

**Tekstil Atıksularından Serisin Geri Kazanımı
ve Serisinin Yeniden Kullanım Olanaklarının
Araştırılması**

Proje No: 106M062

Prof. Dr. M. Ruşen GEÇİT
Yrd. Doç. Dr. Dilek KESKİN
Yrd. Doç. Dr. Ayşen TEZCANER
Dr. Gökşen ÇAPAR

EKİM 2008
ANKARA

ÖNSÖZ

TÜBİTAK tarafından desteklenen MAG 106M062 no'lu ve "Tekstil Atıksularından Serisin Proteininin Geri Kazanımı ve Serisinin Yeniden Kullanım Olanaklarının Araştırılması" adlı proje 01.08.2006-01.08.2008 tarihleri arasında ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü'nde yürütülmüştür. Proje kapsamında Türkiye'de serisin kaynağı olan iki tür atıksu ele alınmıştır. Koza pişirme atıksuları (KPA) ve ipek ipliği pişirme atıksuları (İPA)'ndan serisin geri kazanımı için fiziko-kimyasal yöntemlerden oluşan ön-arıtma süreçleri ve membran süzme işlemleri uygulanmıştır. Her iki atıksu türü için de en uygun ön-arıtma ve membran süreçleri çeşitli alternatifler arasından seçilmiştir. Elde edilen toz serisin örneklerinin özellikleri standartlarla karşılaştırılmış ve geri kazanılan ürünün kalitesi değerlendirilmiştir. Geri kazanılan serisin ile paketleme sektörüne yönelik bir biyofilm hazırlanmış, çalışmanın büyük bir kısmı TÜBİTAK desteğine ek olarak British Council Scientific Partnership Programı çerçevesinde alınan destekle, partner üniversite olan Imperial College, London'ın Kimya Mühendisliği ve Kimya Teknolojisi Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Proje kapsamında ayrıca serisinli bir yanık/yara örtüsü geliştirilmesi konusunda da çalışmalar yürütülmüştür.

Proje kapsamında bir öğrenci 'Recovery of Sericin Protein from Silk Processing Wastewaters by Membrane Technology' başlıklı yüksek tezini hazırlamış ve mezun olmuştur. Bir diğer öğrenci 'Preparation of Sericin Based Wound Dressing and Investigation of Its Biomaterial Properties' başlıklı yüksek lisans tez çalışmasını yazma aşamasına gelmiştir. Membran süzme işlemleri ile koza pişirme atıksularından serisin geri kazanımı konusunda hazırlanan bir makale *Journal of Membrane Science* dergisinde basılmaya kabul edilmiştir. Serisinli yanık örtüsü hazırlanması konusunda ise 13. *Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı (BİYOMUT 2008)*'nda 'Protein Bazlı Yara Örtüsü Hazırlanması ve Biyomalzeme Özelliklerinin İncelenmesi' adlı bir tebliğ sunulmuştur.

Projenin gerçekleştirilmesine sağladığı maddi destek için TÜBİTAK'a şükranlarımızı sunarız. Ayrıca, projeyi 'Bilimsel İşbirliği' kapsamında destekleyen İngiliz Hükümeti'ne ve akademik işbirliği ile çalışmamıza katılan Imperial College, London, Kimya Mühendisliği ve Kimya Teknolojisi öğretim üyesi Prof. Dr. Kang Li'ye teşekkürlerimizi sunarız. Bu projede yürütülen deneysel çalışmaların çok büyük bir kısmı, ODTÜ Çevre Mühendisliği ve Kimya Mühendisliği Bölümleri'nde gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, Prof. Dr. Ülkü Yetiş ve Prof. Dr. Levent Yılmaz'a desteklerinden dolayı şükranlarımızı sunarız. Projenin gerçekleştirilmesinde önemli katkı sağlayan Kirman İplik San. ve Tic. Ltd. Şti.'nden Sayın Baki Akdağ'a da ayrıca teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xviii
ÖZET.....	xx
ABSTRACT.....	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İpek İşleme Atıksularının Özellikleri	4
2.2. Serisinin Özellikleri	7
2.3. Serisin Geri Kazanım Yöntemleri	11
2.4. Serisinli Biyofilm Hazırlanması	12
2.5. Serisinli Yanık/Yara Örtüsü Hazırlanması	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. İpek İşleme Atıksularından Serisin Geri Kazanımı	19
3.1.1. Atıksu Örnekleri	19
3.1.2. Santrifüj	22
3.1.3. Mikrofiltrasyon	22
3.1.4. Ultrafiltrasyon ve Nanofiltrasyon	23
3.1.5. Membran Temizliği	25
3.1.6. Kozadan Serisin Elde Edilmesi	26
3.1.7. Çökeltme.....	26
3.1.8. Diyaliz.....	26
3.1.9. Protein Çözünürlüğü	26
3.1.10. Analitik Teknikler.....	27

3.1.10.1. Çevresel Kirlilik Parametreleri	27
3.1.10.2. Serisin Analizi	27
3.1.10.3. Toplam Protein Analizi	29
3.1.10.4. Karbonhidrat Analizi	29
3.1.10.5. FPLC ile Fraksiyon Toplama	29
3.1.10.6. Nem, Organik ve İnorganik Madde Tayinleri	30
3.1.10.7. Elementel Analiz	30
3.1.10.8. MALDI-TOF MS ve 2-D Elektroferez ile Protein Tanımlanması	30
3.1.10.9. Gaz Kromatograf-Kütle Spektrometri ile Yağ Asitleri Analizi	30
3.2. Serisinli Biyofilm Hazırlanması	31
3.2.1. Malzemeler	31
3.2.2. Film Hazırlama	31
3.2.3. Film Özelliklerinin Belirlenmesi	34
3.2.3.1. Film Kalınlığı	34
3.2.3.2. Su Tutma Oranı	34
3.2.3.3. Nem Tutma Oranı	35
3.2.3.4. Oksijen Geçirgenliği	35
3.2.3.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi	37
3.2.3.6. Mekanik Özellikler	37
3.3. Serisinli Yanık/Yara Örtüsü Hazırlanması	37
3.3.1. Membranların Hazırlanması	37
3.3.2. Serisin-Kollajen Membranların Özelliklerinin İncelenmesi	39
3.3.2.1. Membranların Su Tutma Kapasitesinin İncelenmesi	40
3.3.2.2. Sulu Ortamda Ağırlık Değişiminin İncelenmesi	41
3.3.2.3. Sulu Ortamda Protein İçeriğinin İncelenmesi	41
3.3.2.4. Su Buharı Geçirgenliği Testi	41
3.3.2.5. Oksijen Geçirgenliği Testi	42

3.3.2.6. Mikrobiyal Geçirgenlik Testi	43
3.3.2.7. Mekanik Özellik Testleri	43
3.3.2.8. Biyouyumluluk Testleri	44
3.3.2.9. Kollajen Dağılımının Boyama ile İncelenmesi	44
3.3.2.10. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	46
4.1. SERİSİN GERİ KAZANIMI İLE İLGİLİ BULGULAR	46
4.1.1. Referans Olarak Kullanılan Serisinin Özellikleri	46
4.1.2. İpek İşleme Atıksularındaki Serisinin Özellikleri	48
4.1.3. KPA için En Uygun Ön-arıtma Yönteminin Seçilmesi	51
4.1.3.1. Cazibe ile Çökeltme	52
4.1.3.2. Mikrofiltrasyon	52
4.1.3.3. Santrifüj	53
4.1.3.4. Santrifüj + MF	53
4.1.3.5. MF'in UF Performansı Üzerine Etkisi	55
4.1.4. KPA için En Uygun Membran Süzme İşleminin Seçilmesi	58
4.1.4.1. UF ve NF Membranlarının Tutma (Rejection) Performansları	59
4.1.4.1.1. Serisin Tutma Verimleri	59
4.1.4.1.2. Kirlilik Parametrelerinin Giderim Verimleri	60
4.1.4.1.3. UF ve NF Membranlarında Akı Analizi	68
4.1.5. Koza Pişirme Atıksuyundaki Serisinin NF ile Yoğunlaştırılması	72
4.1.5.1. Yoğunlaştırma Düzeninde Tutma/Giderim Verimleri	72
4.1.5.2. Yoğunlaştırma Düzeninde Akı Analizleri	82
4.1.6. Yoğunlaştırılan Serisinin Çökeltmesi	84
4.1.6.1. Çökeltme için Etanol ve Asit Karşılaştırması.....	84
4.1.6.2. Elementel Bileşimlerin Karşılaştırılması	89
4.1.6.3. Asit ve Etanolün Çevresel Zararlarının Karşılaştırılması	90

4.1.6.4. Nem Miktarı, Organik ve İnorganik İçeriklerin Karşılaştırılması	91
4.1.6.5. Serisin Çözünürlüğüne pH'nın Etkisi	92
4.1.6.6. Serisin Örneklerinde UV Tarama Karşılaştırması	92
4.1.6.7. Geri Kazanılan Serisinin Tanımlanması	95
4.1.6.8. Çökeltilen Serisinin Diyaliz ile Saflaştırılması	100
4.1.6.9. Koza Pişirme Atıksuyundan Serisin Geri Kazanım Süreci	104
4.1.7. İpek İpliği Pişirme Atıksularından Serisin Geri Kazanımı	106
4.1.7.1. İPA için En Uygun Ön-arıtma Yönteminin Seçilmesi	107
4.1.7.1.1. Alkali pH Koşulunda Santrifüj	109
4.1.7.1.2. Nötr ve Asidik pH Koşullarında Santrifüj	109
4.1.7.1.3. Alkali ve Asidik pH Koşullarında Ardışık Santrifüj	111
4.1.7.1.4. Asidik pH Koşullarında Santrifüj	111
4.1.7.1.5. Asidik pH Koşullarında Santrifüj+Cazibeyle Çökeltme	111
4.1.7.2. İPA'dan Ultrafiltrasyon ile Serisin Geri Kazanımı	114
4.1.7.2.1. UF Membranlarının Tutma/Giderme Performansları	115
4.1.7.2.2. UF Membranlarının Akı Analizleri	119
4.1.7.3. Serisin Geri Kazanımı için Alternatif Pişirme Tekniği	120
4.2. SERİSİNLİ BİYOFİLM HAZIRLANMASI İLE İLGİLİ BULGULAR	122
4.2.1. Set-1 Filmleri ile İlgili Sonuçlar	122
4.2.1.1. Su Tutma Oranı	122
4.2.1.2. Nem Tutma Oranı	123
4.2.2. Set-2 Filmleri ile İlgili Sonuçlar	126
4.2.2.1. Oksijen Geçirgenliği	126
4.2.2.2. Mekanik Özellikler	131
4.3. YANIK ÖRTÜSÜ OLARAK HAZIRLANAN SERİSİN-KOLLAJEN MEMBRANLAR İLE İLGİLİ SONUÇLAR	135
4.3.1. Örtüsü Olarak Kullanılmak Üzere Hazırlanan Serisin-Kollajen Membranların Kalınlık ve Uygulanabilirlik Yönünden Değerlendirilmesi .	135

4.3.2. Membranların Yanık Örtüsü Olarak Özelliklerinin Değerlendirilmesi	136
4.3.2.1. Membranların Su Tutma Özelliklerinin Değerlendirilmesi	136
4.3.2.2. Kollajen-Serisin Membranların Oksijen Geçirgenliği Özelliğinin Değerlendirilmesi	138
4.3.2.3. Kollajen-Serisin Membranların Su Buharı Geçirgenliğinin Değerlendirilmesi	139
4.3.2.4. Membranların Toplam Protein Miktarının Değerlendirilmesi	141
4.3.2.5. Membranların In situ Bozunumlarının Değerlendirilmesi	142
4.3.2.6. Membranların Mikrobiyal Geçirgenlik Özelliklerinin İncelenmesi	143
4.3.2.7. Kollajen-Serisin Membranların Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	145
4.3.2.8. Membranların Makroskopik ve Mikroskopik İncelenmesi	149
4.3.2.9. Membranların Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi	152
4.3.3. Geri Kazanılmış Serisinin Sitotoksite Sonuçları	172
4.3.4. Kollajen ve Kollajen-Serisin Köpükler Hazırlanması	174
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	176
KAYNAKÇA	183
EKLER	191
EK A. KPA'nın Saklama Koşullarının Membran Performansına Etkisi	192
EK B. Kimyasal Yıkamanın Membran Performansına Etkisi	195
EK C. Otoklav Süresinin Serisin Çözünürlüğüne Etkisi	197
EK D. Serisin ve T. Protein Analizleri için Kalibrasyon Standardının Seçilmesi	198
EK E. Toplam Protein Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi	199
EK F. Karbonhidrat Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi	200
EK G. Serisin, Sabun ve KOİ Arasındaki İlişki	201
EK H. Koza Pişirme Atıksuyu Bileşenlerinin Analizi	202
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	204

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1.	Tekstil atıksularının özellikleri	5
Tablo 2.2.	İplik dokuma ve sonlandırma işlemlerinden kaynaklanan tekstil atıksuları için deşarj standartları	6
Tablo 2.3.	Serisinin bazı amino asitlerinin yapısı	9
Tablo 3.1.	KPA ve İPA örneklerinin özellikleri	21
Tablo 3.2.	Kullanılan membranların özellikleri	22
Tablo 3.3.	Yoğunlaştırma deneylerinde HAF hesaplanması	24
Tablo 3.4.	Akı analizi için yapılan hesaplar	25
Tablo 3.5.	Analitik teknikler	27
Tablo 3.6.	Set-1 filmlerinin özellikleri	32
Tablo 3.7.	Set-2 filmlerinin özellikleri	34
Tablo 3.8.	Hazırlanan kollajen-serisin membran grupları	39
Tablo 4.1.	Referans serisinin özellikleri	46
Tablo 4.2.	Serisinin atıksudaki MA dağılımı	50
Tablo 4.3.	Yabancı madde ile uyum gösteren proteinler	51
Tablo 4.4.	Ön-arıtma işlemlerinin giderim performansları	52
Tablo 4.5.	Ön-arıtması yapılmış KPA özellikleri	54
Tablo 4.6.	UF (20 kDa) işleminin performansı	56
Tablo 4.7.	UF (20 kDa) için akı azalması analizi	57
Tablo 4.8.	Ön-arıtması yapılan KPA özellikleri (Toplam dolaşım düzeninde yürütülen deneylerde kullanılan örnekler)	57
Tablo 4.9.	Ön-arıtması yapılan KPA özellikleri (Yoğunlaştırma düzeninde yürütülen deneylerde kullanılan örnekler)	58
Tablo 4.10.	Serisin geri kazanımı için UF ve NF performansları	61
Tablo 4.11.	Kirlilik parameteleri için UF ve NF performans karşılaştırması	67
Tablo 4.12.	Kimyasal yıkamanın akı geri kazanımına etkisi	71

Tablo 4.13.	Konsantrasyon polarizasyonu ve kirlenme etkileri	72
Tablo 4.14.	NF-1 deneyinde elde edilen tutma/giderim verimleri	78
Tablo 4.15.	NF-2 deneyinde elde edilen tutma/giderim verimleri	79
Tablo 4.16.	NF-3 deneyinde elde edilen tutma/giderim verimleri	80
Tablo 4.17.	Yoğunlaştırma deneylerinde akı azalması ve geri kazanımı	83
Tablo 4.18.	Hazırlanan ve ölçülen serisin derişimleri farkı	89
Tablo 4.19.	Serisin örneklerinin elementel analizi	90
Tablo 4.20.	Kimyasalların çevreye zararları ve fiyatları açısından karşılaştırılması ...	91
Tablo 4.21.	Geri kazanılan serisin örneklerinin nem, kül ve organik içerikleri	91
Tablo 4.22.	Serisin çözünürlüğüne pH'nın etkisi	92
Tablo 4.23.	Diyaliz sonrası serisinin molekül ağırlık dağılımı	102
Tablo 4.24.	Diyaliz sonrası örneklerin elementel kompozisyonu	104
Tablo 4.25.	Santrifüj süresi ve pH'ın santrifüj performansına etkisi	110
Tablo 4.26.	Asidik pH koşullarında santrifüj süresinin optimizasyonu	113
Tablo 4.27.	UF işlemlerinin performans karşılaştırması	116
Tablo 4.28.	UF işlemlerinin tutma/giderme performansları	117
Tablo 4.29.	Kirlilik parametreleri için toplam giderim verimleri	117
Tablo 4.30.	UF işlemlerinde akı analizi	120
Tablo 4.31.	Simüle edilmiş İPA'nda serisin derişimi ve molekül ağırlığı	121
Tablo 4.32.	Set-1 filmlerinin nem içerikleri ve su tutma oranları	122
Tablo 4.33.	Film ağırlıklarının zamanla artışı (%55 BN)	124
Tablo 4.34.	Filmlerin nem tutma oranları (%55 BN)	124
Tablo 4.35.	Film ağırlıklarının zamanla artışı (%86 BN)	125
Tablo 4.36.	Filmlerin nem tutma oranları (%86 BN)	125
Tablo 4.37.	Film ağırlıklarının zamanla azalması	126
Tablo 4.38.	Filmlerin nem bırakma oranları (NBO)	126
Tablo 4.39.	Serisinsiz filmlerin oksijen geçirim değerleri	127

Tablo 4.40.	Serisinli filmlerin oksijen geçirgenlikleri	128
Tablo 4.41.	Hazırlanan kollajen ve kollajen-serisin membranların kalınlıkları	135
Tablo 4.42.	Kollajen-serisin membranların in situ bozunum sonuçları	143
Tablo 4.43.	Kollajen-serisin membranların mekanik özellikleri a) Kalın membranlar, b) İnce membranlar	147
Tablo A.1.	Dondurma-çözme-ısıtma işlemlerinin atıksu özelliklerine etkisi	192
Tablo A.2.	Simüle edilen KPA özellikleri	193
Tablo A.3.	DÇİ işleminin UF (5 kDa) performansına etkisi	194
Tablo B.1.	Kimyasal yıkama işleminin UF performansına etkisi	195
Tablo B.2.	Kimyasal yıkamanın membran akısı üzerine etkisi	196
Tablo C.1.	Otoklav süresinin serisin çözünürlüğüne etkisi	197
Tablo G.1.	Serisin ve KOİ arasındaki ilişki	201
Tablo G.2.	Sabun ve KOİ arasındaki ilişki	201
Tablo G.3.	Serisin, sabun ve KOİ arasındaki ilişki	201
Tablo H.1.	Atıksu bileşenlerinin incelenmesi	203

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	Serisinin moleküler formülü	8
Şekil 2.2.	Serisinin soğurma spektrumu	10
Şekil 2.3.	Serisine ait elektroforez resmi (SDS-PAGE, %10 jel)	11
Şekil 3.1.	Süzme sisteminin şematik görüntüsü (P: basınç göstergesi, V: vana)	23
Şekil 3.2.	Serisin standart çözeltisinin HPLC kromatogramı (Derişim=2,5 mg/L)	28
Şekil 3.3.	Molekül ağırlık dağılımı için kullanılan standart proteinlerin HPLC Kromatogramları	28
Şekil 3.4.	Oksijen geçirgenliği ölçme düzeneği	36
Şekil 3.5.	Kollajen-serisin membranlarının dökme yöntemiyle hazırlanması	39
Şekil 3.6.	Membranların su tutma oranlarının hesaplanması	40
Şekil 3.7.	Kollajen-serisin membranlarının su buharı geçirgenliği testi	42
Şekil 4.1.	(a) S _C ve (b) S _N örneklerine ait HPLC kromatogramları	48
Şekil 4.2.	(a) KPA ve (b) İPA'nda serisinin MA kromatogramları	49
Şekil 4.3.	Ön-arıtma alternatiflerinin şematik gösterimi	51
Şekil 4.4.	MF akı karşılaştırması	54
Şekil 4.5.	Membran süzme işlemi alternatiflerinin şematik gösterimi	59
Şekil 4.6.	HPLC kromatogramları (a) UF (20 kDa) besleme suyu (b) UF (20 kDa) süzüntü suyu (c) UF (20 kDa) süzulemeyen su (d) UF (5 kDa) besleme suyu (1/10 seyreltme) (e) UF (5 kDa) süzüntü suyu (f) UF (5 kDa) süzulemeyen su (1/10 seyreltme)	62
Şekil 4.7.	HPLC kromatogramları (a) UF (1 kDa) besleme suyu (1/10 seyreltme) (b) UF (1 kDa) süzüntü suyu (1/5 seyreltme) (c) UF (1 kDa) süzulemeyen su (1/10 seyreltme)	63
Şekil 4.8.	UF ve NF işlemlerinde serisinin MA dağılımı	65
Şekil 4.9.	HPLC kromatogramları (a) NF-DK besleme suyu (1/2 seyrelme) (b) NF-DK süzüntü suyu (c) NF-DK süzulemeyen su (1/2 seyrelme) (d) NF-90 besleme suyu (1/2 seyrelme) (e) NF-90 süzüntü suyu (f) NF-90 süzulemeyen su (1/2 seyrelme)	66

Şekil 4.10.	Zamana karşı izlenen (a) Atıksu akıları, (b) Normalize edilmiş akılar..	69
Şekil 4.11.	Kirlenmiş UF (5 kDa) membrana ait SEM fotoğrafları	70
Şekil 4.12.	Yoğunlaştırma süresince serisin değişimi (a) NF-1 (b) NF-2 (c) NF-3 deneyleri	75
Şekil 4.13.	Yoğunlaştırma süresince KOİ değişimi (a) NF-1 (b) NF-2 (c) NF-3 deneyleri	77
Şekil 4.14.	Yoğunlaştırma deneylerinde serisinin molekül ağırlık dağılımı	82
Şekil 4.15.	Yoğunlaştırma deneylerinde normalize akıların zamanla değişimi	83
Şekil 4.16.	HNO ₃ ile çöktülen serisinin HPLC kromatogramı	85
Şekil 4.17.	Diyaliz torbasının içinde kalan serisin çözeltisi (>12 kDa)	85
Şekil 4.18.	Diyaliz torbasından geçen HNO ₃ ve serisinin HPLC kromatogramı (<12 kDa)	86
Şekil 4.19.	HCl ile çöktülen serisinin HPLC kromatogramı	86
Şekil 4.20.	H ₂ SO ₄ ile çöktülen serisinin HPLC kromatogramı	87
Şekil 4.21.	C ₂ H ₄ O ₂ ile çöktülen serisinin HPLC kromatogramı	87
Şekil 4.22.	C ₂ H ₆ O ile çöktülen serisinin HPLC kromatogramı	87
Şekil 4.23.	Serisin fotoğrafları (a) Referans serisin S _N (b) Referans serisin S _C (c) Etanol ile geri kazanılan serisin (d) HCl ile geri kazanılan serisin	88
Şekil 4.24.	HNO ₃ ile çöktülen serisinin UV taraması	93
Şekil 4.25.	HCl ile çöktülen serisinin UV taraması	93
Şekil 4.26.	H ₂ SO ₄ ile çöktülen serisinin UV taraması	94
Şekil 4.27.	C ₂ H ₄ O ₂ ile çöktülen serisinin UV taraması	94
Şekil 4.28.	C ₂ H ₆ O ile çöktülen serisinin UV taraması	95
Şekil 4.29.	Yerli kozadan elde edilen standart serisinin UV taraması	95
Şekil 4.30.	Geri kazanılan serisinin anyon (Q) kolon kromatogramı	96
Şekil 4.31.	Geri kazanılan serisinin katyon (S) kolon kromatogramı	97
Şekil 4.32.	Anyon ve katyon kolondan geçirilen serisinin MALDI-TOF spektrumu	99
Şekil 4.33.	Serisin örneğinin 2-D jel elektroforez resmi	100

Şekil 4.34.	HCl ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)	101
Şekil 4.35.	H ₂ SO ₄ ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)	101
Şekil 4.36.	C ₂ H ₄ O ₂ ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)	101
Şekil 4.37.	HNO ₃ ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)	102
Şekil 4.38.	C ₂ H ₆ O ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)	102
Şekil 4.39.	Koza pişirme atıksuyundan serisin geri kazanım süreçleri	105
Şekil 4.40.	Serisin geri kazanım veriminin şematik gösterimi	106
Şekil 4.41.	İPA için ön-arıtma alternatiflerinin şematik gösterimi	108
Şekil 4.42.	İPA için en uygun ön-arıtma işlemi	113
Şekil 4.43.	İPA'dan serisin geri kazanım süreçlerinin şematik gösterimi	114
Şekil 4.44.	GC-MS kromatogramları (a) yağ asitleri standardı (b) ham İPA (c) UF (5 kDa) girişi (d) UF (5 kDa) çıkışı	119
Şekil 4.45.	Simüle edilen İPA'nun MA kromatogramı	121
Şekil 4.46.	Film 1-1 kesiti (PVA)	129
Şekil 4.47.	Film 4-1 ve 4-4a kesitleri (Serisin/PVA = 10/100)	129
Şekil 4.48.	Film 5-1 ve 5-2 kesitleri (Serisin/PVA = 1/100)	129
Şekil 4.49.	Film 6-4 kesitleri (Serisin/PVA = 2/100)	130
Şekil 4.50.	Film 7-1 ve 7-2 kesitleri (Serisin/PVA = 5/100)	130
Şekil 4.51.	Film 8-1-A ve 8-1-B kesitleri (Geri kazanılmış serisin/PVA = 5/100) ...	130
Şekil 4.52.	Çeşitli malzemelerin elastisite (Young) modülleri	131
Şekil 4.53.	Filmlerin maksimum çekme mukavemetinin karşılaştırılması	132
Şekil 4.54.	Filmlerin elastisite modüllerinin karşılaştırılması	134
Şekil 4.55.	Filmlerin kopma noktasındaki uzama miktarlarının karşılaştırılması ...	134
Şekil 4.56.	Birim membran ağırlığında günlük su tutma miktarlarının karşılaştırılması	136
Şekil 4.57.	Çapraz bağlanmış ince membranlarda birim membran ağırlığında günlük su tutma miktarlarının karşılaştırılması	137
Şekil 4.58.	Kalın membranlarda birim membran ağırlığında toplam su tutma	

	miktarlarının karşılaştırılması	138
Şekil 4.59.	İnce ve kalın membranların oksijen geçirgenliğinin kapalı ve açık kontrolle karşılaştırılması	139
Şekil 4.60.	İnce ve kalın membranlardan günlük ortalama su buharı geçiş hızının karşılaştırılması	140
Şekil 4.61.	Serisin-kollajen membran protein analizlerinde kullanılan kalibrasyon eğrisi	141
Şekil 4.62.	Membranlardan toplam protein çıkışının karşılaştırılması	142
Şekil 4.63.	Bir haftalık inkübasyon sonrasında (1) negatif kontrol, (2) pozitif kontrol ve (3-7) deney gruplarının mikrobiyal geçirgenlik sonuçları	144
Şekil 4.64.	Bir haftalık inkübasyon sonrasında negatif kontrol, pozitif kontrol , ve çapraz bağlı kollajen-serisin a) ince, b) kalın membranlarının mikrobiyal geçirgenliklerinin spektrofotometre ölçümleriyle karşılaştırılması	145
Şekil 4.65.	İnce ve kalın membranların mekanik özelliklerinin karşılaştırılması a) Elastisite modülü, b) Maksimum çekme gerilmesi c) Maksimum birim uzama	148
Şekil 4.66.	Kollajen-serisin a) 1/2, b) 1/3, c) 1/4 bileşimlerine sahip membranların ışık mikroskopu görüntüleri (20X büyütme)	149
Şekil 4.67.	Çapraz bağlanmış a) Kollajen (4 mg/ml), b) Kollajen (3 mg/ml), c) Kollajen-serisin, 1/1, d) Kollajen-serisin, 1/2 membranların ışık mikroskopu mikrografileri (20X büyütme)	149
Şekil 4.68.	Sirius kırmızısı ile boyanmış membranların makroskopik görüntüleri: a) 4 mg/ml kollajen-çapraz bağlanmış, b) 3 mg/ml kollajen-çapraz bağlanmış, c) 1/1 oranında kollajen-serisin-çapraz bağlanmış, d) 1/2 oranında kollajen-serisin, e) 1/4 oranında kollajen-serisin, f) 1/3 oranında kollajen-serisin, g) 1/2 oranında kollajen-serisin-çapraz bağlanmış	150
Şekil 4.69.	a) 1/2, b) 1/3, c) 1/4 bileşim oranlarına sahip kollajen-serisin membranların kollajene bağlanan sirius kırmızısı ile boyandıktan sonra elde edilen ışık mikroskopu görüntüleri (20X büyütme)	151
Şekil 4.70.	a) Çapraz bağlanmış a) Kollajen (4 mg/ml), b) Kollajen (3 mg/ml),	

	c) Kollajen-serisin (1/1), d) Kollajen-serisin (1/2) membranların kollajene bağlanan sirius kırmızısı ile boyandıktan sonra elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri (20X büyütme)	151
Şekil 4.71.	a) HaCaT keratinosit, b) 3T3 hücrelerinin ışık mikrografileri (20X büyütme)	152
Şekil 4.72.	Kollajen-Serisin a) 1/2, b) 1/3, c) 1/4 kompozisyonlarına sahip membranlarına, d) hücre kültür kabına (kontrol) ekilen 3T3 hücrelerinin 24 saat sonra ışık mikroskobisi görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış yayılmış hücreleri, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmamış hücreler ve sarı yıldız ise membranı göstermektedir (20X)	153
Şekil 4.73.	a) Çapraz bağlanmış a) Kollajen (4 mg/ml), b) Kollajen (3 mg/ml) c) Kollajen-serisin, 1/1, d) Kollajen-serisin, 1/2, membranlarına ekilen 3T3 hücrelerinin 24 saat sonra ışık mikroskobisi görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış yayılmış hücreleri, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmamış hücreleri ve sarı yıldız ise membranı göstermektedir (20X büyütme)	154
Şekil 4.74.	3T3 Hücreleri için oluşturulan kalibrasyon eğrisi	155
Şekil 4.75.	24 Saat sonunda membranlar üzerindeki 3T3 hücre sayıları	156
Şekil 4.76.	HaCaT keratinosit hücreleri için oluşturulan kalibrasyon eğrisi	156
Şekil 4.77.	Çapraz bağlanmış ince a) 3/0 Kollajen, b) Kollajen-serisin (1/1), c) Kollajen-serisin (1/2), d) Kollajen-serisin (2/1) membranlar üzerine ekilen 3T3 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (20X büyütme) ...	157
Şekil 4.78.	Çapraz bağlanmış ince a) 3/0 Kollajen, b) Kollajen-serisin (1/1), c) Kollajen-serisin (1/2), d) Kollajen-serisin (2/1) membranlar üzerine ekilen HaCaT keratinosit hücrelerinin ışık mikroskopu görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış ve yayılmış hücreler, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmamış hücreler (20X büyütme)	158
Şekil 4.79.	Çapraz bağlanmış kalın a) 3/0 Kollajen, b) Kollajen-serisin (1/1), c) Kollajen-serisin (1/2), c) Kollajen-serisin (2/1) membranlar üzerine ekilen 3T3 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış ve yayılmış hücreler, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmamış hücreler (20X büyütme)	159

Şekil 4.80.	Çapraz bağlanmış kalın a) 3/0 Kollajen, b) Kollajen-serisin (1/1), c) Kollajen-serisin (1/2), c) Kollajen-serisin (2/1) membranlar üzerine ekilen HaCaT keratinosit hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış ve yayılmış hücreler, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmış hücreler (20X büyütme)	160
Şekil 4.81.	HaCaT keratonosit hücrelerinin kollajen ve kollajen-serisin a) Kalın, b) İnce membranlar yüzeyinde çoğalmaları	161
Şekil 4.82.	Farklı serisin-kollajen oranlarında hazırlanmış membranların taramalı elektron mikroskopi görüntüleri: a) 1/2 (suda bekletilmiş), b) 1/2 (sıfırıncı zaman), c) 1/3 (suda bekletilmiş), d)1/3(sıfırıncı zaman), e) 1/3 T0, f) 1/4 (suda bekletilmiş), g) 1/4 (suda bekletilmiş), h) 1/4 (sıfırıncı zaman) i)1/1X (çapraz bağlanmış, suda bekletilmiş), j) 1/1X (çapraz bağlanmış,sıfırıncı zaman), k)1/2X (çapraz bağlanmış, suda bekletilmiş),l)1/2 (sıfırıncı zaman), m) 3X (çapraz bağlanmış, suda bekletilmiş), n) 3X (çapraz bağlanmış,sıfırıncı zaman), o) 4X (çapraz bağlanmış, suda bekletilmiş), ö) 4X, (çapraz bağlanmış,suda bekletilmiş)	164
Şekil 4.83.	Kollajen membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin, 24 saat inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri a) Kalın membran b) İnce membran	166
Şekil 4.84.	Kollajen-serisin (2/1) membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri a) Kalın membran b) İnce membran	167
Şekil 4.85.	a) Kollajen-serisin (1/1) membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin 7 günlük inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri a) Kalın membran b)İnce membran	168
Şekil 4.86.	a) Kollajen-serisin (2/1) kalın membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin, b) Kollajen-serisin (1/2) kalın membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin 7 günlük inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri	169
Şekil 4.87.	Kollajen-serisin (1/1) membranlara ekilmiş 3T3 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri a) İnce membran, b) Kalın membran	170

Şekil 4.88.	a) Kolajen-serisin (2/1) kalın membranlara ekilmiş 3T3 hücrelerinin, b) Kollajen-serisin (1/2) kalın membranlara ekilmiş 3T3 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri	171
Şekil 4.89.	Diyaliz öncesi ve sonrasında farklı derişimlerde geri kazanılmış serisinin HaCaT keratinosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerinin incelenmesi	172
Şekil 4.90.	HaCaT keratinosit hücrelerinin diyaliz yapılmış farklı derişimde serisin örnekleri ile 48 saatlik inkübasyon sonundaki faz kontrast ışık mikroskop fotoğrafları (20 X büyütme) a) 20 µg/ml, b) 40 µg/ml, c) 60 µg/ml, d) 80 µg/ml, e) Kontrol (serisin eklenmemiş).....	173
Şekil 4.91.	HaCaT keratinosit hücrelerinin diyaliz yapılmamış farklı derişimde serisin örnekleri ile 48 saatlik inkübasyon sonundaki faz kontrast ışık mikroskop fotoğrafları (20 X büyütme).a) 20 µg/ml, b) 40 µg/ml, c) 60 µg/ml, d) 80 µg/ml, e) 100 µg/ml, f) 150 µg/ml, g) 200 µg/ml, h) 300 µg/ml.....	174
Şekil 4.92.	Gözenekli serisin/kollajen içeren köpüklerin taramalı elektron mikroskopi görüntüleri: a) 1/2 yüzey, b) 1/2 kesit, c) 1/2 yüzey kesit ayrımı, d) 1/2 gözenek yapısının yakından görüntüsü, e) 2/1 kesit, f) 2/1 gözenek yapısının yakından görüntüsü	175
Şekil D.1.	(a) S_C (b) S_N ile elde edilen kalibrasyon eğrileri	198
Şekil E.1.	T. Protein analizi için kullanılan kalibrasyon eğrisi	199
Şekil F.1.	Karbonhidrat analizinde kullanılan kalibrasyon eğrisi	200

KISALTMALAR

AÜBE	: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
BCA	: Bisisonik Asit
BN	: Bağıl Nem
BTTG	: İngiliz Tekstil Teknoloji Grubu
C	: Temizlenmiş Membranın Saf Su Akısı
CÇ	: Cazibeyle Çökeltme
CP	: Konsantrasyon Polarizasyonu
Da	: Dalton
F	: Kirli Membranın Saf Su Akısı
FPLC	: Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatograf-Kütle Spektrometrisi
HAF	: Hacim Azaltma Faktörü
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
I	: Temiz Membranın Saf Su Akısı
IF	: Geri Döndürülemeyen Kirlenme
İPA	: İpek İpliği Pişirme Atıksuyu
kDa	: Kilo Dalton
KOİ	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
KPA	: Koza Pişirme Atıksuyu
kPa	: Kilo Paskal
MA	: Molekül Ağırlığı
MAAS	: Molekül Ağırlık Ayırma Sınırı
MALDI-TOF MS	: Dizey-Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektrometrisi
MF	: Mikrofiltrasyon
NF	: Nanofiltrasyon
NTO	: Nem Tutma Oranı
NTU	: Neflometrik Bulanıklık Birimi
Pt-Co	: Platinyum Kobalt
PVA	: Polivinil Alkol
RF	: Geri Döndürülebilen Kirlenme
S _c	: Ticari Olarak Temin Edilen Serisin
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopisi
SFJ	: Santrifüj

S _N	: Yerli Kozadan Elde Edilen Serisin
STO	: Su Tutma Oranı
TF	: Toplam Kirlenme
TFC	: İnce Film Kompozit
TKM	: Toplam Katı Madde
UF	: Ultrafiltrasyon
USEPA	: ABD Çevre Koruma Örgütü
UV	: Ultraviyole
UVA	: Ultraviyole Absorbans
W	: Atıksu Akısı

ÖZET

Koza pişirme atıksuları (KPA) ve ipek ipliği pişirme (İPA) atıksularının özellikleri belirlenmiş, her iki atıksuda yüksek miktarlarda organik madde, katı madde, renk ve bulanıklık tespit edilmiştir. KPA'da 10 kDa ile 200 kDa arasında değişen serisin polipeptidlerinin varlığı tespit edilmiş; bunlar sırasıyla Serisin-1 (175-200 kDa), Serisin-2 (70-90 kDa), Serisin-3 (30-40 kDa) ve Serisin-4 (10-25 kDa) olarak adlandırılmıştır. İPA'ndaki serisinin molekül ağırlığı ise 110-120 kDa olarak bulunmuştur.

KPA için en uygun ön-arıtma işlemlerinin, santrifüj (3000-4000 rpm, 10 dak) + mikrofiltrasyon (MF 1 µm) olduğu sonucuna varılmıştır. İPA için en uygun ön-arıtma işlemi ise, santrifüj (3000-4000 rpm, 10 dak, pH 3,5) + cazibe ile çökeltme (4 °C, 24 saat) olarak bulunmuştur.

KPA'ndan serisin geri kazanımı için ön-arıtma sonrasında iki alternatif süreç geliştirilmiştir; 1. nanofiltrasyon + çökeltme, 2. nanofiltrasyon + diyaliz + çökeltme. İlk süreçte, %39-46 serisin içeriğine sahip olan serisin/ipekböceği proteini karışımı elde edilmiştir. İkincisinde ise NF'e ek olarak diyaliz uygulanmış ve saf serisin elde edilmiştir. Serisin geri kazanım verimi %76 olarak bulunmuştur. İPA ise, UF (5 kDa) membranı ile pH 3,5'te süzölmüş ve %59 oranında serisin geri kazanımı sağlanmıştır. KPA'nın UF ve NF ile süzölmeleri aşamalarında sırasıyla %58-88 ve %70-75 oranlarında ciddi akı azalmaları gözlenmiştir. Benzer şekilde, İPA'nda akı azalması %88 kadar yüksek olmuştur. Kimyasal yıkama işleminde 0,5 M NaOH ve 190-200 mg/L serbest klor kullanılmış, KPA için akılar %83-127 oranında iyileştirilirken, İPA için yalnızca %31 oranında iyileştirme sağlanabilmiştir.

KPA'dan geri kazanılan serisin ile paketleme sektörüne yönelik bir biyofilm hazırlanmıştır. Serisin ve polivinil alkol (PVA) değişen oranlarda karıştırılmış, elde edilen filmlerin oksijen geçirgenliği ve mekanik özellikleri belirlenmiştir. Serisinin oksijen geçirgenliğini oldukça artırdığı tespit edilmiştir. Filmlerin mekanik özellikleri ise paketleme malzemesi olarak kullanıma uygun bulunmuş; hazırlanan serisinli biyofilmin gıda dışı paketleme amacına uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Serisin ile deri yanık/yaralarının tedavisinde kullanılabilecek bir yanık/yara örtüsü geliştirilmiştir. Farklı oranlarda kollajen ve serisin içeren (1:0, 1:1, 2:1, 1:2, 1:3, 1:4) membranlar dökme yöntemiyle iki farklı kalınlıkta hazırlanmış ve glutraldehit ile çapraz bağlanarak dayanımları artırılmıştır. Bu membranların deri yara/yanık örtüsü olarak su tutma, su buharı ve oksijen geçirgenliği, mikrobiyal bariyer özelliği, zamana karşı bozunma hızı,

mekanik ve biyouyumluluk özellikleri incelenmiştir. Yüksek serisin oranındaki membranların (1:3 ve 1:4) dayanımlarının az olduğu ancak diğer grupların ideal yara/yanık örtüsü özelliklerine sahip oldukları gözlenmiştir. Hazırlanan ince membranların çekme kuvvetinin kalın membranlardan daha az olduğu ve daha kısa sürede bütünlüğünü kaybettiği görülmüştür. Sonuç olarak membranların yara/yanık derecesine ve hedeflenen iyileşme süresine göre farklı oranlardaki gruplarla klinik uygulamalarının çok başarılı sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, Geri kazanım, Membran süzme işlemi, Serisin, Yara/yanık örtüsü

ABSTRACT

The cocoon cooking wastewaters (CCW) and silk degumming wastewaters (SDW) were characterized first, where both wastewaters contained high organic matter, total solids, color and turbidity. It was determined that CCW contained sericin polypeptides ranging from 10 kDa to 200 kDa; which were named Sericin-1 (175-200 kDa), Sericin-2 (70-90 kDa), Sericin-3 (30-40 kDa) and Sericin-4 (10-25 kDa), respectively. The MW of sericin in SDW was found as 110-120 kDa.

The most suitable pre-treatment method for CCW was found as centrifugation (3000-4000 rpm, 10 min) + microfiltration (MF) (with a membrane having a pore size of 1 μm). The most suitable pre-treatment method for SDW was found as centrifugation (3000-4000 rpm, 10 min, pH 3.5) + gravity settling (4 $^{\circ}\text{C}$, 24 h).

After applying the pre-treatment method for CCW, two alternative process trains were developed; 1. nanofiltration + precipitation, 2. nanofiltration + dialysis + precipitation. In the first process, a sericin/silkworm protein mixture was obtained with a sericin content of 39-46%. In the second one, however, a pure sericin product was obtained. The sericin recovery efficiency was found as 76%. For SDW, UF (5 kDa) membrane achieved 59% sericin recovery at pH 3.5. During filtration of CCW, severe flux declines of 58-88% and 70-75% occurred in UF and NF, respectively. Similarly, a severe flux decline of 88% occurred for UF of SDW. A chemical cleaning using 0.5 M NaOH and 190-200 mg/L free chlorine achieved 83-127% flux recovery for CCW, whereas a flux recovery of only 31% was achieved for SDW.

The sericin recovered from CCW was used to make a biofilm for food packaging industry. The oxygen permeability and mechanical properties were determined. In these films, sericin was blended with polyvinyl alcohol (PVA) and the oxygen permeability of sericin-based films were realized to be much higher as compared to pure PVA films. The mechanical properties were found suitable for packaging purposes. These results revealed that sericin-based biofilms are not suitable for food packaging sector but may be used for non-food packaging purposes.

Sericin was used in making a wound dressing for healing of burns/wounds. Collagen and sericin containing membranes were prepared at different ratios (1:0, 1:1, 2:1, 1:2, 1:3, 1:4) in two different thicknesses by solvent casting method. The stability of the membranes were

enhanced by crosslinking with gluteraldehyde. These membranes were evaluated for their water holding capacity, water vapour and oxygen permeability, microbial barrier property, time dependent degradation rate, mechanical suitability and biocompatibility as a wound dressing material. High sericin involving groups (1:3 and 1:4) showed less stability whereas all other composite groups were in ideal wound dressing properties. Also the thin membranes showed less tensile strength and disintegrated in a shorter period of time compared to the thick ones. As a result the membranes were found to have high potential for clinical applications in all ratios of sericin and collagen depending on the degree of the wound and the expected healing period.

Key words: Biofilm, Membrane filtration, Recovery, Sericin, Wound dressing

1. GİRİŞ

Türkiye için en önemli endüstrilerden birisi olan tekstil sanayii, çevreye verdiği zararlar açısından dikkat çeker niteliktedir. Tekstilde doğal (yün, pamuklu, ipek) ve sentetik iplik ve kumaşların farklı yöntemlerle işlendiği pek çok alt sektör mevcuttur. Bu işlemlerde oldukça yüksek miktarlarda (40-600 L/kg ürün) ve çoğunlukla yeraltı suyu kalitesinde sular kullanılmakta ve içerisinde çeşitli boyalar, yüzey aktif maddeler ve tuzlar bulunan karmaşık yapıda atıksular ortaya çıkmaktadır.

Çevre kirliliğini azaltmak veya kontrol altında tutmak amacıyla günümüze kadar süregelen geleneksel yaklaşım gereği, doğadan alınan hammaddelerin ürünlere dönüştürülme sürecinde ortaya çıkan atıksular çeşitli arıtma yöntemleriyle belirli oranlarda temizlenerek tekrar doğaya bırakılmaktadır. Diğer taraftan, dünyanın hızla artan nüfusuna karşın giderek azalan doğal kaynaklarının daha akıllıca kullanılması gerekliliğine paralel olarak “sürdürülebilir kalkınma” ve “temiz üretim” kavramları ortaya çıkmış ve geleneksel “arıt-uzaklaştır” yaklaşımına alternatif olarak endüstrilerde “entegre kirlilik yönetimi” yaklaşımının benimsenmesi ihtiyaç haline gelmiştir.

Avrupa Birliği'ne üyelik sürecinde ülkemizin çevre konusunda yerine getireceği mevzuat uyumlaştırma ve uygulama çalışmalarının boyutu göz önüne alındığında, endüstriyel üretim süreçlerinde atık oluşumunu en aza indirecek ve değerli hammaddelerin geri kazanımını sağlayacak teknolojilerin uygunması oldukça önem arz etmektedir. Bu bağlamda, tekstil sanayii Türkiye için önemli bir endüstri dalı olması ve tekstil atıksularının çevreye olumsuz etkileri nedeniyle proje kapsamında ele alınmıştır.

Yürütülen projenin konusu tekstilin bir alt sektörü olan ipek üretiminde ortaya çıkan ve değerli bir hammadde olmasına rağmen halen atılan serisin proteininin membran teknolojisi ile geri kazanılması ve serisinin yeniden kullanım olanaklarının araştırılmasıdır. Membran teknolojisi, son yıllarda uygulama alanları hızla artan bir ileri arıtma yöntemidir. Membranlar, atıksulardan boyar madde, metal, su, protein gibi değerli hammaddelerin geri kazanılmasında üstün ayırma özellikleri sayesinde başarıyla kullanılmaktadır. Ancak, konvansiyonel yöntemlere kıyasla hala pahalı olmaları ve çabuk tıkanmaları/kirlenmeleri nedeniyle yaygınlaştırılmaları kolay olmamaktadır. Bu proje kapsamında, basınç altında çalışan mikrofiltasyon (MF), ultrafiltasyon (UF) ve nanofiltasyon (NF) membranları kullanılmıştır. KPA ve İPA için ön-arıtma ve geri kazanım aşamalarını kapsayan en uygun membranlı süreçler belirlenmiştir. Akı azalmaları değerlendirilmiş ve kimyasal yıkama ile

akıların geri kazanılabilirliği araştırılmıştır. En uygun süreç belirlendikten sonra serisin toz halde geri kazanılmış ve özellikleri standart serisin ile karşılaştırılarak, kalitesi değerlendirilmiştir.

Serisinin, kozmetik ve ilaç sanayiinde pek çok kullanım alanına sahip olduğu ve ayrıca biyomalzeme olarak kullanılabilirdiği bilinmektedir. Serisinin, doğrudan kozadan elde edilerek veya atıksudan geri kazanılarak bahsedilen alanlarda kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır.

