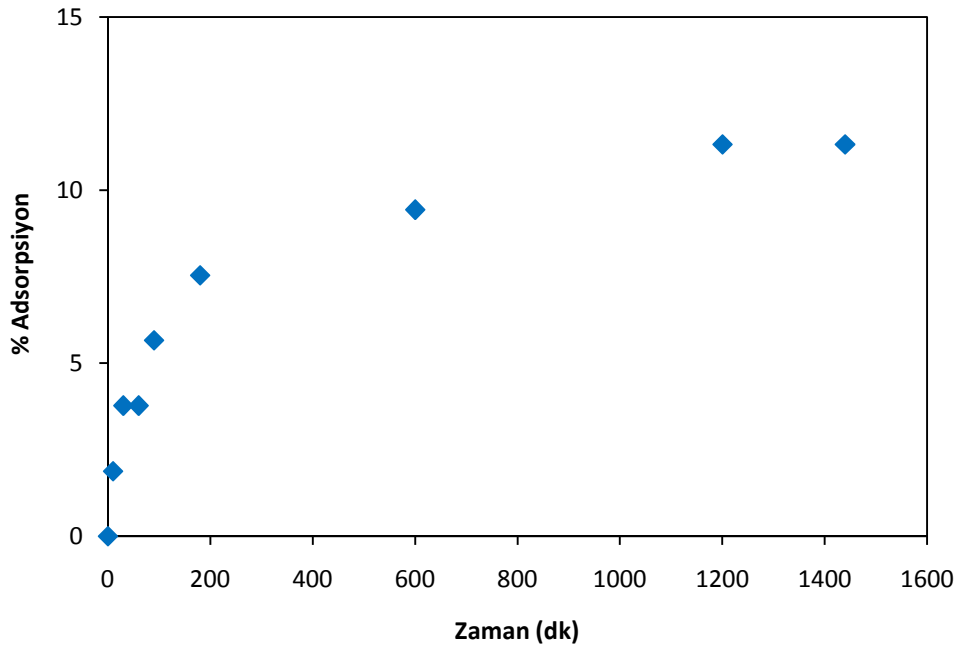
Adsorban olarak 650°C'de sinterlenmiş ve saf olarak elde edilen HAP (H-S) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.14'de verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.35'de, BSA'nın %adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.36'da ve 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.37'de gösterilmiştir.

Çizelge 7.14 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)

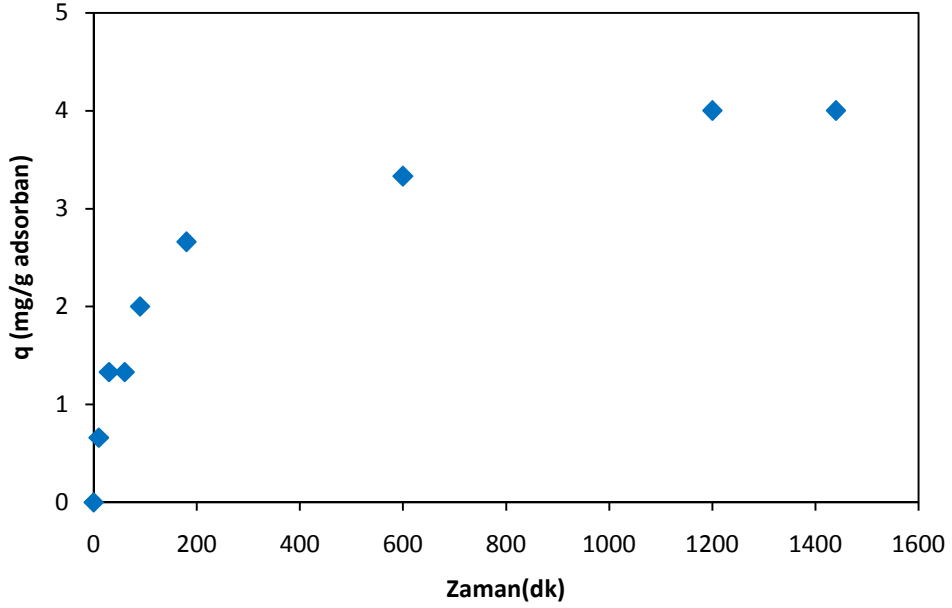
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorbent)	Adsorpsiyon (%)
0	0.53	0.00	0.00
10	0.52	0.66	1.88
30	0.51	1.33	3.77
60	0.51	1.33	3.77
90	0.50	2.00	5.66
180	0.49	2.66	7.54
600	0.48	3.33	9.43
1200	0.47	4.00	11.32
1440	0.47	4.00	11.32



Şekil 7.35 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-S)



Şekil 7.36 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)



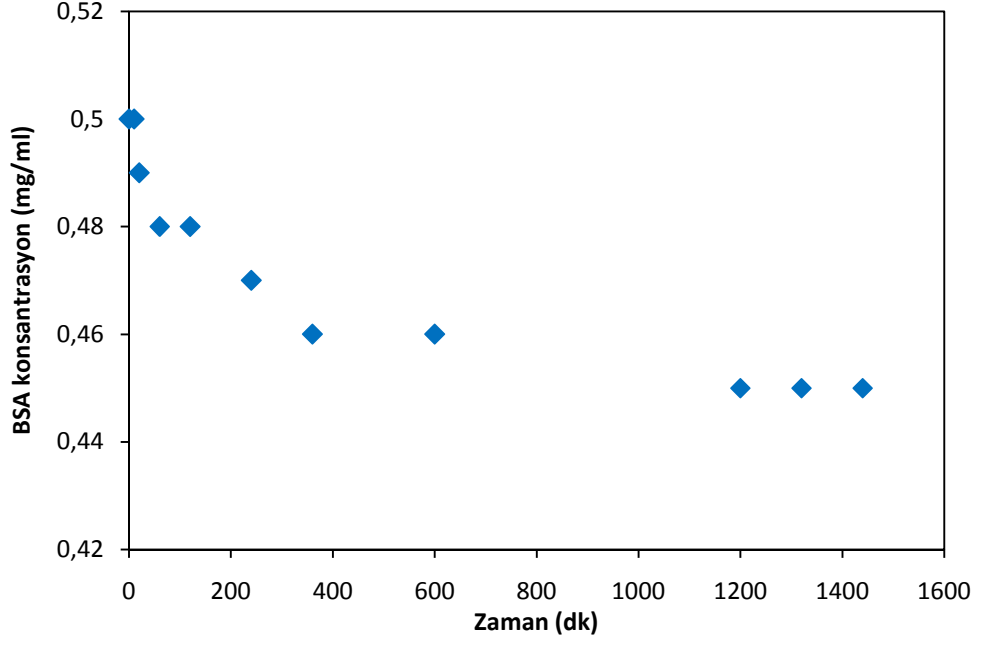
Şekil 7.37 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-S)

Şekil 7.35, Şekil 7.36 ve Şekil 7.37'den görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1200. dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

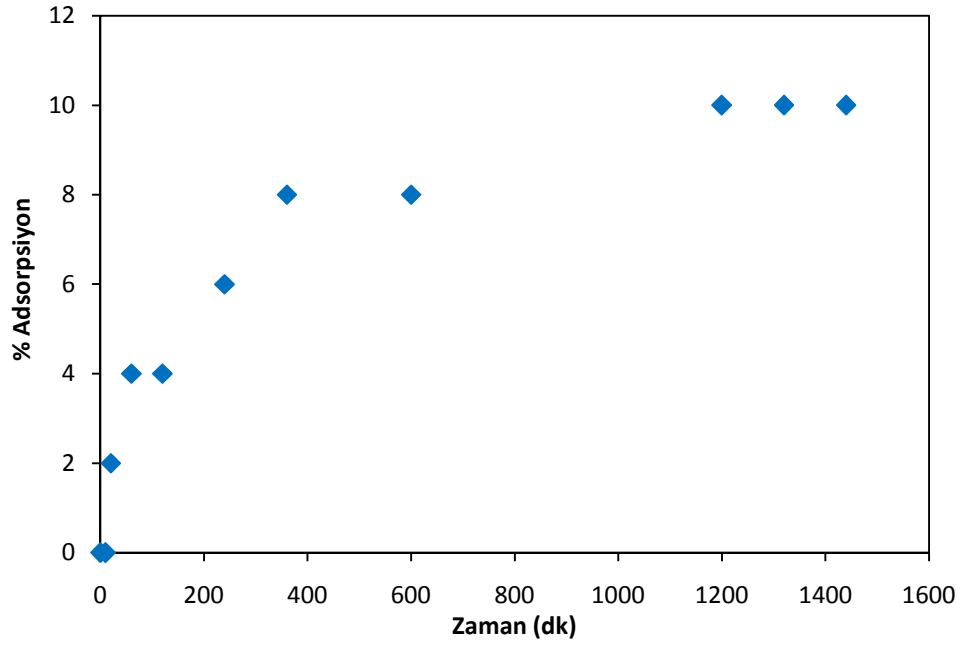
Adsorban olarak 650°C'de sinterlenmiş ve 7500 mg/mL polimer katkılı olarak elde edilen HAP (H-P7500) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.15'de verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.38'de, BSA'nın % adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.39'da ve 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.40'da gösterilmiştir.