Proje önerisinde hedeflendiği üzere, ipek işleme atıksularından geri kazanılan serisin ile iki biyo-bazlı malzeme üretimi çalışılmıştır. Bunlardan birincisi, gıda paketlenme sektörüne yönelik bir biyofilm, ikincisi ise yanık/yara örtüsüdür. Son yıllarda biyobozunur filmlerin ve kaplamaların üretilmesinde biyolojik polimerlerin kullanılması yaygınlaşmıştır (GONTARD ve GUILBERT, 1994; KROCHTA ve DE MULDER-JOHNSTON, 1997; KAYSERİLİOĞLU vd., 2003). Bu filmler gıda sektöründe yiyeceklerin raf ömrünü uzatmak, oksijen ve karbondioksit geçirgenliğini ve nem kaybını kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır (FAKHURI vd., 2004).

Saf serisinden üretilen membranların yeterince esnek olmamaları nedeniyle serisinin diğer maddelerle karıştırılması gerekmektedir. Serisinin yapısında nötr kutupsal fonksiyonel gruplara sahip büyük miktarda amino asitler mevcut olduğundan, serisin içeren membranlar oldukça hidrofiliktir. Serisin suda çözünebilen polimerlerle, özellikle polivinil alkol (PVA) ile iyi karışım sağlamaktadır. Serisin ve PVA karışımından elde edilen bir hidrojel mükemmel nem tutma-bırakma ve elastisite özellikleri göstermiştir (YOSHII vd., 2000). Bu nedenle, proje kapsamında üretilen biyofilm de serisin ve PVA'nın belirli oranlarda karıştırılması ile hazırlanmıştır.

Gıda paketlenme malzemesi olarak kullanılan filmlerde yeterli mekanik kuvvet, oksijen ve neme dayanıklılık önemli özelliklerdir (DOLE vd., 2004; TANADA-PALMU, 2000; PARRA vd., 2004). Diğer bir deyişle, bu malzemelerin darbelere dayanıklı, nem ve oksijeni geçirmez olmaları beklenmektedir. Ancak, yüksek nem ortamında oksijen geçirimi artabilmektedir. Bu durum, ürün kalitesini ve raf ömrünü olumsuz etkileyecek sonuçlar doğurmaktadır. Bu nedenle, gıda paketlenmesi olarak kullanılacak bir filmin hangi malzemeden yapıldığı büyük önem taşımaktadır. Proje kapsamında saf PVA ile hazırlanan filmlerin oksijen geçirimsiz oldukları tespit edilmiştir. Ancak, serisinin oldukça düşük miktarlarda karıştırılması dahi, filmlerin oksijen geçirgenliğini önemli derecede artırmıştır. Hazırlanan filmlerin mekanik

özellikleri ise paketleme malzemesi olarak kullanıma uygunluk göstermiştir. Bu sonuçlar, serisinin gıda dışı paketleme amacıyla kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu projede, yara-yanık örtüsü olarak serisin ve kollajenin birlikte kullanılmasıyla biyokompozit membranlar hazırlanmış ve özellikleri incelenmiştir. Hazırlanan membranların yara-yanık tedavisine olumlu gelişim getireceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra içeriğinde bulunan serisinin doğal bir ürün olması ve projenin daha önceki kısımlarında belirtilen yöntemlerle ipek ipliği atıksularından veya koza pişirme atıksularından gerikazanılabilir olması üretilen membranların biyomedikal bir ürüne dönüştürülme potansiyelinin bulunduğunu göstermektedir. Projede oluşturulan biyokompozit membranların yapısındaki malzemeler grubumuzca daha önce çalışılmamış olmasına rağmen bunlarla ilgili çok miktarda literatür bilgisi ve uygulama tecrübesi kazanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İpek İşleme Atıksularının Özellikleri

Tekstil endüstrisi dünyadaki en önemli ve en büyük endüstrilerden birisidir. Yüksek hacimlerde su tüketimi ve oldukça çeşitli özellikte kimyasal madde kullanımı ile dikkat çeken tekstil endüstrisi, çevresel etkileri açısından da önemli bir yere sahiptir (BARREDO-DAMAS vd., 2006; FERSI vd., 2005; TÜFEKÇİ vd., 2007). Bunlara ek olarak, tekstil endüstrisinde çok sayıda alt sektör mevcuttur; bu da oldukça farklı debilerde ve kirletici özellikte atıksuların üretilmesi anlamına gelmektedir. Tekstil atıksularının karmaşık yapısı nedeniyle, bütün alt sektörlerle uygun olacak bir arıtma yöntemi geliştirmek oldukça zordur. Bu nedenle, her alt sektörün ayrı ele alınması gerekmektedir.

İpek işleme, tekstil endüstrisinin bir alt sektörüdür. İpek işleme işlemleri arasında koza üretimi, ipek ipliğinin sarılması, boyama ve son ürünlerin dokunması sayılabilir. Bu aktiviteler sonucunda koza pişirme, ipek ipliği yumuşatma ve boyama atıksuları ortaya çıkmaktadır. İpek işlemede ilk olarak ipekböceklerinin kozayı delmeden ölmesi ve ipek iplikçiklerinin kozadan ayrılmaya başlaması amacıyla koza pişirme işlemi yapılır. Bu işlemde kozalar sıcak suda yaklaşık 45 dakika kaynatılır. İpek iplikçikleri, serisin adı verilen ve yapışkan olan bir protein ile kaplıdır. Serisinin, boyama öncesinde ipekten ayrılması gerekmektedir. İpek ipliği yumuşatma işleminde, ipek ipliği saf zeytinyağı sabunu ve sodyum karbonat içeren kaynar su dolu bir tankta 2-3 saat bekletilerek serisin uzaklaştırılır. Serisin suda çözünen bir protein olduğundan, bu işlemde ipek ipliği ağırlığının %25-27'sini kaybeder. Bu da yumuşatma atıksuyu ile birlikte atılan serisin miktarına eşittir. İpek işleme endüstrisinde, her bir kg ürün için 50-240 litre su tüketilmektedir (EWA, 2005). Bu oranın, diğer tekstil alt sektörleri ile kıyaslandığında orta seviyede olduğu söylenebilir.

Tekstilin bazı alt sektörlerine ait atıksu özellikleri Tablo 2.1'de verilmiştir (BTTG, 1999; ÇAPAR, 2005; GEÇİT vd., 2007a; KIM CHI, 2005; VAITHANOMSAT vd., 2008). Görüldüğü üzere, KPA ve İPA'nda, diğer alt sektörlerle kıyasla oldukça yüksek miktarlarda organik madde, katı madde, renk ve bulanıklık bulunmaktadır. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), KPA'nda 11-17 g/L, İPA'nda ise 55-63 g/L'dir. Serisin içeriği ise sırasıyla 5-8 g/L ve 27-34 g/L olarak bulunmuştur. Bu veriler, her iki atıksuyun da alıcı ortama deşarj edilmeden önce arıtılması ve deşarj limitlerinin sağlanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 2.1. Tekstil atıksularının özellikleri

Parametre	Değer				
	Koza pişirme	İpek ipliği pişirme	Dokuma kumaş sonlandırma	İplik boyama	Halı üretimi
KOİ (g/L)	11-17	50-60	0,1-1	0,8	0-4
Renk (Pt-Co)	4000-8000	20000-30000	-	-	10-700
Bulanıklık (NTU)	400-1000	4000-4200	-	-	0-70
TKM (g/L)	12-13	30-40	-	-	0,6-0,9
T. protein (g/L)	7-9	40-45	-	-	-
Serisin (g/L)	5-8	27-34	-	-	-
Sıcaklık (°C)	90-100	90-100	30-40	25-50	30-40
pH	5-6	7-9	7-9	5-9	6-8

Türkiye’de ipek böcekçiliği yoğun olmasa da, halen Bursa ve Bilecik illerinde yürütülen yardımcı bir tarımsal faaliyettir. İpek ihtiyacının büyük bir bölümü ise yurtdışından karşılanmaktadır. İthal edilen ham ipek ipliği ülkemizde boyanmakta ve ürüne dönüştürülmektedir. Dolayısıyla, yürütülen proje kapsamında serisin geri kazanımı için Bursa’da faaliyet gösteren bir boyahaneden temin edilen ipek ipliği pişirme atıksuları ile Bilecik’te sonbahar mevsiminde gerçekleştirilen koza çekimi işleminden çıkan KPA kullanılmıştır. Bu işlem Bilecik’in Söğüt İlçesi’nde köylüler tarafından yapılmaktadır (AKDAĞ, 2006). İPA ise, Bursa’da faaliyet gösteren Batmaz Tekstil tesisinde haftada bir veya iki gün gerçekleştirilen yumuşatma işleminden kaynaklanmaktadır. Tesisde yılda 70-80 ton ipek ipliği boyanmaktadır. Tesisde bulunan pişirme tankının hacmi 5000 L’dir ve bu tank içinde 150-200 kg iplik pişirmek için 50-75 kg sabun ve yaklaşık 3 kg soda kullanılmaktadır. Pişirme tankı bir defa doldurulduğunda 3 defa ardarda pişirme yapılabilen, diğer bir deyişle 5000 L suda 550-600 kg ipek ipliği yumuşatılabilmektedir (SİPAHİOĞLU, 2007). Dolayısıyla pişirme tankından çıkan suda bir defa pişirme yapıldığında 50 kg, üç defa pişirme yapıldığında ise 150 kg serisin bulunması beklenmektedir. Bu da, atıksu örneklerinde serisin derişiminin yaklaşık 10 g/L ile 30 g/L arasında olacağını göstermektedir. Türkiye’de koza pişirme ve ipek ipliği yumuşatma işlemlerinden çıkan atıksuların debisi, 1875 L/gün (yılın 80 günü boyunca) ve 1100 L/gün olarak hesaplanmıştır.

Tekstil atıksuları için deşarj limitlerini sağlayacak pek çok konvansiyonel arıtma yöntemi mevcuttur. Bunlardan bazıları, biyolojik arıtma, fiziko-kimyasal yöntemler, aktif karbon adsorpsiyonu, ozon ve hidrojen peroksit gibi reaktifler ile kimyasal oksitleme yöntemidir. Doğrudan ipek ipliği üretimi sektörü için geçerli olan deşarj standartları bulunamadığından, Tablo 2.2'de iplik üretimi ve sonlandırma işlemlerinden çıkan tekstil atıksuları için geçerli olan limit değerler verilmiştir (SU KİRLİLİĞİ KONTROLÜ YÖNETMELİĞİ, 2004). Bu değerler, Tablo 2.1'de verilen atıksu özellikleri ile karşılaştırıldığında, deşarj standartlarının karşılanması için oldukça yüksek verimde çalışacak bir yöntemin seçilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Tablo 2.2. İplik dokuma ve sonlandırma işlemlerinden kaynaklanan tekstil atıksuları için deşarj standartları

Parametre	Birim	Kompozit örnek (2 saat)	Kompozit örnek (24 saat)
KOİ	(mg/L)	350	240
Amonyum azotu (NH ₄ -N)	(mg/L)	5	-
Serbest klor	(mg/L)	0,3	-
Toplam krom	(mg/L)	2	1
Sülfür (S ⁻²)	(mg/L)	0,1	-
Sülfid	(mg/L)	1	-
Yağ ve gres	(mg/L)	10	-
Balık biyodeneyi	-	4	3
pH	-	6-9	6-9

Endüstriyel aktivitelere bağlı olarak artan çevre sorunlarına paralel olarak doğal kaynakların giderek azalması ve çevreye duyarlılığın artması nedeniyle, geleneksel yöntemlere alternatif olarak ileri arıtma yöntemleri ilgi çekmektedir. Bu bağlamda, sürdürülebilir kalkınma yaklaşımı giderek benimsenmiş; sanayiciler, atılan değerli doğal kaynakların geri kazanılması ve yeniden kullanılması konusunda çeşitli arayışlara girmiştir. Son yıllarda bu konuda yapılan araştırma çalışmaları da hız kazanmıştır.

İleri arıtma yöntemlerinden birisi olan membran teknolojisi, endüstriyel atıksulardan değerli hammadde geri kazanımı konusunda oldukça umut vaatmektedir. Membran süzme işlemlerinin tekstil endüstrisinde giderek yaygınlaşan uygulamaları vardır. Ayrıca protein

ayırımı konusunda da membran teknolojisi uygulanmaktadır. Ancak, hala konvansiyonel yöntemlere kıyasla pahalı olması, kirlenme ve konsantrasyon polarizasyonu sonucunda süzüntü suyu akılarının azalması, en önemli dezavantajları olarak sayılabilir. Özellikle protein ayırımında, membran tıkanması verimi olumsuz etkileyen kritik bir süreçtir (KWON vd., 2008). Buna rağmen, yüksek ayırım performansına sahip olması ve su, protein gibi değerli maddelerin geri kazanımını sağlaması gibi avantajları nedeniyle kullanımı yaygınlaşmaktadır (FERSI vd., 2005).

İpek işleme atıksularında bulunan serisin değerli bir protein olmasına rağmen halen atılmaktadır. Serisin, yüksek oranda nem tutma/bırakma özelliği, antibakteriyel ve antioksidan olması ve ultraviyole ışınlarla gösterdiği direnç gibi nedenlerle gıda, kozmetik ve ilaç sanayiinde ve ayrıca biyomalzeme üretiminde kullanılmaktadır (FABIANI vd., 1996; RIGUERIO vd., 2001; SHEN vd., 1998; WU vd., 2007). Serisinin önemi, oldukça yüksek olan piyasa değerinden de anlaşılabilir (bir gramı yaklaşık 80-90 €). Dünyada koza üretimi yaklaşık 1 milyon tondur, bu da yaklaşık 400000 ton kuru kozaya eşittir. Bu miktarda kozanın işlenmesi ile yaklaşık 50000 ton serisin geri kazanılabilir (ZHANG, 2002). Bu bilgiler, serisin geri kazanımı ile hem çevresel hem de ekonomik faydalar elde edileceğini açıkça göstermektedir.

2.2. Serisinin Özellikleri

Serisin, *Bombyx mori* ipek böceğinden elde edilen doğal bir makromoleküler proteindir. Molekül ağırlığı 10 kDa ile 300 kDa arasında değişen bir protein ailesi olarak tanımlanmaktadır (FABIANI vd., 1996; ZHANG, 2002). WU ve diğerleri (2007), serisinin ana kompozisyonunun protein olduğunu belirtmiştir. Şeker derişimi yalnızca %1, kül miktarı ise %4,2 olarak tespit edilmiştir. Bu veri, serisinin muhtemelen tuz içerdiğine işaret etmektedir.

Serisin oda sıcaklığında kısmen jelleşmiş sıvı halinde bulunmaktadır. Düşük olan akışkanlığı, sıcaklığa ve pH'a bağlı değişmektedir. Molekül ağırlığı (MA) 60 kDa'dan az olan, genelde 5 kDa'ın altında olan serisin polipeptidleri soğuk suda çözünmektedir. Bu peptidler, mükemmel nem tutma ve bırakma özelliği, antioksidasyon gibi biyolojik aktiviteler, farmakolojik fonksiyonlar, anti-kanser aktiviteler ve sindirimi kolaylaştırma gibi özelliklere sahiptir (TAMADA, 1997, SASAKI vd., 2000; ZHAORIGETU vd., 2001). Molekül ağırlığı 60 kDa ile 300 kDa arasında olan diğer polipeptidler ise sıcak suda çözünebilmektedirler (ZHANG vd., 2002).

Serisin oldukça hidrofilik bir proteindir. Serisin, Ser1 ve Ser2 adlı iki serisin geninin birincil kopyalarının alternatif biçimde bağlanmaları ile oluşan farklı uzunlukta en az altı proteinden oluşmaktadır. ExPASy protein veritabanında serisin Ser1 ve Ser2 olarak tanımlanmaktadır. Ser1 geni, kompozisyonu ortalama serisin kompozisyonuna çok yakın olan ve yüksek oranda hidroksil amino asit içeren 38 amino asit motifinin pek çok tekrarından oluşan çeşitli polipeptidleri kodlamaktadır (GAREL vd., 1997). Amino asit modelinin mol bazında %73'ünü hidroksil (serin, treonin, tirozin), asidik (aspartik asit, glutamik asit) ve bazik (lizin, histidin, arginin) amino asitler oluşturmaktadır. Glisin ve alanin ise mol bazında yalnızca %20'sini oluşturmaktadır. Diğer amino asitler ise çok az miktarlarda bulunmaktadır.

Serisin küresel bir proteindir. Molekül ağırlığı (KIM, 2007) Şekil 2.1'de, bazı amino asitlerinin yapısı ise (MORRISON ve BOYD, 1992) Tablo 2.3'te verilmiştir. Serin ve treonin, antioksidan aktivite gibi serisin fonksiyonellik mekanizması ile ilgili olduğundan önemlidir (Kato vd., 1998). Bunlara ek olarak, WU ve diğerleri (2008) hidrofilik amino asitlerin %76'ya ulaştığını, bu nedenle serisinin iyi su emme ve çözünme özelliklerine sahip olduğunu belirtmiştir. Amino asitlerin bir kısmı polar, diğerleri apolar yan gruplara sahiptir. Böylece, serisinin yapısında hem hidrofilik hem de hidrofobik elemanlar mevcuttur (WEI vd., 2005). Kozadan çıkarılan ve ipek ipliğinden izole edilen serisin örneklerinin izo-elektrik noktaları (pI), 4,3 ve 5 olarak bulunmuştur (KURIOKA vd., 2002; MONDAL vd., 2007).



Şekil 2.1. Serisinin moleküler formülü

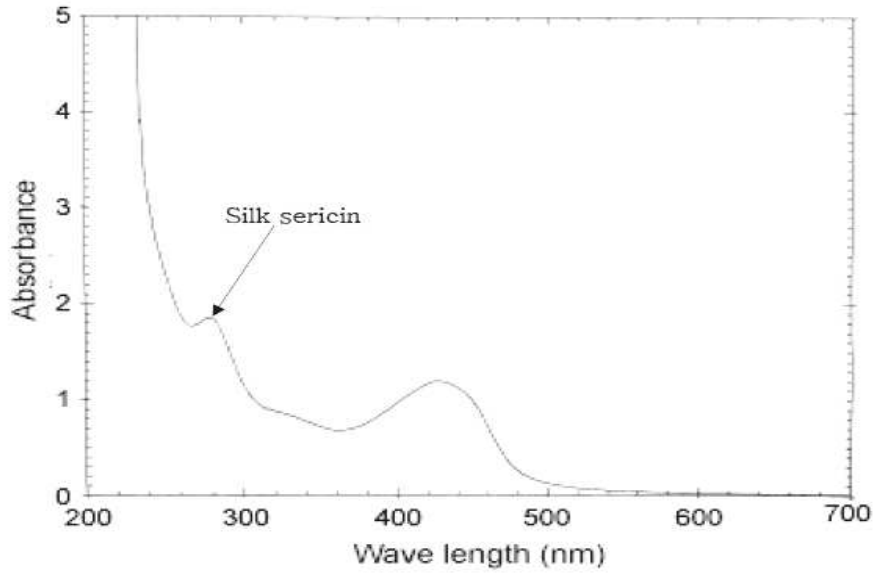
Tablo 2.3. Serisinin bazı amino asitlerinin yapısı

Amino Asit	Yapısı	Amino Asit	Yapısı
Aspartik Asit	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Metionin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Treonin	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3\text{CHCHCOOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	İzolesin	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCHCOOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Serin	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOCH}_2\text{CHCOOH} \end{array}$	Lesin	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Glutamik Asit	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \end{array}$	Lizin	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Glisin	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$	Arginin	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{NCNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH} \end{array}$
Alanin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Sistin	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{SH} \end{array}$

Serisin dizey-yardımlı lazer desorpsiyon/ionizasyon kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) ile tanımlanabilmektedir. MALDI-TOF MS ile biyomoleküller kütle/yük oranlarına göre ayrılırlar. Bu yöntem, proteinler, peptidler, oligosakkaritler gibi moleküler kütleleri 0,4 kDa ile 350 kDa arasında olan biyomoleküllerin tespit edilmesi ve karakterizasyonu için kullanılmaktadır.

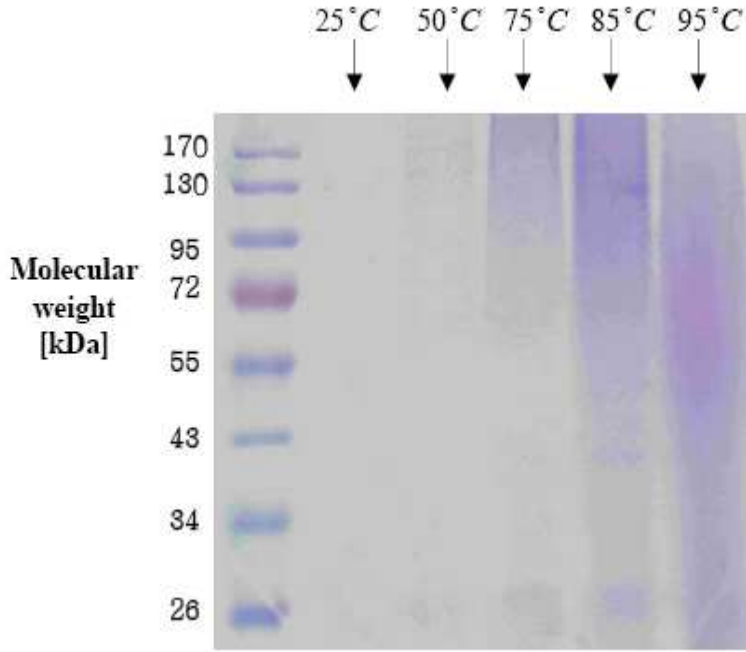
Serisin, karbon (C), azot (N), hidrojen (H) ve sülfür (S) içerikleri elementel analiz ile belirlenebilir. Bir çalışmada serisinin C, H ve N içerikleri %43, %6 ve %17 olarak bulunmuştur (WHEMELL, 1941).

Proteinler UV bölgesinde iki absorbans tepesi vermektedir, birincisi peptid bağlarının 215-230 nm arasında ışığı soğurması, ikincisi ise aromatik amino asitlerin 280 nm civarında ışığı soğurmasından kaynaklanmaktadır (BİYOTEKNOLOJİ PROJESİ, 2008). Şekil 2.2'de serisinin 280 nm'de verdiği tepe görünmektedir (KIM, 2007).



Şekil 2.2. Serisinin soğurma spektrumu

Serisinin molekül ağırlığı sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlenebilir. Şekil 2.3'te örnek bir dağılım gösterilmektedir (KIM, 2007). Görüldüğü üzere, serisinin molekül ağırlığı 26 kDa ile 170 kDa arasında değişmektedir. Diğer yandan, WU ve diğerleri (2007) serisinin molekül ağırlığını 14-467 kDa olarak bulmuştur. Literatürde verilen farklı sonuçlar, sıcaklık, pH, süre gibi değişen işlem koşullarından kaynaklanmaktadır.



Şekil 2.3. Serisine ait elektroforez resmi (SDS-PAGE, %10 jel)

2.3. Serisin Geri Kazanım Yöntemleri

Molekül ağırlığı 60 kDa'dan küçük olan serisin polipeptidleri ham ipek üretiminin erken aşamalarında, daha büyük olan (60-300 kDa) peptidler ise daha sonra ye alan ipek işleme veya yumuşatma işlemlerinde geri kazanılabilmektedir (ZHANG vd., 2006). Literatürde, ipek atıksularından serisin geri kazanımı konusunda oldukça az çalışma vardır (FABIANI vd., 1996; VAITHANOMSAT vd., 2007; WU vd., 2007). FABIANI ve diğerleri (1996) ipek yumuşatma atıksuyundan serisin geri kazanımı için ultrafiltrasyon (UF) işlemini uygulamış ve molekül ağırlık ayırma sınırı (MAAS) 15-30 kDa olan UF membranları ile %97'nin üzerinde serisin geri kazanımı sağlamıştır. Bunun yanında, membran geçirgenliğinde zamanla membran yüzeyinde oluşan jel tabaka nedeniyle azalma gözlenmiştir. Ancak kimyasal yıkama ile en az %90 oranında akı geri kazanımı sağlanmıştır.

Bir diğer çalışmada, VAITHANOMSAT ve diğerleri (2007), atıksu arıtımı ve serisin geri kazanımı için membran filtrasyonu ve enzimatik hidroliz denemiştir. Sonuçlar, atıksu kalitesinin iyileştiğini ve molekül ağırlığı 2427-9863 Da olan serisin proteininin geri kazanıldığını göstermiştir. Elde edilen serisinin molekül ağırlığı, kozmetik uygulamalara daha uygun olması amacıyla enzimatik hidroliz ile 1046-2795 Da'a düşürülmüştür. Atıksuyun bir kısmı doğrudan dondur-kurut yöntemiyle, diğer kısmı ise MAAS'ı 20-80 kDa olan UF

membranları ile konsantre edilmiştir. Uygulanan UF yöntemi ile 2427-9863 Da büyüklüğünde serisin, %94 verimle elde edilmiştir.

Membran çalışmalarına ek olarak, WU ve diğerleri (2007) ipek atıksuyundan etanol kullanarak serisini çökeltilmiştir. Molekül ağırlığı 14-467 kDa olan toz serisin, hacimsel bazda %75 etanol kullanılarak elde edilmiştir. Bu yöntemin daha çok laboratuvar ölçekli çalışmalar için uygun olduğu, yüksek etanol hacmi gerektirmesi nedeniyle endüstriyel ölçekte çevre dostu bir yöntem olmadığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, değerli bir protein olmasına rağmen, serisinin halen ipek işleme atıksuları ile birlikte bertaraf edilmesi, ekonomik bir kayba ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. Türkiye’de her yıl yaklaşık olarak 12 ton serisin ziyan edilmektedir. Yürütülen proje kapsamında, serisinin koza pişirme ve ipek ipliği pişirme atıksularından membrane teknolojisi ile geri kazanımı için uygun süreçler belirlenmiştir. Bu sonuçların en kısa sürede pilot ölçekli çalışmalar ile geliştirilmesi ve endüstriyel ölçekte uygulanması ile ülkemize hem çevresel hem de ekonomik fayda sağlanacaktır.

2.4. Serisinli Biyofilm Hazırlanması

Serisin kozmetik ve ilaç sanayiinde pek çok kullanım alanına sahiptir. Ayrıca biyomalzeme olarak kullanımı önerilmektedir (ZHANG, 2002; ALTMAN vd., 2003; CHO vd., 2003; MORI ve TSUKADA, 2000; ANNAMARIA vd., 1998; NOMURA vd., 1995; HATAKEYAMA, 1996; KABAYAMA, 2000; HIROTSU ve NAKAJIMA, 1988; MIZOGUCHI vd., 1991; YAMADA ve FUWA, 1993; YOSHIKAWA vd., 2001). Genellikle, molekül ağırlığı 20 kDa’dan küçük olan serisin peptidleri kozmetikte cilt ve saç bakımı ürünlerinde ve sağlıkla ilgili diğer ürünlerde kullanılmaktadır. Molekül ağırlığı 20 kDa’dan büyük olan serisin peptidleri ise çoğunlukla tıbbi biyomalzeme, hidrojel, fonksiyonel ip ve kumaşlarda kullanılmaktadır (ZHANG, 2002).

Serisin özellikle polyester ve poliamid gibi yapay polimerlerin geliştirilmesinde yararlıdır. Ayrıca, doğal ve yapay ip ve kumaşlarda kaplama veya karışım malzemesi olarak da kullanılmaktadır. Serisini diğer reçinelerle karıştırarak çevre dostu ve biyobozunur polimerler üretilebilir (ANNAMARIA, 1998). Serisin içeren poliüretan köpükler mükemmel nem tutma ve bırakma özelliklerine sahiptir. Serisin içeren poliüretan bir köpüğün, serisin içermeyen köpüğe kıyasla 2-5 kat daha fazla nem tutabildiği rapor edilmiştir (NOMURA vd., 1995). Ayrıca serisin içeren poliüretan bir köpüğün mükemmel mekanik ve termal özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir (HATAKEYAMA, 1996).

Serisinin bir diğere uygulama alanı ise membran üretimidir. Sudan tuz ayırımı, ultra saf su üretimi, biyoproses işlemler, kimyasal işlemler ve atıksu geri kazanımı gibi pek çok alanda uygulanan membran ayırma proseslerinde çeşitli özelliklerde membranlar kullanılmaktadır. Bu membranlar genelde sentetik polimerlerden yapılmaktadır. Membranların, üstün ayırma yetenekleri ile hızla kullanım alanları genişlemektedir. Ancak membranlar, belirli sıcaklık, pH, basınç vb. koşullarda kullanılabilirlerdir. Membranlarda bir diğere problem ise zamanla akı (birim zamanda birim yüzey alandan geçen sıvı miktarı) azalması meydana gelmesidir. Membran yüzeyinin ve gözeneklerinin tıkanması ile süzülen sıvı miktarında zamanla azalma olmakta, bu da operasyona ara vermeyi ve membranı temizlemeyi gerektirmektedir. Temizlik aralıklarının sık olması membran ömrünü kısaltmakta ve proses ekonomisini olumsuz etkilemektedir. Ayrıca, kirlenici maddelerin membran yüzeyine adsorpsiyonu durumunda, temizleme işlemi ile akının tamamen geri kazanılması mümkün olmayabilmektedir. Membran performansını daha iyileştirmek ve operasyonel kısıtlamaları azaltmak amacıyla yeni membranların üretilmesi konusunda çalışmalar sürmektedir.

Saf serisinden üretilen membranların yeterince esnek olmamaları nedeniyle serisinin diğere maddelerle karıştırılması gerekmektedir. Serisinin yapısında nötr polar fonksiyonel gruplara sahip büyük miktarda amino asitler mevcut olduğundan, serisin içeren membranlar oldukça hidrofildir. Serisin kompozit membranlar su ve organik sıvı karışımlarında suya karşı yarı-geçirgen özellik göstermektedirler. Serisin içeren bir membranın alkol-su karışımından alkolü ayırdığı ve membranın yeniden kullanılabilirliği rapor edilmektedir (MIZOGUCHI vd., 1991). YOSHIKAWA ve diğere (2001) ise ortalama molekül ağırlığı 20 kDa olan serisin kullanarak eter-alkol karışımını ayırabilen bir jel malzeme hazırlamışlardır.

Serisin kullanılarak fonksiyonel biyomalzemeler üretilmektedir. Bu malzemeler, genelde kompozit film olarak hazırlanmaktadır. Serisin suda çözünebilen polimerlerle, özellikle polivinil alkol (PVA) ile iyi karışım sağlamaktadır. Serisin ve PVA karışımından elde edilen bir hidrojel mükemmel nem tutma-bırakma ve elastisite özellikleri göstermiştir (YOSHII vd., 2000). Bu hidrojel, tohum kültüründe, toprak şartlandırmada, tıbbi malzeme veya yara sargısı olarak kullanılabilir. PVA ve serisinden elde edilen bir hidrojin yüksek nem tutma kapasitesi ve dayanıklılığa sahip olması nedeniyle fonksiyonel bir film olarak kullanılabilirliği açıklanmıştır (NAKAMURA ve KOGA, 2001). Serisin kaplı filmler ayrıca soğutma cihazlarının yüzeyini kaplamada kullanılmaktadır (TANAKA, 2001). Serisin filminin kaplama olarak kullanılması ile buzdolaplarında ve derin dondurucularda buzlanma etkin bir şekilde önenebilir (ZHANG, 2002).

Literatürdeki örnek çalışmalar, serisinin faydalı bir malzeme olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Bu çalışmalara ek olarak, serisinin doğal bir protein olarak gıda ürünlerinin kaplanması için kullanılmak üzere biyofilm üretiminde de kullanılabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda biyobozunur filmlerin ve kaplamaların üretilmesinde biyolojik polimerlerin kullanılması yaygınlaşmıştır (GONTARD ve GUILBERT, 1994; KROCHTA ve DE MULDER-JOHNSTON, 1997; KAYSERİLİOĞLU vd., 2003). Bu filmler gıda sektöründe yiyeceklerin raf ömrünü uzatmak, oksijen ve karbondioksit geçirgenliğini ve nem kaybını kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır (FAKHURI vd., 2004). Benzer şekilde, biyomalzeme üretiminde de sentetik polimerlerin yanısıra doğal polimerlerin kullanılabilirliği araştırılmakta, özellikle de doku mühendisliği ve kontrollü ilaç salımı alanlarında uygulamalar dikkat çekmektedir. Doğal polimerlerin, sentetik olanlara kıyasla biyoyumluluk ve biyobozunurluk gibi pek çok avantajı mevcuttur (GILBERT vd., 2005).

Doğal polimer olarak kullanılan malzemelere örnek olarak nişasta, glüten, ksilen, peynir altı suyu sayılabilir. Birden fazla polimerin kullanılması ile hazırlanan kompozit filmlerde mekanik özellikler ve oksijen ile su buharı geçirgenliği iyileştirilebilmektedir. Serisinin yüksek nem tutma, oksijen geçirgenliği ve elastisite gibi özellikleri dikkate alındığında, biyofilm hazırlamada literatürde görülen diğer doğal malzemelere iyi bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Serisin, halen ipek ipliği üretiminde kozaların ve ipliğin yumuşatıldığı sularla birlikte atılmaktadır. Son 20 yılda, ipek bazlı biyomalzemelerde bazı biyoyumluluk problemleri gözlenmiş ve bunun nedeninin serisin kontaminasyonu olabileceği rapor edilmiştir (ALTMAN vd., 2003). Faydalı kullanım alanları göz önüne alındığında, serisin kullanılarak elde edilen malzemelerin stabilitesi, biyo-uyumluluğu ve fonksiyonel özelliklerinin derinlemesine araştırılması gerekmektedir. İpeğin, yüzyıllar boyunca biyomalzeme olarak kullanıldığı bilinmesine rağmen, ipeğin yapısındaki proteinlerden biri olan serisin için doku mühendisliği ve biyoyumluluk alanlarında yeni araştırmalara ihtiyaç vardır (ALTMAN vd., 2003). Buna ek olarak, atık olarak hiç bir ekonomik değeri olmayan serisinin değerlendirilmesinin pek çok avantajı olacaktır. Öncelikle tekstil endüstrisinin bir alt kategorisinde hammadde geri kazanımı ile temiz üretim sağlanabilecek ve serisinin atıksudan geri kazanılması ile söz konusu atıksu daha az kirlilik içerecek ve ipek ipliği üretiminden kaynaklanan çevre kirliliği sorunlarının çözümüne katkı yapılmış olacaktır. Ayrıca, bir atığın biyomalzeme üretiminde değerlendirilebilmesi, malzemenin maliyetini azaltarak ekonomik yarar da sağlayacaktır.

2.5. Serisinli Yanık/Yara Örtüsü Hazırlanması

Vücudumuzdaki en büyük organ olan deri, epitel, bazal membran ve dermisten oluşan üç katmana sahiptir. Kendi kendini tamir edebilmesi, yenilenmesi, yüzeyinde gözenekler bulunmasına rağmen su geçirmemesi, fakat terleme yoluyla dışarıya su vermesi, kolay kolay yırtılmayacak kadar kalın, aynı zamanda hareket etmeye imkan verecek şekilde ince ve esnek olması, sıcaktan, soğuktan, zararlı güneş ışınlarından bedeni koruyabilmesi derinin önemli özelliklerinden bazılarıdır. Ağır ve derin deri yanıklarında hastanın sağlıklı derisinden tüm veya bir bölüm katmanların implante edilmesi en büyük başarı kabul edilmektedir. Ağır yanıklarda çoğu zaman yanmış bölgeleri kaplamak için hastanın kendi (otolog) hasarsız deri parçaları yeterli miktarlarda bulunamamaktadır. Bu durumda hastanın otolog epitel hücreleri in vitro şartlarda çoğaltılarak kullanılabilir. Ancak ihtiyaç duyulan otolog yamaları (greft) çoğunlukla yeterli miktarda olmamakta ve hasta enfeksiyonlarla ve aşırı su kaybına bağlı yaşamsal risklerle karşı karşıya olabilmektedir. Yanık vakalarının tedavisi yapay deri implantlerinin geliştirilmesiyle hız kazanmıştır. Deri yamaları ilk olarak hastanın kendisinden (otogreft), daha sonra ise bir yakınından (allogreft) alınan parçanın sentetik ve doğal biyomalzemeler üzerinde uygulanması ile gerçekleştirilmiştir (HORCH, 2005). Doku mühendisliği yaklaşımıyla hazırlanan yapay deriler; otolog keratinosit greftleri, kültürde çoğaltılmış allojenik keratinosit greftleri, otolog/allojenik kompozitleri ve hücreden uzaklaştırılmış biyolojik matrisler, kollajen, hiyaluronan, fibrin gibi biyolojik malzemelerin ve polilaktik asit, polilaktik-koglikolik asit, polietilen oksit gibi sentetik malzemelerin kullanılması ile hazırlanan deri yamaları ağır yanık tedavilerinde büyük çığır açmıştır.

Yara iyileşmesi, endotel (damar), bağ doku ve epitel hücrelerinin zamanlı ve dengeli aktivitelerinden oluşan bir süreçtir. Bu hücrelerin tümünün iyileşme süreci için hücre dışı matrise ihtiyaç vardır. Yara izinin kalmaması ve iyileşmenin hızlandırılması konusunda çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir (RUSZCZAK, 2003). Son yıllarda yaranın epidermal ve dermal analoglarının iki katman halinde yarayı kaplama yaklaşımı kullanılmaktadır. Bu yaklaşım ile yerleştirilen konstrükt, bariyer görevi görerek yarayı bakteriyel enfeksiyonlardan ve sıvı kaybından korumakta, fazla ısınma ile doku sıvılarının birikmesini engellemektedir. Yara konstrüktlerinde dermal element hücrenin yönlendirilmesi, doku oluşumu, yeniden doku modellemesi ve epitelizasyonda önemli rol oynar. Dermal element ise doku iyileşmesi için geçici veya kalıcı yara greftleri olarak kullanılmaktadır (DEMLING, 2003). Geçmişte kullanılan kadavra kökenli biyolojik greftler yerine fibrin (KEISER, 1994, SIEDLER, 2000), hiyaluronik asit (KING, 1991; MURASHITA, 1996) ve kollajen (FROGET, 2003; GOMATHI, 2003) gibi doğal kaynaklı polimerler lokal ilaç salım sistemleri ve yara iyileşmesi için değişik

matris sistemlerde test edilmiştir. Kollajen vücudun bağ dokusunun temel proteinlerinden biridir. Kollajen, molekül içi çapraz bağlama ile makromoleküler fiberler oluşturduğundan dokulara dayanıklılık vermektedir. Yapısı bozunmamış kollajen, hücrelerin bağlanması ve farklılaşmasını sağlayan doğal bir alt katmandır. Antimikrobiyal ilaç içermeyen veya tek başına kullanılan kollajenin, sünger veya örtü olarak dermal katmanda rejenerasyonu ve yara iyileşmesini hızlandırdığı gözlenmiştir. Bu tür kollajen bazlı ürünler birçok Avrupa ülkelerinde onaylanmış olup, klinik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Konvansiyonel yara-yanık tedavilerinde günümüzde uygulanan yöntemler, genellikle yaranın korunması amacıyla kullanılan yara iyileşmesinde ve korunmasında aktif rol oynamayan malzemeler içermektedir. Ancak bu tedavilerde görülen geç iyileşme, enfeksiyon riskindeki yükseklik ve bazı durumlarda tam iyileşmenin sağlanamaması gibi nedenler, tedavi amaçlı yeni yara-yanık örtüleri geliştirilmesi çalışmalarına son yıllarda hız kazandırmıştır. Medikal uygulamalarda kullanılacak biyolojik malzemelerin artması da bu amaca destek olan bir diğer nedeni oluşturmaktadır. Bu yeni yaklaşımda hazırlanan yanık örtülerinde, hasarlı dokunun dış çevreden korunmasına ek olarak, iyileştirmeyi daha etkin ve hızlı kılacak optimum mikroçevre oluşturulmak da hedeflenmektedir. İdeal yara-yanık örtüsü şu özelliklerde olmalıdır:

1. Dokuyu ikincil enfeksiyona karşı koruyabilme,
2. Nemli bir doku iyileşme çevresi oluşturma,
3. Dış ortama karşı termal izolasyon sağlama,
4. Yaradan çıkan debris ve irini emerek yara bölgesinde rekonstrüksiyonun sürekliliğini sağlama,
5. Parçacık ve toksik ürün içermeme,
6. Doku iyileşmesi işlemi başlatma ve destekleme,
7. Dokuya zarar vermeden çıkarılabilme (biyobozunur malzemeler için gerekli değildir) (SAKCHAI, 2006).

Bu amaçları sağlayacak tek bir malzemenin olmadığı ve doğal dokuların dahi farklı tür bileşenlerden oluştuğu düşüncesi yeni yaklaşımla yara tedavisinin kompozit yapıda olması gerekliliğini işaret etmektedir. Son yıllarda yara-yanık örtüsü geliştirme araştırmalarında kompozit malzemelerin yoğunluk kazanması ve bu çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar da bu düşünceyi desteklemektedir. Örneğin, kitosan ve polisakkaritlerin karışımı ile elde edilen filmlerde kompozit malzemelerin tek başına uygulanan malzemelere göre daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Doğal bir makromolekül olan kitin (veya kitosan) kullanılarak hazırlanan yara-yanık örtülerinde bu malzemenin seçilme nedeni özellikle yara

iyileşmesine yönelik olumlu nitelikler taşımasıdır. Bunlar, biyoyumlu olması, biyobozunur olması, hemostatik aktivitesinin bulunması, enfeksiyonlara karşı koruyucu özellikte bulunması ve iyileşmeyi hızlandırıcı olması olarak özetlenebilir. Ne varki, kitin tek başına zayıf mekanik özelliklere sahip bir malzemedir. Çekme kuvvetinin ve elastisitesinin az olması nedeniyle yara bölgesinde tek başına kullanıldığında istenilen dayanıklılığı sağlamayacağı bilinmektedir. Yukarıda bahsedilen kitosan ve polisakkarit kompozitlerin bu yönde olumlu gelişme sağladığı ve kitine göre mekanik özelliklerinin daha iyi olduğu bilinmektedir (WITTAYA-AREEKUL, 2006).

Bu projede, yara-yanık örtüsü amacıyla Kollajen-Serisin membranlar hazırlanmıştır. Kollajen ve serisin biyoyumlu ve biyobozunur doğal proteinlerdir. Kollajen insan vücudu bağ dokusunda en yüksek oranda bulunan proteindir. Jel, köpük veya film formunda hazırlanan kollajen özellikle yara iyileşmesinde olumlu etkisinden dolayı klinikte yara örtüleri olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Dıştan uygulanan kollajen, yara iyileşmesinde rol alan granulosit, makrofaj ve fibroblast hücrelerine kemotaktik bir etki gösterir ve yaraya doğru hareket etmelerini sağlamaktadır. Kollajen, bağ dokunun temel taşlarından biri olarak, aynı zamanda bu hücrelere yapışabilecekleri bir alt katman görevi de yapar. Bu şekilde dışarıdan uygulanan kollajen, yara iyileşme sürecini hızlandırmaktadır (SAI, 2000; RHO, 2006). Serisinin antimikrobiyal koruyucu özelliği, kollajenin deri dokusunun doğal bir maddesi olması ve iyileşmeyi hızlandırıcı özellikte olması bu iki malzemenin bu amaca yönelik uygunluğunu göstermektedir. Yapıştırıcı bir protein olan serisin, birçok hidrofilik amino asite sahip olması (GAMO, 2005) nedeniyle gerekli kimyasal değişimlere uygundur (TERATOMO, 2004). Bunların yanısıra serisin ve kollajenin yara-yanık örtüsü için yukarıda bahsedilen özelliklerden dokuyu nemli tutma, termal izolasyon ve debrisi emebilme yönlerinden de yeterli nitelikte olduğu, serisinin kozadaki dış ortama karşı koruyucu rolü ve her iki proteinin de hidofilik yapıda olması ile görülmektedir. Serisinin yapısında serin amino asitinin diğer amino asitlere göre yüksek oranda bulunması (%30), bu amino asitin deri dokusundaki doğal nemlendirme faktörü olarak bilinen ana amino asit olması, bu proteinin nemlendirme ve su tutmadaki yüksek kapasitesini açıklamaktadır. Bunun yanısıra serisinin yapısında hidroksil gruplara sahip amino asitlerin fazlalığı da hidofilik özelliğini artırmaktadır (ARAMWIT, 2007).

Literatürdeki örnek çalışmalar, ipekböceği kozasından elde edilen serisinin biyomalzeme olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Serisinin biyobozunurluğu, biyoyumluluğu ve yüksek hidrofilitesi nedeniyle yara iyileşmesine yönelik kullanılabileceği ARAMWIT ve SANGCAKUL (2007) tarafından yapılan yakın tarihli bir araştırmada gösterilmiştir. Serisinin % 8'lik krem halinde ratlarda oluşturulan deri yaralarına uygulandığı bu araştırmada hasarlı

bölgede ülser oluşmaması, kısa sürede ve tam iyileşme sağlanması ile kollajen dokusunun artışı yönlerinden, kontrol olarak uygulanan kreme göre daha başarılı sonuçlar verdiği belirtilmiştir (ARAMWIT, 2007). Son yıllarda yapılan araştırmalarda serisinin in vitro şartlarda memeli hücrelerinin çoğaltılmasında olumlu etkileri olmuş (TARADA, 2002) ve yüzeye ilk bağlanma yüzdesinde artış sağladığı gözlenmiştir (TSUBOUCHI, 2005). TERATOMO ve diğerleri (2005), ipek serisinden hazırlanmış oldukları gözenekli üç boyutlu hidrojelin ıslak koşullarda çok esnek yapıya sahip olduğunu belirtmektedir. Aynı çalışmada, diğer ipek bazlı malzemeler için kullanılan metanol yerine serisin için etil alkol ile kuvvetli intermoleküler bağlar oluşturulduğu ve jelleşmenin sağlandığı rapor edilmiştir. Söz konusu yapının, ilaç salım sistemleri veya doku mühendisliği amaçlı kullanıma uygun özellikleri olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde ipek bazlı birçok hücre taşıyıcısı hazırlanmış ve karakterize edilmiş olmasına rağmen, serisin bazlı taşıyıcılar üzerine araştırmalar çok kısıtlıdır (TERAMATO, 2005).

Kollajenin doğal deri dokusunda yüksek miktarda bulunduğu ve fiber yapısıyla dokunun çekme kuvvetlerine karşı dayanımını sağlayan temel malzeme olduğu bilinmektedir. Bu nedenle doku iyileşmesinde kollajenin oluşumunun desteklenmesinin önemli rolü bulunmaktadır. ARAMWIT ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada serisin kremin kollajen oluşumunu hızlandırdığı ve epidermis tabakasının büyüyerek tam kalınlığına ulaşmasını sağladığı da gözlenmiştir (ARAMWIT, 2007). Bu bulgular, kollajen ve serisinin birlikte kullanımının, kompozit malzemenin krem olarak serisinin tek başına kullanımına göre daha hızlı ve etkin sonuç vereceğini düşündürmektedir. Ancak bu karşılaştırmanın kesin olarak yapılabilmesi için benzer şekilde in vivo yara üzerinde (ratlarda) denenmesi gerekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İpek İşleme Atıksularından Serisin Geri Kazanımı

3.1.1. Atıksu Örnekleri

İpek ipliği üretimi mevsimlik bir iş olduğundan, koza pişirme atıksuları her yıl sonbahar mevsiminde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, 2006 yılının sonbahar mevsiminde Bilecik'in Söğüt İlçesinde yerel halk tarafından gerçekleştirilen koza pişirme işleminden kaynaklanan atıksulardan yüksek hacimlerde (yaklaşık 100 L) iki ayrı örnek (KPA1 ve KPA2) temin edilmiştir. KPA1, ön-arıtma işlemlerinde kullanılmış, KPA-2 ise laboratuvar koşullarında bozulmadan saklanabilmesi için, küçük hacimlere bölünerek -20 °C'de dondurulmuş ve membran süzme deneyleri için sırayla çözülerek ve ısıtılarak kullanılmıştır. Saklama koşullarının atıksu kalitesi ve membran performansına etkisi Ek A'da verilmiştir. KPA2'den alınarak kullanılan örnekler, KPA2-A, KPA2-B, KPA2-C, KPA2-D, KPA2-E, KPA2-F, KPA2-G ve KPA2-H olarak adlandırılmış ve özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Koza pişirme atıksularına ek olarak, Bursa'daki boyama tesisinde ortaya çıkan ipek ipliği pişirme atıksularından toplam üç adet örnek alınmıştır. Bu örnekler İPA1, İPA2 ve İPA3 olarak adlandırılmıştır. İPA1 yalnızca karakterizasyon amaçlı kullanılmış, İPA2 ve İPA3 ise membrane filtrasyon deneylerinde kullanılmıştır.