Çizelge 7.15 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)

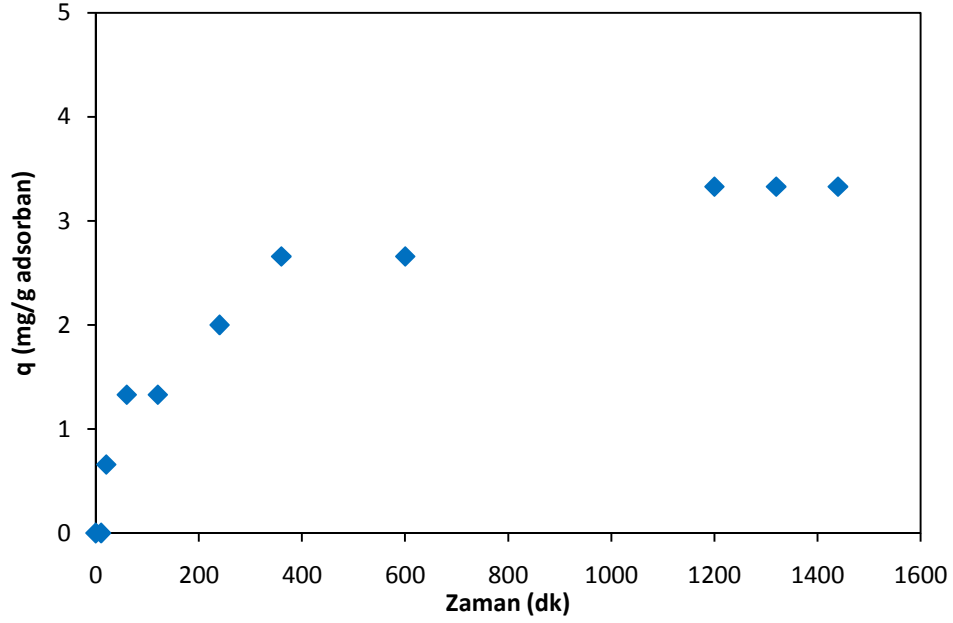
Zaman (dk)	BSA konsantrasyonu (mg/ml)	q (mg/g adsorbent)	Adsorpsiyon (%)
0	0.50	0.00	0.00
10	0.50	0.00	0.00
20	0.49	0.66	2.00
60	0.48	1.33	4.00
120	0.48	1.33	4.00
240	0.47	2.00	6.00
360	0.46	2.66	8.00
600	0.46	2.66	8.00
1200	0.45	3.33	10.00
1320	0.45	3.33	10.00
1440	0.45	3.33	10.00



Şekil 7.38 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)



Şekil 7.39 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)



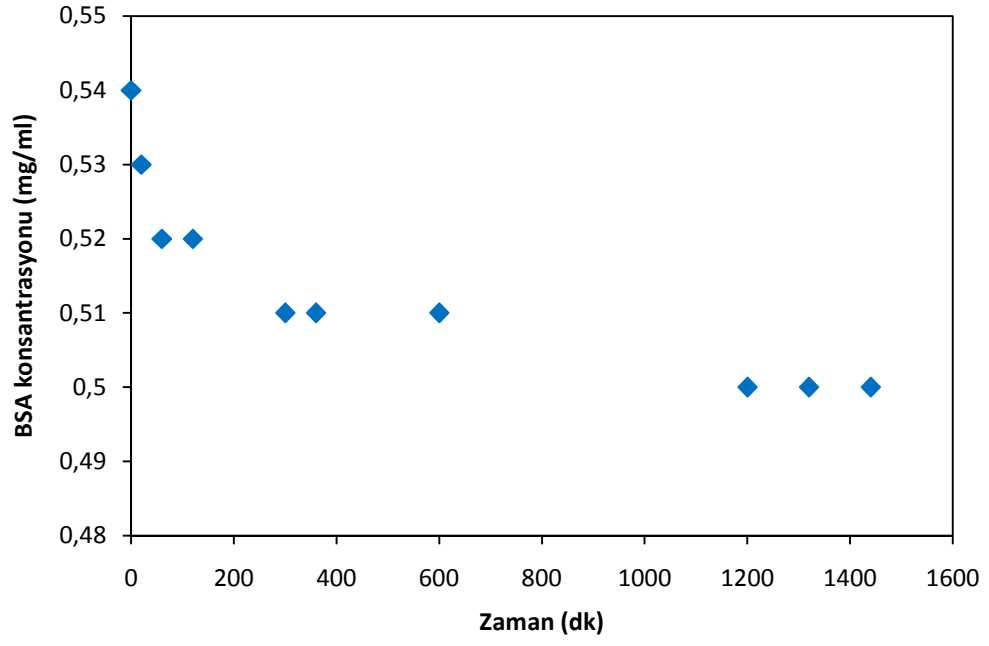
Şekil 7.40 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P7500)

Şekil 7.38, Şekil 7.39 ve Şekil 7.40'dan görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1200. dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

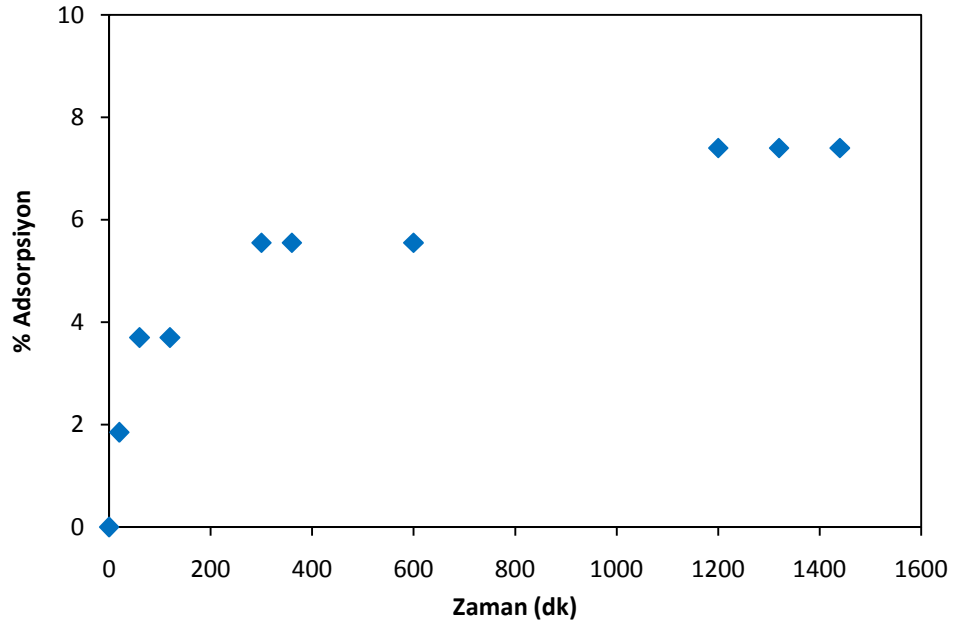
Adsorban olarak 650°C'de sinterlenmiş ve 15000 mg/mL polimer katkı olarak elde edilen HAP (H-P15000) kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.16'da verilmiştir. Çözeltideki BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 7.41'de, BSA'nın %adsorpsiyonunun zamanla değişimi Şekil 7.42'de ve 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi ise Şekil 7.43'de gösterilmiştir.

Çizelge 7.16 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarlarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)

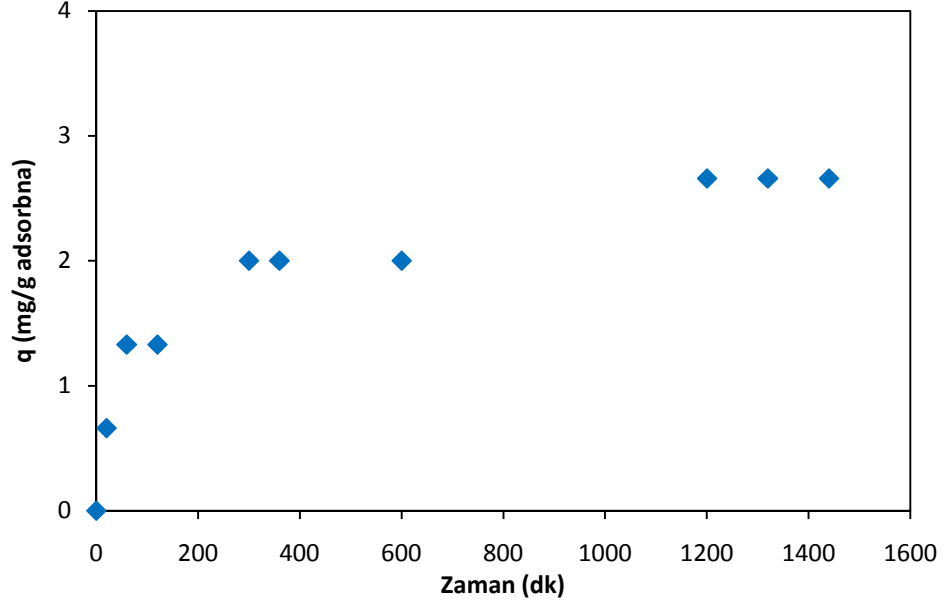
Zaman (dk)	BSA konsantrasyon (mg/ml)	q (mg/g adsorbent)	Adsorpsiyon (%)
0	0.54	0.00	0.00
20	0.53	0.66	1.85
60	0.52	1.33	3.70
120	0.52	1.33	3.70
300	0.51	2.00	5.55
360	0.51	2.00	5.55
600	0.51	2.00	5.55
1200	0.50	2.66	7.40
1320	0.50	2.66	7.40
1440	0.50	2.66	7.40



Şekil 7.41 BSA konsantrasyonunun zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)



Şekil 7.42 Adsorpsiyon miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)

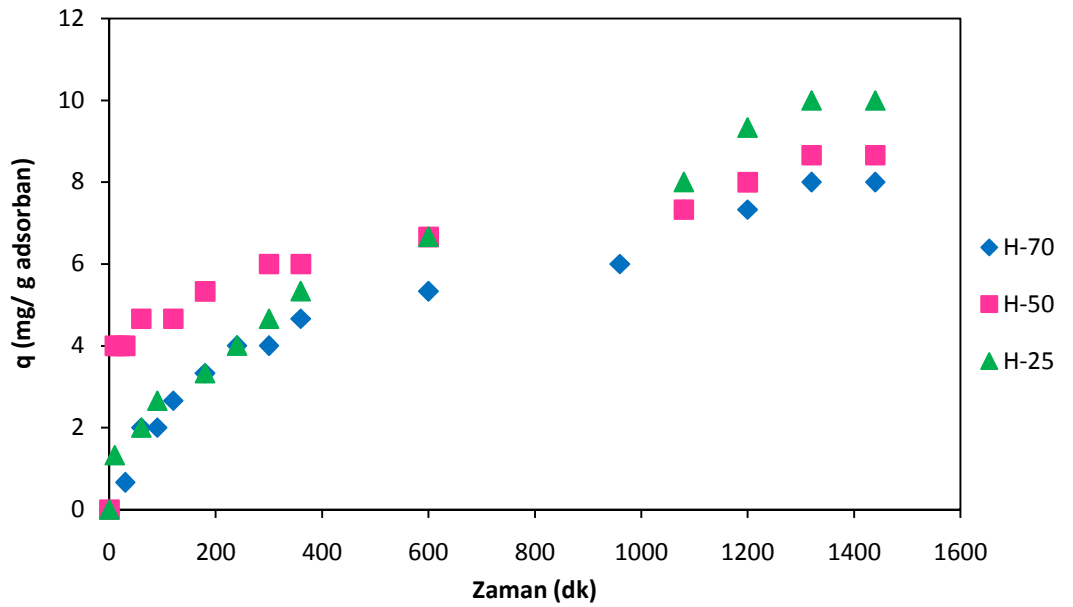


Şekil 7.43 1 g adsorbanın adsorpladığı BSA miktarının zamanla değişimi (adsorban: H-P15000)