Toplam dolaşım düzeninde yürütülen deneylerde KPA2-A, KPA2-B, KPA2-C, KPA2-D ve KPA2-E örnekleri kullanılmış ve bu deneyler kısa sürede tamamlandığından örnekler herhangi bir koruyucu eklenmemiştir. Yoğunlaştırma düzenindeki deneylerde ise KPA2-F, KPA2-G ve KPA2-H örnekleri kullanılmıştır. Bu deneylerin uzun sürmesi nedeniyle, atıksuların bozulmasını önlemek amacıyla örnekler % 0,02 oranında NaN_3 eklenmiştir.

Tablo 3.1'den görüleceği üzere, her iki atıksuda oldukça yüksek miktarlarda organik madde mevcuttur. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) KPA'nda 11-17 g/L, İPA'nda ise 55-63 g/L olarak ölçülmüştür. Bu atıksularda bulunan KOİ değerleri arasında büyük farkın iki nedeni vardır; birincisi ipek ipliği pişirme işleminde serisini uzaklaştırmak için pişirme suyuna yüksek miktarda sabun eklenmesi, ikicisi ise ipek ipliği pişirme tankında ardışık olarak üç tur pişirme yapılması nedeniyle konsantre bir atıksu üretilmesidir. Her iki atıksu da renkli ve bulanıktır; 4500-44000 Pt-Co değerinde renk ve 500-7400 NTU değerinde bulanıklık ölçülmüştür. Benzer şekilde, toplam katı madde (TKM) içerikleri de oldukça yüksektir; KPA için yaklaşık 10 g/L ve İPA için yaklaşık 40 g/L'dir. KPA'ndaki toplam protein ve serisin derişimleri 5-10 g/L

ve 5-8 g/L olarak ölçülmüştür. Diğer taraftan, bu parametreler İPA'nda 35-47 g/L ve 27-34 g/L olarak ölçülmüştür. Diğer bir deyişle, toplam protein ve serisin miktarları İPA'nda yaklaşık altı kat daha fazladır. İki atıksu arasındaki bir diğer fark pH'dır; KPA'nda pH 5,8-6,5 iken, İPA'nda mevcut olan sabun ve Na₂CO₃ nedeniyle 8,6-9,6 olarak belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, bütün örneklerde serisinin yapısından kaynaklanan 0,3-1,3 g/L karbonhidrat bulunmuştur. Özetle, İPA'nın, KPA'na kıyasla daha kirli bir atıksu olduğu, ancak serisin kaynağı olarak daha değerli bir atıksu olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.1. KPA ve İPA örneklerinin özellikleri

Örnek	Atıksu Kalitesi							
	Serisin (mg/L)	T. Protein (mg/L)	KOİ (mg/L)	TKM (mg/L)	Renk (Pt-Co)	Bulanıklık (NTU)	Karbonhidrat (mg/L)	pH
KPA1	-	9443	11600	10238	8650	771	-	5,9
KPA2-A	5809	8357	14575	12560	6060	561	355	5,8
KPA2-B	-	9883	14920	13130	25000	1050	-	5,8
KPA2-C	-	9127	14250	12880	27150	468	-	5,9
KPA2-D	5562	7606	15245	12630	5490	559	406	5,9
KPA2-E	6354	8151	13075	12460	6200	543	769	6,2
KPA2-F	5679	5510	14205	12470	5640	823	289	6,1
KPA2-G	7957	7992	17050	14040	5970	985	1290	6,5
KPA2-H	5043	7202	13600	11800	4520	745	592	5,9
İPA1	-	35634	62850	40637	43600	7370	-	9,6
İPA2	34002	46747	59150	39900	26050	4134	513	8,6
İPA3	27581	-	55950	-	-	-	-	9,1

3.1.2. Santrifüj

Atıksu örnekleri, Hettich Universal ve Rotofix 32A santrifüj cihazları kullanılarak 10-40 dakika boyunca ve 3000-4000 rpm hızda santrifüj edilmiştir.

3.1.3. Mikrofiltrasyon

Atıksuda bulunan serisini ön-arıtma aşamasında kaybetmemek ve atıksuların membran sistemini en az kirliletecek özelliklere kavuşturmak için en ucuz membran işlemi olan mikrofiltrasyon (MF) uygulanmıştır. Bunun için 550 mm Hg vakum sağlayan Millipore marka bir vakum süzme düzeneği kullanılmıştır. MF deneyleri, düz akış süzme düzeninde yapılmıştır. Sistemde kullanılan filtrelerin çapı 47 mm, gözenek büyüklükleri ise 1 µm, 8 µm and 20 µm'dir (Tablo 3.2). Süzülen örneklerde KOİ, renk, bulanıklık, TKM, T. protein, serisin ve karbonhidrat analizleri yapılmıştır. Akılar ise, toplam süzülen su hacminin filtrasyon süresine ve etkin membran alanına bölünmesi ile hesaplanmıştır.

Tablo 3.2. Kullanılan membranların özellikleri

Filtrenin Adı	Türü	Malzeme	Etkin Alan (m ²)	MAAS (veya Gözenek Büyüklüğü)
Whatman 41	MF	Selüloz	0,0010	20-25 µm
Millipore	MF	Selüloz	0,0010	8 µm
Whatman GF/B	MF	Fiberglas	0,0010	1 µm
Osmonics PW	UF	Polietersülfon	0,0044	20 kDa
Osmonics PT	UF	Polietersülfon	0,0044	5 kDa
Osmonics GH	UF	TFC ^a	0,0044	1 kDa
Osmonics DK	NF	TFC ^a	0,0044-0,036	190 kDa ^b
Dow Filmtec NF-90	NF	TFC ^a	0,0044-0,072	100 Da ^c

^a İnce film kompozit olarak hazırlanmıştır.

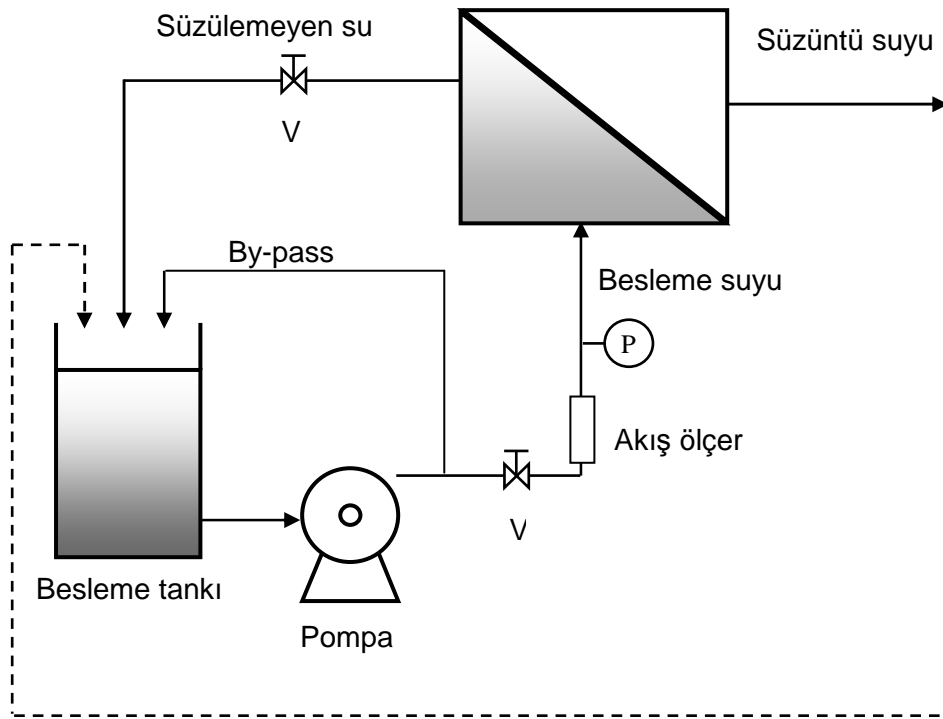
^b %98 MgSO₄ giderimi sağlar.

^c %97 MgSO₄ giderimi sağlar.

3.1.4. Ultrafiltrasyon ve Nanofiltrasyon

UF ve NF deneyleri, Berghof BHT-2 model membran süzme sistemi ile toplam dolaşım

düzeninde, DSS LabStak M20 model membran süzme sistemi ile de yoğunlaştırma düzeninde yürütülmüştür. Kullanılan membranların özellikleri Tablo 3.2'de verilmiştir. Sistem şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Toplam dolaşım düzeninde hem süzülen hem de süzülmemeyen sular giriş tankına döndürülerek besleme suyu kalitesi ve hacmi sabit tutulmaya çalışılmış ve bu şekilde membran performansı izlenerek en uygun membran süzme işlemi seçilmiştir. Berghof BHT-2 model sistemde giriş basıncı UF için 2 bar ve NF için 5 bar olarak ayarlanmış, atıksu debisi ise 30 L/saat olarak uygulanmıştır.



Şekil 3.1. Süzme sisteminin şematik görüntüsü (P: basınç göstergesi, V: vana)

Yoğunlaştırma düzeninde gerçek uygulamaya daha yakın olarak, süzülen sular ayrı bir tankta toplanmış ve besleme suyu hacmi zamanla azaltılarak atıksudaki serisin yoğunlaştırılmıştır. Bu deneylerde hacim azaltma faktörü (*HAF*) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$HAF = \frac{V_i - V_s}{V_f}$$

Burada V_i : Deney başlamadan önce besleme tankındaki giriş suyu hacmi (L),

V_f : Deney sonunda besleme tankında kalan giriş suyu hacmi (L),

V_s : Deney sırasında analiz için toplanan örneklerin toplam hacimleri (L)'dir.

Yoğunlaştırma düzenindeki deneylerde HAF 4,2-4,6 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 3.3). Diğer bir deyişle, başlangıç hacmi 9,0 L, 9,8 L ve 9,2 L olan atıksular, 16-21 saatlik süzme sürelerinin sonunda 1,9 L, 2,3 L ve 2,1'ye kadar azaltılmıştır.

Tablo 3.3. Yoğunlaştırma deneylerinde HAF hesaplanması

DSS	Örnek	Atıksu hacmi (L)				HAF
		V_i	V_s	V_p^*	V_f	
	KPA2-F	9,0	0,17	6,9	1,9	4,6
	KPA2-G	9,8	0,20	7,3	2,3	4,2
	KPA2-H	9,2	0,18	6,9	2,1	4,2

* V_p : NF membranından süzülen suyun hacmi

LabStak M20 model sistemde her birinin alanı 0,018 m² olan iki veya üç çift NF membranı kullanılmıştır. Sistemin giriş kısmındaki basınç 5 bar'a ayarlanmış, süzilemeyen suyun membrandan çıktığı kısımdaki basınç ise 4,8 bar olarak gözlenmiştir. Süzülen suların toplandığı hortumlar ise atmosfere açıktır (0 bar). Bu şekilde membran üzerinde 4,9 bar'lık bir basınç oluşturulmuştur. Atıksu debisi ise 372 L/saat olarak ayarlanmıştır. Deneylerde saf su ve atıksu akıları zamana karşı izlenmiş ve akılar sabitlendiğinde deney sonlandırılarak süzüntü suları toplanmıştır. Süzüntü sularında KOİ, renk, bulanıklık, TKM, toplam protein, pH ve serisin analizleri yapılmıştır. Kirlenen membranlar deney sırasında ve sonunda NaOH ve klor ile yıkanmış, temizlenmiş membranların saf su akıları yeniden okunmuştur.

Deneylerde akı ölçümleri süzüntü suyunun belirli bir sürede mezürde toplanmasıyla gerçekleştirilmiş ve akı değerleri, toplanan hacmin birim zamana ve birim membran alanına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Akı analizi için dört aşamada akı okuması yapılmıştır:

- 1) Başlangıç saf su akısı (I): Temiz membran ile ölçülen ilk saf su akısı,
- 2) Atıksu akısı (W): Süzme deneyinde zamanla dengeye gelen atıksu akısı,
- 3) Kirlenmiş membranın saf su akısı (F): Atıksu ile kirlenen membranın saf su akısı,
- 4) Temizlenmiş membranın saf su akısı (C): Kimyasal temizleme yöntemi ile yıkanan membranın saf su akısı.

Akı azalmalarını değerlendirmek amacıyla Tablo 3.4'te verilen hesaplar kullanılmıştır. Bu hesaplar, membrandaki akı azalmaları üzerinde konsantrasyon polarizasyonu ve kirlenmenin etkilerini bulmak için yapılmıştır.

Tablo 3.4. Akı analizi için yapılan hesaplar

Hesaplama	Açıklama
$(I-W)/I$	Toplam akı azalması
$(F-W)/F$	Konsantrasyon polarizasyonundan kaynaklanan akı azalması
$(I-F)/I$	Kirlenmeden kaynaklanan toplam akı azalması
$(C-F)/C$	Geri döndürülebilen kirlenmeden kaynaklanan akı azalması
$(I-C)/I$	Geri döndürülemeyen kirlenmeden kaynaklanan akı azalması

3.1.5. Membran Temizliği

Toplam dolaşım düzeninde yürütülen her deneyde yeni bir membran kullanılmıştır. Yoğunlaştırma deneylerinde ise NF membranları en az bir kez kullanılmıştır. Bütün yeni membranlar, kullanımdan önce bir gece saf suda bekletilmiştir. Bir kez kullanıldıktan sonra yıkanan membranlar ise, bakteriyel büyümeyi engellemek amacıyla %0,25 sodyum bisüfit içeren solüsyonlarda bekletilmiştir. Kirlenen membranlara kimyasal yıkama işlemi uygulanmıştır. Kimyasal yıkamanın membran performansına etkisi Ek B'de verilmiştir. Yıkama sırasında membranlar sistemden çıkarılarak 0,5 M NaOH ve yaklaşık 200 mg/L serbest klor içeren solüsyonla dolu bir kapta 20-30 dak bekletilmiştir.

3.1.6. Kozadan Serisin Elde Edilmesi

Serisin analizinde standart madde olarak kullanılmak üzere, ipek kozasından serisin elde edilmiştir. Kozalar kesilerek küçük parçalara bölünmüş, üzerlerine su eklenmiş ve otoklavda 120 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Otoklav süresinin serisinin çözünürlüğü üzerine etkisi ayrıca incelenmiştir (Ek C). Serisin çözeltisi 1,6 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden (Whatman GF/C) süzülerek üzerine hacminin üç katı kadar (%75) soğuk etanol eklenmiştir. Serisin çöktürüldükten sonra etanolün üst fazı atılarak serisin -80 °C'de dondurulmuş ve

liyofilizatörde kurutularak toz serisin elde edilmiştir (KURIOKA vd., 2004; WU vd., 2007; VAITHANOMSAT vd., 2008).

3.1.7. Çökeltme

NF ile yoğunlaştırılan atıksu asit ve alternatif olarak da alkol kullanılarak çökeltmiştir. Bu aşamada dört çeşit asit (HNO_3 , HCl , H_2SO_4 , $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) ve etanol kullanılmıştır. Asitle çökeltmede örneklerin pH'ı hacimsel bazda %0,3 asit kullanımı ile 6,1'den 3,8'e kadar düşürülmüştür. Alkol kullanımında ise etanol hacminin %75 olarak uygulanması gerekmiştir. Asit veya etanol eklenen örnekler, 3000 rpm'de 10-20 dak santrifüj edilerek serisinin çökmesi sağlanmıştır.

3.1.8. Diyaliz

Elde edilen toz serisin örneklerinin saflığını artırmak amacıyla, örnekler diyaliz edilmiştir. Diyaliz torbalarının MAAS değerleri 12,0 kDa (SIGMA ALDRICH) ve 3,5 kDa (SERVA)'dır. Serisin çözeltileri diyaliz torbalarına eklendikten sonra, torbaların uçları kapatılmış ve içinde saf su bulunan beherlere yerleştirilmiştir. Daha sonra beherler 37 °C'de su banyosuna konmuş ve 1-2 gün boyunca çalkalanmıştır. Diyaliz işlemi sona erdiğinde, diyaliz torbasının içinde kalan serisin çözeltisi HPLC'de analiz edilmiştir.

3.1.9. Protein Çözünürlüğü

Geri kazanılan serisin örneklerinin çözünürlüğü çeşitli pH değerlerinde belirlenmiştir. Örnekler, pH'ları NaOH ve HCl ile 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 ve 11,0 olarak ayarlandıktan sonra 4000 rpm'de 10 dak boyunca santrifüj edilmiştir. Örneklerin pH ayarlaması yapılmadan önce ve pH ayarlaması ile santrifüj yapıldıktan sonra üstte kalan fazlarda toplam protein içerikleri ölçülmüştür. Bu şekilde, serisin çözünürlüğünün en yüksek olduğu pH değeri bulunmuştur. Protein çözünürlük oranı, üst fazda kalan protein miktarının, örnekte ilk olarak bulunan protein miktarına bölünmesi ile hesaplanmıştır (WERE vd., 1997; CHOVE vd., 2007).

3.1.10. Analitik Teknikler

3.1.10.1. Çevresel Kirlilik Parametreleri

Deneysel çalışmalarda yapılan analizler için Tablo 3.5'te verilen standart yöntemler kullanılmıştır (APHA, 1995). Örneklerin KOİ değerleri USEPA onaylı HACH Metot 8000'e göre HACH DR-2000 Model spektrofotometre kullanılarak 620 nm dalgaboyunda okunmuştur. Renk ölçümü, aynı cihazla Pt-Co cinsinden 455 nm'de yapılmıştır. Morötesi soğurum (Ultraviolet absorbance-UVA) ölçümleri ise Shimadzu 1601 Model spektrofotometre ile 275-290 nm dalga boylarında yapılmıştır. Bulanıklık değerleri HACH 2100N Model türbidimetre ile ölçülmüş; örneklerin toplam katı madde (TKM) içeriği ise kurutma ve ağırlık tartma yöntemiyle belirlenmiştir.

Tablo 3.5. Analitik teknikler

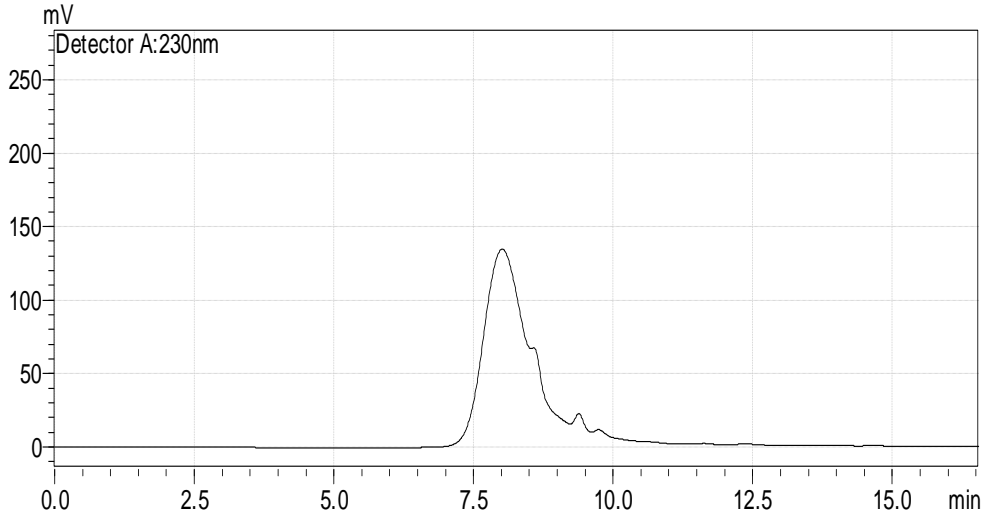
Parametre	Yöntem
UVA	Standart Metot 5910 B
KOİ	EPA onaylı HACH 8000
Renk	Standart Metot 2120 B
Bulanıklık	Standart Metot 2130 B
TKM	Standart Metot 2540 B
Toplam protein	BCA Toplam Protein Protokolü (KRIEG vd., 2005)
Serisin	GPC, HPLC (OGINO vd., 2006)
Karbohidrat	Dubois Metodu (DUBOIS vd., 1956)
pH	Standart Metot 4500-H ⁺ B

3.1.10.2. Serisin Analizi

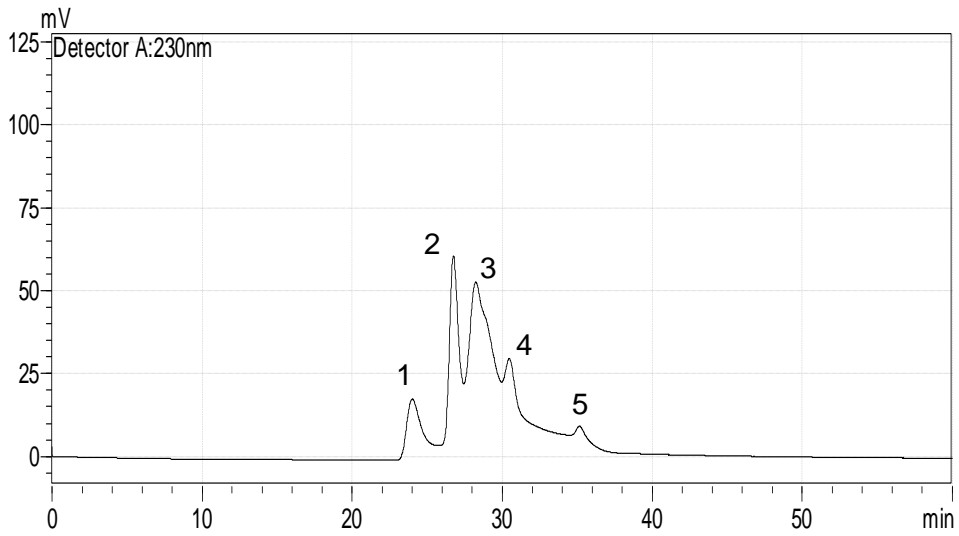
Atıksu örneklerinde serisin analizi yapmak ve serisinin molekül ağırlık dağılımını belirlemek amacıyla Shimadzu Prominence Marka HPLC sistemi kullanılmıştır. Sistemde jel geçirgenlik kolonu (Nucleogel aqua OH-40-8) kullanılmış, hareketli faz olarak 0,3 M NaCl içeren 0,05 M fosfat tamponu kullanılmıştır. Analizler 30 °C'de gerçekleştirilmiş ve UVA değerleri 230 nm'de okunmuştur (OGINO vd., 2006). Mobil faz debisi kantitatif analizde 1 mL/dak, molekül ağırlık tayininde ise 0,3 mL/dak olarak ayarlanmıştır. Bütün örnekler, 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden (MILLIPORE Millex-HV) süzöldükten sonra, bir şırınga yardımıyla 20 µL hacminde sisteme enjekte edilmiştir. Kalibrasyon standardı olarak yerli ipek kozasından elde edilen toz serisin ile hazırlanmış çözeltiler kullanılmıştır (Ek D). Serisinin 6,5 ile 11,0 dakikaları arasında geniş bir tepe çizerek kolondan çıktığı gözlenmiştir (Şekil 3.2).

Serisin molekül ağırlık dağılımını belirlemek amacıyla, içinde beş farklı molekül ağırlığına sahip standart bir protein karışımı (Cytochrome c monomer: 12,4 kDa, Myokinase: 32 kDa, Enolase: 67 kDa, Lactate dehydrogenase: 142 kDa ve Glutamate dehydrogenase: 290 kDa) kullanılmıştır (CALBIOCHEM) (Şekil 3.3). Standart proteinlerin kolondan çıktıkları süreler (t) kullanılarak aşağıdaki doğrusal regresyon denklemi elde edilmiştir:

$$\log MW = -0,1262t + 8,46 \quad (r^2 = 0,98)$$



Şekil 3.2. Serisin standart çözeltisinin HPLC kromatogramı (Derişim=2,5 mg/L)



Şekil 3.3. Molekül ağırlık dağılımı için kullanılan standart proteinlerin HPLC

kromatogramları (1. Glutamate dehydrogenase: 290 kDa, 2. Lactate dehydrogenase: 142 kDa, 3. Enolase: 67 kDa, 4. Myokinase: 32 kDa, 5. Cytochrome c monomer: 12,4 kDa)

3.1.10.3. Toplam Protein Analizi

T. protein analizi BCA (bisonik asit) protokolü ile yapılmıştır (KRIEG vd., 2005) Spektrofotometrik bir yöntem olan BCA protokolünde, örneklerin içine bakır-BCA karışımı eklenmekte ve örnekler bir su banyosu içinde 37°C'de 30 dakika inkübe edilmektedir. Böylece alkali bir ortamda protein ile bakırın tepkimesi sonucu Cu^{2+} iyonu Cu^+ iyonuna indirgenmekte, ardından $BCA-Cu^+$ bileşiminin ortaya çıkmasıyla örneklerde renk oluşmaktadır. Örneklerin soğurumu Hitachi marka bir spektrofotometre ile 562 nm'de okunmuş ve kalibrasyon denklemi (Ek E) kullanılarak toplam protein derişimleri bulunmuştur.

3.1.10.4. Karbonhidrat Analizi

Atıksu örneklerinde karbohidrat ölçümleri Dubois yöntemi ile yapılmıştır (DUBOIS vd., 1956). İlk olarak stok glüköz çözeltisi hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Standartlara ve örneklerle fenol (% 80 w/w) ile sülfürik asit eklenmiş ve 10 dak bekletildikten sonra çözeltiler iyice karıştırılmıştır. Ardından örnekler 30-35°C'de 15 dak bekletilmiş ve bir spektrofotometre kullanılarak 490 nm'de absorbansları okunmuştur. Kalibrasyon eğrisi (Ek F) kullanılarak atıksu örneklerindeki karbohidrat derişimleri belirlenmiştir.

3.1.10.5. FPLC ile Fraksiyon Toplama

KPA örneklerinde serisin haricinde bulunan ve ipekböceğinden kaynaklanan yabancı proteini tanımlamak amacıyla, ODTÜ MERkezi Laboratuvarı'nda hızlı performans sıvı kromatografisi (FPLC) yöntemi ile fraksiyon toplama işi yaptırılmıştır. Varian ProStar Model FPLC sistemi kullanılmış, Hiprep 16/60 Sephacryl-200 kolonundan hareketli faz olarak 0,3 M NaCl ve 0,05 M fosfat içeren tampon çözelti 0,7 mL/dak hızla geçirilmiştir. Oda sıcaklığında çalışılmış ve UVA değerleri 230 nm'de okunmuştur. Örnekler, 0,45 µm filtreden süzölmüş ve 1-1,2 mL hacimde sisteme enjekte edilmiştir. Kolondan çıkan örnekler 57 tüpte toplanmış, 1-41 numaralı tüplerde serisin bulunurken 42-55 numaralı tüplerde ipek böceğinden kaynaklanan yabancı protein toplanmıştır. Bu tüplerin içeriği (42-55) birleştirilerek Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde MALDI-TOF analizi yaptırılmıştır.

3.1.10.6. Nem, Organik ve İnorganik Madde Tayinleri

Ticari olarak temin edilen serisin (S_C) ve geri kazanılan serisin (S_N) örneklerindeki nem miktarı ile organik ve inorganik madde miktarları gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Örnekler nem tayini için 100 °C'de 3 saat, diğerleri için ise 600 °C'de 1 saat kurutulmuştur.

3.1.10.7. Elementel Analiz

Ticari olarak temin edilen serisin (S_C) ve geri kazanılan serisin (S_N) örneklerinin elementel kompozisyonu ODTÜ Merkezi Laboratuvarı'nda yaptırılmıştır. Serisin örneklerinin karbon, hidrojen, azot ve sülfür içerikleri, kuru bazda LECO CHNS-932 model cihazla belirlenmiştir. Bu yöntemde, cihaz 1000 °C'ye kadar ısıtılmakta ve yaklaşık 1 g örnek gümüş bir kapsülün içine yerleştirilerek tamamen yakılması için fırına gönderilmektedir. Örneklerin C, H ve S miktarları infrared dedeksiyon, N miktarı ise termal iletkenlik yöntemiyle belirlenmektedir.

3.1.10.8. MALDI-TOF MS ve 2-D Elektroferez ile Protein Tanımlanması

Geri kazanılan örneklerde serisinin varlığını tespit etmek amacıyla, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde 2-D jel elektroferez ve MALDI-TOF analizleri yaptırılmıştır. Burada ilk olarak, etanol ile geri kazanılan serisin örneği, biyomolekülleri taşıdıkları yüke göre ayıran iyon değiştirici kolonlardan (anyon ve katyon) geçirilmiştir. Kolondan geçirilen örnekler, iki boyutlu bir jelde izo-elektrik noktaları (pI) ve molekül ağırlıklarına göre ayrılmıştır. Ardından, jel içinde ayrılan protein spotları kesilerek çıkarılmış ve MALDI-TOF'a yüklenmiştir.

MALDI-TOF MS'te UV ışığı emen bir dizey ve bir biyomolekül tortusu, nanosaniyelik lazer darbesiyle aydınlatılır. İyonize olan biyomoleküller bir elektrik alanında ivmelenir ve bir uçuş tüpüne girerler. Bu tüpte uçarken, farklı moleküller kütle/yük oranlarına göre ayrılıp dedektöre farklı zamanlarda varırlar. Bu şekilde, her molekül ayrı bir sinyal verir. Geri kazanılmış serisinin MALDI-TOF spektrumları, ExPASy protein veritabanı ile karşılaştırılarak tanımlanmıştır.

3.1.10.9. Gaz Kromatograf-Kütle Spektrometri ile Yağ Asitleri Analizi

İpek ipliği pişirme atıksuyunda bulunan sabun doğrudan analiz edilememiştir. Bu nedenle, serisin, sabun ve KOİ arasındaki ilişki belirlenmiş (Ek G) vesabun içeriği KOİ ile serisin derişimleri arasındaki farktan bulunmuştur. Ayrıca, sabundan kaynaklanan yağ asitlerinin

Ankara Üniversitesi'nde Gaz Kromatograf-Kütle Spektrometri (GC-MS) ile analiz edilmesi sağlanmış ve bu şekilde örneklerden sabunun ne derecede uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Bu yöntemde, ilk olarak örneklere ekstraksiyon uygulanmış, 20 g örneğin içine %2'lik metanolik NaOH'ten 40 mL eklenerek sabunlaşma meydana gelene kadar kaynatılmıştır. Sabunlaşma sonunda, %14'lük BF_3 'ten 50 mL eklenmiş ve örnek 5 dak daha kaynatılmıştır. Son olarak, 20 mL n-heptan eklenmiş ve 1 dak daha kaynatılmıştır. Ardından, 4 mL doymuş NaCl eklenmiş ve örnek bir ayırma hunisine alınarak 5-10 dak faz ayırımı oluşması beklenmiştir. Hazır olan örnekten 1 μ L alınarak GC'ye enjekte edilmiştir (Shimadzu GC-MS QP2010 Plus). Bu örnek, kapiler bir kolondan (Teknokroma TR-CN 100) helium taşıyıcı fazı ile geçirilmiştir. Kütle spektrometrisine gelen örnekler, ekeatron bombardımanına tutularak kütle/yük oranlarına göre ayrılmıştır. Son olarak, MS spektrumları belirlenmiş ve elde edilen tepeler WILEY7 ve NIST147 veritabanları ile karşılaştırılmıştır.

3.2. Serisinli Biyofilm Hazırlanması

3.2.1. Malzemeler

Polivinil alkol (PVA) (sıcak suda çözünebilen, ortalama molekül ağırlığı 70 kDa, akışkanlığı 11-14 cP) Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Gliserol, Fluka'dan satın alınmış ve plastikleştirici olarak kullanılmıştır. Serisin iki formda elde edilmiştir: 1) Brezilya'da bir firmadan toz halinde temin edilmiş, 2) ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü Laboratuvarında koza pişirme atıksularından geri kazanılmıştır. NaOH, Riedel'den temin edilmiş ve pH ayarlaması için kullanılmıştır. Bütün çözeltiler, saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Saf oksijen gazı ise, BOC firmasından satın alınmıştır.

Hazırlanan çözeltiler, Stuart model manyetik karıştırıcı ile ısıtılarak karıştırılmıştır. Film dökmek için otomatik bir film uygulayıcı (BRAIVE Instruments) kullanılmıştır. Çözeltilerde, film dökmeden önce Sonikor model bir ultrasonik banyo ile gassızlaştırma işlemi yapılmıştır. Bir cep pH metresi ile pH ayarlanmıştır. Filmler, önceden deterjan ve aseton ile temizlenmiş olan 20x30 cm boyutlarındaki camların üzerine dökülmüştür. Kurutulan filmler, çapraz bağlanmayı artırmak amacıyla Gallenkamp Duostat model bir fırında ısıtılmıştır.

3.2.2. Film Hazırlama

Proje kapsamında iki tip film (Set-1 ve Set-2) hazırlanmıştır. Partner üniversiteye yapılan ilk ziyarette yürütülen çalışmalar kapsamında Set-1 filmleri hazırlanmış ve PVA çözeltileri,

PVA'nın sudaki ağırlık oranı %5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Serisin çözeltisi ise %1 ve %5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Plastikleştirici olarak gliserol kullanılmıştır. Gliserol çözeltisi ise gliserolün sudaki hacmi %40 olacak şekilde hazırlanmıştır. Filmler 100 µm kalınlığında dökülmüş ve oda sıcaklığında bir gece boyunca kurutulmuştur. Daha sonra çapraz bağlanmayı güçlendirmek için 75-90 °C'de 20-30 dak ısıtma yapılmıştır. Serisin ve PVA karışım oranları ise 1/100, 2/100, 5/100, 10/100, 20/100, 40/100 ve 60/100 olarak ayarlanmıştır. İlk ziyaret sırasında hazırlanan filmler daha çok deneme ve öğrenme amaçlı hazırlandığından, bu filmlerin oksijen geçirgenliklerinde tutarsız sonuçlar elde edilmiş ve ayrıca serisin içeren filmlerin oldukça yüksek miktarda oksijen geçirdikleri tespit edilmiştir. Set-1 filmlerinin özellikleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Set-1 filmlerinin özellikleri

Film no.	Serisin ^a (mL)	PVA ^b (mL)	Serisin/PVA	Gliserol ^c (mL)	Isıtma işlemi
1	0	10	0/100	0,0	yok
2	0	10	0/100	0,0	95 °C, 20 dak
3	0	10	0/100	0,5	95 °C, 20 dak
4	2	10	20/100	0,6	96 °C, 25 dak
5	4	10	40/100	0,7	96 °C, 25 dak
6	6	10	60/100	0,8	81 °C, 30 dak
7	8	10	80/100	0,9	81 °C, 30 dak
8	10	0	100/0	0,0	81 °C, 30 dak
9	10	0	100/0	0,5	81 °C, 30 dak

^{a, b} Serisin ve PVA stok çözeltileri ağırlık olarak %5

^c Gliserol stok çözeltisi hacim olarak %40, karışım çözeltisinde %2.

Hazırlanan filmler arasında, Film 7, 8 ve 9 başarılı olmamıştır. Bunun nedeni, Film 7'de yüksek miktarda serisin bulunması ve filmin cama yapışmasıdır. Benzer olarak, Film 8 saf serisin ile hazırlandığından ısıtma sonrasında oldukça kırılğan olmuş ve camdan tek parça halinde alınamamıştır. Film 9 ise kurutma işlemine rağmen ıslak bir görüntüye sahip olmuş ve yine camda kalmıştır. Bu sonuçlar, serisinin bir polimerle karıştırılması gerektiğini açıkça göstermiştir. Bu nedenle, saf PVA ile hazırlanan filmler kontrol olarak kullanılmış, bütün diğer filmlerde serisin PVA ile karıştırılmıştır.

İlk ziyaret sırasında yaşanan sorunları çözmek amacıyla, ikinci ziyaret sırasında Set-2 filmleri biraz daha farklı hazırlanmıştır. İlk olarak filmlerin daha dayanıklı olması için PVA

çözeltisinde PVA'nın miktarı artırılmış ve filmler daha kalın dökülmüştür. İkinci olarak da oksijen geçirgenliğini, kullanılan ölçüm sisteminin ölçebildiği aralıkta tutabilmek amacıyla serisin/PVA karışım oranları azaltılmış ve daha az serisin eklenmiştir. Ayrıca oda sıcaklığında bir gece kurutma işlemi sırasında, 2. Gelişme Raporu'nda da bahsedildiği üzere, filmlerin üzerinde toz biriktiği için, kurutma işleminin kapalı ortamda yapılmasına karar verilmiştir. Bu nedenle, PVA'nın sudaki ağırlık oranı %10 olarak ayarlanmıştır. PVA çözeltisi, 80°C'de ısıtmalı karıştırıcı üzerinde 2-3 saat tutulmuştur. Serisin çözeltileri ise benzer şekilde serisinin sudaki ağırlık oranları %5 olacak şekilde hazırlanmış ve 60°C'de ısıtmalı karıştırıcı ile yaklaşık 3 saat süreyle karıştırılmıştır. Serisinin sudaki çözünürlüğünü artırmak amacıyla çözelti pH'ı 0,5 M NaOH ile 10'a ayarlanmıştır. Gliserol çözeltisi ise gliserolün sudaki hacmi %40 olacak şekilde hazırlanmıştır.

Serisin ve PVA, serisin/PVA karışım oranları 1/100, 2/100, 5/100 ve 10/100 olacak şekilde karıştırılmıştır. Bunun için, önce serisin ve PVA çözeltilerinden gerekli hacimlerde alınarak karıştırılmış, ardından gliserol çözeltisinden eklenmiştir. Gliserol çözeltisinden, karışım çözeltisindeki hacmi %1 olacak şekilde eklenmiştir. Karışım çözeltileri 80°C'de en az 1 saat ısıtılarak karıştırılmış ve 1 saat boyunca gazzsılaştırma yapılmıştır. Otomatik film uygulayıcı cihazının bıçağı, film kalınlığı 250 µm olacak şekilde ayarlanmıştır. Bıçağın içindeki rezervuara 5-10 mL karışım çözeltisi konmuş ve cihazın en yüksek hızı olan 10-12'de bıçak cam üzerinde hareket ettirilerek çözelti cam üzerinde sabit kalınlıkta yayılmıştır. Daha sonra, dökülen filmin kuruması için, üzerine çözelti yayılan cam 30°C'ye ayarlanmış fırında bir gece bekletilmiştir.

Filmlerde çapraz bağlanmayı güçlendirmek amacıyla, kurutma sonunda camlar fırına konmuş ve 75-90°C'de 20-30 dak ısıtma işlemi yapılmıştır. Serisin içeren filmlerin bir kısmı, ısıtma işlemine ek olarak, yaklaşık 1 dakika boyunca metanolde bekletilmiştir. Filmler, soğuduktan sonra cam yüzeyden ayrılmıştır. Temiz bir kağıt havlu arasına konduktan ve etiketlendikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır. Son olarak, hazırlanan filmlerin özelliklerini belirlemek amacıyla oksijen geçirgenlikleri ölçülmüştür. Hazırlanan filmlerin özellikleri Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7. Set-2 filmlerinin özellikleri

Film no. *	Serisin/PVA	Gliserol (%)	Çapraz bağlanma için uygulanan işlem
1	0/100	0	75 °C'de 40 dak ısıtma
2	0/100	0	75 °C'de 30 dak ısıtma
3	0/100	1	75 °C'de 30 dak ısıtma
4	10/100	1	75 °C'de 30 dak ısıtma Metanolde 1 dak bekletme
5	1/100	1	75 °C'de 30 dak ısıtma Metanolde 1 dak bekletme
6	2/100	1	75 °C'de 30 dak ısıtma
7	5/100	1	75 °C'de 30 dak ısıtma
8	5/100	1	75 °C'de 30 dak ısıtma

* Film 4, 5, 6 ve 7'de hazır olarak temin edilen, Film 8'de ise atıksudan geri kazanılan serisin kullanılmıştır.

3.2.3. Film Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Film Kalınlığı

Bütün filmler 100 µm kalınlığında dökülmüştür. Kurutulan ve ısıtılan filmlerin kalınlığı, dijital göstergeli bir mikrometre yardımıyla ölçülmüştür.

3.2.3.2. Su Tutma Oranı

Bir filmin su tutma oranı (STO), birim kuru ağırlığı başına tutabildiği su miktarı olarak tanımlanabilir. STO testlerinde hazırlanan filmler 1 saat boyunca oda sıcaklığında saf suda bekletilmiştir. Başlangıçtaki kuru ağırlıklarını belirlemek için filmler önce tartılmış ve 40 °C'de 50 dak kurutulmuştur. Kurutma sonrası tekrar tartılarak içerdikleri nem oranı hesaplanmıştır. Suda bekletildikten sonra temiz bir kağıt havlu ile kurulanmış ve tekrar tartılmıştır. Filmler tekrar 40 °C'de 50 dak kurutulmuş ve yeniden kuru ağırlıkları belirlenmiştir. STO aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$STO = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100$$

Burada,

W_w : Filmin ıslak ağırlığı (g),

W_d : Filmin başlangıçtaki kuru ağırlığı (g)'dir.

3.2.3.3. Nem Tutma Oranı

Filmlerin nem tutma oranı (NTO) ağırlık tartma yöntemiyle belirlenmiştir. Başlangıçtaki kuru ağırlıkları belirlenen filmler, ilk olarak %55 bağıl nem (BN) ve 20 °C sıcaklık sağlayan kutularda, ardından %86 BN ve 20 °C sıcaklık sağlayan kutularda bekletilmiştir. Farklı zaman aralıklarında filmler kutulardan çıkarılmış ve tartılmıştır. Bu işlem, film ağırlıkları artık değişmeye kadar devam ettirilmiştir. NTO (g/m².gün) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$NTO = \frac{W_f - W_o}{t.A}$$

Burada,

W_f : Filmin son ağırlığı (g),

W_o : Filmin başlangıçtaki kuru ağırlığı (g),

t : Neme maruz kalınan süre (gün),

A : Filmin alanı (m²)'dir.

3.2.3.4. Oksijen Geçirgenliği

Filmlerin oksijen geçirgenliklerini (P_{O_2}) belirlemek amacıyla, etkin alanı 18,096 cm² olan bir gaz geçirgenlik hücresi kullanılmıştır. Bu hücrenin içine yerleştirilen film, hücrenin girişine bağlanan bir oksijen tüpünden oksijen gazı geçirilmektedir. Hücrenin çıkışına, içinde sabun çözeltisi bulunan bir balon akış ölçer bağlanmakta ve filmden geçen oksijen gazının hızı ölçülmektedir. (Şekil 3.4). Film, filmden geçen oksijen gazının hızını gözleyebilmek amacıyla hücre üzerinde 1 psi ile 30 psi arasında değişen basınçlar uygulanmıştır. Film, filmden geçen gazın, cam tüp içinde belirli sürede aldığı yol kaydedilmiş ve oksijen geçirgenliği aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$P_{O_2} = \frac{Fl}{A\Delta p}$$

Burada,

P_{O_2} : Oksijen geçirgenliği ($\text{cm}^3(\text{STP})\cdot\text{cm}/\text{s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{cmHg}$)

F : Oksijen transfer hızı (cm^3/s)

l : Film kalınlığı (cm),

A : Filmin etkin alanı (cm^2),

Δp : Film üzerindeki basınç (cmHg).

Filmden geçen gazın debisi, standart sıcaklık ve basınç koşullarına göre aşağıdaki gibi düzeltilmiştir:

$$V_{STP} = V_T \frac{273K}{(T + 273)K}$$

Burada,

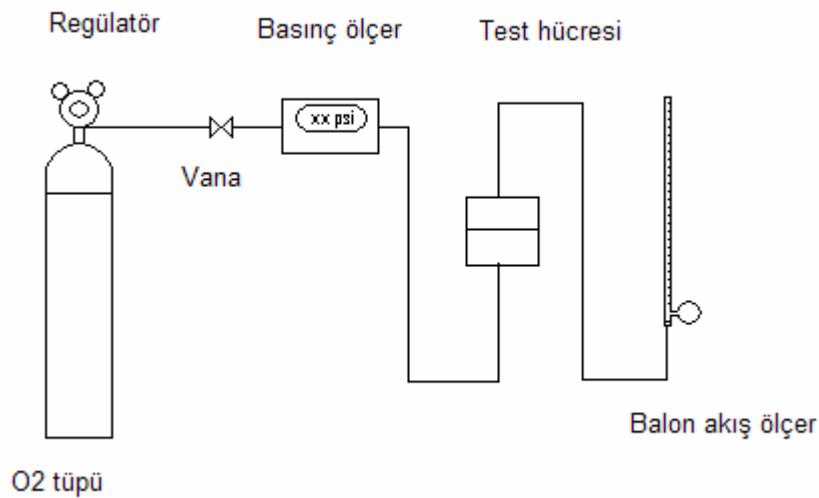
V_{STP} : Filmden standart sıcaklık (0°C) ve basınçta (1 atm) geçen O_2 gazının hacmi,

V_T : Filmden deney sıcaklığı (T) ve basıncı altında geçen O_2 gazının hacmi'dir.

Oksijen transfer hızı (F) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$F = \frac{V_{STP}}{t}$$

Burada t, gazın filmden geçme süresi (sn)'dir.



şekil 3.4. Oksijen geçirgenliği lme düzeneği

3.2.3.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi

Hazırlanan filmlerin yüzey ve kesit özellikleri Imperial College, London'da taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir. Örnekler incelemelerden önce altın ile kaplanmıştır.

3.2.3.6. Mekanik Özellikler

Filmlerin mekanik özellikleri Nexygen yazılım programı içeren bilgisayara bağlı Lloyd LS500 Malzeme Test Cihazıyla (Lloyd, İngiltere) ASTM D882 metoduna göre incelenmiştir. Mekanik testler için her filmde ortalama olarak 5 replike örnek alınmış ve bunlar 12x86 mm boyutlarında dikdörtgen şekilde kesilmiştir. Örnekler, %44-48 bağıl nem ve 26,0-26,7°C sıcaklıkta en az 40 saat boyunca şartlandırılmıştır. Film kalınlıkları dijital bir mikrometre yardımıyla ölçülmüştür. Mekanik testler, 500 N statik yük altında gerçekleştirilmiştir. Film örneklerinin ucuna bağlanan çeneler arasındaki mesafe 50 mm, çenelerin ayrılma hızı da 5 mm/dak olarak ayarlanmıştır. Filmin mekanik özellikleri, gerilme-birim uzama (stress-strain) eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Maksimum çekme mukavemeti (MÇM) (tensile strength), yükün en büyük değerinin, numunenin başlangıçtaki kesit alanına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Kopma anındaki birim uzama (strain at break), numunenin başlangıçtaki boyunun değişme yüzdesi olarak tanımlanmıştır. Elastisite modülü (E) ise, gerilme-birim uzama eğrisinin doğrusal kısmından alınan veri noktalarından eğim hesaplanması ile bulunmuştur.

3.3. Serisinli Yanık/Yara Örtüsü Hazırlanması

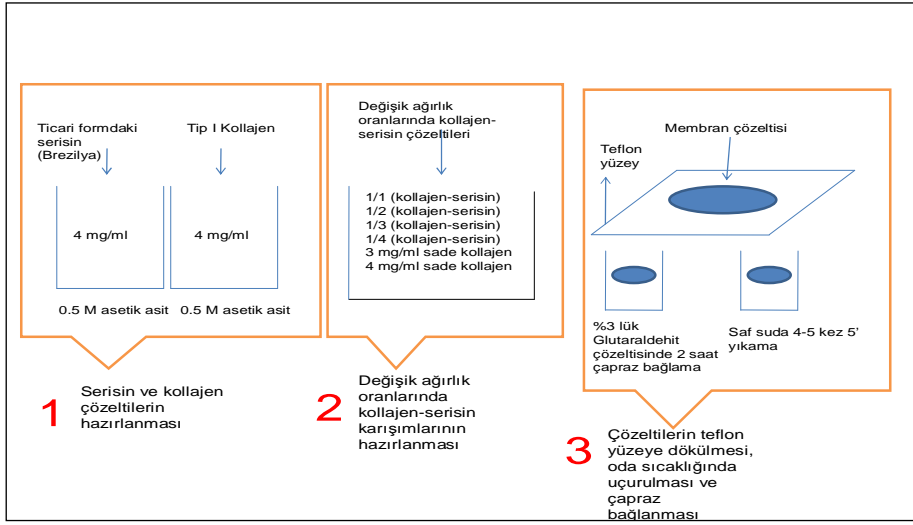
3.3.1. Membranların Hazırlanması

Yanık örtüsü olarak serisin-kollajen membranların hazırlanma optimizasyon deneyleri TÜBİTAK-British Council Bilimsel İşbirliği Programı kapsamında Londra'da Imperial College, Kimya Mühendisliği ve Kimya Teknolojisi Bölümü Membran Üretim Laboratuvarı'nda başlatılmış, ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü Laboratuvarı'nda sürdürülmüştür. Membranlar ticari formdaki serisin (Brezilya) ve kollajen tip I (GelFix liyofilize Tip I Kollajen ped, İsse Int.) kullanılarak hazırlanmıştır. Serisinin su, asetik asit ve organik çözücülerdeki çözünürlük özellikleri incelenmiş ve su en uygun çözücü olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde membran yapımında kullanılacak 2. malzeme olan kollajenin de değişik asit derişimlerinde çözünürlüğü çalışılmış ve 0,5 M asetik asit içinde çözüldüğü belirlenmiştir.

Kollajen stok çözeltisi 0,5 M asetik asit içinde 4 °C'de, serisin stok çözeltisi su içinde oda sıcaklığında bir gece boyunca karıştırılarak hazırlanmıştır. Ayrıca, kollajenin bu sıcaklıktaki çözünürlüğü çok düşük olduğu için çözünememiş olan büyük parçalar homojenizatör yardımıyla mümkün olduğunca küçük parçalar haline gelinceye kadar öğütülmüş ve santrifüj edildikten sonra 100 mikron filtreden süzölmüştür. Düzgün ve homojen membran oluşumunu engelleyecek toz ve kümeleşmiş parçacıkların uzaklaştırılması için aynı filtreden süzme işlemi, serisin çözeltisine de membran yapımı öncesindeki son aşamada uygulanmıştır.

Membran hazırlanmasında 4 mg/ml kollajen ve 1 mg/ml serisin stok çözeltileri kullanılmıştır. 4 mg/ml and 3 mg/ml saf kollajen membranlar ve farklı ağırlık oranlarına sahip (Tablo 3.8) kollajen-serisin ince ve kalın membranlar hazırlanmıştır. İnce membranlar teflon yüzeylere dökme yöntemiyle oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Kalın membranlar ise cam petri kaplarda aynı dökme yöntemiyle hazırlanmıştır.

Hazırlanan membranlar 2 saat %3'lük Gluteraldehit (%50'lik, SIGMA-ALDRICH) çözeltisiyle çapraz bağlanmıştır (WITTAYA-AREEKUL, 2006). (Çapraz bağlama yapılmış membranlar x-ile işaretlenmiştir). Reaksiyona girmeyen çapraz bağlayıcılar 4 kez 5'er dakika boyunca saf suyla yıkama ile uzaklaştırılmış ve kollajen üzerinde geri kalan reaktif gruplar 0,2 M glisin ile bekletilerek kapatılmıştır (CHEN, 2007). Yanık örtüsü olarak kullanılması uygun görülen ve bu amaçla özellikleri incelenen ince membran grupları Tablo 3.8'de gösterilmiştir. Ancak bu membran gruplarıyla yapılan ön çalışmalar sonrasında uygulanabilirlik ve dayanıklılık yönünden en uygun olan gruplar belirlenmiş ve Tablo 1 deki kollajen/serisin oranları 1/1, 1/2, 4X (veya 1/0) gruplar ile bunlara ek olarak 2/1 grubunun yara-yanık örtüsü olarak ayrıntılı incelenmesine karar verilmiştir.



Şekil 3.5. Kollajen-serisin mebranlarının dökme yöntemiyle hazırlanması

Tablo 3.8. Hazırlanan kollajen-serisin membran grupları

Grup No:	Kollajen (ağırlık oranı)	Serisin (ağırlık oranı)
1	1	1
2	1	2
3	1	3
4	1	4
6	1 (3 mg/ml derişimden)	-
7	1 (4 mg/ml derişimden)	-

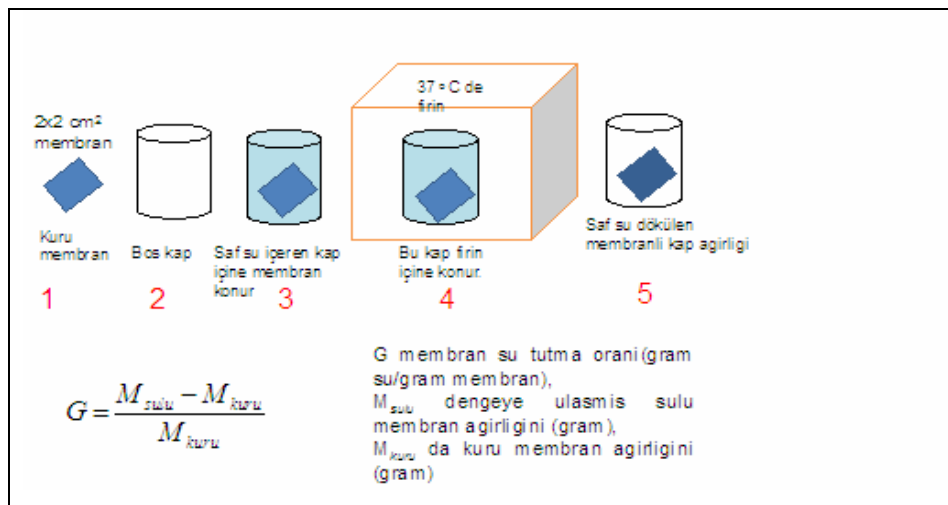
3.3.2. Serisin-Kollajen Membranların Özelliklerinin İncelenmesi

Serisin-kollajen membranların yanık örtüsü olarak uygunluğunun incelenmesi için in situ ve in vitro testler yapılmıştır. Öncelikle hazırlanan kollajen ve serisin-kollajen membranların kalınlıkları hassas kumpas ile ölçülmüştür. Membranların yüzey özellikleri ışık mikroskopisi ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Farklı bileşimlere sahip membranlar 37 °C'de saf su içinde

bekletilerek yapısal bütünlüklerinin korunması, gravimetrik ölçümler (kuru ve yaş ağırlık değişimleri), makroskopik ve mikroskopik incelemeler ve kolorimetrik yöntemler ile (inkübasyon ortamına çıkan toplam protein miktarları hesaplanarak) incelenmiştir. Hazırlanan membranların biyoyuymululukları hücre kültüründe sitotoksosite testleri yapılarak araştırılmıştır.

3.3.2.1. Membranların Su Tutma Kapasitesinin İncelenmesi

Yukarıda belirtilen değişik oranlardaki membranlardan 2x2 cm² boyutlarında örnekler kesilmiş ve kuru ağırlıkları hassas terazi ile ölçülmüştür. Her bir membran 3 cm çapında (yaklaşık 4 cm yüksekliğinde, ağırlığı önceden ölçülmüş) kapaklı plastik kaplar içerisine ayrı ayrı yerleştirilmiştir. Membranların üzerine saf su eklenerek tekrar ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra kaplar, kapakları buharlaşmayı engelleyecek şekilde sıkıca kapatılmış olarak sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış fırının içine yerleştirilmiştir. Membranların su tutma kapasiteleri ilk gün 1. ve 3. saatlerde, daha sonra da 24 saatte bir 4 hafta boyunca incelenmiştir. Örneklerin içinde bulunduğu su alınarak kap ile membranın tartılması ve kuru kap ağırlıklarınının bu değerlerden çıkarılması ile son ağırlıkları belirlenmiştir (Şekil 3.6). Aynı yüzey alanına sahip membranların içeriklerinin farklı olması nedeniyle farklı ağırlıklara sahip oldukları gözlenmiş ve bu yüzden membranlarda tutulan su miktarları membranların kendi ağırlıklarıyla normalize edilerek birim membran ağırlığına düşen su tutma kapasitesi hesaplanmıştır. Membranların su tutma kapasitelerinin incelenmesi deneyleri, her grup için dört örnekle yapılmıştır (TANODEKA EW, 2004; WITTAYA-AREEKUL, 2006).



Şekil 3.6. Membranların su tutma oranlarının hesaplanması

3.3.2.2. Sulu Ortamda Ağırlık Değişiminin İncelenmesi

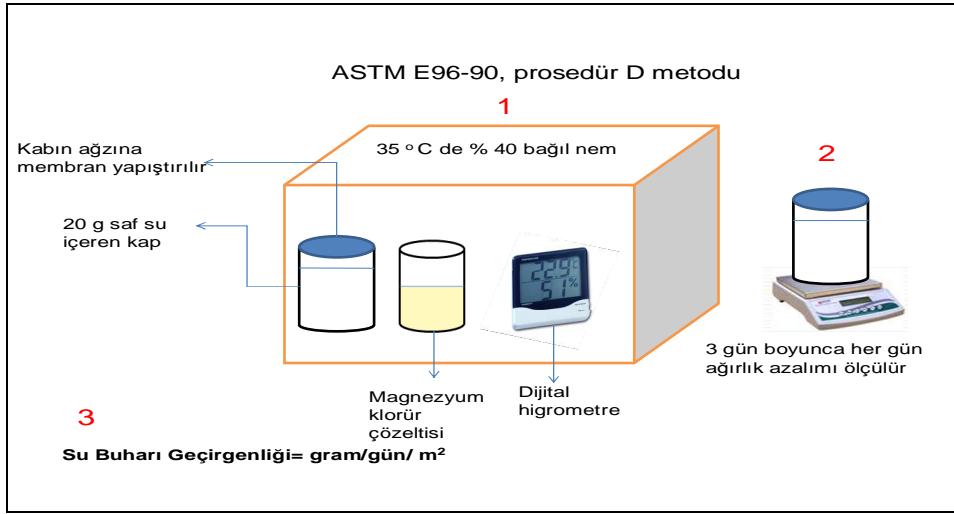
Dört hafta sulu ortamda bekletilen membranlar tüm su alındıktan sonra yine 37 °C'de bir gece bekletilerek kurutulmuş ve membranların tek olarak ölçümleri alınmıştır. Membranların yapısal bütünlüklerini koruma özellikleri ve ağırlık kaybı değerlendirilmiştir.

3.3.2.3. Sulu Ortamda Protein İçeriğinin İncelenmesi

Zamana bağlı olarak membranlardan su ortamına çıkan toplam protein miktarları bisisonik asit (BCA) bazlı protein analiz yöntemiyle belirlenmiştir. Protein tayininde kullanılacak kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için standart proteinler olarak serum albumin (sığır kaynaklı) kullanılmıştır. Membranların bekletildiği su ortamından farklı zamanlarda alınan 100 µl'lik örnekler 48 kuyucuklu kaplara alınmış ve üzerine 1 ml bakır sülfat-BCA karışımı eklenmiş ve 37 °C'de yarım saat bekletilmiştir. Kuyucuklarda oluşan renk 562 nm dalga boyunda ışık tutma yüzdeleri olarak (abzorbans) mikroparka okuyuculu spektrofotometre ile (BioTek µQuant) ölçülmüştür. Su ortamlarına çıkan toplam protein miktarı kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır.

3.3.2.4. Su Buharı Geçirgenliği Testi

Su buharı geçirgenliği hızı D ASTM E96-90 yöntemine göre belirlenmiştir. Bunun için, dış çevreye bağlı değişimleri engellemek amacıyla kapalı bir ortamda bir buharlaşma sistemi oluşturulmuştur. Sistem özetle 35 °C'de sabitlendirilmiş isothermal bir fırın içine yerleştirilmiş ve içinde % bağıl nemi ve sıcaklığı gösteren bir higrometre de bulunan hava geçirmeyen kapaklı bir kutudan oluşmaktadır. Kutu içine, nemin %40 derecede sabit tutulması için doygun bir magnezyum klorür solusyonu yerleştirilmiştir. Su buharı geçirgenliği hızının ölçüleceği membranlar su dolu kaplara yapıştırıldıktan sonra hazırlanan bu düzeneğin içine yerleştirilmiştir. Su buharı geçirgenliği ölçülecek olan membranlar, içinde 20 g su bulunan 3 cm kapak çapı ve 5 cm yüksekliği olan kapların kapak yüzeylerine kollajen çözeltisiyle sıkıca yapıştırılmıştır. Su buharının membrandan geçişi, kapların ağırlık azalması olarak 4 gün boyunca gravimetrik olarak takip edilmiş ve günlük ağırlık değişiminin eğrisi çizilmiştir. Bu grafikten çıkan eğim, kullanılan kapların buharlaşma alanına bölünerek su buharı geçirgenliği hesaplanmıştır. Tüm deneylerde, üstü açık su dolu kap, kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Şekil 3.7) (ADEKOGBE, 2005; ASTM E96-00).



Şekil 3.7. Kollajen-serisin membranlarının su buharı geçirgenliği testi

3.3.2.5. Oksijen Geçirgenliği Testi

Membran oksijen geçirgenliği testleri için membranlar, içlerinde üst yüzeylerine yakın miktarda distile su bulunan 250 mililitrelik flaslara yapıştırıldı. Üst tarafı hava geçirmeyecek şekilde bir kapakla kapatılan flask negatif (kapalı) kontrol, ağzı açık olan flask da pozitif (açık) kontrol olarak kullanıldı. Test flaslari, 24 saatlik bir süre boyunca manyetik karıştırıcılarla karıştırılarak bekletildi. Daha sonra toplanan su örnekleri içlerinde çözülmüş olan oksijeni ölçmek için Winkler metoduna göre analiz edilmiştir.

Winkler metoduna göre divalent manganer sülfat çözeltisi ($MnSO_4 \cdot H_2O$) test edilen su içerisine eklendi. Bu işlemi kuvvetli bir alkali-iyodit çözeltisinin ($KOH+KI$) eklenmesi takip etti. Bunun sonucunda, suda çözülmüş manganer (II) iyonları suda bulunan hidroksit iyonları ile bağlanarak $Mn(OH)_2(s)$ oluşturmaktadır. Kuvvetli bir baz varlığında oksijen bu manganer kompleksini Manganer (III) ($Mn(OH)_3$) olarak yükseltmektedir. Bunu sonucunda oksijenle tepkimeye giren $Mn(OH)_3$ flask tabanında kahverengi soluk renkte bir çökelti olarak gözlenmektedir. Suda bulunan iyodit (I), konsantre bir asit çözeltisi olan sülfürik asit eklenmesi sonucu çökeltiyle tepkimeye girerek Mn^{+2} ve iyodin oluşur. Böylece çözeltideki bütün oksijen, iyodine dönüştürülmüş olur. Bu çözeltinin rengi altın sarısı olarak gözlenmektedir. Son olarak çözelti 0,025 N Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) çözeltisiyle titre edilerek oksijen miktarı tayin edilmektedir. Titrasyon işlemine altın sarısı renk soluklaşmaya başlayana kadar devam edilmiş ve titrasyon işleminin bitiş noktasının doğru

taini için nişasta çözeltisi indikatör olarak bir miktar daha eklenmiştir. Titrasyon sonunda Sodium thiosulfate çözeltisinin miktarı büretten okunmuştur. Her 1 ml Sodyum thiosülfat ≥ 1 mg/L çözünmüş oksijen eşitliği kullanılarak suda bulunan çözünmüş oksijen miktarları hesaplanmıştır.

3.3.2.6. Mikrobiyal Geçirgenlik Testi

Membranların mikrobiyal geçirgenlik özellikleri otoklavlanarak sterilize edilmiş 10 ml bakteri büyüme besiyeri içeren ağzı açık cam tüplerin üstüne membranlar yapıştırılarak test edilmiştir. Test edilen membranlar %70'lik etil alkol içinde 15 dakika bekletilerek sterilize edilmiştir. Örnekler için, ağzı pamuk topu ve alüminyum folyo ile kapanmış cam tüpler negatif kontrol, ağzı açık olan tüpler de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Örneklerin hepsi ikişerli olarak çalışılmıştır. Test edilecek cam tüpler açık ortamda 1 hafta boyunca bekletilmiştir. Bir hafta sonunda bakteri büyüme besiyerinde oluşan değişimler makroskopik olarak ve 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrik ölçümlerle kaydedilmiştir (WITTAYA-AREEKUL, 2006).

3.3.2.7. Mekanik Özellik Testleri

Membranların mekanik özellikleri Nexygen yazılım programı içeren bilgisayara bağlı Lloyd LS500 Malzeme Test Cihazıyla (Lloyd, İngiltere) çekme testleri uygulanarak incelenmiştir. Testler için membranlardan kalıpla Dumbel şeklinde parçalar kesilmiştir. Böylece örneklerde çekme uzunluğu 10 mm-gauge length ve çekme yapılan genişlik 4 mm olarak sabit tutulmuştur. Örneklerin kaymasını önlemek için çeneler üzerindeki örnek tutma bölgelerine zımpara kağıdı yapıştırılmıştır. Çekme testleri ASTM D 882 (İnce plastik örtülerin çekme gerilme özellikleri için standard test yöntemleri) metoduna uygun olarak yapılmıştır. 10 mm/dakika çekme hızı ile yapılan testlerle elde edilen yüke karşı uzama (load-deflection) verileri bilgisayar programı ile gerilme-birim uzama (stress-strain) verilerine dönüştürülmüş ve elastisite modülü, ultimate tensile stress (maksimum çekme gerilmesi), ultimate tensile strain (maksimum birim uzama) değerleri bulunmuştur. Strain (birim uzama) değeri başlangıçtaki boyutun yüzdesi olarak hesaplanan uzama miktarıdır. Kalın membranlarda 4 örnekle yapılan testlerin ortalama değerleri kullanılmıştır. İnce membranlarda ise membranların mekanik deneylerinde karşılaşılan (katlanma, elektriklenme, kalıpla kesme sırasında yırtılma, v.b.) nedeniyle 3 örnekle yapılan testlerin ortalaması kullanılmıştır.

3.3.2.8. Biyouyumluluk Testleri

Biyoyumluluk testlerinde 3T3 fibroblast hücre hattı ve HaCaT keratinosit hücre hatları kullanılmıştır. 3T3 hücreleri, derinin stroma katmanında bulunan fibroblast hücrelerinin; HaCaT hücreleri de, epitel yüzeyde bulunan keratinosit hücrelerinin morfoloji ve farklılaşma özelliklerine sahiptir. Hücreler %10 sığır serum ve %1 antibiyotik içeren DMEM vasatı içerisinde 37 °C'de karbondioksit etüvünde çoğaltılmıştır.

Geri kazanılmış serisinin in vitro sitotoksosite deneyleri HaCaT keratinosit hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. Serisin bir gece boyunca suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz öncesi ve sonrası serisin solusyonu hücre kültür deneyleri öncesi şırınga filtrasyonu ile sterilize edilmiştir. Farklı konsantrasyon aralıklarında (20-300 µg/ml) hazırlanan serisin solusyonu 48 kuyucuklu hücre kalıbına ekilen keratinosit hücreleri üzerine ekilmiştir (35000/kuyucuk). Hücreler 48 saat boyunca 37 °C'de karbondioksit etüvünde inkübe edilmiştir. Yapılan testlerin sonuçları hücrelerin hücre ölümleri ve morfolojik değişimler yönünden faz kontrast mikroskopisinde incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Ayrıca, hücrelerin canlılıklarındaki değişimler MTT canlılık testi ile kontrollerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Biyoyumluluk testleri için membranlar öncelikle %70'lik etil alkolde 2 saat bekletilerek sterilize edilmiş ve 24 kuyucuklu steril hücre kültür kaplarına yerleştirilmiştir. Membranların üzerine 3T3 veya HaCaT keratinosit hücreleri ekildikten sonra 1 hafta boyunca karbondioksit etüvünde bekletilmiştir. Birinci günün sonunda membran yüzeyine bağlanan hücreler ışık ve taramalı elektron mikroskopisi ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Hücre-membran yüzey ilişkisinin ve hücre morfolojilerinin incelenmesi için hücreler %3'lük glutaraldehit ile çapraz bağlandıktan sonra taramalı elektron mikroskopisi kullanılmıştır. Ayrıca, membranlara bağlanan hücre sayısı 1., 4. ve 7. günlerde kalın membranlar için MTT canlılık testi ile belirlenmiştir.

3.3.2.9. Kollajen Dağılımının Boyama ile İncelenmesi

Membranlar kollajenin amino asit dizilimine özel olarak (Glisin-X-X) bağlanan sirius kırmızısı ile boyanmış ve kollajen dağılımı incelenerek fotoğraflanmıştır. Kollajen membranlardan alınan örnekler 1 saat oda sıcaklığında sirius kırmızısı ile bekletilmiş ve % 0,5'lik asetik asit çözeltisi ile 3 kez yıkanarak boya uzaklaştırılmıştır.

3.3.2.10. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

Hazırlanan membranlar sulu ortamda bekletilmeden önce ve sonrasında fırında kurutulmuş ve yüzey özellikleri ODTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde taramalı elektron mikroskopisi ile incelenmiştir. Örnekler incelemelerden önce altın ile kaplanmıştır. Biyouyumluluk testleri için membranlar yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmış ve aynı elektron mikroskopisi ile incelenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. SERİSİN GERİ KAZANIMI İLE İLGİLİ BULGULAR

4.1.1. Referans Olarak Kullanılan Serisinin Özellikleri

Toplam protein ve serisin analizlerinde kalibrasyon standardı olarak kullanılmak üzere iki farklı kaynaktan serisin elde edilmiştir. Birincisi Brezilya'da iplik üreten bir firmadan temin edilen (S_C), ikincisi ise yerli kozadan elde edilen (S_N) serisidir. Serisinin özelliklerini belirlemek amacıyla bir dizi analiz yapılmış ve sonuçlar literatür bilgileriyle karşılaştırılmıştır (SILK BIOCHEMICAL Co., Ltd., 2008; ZHANG vd., 2002; WU vd., 2007). Tablo 4.1'ten görüldüğü üzere, S_C ve S_N örneklerinin nem oranları %7,4 ve %8,6 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, Silk Biochemical Co.'nun %5 olarak rapor ettiği değerden biraz yüksek, ancak ZHANG ve diğerlerinin (2002) koza ve ipek ipliği için bulunduğu %9 ve %8,2'lik nem miktarlarına oldukça yakındır.

Tablo 4.1. Referans serisinin özellikleri

Parametre	Kaynak/Referans				
	Bu çalışma		Diğerleri		
	Brezilyadan temin edilen serisin (S_C)	Yerli kozadan elde edilen serisin (S_N)	Silk Biochemical Co. Ltd. *	Zhang vd. (2002)	Wu vd. (2007)
Nem (%)	7,4	8,6	≤ 5	8,2-9,0	-
Azot (%)	13,9	14,9	≥ 14	-	14,7
Sülfür (%)	0,3	0,2	-	-	-
Hidrojen (%)	6,4	6,2	-	-	-
Karbon (%)	42,5	41,0	-	-	-
Kül (%)	2,7	3,8	≤ 4	0,9-1,0	4,2
pH	3,9	7,1	5-7	-	~ 7
Molekül Ağırlığı (kDa)	138	124	6-15	10-300	14-467

* <http://www.alibaba.com/catalog/10624740/Sericin.html>

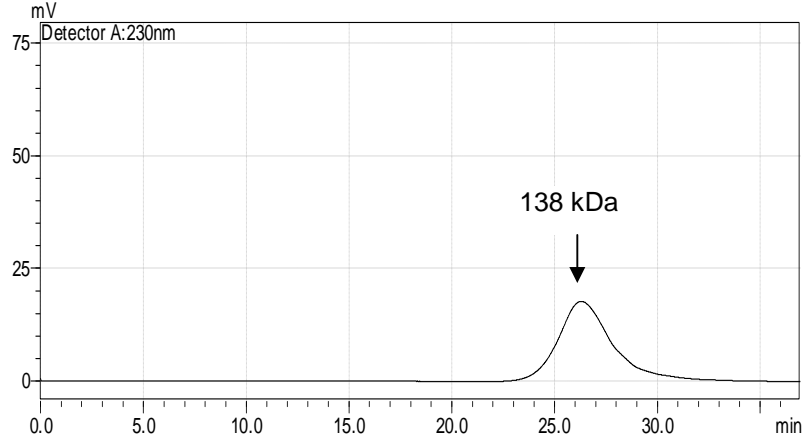
S_C ve S_N örneklerinin elementel kompozisyonu oldukça benzer çıkmıştır (Tablo 4.1). Her ikisi için de C, H, N, S miktarlarının toplamı %62-63 olmuştur. Brezilya'dan temin edilen ve yerli kozadan elde edilen serisin örneklerinin azot içerikleri %13,9 ve %14,9 olarak bulunmuştur. Bu değerler, literatürde rapor edilen %14 ve %14,7 seviyelerindeki azot miktarları (Silk Biochemical Co. Ltd., 2008; Wu et al., 2007) ile hemen hemen aynıdır. Benzer şekilde, S_C ve S_N örneklerinin S, H ve C içerikleri de sırasıyla %0,2-0,3, %6,2-6,4 ve %41,0-42,5 seviyelerinde oldukça yakın bulunmuştur.

Örneklerin kül miktarları S_C ve S_N için %2,7 ve %3,8 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Serisinin termal özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada bu oran koza ve ipek ipliği için %0,9 ve %1,0 olarak rapor edilmiştir (ZHANG vd., 2002). Bu çalışmada elde edilen kül miktarının daha yüksek olması, büyük olasılıkla uygulana yakma sürelerinin farklı olması ile ilgilidir. Bir diğer olası neden, farklı malzemelerin yakılmış olmasıdır; bu çalışmada saf serisinin kül miktarı bulunurken diğer çalışmada koza kabuğu ve ipek ipliği yakılmış, serisine ek olarak fibrion bulunması, kül miktarlarında farklılığa neden olmuş olabilir. Diğer yandan, S_C ve S_N örneklerinin kül miktarları, SILK BIOCHEMICAL Co. Ltd. (2008) ve WU vd. (2007) tarafından %4 ve %4,2 olarak rapor edilen değerlere oldukça yakındır. Bu değerler, serisinin az da olsa tuz içerebileceğine işaret etmektedir. Bu sonuç, kalsiyum, potasyum, sülfür, fosfor, silikon ve magnezyum içeren kozanın inorganik kompozisyonu ile de uyumludur (ASABE, 2008; ZHANG vd., 2001). Bu veriler, S_C ve S_N örneklerinin organik içeriğinin %97,2 ve %96,2 olduğunu göstermektedir. C, H, N ve S miktarlarının toplamı %62-63 olarak bulunduğundan, aradaki farkın oksijen miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

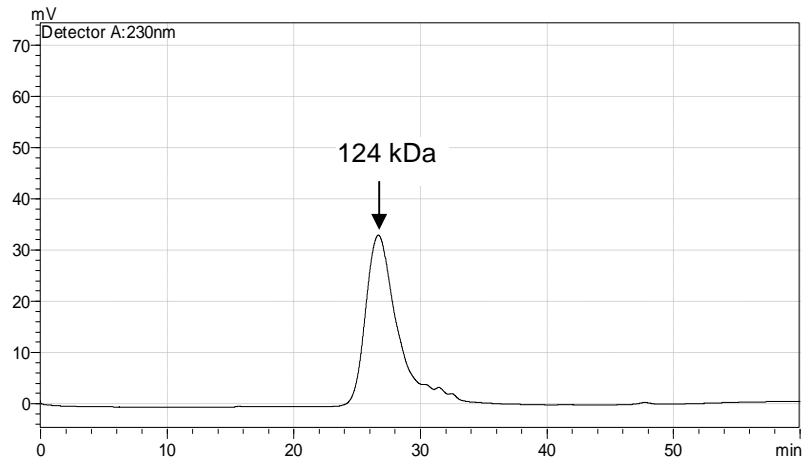
Son olarak S_1 ve S_2 örneklerinin pH değerleri ölçülmüş, sırasıyla 3,9 ve 7,1 olarak bulunmuştur. Literatürde serisinin pH değeri 5-7 olarak rapor edilmiştir (SILK BIOCHEMICAL Co. Ltd., 2008; WU vd., 2007). Bu farkın serisinin elde edilme yönteminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Zira, toz serisin etanolde çökeltme işleminin yanı sıra asitte çökeltme işlemi ile de elde edilebilmektedir (KURIOKA, 2004).

Serisin için 6 kDa ile 467 kDa arasında değişen geniş bir molekül ağırlık (MA) aralığı belirtilmektedir (SILK BIOCHEMICAL Co. Ltd., 2008; WU vd., 2007, ZHANG vd., 2002). Bunun başlıca sebebi, serisinin molekül ağırlığının, uygulanan işlemin pH'ı, sıcaklığı ve süresi gibi faktörlerden etkilenmesidir (ZHANG, 2002). Bu çalışmada kullanılan S_C ve S_N örneklerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 138 kDa ve 124 kDa olarak bulunmuştur (Şekil 4.1). Görüldüğü üzere, bu değerler literatür verileri ile uyumludur.

Referans olarak kullanılan serisin örneklerinin özellikleri, literatürde rapor edilen verilerle oldukça benzer bulunmuştur. Dolayısıyla, referans örneklerin geri kazanılan serisin örneklerini değerlendirmede güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



(a)



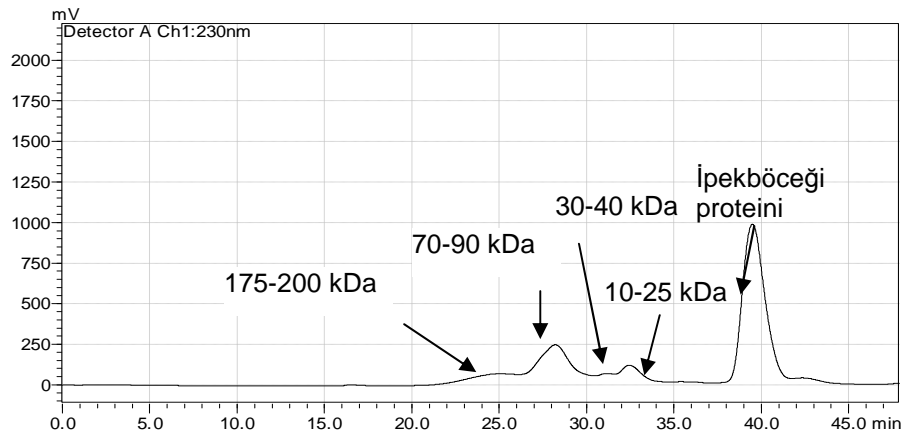
(b)

Şekil 4.1. (a) S_C ve (b) S_N örneklerine ait HPLC kromatogramları

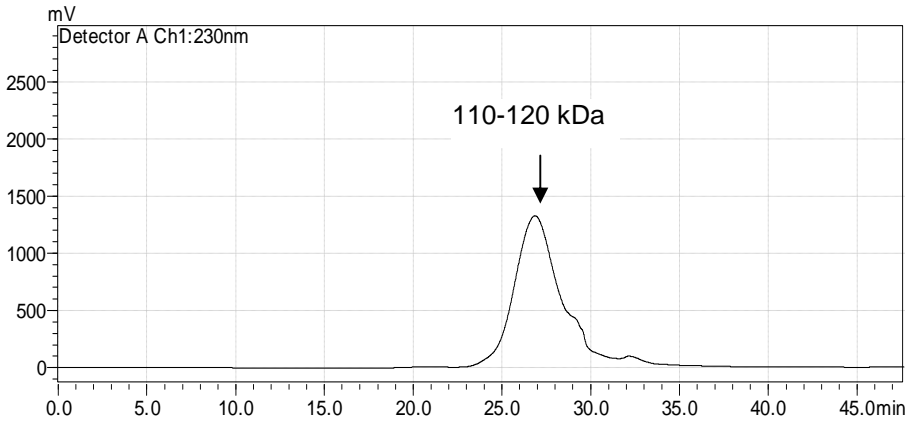
4.1.2. İpek İşleme Atıksularındaki Serisinin Özellikleri

Koza pişirme ve ipek ipliği pişirme atıksularındaki serisin derişimleri oldukça farklı bulunmuştur. KPA'nda 5043-7957 mg/L, İPA'nda ise 27581-34002 mg/L olarak ölçülmüştür (Tablo 3.1). Koza ve ipek ipliği pişirme atıksularının debilerinin 1875 L/gün ve 7500 L/hafta olduğu dikkate alındığında, yıllık olarak KPA'ndan 750-1200 kg, İPA'ndan ise 10000-13300 kg serisin elde edilebileceği görülmektedir.

Serisin için en uygun membran esaslı geri kazanım yöntemini belirlemeden önce atıksuda bulunan serisinin özellikleri belirlenmiştir. Koza ve ipek ipliği pişirme atıksularında bulunan serisinin molekül ağırlık dağılımları Şekil 4.2'de verilmiştir. Tablo 4.2'de ise serisinin farklı MA'na sahip polipeptidleri ve atıksudaki derişimleri verilmiştir. Görüldüğü üzere, KPA'nda dört farklı serisin vardır; Serisin-1 (MA 175-200 kDa, atıksudaki oranı %5-25), Serisin-2 (MA 70-90 kDa, atıksudaki oranı %53-69), Serisin-3 (MA 30-40 kDa, atıksudaki oranı %4-8) ve Serisin-4 (MA 10-25 kDa, atıksudaki oranı %12-22). En yüksek ve en düşük oranların, Serisin-2 ve Serisin-3'e ait olduğu tespit edilmiştir. İPA'nda ise tek bir MA bulunmuş, Serisin-İPA adı verilmiştir (MA 110-120 kDa).



(a)



(b)

Şekil 4.2. (a) KPA ve (b) İPA'nda serisinin MA kromatogramları

Tablo 4.2. Serisinin atıksudaki MA dağılımı

Adı	MA (kDa)	Atıksudaki oranı (%)	
		KPA	İPA
Serisin-1	175-200	5-25	-
Serisin-2	70-90	53-69	-
Serisin-3	30-40	4-8	-
Serisin-4	10-25	12-22	-
Serisin-SDW	110-120	-	100

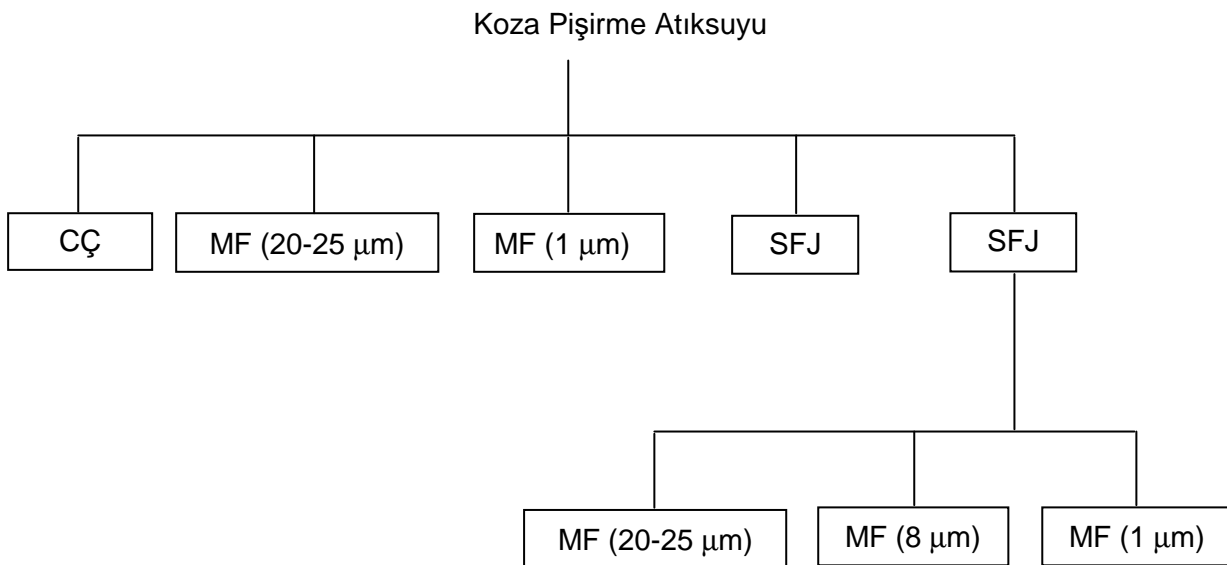
Şekil 4.2(a)'da görüldüğü üzere, atıksudaki serisin GPC kolonundan 6,0 ve 11,0. dakikalar arasında çıkmaktadır. Ayrıca, 11,5 ve 13,5. dakikalar arasında serisin olmayan bir maddenin daha kolondan çıktığı farkedilmiştir. Bu maddenin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 3000 Da olarak hesaplanmıştır. Bu maddenin İPA'nda ve referans serisinde bulunmadığı, yalnızca KPA'nda bulunduğu ve ipek böceğinden kaynaklandığı farkedilmiştir (Ek H). Yabancı maddenin tanımlanması için bir kaç ipekböceği alınarak tartılmış ve üzerine 25 mL su ekleyerek 120 °C'de 1 saat otoklav yapılmıştır. Bu solüsyonda hem serisin hem de yabancı protein olduğu tespit edilmiş ve iki maddeyi ayırmak amacıyla FPLC ile fraksiyon toplama işi yapılmıştır. Ardından, yabancı maddenin protein olduğu Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde tanımlanmıştır. Hangi protein olduğunun anlaşılması için, örnek MALDI-TOF ile analiz edilmiştir. SWISS-PROT ve ExPASy protein veritabanları (ExPASy, 2008) ile yapılan uyumluluk çalışması sonucunda bu proteinin *Bombyx mori* ipekböceğinden kaynaklandığı ve Tablo 4.3'te verilen proteinlerle uyumlu olduğu bulunmuştur. Bu proteinler arasında, MA 10 kDa ile en küçük olanı Bombyxin B-2 (P26734)'dir. GPC analizi ile de bu maddenin yaklaşık olarak 3000 Da olduğu hesaplanmış idi. Dolayısıyla, GPC ile bulunan MA değerine en yakın olduğundan, yabancı proteinin Bombyxin B-2 olduğu speküle edilebilir.

Tablo 4.3. Yabancı madde ile uyum gösteren proteinler

ExpASy Giriş Numarası	Protein Adı	Kaynağı	MA (Da)
P07836	Actin, muscle type A1	<i>Bombyx mori</i>	41876
P22922	Antitrypsin	<i>Bombyx mori</i>	43499
P26734	Bombyxin B-2	<i>Bombyx mori</i>	10039
Q17239	5-hydroxytryptamine	<i>Bombyx mori</i>	48599
Q2F637	14-3-3 protein zeta	<i>Bombyx mori</i>	28097
Q566B1	Bursicon	<i>Bombyx mori</i>	17901

4.1.3. KPA için En Uygun Ön-arıtma Yönteminin Seçilmesi

Serisin geri kazanımı için uygulanan membran proseslerinde, membran kirlenmesini en aza indirmek için uygun bir ön-arıtma işlemi belirlemek gerekmektedir. Ancak, geri kazanılacak proteinin bu aşamada kaybedilmemesi de gerekir. Bu nedenle, ön-arıtma aşamasında üç farklı fiziko-kimyasal yöntem, toplam dört ayrı alternatifte değerlendirilmiştir. Bunlar sırasıyla, ayırık ve ardışık denenen cazibe ile çöktürme (CÇ), mikrofiltrasyon (MF) ve santrifüj (SFJ) yöntemleridir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Ön-arıtma alternatiflerinin şematik gösterimi

4.1.3.1. Cazibe ile Çökeltme

Birinci alternatifte, en ekonomik yöntem olarak cazibeyle çökeltme uygulanmıştır. KPA yaklaşık olarak 21 saat bekletilmiş, ancak yalnızca %34 oranında katı madde çökmüştür. Buna ek olarak, atıksuda bulunan proteinler, hızlı bir bozulmaya neden olmuştur. Bu durumda CÇ'nin bu tür atıksular için kolaylıkla uygulanamayacağı anlaşılmıştır.

4.1.3.2. Mikrofiltrasyon

İkinci alternatifte, MF uygulanmış ve atıksu, gözenek büyüklüğü 20-25 µm ve 1 µm olan membranlardan süzölmeye çalışılmıştır. MF (20-25 µm) ile %15, %8 ve %20 oranlarında KOİ, renk ve bulanıklık giderimleri sağlanmış, akı ise 930 L/saat/m² olarak bulunmuştur. Giderimler yüksek olmadığından, MF (1 µm) uygulanmıştır. KOİ, renk ve bulanıklık giderimleri belirgin bir şekilde artmış ve %34, %79 ve %99'a yükselmiştir. Ancak oldukça hızlı bir tıkanma meydana gelmiş ve akı 200 L/saat/m² olarak bulunmuştur (Tablo 4.4). Görüldüğü üzere, tıkanma, membranda ciddi bir akı azalmasına neden olmuş ve MF (1 µm)'in akısı MF (20-25 µm)'e kıyasla yaklaşık 5 kat azalmıştır. Bu sonuçlar, doğrudan MF uygulamasının kabul edilir olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, MF öncesinde daha etkin katı madde giderimi sağlayacak bir yöntem olan santrifüj denenmiştir.

Tablo 4.4. Ön-arıtma işlemlerinin giderim performansları

İşlem	Giderim Performansı (%)					Akı ^a (L/saat/m ²)
	KOİ	TKM	T. Protein	Renk	Bulanıklık	
MF (20-25 µm)	15	-	-	8	20	930
MF (1 µm)	34	-	-	79	99	200
SFJ	26	21	22	74	92	-
SFJ + MF (20-25 µm)	27	26	24	76	95	32900
SFJ + MF (8 µm)	33	25	33	80	96	8500
SFJ + MF (1 µm)	35	26	32	80	98	10500

^a Toplam süzölen su hacminin, süzme süresi ve etkin membran alanına bölünmesiyle hesaplanmıştır.

4.1.3.3. Santrifüj

Üçüncü alternatifte, atıksu doğrudan 3000 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir. KOİ, TKM ve toplam protein giderimleri %26, %21 ve %22 olarak bulunmuştur. Buna ek olarak, renk ve bulanıklık giderimleri de %74 ve %92 olmuştur (Tablo 4.4). Bu veriler, SFJ ve MF işlemlerinin benzer sonuçlar verdiğini göstermiştir. Arkadan gelecek membran süzme işleminde oluşacak kirlenmeyi kontrol etmek için aynı derecede etkin olacakları söylenebilir. Ancak, santrifüj işleminden sonra yüzeyde çökmeyen koza parçaları gözlenmiştir. Bu maddelerin membran işleminden önce uzaklaştırılması gerekmektedir. Buna ek olarak, atıksudaki serisinin ön-arıtma işleminde diğer kirlenici maddelerden ayrılması ve membran süzme işlemine geldiğinde en saf haliyle yoğunlaştırılması gerektiğinden, SFJ ve MF işlemlerinin birlikte uygulanması zorunlu görülmüştür. Öncesinde SFJ uygulanan MF işleminde de akıların ciddi oranda artacağı düşünülmüştür.

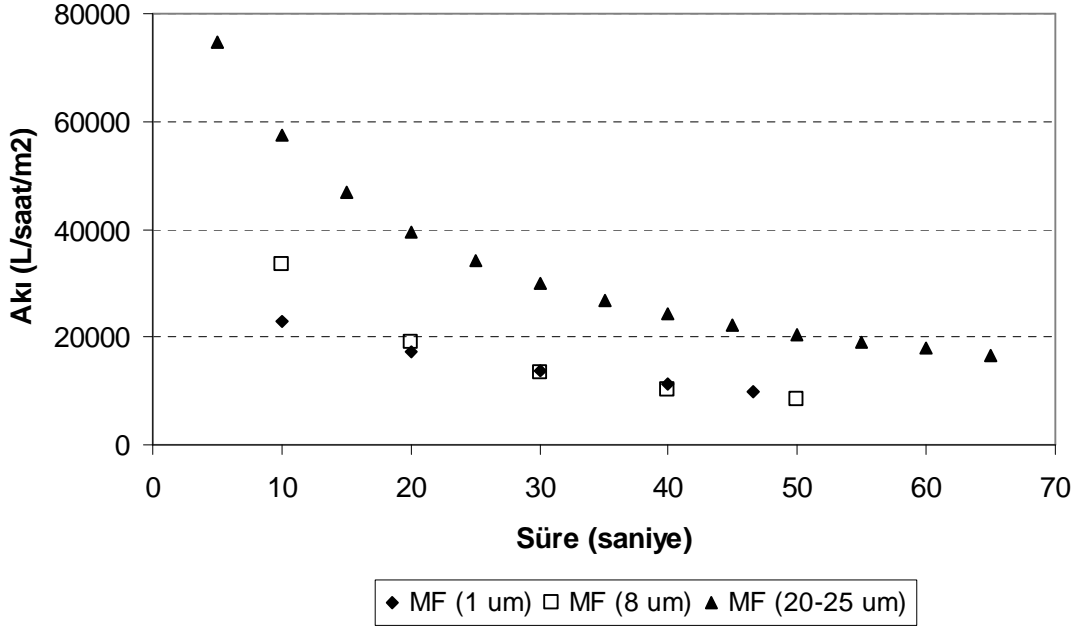
4.1.3.4. Santrifüj + MF

Dördüncü alternatifte SFJ+MF uygulanmıştır. Tablo 4.4'te görüldüğü üzere, SFJ sonrasında MF (20-25 µm) uygulanması ile giderim performansları artmış, KOİ, TKM ve toplam protein için giderimler %27, %26 ve %24'e yükselmiştir. Benzer olarak, renk ve bulanıklık giderimleri de %76 ve %95'e yükselmiştir. Diğer taraftan, akı 930 L/saat/m²'den 32900 L/saat/m²'ye yükselerek yaklaşık 35 kat artış göstermiştir. SFJ + MF (8 µm) ve CFG + MF (1 µm) seçeneklerinde ise, KOİ, TKM ve toplam protein giderim verimleri %33-35, %25-26 ve %32-33'e yükselmiştir. Benzer şekilde, renk ve bulanıklık giderimleri de %80 ve %96-98'e kadar yükselmiştir.

MF (8 µm) ve MF (1 µm)'in akıları 8500 ve 10500 L/saat/m² olarak belirlenmiştir. Akılar, zamana karşı izlenmiş ve Şekil 4.4'ten görüleceği üzere, MF (1 µm) ve MF (8 µm) akıları 20 saniye sonunda eşitlenmiştir. En yüksek akı, beklendiği gibi MF (20-25 µm)'de görülmüş, 50 saniyelik süzme işleminin ardından daha küçük gözenekli olan diğer iki membrana kıyasla 2,2-2,4 kat daha fazla akıya sahip olduğu bulunmuştur. En yüksek akının SFJ + MF (20-25 µm) sürecinde gözlenmesine rağmen, en iyi süzüntü suyu kalitesi SFJ + MF (1 µm) sürecinde elde edilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Ön-arıtması yapılmış KPA özellikleri

İşlem	Ön-arıtma çıkış kalitesi				
	KOİ (mg/L)	TKM (mg/L)	T. Protein (mg/L)	Renk (Pt-Co)	Bulanıklık (NTU)
SFJ	8597	8075	7403	2280	60
SFJ + MF (1 µm)	7513	7613	6426	1730	18
SFJ + MF (8 µm)	7773	7700	6341	1760	33
SFJ + MF (20 µm)	8460	7625	7148	2040	38



Şekil 4.4. MF akı karşılaştırması

Ele alınan ön-arıtma alternatifleri arasında santrifüj, katı madde giderimi için oldukça uygun bir yöntem olmuştur. Ancak, geri kazanılacak serisinin saf olarak elde edilmesi, proje amacı dikkate alındığında büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda, ön-arıtma yönteminin serisinin haricindeki bütün safsızlıkları gidermesi beklenmektedir. SFJ tek başına uygulandığında bu amaca ulaşak mümkün olmadığı için, daha pahalı olmasına rağmen ardışık bir yöntem olan SFJ+MF uygulanmasına karar verilmiştir. En iyi süzüntü suyu kalitesi MF (1 µm) ile sağlandığından, ardışık uygulamada MF gözenek büyüklüğü 1 µm olarak seçilmiştir.