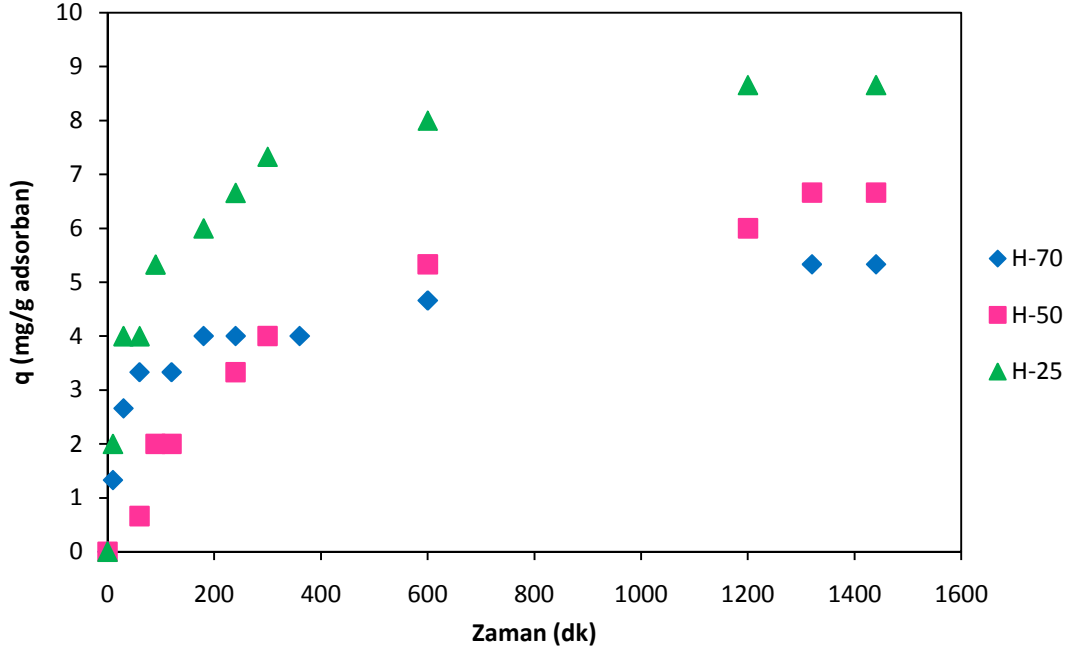
Şekil 7.41, Şekil 7.42 ve Şekil 7.43'den görüldüğü gibi adsorpsiyonun yaklaşık 1200. dakikada dengeye ulaştığı tespit edilmiştir.

7.4 HAP Üretim Sıcaklığının Adsorpsiyona Etkisi

Farklı sıcaklıklarda üretilmiş sintersiz adsorbanların üretim sıcaklığının BSA adsorpsiyonuna etkisi pH 7.4'da gerçekleştirilen deneyler için Şekil 7.44'de; pH 6.0'de gerçekleştirilen deneyler için ise Şekil 7.45'de gösterilmiştir.



Şekil 7.44 Adsorban üretim sıcaklığının pH 7.4'de BSA adsorpsiyonuna etkisi

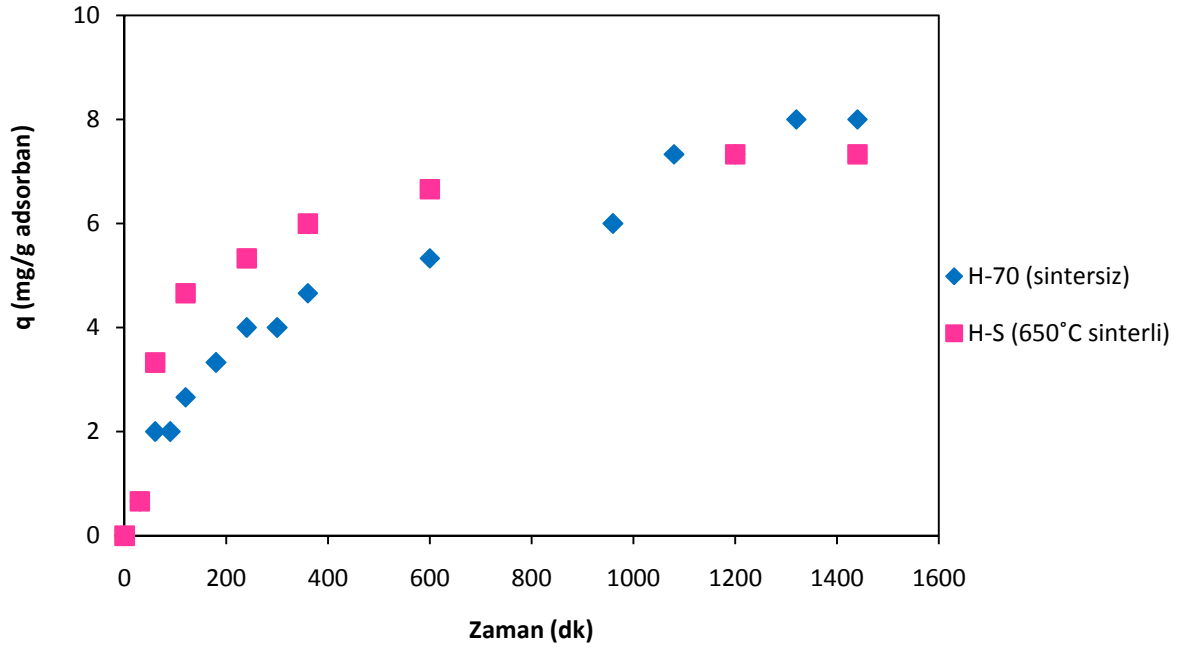


Şekil 7.45 Adsorban üretim sıcaklığının pH 6.0'da BSA adsorpsiyonuna etkisi

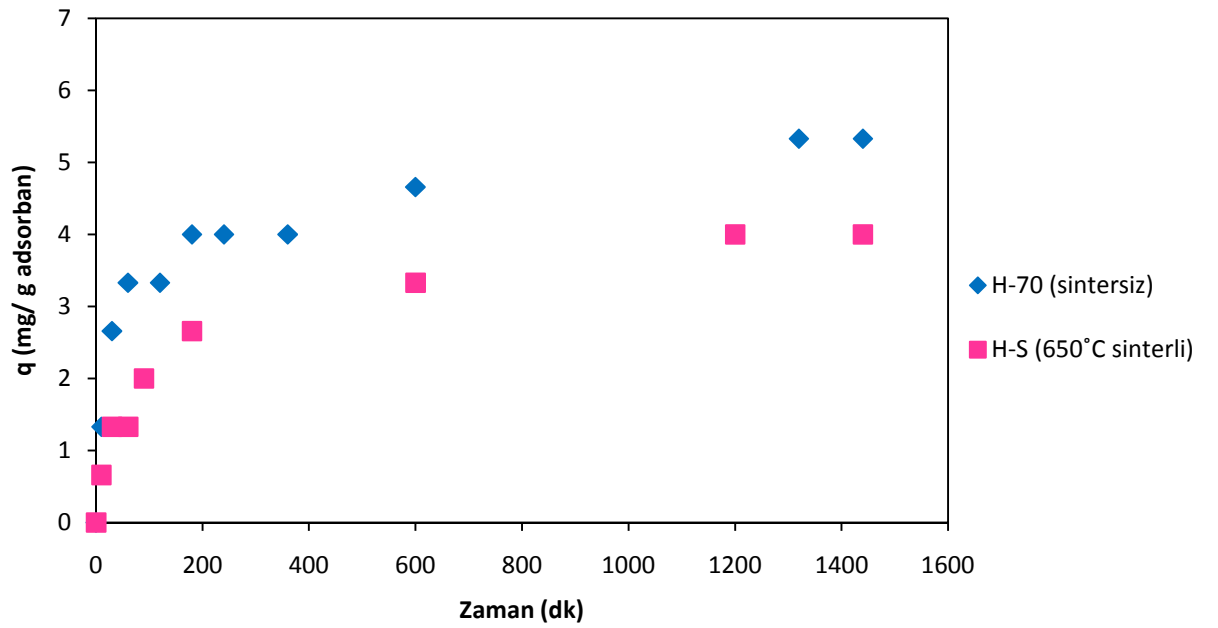
Adsorbanların üretim sıcaklığının adsorpsiyon kapasitesini etkilediği görülmüştür. pH 7.4 ve pH 6.0'da gerçekleştirilen deneylerde adsorpsiyon kapasitesinin 70°C'de üretilen adsorbanda en düşük; 25°C'de üretilen adsorbanda ise en yüksek olduğu gözlenmiştir.

7.5 HAP Sinterleme Sıcaklığının Adsorpsiyona Etkisi

Katkı maddesi olmadan üretilmiş sintersiz (H-70) ve 650°C'de sinterlenmiş (H-S) adsorbanları ile yapılan adsorpsiyon deneylerinde sinterleme sıcaklığının BSA adsorpsiyonuna etkisi pH 7.4'de gerçekleştirilen deneyler için Şekil 7.46'da; pH 6.0'da gerçekleştirilen deneyler için ise Şekil 7.47'de gösterilmiştir.