4.1.3.5. MF'in UF Performansı Üzerine Etkisi

Ön-arıtma aşamasında MF uygulanmasının, ardından gelen membran işleminin performansı üzerindeki etkisi de ayrıca incelenmiştir. Bunun için iki set deney yapılmıştır; 1. SFJ + UF (20 kDa), 2. SFJ + MF (1 µm) + UF (20 kDa). Bu iki alternatif süreçte elde edilen giderim verimleri ve süzöntü suyu kaliteleri Tablo 4.6'da verilmiştir. Görüldüğü gibi, öncesinde MF (1 µm) olmayan UF (20 kDa) membranı toplam protein ve KOİ için %66 ve %53 oranında, renk ve bulanıklık için ise %94 ve %99 oranında giderim sağlamıştır. Öncesinde MF (1 µm) uygulandığında ise, bu giderimler toplam protein ve KOİ için sırasıyla %87 ve % 55'e yükselmiş, renk ve bulanıklık için ise aynı kalmıştır.

Akılar üzerindeki etki de olumlu olmuş, öncesinde MF uygulanan UF işleminde akı azalması %88'den %80'e düşmüştür. Membran temizliği için iki farklı yöntem uygulanmıştır. SFJ + UF (20 kDa) sürecinde, hem filtrasyon sistemi hem de membran NaOH (pH 10) ve ardından HNO₃ (pH 3) ile yıkanmıştır. Ancak akıda yalnızca %27 oranında iyileşme sağlanmıştır. İkinci yıkama işleminde ise NaOH ve klor karışımı kullanılmıştır (CRAWFORD vd., 1995; WU vd., 2006). Membran, 0,5 M NaOH ve yaklaşık 200 ppm serbest klor içeren bir kaptaki 40-45 dak bekletilmiştir. Ardından saf su akısı okunmuştur. Bu yöntemle, MF sayesinde, UF'in saf su akısındaki geri kazanım %83'ten %104'e çıkmıştır (Tablo 4.6). Akı geri kazanımının %100'ün üzerinde olmasının olası nedeni, yıkama kimyasallarına maruz kalan membranın hidrofilitésinin artmış olmasıdır.

Öncesinde MF uygulanan ve uygulanmayan UF'te akı azalması analizi de yapılmıştır (Tablo 4.7). Konsantrasyon polarizasyonu ve toplam kirlenme oranları, tek başına uygulanan UF'te %42 ve %79 olarak hesaplanmıştır. Burada, toplam kirlenmenin %20'si geri döndürülebilir, %73'ü ise geri döndürülemez olmuştur. Bu da saf su akısının kimyasal yıkama ile geri kazanılamadığını göstermektedir. UF'in öncesinde MF uygulandığında ise, konsantrasyon polarizasyonu %67'ye çıkarken toplam kirlenme %40'a düşmüştür. Buna ek olarak, saf su akısı tamamen geri kazanılmıştır. Bu sonuçlar, ön-arıtmada ikinci kademe yöntem olarak MF uygulanmasının, hem akı kontrolü hem de giderim performansı açısından faydalı olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, ön-arıtma yöntemi olarak SFJ + MF (1 µm) uygulamasının yerinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.6. UF (20 kDa) işleminin performansı

Parametre	Süzüntü suyu kalitesi	
	(Toplam tutma/giderim performansı, %)	
	(KPA1 ile)	
	SFJ + UF (20 kDa)	SFJ + MF (1 µm) + UF (20 kDa)
Serisin (mg/L)	nm	2080
T. Protein (mg/L)	2738 (66)	1624 (87)
KOİ (mg/L)	5440 (53)	5205 (55)
TKM (mg/L)	nm	6500 (37)
Renk (Pt-Co)	540 (94)	570 (93)
Bulanıklık (NTU)	4,6 (99)	7,2 (99)
pH	5,7	5,9
Akı azalması (%)	88	80
Akı geri kazanımı (NaOH+HNO ₃) (%)	27	68
Akı geri kazanımı (NaOH+Klor) (%)	83 ^a	104 ^b

nm: ölçülemedi

^a0,5 M NaOH +196 ppm serbest Cl, 45 dak

^b0,5 M NaOH + 240 ppm serbest Cl, 40 dak

SFJ + MF (1 µm) en uygun ön-arıtma işlemi olarak seçildikten sonra, koza pişirme atıksuyu örneklerine uygulanmıştır. Tablo 4.8'den görüldüğü üzere, serisin ve toplam protein tutma oranları, arzu edildiği gibi düşük olmuş; sırasıyla %1-16 ve %3-18 olarak gerçekleşmiştir. KOİ ve TKM ise temel olarak atıksudaki serisinden kaynaklandığı için, bu parametreler için de giderimler %23-36 ve %11-19 seviyesinde kalmıştır. Renk ve bulanıklık ise %48-92 ve %94-98 oranında giderilmiştir. Karbonhidrat giderim verimi ise %12-46 olmuştur.

Tablo 4.7. UF (20 kDa) için akı azalması analizi

İşlem	Akı (L/m ² /saat) (T=20-24 °C)				Akı Azalması (%)			
	I	W	F	C	C.P.	T.F.	R.F.	I.F.
SFJ+UF (20 kDa)	76,0	9,5	16,3	20,4	42	79	20	73
SFJ+MF (1 µm)+UF (20 kDa)	67,9	13,6	40,7	70,6	67	40	*	*

I: Saf su, W: Atıksu, F: Temizleme öncesi saf su, C: Temizleme sonrası saf su

C.P. : Konsantrasyon polarizasyonu [(F-W)/F], T.F. : Toplam kirlenme [(I-F)/I]

R.F. : Geri döndürülebilir kirlenme [(C-F)/C]

I.F. : Geri döndürülemeyen kirlenme [(I-C)/I]

* C değeri I değerinden büyük olduğu için hesaplanamamıştır.

Tablo 4.8. Ön-arıtması yapılan KPA özellikleri
(Toplam dolaşım düzeninde yürütülen deneylerde kullanılan örnekler)

Parametre	Ön-arıtma çıkış kalitesi (<i>Tutma/Giderim Verimi, %</i>)				
	UF (20 kDa) (KPA2-A)	UF (5 kDa) (KPA2-B)	UF (1 kDa) (KPA2-C)	NF-DK (KPA2-D)	NF-90 (KPA2-E)
Serisin (mg/L)	5775 (1)	9706	8716	6087	5639 (11)
Serisin-1	1416			1319	108
Serisin-2	3074	nm	nm	3203	2662
Serisin-3	471			575	397
Serisin-4	814			991	1038
T. Protein (mg/L)	7711 (8)	9607 (3)	8217 (10)	7084 (7)	6982 (14)
KOİ (mg/L)	10540 (28)	10470 (30)	10395 (27)	9780 (36)	10090 (23)
TKM (mg/L)	10730 (15)	10700 (19)	10640 (17)	10870 (14)	11110 (11)
Renk (Pt-Co)	2450 (60)	2170 (91)	2130 (92)	2190 (60)	2840 (54)
Bulanıklık (NTU)	36 (94)	17 (98)	14 (97)	21 (96)	30 (94)
Karbonhidrat (mg/L)	251 (29)	nm	nm	299 (26)	634 (18)
pH	5,9	5,8	5,9	5,9	6,1

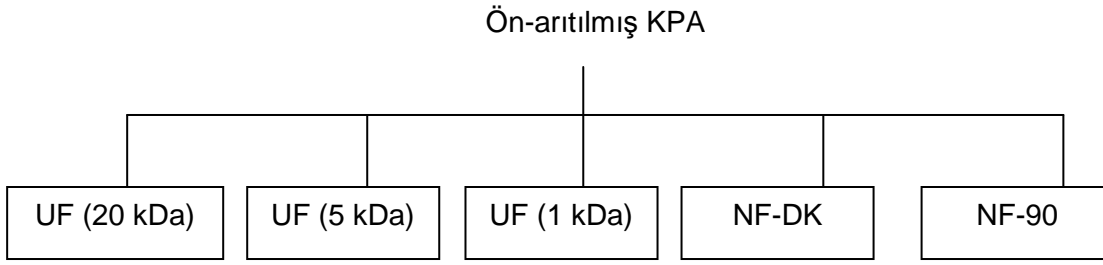
nm: ölçülememiştir

Tablo 4.9. Ön-arıtması yapılan KPA özellikleri
(Yoğunlaştırma düzeninde yürütülen deneylerde kullanılan örnekler)

Parametre	Ön-arıtma çıkış kalitesi (<i>Tutma/Giderim Verimi, %</i>)		
	NF-DK (KPA2-F)	NF-DK (KPA2-G)	NF-90 (KPA2-H)
Serisin (mg/L)	4768 (16)	7800 (2)	4595 (9)
Serisin-1	280	1268	226
Serisin-2	4283	3697	3301
Serisin-3	0	892	0
Serisin-4	205	1943	1068
T. Protein (mg/L)	5262 (5)	6570 (18)	6328 (12)
KOİ (mg/L)	10205 (28)	11140 (35)	9730 (28)
TKM (mg/L)	10700 (14)	11610 (17)	10500 (11)
Renk (Pt-Co)	2080 (63)	3010 (50)	2360 (48)
Bulanıklık (NTU)	17 (98)	56 (94)	18 (98)
Karbonhidrat (mg/L)	156 (46)	1136 (12)	425 (28)
pH	6,1	6,5	5,9

4.1.4. KPA için En Uygun Membran Süzme İşleminin Seçilmesi

Koza pişirme atıksularından serisin geri kazanımı için en uygun membrane süzme işleminin belirlenmesi için, MAAS'ı 20 kDa, 5 kDa ve 1 kDa olan üç adet UF membranı ile iki adet NF membranı, toplam dolaşım düzeninde test edilmiştir (Şekil 4.5). Bu membranların performansları, serisini tutma ve diğer kirlilik parametrelerini giderme verimleri ve ayrıca akıları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. En uygun membran süzme işlemi belirlendikten sonra, yoğunlaştırma deneyleri yapılmış ve serisin konsantre edilmiştir.



Şekil 4.5. Membran süzme işlemi alternatiflerinin şematik gösterimi

4.1.4.1. UF ve NF Membranlarının Tutma (Rejection) Performansları

4.1.4.1.1. Serisin Tutma Verimleri

UF ve NF süzüntü suyu kaliteleri ve tutma verimleri Tablo 4.10'da verilmiştir. Görüldüğü üzere, UF işleminde oldukça düşük verimler elde edilmiştir. MAAS 20 kDa'dan 5 kDa'a düşürüldüğünde, serisin tutma verimi yalnızca %36'dan %52'ye çıkmıştır. Benzer şekilde, toplam protein tutma verimi, UF (20 kDa) ve UF (5 kDa) için %57 ve %68 olmuştur. Bu değerler, FABIANI ve diğerlerinin (1996) MAAS'İ 20-30 kDa olan UF membranları ile elde ettikleri %97'lik verime göre oldukça düşüktür. Bunun bir sebebi, bu iki çalışmada farklı atıksu türlerinin kullanılmış olmasından dolayı serisinin MA dağılımının farklılık göstermesi olabilir. Koza pişirme işleminde serisin suda uzun süre bekletildiğinden, küçük molekül ağırlıklı polipeptidlerine bölünmüş olabilir. Bu da küçük moleküllerin membrandan daha kolaylıkla geçmesine neden olmuş olabilir. Bir diğer sebep ise, kullanılan membranların ve süzme sistemlerinin farklı özelliklere sahip olması ile açıklanabilir.

Serisin tutma verimlerini yükseltmek amacıyla daha sıkı bir membran olan UF (1 kDa) test edilmiştir. Serisin tutma verimi %60'a yükselmiş, toplam protein tutma verimi ise %67'de kalmıştır (Tablo 4.10). Bu verimlerin düşük olmasına rağmen, akı azalmaları oldukça yüksek çıkmış; UF (20 kDa)'da %88 ve UF (5 kDa)'da %83 olarak gerçekleşmiştir. Bu değerler, FABIANI ve diğerlerinin (1996) rapor ettiği akı azalma oranlarına oldukça yakındır. UF (1 kDa) membranında ise diğerlerine kıyasla daha düşük bir akı azalma oranı meydana gelmiş ve 200 dak süzme işlemi sonunda %58 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.10). Akı analizleri ise Bölüm 4.1.4.1.3'te tartışılmıştır.

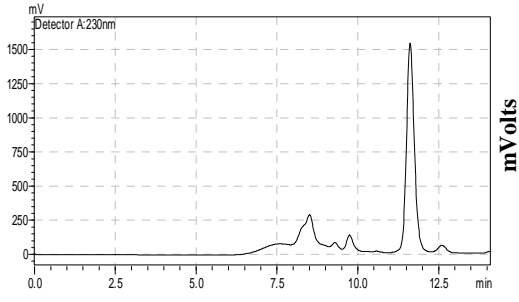
Bu sonuçlar, UF işlemi ile serisin geri kazanımı yapıldığında, atıksudaki serisinin %40'ının süzüntü suyu ile birlikte atılacağını ve yalnızca %602'nin geri kazanılabileceğini göstermektedir. Bu durumda, UF işleminin serisinin farklı MA sahip polipeptidlerini ayırmada başarılı olacağı düşünülmektedir. Buna ek olarak, test edilen UF membranlarının hiç birisi serisin ile ipekböceği proteinini ayıramamıştır. Şekil 4.6 ve 4.7'de görüldüğü üzere, ikinci tepe, ipekböceği proteinine aittir. Bu protein, hen süzülen hem de alıkonulan atıksuda mevcuttur. Bu da, UF ile geri kazanılan serisinin, ipekböceği proteini içereceğini ve saf olmayacağını göstermektedir.

NF işleminde, iki farklı membran, NF-DK ve NF-90 test edilmiştir. Serisin tutma verimi her iki membranda da %94 ve %95 kadar yüksek olmuştur (Tablo 4.10). NF-90 süzüntü suyunda az miktarda serisin bulunmasına rağmen toplam protein derişimi 0 mg/L olarak bulunmuştur. Bunun nedeni, toplam protein analizinin spektrofotometrik bir yöntem olması ve hassasiyetinin serisin analizi yapılan HPLC'den daha az olmasıdır. Akı azalması, her iki membranda da yüksek olmuş, NF-DK için %70 ve NF-90 için %75 olarak gerçekleşmiştir. Akı analizi ile detaylı açıklamalar Bölüm 4.1.4.1.3'te yapılmıştır.

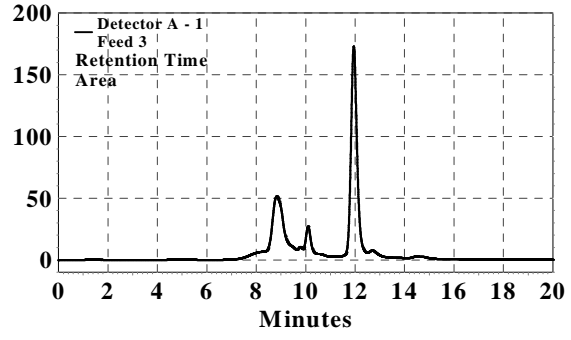
Tablo 4.10. Serisin geri kazanımı için UF ve NF performansları

Parametre	Süzüntü suyu kalitesi (<i>Tutma/Giderim Verimi, %</i>)				
	UF (20 kDa) (KPA2-A)	UF (5 kDa) (KPA2-B)	UF (1 kDa) (KPA2-C)	NF-DK (KPA2-D)	NF-90 (KPA2-E)
Serisin (mg/L)	3669 (36)	4621 (52)	3488 (60)	392 (94)	296 (95)
Serisin-1	0 (100)			0 (100)	0 (100)
Serisin-2	2719 (12)	nm	nm	65 (98)	0 (100)
Serisin-3	218 (54)			221 (62)	252 (37)
Serisin-4	732 (10)			106 (89)	44 (96)
T. Protein (mg/L)	3287 (57)	3108 (68)	2715 (67)	1119 (84)	0 (100)
Akı azalması (%)	88	83	58	70	75

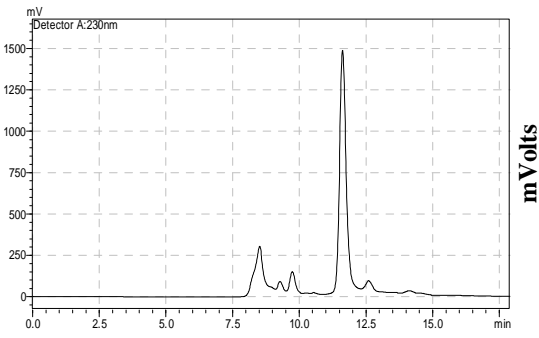
nm: ölçülememiştir



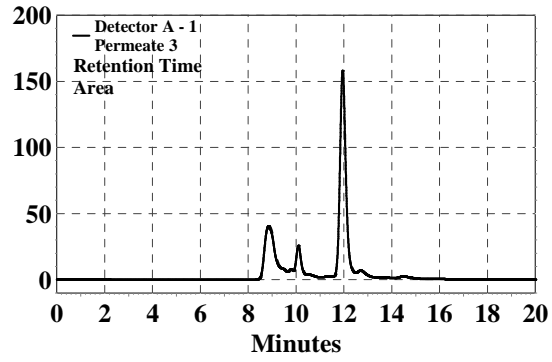
(a)



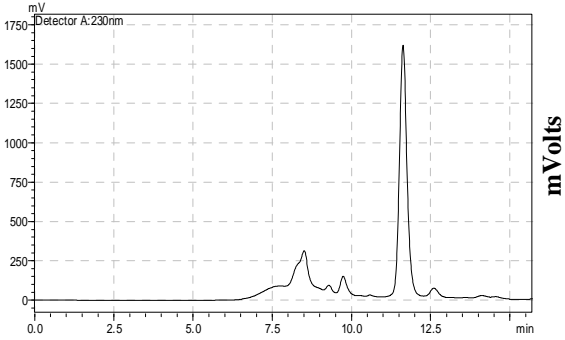
(d)



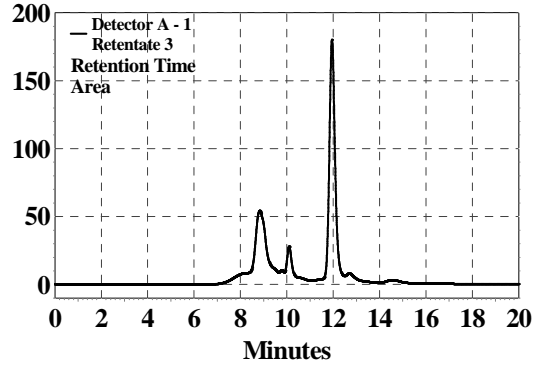
(b)



(e)

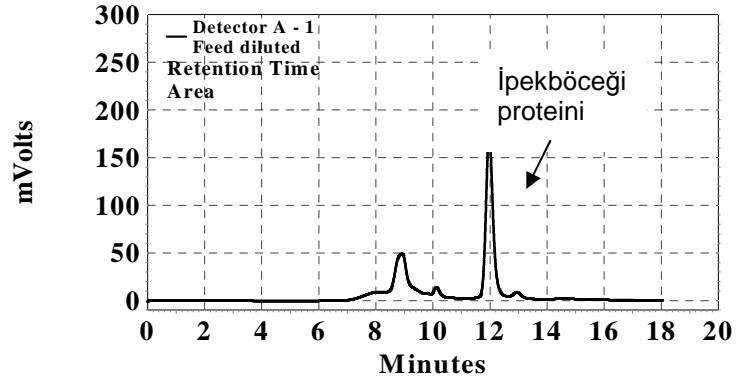


(c)

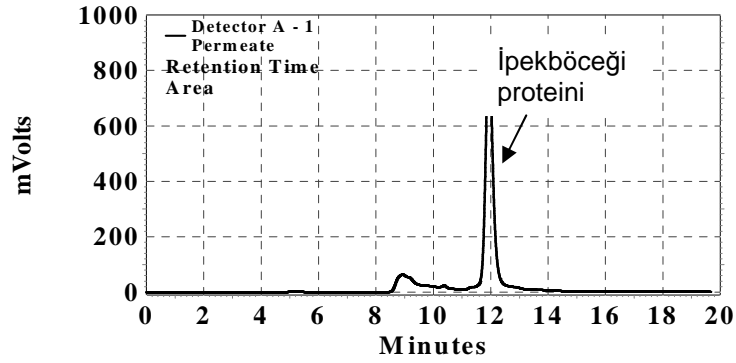


(f)

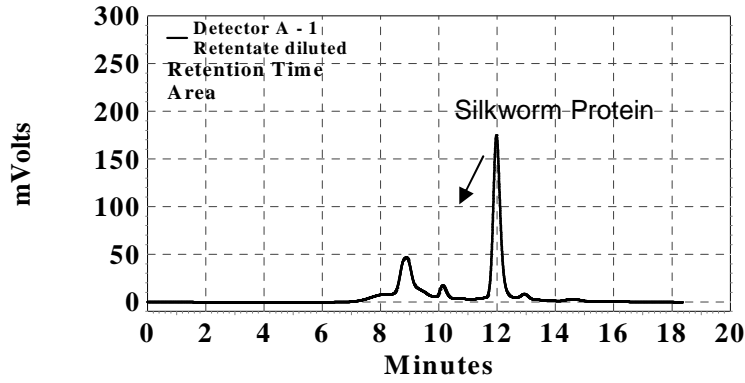
Şekil 4.6. HPLC kromatogramları (a) UF (20 kDa) besleme suyu (b) UF (20 kDa) süzüntü suyu (c) UF (20 kDa) süzümeyen su (d) UF (5 kDa) besleme suyu (1/10 seyreltme) (e) UF (5 kDa) süzüntü suyu (f) UF (5 kDa) süzümeyen su (1/10 seyreltme)



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.7. HPLC kromatogramları (a) UF (1 kDa) besleme suyu (1/10 seyreltme) (b) UF (1 kDa) süzüntü suyu (1/5 seyreltme) (c) UF (1 kDa) süzümeyen su (1/10 seyreltme)

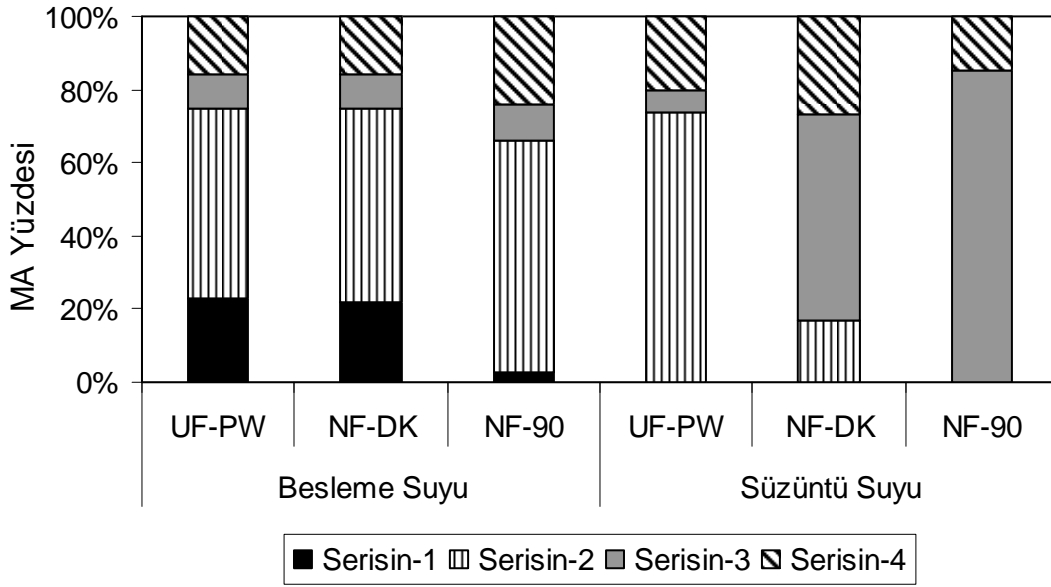
Besleme ve süzüntü sularında serisinin MA dağılımı da çıkarılmıştır (Şekil 4.8). UF (20 kDa) besleme suyunda, Serisin-1 ve Serisin-2'nin bulunma oranları %25 ve %53'tür. Serisin-3 ve Serisin-4 ise %8 ve %14 oranında bulunmuştur. UF (20 kDa) süzüntü suyunda, tamamen tutulduğu için Serisin-1'e rastlanmamıştır. Serisin-2 ise %12 verimle tutulmuş ve süzüntü

suyundaki toplam serisinin %74'ünü oluşturmuştur (Tablo 4.10). Serisin-3 ve Serisin-4'ün tutulma verimleri %54 ve %10 olmuş, süzüntü suyundaki oranları ise %6 ve %20 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).

NF-DK besleme suyunda, Serisin-1, Serisin-2, Serisin-3 ve Serisin-4 oranları sırasıyla %22, %53, %9 ve %16 olarak bulunmuştur. NF-90 besleme suyunda ise bu oranlar biraz farklılık göstermiş ve sırasıyla %3, %63, %10 ve %24 olarak bulunmuştur. Bu veriler, koza pişirme atıksuyunda Serisin-2'nin en yüksek oranda bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.8).

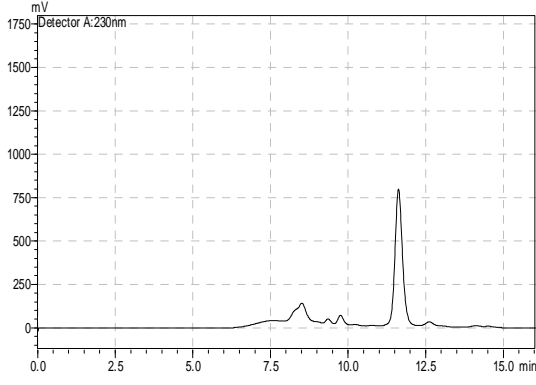
NF-DK süzüntü suyunda, Serisin-1'e rastlanmamıştır. Serisin-2 ve Serisin-3'ün tutulma verimleri %98 ve %62 olmuş, süzüntü suyundaki oranları ise %17 ve %56 olarak gerçekleşmiştir. Serisin-4 ise %89 verimle tutulmuş, süzüntü suyundaki oranı da %27 olmuştur. Diğer yandan, NF-90 membranı ile Serisin-1 ve Serisin-2'nin tamamı tutulmuştur. En düşük oranda tutulan serisin, %37 ile Serisin-3 olmuş, süzüntü suyundaki oranı ise %85 olarak bulunmuştur. Serisin-4 ise, %96 verimle tutularak süzüntü suyunun %15'ini oluşturmuştur. Sonuç olarak, NF membranlarının en büyük MA sahibi olan Serisin-1 ve Serisin-2'yi en yüksek verimle tuttuğu gözlenmiştir.

NF-DK ve NF-90 membranlarının HPLC kromatogramları Şekil 4.9'da verilmiştir. Görüldüğü üzere, atıksuda bulunan ipekböceği proteini, NF membranları ile de ayıramamıştır. Bu protein, NF-90 süzüntü suyunda daha az miktarda bulunmuştur, bu da NF-90 membranı ile daha yüksek oranda tutulmuş olduğunu göstermektedir. Bu proteinin tamamen süzüntü suyuna geçmesi arzu edildiğinden, NF-DK'nın serisin geri kazanımı için NF-90'dan daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

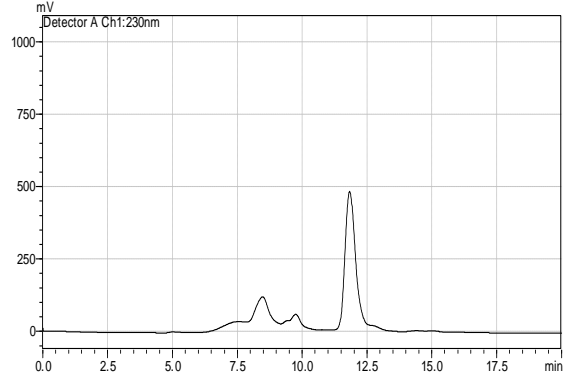


Şekil 4.8. UF ve NF işlemlerinde serisinin MA dağılımı

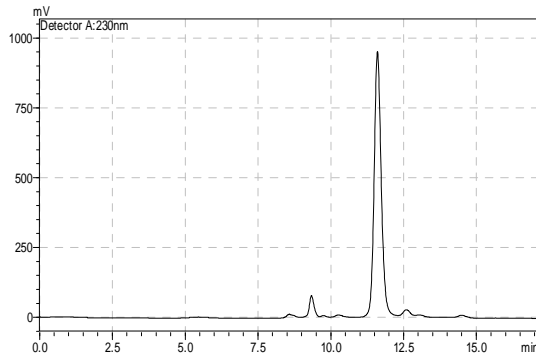
Tutma verimleri ile ilgili bütün bulgular değerlendirildiğinde, UF işleminin bütün serisin polipeptidlerini geri kazanmada yeterli olmadığı, ancak farklı MA sahip polipeptidlerini ayırmak için uygun bir işlem olabileceği sonucuna varılmıştır. Aslında, serisinin hangi alanda kullanılacağı, en uygun geri kazanım işleminin seçilmesinde büyük önem taşımaktadır. Koza pişirme atıksuyunda bulunan serisin proteininin %78-88'inin molekül ağırlığı 20 kDa'dan büyük olduğundan, 'büyük molekül ağırlıklı serisin' olarak sınıflandırılabilir (Zhang, 2002). Bu özellikteki serisin, biyomalzeme ve membran yapımında kullanılmaya uygun iken, MA 20 kDa'dan küçük olan ve 'küçük molekül ağırlıklı serisin' olarak sınıflandırılan serisin ise kozmetik ve cilt bakım ürünleri için uygundur. Bu durumda, hem büyük hem de küçük molekül ağırlığına sahip bütün serisin polipeptidlerinin geri kazanılması için NF işleminin uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Membran sürecinin seçiminde dikkate alınan akı analizleri de Bölüm 4.1.4.1.3'te detaylı anlatılmıştır.



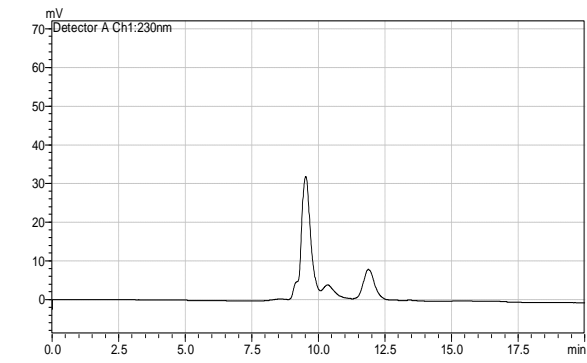
(a)



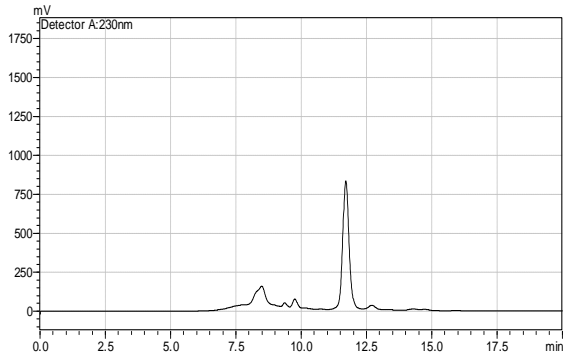
(d)



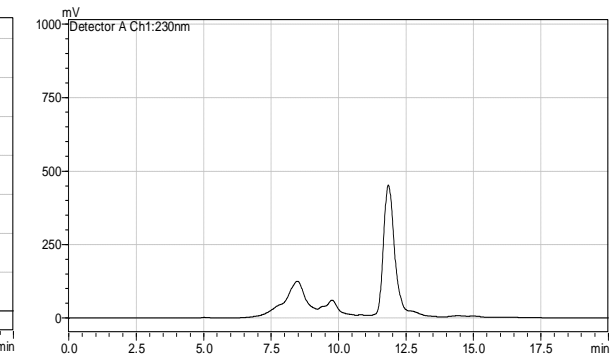
(b)



(e)



(c)



(f)

Şekil 4.9. HPLC kromatogramları **(a)** NF-DK besleme suyu (1/2 seyrelme) **(b)** NF-DK süzüntü suyu **(c)** NF-DK süzümeyen su (1/2 seyrelme) **(d)** NF-90 besleme suyu (1/2 seyrelme) **(e)** NF-90 süzüntü suyu **(f)** NF-90 süzümeyen su (1/2 seyrelme)

4.1.4.1.2. Kirlilik Parametrelerinin Giderim Verimleri

Kirlilik parametrelerinin giderimlerinde bütün UF membranları düşük performans göstermiştir. UF (20 kDa) ve UF (5 kDa) membranlarının KOİ, TKM, renk ve bulanıklık giderim verimleri

sırasıyla %41-43, %36-44, %64-64 ve %42-43 olarak bulunmuştur (Tablo 4.11). UF (1 kDa) membranı ise giderim verimlerinde belirgin olmayan bir artış sağlamış; KOİ, TKM, renk ve bulanıklık giderim verimleri %52, %51, %83 ve %53'e yükselmiştir. Diğer yandan, NF membranları ile beklendiği gibi oldukça yüksek giderim sağlanmıştır. NF-DK ve NF-90 membranlarının KOİ, TKM, renk ve bulanıklık giderim verimleri, %90-99, %90-98, %97-100 ve %93-98 olmuştur (Tablo 4.11).

KOİ için deşarj standardı 350 mg/L olarak verilmektedir (SKKY, 2004). UF (20 kDa) ve UF (5 kDa) çıkışlarında KOİ 5980 ve 6210 mg/L olarak ölçülmüştür (Tablo 4.11). Benzer şekilde, UF (1 kDa) çıkışında da 5040 mg/L KOİ bulunmuştur. Bu değerler, deşarj limitinin oldukça üzerindedir. Bu sonuçlar, tek başına UF'un arıtma hedefini karşılama açısından yeterli olmadığını göstermektedir. Diğer taraftan, NF-DK çıkışında KOİ 1020 mg/L, NF-90 çıkışında ise 109 mg/L'dir. Görüldüğü üzere NF-DK süzöntü suyu kalitesi deşarj limitine oldukça yakındır. Ancak alıcı ortama deşarj edilmeden önce ilave arıtma gerektirmektedir. NF-90 süzöntü suyu kalitesi ise deşarj limitini sağlamıştır.

Tablo 4.11. Kirlilik parameteleri için UF ve NF performans karşılaştırması

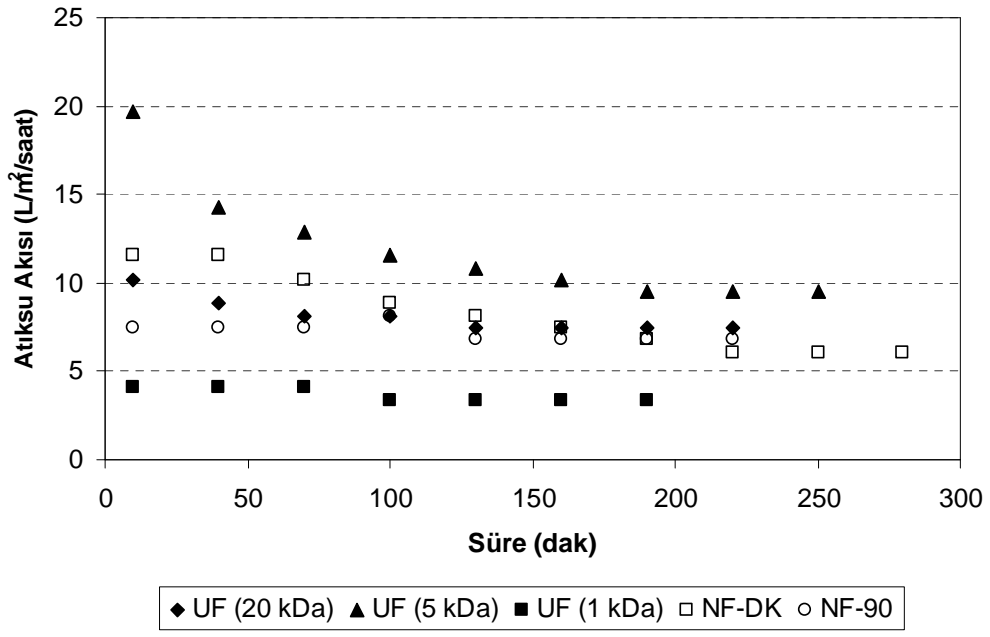
İşlem	Süzöntü suyu kalitesi (<i>Giderim Verimi, %</i>)				
	KOİ (mg/L)	TKM (mg/L)	Renk (Pt-Co)	Bulanıklık (NTU)	pH
UF (20 kDa) (KPA2-A)	5980 (43)	6850 (36)	890 (64)	21 (42)	5,7
UF (5 kDa) (KPA2-B)	6210 (41)	5975 (44)	790 (64)	10 (43)	5,6
UF (1 kDa) (KPA2-C)	5040 (52)	5175 (51)	370 (83)	7 (53)	6,1
NF-DK (KPA2-D)	1020 (90)	1125 (90)	62 (97)	2 (93)	6,0
NF-90 (KPA2-E)	109 (99)	167 (98)	12 (100)	0,7 (98)	6,6

4.1.4.1.3. UF ve NF Membranlarında Akı Analizi

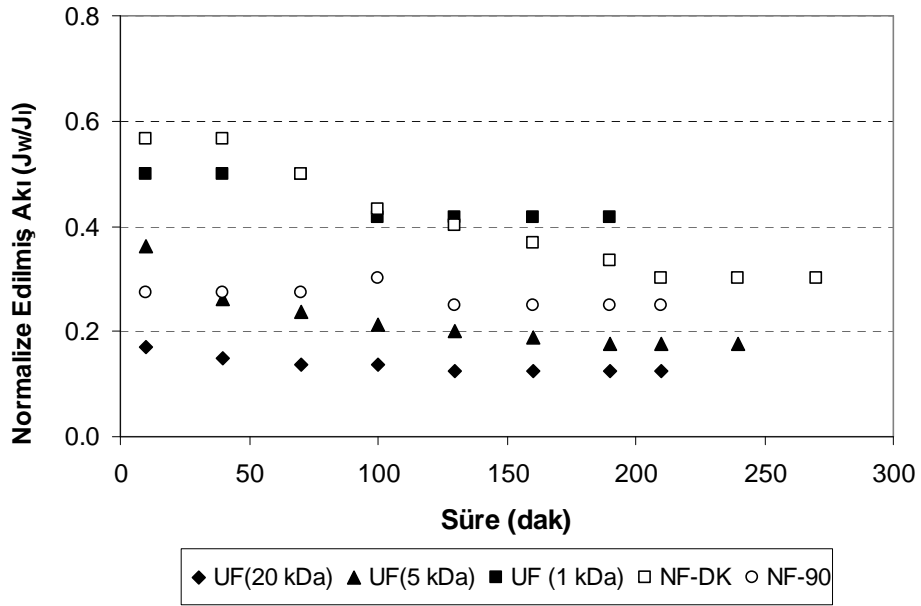
Membran süzme işlemlerinde performans değerlendirmesi yapmak için tutma verimlerinin yanında akı azalmasının da dikkate alınması gerekir. Akının düşmesi, süzme işleminin dudurulması ve mekanik ve/veya kimyasal temizleme yapılmasını gerektirmekte, bu da membran ömrünün azalması ve verimin düşmesi anlamına gelmektedir.

Protein süzme uygulamalarında, proteinlerin membrane yüzeyine yapışması sonucunda akılarda ciddi azalmalar meydana gelmektedir (CARIC vd., 2000). Serisin yapışkan bir protein olduğundan membrane yüzeyinde bir jel tabakası oluşturmaktadır. Bu çalışmada, akılar zamana karşı izlenmiş ve akı azalma oranları hesaplanmıştır. Şekil 4.10'da zamana karşı izlenen atıksu akıları ve normalize edilmiş akılar (J_w/J_1) gösterilmektedir.

Membran süzme işlemi başladığında, akılar ciddi oranda düşmüş ve 50. dakikadan sonra süzme işleminin sonuna kadar hemen hemen aynı seviyede kalmıştır (Şekil 4.10(a)). Bu sonuçlar, FABIANI ve diğerlerinin (1996) gözlemlerine oldukça benzerdir. Şekil 4.10 (b)'de ise normalize edilmiş akıların oldukça düşük olduğu görülmektedir. Normalize akının, 200-270 dak süren süzme işlemi sonunda UF (20 kDa) için 0,12, UF (5 kDa) için 0,17, UF (1 kDa) için 0,42, NF-DK için 0,30 ve NF-90 için de 0,25 olduğu farkedilmiştir. Diğer bir deyişle, bu işlemlerde akı azalması %88, %83, %58, %70 ve %75 olarak gerçekleşmiştir. Akıların, bu kadar ciddi seviyede düşmesi, beklenmeyen bir sonuç değildir. Proteinlerin membran yüzeyine yapışması, akılarda azalmaya sebep olmaktadır. Nitekim, UF (5 kDa) membranı üzerinde oluşan jel tabakanın membranda ciddi bir kirlenmeye yol açtığı Şekil 4.11'deki SEM fotoğrafında açıkça görülmektedir.

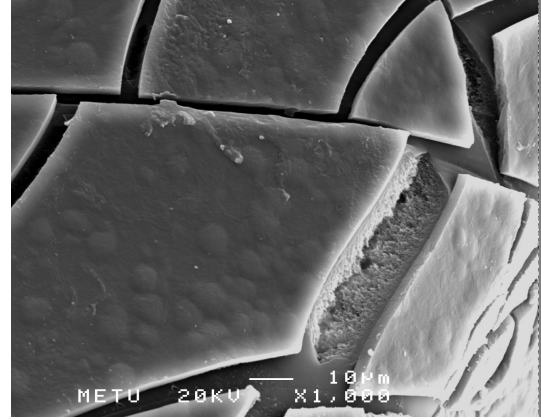
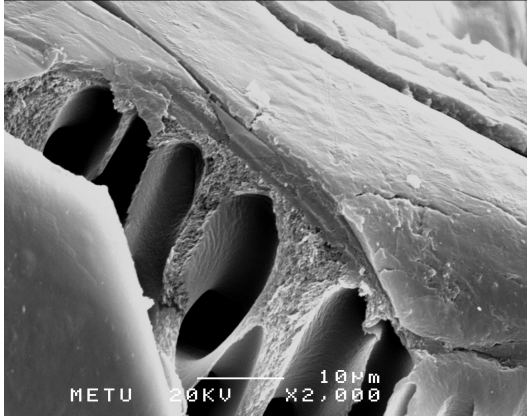


(a)



(b)

Şekil 4.10. Zamana karşı izlenen (a) Atıksu akıları, (b) Normalize edilmiş akılar



Şekil 4.11. Kirlenmiş UF (5 kDa) membrana ait SEM fotoğrafları

Akılardan ciddi oranda azalmasının bir diğer sebebi ise kullanılan sistem konfigürasyonudur. Laboratuvarda toplam dolaşım düzeninde yürütülen deneyler, Berghof BHT-2 model cihazla yapılmış, burada suyun dolaşım hızı sınırlı derecede yükseltilebilmiştir. Diğer taraftan, yoğunlaştırma deneyleri DSS LabStak M20 model membran sistemi ile yapılmış ve suyun dolaşım hızı yaklaşık 10 kat artırılabilmiştir. Bu değişiklik ile, akı azalması %67'den %31 seviyesine düşmüştür. Bu veriler, daha uygun bir konfigürasyon kullanıldığında, akılardaki azalmanın daha iyi kontrol edilebileceğini göstermektedir.

Akıları geri kazanmak amacıyla kimyasal yıkama yapılmıştır. Tablo 4.12'de geri kazanılan akı yüzdeleri verilmiştir. Görüldüğü üzere, saf su akıları %83-127 seviyesinde geri kazanılmıştır. Akı geri kazanımının %100'ün üzerinde olması, UF ve NF membranlarının klor ile temas etmesi sonucunda gözeneklerinin büyümüş olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, NF membranları yüklü olduğundan, atıksu kimyasına bağlı olarak gözeneklerinde açılma meydana gelmiş olabilir.

Tablo 4.12. Kimyasal yıkamanın akı geri kazanımına etkisi

Membran	Akı Azalması (%)	Akı Geri Kazanımı (%)	Temizleme Koşulları
UF (20 kDa)	88	105	0,5 M NaOH +193 ppm klor, 30 dak
UF (5 kDa)	83	85	0,5 M NaOH + 200 ppm klor, 25 dak
UF (1 kDa)	58	83	0,5 M NaOH + 197 ppm klor, 20 dak
NF-DK	70	127	0,5 M NaOH + 179 ppm klor, 30 dak
NF-90	75	95	0,5 M NaOH + 194 ppm klor, 30 dak

UF ve NF’te meydana gelen akı azalmasının nedeni, konsantrasyon polarizasyonu ve kirlenmedir. Konsantrasyon polarizasyonu, uygulanan basıncın serbest bırakılması ve atıksuyun saf suyla değiştirilmesi ile geri döndürülebilir bir etkidir. Kirlenme ise iki türlü olabilir; geri döndürülebilir ve döndürülemez. Birincisi, membran yüzeyinde jel tabaka oluşumuna bağlıdır ve kimyasal yıkama ile giderilebilir. İkincisinde ise atıksudaki kirlenmeler membran yüzeyine ve gözeneklerine yapıştığından, membran kalıcı olarak kirlenir. Bu durumda akıların yıkama işlemi ile dahi geri kazanılması çoğunlukla mümkün olmamaktadır. Tablo 4.12’de görüldüğü üzere, toplam akı azalması UF’te %58-88, NF’te ise %70-75’tir. Tablo 4.13’te ise konsantrasyon polarizasyonu ile kirlenme etkileri verilmiştir. Elde edilen veriler, konsantrasyon polarizasyonu etkisinin %69 ile en yüksek derecede UF (20 kDa)’da meydana geldiğini göstermektedir. UF (5 kDa) ve UF (1 kDa) membranlarında ise bu etki %30 ve %38’e düşmüştür. Kirlenme etkisi ise UF (20 kDa)’da %59 olmuştur. Kirlenme etkisi, UF (5 kDa)’da %75 olarak hesaplanmıştır; bunun %71’i geri döndürülebilir, %15’i ise geri döndürülemez kirlenme olarak bulunmuştur. Diğer bir deyişle, saf su akısının %15’i kimyasal yıkama ile geri kazanılamamıştır. UF (1 kDa)’da ise, kirlenme etkisi %33 olmuş, bunun %20’si geri döndürülmüş, %17’si ise geri döndürülememiştir. Bu veriler, membran yüzeyinde jel oluşumunun gözenek tıkanmasına kıyasla dominant olduğuna işaret edebilir.

Tablo 4.13. Konsantrasyon polarizasyonu ve kirlenme etkileri

Membran	Akı (L/m ² /saat) (T=19-21 °C)				Akı Azalması (%)			
	I	W	F	C	C.P.	T.F.	R.F.	I.F.
UF (20 kDa)	59,7	7,5	24,4	62,4	69	59	*	*
UF (5 kDa)	54,3	9,5	13,6	46,2	30	75	71	15
UF (1 kDa)	8,1	3,4	5,4	6,8	38	33	20	17
NF-DK	20,4	6,1	16,3	25,8	63	20	*	*
NF-90	27,2	6,8	19,0	25,8	64	30	26	5

I: Saf su, W: Atıksu, F: Temizleme öncesi saf su, C: Temizleme sonrası saf su
C.P. : Konsantrasyon polarizasyonu [(F-W)/F], T.F. : Toplam kirlenme [(I-F)/I]
R.F. : Geri döndürülebilir kirlenme [(C-F)/C]
I.F. : Geri döndürülemeyen kirlenme [(I-C)/I]
* C değeri I değerinden büyük olduğu için hesaplanamamıştır.

NF-DK ve NF-90 membranlarında ise konsantrasyon polarizasyonu etkisi %63, kirlenme etkisi ise %20 ve %30 olmuştur. NF-90 membranında geri döndürülemeyen kirlenme %5 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, kirlenme ve akı geri kazanımı konusunda NF'in UF'ten daha iyi performansa sahip olduğunu göstermektedir.