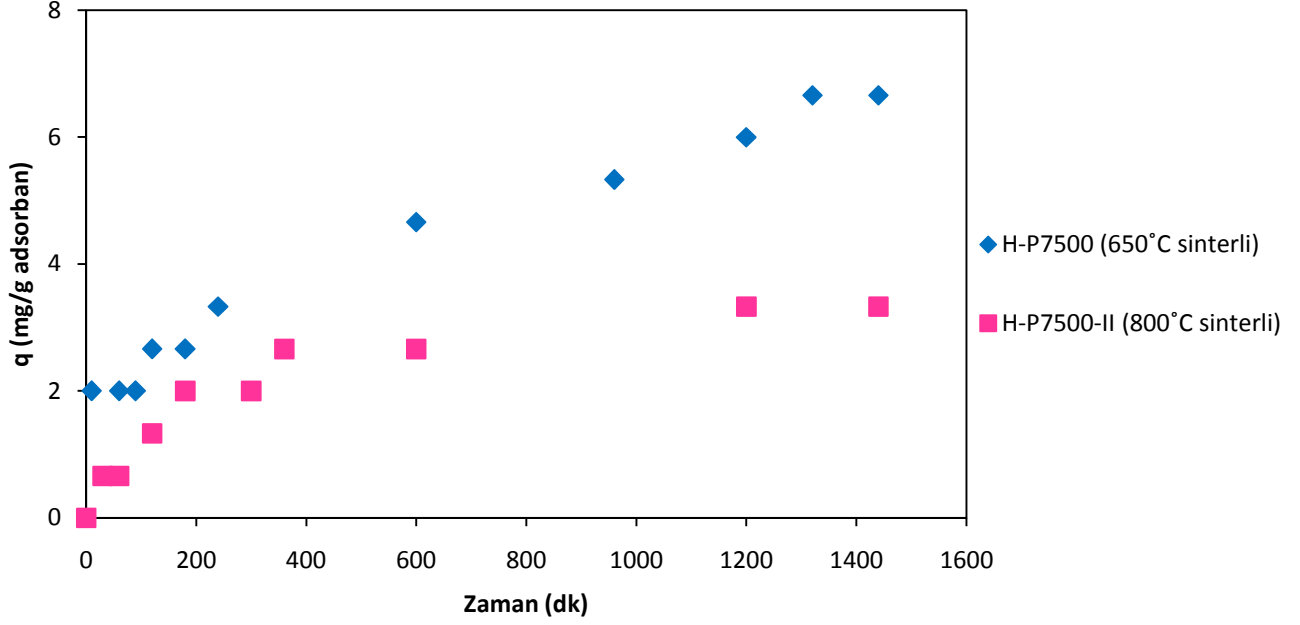


Şekil 7.46 Sinterleme sıcaklığının pH 7.4’de BSA adsorpsiyonuna etkisi



Şekil 7.47 Sinterleme sıcaklığının pH 6.0’da BSA adsorpsiyonuna etkisi

Sinterleme sıcaklığının BSA adsorpsiyonuna etkisi 650°C ve 800°C’de sinterlenmiş H-P7500 ve H-P7500-II adsorbanları ile pH 7.4’de gerçekleştirilen adsorpsiyon deneyleri için Şekil 7.48’de gösterilmiştir.



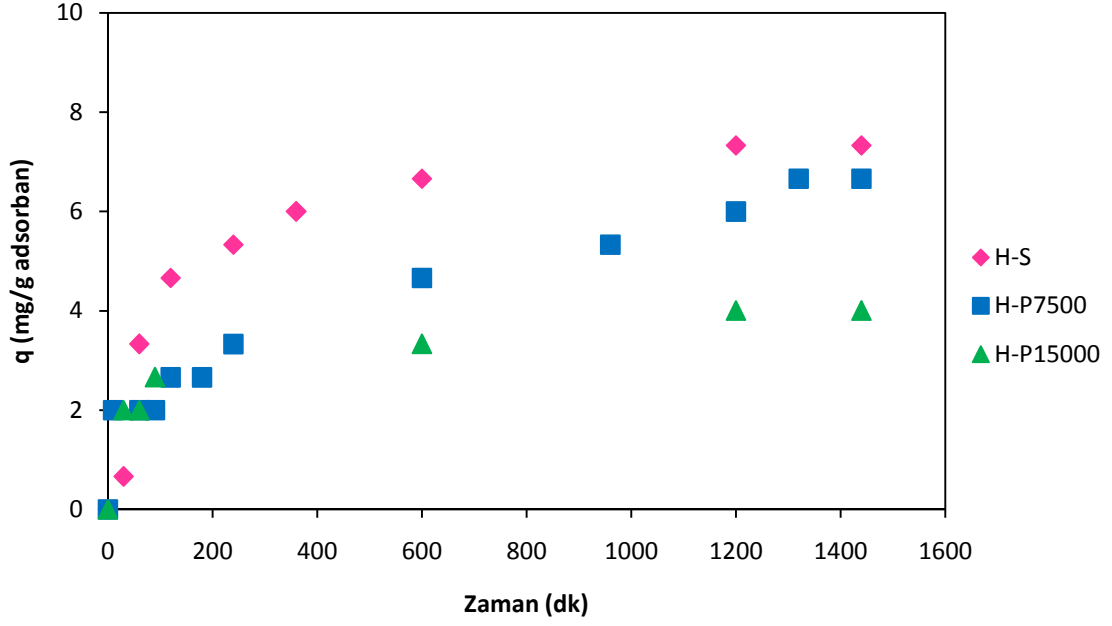
Şekil 7.48 Sinterleme sıcaklığının pH 7.4’de BSA adsorpsiyonuna etkisi

Sinterleme sıcaklığının artırılması adsorbanların spesifik yüzey alanlarında azalmaya neden olduğu için Şekil 7.46, Şekil 7.47 ve Şekil 7.48’den görüldüğü gibi adsorbanın adsorpsiyon kapasitesini düşürmüştür.

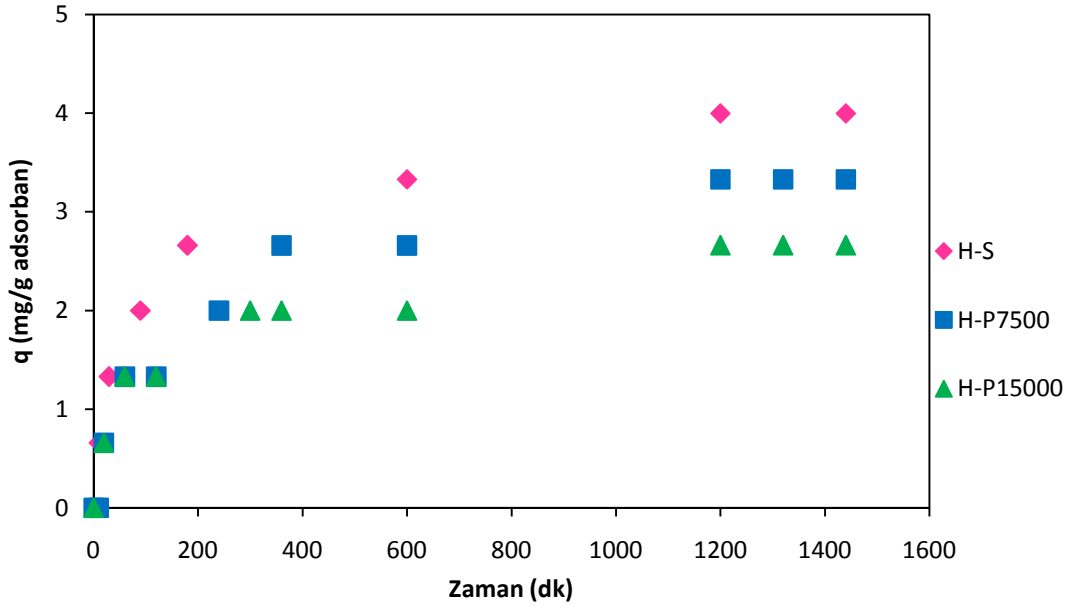
7.6 HAP Üretiminde Kullanılan Katkı Maddesi Konsantrasyonunun Adsorpsiyona Etkisi

Polimer varlığında üretilmiş ve sinterlenmiş adsorbanlar ile gerçekleştirilen adsorpsiyon deneylerinde endüstriyel polimer konsantrasyonunun BSA adsorpsiyonuna etkisi pH 7.4’de gerçekleştirilen deneyler için Şekil 7.49’da; pH 6.0’de gerçekleştirilen deneyler için ise Şekil 7.50’de gösterilmiştir.

Polimerik katkı maddesi varlığında üretilen adsorbanların sinterleme işlemi sonrasında polimerin uzaklaştırılması sonucu spesifik yüzey alanları azalmıştır. Polimer konsantrasyonu arttıkça sinterleme sonrasında spesifik yüzey alanlarındaki düşüş artmıştır. Bu nedenle adsorbanların üretimi esnasında katkı maddesi olarak kullanılan polimer konsantrasyonu artması adsorpsiyon kapasitesini düşürmüştür.



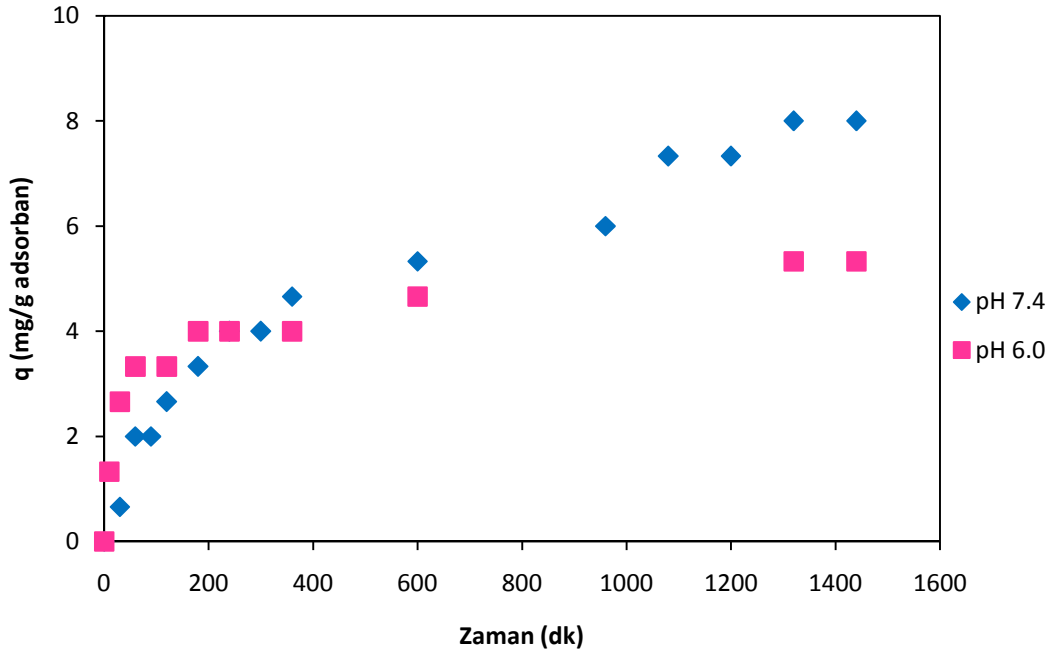
Şekil 7.49 Katkı maddesi konsantrasyonunun pH 7.4’de BSA adsorpsiyonuna etkisi



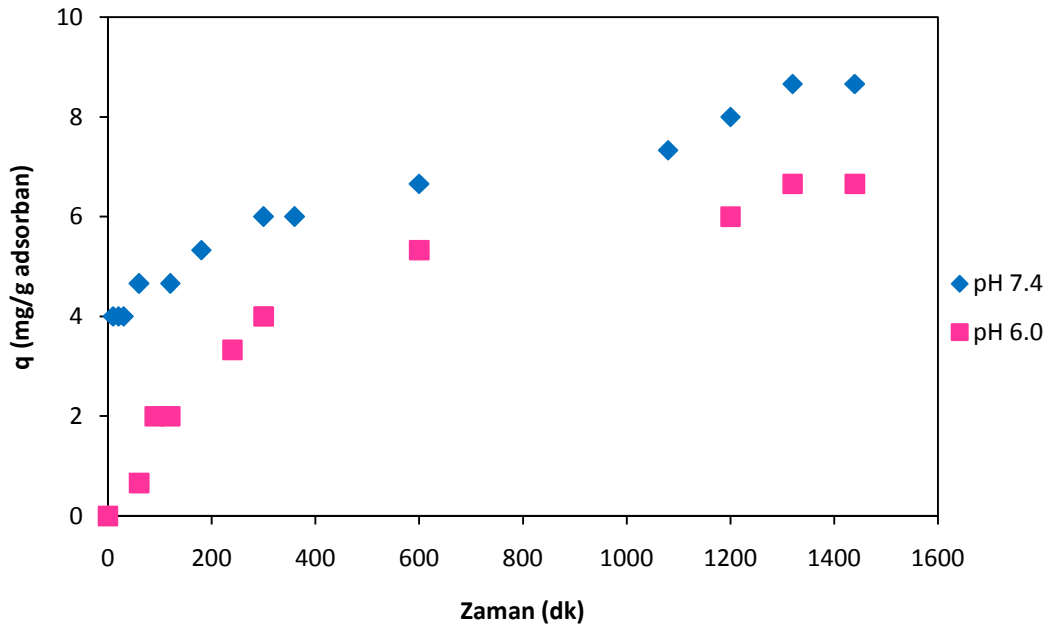
Şekil 7.50 Katkı maddesi konsantrasyonunun pH 6.0’da BSA adsorpsiyonuna etkisi

7.7 pH’ın Adsorpsiyona Etkisi

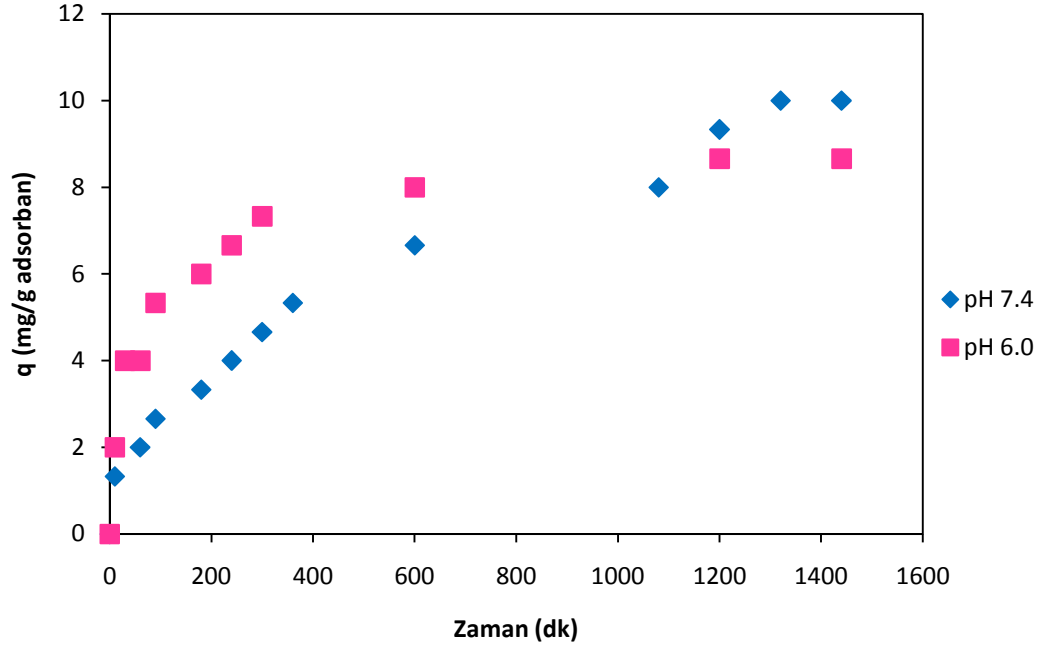
Çözelti pH’nın BSA adsorpsiyonuna etkisinin incelendiği deneylerde adsorbanların 1 gramının adsorpladığı BSA miktarları Şekil 7.51, Şekil 7.52, Şekil 7.53, Şekil 7.54, Şekil 7.55 ve 7.56’da gösterilmiştir.



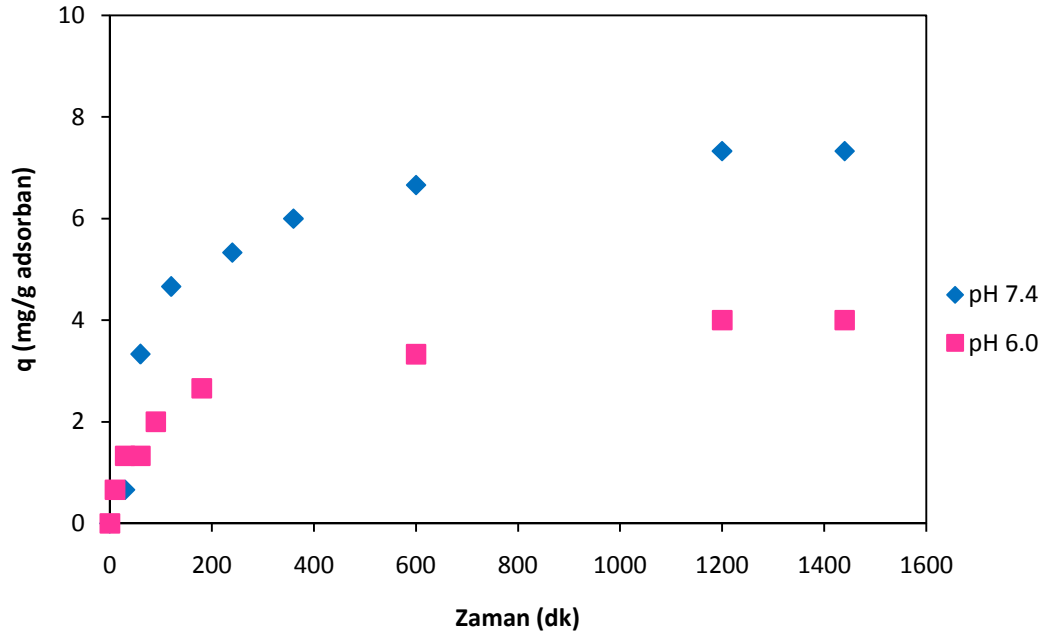
Şekil 7.51 Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-70)



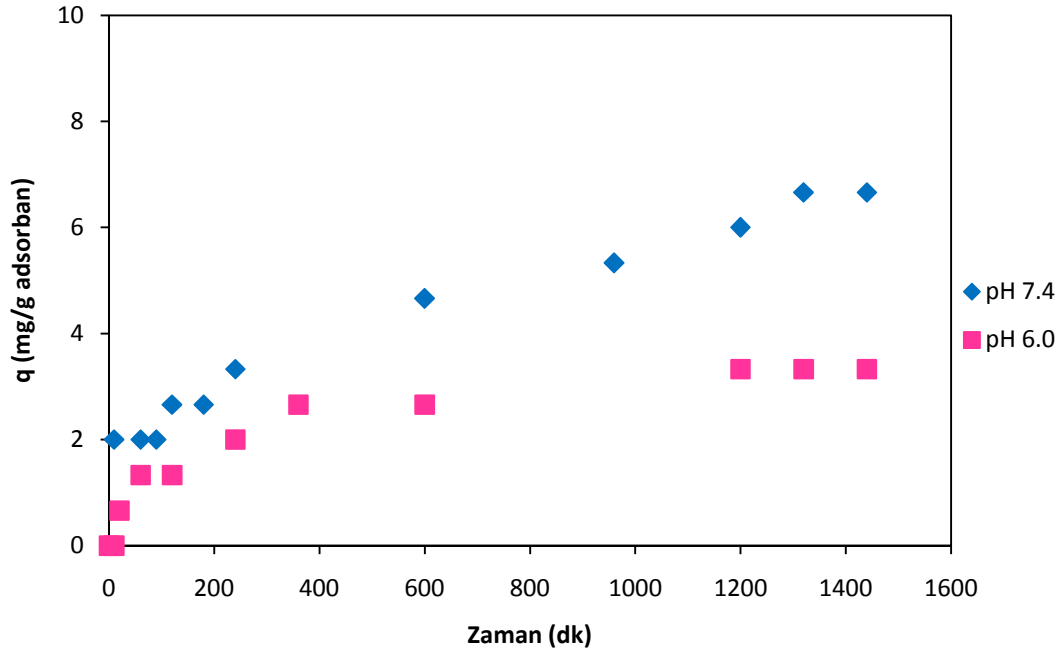
Şekil 7.52 Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-50)