Bu bölümde tartışılan bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, serisin geri kazanımı için en iyi performansın NF membranları ile alındığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, serisinin yoğunlaştırılması deneylerine NF ile devam edilmiştir.

4.1.5. Koza Pişirme Atıksuyundaki Serisinin NF ile Yoğunlaştırılması

4.1.5.1. Yoğunlaştırma Düzeninde Tutma/Giderim Verimleri

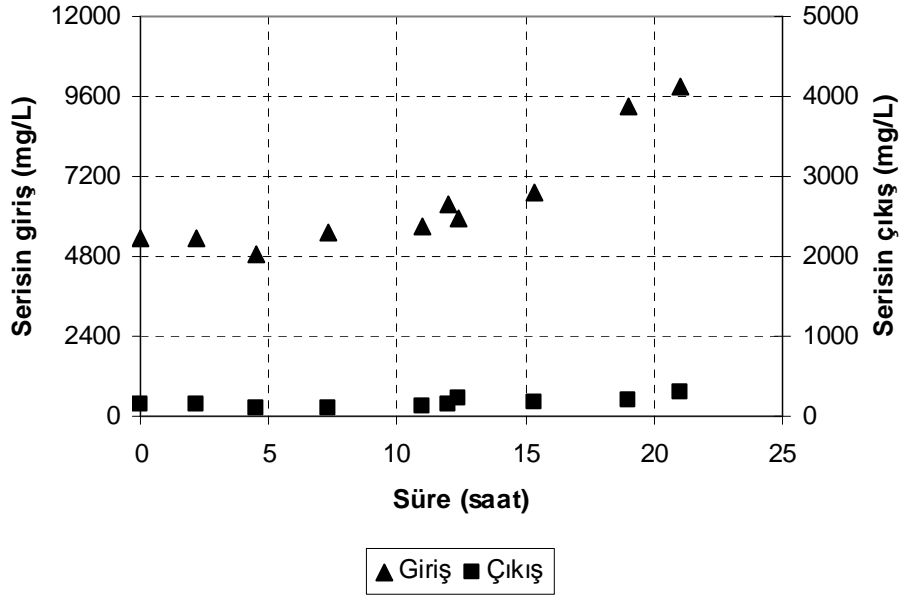
NF-DK ve NF-90 membranları ile KPA2-F, KPA2-G ve KPA2-H örnekleri (özellikleri için Tablo 3.1'e bakınız) kullanılarak 3 set yoğunlaştırma deneyi yapılmıştır. Birinci ve ikinci deneylerde (NF-1 ve NF-2) aynı NF-DK membran çifti, üçüncü deneyde (NF-3) ise NF-90 membran çiftleri kullanılmıştır.

Besleme ve süzüntü sularında, serisin ve KOİ derişimlerinde zamana karşı meydana gelen değişimler izlenmiştir (Şekil 4.12 ve 4.13). Toplam 21 saat süren NF-1 deneyinde, Şekil

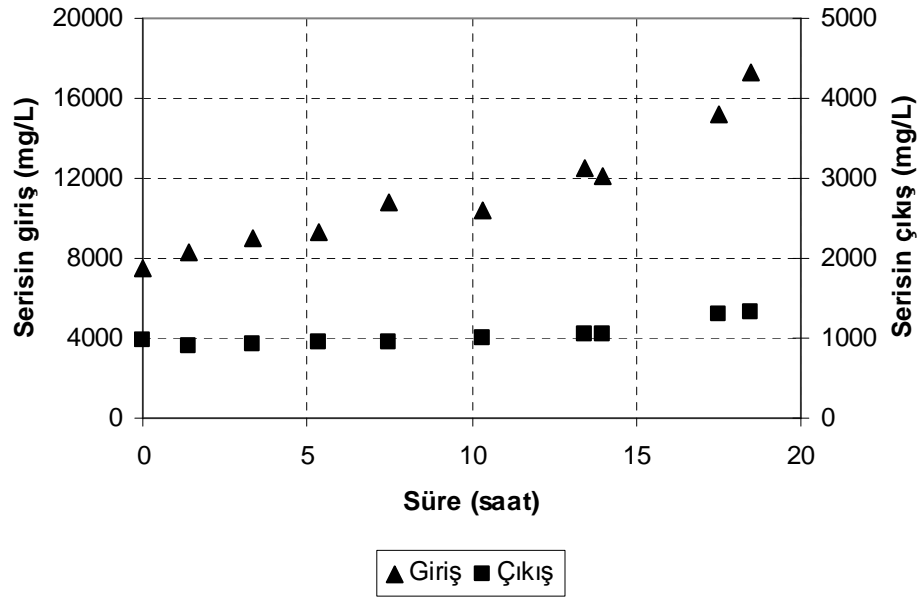
4.12(a)'da ve Tablo 4.14.2te verildiği üzere, serisin derişimi besleme suyunda yaklaşık iki kat artmış, hacim azaltma faktörü (HAF) 4,6'ya ulaştığında serisin derişimi 5332 mg/L'den 9888 mg/L'ye çıkmıştır. Süzüntü suyu derişimi ise 151 mg/L'den 298 mg/L'ye çıkmıştır. Toplam 18,5 saat süren NF-2 deneyinde ise, serisinin besleme suyundaki derişimi yaklaşık 2,3 kat artarak 7534 mg/L'den 17280 mg/L'ye kadar yükselmiştir. Buna rağmen süzüntü suyu derişimi 977-1332 mg/L'de kalmıştır (Şekil 4.12(b) ve Tablo 4.15). NF-90 membranının kullanıldığı NF-3 deneyinde ise, 16 saatlik süzme işleminin sonunda besleme suyundaki serisin derişimi 4350 mg/L'den 12307'ye yükselerek yaklaşık 3 kat artış göstermiş, süzüntü suyunda ise 89 mg/L ile başlayarak 309 mg/L'ye ulaşmıştır (Şekil 4.12(c) ve Tablo 4.16). Böylece, serisin tutma verimleri NF-1, NF-2 ve NF-3 deneyleri için sırasıyla %97, %87-92 ve %97-98 olarak gerçekleşmiştir. Görüldüğü üzere, bu oldukça yüksek bir verimdir ve HAF 4,2-4,6'ya ulaşmasına rağmen bütün membranlarda aynı seviyede kalmıştır. Bu da kullanılan membranların gerçek uygulamada serisini yüksek verimle geri kazanacağını göstermektedir. Ayrıca, daha yüksek verim sağlaması nedeniyle NF-90'ın daha sıkı bir membran olduğu anlaşılmıştır.

NF-2 deneyinde elde edilen tutma/giderim verimleri, aynı membran kullanılmasına rağmen NF-1'e kıyasla düşük olmuştur. Bunun nedeni, membranın NF-1 deneyinde toplam üç defa kimyasal yıkama işlemine maruz kalmasıdır. Sık yıkamanın gözeneklerde açılmaya neden olduğu düşünülmektedir.

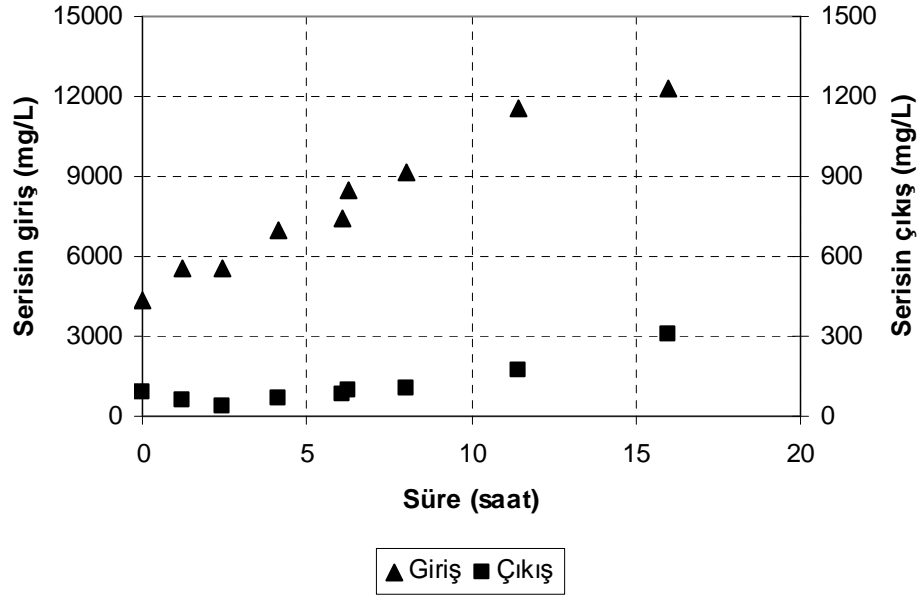
Atıksuda bulunan ipekböceği proteininin serisinden ayrılmasında NF-DK ve NF-90 membranları benzer performans göstermiştir. Bu proteininin, hem süzülen hem de süzilemeyen sularda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, NF-90 membranının bu proteini daha yüksek oranda tuttuğu fark edilmiştir. Serisinde safsızlık yaratacağı için bu arzu edilen bir durum değildir. HPLC kromatogramlarında, ipekböceği proteini ile serisin için elde edilen alanların oranı, NF-90 süzüntü suyunda 0,25 iken, NF-DK süzüntü suyunda 14,4 olmuştur. Bu da, ipekböceği proteininin, NF-DK'dan daha yüksek oranda geçtiğini göstermektedir.



(a)



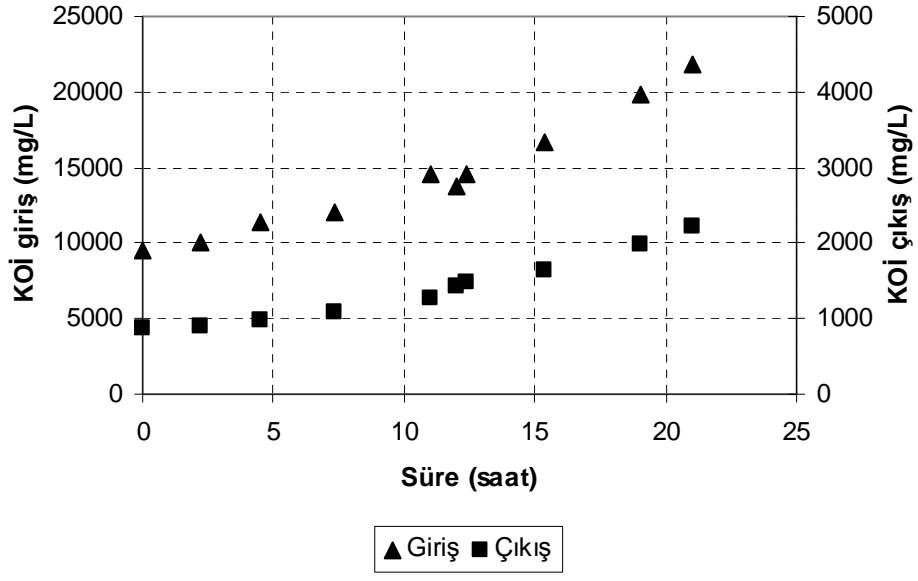
(b)



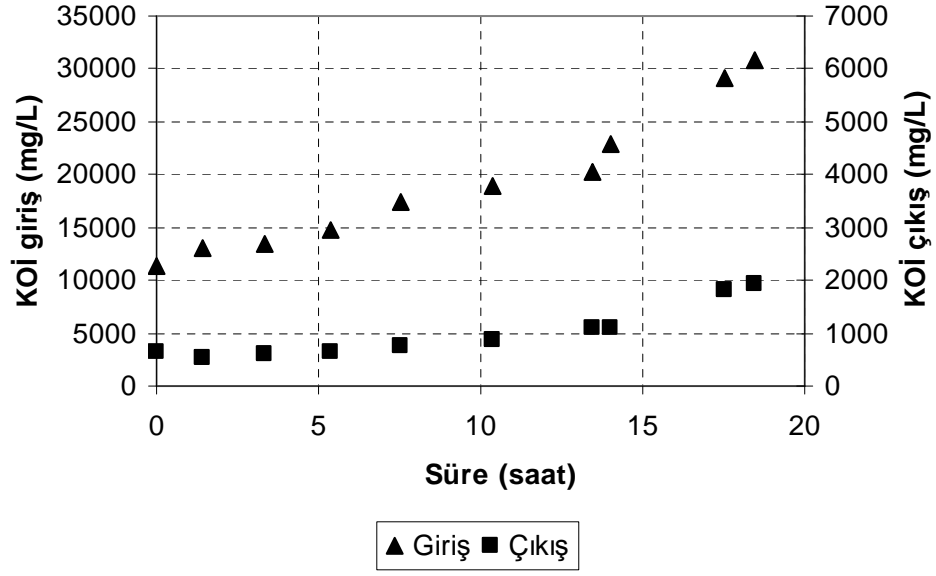
(c)

şekil 4.12. Yoğunlaştırma süresince serisin değişimi (a) NF-1 (b) NF-2 (c) NF-3 deneyleri

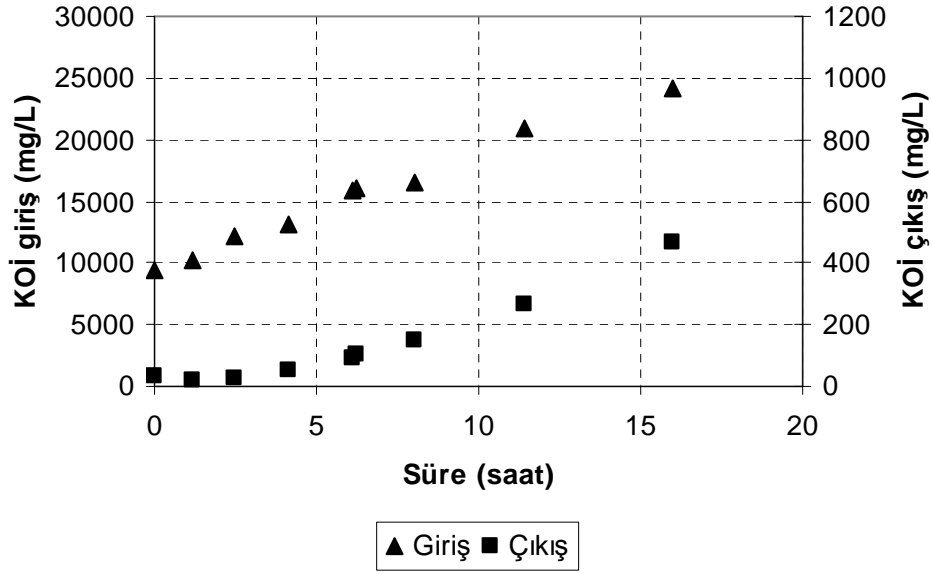
Yoğunlaştırma deneylerinde izlenen KOİ değişimleri, beklendiği üzere serisin değişimlerine paralel olmuştur. şekil 4.13(a)'da görüldüğü üzere, NF-1 deneyinde besleme suyu KOİ değeri 9560 mg/L'den 21813 mg/L'ye yükselerek 2,3 kat artış göstermiştir. Sznt suyunda ise 867 mg/L'den 2229 mg/L'ye kadar çıkmıştır. NF-2 deneyinde, giriş KOİ değeri 11395 mg/L'den 30825 mg/L'ye kadar çıkarken, çıkış değeri 646-1929 mg/L arasında değişmiştir. NF-3 deneyinde ise, girişte 9420 mg/L'den 24210 mg/L'ye çıkmış, çıkışta ise 32-470 mg/L'de kalmıştır. Bu veriler, NF-90 membranının organik maddeyi gerçekten çok iyi verimle giderdiğini göstermektedir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.13. Yoğunlaştırma süresince KOİ değişimi (a) NF-1 (b) NF-2 (c) NF-3 deneyleri

NF-1, NF-2 ve NF-3 deneylerinde, bütün kirlilik parametreleri izlemiştir (Tablo 4.14-4.16). HAF, 4,2-4,6'ya kadar artsa dahi, giderim verimleri oldukça yüksek kalmıştır. Toplam katı madde giderimi %87-95 iken, renk ve bulanıklık tamamen giderilmiştir. Bu sonuçlar, endüstriyel ölçekli uygulamada hem serisinin yüksek verimle geri kazanılacağını hem de kirlilik parametrelerinin yüksek verimle giderileceğini göstermesi bakımından oldukça memnun edicidir.

Tablo 4.14. NF-1 deneyinde elde edilen tutma/giderim verimleri

Parametre	Ölçülen Değer				Tutma/Giderim	
	Besleme Suyu		Süzüntü Suyu		Verimi (%)	
	t=0 saat (HAF=1)	t=21 saat (HAF=4,6)	t=0 saat (HAF=1)	t=21 saat (HAF=4,6)	t=0 saat (HAF=1)	t=21 saat (HAF=4,6)
Serisin (mg/L)	5332	9888	151	298	97	97
Serisin-1	22	-	-	-	100	-
Serisin-2	4850	8385	20	74	100	99
Serisin-3	324	-	20	167	94	-
Serisin-4	136	1503	111	57	18	96
T.Protein (mg/L)	4248	9990	460	1380	89	86
KOİ (mg/L)	9560	21813	867	2229	91	90
TKM (mg/L)	9250	20800	1033	2670	89	87
Renk (Pt-Co)	1520	5000	3	37	100	99
Bulanıklık (NTU)	15	84	0,5	0,3	97	100
pH	6,1	6,0	5,5	6,1	-	-

Tablo 4.15. NF-2 deneyinde elde edilen tutma/giderim verimleri

Parametre	Ölçülen Değer				Tutma/Giderim	
	Besleme Suyu		Süzüntü Suyu		Verimi (%)	
	t=0 saat (HAF=1)	t=18,5 saat (HAF=4,2)	t=0 saat (HAF=1)	t=18,5 saat (HAF=4,2)	t=0 saat (HAF=1)	t=18,5 saat (HAF=4,2)
Serisin (mg/L)	7534	17280	977	1332	87	92
Serisin-1	189	-	-	-	100	-
Serisin-2	4450	11166	79	262	98	98
Serisin-3	801	1376	641	514	20	63
Serisin-4	2094	4738	257	556	88	88
T.Protein (mg/L)	6599	13472	561	1834	91	86
KOİ (mg/L)	11395	30825	646	1929	94	94
TKM (mg/L)	11610	27950	-	2400	-	91
Renk (Pt-Co)	3010	8463	28	100	100	100
Bulanıklık (NTU)	56	177	-	0,4	-	100
pH	6,4	6,4	6,2	6,5	-	-

Tablo 4.16. NF-3 deneyinde elde edilen tutma/giderim verimleri

Parametre	Ölçülen Değer				Tutma/Giderim	
	Besleme Suyu		Süzüntü Suyu		Verimi (%)	
	t=0 saat (HAF=1)	t=16 saat (HAF=4,2)	t=0 saat (HAF=1)	t=16 saat (HAF=4,2)	t=0 saat (HAF=1)	t=16 saat (HAF=4,2)
Serisin (mg/L)	4350	12307	89	309	98	97
Serisin-1	74	-	-	-	100	-
Serisin-2	3207	9081	3	76	100	99
Serisin-3	-	-	64	61	-	-
Serisin-4	1069	3226	22	172	98	95
T.Protein (mg/L)	7038	11519	0	236	100	98
KOİ (mg/L)	9420	24210	32	470	100	98
TKM (mg/L)	10500	25667	-	1267	-	95
Renk (Pt-Co)	2560	7210	-	1	-	100
Bulanıklık (NTU)	20	96	0.2	0,4	99	100
pH	5,90	6,05	4,97	5,61	-	-

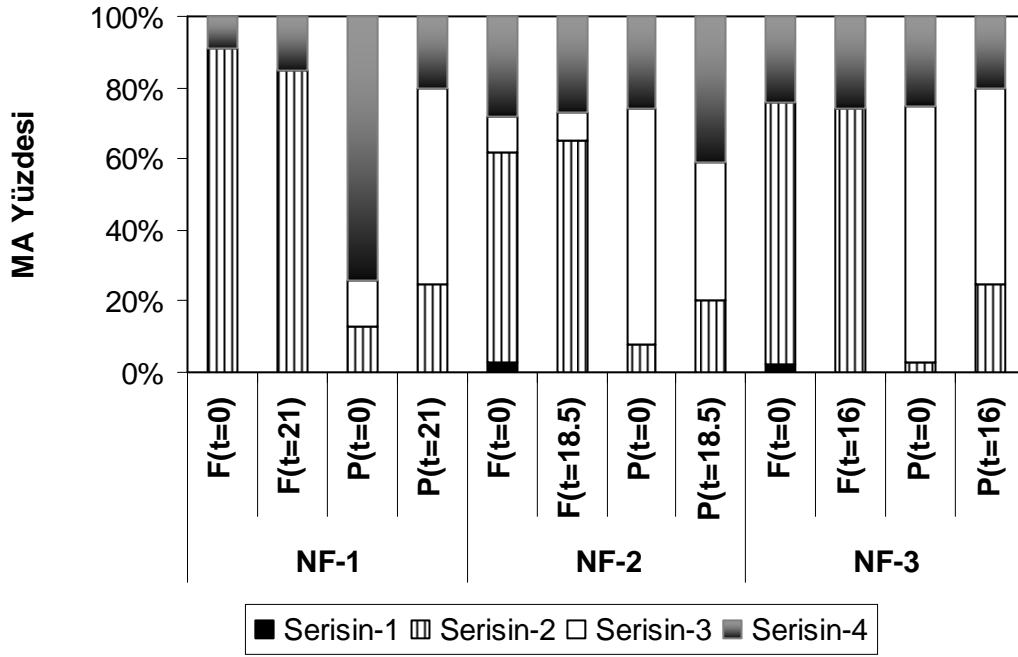
Yoğunlaştırma deneylerinde molekül ağırlık dağılımları da incelenmiştir (Şekil 4.14). Atıksudaki en yüksek molekül ağırlığına (175-200 kDa) sahip serisin polipeptidleri, Serisin-1 olarak adlandırılmış idi. Serisin-1, NF-2 ve NF-3 deneylerinde kullanılan KPA2-G ve KPA2-H örneklerinde %3 ve %2 oranında bulunurken, NF-1 deneyinde kullanılan KPA2-F örneğinde bulunmamıştır. Bunun nedeni büyük olasılıkla, NF-1 deneyinde yoğunlaştırma öncesinde süzme işleminin bir kaç saat süreyle toplam dolaşım düzeninde yürütülmesi ve bu sırada Serisin-1'in membran yüzeyinde birikmiş olmasıdır.

Molekül ağırlığı 70-90 kDa olan Serisin-2'nin oranı besleme suyunda fazla değişmemiştir. NF-1'de %91 ile başlayan bu oran, deney sonunda %85 olarak bulunmuştur. Süzüntü

suyunda ise, %13 ile başlamış ve %25 ile sona ermiştir. NF-2'de Serisin-2 oranı, besleme suyunda %59'dan %65'e yükselmiş, süzüntü suyunda ise %8'den %20'ye çıkmıştır. NF-3'te ise Serisin-2 oranı besleme suyunda %74 olarak sabit kalmış, süzüntü suyunda ise %3'ten %25'e yükselmiştir. Bu veriler, Serisin-2'nin yüksek verimle tutulduğunu göstermektedir.

NF-1'de molekül ağırlığı 30-40 kDa olan Serisin-3'e besleme suyunda rastlanmamıştır. Bunun nedeni yine toplam dolaşım düzeninde yürütülen deney sırasında Serisin-3'ün muhtemelen membran yüzeyinde oluşan jel tabakada kalmış olmasıdır. NF-2'de Serisin-3 besleme suyunda %8-10 iken, süzüntü suyunda %66'dan %39'a düşmüştür. Bunun da olası nedeni, süzüntü suyunda zamanla Serisin-2 ve Serisin-4 oranlarının artmış olmasıdır. NF-3'te ise, Serisin-3'e besleme suyunda rastlanmamış, süzüntü suyunda ise %72'den %55'e azalmıştır. Yoğunlaştırma deneylerinde, membran performansının zamanla değişmesi, besleme suyu kalitesinin değişmesinden dolayı beklenen bir durumdur. Membran seçiciliği, membran yüzeyinde oluşan jel tabakanın ikinci bir membran gibi görev yapması nedeniyle, değişim gösterebilmektedir.

Molekül ağırlık dağılımı 10-25 kDa olan Serisin-4, atıksuda az miktarda bulunmuştur. En küçük polipeptidlerden oluşan Serisin-4'ün NF-1, NF-2 ve NF-3 besleme sularındaki oranı sırasıyla %9-15, %27-28 ve %24-26 olmuştur. Kullanılan membranların gözeneklerine kıyasla oldukça büyük olmalarına rağmen bu polipeptidlerin membrandan rahatlıkla geçtikleri fark edilmiştir. Bu durum, protein yapısından ve/veya protein-membran etkileşiminden kaynaklanmış olabilir. Serisin-4'ün süzüntü suyundaki oranı NF-1'de %74 ile başlamış ve %20 ile son bulmuştur. NF-2 ve NF-3 süzüntü sularında ise, Serisin-4 oranı %26-41 ve %20-25 olmuştur. Yukarıda da bahsedildiği gibi, membran seçiciliği zamanla değişebilmektedir. Ancak, yürütülen deneylerde serisin tutma verimi zamana karşı fazla değişmemiş ve %90'ın üzerinde seyretmiştir. Bu sonuçlar da serisin geri kazanımı için NF'in uygun bir yöntem olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.14. Yoğunlaştırma deneylerinde serisinin molekül ağırlık dağılımı

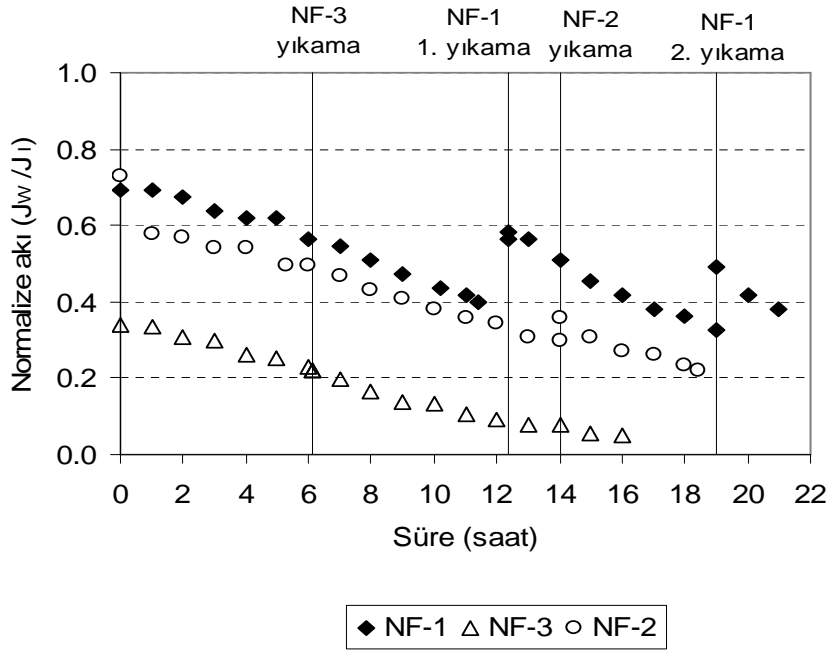
4.1.5.2. Yoğunlaştırma Düzeninde Akı Analizleri

NF-1, NF-2 ve NF-3 deneylerinde gözlenen akılar Şekil 4.15'te verilmiştir. Görüldüğü üzere, HAF 1 iken, süzüntü akısı NF-1'de yaklaşık %30 kadar azalmış, 12 saatlik süzme işlemi sonunda akı azalması %60'ın üzerine çıkmıştır. Bu aşamada işleme ara verilerek yıkama yapılmıştır. Yaklaşık 6 saatlik süzme işleminin ardından akı azalması %44 olmuş ve devam eden 6 saat sonunda %70'e yükselmiştir. Bu noktada ikinci yıkama yapılmış ve akı azalması %66'dan %51'e düşürülmüştür. Ardından gelen 2 saatlik bir filtrasyon süresi sonunda HAF 4,6'ya ulaşmıştır. Deney bitiş anında ise, akı azalması %62 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.15 ve Tablo 4.17). Deney sonunda bir kez daha kimyasal yıkama yapılmış ve saf su akısı %118 oranında geri kazanılmıştır.

NF-2'de ise aynı NF-DK membranı ile süzme işlemi yapılmış ve 14. saatte akı azalması %70'e ulaştığında yıkama yapılmıştır. Ancak akı iyileşmesi olmamıştır. Deney sonunda %78'e ulaşan akı azalmasını düzeltmek için yeniden kimyasal yıkama yapılmış ve saf su akısı %81 oranında geri kazanılmıştır (Tablo 4.17).

NF-3' te ise, HAF 4,2 olduğunda akı azalması %95'e ulaşmıştır. Bu deneyde NF-90

membranı bir kez yıkanmış ancak iyi bir sonuç alınamamıştır. Buna ek olarak, deney sonunda yapılan yıkama ile saf su akısının ancak %75 kadarı geri kazanılabilmektedir (Tablo 4.17). Bu veriler, NF-90 membranının atıksu kimyasından daha olumsuz etkilendiğini açıkça göstermektedir. Bu durumda, NF-DK membranının serisin geri kazanımı için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.15. Yoğunlaştırma deneylerinde normalize akıların zamanla değişimi

Tablo 4.17. Yoğunlaştırma deneylerinde akı azalması ve geri kazanımı

Deney	Akı (L/m ² /saat) at T=19-21 °C			Akı azalması (%), (I-W)/I	Akı Geri Kazanımı (%), C/I
	Saf su,	Atıksu,	Saf su,		
	I	W	Yıkama sonrası C		
NF-1	18,3	7,0	21,7	62	118
NF-2	27,0	6,0	22,0	78	81
NF-3	33,0	1,7	24,7	95	75

4.1.6. Yoğunlaştırılan Serisinin Çökeltilmesi

4.1.6.1. Çökeltme İçin Etanol ve Asit Karşılaştırması

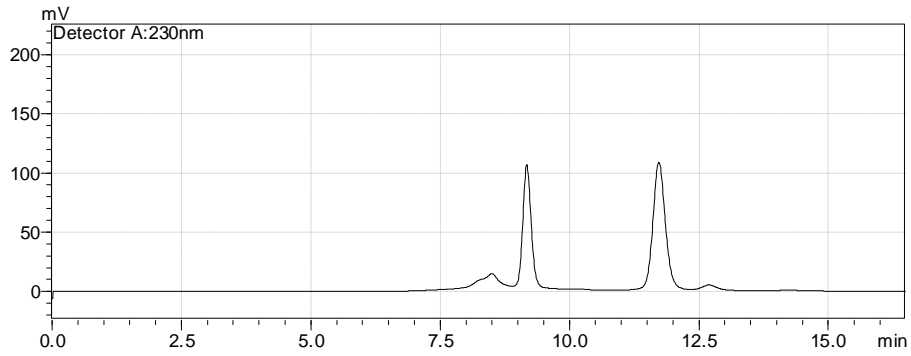
Serisinin kozadan elde edilmesinde yaygın olarak etanol kullanılmaktadır. Ancak, kullanılması gereken etanol miktarı, serisin çözeltisi hacminin üç katıdır. Yürütülen projede temel alınan felsefe, çevre kirliliğini en aza indirecek yöntemlerin kullanılmasıdır. Bu nedenle, gerçek bir koza pişirme tesisinde ortaya çıkacak atıksu debileri dikkate alındığında, etanol ile çökeltme çevre dostu bir yöntem olarak görünmemektedir. Etanole alternatif olarak asit ile çökeltme işlemi denenmiştir. Serisinin çözünürlüğünün pH 3,8'de en az olduğu bilinmektedir (KODAMA, 1926). Ancak, geri kazanılan serisinin kalitesi, proje kapsamında birinci derecede öncelik taşıdığından, çökeltme için en uygun maddenin kullanılması kaçınılmazdır. Bu nedenle hem asit hem de etanol kullanılmış ve geri kazanılan serisinin özellikleri değerlendirilerek çökeltme için en uygun madde seçilmiştir.

İlk olarak nitrik asit denenmiş ve NF-1 deneyinde elde edilen serisin konsantrasyonunun pH'ı HNO₃ ile 3,8'e ayarlanarak 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Serisin konsantrasyonunun pH'ını ayarlamak için ihtiyaç duyulan asit miktarı bir kaç mL olmuştur. Diğer bir deyişle, hacim olarak 200-300 mL olan serisin konsantrasyonunun yalnızca % 0,3'ü kadardır. Çökelti üst fazında kalan serisin analiz edilerek asitle çökeltme işleminin verimi %63 olarak bulunmuştur. Çökeltme verimini artırabilmek amacıyla, ilk olarak santrifüj hızı 5000 rpm'e çıkarılmıştır. Ancak serisin çökeltisi gözlenmemiştir. İkinci olarak, çökelti üst fazında pH 1,9'a kadar düşürülmüş ve yine 5000 rpm'de 10 dak santrifüj yapılmıştır. Ancak, serisin çökeltisine rastlanmamıştır. Elde edilen çökeltme verimi, literatürde %75 hacimde etanol kullanılarak elde edilen %64'lük verimle aynıdır (WU vd., 2007). Wu vd.'nin çalışmasında, %90 hacimde etanol kullanıldığında dahi, serisin elde etme verimi ancak %71'e kadar çıkarılabilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada elde edilen çökeltme verimi kabul edilebilir bulunmuştur.

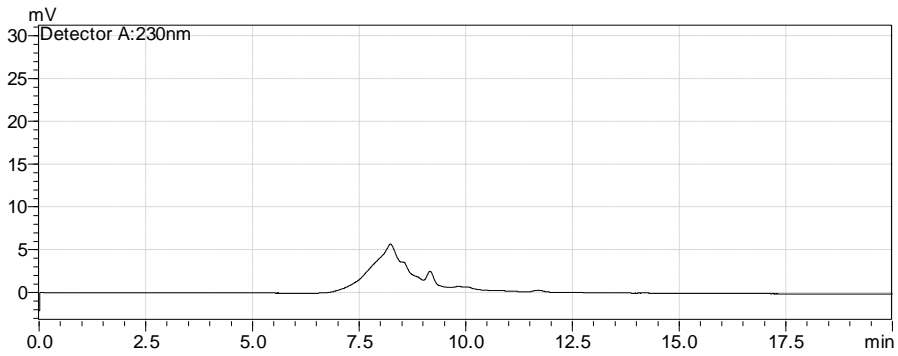
Serisin çökeltisi, -80 °C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde kurutularak toz haline getirilmiştir. HNO₃ ile çökeltile toz serisinden 0,5 mg/mL derişiminde bir çözelti hazırlanmış ve HPLC'de analiz edilmiştir (Şekil 4.16). HPLC kromatogramında, serisin ile aynı zaman aralığında HNO₃'e ait bir tepe gözlenmiştir. Elde edilen toz serisin örneğinin HNO₃'ten uzaklaştırılması amacıyla diyaliz yapılmıştır. Şekil 4.17 ve 4.18'de görüldüğü üzere, MAAS'ı 12 kDa olan bir diyaliz torbasında 24 saat bekletilen serisin çözeltisi, HNO₃'ten arındırılmıştır. Diyaliz torbası içinde kalan serisinin HPLC kromatogramı, standart serisine oldukça yakındır. Diyaliz torbasından geçen maddeler ise, diyaliz torbasının dışındaki suyun hacmi fazla olduğundan

seyrelmiş ve HPLC'de belirgin bir tepe görebilmek için bu su kurutularak yoğunlaştırılmıştır. Şekil 4.18'de gösterilen tepe gerçekte çok daha küçüktür.

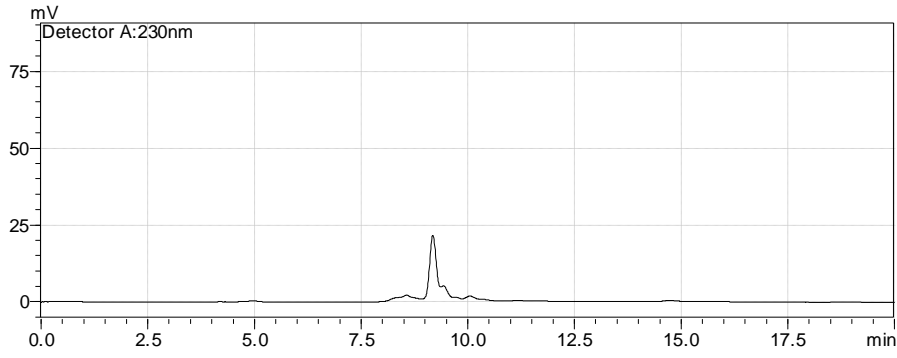
HPLC kromatogramlarında serisinden sonra 11,5-13,5 dakikaları arasında gözlenen diğer organik maddenin, geri kazanılan serisine birlikte bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.16). Uygulanan diyaliz işlemi ile nitrik asite ek olarak bu madde de uzaklaştırılmıştır (Şekil 4.17). Ancak, bazı küçük serisin peptidlerinin de kaybedildiği görülmektedir (Şekil 4.18). Bu nedenle, çalışmanın devamında daha küçük MAAS'a sahip bir diyaliz torbasının kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.16. HNO₃ ile çökeltilen serisinin HPLC kromatogramı

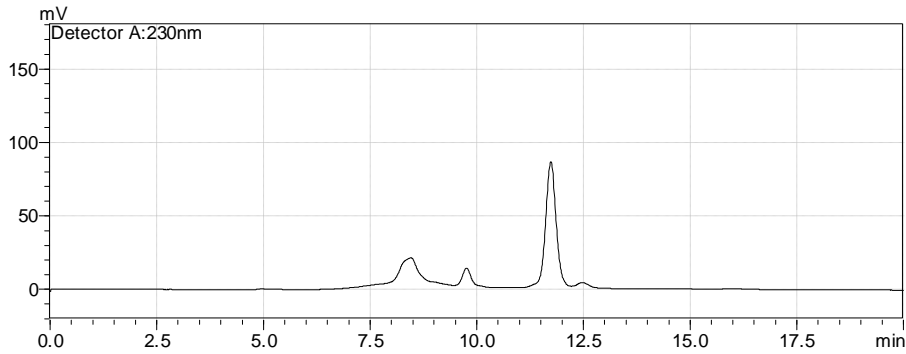


Şekil 4.17. Diyaliz torbasının içinde kalan serisin çözeltisi (>12 kDa)

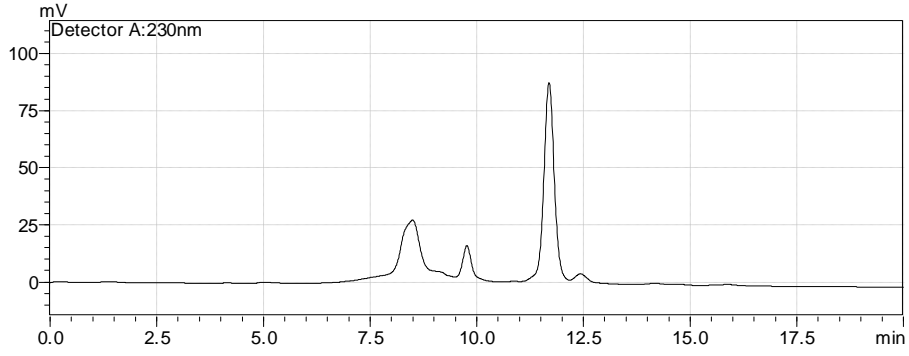


Şekil 4.18. Diyaliz torbasından geçen HNO_3 ve serisinin HPLC kromatogramı (<12 kDa)

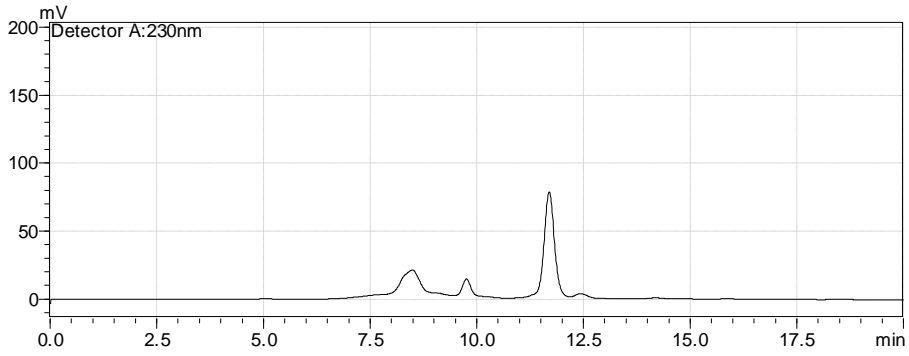
Serisinin çöktürülmesi için HNO_3 'ten daha uygun bir asit bulmak amacıyla, NF-2 deneyinde elde edilen serisin konsantrasyonunun çöktürülmesi için nitrik asite ek olarak hidroklorik asit (HCl), sülfürik asit (H_2SO_4), asetik asit ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) ve ayrıca etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) denenmiştir. NF-2'de elde edilen serisin konsantrasyonundan eşit miktarda alınan örneklerin pH'sı yukarıda adı geçen asitlerle 3,8'e ayarlanmış ve santrifüj yardımıyla çöktürme yapılmıştır. Etanolle çöktürülen örneğe ise, hacminin üç katı kadar soğuk etanol eklenmiş ve yine santrifüj yapılmıştır. Daha sonra üst fazlar atılarak çöktürülenler $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de dondurulmuş ve liyofilizatörde kurularak toz haline getirilmiştir. Elde edilen dört farklı toz serisin örneğinden hazırlanan çöktürülenlerin HPLC kromatogramları Şekil 4.19-4.22'de gösterilmektedir. Kullanılan asitler arasında yalnızca nitrik asidin serisin ile birlikte belirgin bir tepe verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.17). Asetik asidin ise, serisin çöktürüldükten sonra atılan üst fazda diğer asitlere kıyasla iki kat daha fazla KOİ'ye neden olduğu anlaşılmıştır. Bu üst fazın, deşarj öncesinde arıtılması gereken atıksuların kirliliğini artıracak olması nedeniyle, çöktürmede asetik asit kullanılması uygun görülmemiştir. Böylece, HCl, H_2SO_4 ve etanol çöktürme için en uygun görünmüştür.



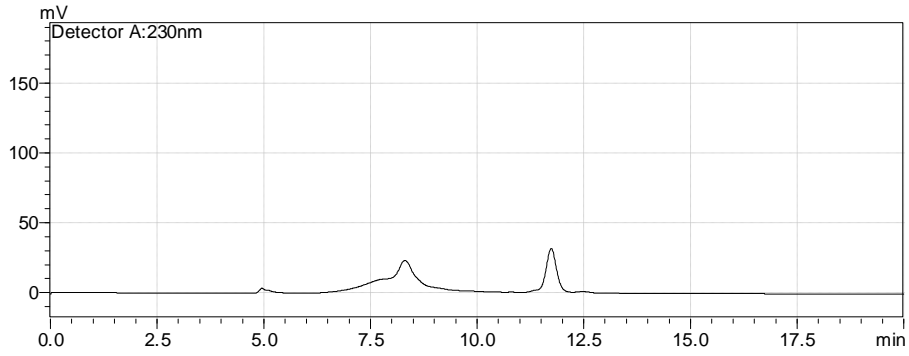
Şekil 4.19. HCl ile çöktürülen serisinin HPLC kromatogramı



Şekil 4.20. H₂SO₄ ile çökeltilen serisinin HPLC kromatogramı



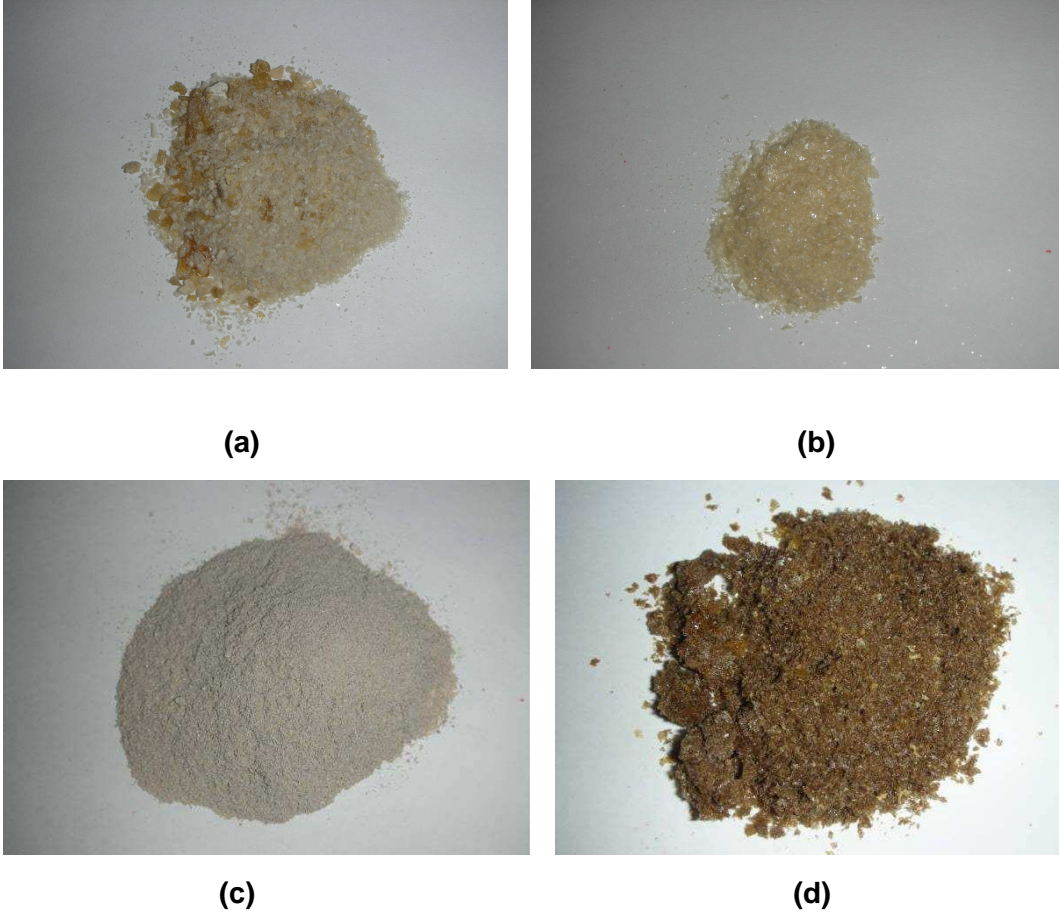
Şekil 4.21. C₂H₄O₂ ile çökeltilen serisinin HPLC kromatogramı



Şekil 4.22. C₂H₆O ile çökeltilen serisinin HPLC kromatogramı

Koza atıksuyu kahverengi olduğundan, asitle çökeltilen toz serisin örnekleri de kahverengi olmuştur. Etanol ile elde edilen serisin ise, kullanılan etanol hacminin fazla olması nedeniyle seyrelmiş ve rengi açık sarı olmuştur (Şekil 4.23). Geri kazanılan serisinin rengi, kullanılacağı alana göre önem gösterebilir. Örneğin, paketleme sektörüne yönelik olarak hazırlanacak bir

biyofilmin, içindeki ürünün görünebilmesi için şeffaf olması gerekmektedir. Başka bir alanda ise renki olmasının önemi olmayabilir.



Şekil 4.23. Serisin fotoğrafları **(a)** Referans serisin S_N **(b)** Referans serisin S_C **(c)** Etanol ile geri kazanılan serisin **(d)** HCl ile geri kazanılan serisin

Geri kazanılan serisin örnekleri ile hazırlanan çözeltiler HPLC ile analiz edilmiştir (Tablo 4.18). Görüldüğü üzere, hazırlanan ve ölçülen derişimler oldukça farklıdır. HNO_3 ile geri kazanılan serisinin en düşük derişime sahip olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, asit tepesinden dolayı serisin derişiminin yanlış hesaplanmış olabileceğidir. Bütün örneklerde, hazırlanan ve ölçülen derişimler arasındaki fark, ipekböceği proteininden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, geri kazanılmış örneklerdeki serisin miktarı %39-46 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.18. Hazırlanan ve ölçülen serisin derişimleri farkı

Çökeltmede kullanılan madde	Hazırlanan derişim (mg/L)	Ölçülen derişim (mg/L)
HCl	1000	395
H ₂ SO ₄	1000	464
C ₂ H ₄ O ₂	1000	403
HNO ₃	1000	147
C ₂ H ₆ O	1000	449

4.1.6.2. Elementel Bileşimlerin Karşılaştırılması

Serisin örnekleri, elementel analiz ile de karşılaştırılmıştır (Tablo 4.19). Brezilyadan temin edilen serisin ile yerli kozadan etanol ile çıkarılan serisin hemen hemen aynı bileşime sahiptir. Atıksudan geri kazanılan serisin örneklerinin bileşimleri az da olsa farklılık göstermiştir. Bu örneklerin C, H ve N içerikleri, standart olarak kullanılan örneklere oranla biraz daha düşüktür. Diğer yandan S içerikleri biraz daha yüksektir. Brezilya ve yerli serisinde % 41-43 karbon varken, geri kazanılan serisinde bu değer % 36-40'tır. Benzer şekilde, geri kazanılan örneklerin N içerikleri de standartlara oranla daha azdır.