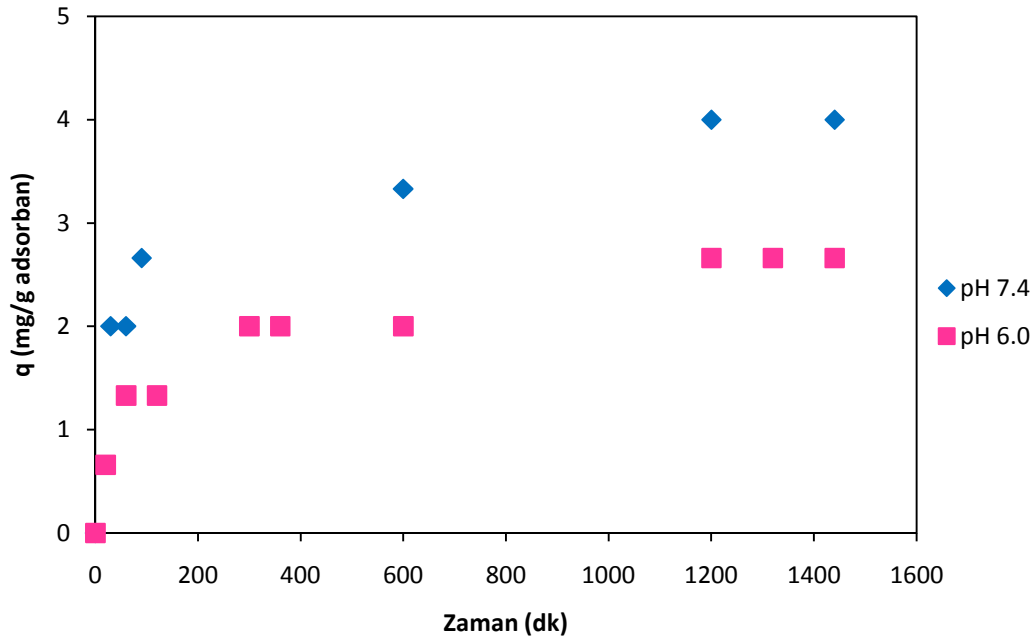
Şekil 7.53 Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-25)



Şekil 7.54 Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-S)



Şekil 7.55 Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-P7500)



Şekil 7.56 Çözelti pH'nın BSA adsorpsiyonuna etkisi (adsorban: H-P15000)

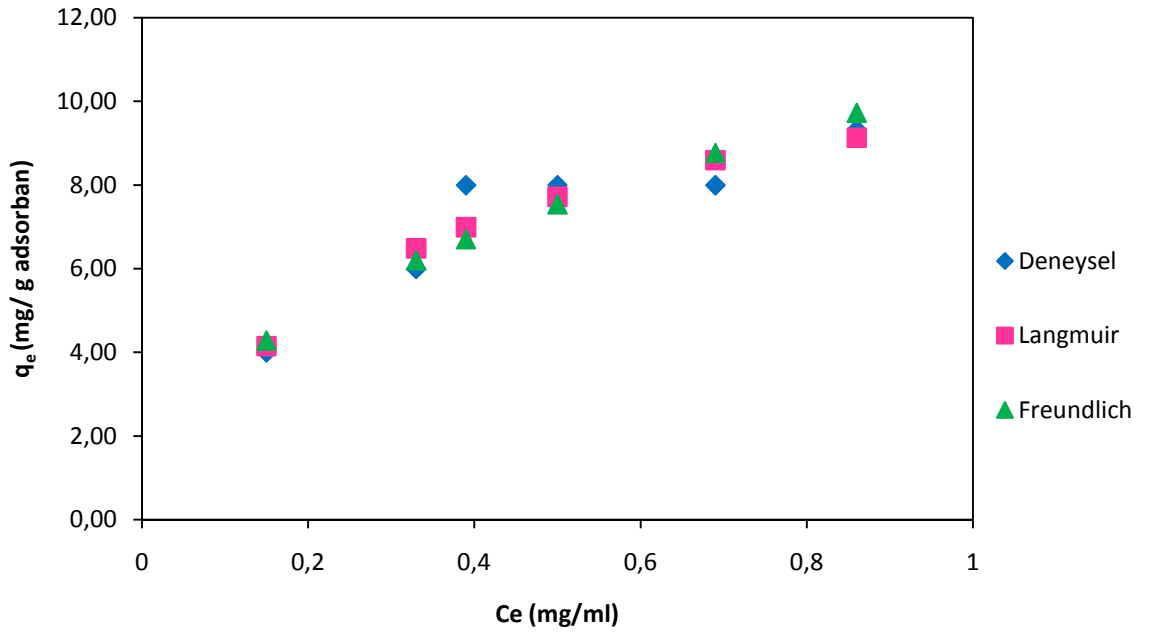
Grafiklerde görüldüğü gibi deneylerde kullanılan adsorbanların hepsi ile gerçekleştirilen adsorpsiyon deneylerinde pH 7.4'de pH 6.0'ya göre daha yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılmıştır. Tse-Ying Liu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2005) adsorpsiyon kapasitesinin en iyi pH 7.5 civarında olduğu bulunmuştur.

7.8 Adsorpsiyon İzotermlerinin İncelenmesi

Adsorban olarak H-70 kullanılarak 37°C’de pH 7.4 ‘de farklı BSA konsantrasyonlarında gerçekleştirilen adsorpsiyon deneylerinin adsorpsiyon izotermi Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm model denklemleri kullanılarak incelenmiştir. pH 7.4’de gerçekleştirilen adsorpsiyon deneylerinde elde edilen sonuçlar Çizelge 7.17’de ve Şekil 7.57’de verilmiştir.

Çizelge 7.17 Denge değerleri

C_e (mg/mL)	q_e (deneysel) (mg/g adsorban)	q_e (Langmuir hesaplanan) (mg/g adsorban)	q_e (Freundlich hesaplanan) (mg/g adsorban)
0.15	4.00	4.1485	4.2824
0.33	6.00	6.4879	6.2030
0.39	8.00	6.9935	6.7096
0.50	8.00	7.7217	7.5405
0.69	8.00	8.5954	8.7727
0.86	9.33	9.1329	9.7294



Şekil 7.57 Adsorpsiyon İzotermi

Langmuir ve Freundlich izoterm model denklemlerinden hesaplanan değerler izelge 7.18’de verilmiştir.

Çizelge 7.18 Langmuir ve Freundlich sabitleri

Langmuir İzotermi		Freundlich izotermi	
K_L (ml/mg)	3.418	K_F (ml/mg)	10.444
Q_{max} (mg/g)	12.240	1/n	0.469
R_L	0.226	n	2.128
R^2	0.9510	R^2	0.8930

Langmuir izoterminde, adsorban yüzeyinin enerji açısından benzer olduğu kabul edilmekte ve tek tabakalı homojen adsorpsiyonu açıklamak için kullanılmaktadır. Böylece bu bölgelerin albumin moleküllerini eşit sayıda tutarak tek tabaka oluşturması beklenmektedir. Ayrıca Langmuir izotermi, tersinmez adsorpsiyon ve yüksek uygunluk göstermektedir. Diğer yandan Freundlich izotermine göre adsorplayıcı maddenin yüzeyi üzerinde bulunan adsorpsiyon alanları heterojen olarak kabul edilmektedir.

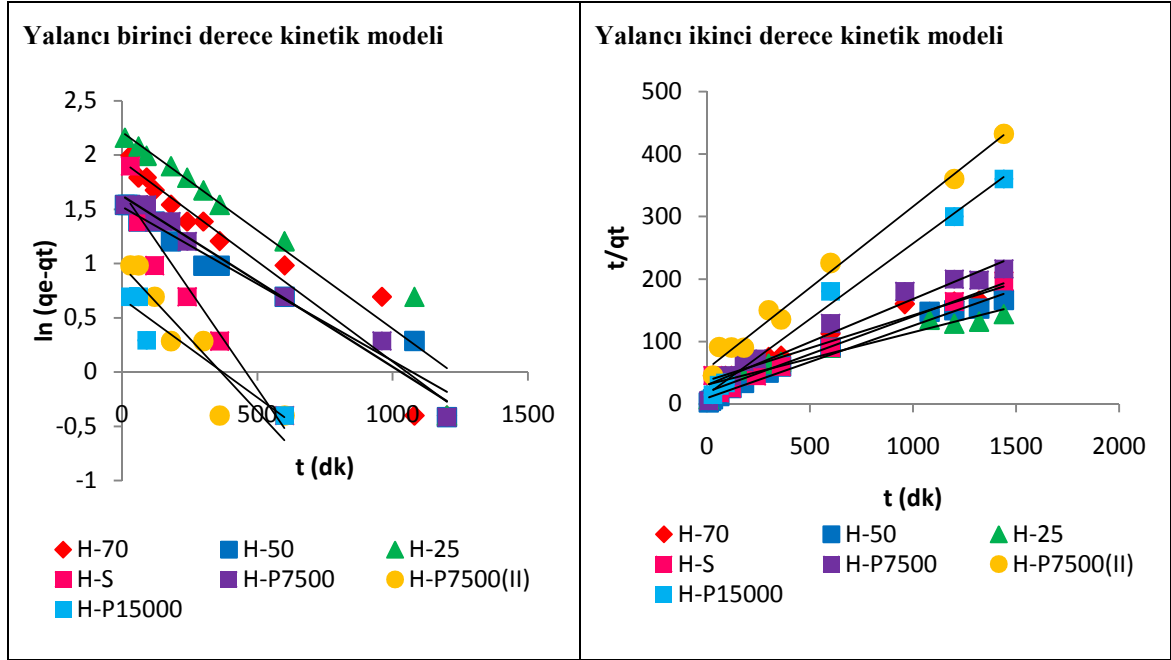
Sulu czeltilerden üretilen adsorbanlarla BSA adsorpsiyonunda Langmuir izoterminin Freundlich izotermine göre daha uygun olduğu saptanmıştır. Langmuir izotermi, katı yüzeyler üzerinde aktif adsorpsiyon alanlarında meydana gelen tutulmanın fiziksel yada kimyasal adsorpsiyon olup olmadığını diğer izotermelere göre daha iyi açıklamaktadır. Langmuir izoterminde bulunan R_L değerinin $0 < R_L < 1$ arasında olması BSA’nın H-70’e adsorbanı ile adsorpsiyonuna elverişli olduğunu göstermektedir. Michele Lafisco ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2010) BSA’nın adsorpsiyon izotermini açıklamak için Langmuir ve Freundlich izotermilerinden yararlanmışlardır. Yapılan bu çalışmaya göre BSA adsorpsiyonunun Langmuir izotermine daha uygun olduğu tespit edilmiştir.