Asetik asitle çökeltilen örnekte standartlara en yakın olarak % 40 seviyesinde karbon tespit edilmiştir ancak örnekler diyaliz öncesinde analiz edildiğinden, bunun asetik asitten gelen karbonu da içerdiği düşünülmektedir. Azot içeriği ise Brezilya'dan gelen ve yerli kozadan çıkartılan serisinde % 14-15'tir, ancak geri kazanılan örneklerde % 10-13'tür. Burada da nitrik asit ile çökeltilen örnekte diğerlerine oranla fazla azot olmasının nedeni, HNO₃'ten kaynaklanan azotun da eklenmesidir. Yine sülfürik asitle çökeltilen örnekteki S oranı % 2,9 ile en fazladır. Bu örnek de, serisine ek olarak asitten gelen S içermektedir. Kullanılan asitlerden kaynaklanan bu problemin, elementel analizin diyaliz sonrasında yeniden yapılmasıyla aşılacağı düşünülmüştür. Geri kazanılan örneklerin elementel kompozisyonunun, referanslardan az da olsa farklı bulunmasının nedeni, örneklerde safsızlık olarak ipekböceği proteini bulunmasıdır.

Tablo 4.19. Serisin örneklerinin elementel analizi

Örnek	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	Toplam (%)	C/H	C/N	C/S
Brezilya'dan temin edilen serisin	42,5	6,4	13,9	0,3	63,1	3,1	6,7	157,3
Yerli kozadan elde edilen serisin	41,0	6,2	14,9	0,2	62,3	2,8	6,7	241,3
HNO ₃ ile çökeltilen serisin	36,7	5,4	12,9	0,6	55,6	2,9	6,8	63,2
HCl ile çökeltilen serisin	37,7	5,6	11,0	0,7	55,0	3,4	6,8	55,5
H ₂ SO ₄ ile çökeltilen serisin	37,0	5,5	10,7	2,9	56,1	3,4	6,7	12,9
C ₂ H ₄ O ₂ ile çökeltilen serisin	40,3	5,8	10,9	0,6	57,6	3,7	6,9	66,0
C ₂ H ₆ O ile çökeltilen serisin	37,9	5,8	10,2	0,4	54,3	3,7	6,6	88,2

Bütün örneklerde C/H ve C/N oranları oldukça yakındır. Ancak C/S oranları farklıdır. Bu oranlar, serisinin moleküler formülü ile ilgilidir. Elementel analiz sonuçları, referanslara en yakın örneklerin HCl ve C₂H₆O ile elde edildiğini göstermiştir.

4.1.6.3. Asit ve Etanolün Çevresel Zararlarının Karşılaştırılması

Elde edilen bütün sonuçlar, çökeltme işleminde HCl'nin en uygun asit olduğuna işaret etmekle birlikte, seçim yapmadan önce, denenen asitlerin insan sağlığına ve çevreye zararları (AVUSTRALYA HÜKÜMETİ, Çevre, Su, Miras ve Sanat Bölümü, 2007) ve ayrıca fiyatları dikkate alınmıştır. Tablo 4.20'den görüldüğü üzere insan sağlığı için en az tehlikeli olan madde 1,2 puanla etanoldür. İkinci en az tehlikeli madde ise 1,5 puanla HCl'dir. Çevre sağlığına en az zararlı olan madde 0,7 puanla HCl'dir. Çevre için en tehlikeli maddeler ise 1,3 puanla sülfürik asit ve etanol olarak verilmiştir. Toplamda en düşük puan 2,2 ile yine HCl'ye aittir. Ayrıca, HCl ikinci en ucuz asittir. Bu durumda, koza atıksularından serisin geri kazanımı için en uygun asitin HCl olduğu söylenebilir.

Tablo 4.20. Kimyasalların çevreye zararları ve fiyatları açısından karşılaştırılması

Kimyasal Madde	Sağlık için tehlike puanı (3 üzerinden)	Çevre için tehlike puanı (3 üzerinden)	Toplam puan (3 üzerinden)	Fiyat (AVRO/2,5 L)
HNO ₃	1,8	0,8	2,6	52,2
HCl	1,5	0,7	2,2	64,2
H ₂ SO ₄	2,3	1,3	3,6	73,0
C ₂ H ₄ O ₂	1,7	1,0	2,7	68,1
C ₂ H ₆ O	1,2	1,3	2,5	180,5

4.1.6.4. Nem Miktarı, Organik ve İnorganik İçeriklerin Karşılaştırılması

Geri kazanılan serisin örneklerinin nem, organik ve inorganik içerikleri belirlenmiştir (Tablo 4.21). Geri kazanılan örneklerin nem miktarı %2,8-3,9 olarak bulunmuştur. Bu değerler, referans S_C ve S_N örnekleri için bulunan %7,4 ve %8,6'dan daha düşüktür. Bu farkın, saklama koşullarından kaynaklandığı ve önemli olmadığı düşünülmüştür. Kül miktarları ise %11,3-14,4 olarak bulunmuştur. Bu değerler, S_C ve S_N için bulunan %2,7 ve %3,8 inorganik içerikten yüksektir. Bu da geri kazanılan serisin örneklerinin organik içeriğinin daha düşük olduğu anlamına gelmektedir. Bu farkların, örneklerde bulunan ipekböceği proteininden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 4.21. Geri kazanılan serisin örneklerinin nem, kül ve organik içerikleri

Çökeltmede Kullanılan Kimyasal Madde	Nem Miktarı (%)	Kül Miktarı (%)	Organik Miktarı (%)
HNO ₃	3,9	11,3	88,7
HCl	3,1	12,8	87,2
H ₂ SO ₄	2,8	13,9	86,1
C ₂ H ₄ O ₂	2,8	11,6	88,4
C ₂ H ₆ O	3,1	14,4	85,6

4.1.6.5. Serisin Çözünürlüğüne pH'nın Etkisi

Geri kazanılan serisin örneklerinin özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan bir diğer çalışma, pH'nın serisin çözünürlüğüne etkisinin incelenmesi olmuştur. Bu amaçla, hazırlanan serisin çözeltilerinin pH'ları 3-11 arasında değişen değerlere ayarlanmış ve örnekler 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Tablo 4.22). Üst fazlar alınarak toplam protein analizi yapılmıştır. Tablo 4.22'de görüldüğü üzere kullanılan bütün asitler için, pH 3'ten 11'e doğru çıkarıldığında serisin çözünürlüğü artmış ve pH 11'de % 89-110'a ulaşmıştır. Etanol ile çöktülenen örneğin çözünürlüğü ise, bütün pH değerlerinde % 90'ın üzerinde olmuştur.

Bu sonuçlar, serisinin çözünürlüğü bakımından etanolün asitlerden daha avantajlı olduğunu göstermektedir. Asitle çöktülenen serisinin tamamen çözünebilmesi için pH ayarlaması gerekecektir. Bu durum, serisinin yeniden kullanım alanlarını kısıtlayabilecektir. Diğer yandan, etanol ile çöktülenen serisinin bütün pH değerlerinde çözünebilmesi, yeniden kullanım alanları belirlenirken önemli bir avantaj olacaktır. Buna ek olarak, etanol ile çöktüleme verimi %84 olarak bulunmuş ve asitle çöktülmeye kıyasla daha yüksek bir verim elde edilmiştir. Bu sonuçlar, serisin çöktüleme işlemi için en uygun maddenin etanol olduğunu göstermektedir.

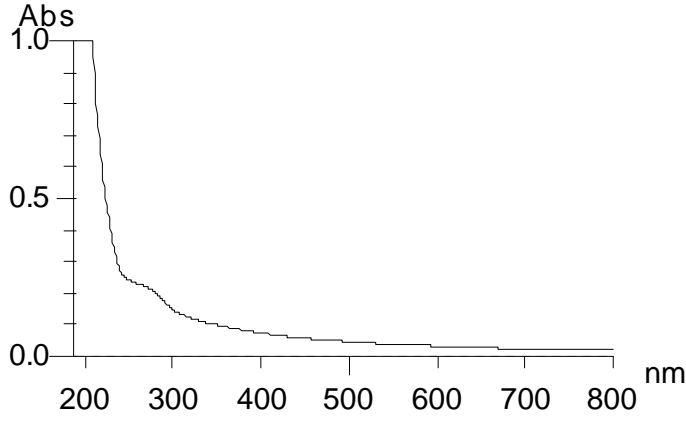
Tablo 4.22. Serisin çözünürlüğüne pH'nın etkisi

pH	Çözünürlük (%)				
	HNO ₃	HCl	H ₂ SO ₄	C ₂ H ₄ O ₂	C ₂ H ₆ O
3	47	53	65	56	92
4	65	58	63	59	99
5	56	52	68	58	98
6	56	66	61	59	108
7	88	66	68	59	105
8	61	70	62	67	98
9	58	70	62	76	95
10	73	83	70	83	103
11	110	95	89	96	101

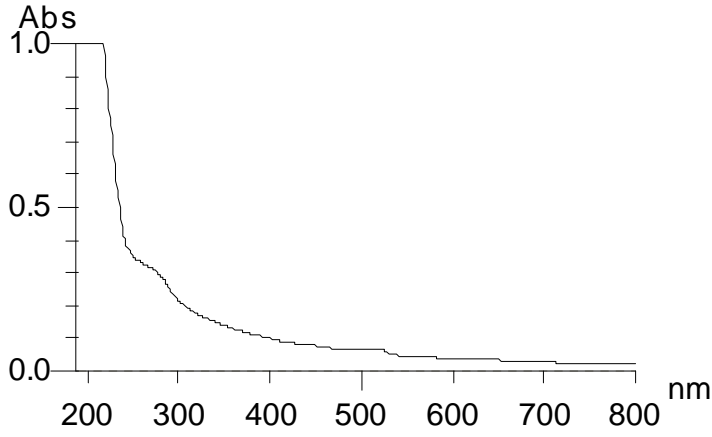
4.1.6.6. Serisin Örneklerinde UV Tarama Karşılaştırması

Geri kazanılan serisin çözeltilerinin 190-700 nm dalgaboyları arasında UV taramaları da

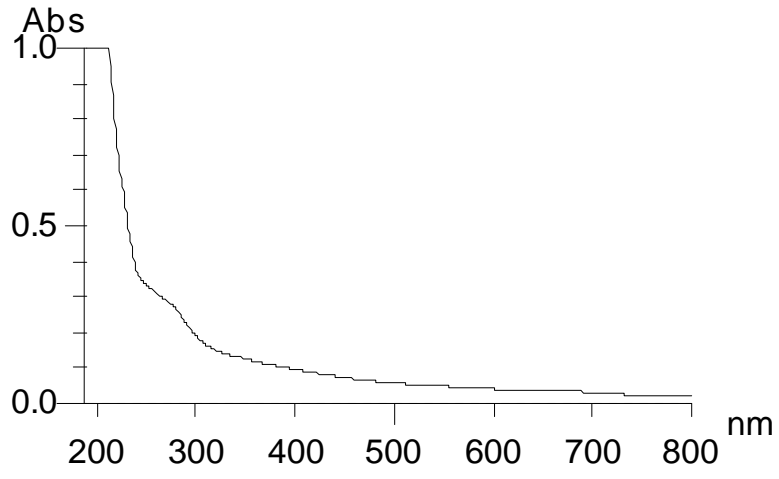
yapılmıştır. Şekil 4.24-4.28'de görüldüğü üzere, bütün asitler ve etanol için aynı sonuç alınmıştır. Serisin proteini 275-290 nm arasında tepe vermektedir. Geri kazanılan serisin örnekleri ile yerli kozadan çıkarılıp standart olarak kullanılan serisinin aynı dalga boyu aralığında tepe verdiği gözlenmiş, ancak standart serisin daha yüksek ve belirgin bir tepe vermiştir (Şekil 4.29). Bunun nedeni, yine safsızlık olarak bulunan ipekböceği proteini olabilir.



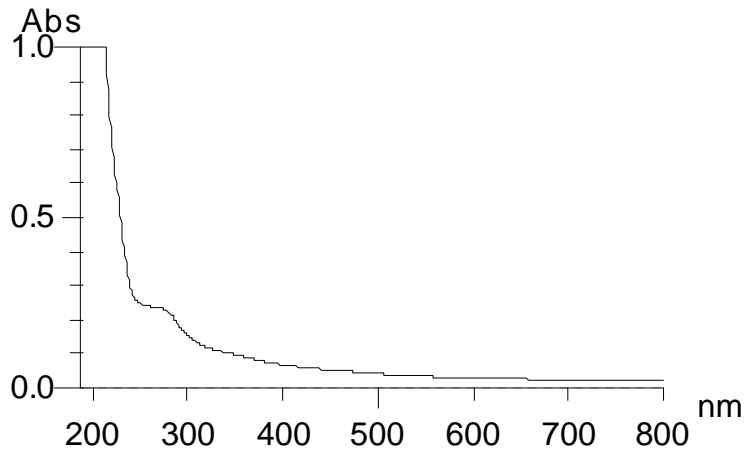
Şekil 4.24. HNO₃ ile çöktürülen serisinin UV taraması



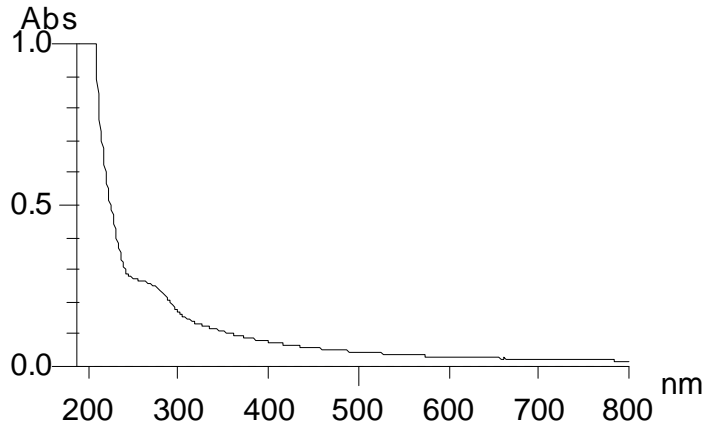
Şekil 4.25. HCl ile çöktürülen serisinin UV taraması



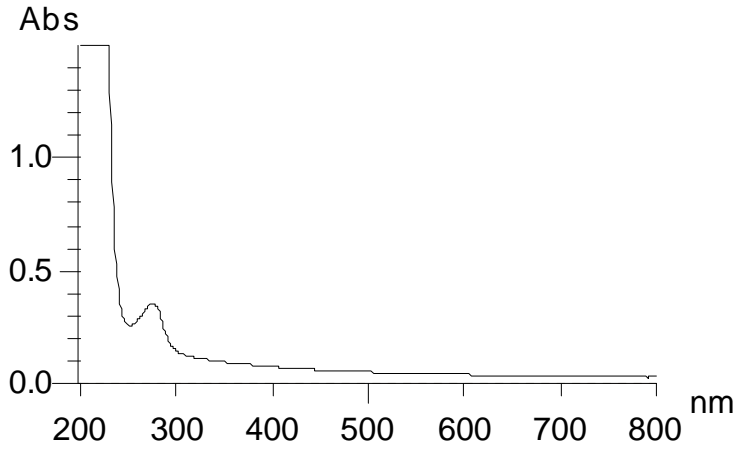
Şekil 4.26. H₂SO₄ ile çökeltilen serisinin UV taraması



Şekil 4.27. C₂H₄O₂ ile çökeltilen serisinin UV taraması



Şekil 4.28. C₂H₆O ile çöktürülen serisinin UV taraması

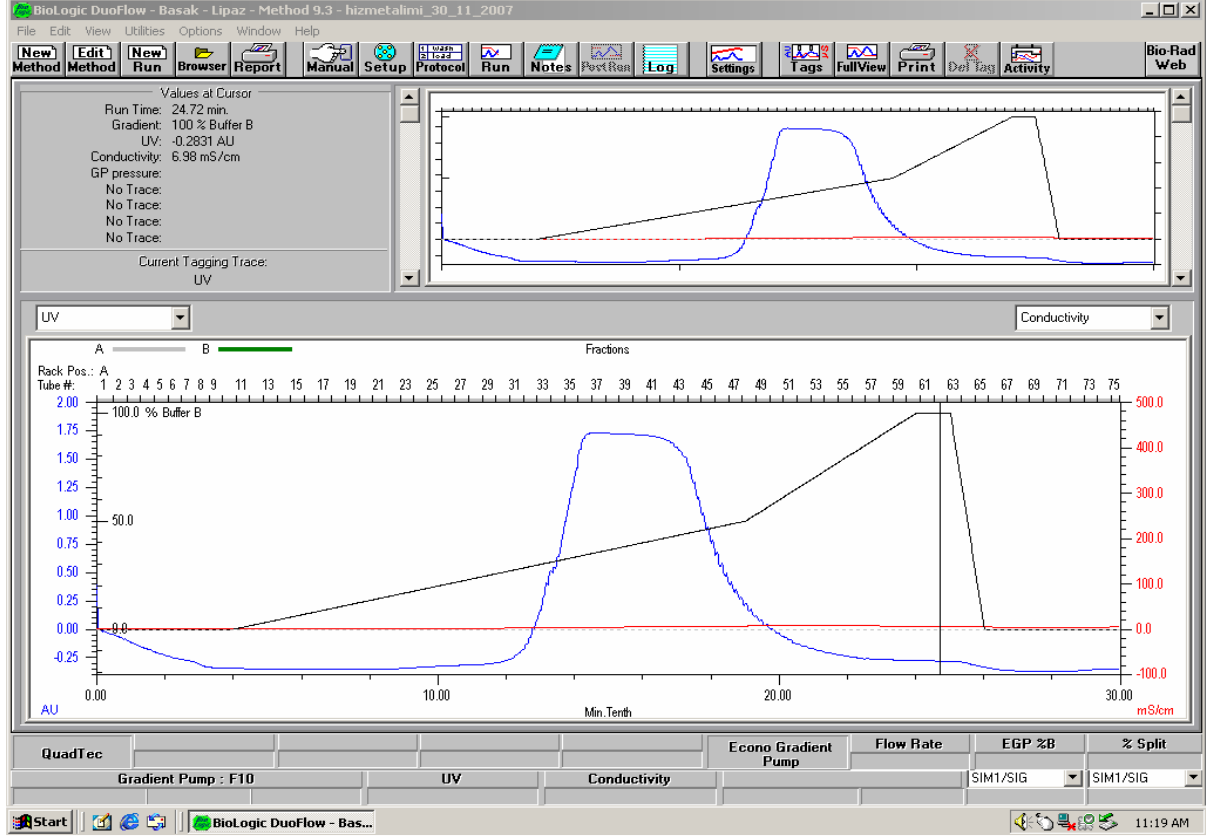


Şekil 4.29. Yerli kozadan elde edilen standart serisinin UV taraması

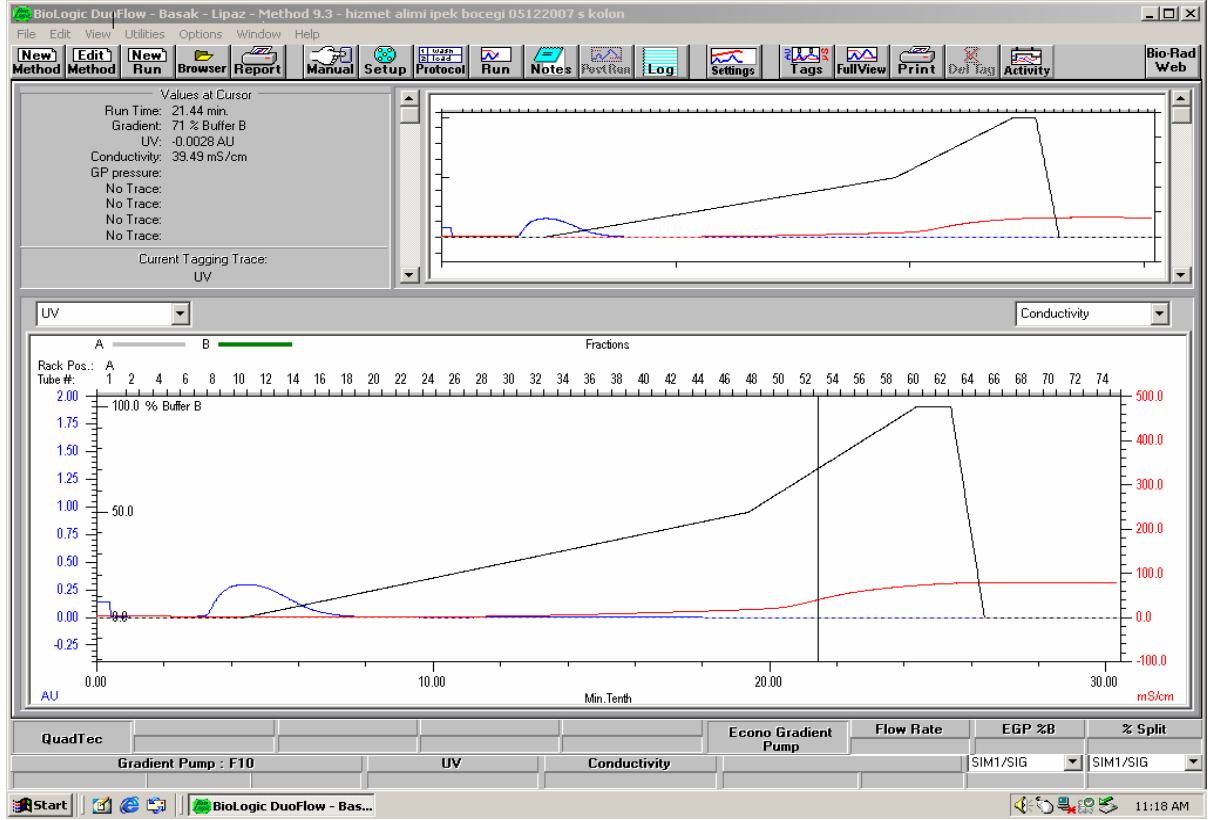
4.1.6.7. Geri Kazanılan Serisinin Tanımlanması

Geri kazanılan serisinin saflığını belirlemek amacıyla, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde (AÜBE) iyon değişimi kromatografisi, 2-D jel elektroforezi ve MALDI-TOF analizleri yaptırılmıştır. Bunun için, NF-DK membranı ile yoğunlaştırılan serisin, etanol kullanılarak çöktürülmüş, ardından bir liyofilizatör yardımıyla kurutulmuş toz haline getirilmiştir. Serisin örneği, AÜBE'de ilk olarak biyomoleküllerin yüklerine bağlı olarak ayrılmasını sağlayan iyon değişim kolonundan geçirilmiştir. Serisinin izoelektrik noktasını (pI) bulmak için hem anyon (Q) hem de katyon (S) kolonu kullanılmıştır. Şekil 4.30 ve 4.31'de verilen iyon

değişim kromatogramları, geri kazanılan serisinin asidik bir protein olduğunu ve pI'sının 5-6 arasında olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.30. Geri kazanılan serisinin anyon (Q) kolon kromatogramı

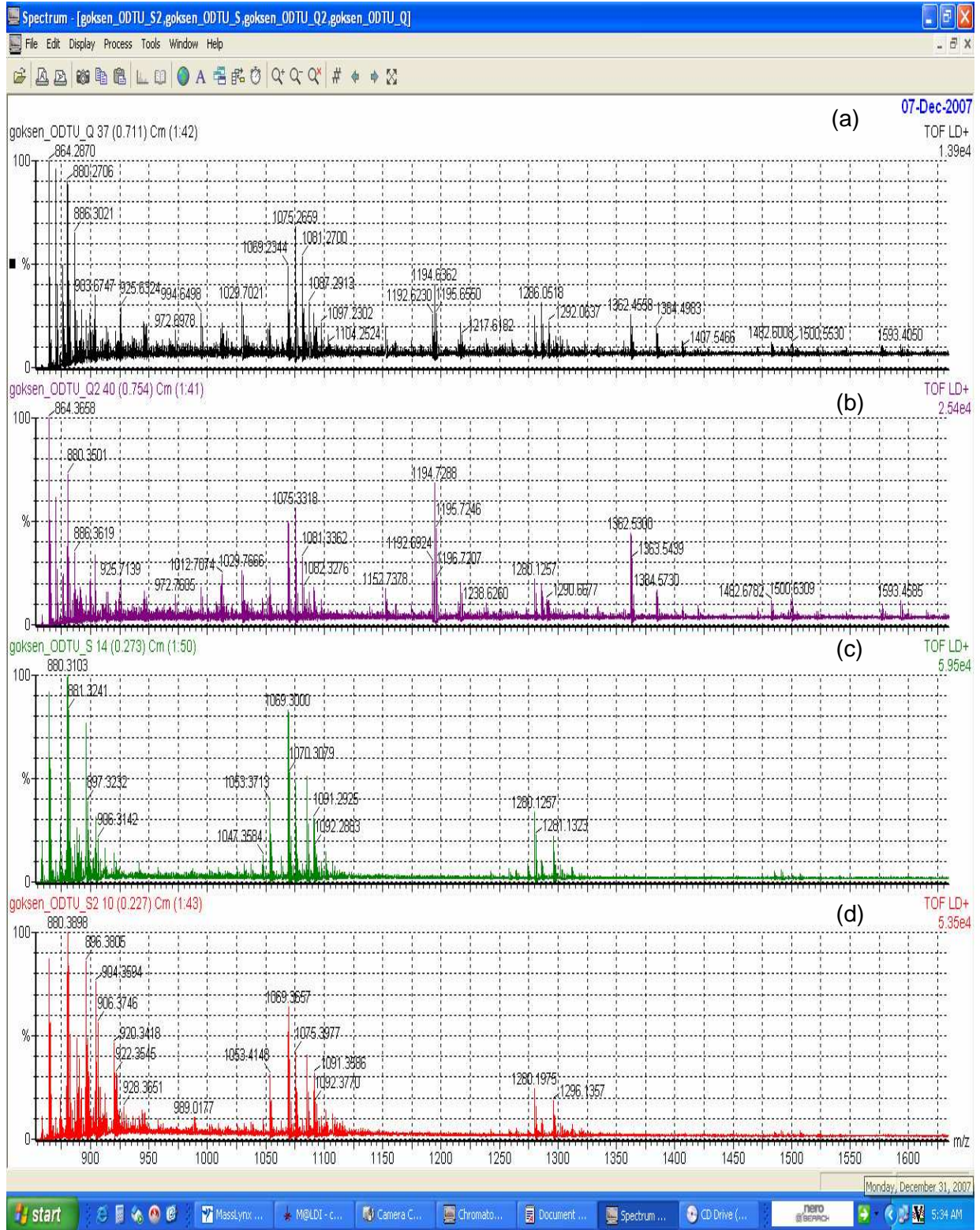


Şekil 4.31. Geri kazanılan serisinin katyon (S) kolon kromatogramı

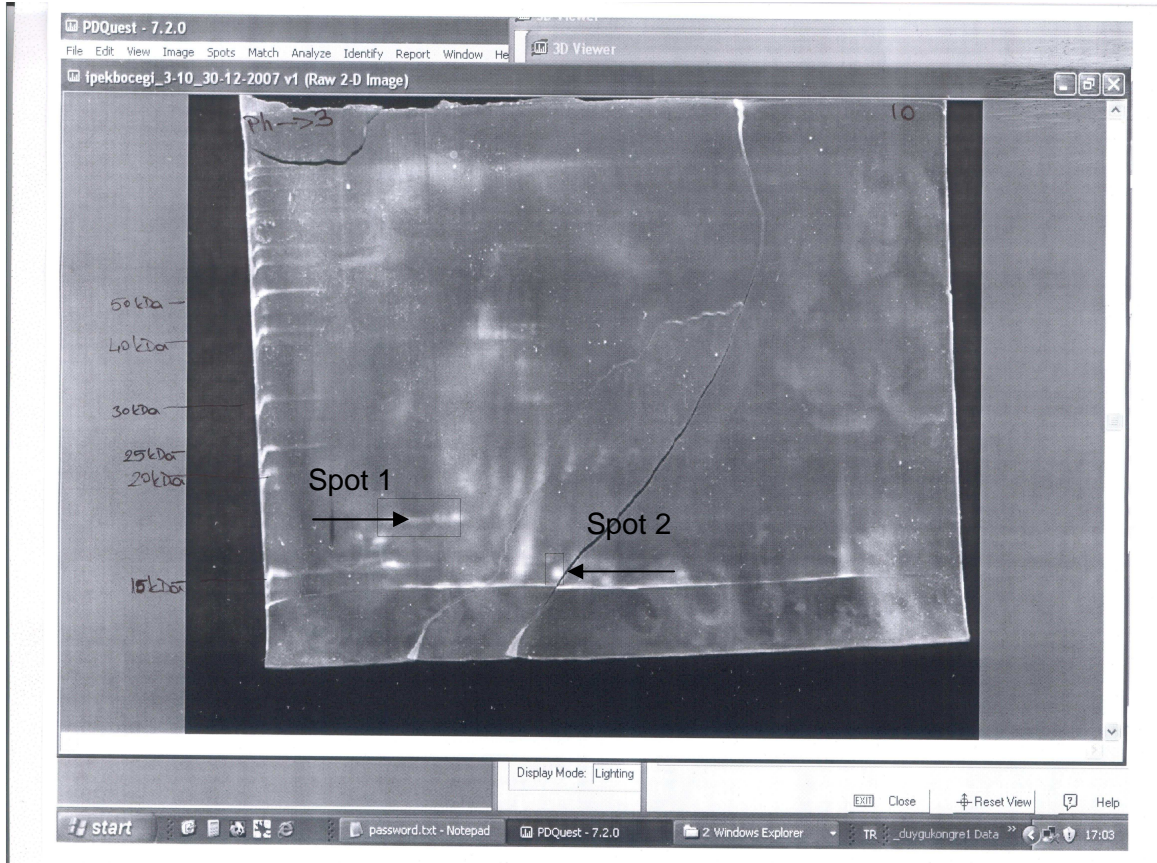
Proje kapsamında uygulanan yöntemlerle elde edilen serisin örneğinin, çeşitli veri tabanlarında tanımlanmış olan proteinlerle karşılaştırılması ve serisin olduğundan emin olunması için AÜBE'de MALDI-TOF MS analizi yaptırılmıştır. AÜBE'de ilk olarak anyon (Q) ve ardından katyon (S) kolonundan geçirilen serisin örnekleri, MALDI-TOF'a yüklenmiş ve elde edilen m/z spektrumları Şekil 4.32'de verilmiştir. Şekil 4.32(a) ve 4.32(b), anyon kolondan çıkan, 4.32(c) ve 4.32(d) ise katyon kolondan çıkan serisin örneklerine ait ikiye analiz sonucunu göstermektedir. Görüldüğü üzere, aynı örneğe ait m/z değerleri hemen hemen aynıdır. Katyon kolondan geçen örnekte ise bazı tepeler gözlenmemiştir (Şekil 4.32(c) ve 4.32(d)). Bu sonuç, analizi yürüten AÜBE yetkilisi tarafından, anyon kolonda bazı proteinlerin tutulmuş olabileceği ve bu nedenle katyon kolon çıkışında görülmemelerinin doğal olduğu şeklinde yorumlanmıştır. İyon değiştirme kolonlarının, aynı zamanda kısmi saflaştırma amacıyla kullanılan kolonlar olması nedeniyle, elde edilen sonuç anlaşılır bulunmuştur.

MALDI-TOF ile elde edilen spektrumlar, SWISS-PROT ve ExpASY protein veri tabanları (<http://www.expasy.org/uniprot>) ile karşılaştırıldığında, pek çok sürüngen hayvan türüne ait proteinlerle uyumluluk bulunmuştur. Bu analizden istenen sonuç alınamadığından ve geri

kazanılan serisin örneğinde ipek böceğinden kaynaklanan protein bulunduğundan, örnekte bulunan proteinlerin MALDI-TOF'a ayrı ayrı yüklenmesi gerekmiştir. Bunun için iki boyutlu (2-D) jel elektroforezi yapılmış ve serisin örneğinde mevcut olan bütün proteinlerin jel içinde pI'larına ve molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmıştır. Elektroforez sonucunda, pH 4-6,5 aralığında protein spotları (Spot 1 ve Spot 2) tespit edilmiştir (Şekil 4.33). Bunun dışında, bir adet de pH 8-9 aralığında protein spotu gözlenmiştir. Moleküler ağırlık dağılımına bakıldığında ise, 9000 daltonluk bir asidik protein ve 25000-40000 daltonluk bir grup asidik protein gözlenmiştir. Bu spotların MALDI-TOF analizi sonucunda elde edilen spektrumlar, ExPASy ana sayfasında SWISS-PROT/TrEMBL veri tabanları ile yeniden karşılaştırılmış ve veri tabanında kayıtlı olan O96614 numaralı SER1 (molekül ağırlığı 9161 Da) ve O96615 numaralı SER2 (molekül ağırlığı 20302 Da) serisinleri ile uyumlu bulunmuştur. Bunların dışında, bir kaç E.coli ve mantar proteini de çıkmıştır. Serisin dışındaki proteinlerin, atıksuda hızla üreyen bakteri/mantarlar a ait ve/veya sonradan meydana gelmiş olabilecek kontaminasyonlara da bağlı olduğu düşünülmektedir. Geri kazanılan serisin örneğinde MALDI-TOF analizi ile serisinin varlığından emin olunmuş ve geri kazanım için geliştirilen sürecin başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.



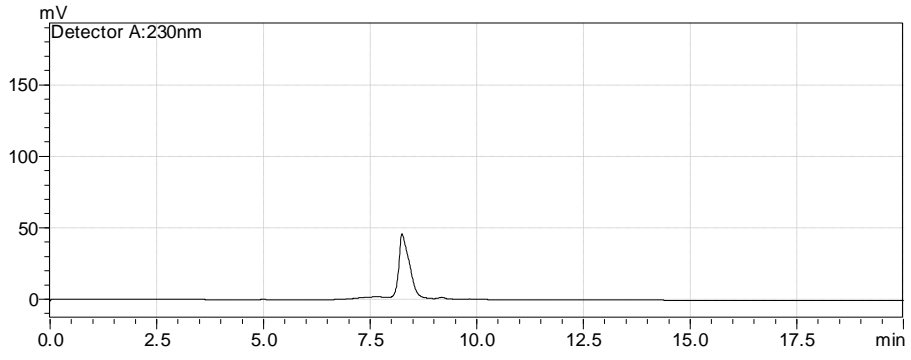
Şekil 4.32. Anyon ve katyon kolondan geçirilen serisinin MALDI-TOF spektrumu



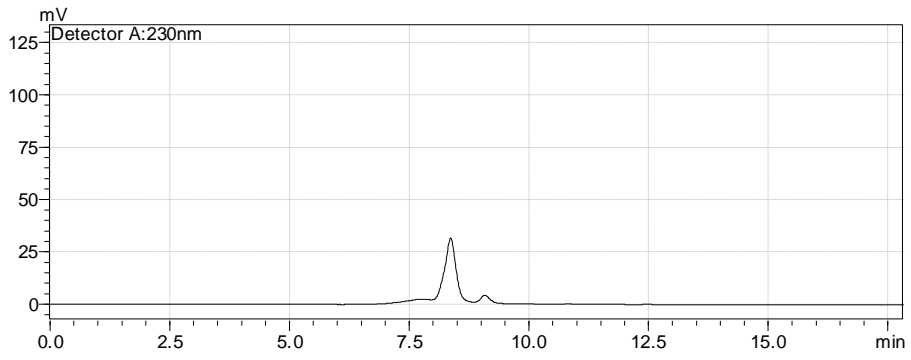
Şekil 4.33. Serisin örneğinin 2-D jel elektroforez resmi

4.1.6.8. Çökeltilen Serisinin Diyaliz ile Saflaştırılması

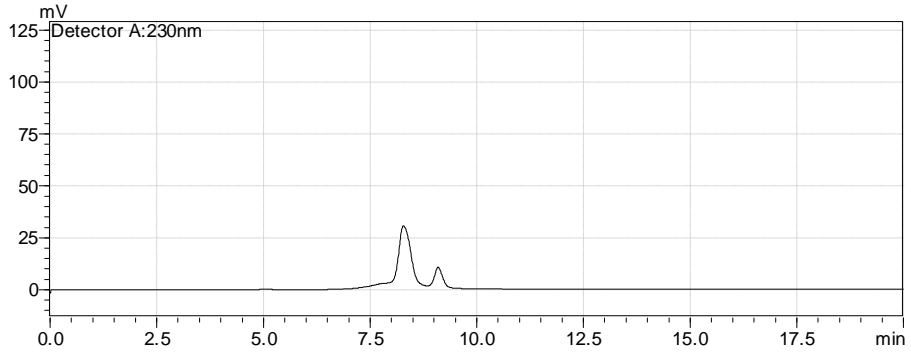
Serisin örneklerinin saflığını artırmak için diyaliz yapılmış, küçük serisin peptidlerinin kaybını önlemek amacıyla da MAAS'ı 12 kDa'dan daha küçük olan bir diyaliz torbası (MAAS 3,5 kDa) kullanılmıştır. Diyaliz edilen serisin çözeltilerinin HPLC kromatogramları Şekil 4.34-4.38'de gösterilmektedir. Görüldüğü üzere, diyaliz sonrasında elde edilen HPLC kromatogramları oldukça benzerdir.



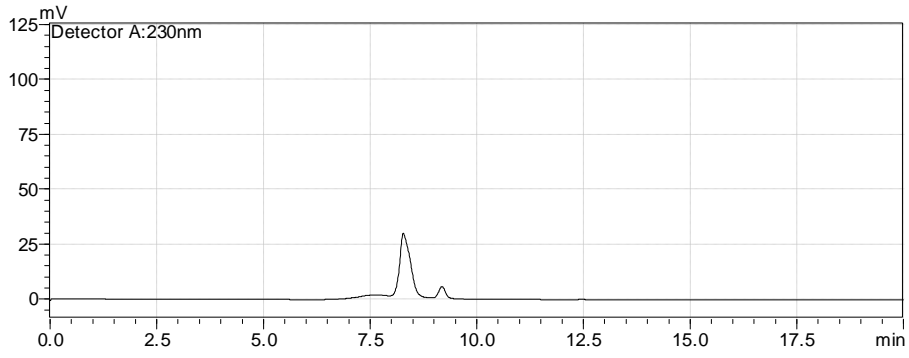
Şekil 4.34. HCl ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)



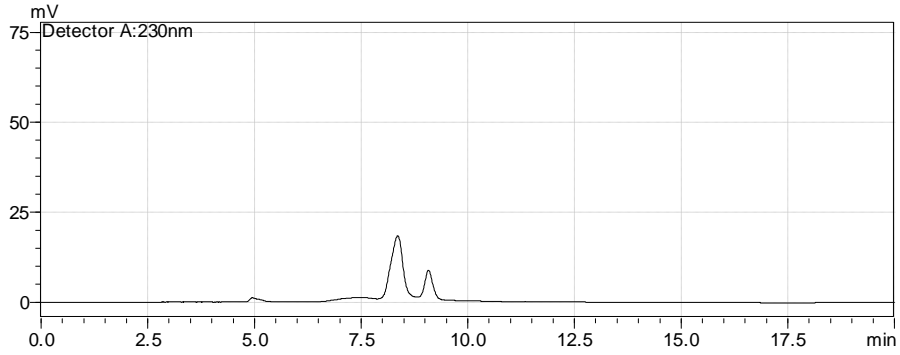
Şekil 4.35. H₂SO₄ ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)



Şekil 4.36. C₂H₄O₂ ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)



Şekil 4.37. HNO₃ ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)



Şekil 4.38. C₂H₆O ile çökeltilen ve diyaliz edilen serisin (>3,5 kDa)

Diyaliz edilen serisin örneklerinin molekül ağırlık dağılımları çıkarılmış ve karşılaştırılmıştır (Tablo 4.23). Bütün örneklerde üç farklı molekül ağırlığı tespit edilmiştir. Bunlar, S-1 (150-180 kDa), S-2 (85-100 kDa) ve S-3 (40-45 kDa)'tür. Görüldüğü gibi, serisinin bütün örneklerde en yüksek oranda bulunan polipeptidleri % 79-97 ile S-2 olmuştur. Diğerlerinin oranı ise %1 ile %20 arasında değişim göstermiştir. Molekül ağırlık dağılımlarına bakıldığında, denenen bütün asitler ve etanol hemen hemen aynı sonucu vermiştir. Diyaliz edilen ve edilmeyen örnekler arasındaki farkın, 10-25 kDa olan serisinin diyaliz torbasından difüze olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.23. Diyaliz sonrası serisinin molekül ağırlık dağılımı

Kimyasal Madde	Diyaliz Sonrası Kalan Serisin		
	Adı	MA (kDa)	Derişimi (mg/L) (Yüzdesi, %)
HCl	S-1	169	8 (2)
	S-2	96	323 (97)
	S-3	40	3 (1)
	TOPLAM		334
H ₂ SO ₄	S-1	157	31 (12)
	S-2	86	205 (79)
	S-3	44	23 (9)
	TOPLAM		259
C ₂ H ₄ O ₂	S-1	151	2 (1)
	S-2	90	270 (84)
	S-3	44	48 (15)
	TOPLAM		320
HNO ₃	S-1	176	29 (11)
	S-2	92	204 (80)
	S-3	40	23 (9)
	TOPLAM		256
C ₂ H ₆ O	S-1	-	-
	S-2	85	154 (80)
	S-3	44	42 (20)
	TOPLAM		220

Diyaliz edilen serisin örneklerinin elementel kompozisyonları belirlenmiştir (Tablo 4.24). bu örneklerin karbon içerikleri %40,8-45,3% arasında değişmiştir. Bu değerler, referans serisin örnekleri için %41-43 olarak bulunan C içeriklerine oldukça yakındır. Diyaliz sonrasında örneklerin H içerikleri %7,3-8,8 arasında değişmiştir. Bu değerler, S_C ve S_N örneklerine kıyasla yüksektir. Diyaliz edilen örneklerde %14-17 oranında N bulunmuştur. Bu değer, referans örneklerin %14-15 olan N içerikleri ile hemen hemen aynıdır. C/H oranları ise %4,7-5,9 olarak, C/N oranı ise %2,4-3,0 olarak bulunmuştur. Bu oranlar, S_C ve S_N örneklerinin %6,6 ve %2,8-3,1 olan C/H ve C/N oranlarına oldukça yakındır. Diyaliz edilen serisin örneklerinde S bulunamamıştır. Bunun olası nedeni, ipekböceği proteininin daha fazla S içermiş olması ve diyaliz işlemi ile bu proteinin uzaklaştırılması sonucunda sülfürün de kaybedilmiş olmasıdır.

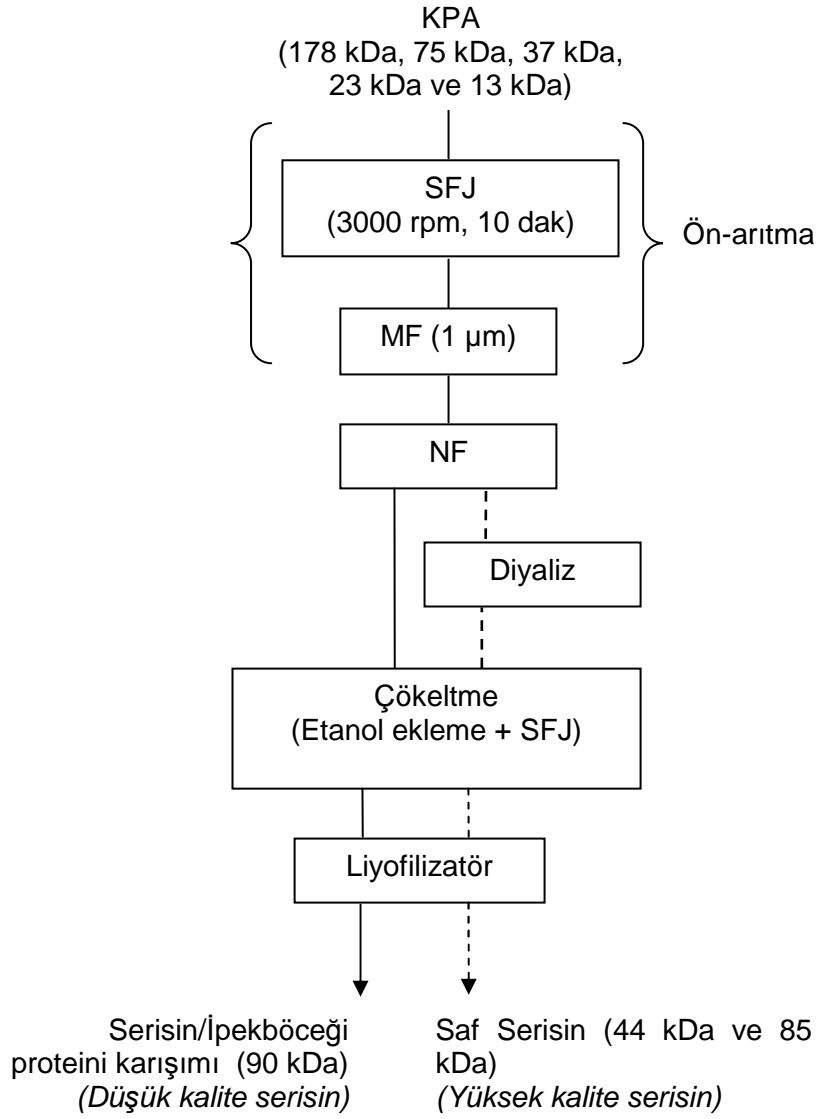
Tablo 4.24. Diyaliz sonrası örneklerin elementel kompozisyonu

Kimyasal Madde	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	Toplam (%)	C/H	C/N
HCl	45,3	8,8	16,8	-	70,9	5,2	2,7
H ₂ SO ₄	40,8	8,7	16,8	-	66,3	4,7	2,4
C ₂ H ₄ O ₂	44,2	7,9	16,8	-	68,9	5,6	2,6
HNO ₃	43,6	7,9	15,2	-	66,7	5,5	2,9
C ₂ H ₆ O	43,1	7,3	14,4	-	64,8	5,9	3,0

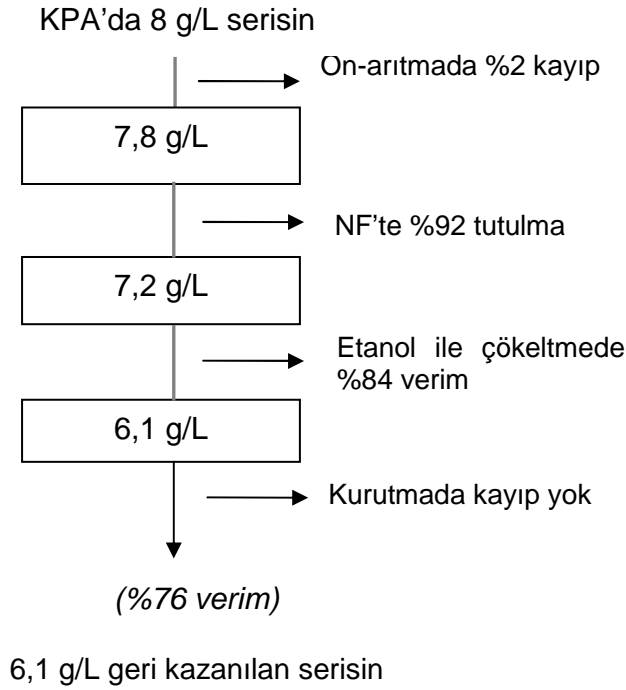
4.1.6.9. Koza Pişirme Atıksuyundan Serisin Geri Kazanım Süreci

Koza pişirme atıksularından serisin geri kazanımı için en uygun ön-arıtma ve membran süzme işlemleri, ele alınan alternatifler arasından seçilmiştir. En uygun ön-arıtma işlemi olarak SFJ + MF (1 µm) seçilmiştir. Bütün deneysel sonuçlar dikkate alınarak, KPA'dan serisin geri kazanımı için iki alternatif süreç önerilmiştir: 1. NF + etanol ile çökeltme + liyofilizasyon, 2. NF + diyaliz + etanol ile çökeltme + liyofilizasyon. Geliştirilen süreçler Şekil 4.39'da, bu süreçle elde edilen geri kazanım verimi ise Şekil 4.40'ta şematik olarak gösterilmiştir. Buna göre, geliştirilen süreçle elde edilen geri kazanım verimi yaklaşık olarak %76'dır.