7.9 Adsorpsiyon Kinetiklerinin İncelenmesi

Üretilen adsorbanlarla 37°C’de pH 7.4 ve pH 6.0’da 0.5 mg/ml BSA başlangıç konsantrasyonlarında gerçekleştirilen adsorpsiyon deneylerinin kinetiği yalancı birinci

derece ve yalancı ikinci derece adsorpsiyon kinetik model denklemleri kullanılarak incelenmiştir.

37°C ve pH 7.4'de gerçekleştirilen adsorpsiyon deneylerinin yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece kinetik modellerine göre incelenmesi Şekil 7.58'de gösterilmiştir. Hesaplanan kinetik parametreler ise Çizelge 7.19 ve 7.20'de verilmiştir.



Şekil 7.58 Yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece reaksiyon kinetikleri (pH 7.4)

Çizelge 7.19 pH 7.4 yalancı birinci adsorpsiyon kinetik parametreleri

Yalancı birinci derece				
Adsorban	q_e , deneysel (mg/g)	q_e , hesaplanan (mg/g)	$k_1 \times 10^3$ (1/dak.)	R^2
H-25	10.00	9.12	1.8	0.9296
H-50	8.66	4.57	1.4	0.9548
H-70	8.00	6.95	1.8	0.9338
H-S	7.33	5.25	3.6	0.9364
H-P7500	6.66	5.07	1.6	0.9824
H-P7500(II)	3.33	2.65	2.7	0.8459
H-P15000	4.00	1.96	1.8	0.9129

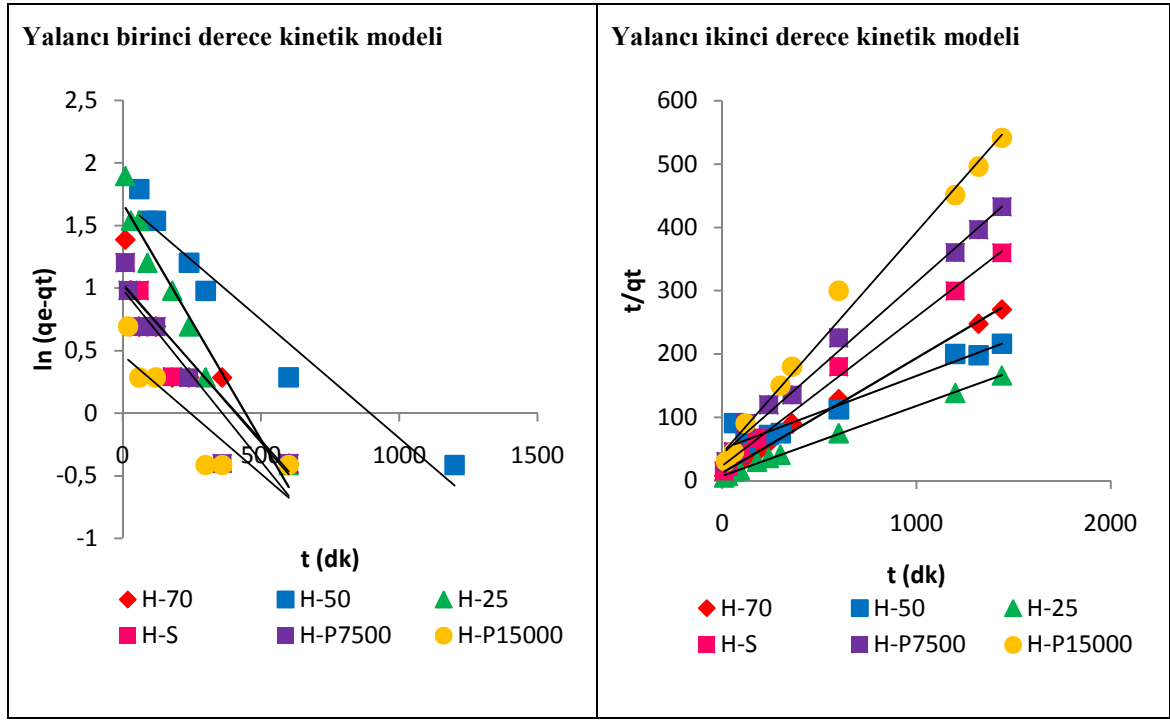
Çizelge 7.20 pH 7.4 yalancı ikinci derece adsorpsiyon kinetik parametreleri

Yalancı ikinci derece

Adsorban	q_e, deneysel (mg/g)	q_e, hesaplanan (mg/g)	k₂ (g/mg dak.)	v₀ (mg/g dak.)	R²
H-25	10.00	11.89	2.297x10 ⁻⁴	0.032	0.9441
H-50	8.66	8.65	1.364x10 ⁻³	0.102	0.9841
H-70	8.00	9.55	2.914x10 ⁻⁴	0.026	0.9714
H-S	7.33	8.28	7.505x10 ⁻⁴	0.051	0.9776
H-P7500	6.66	7.25	6.300 x10 ⁻⁴	0.033	0.9682
H-P7500(II)	3.33	3.84	1.203x10 ⁻³	0.017	0.9889
H-P15000	4.00	4.13	3.779x10 ⁻³	0.064	0.9955

Çizelge 7.19 ve 7.20'ye bakıldığında pH 7.4'de gerçekleştirilen deneyler için yalancı ikinci derece kinetik modelinin daha uygun olduğu görülmektedir. Sadece H-P7500 adsorbanı için yalancı birinci derece modelinde korelasyon katsayısı (R²) daha yüksek bulunmuştur.

37°C ve pH 6.0'da gerçekleştirilen adsorpsiyon deneylerinin yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece kinetik modeline göre incelenmesi Şekil 7.59'da gösterilmiştir. Hesaplanan kinetik parametreler ise Çizelge 7.21 ve 7.22'de verilmiştir.



Şekil 7.59 Yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece reaksiyon kinetikleri (pH 6.0)

Çizelge 7.21 pH 6.0 yalancı birinci derece adsorpsiyon kinetik parametreleri

Yalancı birinci derece

Adsorban	q_e , deneysel (mg/g)	q_e , hesaplanan (mg/g)	$k_1 \times 10^3$ (1/dak.)	R^2
H-25	8.66	5.35	3.8	0.9513
H-50	6.66	5.44	1.9	0.9537
H-70	5.33	2.78	2.5	0.8433
H-S	4.00	2.82	2.5	0.9142
H-P7500	3.33	2.69	2.7	0.8737
H-P15000	2.6	1.59	1.9	0.7589

Çizelge 7.22 pH 6.0 yalancı ikinci derece adsorpsiyon kinetik parametreleri

Yalancı ikinci derece

Adsorban	q_e, deneysel (mg/g)	q_e, hesaplanan (mg/g)	k₂ (g/mg dak.)	v₀ (mg/g dak.)	R²
H-25	8.66	9.03	1.696x10 ⁻³	0.138	0.9986
H-50	6.66	8.65	2.668x10 ⁻⁴	0.200	0.9523
H-70	5.33	5.52	2.627x10 ⁻³	0.080	0.9955
H-S	4.00	4.24	2.383x10 ⁻³	0.043	0.9959
H-P7500	3.33	3.69	1.718x10 ⁻³	0.023	0.9928
H-P15000	2.86	2.85	2.796x10 ⁻³	0.023	0.9894

Çizelge 7.21 ve 7.22'ye bakıldığında pH 6'da gerçekleştirilen deneyler için de yalancı ikinci derece kinetik modelinin daha uygun olduğu bulunmuştur. H-50 adsorbanı için ise her iki model denklemi ile aynı korelasyon katsayısı elde edilmiştir. (R²≈ 0.95).

Shan Gao ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2009) adsorpsiyon kinetikleri yalancı birinci ve ikinci derece kinetik modelleriyle açıklanmıştır. Bu çalışmada florür mineralinin nano-HAP adsorbanı üzerine gerçekleşen adsorpsiyonu incelenmiştir. Deney sonuçlarının yalancı ikinci derece kinetik modeline daha çok uyduğunu belirtmişlerdir.

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında farklı şartlarda üretilen HAP adsorbanlarının 0,5 mg/ml BSA başlangıç konsantrasyonunda, 37°C'de, pH 7.4 ve pH 6.0'da 24 saat süresince gerçekleştirilen adsorpsiyon deneyleri ile BSA adsorplama kapasiteleri incelenmiştir.

Kesikli sistemde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar adsorpsiyon izotermeleri (Langmuir ve Freundlich) ve adsorpsiyon kinetik modelleriyle (yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece) açıklanmıştır.

Farklı üretim sıcaklıklarında üretilen sintersiz HAP adsorbanlarının (25°C, 50°C ve 70°C) üretim sıcaklığının adsorpsiyon kapasitesini etkilediği görülmüştür. Adsorbanın üretim sıcaklığının artırılması BSA adsorpsiyon kapasitesini düşürmüştür.

Adsorpsiyon deneylerinde HAP adsorbanlarına uygulanan sinterleme işlemi spesifik yüzey alanını azalttığı için adsorpsiyon kapasitesini düşürmüştür. Ayrıca sinterleme sıcaklığının artması da adsorpsiyon kapasitesini azaltmıştır.

Polimerik katkı maddesi varlığında üretilen ve sinterlenen adsorbanların polimer konsantrasyonu arttıkça sinterleme sonrasında spesifik yüzey alanlarındaki düşüş artmıştır. Bu nedenle adsorbanların üretimi esnasında katkı maddesi olarak kullanılan polimer konsantrasyonu arttıkça adsorpsiyon kapasitesi düşmüştür.

pH'in adsorpsiyon üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda, pH 7.4'de pH 6.0'ya göre daha yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılmıştır.

Yapılan tüm deneylerde denge süresi yaklaşık 1200 dakika olarak bulunmuştur.

Konsantrasyona bağlı olarak elde edilen verilerin Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerine uygunluğu incelenmiştir. Deneysel sonuçların Langmuir izotermine uygunluk göstermiştir.

Elde edilen deney sonuçlarının adsorpsiyon kinetik modelleri ile açıklanması çalışmalarında, pH 7.4 ve pH 6.0'da en iyi kinetik modelin yalancı ikinci derece kinetik model olduğu belirlenmiştir.

Adsorpsiyon kapasitesini yükseltmek için üretim şartları değiştirilerek yüksek spesifik yüzey alanına sahip HAP numuneleri üretilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Kawasaki, K., Kambara, M. ve Norde W., (2003). “A Comparison of the Adsorption of Saliva Proteins and Some Typical Proteins onto the Surface of Hydroxyapatite”, *Science Direct*, 32:321-334.
- [2] Yin, G., Liu, Z., Zhan J., Ding F. ve Yuan N., (2002). “Impacts of the Surface Charge Property on Protein Adsorption on Hydroxyapatite”, *Chemical Engineering Journal*, 87:181-186.
- [3] Kandori, K., Fudo A. ve Ishikawa T., (2000). “Adsorption of Myoglobin onto Various Synthetic Hydroxyapatite Particles”, *Owner Societies*, 2:2015-2020.
- [4] Tsuyama S, Tanaka H. ve Ishikawa T., (2007). “Protein Adsorption Characteristics of Calcium Hydroxyapatites Modified with Pyrophosphoric Acids”, *Science Direct*, 58:98-104.
- [5] Kandori K., Fudo A. ve Ishikawa T., (2001). “Study on the Particle Texture Dependence of Protein Adsorption by Using Synthetic Micrometer-Sized Calcium Hydroxyapatite Particles”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 24:145-153.
- [6] Fukusumi M., (1999). “Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme on Hydrophobic Calcium Hydroxyapatite”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 212:600–603.
- [7] Mueller B., Zacharias M. Ve Rezwan K., (2010). “Bovine Serum Albumin and Lysozyme Adsorption on Calcium Phosphate Particles”, *Advanced Engineering Materials*, 12:1-2.
- [8] Serro A.P., Bastos M., Costa Pessoa ve Saramago B., (2004). “Bovine Serum Albumin Conformational Changes upon Adsorption on Titania and on Hydroxyapatite and Their Relation with Biomineralization”, *Wiley Inter Science*, 420-427.
- [9] Lafisco M., Sabatino P. ve Prat M., (2010). “Conformational Modifications of Serum Albumins Adsorbed on Different Kinds of Biomimetic Hydroxyapatite Nanocrystals”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81:274-284.
- [10] Fujiwara A., Mukai M. ve Yasukawa A., (1998). “Evaluation of the Adsorption Affinity of Proteins to Calcium Hydroxyapatites by Desorption and Pre-adsorption Methods”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 11:313-320.

- [11] Tomado K., Ariizumi H., Nakaji T. ve Makino K., (2010). “Hydroxyapatite Particles as Drug Carriers for Proteins”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76:226-235.
- [12] Kandori K., Uoya Y. ve Ishikawa T., (2002). “ Effects of Acetonitrile on Adsorption Behaviour of Bovine Serum Albumin onto Synthetic Calcium Hydroxyapatite Particles ”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 252:269-275.
- [13] Mizumoto S., Toshima S. ve Morisada Y., (2009). “ Effects of Heat Treatment of Calcium Hydroxyapatite Particles on the Protein Adsorption Behaviour “, *J. Phys. Chem. B*, 113:11016-11022.
- [14] Oda S., Tsuyama S. ve Kandori K., (2008). “Effects of Pyrophosphate Ions on Protein Adsorption onto Calcium Hydroxyapatite”, *J. Phys. Chem. B*, 112:2542-2547.
- [15] Bozgeyik K., (2006). Titanyum Dioksit Üzerine Bovin Serum Albümin Adsorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
- [16] Proteinlerin Özellikleri, www.mustafaaltinisik.org.uk, 8 Mart 2011.
- [17] Proteinler, www.wikipedia.org, 13 Nisan 2011.
- [18] Proteinler, www.altezozturk.com, 24 Mayıs 2011.
- [19] Proteinlerin Organizmadaki Fonksiyonları, <http://daganer.blogcu.com>, 21 Mayıs 2011.
- [20] Proteinlerle ilgili genel bilgiler, www.biyolojik.org, 8 Haziran 2011.
- [21] Proteinlerin Yapısı, www.saglik.im.com, 8 Haziran 2011.
- [22] Proteinlerin özellikleri, www.diyadinnet.com, 12 Mayıs 2011.
- [23] Proteinlerin Özellikleri, www.meb.gov.tr, 10 Haziran 2011.
- [24] Proteinin Canlılar İçin Önemi, www.msxlab.org, 10 Haziran 2011.
- [25] Proteinin Saflaştırılması, www.forumlord.com, 4 Nisan 2012.
- [26] Proteinin Önemi, www.hacettepe.edu.tr, 25 Mayıs 2011.
- [27] İmamoglu Ö., Biyokimya Lab. Deney Föyü, Muğla Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Muğla.
- [28] Pekyardımcı Ş., Protein Tayin Yöntemleri, Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü, Ankara.
- [29] Battal Y., (2006). Anyonik Polielektrolitlerin Sığır Serum Albuminle Etkileşiminin Floresans Yöntemiyle İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [30] Altuner D., (2006). Sığır Serum Albuminin İmmobilize Metal Affinite Membranları Kullanılarak Sulu Ortamdan Adsorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
- [31] Bovin Serum Albuminin Yapısı, www.friedli.com, 10 Haziran 2011.

- [32] Karadul, A., (2008). Dental Restoratif Malzemelerin Sitotoksitesine Işık Kaynağının ve Hidroksiapatit İlavésinin Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [33] Çalımlı A., Aktaş A., Yıldız Y. Ve Gökçe Y., (2008). “Nano Yapıdaki Kitosan, Hidroksiapatit ve Kompozitlerinin Sentezi ve Parçacık Karakterizasyonu”, Tübitak proje no:104M412, Ankara.
- [34] Pasinli A. ve Aksoy R.S., (2010). “Yapay Kemik Uygulamaları İçin Hidroksiapatit”, Biyoteknoloji Elektronik Dergisi, 1: 41-51.
- [35] Cengiz, B., (2007). Hidroksiapatit Nanoparçacıklarının Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [36] Evcin A., Kepekçi D. Ve Barut İ., (2009). “Hidroksiapatit Tozlarının Plazma SpreyYöntemiyle Paslanmaz Çelik Üzerine Kaplanması”, Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumu, Karabük.
- [37] Hidroksiapatit hakkında bilgiler, <http://m.didikle.com>, 4 Nisan 2012.
- [38] Ekmen, M., (2009).Hidroksiapatit Kristallerinin Kontrollü İlaç Salınımında Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [39] Galip, S., (2010). Bakır(II)'nin Kalsiyum Karbonat Üzerine Adsorpsiyonunun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [40] Güçlü, K., (1999). pH ve Kompleksan Bağımlı Ağır Metal Adsorpsiyonunun İncelenmesi ve Modellenmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [41] Kalaycı, G., (2008). Polianilin/Aktif Karbon Kompozit Maddesinin Sentezi, Karakterizasyonu ve İletken Film Yapımı, Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- [42] Aşkın, A., (1994). Mezogözenekli Katılarda Boyarmadde Adsorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [43] Adsorpsiyon, www.kimyaevi.org, 6 Eylül 2011.
- [44] Baştuğ, B., (2008). Palmiye Kabuğu Kökenli Aktif Karbon Adsorpsiyonu ile Ağır Metal Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- [45] Şencan A., (2006). Sulu Çözelti ve Deri Endüstrisi Atıksuyundan Cr^{+6} İyonunun Aktif Çamur Biyokütlesiyle Biyosorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- [46] Filiz E., (2007). Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Adsorbanlarla Sulardan Ağır Metal Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [47] Dinçyürek Ö., (2006). Termik Santral Uçucu Kül Tiplerinin Atıksulardaki Fenolün Adsorpsiyon Yöntemi ile Giderim Etkinliklerinin Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

- [48] Kabak, H., (2008). Kullanılan Bazı Tıbbi İlaçların Canlı Aktif Çamur Biyokütlesi Tarafından Adsorplanma Özelliğinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [49] Akkuş B., (2007). Atıksuların Arıtılmasında Uygun Adsorban Seçimi, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- [50] Çakmak M.E., Adsorpsiyon Teorisi.
- [51] Balcı B., (2007). Atıksulardan Tekstil Boyarmaddelerinin Sürekli ve Kesikli Sistemlerde Ağaç Kabuğu Kullanılarak Adsorpsiyon İle Giderilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [52] Gökçe C., (2005). Farklı Kaynaklardan Üretilen Adsorbanlarla Hümik Asit Adsorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [53] Kılıç M., (2004). Kurşun (II) ve Cıva (II) İyonlarının Biyokütle Üzerine Adsorpsiyonunun İncelenmesi, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- [54] Dietschweiler C., (2007). “Protein adsorption at solid surfaces”, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich.
- [55] Brusatori M., (2001). Protein Adsorption Kinetics Under an Applied Electric Field: An Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy Study, Doktora Tezi, Wayne State University, Michigan.
- [56] Andrade J.D., Hlady V. ve Wei A.P., (1992). “ Adsorption of Complex Proteins at Interfaces “, Pure & Appl. Chem., 11:1777-1781.
- [57] Gomez-Morales, J.,Torrent-Burgues, J., Boix, T., Fraile, J. ve Rodriguez-Clemente, R., (2001). “Precipitation of Stoichiometric Hydroxyapatite by a Continuous Method”, Cryst. Res. Technol., 36(1): 15-26.
- [58] Koutsopoulos, S., (2002). “Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Crystals: A Review Study on The Analytical Methods”, Wiley Periodicals, Inc. 600-612.
- [59] Ying Liu T., Yuan Chen S., Mo Liu D. ve Chian Liou S., (2005). “ One the Study of BSA-loaded Calcium-deficient Hydroxyapatite Nano-carriers for Controlled Drug Delivery”, Science Direct, 107:112-121.
- [60] Gao S., Cui J. ve Wei Z., (2009). “ Study on the Fluoride Adsorption of Various Apatite Materials in Aqueous Solution”, Journal of Fluorine Chemistry, 130:1035-1041.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : İmren EKİNGEN
Doğum Tarihi ve Yeri : 9 Kasım 1986 - Diyarbakır
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : imren_1986@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	----
Lisans	Kimya Mühendisliği	İstanbul Üniversitesi	2010
Lise	Fen Bilimleri	Dede Korkut Anadolu Lisesi	2004

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011	Elso Kimya	Kalite Kontrol Sorumlusu