Bu süreçlerde iki tür serisin ürün olarak elde edilebilir: MA 90 kDa olan düşük kalite serisin ve MA 44 kDa (%20) ve 85 kDa (%80) olan yüksek kalite serisin. Farklı MA elde edilmesi, diyaliz işleminden kaynaklanmış olabilir. Serisinin sıcaklıktan etkilenecek, 37 °C'de farklı molekül ağırlığına sahip peptidlerine ayrılmış olabileceği speküle edilebilir. Düşük kalite serisinde safsızlık olarak ipekböceği proteini bulunduğundan, bu ürünün son kullanım alanı hayvan maması üretimi olabilir. Buna ek olarak, CORTEZ ve diğerleri (2007), geri kazanılmış serisin ile iplik mukavemetini artırmayı denemiştir. Düşük kalite serisinin de benzer işlerde kullanılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca, gıda paketlenme sektörü için üretilecek biyofilmlerde de bu ürün kullanılabilir. Diğer taraftan, yüksek kalite serisinin tıp, kozmetik, ilaç ve gıda sanayiilerinde kullanılabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.39. Koza pişirme atıksuyundan serisin geri kazanım süreçleri



Şekil 4.40. Serisin geri kazanım veriminin şematik gösterimi

4.1.7. İpek İpliği Pişirme Atıksularından Serisin Geri Kazanımı

Özellikleri Tablo 3.1'de verilmiş olan ipek ipliği pişirme atıksuları, ikinci serisin kaynağı olarak ele alınmıştır. İPA'ndaki serisinin molekül ağırlığı 110-120 kDa olarak bulunmuştur. Çalışmanın bu kısmında, İPA için membran esaslı bir serisin geri kazanım süreci geliştirilmiştir. İPA'nın KOİ değeri yaklaşık 60 g/L'dir. Sabun miktarı ise doğrudan analiz edilememiş, ancak serisin ve KOİ derişimleri arasındaki farktan bulunmuştur. Bunun için ilk olarak serisin, sabun ve KOİ arasındaki ilişki incelenmiştir. Sonuç olarak, 1 g serisinin 1 g KOİ'ye eşit olduğu ve 1 g sabunun da yaklaşık 2,5 g KOİ'ye eşit olduğu bulunmuştur (Ek I).

Atıksuda bulunan sabundan kaynaklanan yağ asitleri GC-MS ile analiz edilmiştir. Bu şekilde, içinde yağ asitleri bulunan örneklerde sabunun da varlığı tespit edilmiş ve uygulanan arıtma işlemlerinin sabun giderme verimi bu şekilde değerlendirilmiştir.

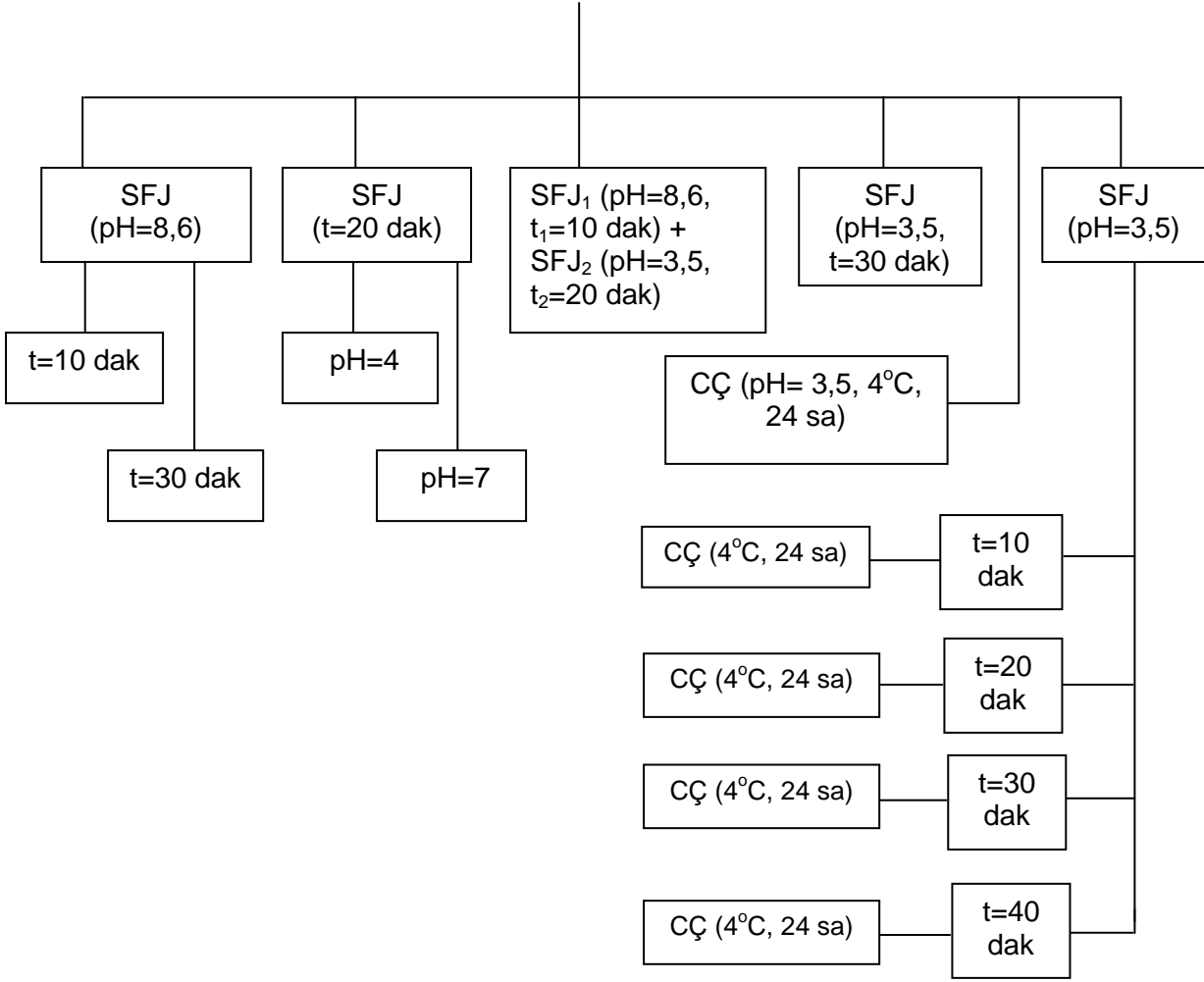
İPA'nda bulunan gerçek sabun ve serisin miktarları hakkında tesis personelinin detaylı bilgi alınmıştır. İPA2 örneğinin alındığı tankta, 100-120 kg sabun ve 15-20 kg sodanın 4-4,5 ton suya eklendiği, bu suda 550-600 kg ipek ipliği yıkandığı ve ipek ipliğinin yaklaşık olarak ağırlığının %25-27'sini kaybettiği bilgisinden, İPA2 örneğinde bulunması beklenen serisin miktarı 140-156 kg olarak hesaplanmıştır. Bu miktar yaklaşık 35 g/L serisin derişimine eşittir.

Buna ek olarak, atıksuda olması gereken sabun derişimi 22-30 g/L olarak hesaplanmıştır. İPA'nun karakterizasyonu sırasında serisin derişimi 34002 mg/L olarak ölçülmüştür. Bu değer, beklenen değerle oldukça uyumludur. Benzer şekilde, toplam protein ve KOİ derişimleri 46747 mg/L ve 59150 mg/L olarak bulunmuştur. Serisin ve KOİ arasındaki farkın sabundan kaynaklanması nedeniyle sabun derişiminin 25148 mg/L olması gerektiği anlaşılmıştır. Bu da zaten beklenen değere oldukça yakındır. İPA3 örneğinde ise serisin ve KOİ derişimleri 27581 mg/L ve 55950 mg/L olarak bulunmuştur (Tablo 3.1). Aradaki 28369 mg/L'lik fark ise yaklaşık sabun derişimine eşittir.

4.1.7.1. İPA için En Uygun Ön-arıtma Yönteminin Seçilmesi

Atıksuda bulunan sabun ve serisini ayırmak ve membran kirlenmesini kontrol etmek amacıyla uygun bir ön-arıtma süreci araştırılmıştır. KPA ile tecrübe edildiği üzere, ön-arıtma sürecinde serisinin az da olsa bir miktar kaybedilmektedir. Bu kaybı en aza indirmek ve serisini kimyasallarla kontamine etmemek için, ön-arıtma aşamasında fiziksel yöntemler kullanılmıştır (Şekil 4.41).

İpek İpliği Pişirme Atıksuyu



Şekil 4.41. İPA için ön-arıtma alternatiflerinin şematik gösterimi

4.1.7.1.1. Alkali pH Koşulunda Santrifüj

Birinci alternatifte, atıksuyun orijinal pH değeri olan 8,6'da ve 3000-4000 rpm'de santrifüj uygulanmıştır. Burada iki ayrı santrifüj süresi denenmiştir; 10 dak ve 30 dak. Elde edilen giderim verimleri Tablo 4.25'te verilmiştir. Görüldüğü üzere, serisin ve toplam protein giderimleri oldukça düşüktür; sırasıyla t=10 dak'da %5 ve %22, t=30 dak'da ise %2 ve %14 olmuştur. Kirlilik parametreleri için de giderim verimleri düşük olmuştur. KOİ ve TKM giderimleri t=10 dak'da %23 ve %11; t=30 dak'da ise %24 ve %13 olarak gerçekleşmiştir. Diğer yandan, renk ve bulanıklık giderimleri t=10 dak'da %51 ve %65; t=30 dak'da ise %67 ve %78 olmuştur. Santrifüj edilen atıksuda KOİ ve serisin derişimleri, santrifüj süresi 10 dak olduğunda 38850 mg/L ve 23684 mg/L; 30 dak olduğunda ise 38375 mg/L ve 24420 mg/L olarak ölçülmüştür. Serisin ve KOİ derişimleri arasındaki farklar, santrifüj edilen atıksuyun yüksek miktarda sabun içerdiğini göstermektedir.

4.1.7.1.2. Nötr ve Asidik pH Koşullarında Santrifüj

Santrifüj aşamasında gözlenen düşük giderimlerin, atıksuyun alkali olan pH'ından kaynaklanmış olabileceği düşünülerek, ikinci ön-arıtma alternatifinde santrifüj üzerine pH etkisi çalışılmıştır. Bunun için, atıksu pH'ı 7,0 ve 4,0'e düşürülerek 20 dak süreyle santrifüj yapılmıştır. Tablo 4.25'ten görüldüğü üzere, bazı parametreler için artış olmasına rağmen giderim verimlerinde belirgin bir iyileşme gözlenmemiştir. Serisin kaybı ise pH 7,0 ve 4,0'te %3 ve %13 olmuştur. KOİ giderimi ise pH 7,0'de %14, pH 4,0'te ise %32 olmuştur. Diğer yandan, renk ve bulanıklık değerlerinde asidik pH koşulunda artış meydana gelmiştir (Tablo 4.25). Santrifüj edilen İPA2 örneği, pH 7,0 ve 4,0'te 51000 mg/L ve 40050 mg/L KOİ derişimi içermektedir. Serisin derişimleri ise 33059 mg/L ve 29633 mg/L olmuştur. Bu verilerden, nötr ve asidik pH koşullarının sabun ve serisini ayırmak için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.25. Santrifüj süresi ve pH'ın santrifüj performansına etkisi

Parametre	Santrifüj edilmiş atıksu kalitesi (<i>Giderim</i> , %)					
	SFJ			SFJ ₁ + SFJ ₂		
	pH=8,6		pH=7,0	pH=4,0	pH=3,5	pH ₁ =8,6, pH ₂ =3,5
	t=10 dak	t=30 dak	t=20 dak	t=20 dak	t=30 dak	t ₁ =10 dak, t ₂ =20 dak
Serisin (mg/L)	23684 (5)	24420 (2)	33059 (3)	29633 (13)	22190 (11)	20133 (20)
T. Protein (mg/L)	20950 (22)	23115 (14)	54147 (0)	47672 (0)	23436 (13)	20388 (24)
KOİ (mg/L)	38850 (23)	38375 (24)	51000 (14)	40050 (32)	29150 (42)	29438 (42)
TKM (mg/L)	27475 (11)	26975 (13)	-	-	30475 (1)	29400 (5)
Renk (Pt-Co)	22725 (51)	15650 (67)	23550 (10)	35500 (0)	94 (99)	59 (100)
Bulanıklık (NTU)	2845 (65)	1798 (78)	3190 (23)	5555 (0)	233 (97)	73 (99)

4.1.7.1.3. Alkali ve Asidik pH Koşullarında Ardışık Santrifüj

Serisin ve sabun 1. ve 2. alternatiflerde tamamen ayırlamadığı için, alkali ve asidik pH koşullarında ardışık santrifüj işleminin yapılmasına karar verilmiştir. Atıksu ilk olarak orijinal pH değerinde 10 dak santrifüj edilmiş, ardından üst faz alınarak pH'ı 3,5'a ayarlandıktan sonra tekrar 20 dak santrifüj edilmiştir. Tablo 4.25'te görüldüğü üzere, serisin ve toplam protein kaybı %20 ve %24 olmuştur. KOİ, TKM, renk ve bulanıklık giderimleri ise %42, %5, %100 ve %99 olarak gerçekleşmiştir. Üst fazdaki KOİ ve serisin derişimleri 29438 mg/L ve 20133 mg/L olarak ölçülmüş, aradaki farkın tam olarak çökmeyen sabundan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Serisin ve KOİ arasındaki farkın en az olduğu, diğer bir deyişle atıksudaki sabun derişiminin en az olduğu durum pH 3,5 koşulunda elde edilmiştir. Ek olarak, ikinci kademedede oldukça berrak bir üst faz elde edilmiş; renk ve bulanıklık 59 Pt-Co ve 73 NTU olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, asidik pH koşulunun sabun giderimini olumlu etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle, yalnızca ikinci kademe santrifüj uygulamasının yeterli olacağı düşünülmüştür. Bir sonraki alternatifte bu koşullar uygulanmıştır.

4.1.7.1.4. Asidik pH Koşullarında Santrifüj

Dördüncü alternatifte, 30 dak süreyle pH 3,5'te tek kademeli santrifüj yapılmıştır. Tablo 4.25'ten görüldüğü üzere, serisin ve toplam protein kaybı %11 ve %13 olmuştur. KOİ, TKM, renk ve bulanıklık ise sırasıyla %42, %1, %99 ve %97 olarak gerçekleşmiştir. Serisin ve KOİ derişimleri üst fazda 22190 mg/L ve 29150 mg/L olmuş, sabunun tamamen giderilmediği anlaşılmıştır. Renk ve bulanıklık ise 94 Pt-Co ve 233 NTU olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak, ardışık santrifüj ile asidik pH koşulunda tek kademe santrifüj arasında fazla bir fark meydana gelmemiştir. Bu nedenle, İPA'nda serisin ve sabunu ayırmak için atıksu pH'ı 3,5'e ayarlandıktan sonra tek kademe santrifüj yapılmasına karar verilmiştir.

4.1.7.1.5. Asidik pH Koşullarında Santrifüj+Cazibeyle Çökeltme

Santrifüj edilmiş örneklerin buzdolabında bir gece bekletildikten sonra oldukça berrak olduğu gözlenmiş, sabunun tamamen çöktüğü farkedilmiştir. Bu gözleme dayanarak, santrifüj sonrasında cazibeyle çökeltme işlemi uygulanmasına karar verilmiştir. Aslında, SFJ partikül maddelerin çökeltmesi için oldukça etkin bir işlemdir. Ancak, sabun giderimi söz konusu olduğunda yetersiz bulunmuştur. Bunun nedeni, sabunun yoğunluğu gibi fiziksel özellikleri olabilir.

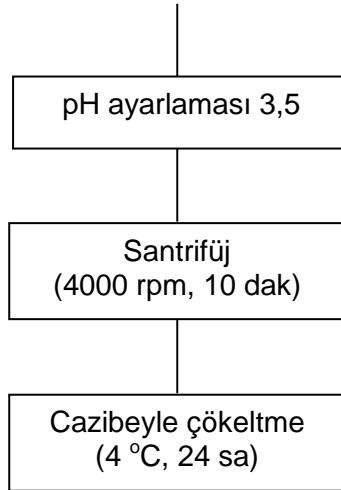
Santrifüj süresi de ayrıca optimize edilmiştir. Asidik pH ayarlaması sonrasında örnekler 10, 20, 30 ve 40 dak santrifüj edilmiştir. Bir adet örnek ise, orijinal pH değerinde tutulmuş ve kontrol olarak kullanılmıştır. Santrifüj edilen ve üst fazları alınan kontrol ve örnekler, 24 saat süreyle oda sıcaklığında çökmeye bırakılmıştır. Ancak sabunun çökmediği, atıksuyun üstünde toplandığı fark edilmiştir. Bu bulgu, sabunun 4 °C'de çökebildiğini göstermiştir. Literatür bilgileri, üstte toplanan sabunun bir sıyırıcı ile toplanabildiğini göstermektedir (DAVIDSOHN, 1953) Ancak laboratuvar koşullarında sabunun çökeltmesi daha uygun bulunmuştur. Böylece, örnekler buzdolabına yerleştirilmiş ve Tablo 4.26'da gösterilen giderim verimleri elde edilmiştir. Cazibeyle çökeltilen ve öncesinde santrifüj uygulanan örneklerde, serisin ve KOİ derişimleri 24080-27450 mg/L ve 22688-26000 mg/L olarak ölçülmüştür. Görüldüğü üzere, serisin ve KOİ derişimleri oldukça yakındır, bu da sabunun maksimum oranda giderildiğini göstermektedir. Renk ve bulanıklık giderimleri ise en kısa süreyle (10 dak ve 20 dak) uygulanan santrifüj işlemlerinde en yüksektir. Renk ve bulanıklık değerleri, santrifüj süresi 10 dak olduğunda 4963 Pt-Co ve 21 NTU; 20 dak olduğunda ise 5913 Pt-Co ve 37 NTU olarak ölçülmüştür. Yalnızca cazibeyle çökeltme işleminde elde edilen renk ve bulanıklık giderimleri de bu değerlere yakın olmuştur. Ancak, çökme işlemi oldukça yavaş olduğundan, en uygun ön-arıtma işlemi olarak seçilmemiştir. SFJ (t=30 dak) + CÇ ve SFJ (t=40 dak) + CÇ işlemlerinde ise, renk ve bulanıklık giderimlerinde diğer alternatiflere kıyasla daha az bir fark olmuş, %65-66 ve %86-90 olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçların deneysel hata içerdiği düşünülmektedir. Bunun nedeni ise, SFJ (t=30 dak) + CÇ ve SFJ (t=40 dak) + CÇ işlemlerinde sabunun üstte toplanması ve örnekleme yapılırken sabunlu fazın dağılarak alınan örneğe karışmış olabileceğidir.

Bütün alternatifler değerlendirildiğinde, İPA için en uygun ön-arıtma işleminin SFJ (pH 3,5) + CÇ (4 °C, 24 saat) olduğuna karar verilmiş, bu süreç şematik olarak Şekil 4.42'de gösterilmiştir.

Tablo 4.26. Asidik pH koşullarında santrifüj süresinin optimizasyonu

Parametre	Santrifüj Edilmiş Atıksu Kalitesi (<i>Giderim, %</i>)				
	(pH=3,5)				
	CÇ	SFJ (t=10 dak) + CÇ	SFJ (t=20 dak) + CÇ	SFJ (t=30 dak) + CÇ	SFJ (t=40 dak) + CÇ
Serisin (mg/L)	27450 (1)	24080 (13)	25533 (7)	25842 (6)	26509 (4)
KOİ (mg/L)	23725 (58)	22688 (59)	23513 (58)	26000 (54)	23240 (55)
Renk (Pt-Co)	6175 (76)	4963 (81)	5913 (77)	9025 (65)	8950 (66)
Bulanıklık (NTU)	396 (90)	21 (99)	37 (99)	567 (86)	416 (90)

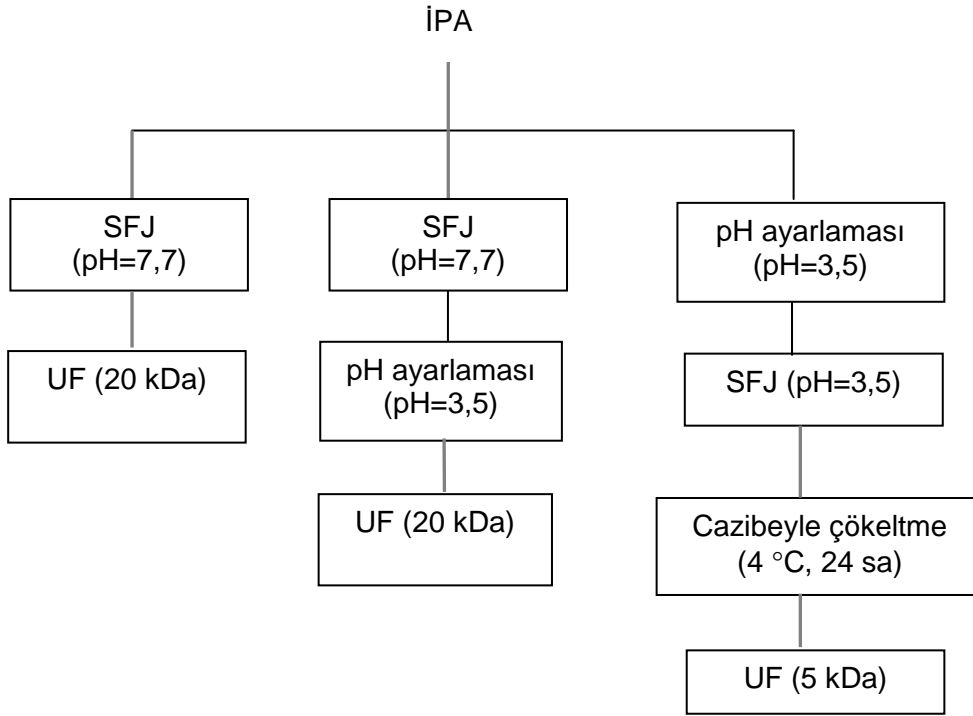
İpek İpliği Pişirme Atıksuyu



Şekil 4.42. İPA için en uygun ön-arıtma işlemi

4.1.7.2. İPA'dan Ultrafiltrasyon ile Serisin Geri Kazanımı

İPA'nda bulunan serisinin molekül ağırlığı 110-120 kDa kadar büyük olduğundan, serisin geri kazanımı için, UF işleminin uygun olacağı ve NF'e gerek kalmayacağı düşünülmüştür. Bu nedenle Şekil 4.43'te gösterilen üç alternatif süreç denenmiştir. Bu süreçler, serisin ve sabun için en basit ayırma işleminin belirlenmesi amacıyla seçilmiştir. Şekil 4.43'te görüldüğü üzere, en basit süreç birinci seçenekte ele alınan SFJ+UF'tir. Bu seçenekte, atıksu pH değeri değiştirilmemiş ve serisin ile sabunun UF aşamasında ayrılması denenmiştir. İkinci süreçte ise, atıksuyun orijinal pH'ında santrifüj yapıldıktan sonra asidik pH koşulunda UF denenmiştir. Son olarak, üçüncü alternatifte ise en uygun ön-arıtma işlemi olarak seçilen SFJ (pH 3,5) + cazibeyle çökeltme (4 °C, 24 saat) uygulanmış ve yine asidik pH koşulunda UF yapılmıştır. Bu seçenekte ise, serisin ve sabun ön-arıtma aşamasında ayrılmış, UF'in amacı ise serisini yoğunlaştırma olmuştur. Bu alternatiflerin değerlendirilmesi yapılarak İPA'ndan serisin geri kazanımı için en uygun yöntem belirlenmiştir.



Şekil 4.43. İPA'dan serisin geri kazanım süreçlerinin şematik gösterimi

4.1.7.2.1. UF Membranlarının Tutma/Giderme Performansları

Alternatif işlemlerde elde edilen besleme ve süzüntü suyu kaliteleri Tablo 4.27 ve 4.28'de verilmiştir. Görüldüğü üzere, birinci ve ikinci alternatiflerde benzer sonuçlar alınmıştır. Birinci alternatifte, atıksuyun orijinal pH'ı olan 7,7'de uygulanan UF (20 kDa) işleminde, besleme ve süzüntü suyu derişimleri 24252 mg/L ve 3725 mg/L olmuştur. Bu değerler, %85'lik serisin tutma verimine denk gelmektedir. Serisinin moleköl ağırlığı ise besleme ve süzüntü sularında 119 kDa ve 92 kDa olarak bulunmuştur. KOİ derişimi ise, giriş ve çıkışta 32650 mg/L ve 8985 mg/L olarak ölçülmüştür. KOİ giderimi ise %72 olarak bulunmuştur. Besleme suyunda 1,3 olarak bulunan KOİ/Serisin oranı, ciddi oranda sabun varlığına işaret etmektedir. Dolayısıyla, uygulanan UF (20 kDa) işlemi ile serisin ve sabunun tamamen ayrılamadığı anlaşılmıştır.

İkinci alternatifte ise aynı membran asidik pH koşulunda daha iyi sonuç vermiştir. Besleme ve süzüntü sularında serisin derişimi 20610 mg/L ve 314 mg/L olarak bulunmuş, serisin tutma verimi ise %98 olarak hesaplanmıştır. Serisinin moleköl ağırlığı ise birinci alternatifte paralel olarak girişte 119 kDa ve çıkışta 96 kDa olarak bulunmuştur. KOİ giderimi ise biraz daha düşük olmuş ve %70 olarak gerçekleşmiştir. Giriş ve çıkış KOİ derişimi ise 39500 mg/L ve 11820 mg/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, asidik pH koşulunun UF (20 kDa) membranının serisin tutma verimini olumlu etkilediğini, ancak KOİ giderim verimini düşürdüğünü göstermektedir. Besleme suyunda 1,9 olarak belirlenen KOİ/Serisin oranı ise yine sabunun varlığına işaret etmiş ve serisin ile sabunun UF (20 kDa) membran ile pH 3,5'te tamamen ayrılamadığını göstermiştir.

UF (20 kDa) membranının serisin, toplam protein, renk ve bulanıklık giderim verimleri oldukça yüksektir. KOİ ve TKM ise daha düşük verimle giderilmiştir. Özellikle TKM için elde edilen düşük verimin, deneysel hatadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Renk ve bulanıklık her iki süreçte de tamamen giderilmiştir. Ancak, he iki süreçte de süzüntü sularının kalitesi, KOİ için 350 mg/L olan deşarj limitini sağlayamamıştır.

Üçüncü alternatifte ise, serisin ve sabun ön-arıtma aşamasında ayrılmıştır. Atıksu pH'ı HCl ile 3,5'e ayarlanmış ve 4000 rpm'de 10 dak süreyle santrifüj yapılmıştır. Ardından üst faz alınarak +4 °C'de 24 saat bekletilmiş ve sabunun çökmesi sağlanmıştır. Serisin geri kazanımı için uygulanan UF (5 kDa)'ın performansı Tablo 4.27 ve 4.28'de verilmiştir. Görüldüğü üzere, besleme suyunda KOİ ve serisin derişimleri 24188 mg/L ve 24274 mg/L olarak bulunmuştur. Bu değerler hemen hemen aynı olduğundan, besleme suyundaki KOİ'nin yalnızca serisinden

kaynaklandığı ve sabun kalmadığı anlaşılmıştır. UF (5 kDa) membranının serisini ise tamamen tutamadığı gözlenmiştir. Besleme suyundaki serisinin yarısına yakını süzüntü suyuna geçmiş, 10063 mg/L serisin derişimi ölçülmüş ve %59 tutma verimi hesaplanmıştır. UF (5 kDa)'nın düşük performansının nedeni, atıksuyun asidik pH'ı olabilir. Bu durumda, UF deneyi öncesinde atıksuyun pH'ının nötralize edilmesi veya bazik koşula getirilmesi ile, UF(20 kDa) membranda olduğu gibi yüksek verim elde edilmesi sağlanabilecektir. Bir diğer seçenek ise UF (5 kDa) yerine asidik koşulda yüksek serisin tutma kapasitesi gösteren UF (20 kDa) membranını kullanmaktır.

Kirlilik parametreleri açısından ise, renk ve bulanıklık UF (5 kDa) ile tamamen giderilmiştir (Tablo 4.29). Ancak, UF (5 kDa) süzüntü suyu yine de deşarj limitini sağlamamaktadır. Serisin tamamen geri kazanıldığında süzüntü suyunda KOİ kalmayacak ve deşarj limiti de sağlanacaktır. Bunun için, yukarıda bahsedilen önerilerin faydalı olacağı düşünülmektedir.

Tablo 4.27. UF işlemlerinin performans karşılaştırması

Parametre	Atıksu Kalitesi					
	UF (20 kDa) @ pH=7,7		UF (20 kDa) @ pH=3,5		UF (5 kDa) @ pH=3,5	
	Giriş	Çıkış	Giriş	Çıkış	Giriş	Çıkış
Serisin (mg/L)	24252	3725	20610	314	24274	10063
MA (kDa)	119	92	119	96	110	106
T. Protein (mg/L)	26675	3608	24697	2972	nm	nm
KOİ (mg/L)	32650	8985	39500	11820	24188	10090
TKM (mg/L)	33370	8725	42530	21300	nm	nm
Renk (Pt-Co)	3675	85	31900	73	4713	345
Bulanıklık (NTU)	1780	0,4	4010	0,4	17	3
pH	7,7	8,0	3,5	3,4	3,5	3,4
Akı Azalması (%)	85		94		88	
Akı Geri Kazanımı (%)	89 ^a		97 ^b		31 ^c	

nm: ölçülememiştir

^a0,5 M NaOH + 201 ppm Cl, 20 dak

^b0,5 M NaOH + 207 ppm Cl, 30 dak

^c0,5 M NaOH + 192 ppm Cl, 35 dak

Tablo 4.28. UF işlemlerinin tutma/giderme performansları

Parametre	Tutma/Giderim Verimi (%)		
	UF (20 kDa)	UF (20 kDa)	UF (5 kDa)
	@ pH=7,7	@ pH=3,5	@ pH=3,5
Serisin (mg/L)	85	98	59
T. Protein (mg/L)	86	88	nm
KOİ (mg/L)	72	70	58
TKM (mg/L)	74	50	nm
Renk (Pt-Co)	99	100	93
Bulanıklık (NTU)	100	100	84

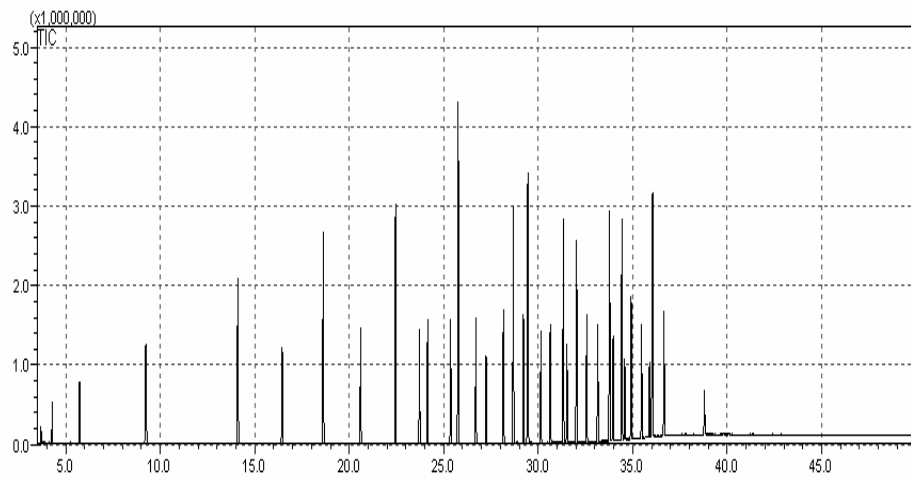
nm: ölçülememiştir

Tablo 4.29. Kirlilik parametreleri için toplam giderim verimleri

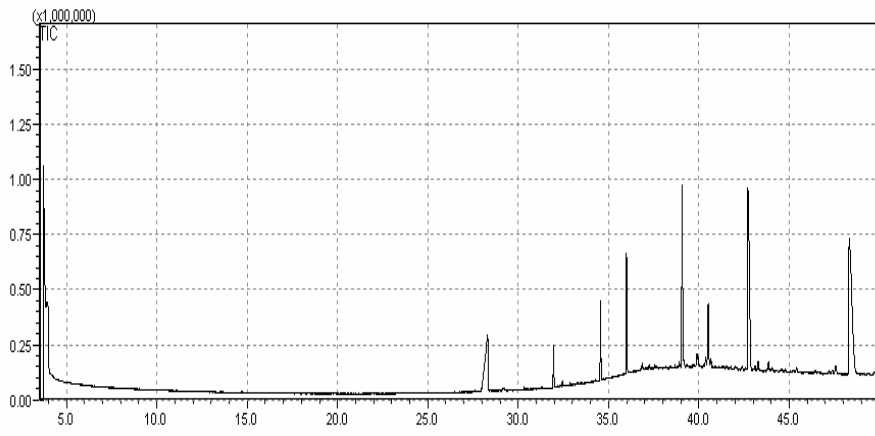
Parametre	Giderim Verimi (%)		
	UF (20 kDa)	UF (20 kDa)	UF (5 kDa)
	@ pH=7,7	@ pH=3,5	@ pH=3,5
KOİ (mg/L)	81	76	82
TKM (mg/L)	75	37	nm
Renk (Pt-Co)	100	100	99
Bulanıklık (NTU)	100	100	100

nm: ölçülememiştir

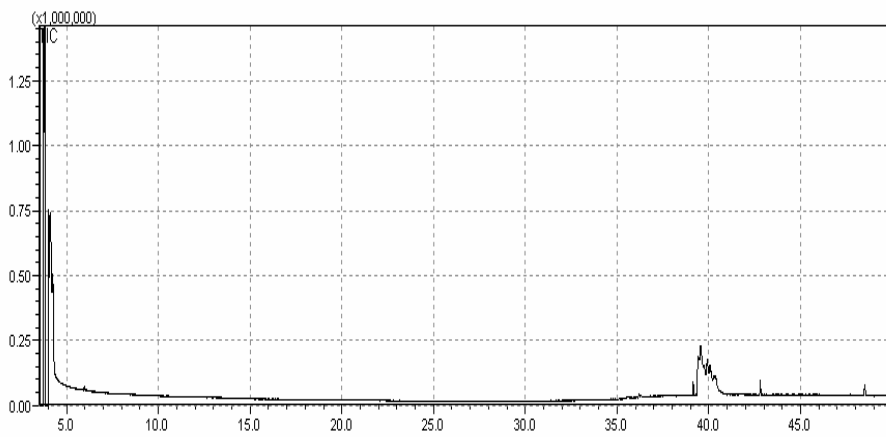
Üçüncü alternatifte sabunun tamamen giderildiğinden emin olmak amacıyla, UF (5 kDa) besleme ve süzüntü suları Ankara Üniversitesi Enstrümental Analiz Laboratuvarı'nda GC-MS ile analiz edilmiştir. Şekil 4.44(a) ve 4.44(b)'de gösterildiği üzere, yağ asiti standartları ile karşılaştırıldığında ham İPA'nun da yağ asitleri içerdiği gözlenmiştir. Şekil 4.44(c) ve 4.44(d)'de ise hiç bir yağ asiti bulunmamış, dolayısıyla UF (5 kDa) giriş ve çıkışında sabun bulunmadığı anlaşılmıştır.



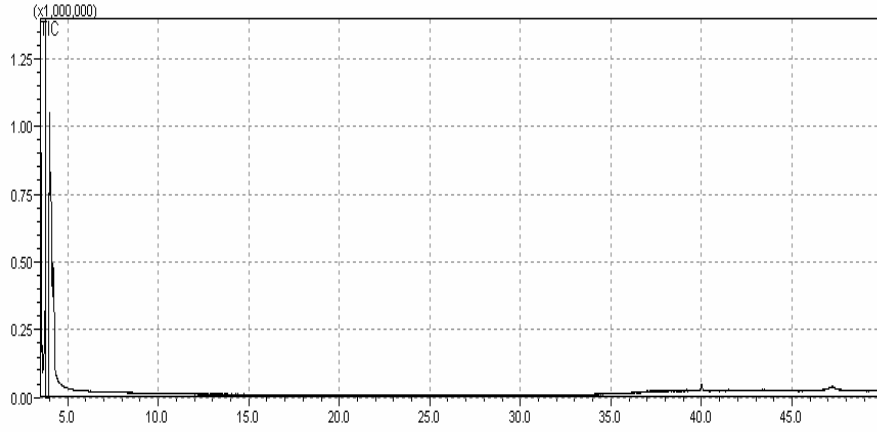
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.44. GC-MS kromatogramları (a) yağ asitleri standardı (b) ham İPA (c) UF (5 kDa) girişi (d) UF (5 kDa) çıkışı

4.1.7.2.2. UF Membranlarının Akı Analizleri

UF işlemlerinde ciddi akı azalması gözlenmiştir. UF (20 kDa)'da pH 7,7'de %85 ve pH 3,5'te %94; UF (5 kDa)'da pH 3,5'te ise %88 olarak gerçekleşmiştir. UF (20 kDa) membranında kimyasal yıkama ile saf su akısı tamamen geri kazanılmış olmasına rağmen, UF (5 kDa) membranda akılar kısmen geri kazanılabilmektedir. Diğer bir deyişle, UF (20 kDa) membranının akı geri kazanım oranı %89-97 iken, UF (5 kDa) membranda bu oran yalnızca %31 olmuştur. Bunun olası bir sebebi, UF (5 kDa) membranda ciddi gözenek tıkanması meydana gelmesidir. Diğer bir sebep ise, sabunun bulunmadığı ortamda serisinin membran yüzeyi ile daha fazla etkileşimde olması ve geri döndürülemeyen kirlenmeye neden olmasıdır. Serisin derişiminin oldukça yüksek olması da akı azalmasını artıran ve ciddi kirlenmeye neden olan bir durumdur.

Akı analizi Tablo 4.30'da verilmiştir. Görüldüğü üzere, pH 7,7'de, asidik pH koşuluna kıyasla konsantrasyon polarizasyonu etkisi daha yüksek ve kirlenme etkisi daha düşük olmuştur. Konsantrasyon polarizasyonu etkisi, atıksuyun orijinal pH'ında %78, asidik pH koşulunda ise %33 ve %53 olmuştur. Ayrıca, toplam kirlenme etkisi %34 (pH 7,7) ve %81-88 (pH 3,5) olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, nötre yakın pH koşulunun akı azalması üzerinde daha az olumsuz etkiye sahip olduğu, ancak sabun giderimi üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Bu kısımda elde edilen veriler, ipek ipliği pişirme atıksularından serisin geri kazanımının kolay bir iş olmadığını göstermektedir. Meydana gelen ciddi akı azalması, önerilen sürecin en büyük dezavantajıdır. Dahası, serisin ve sabunun membran işleminden önce ayrılması gerekmektedir. Bu sonuçlar, ipek ipliği pişirme işleminin çevresel olarak daha az zarar verecek şekilde yapılması gerektiğini açıkça göstermektedir. Fabiani ve diğerleri (1996)'nin bahsetmiş olduğu alternatif pişirme tekniği uygulandığında, sabun kullanımına ihtiyaç duyulmayacak ve serisin iplikten basınçlı kazanlarda sadece sıcak su kullanılarak ayrılabilir. Bu da daha pratik ve daha temiz bir yöntemdir. Bu yöntem, Bölüm 4.1.7.3'te anlatılmıştır.

Tablo 4.30. UF işlemlerinde akı analizi

Süreç	Akı (L/m ² /sa) (T=17-24 °C)				Akı Azalması (%)			
	I	W	F	C	C.P	T.F	R.F	I.F
UF (20 kDa) @ pH=7,7	63,3	9,3	41,7	56,7	78	34	27	11
UF (20 kDa) @ pH=3,5	53,3	3,0	6,3	51,7	53	88	88	3
UF (5 kDa) @ pH=3,5	43,4	5,4	8,1	13,6	33	81	40	69

I: Saf su, W: Atıksu, F: Yıkama öncesi saf su, C: Yıkama sonrası saf su
C.P. : Konsantrasyon polarizasyonu [(F-W)/F], T.F. : Toplam kirlenme [(I-F)/I]
R.F. : Geri döndürülebilir kirlenme [(C-F)/C]
I.F. : Geri döndürülemez kirlenme [(I-C)/I]
* C değeri I değerinden büyük olduğundan hesaplanamamıştır.

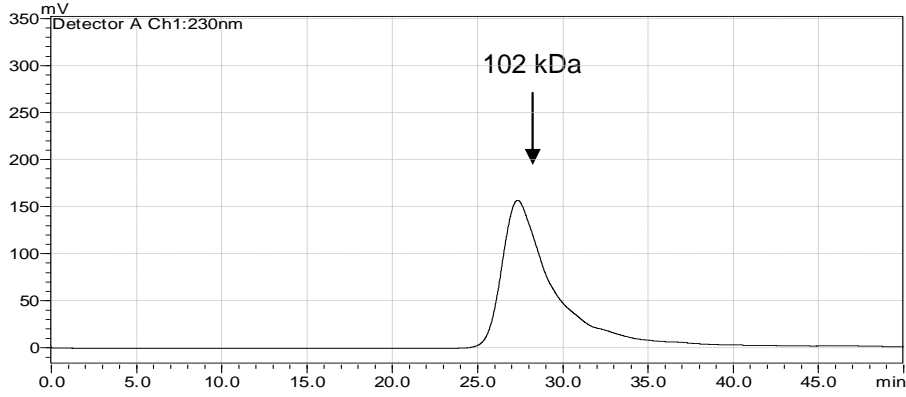
4.1.7.3. Serisin Geri Kazanımı için Alternatif Pişirme Tekniği

Konvansiyonel pişirme tekniğinde, sabun ve sodyum karbonat içeren kaynar su dolu kazanda bir kaç saat bekletilen ipek ipliği ağırlığının %25-27'sini kaybetmektedir. Bu kayıp, atıksu ile birlikte atılan serisin miktarına denk gelmektedir. Göreceli olarak yeni olan bir teknikte ise, 120-130 °C sıcaklık ve 300-400 kPa basınç uygulanan kazanlarda su buharı ile serisin uzaklaştırılmaktadır (FABIANI vd., 1996). Bu çalışmada, alternatif pişirme tekniği simüle edilmiş ve serisinin suda çözünürlüğü bulunmuştur. Otoklav içinde 135 °C'de ve yaklaşık 200 kPa basınç altında 3 saat bekletilen ipek ipliğinin ne kadar serisin bıraktığı, deney öncesi ve sonrasında tartılan kuru ağırlıklarının farkından hesaplanmış ve %24 olarak

bulunmuştur. Bu oran, konvansiyonel teknikle elde edilen %25-27'lik orana oldukça yakındır. Serisinin kantitatif analizi ve MA dağılımı da ayrıca yapılmıştır (Tablo 4.31 ve Şekil 4.45).

Tablo 4.31. Simüle edilmiş İPA'nda serisin derişimi ve molekül ağırlığı

Örnek	Serisin Derişimi (mg/L) (İpek ipliğinin yüzdesi, %)		MA (kDa)
	Beklenen	Bulunan	
Alternatif yöntemle pişirilen İPA	2561 (25-27)	3323 (24)	102



Şekil 4.45. Simüle edilen İPA'nun MA kromatogramı

Tablo 4.31'den görüldüğü üzere, beklenen ve elde edilen serisin derişimleri arasında oldukça az bir fark vardır. Ayrıca, simüle edilen teknikle elde edilen MA 102 kDa olmuş, bu da konvansiyonel teknikle elde edilen MA değerine yakın çıkmıştır. Sonuç olarak, ipek ipliği pişirme işleminde sabun kullanımına son vermek için alternatif yöntemin başarıyla uygulanabileceği açıkça görülmektedir. Bu durumda, önerilen ön-arıtma işlemine gerek kalmayacak ve UF doğrudan uygulanabilecektir. Alternatif pişirme tekniği ile ipek ipliği pişirme atıksularının çevresel zararları da minimize edilmiş olacaktır.

4.2. SERİSİNLİ BİYOFİLM HAZIRLANMASI İLE İLGİLİ BULGULAR

4.2.1. Set-1 Filmleri ile İlgili Sonuçlar

4.2.1.1. Su Tutma Oranı

Serisimli filmlerin su tutma kapasitesini belirlemek amacıyla hazırlanan filmlerin su tutma oranları (STO) belirlenmiştir. Tablo 4.32’de görüldüğü üzere, saf PVA filminin (Film 2) nem oranı %8’dir. Gliserol eklenmesi ile bu oran %4’e düşmüştür (Film 3). Filme, S/PVA karışım oranı 20/100 olacak şekilde serisin eklenmesi ile nem oranı %5 olarak elde edilmiştir (Film 4). Bu veriler, karışım yapılmasının, filmin saf PVA’dan yapılmasına kıyasla daha avantajlı olduğunu göstermektedir. Filmlerin, suda bekletildiklerinde çözünmeye başladıkları görülmüştür. PVA ve serisinin suda çözündüğü bilinmektedir. Saf PVA’dan yapılan film, 1 saat sonunda kuru ağırlığının %37’sini kaybetmiştir. Benzer şekilde, %2 oranında gliserol içeren filmde %38 oranında ağırlık kaybı olmuş, 20/100 oranında serisin karıştırılması ile de kayıp %28’e azalmıştır. Karışımdaki serisin miktarının artırılması ile filmin suda bütünlüğünün korunabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, bazı gıda paketlerinin suda yıkama işlemi ile çözünmesi arzu edilen bir durum da olabilir. Meyve ve sebze gibi gıdaların paketlenmesinde kullanılacak bu ürünlerin yıkama sırasında yok olması, ortaya çıkan evsel katı atıkların miktarında azalma sağlayarak çevre kirliliği kontrolüne yardımcı olabilir.

Tablo 4.32. Set-1 filmlerinin nem içerikleri ve su tutma oranları

Film no.	İlk ağırlık, W_i (g)	Kuru ağırlık, W_d (g)	Islak ağırlık, W_w (g)	Islatma sonrası kuru ağırlık, W_{d2} (g)	Nem oranı (%)	STO (%)	Ağırlık kaybı (%)
2	0,0096	0,0089	0,0166	0,0056	8	87	37
3	0,0181	0,0174	0,0520	0,0108	4	199	38
4	0,0164	0,0156	0,0422	0,0113	5	171	28

Su emildiğinde, su molekülleri filmin içine dağılmakta ve filmin şişmesine neden olmaktadır. PVA ve serisinin hidroksil grupları ile serisinin karboksil grupları, filmin oldukça hidrofilik bir yapıya sahip olmasına neden olmaktadır (KIM, 2007). Bu durumda, hazırlanan filmlerin su tutma oranlarının yüksek olması beklenmektedir. Saf PVA’dan yapılan filmin STO’u %87’dir;

bu da Film 2'nin ağırlığının iki katı kadar su tutabildiği anlamına gelmektedir. Filme gliserol eklenmesi ile 3 kat ağırlık artışı olmuştur; yani Film 3'ün STO'ı %199 olmuştur. Gliserole ek olarak serisin eklenmesi ise %171 oranında su tutulmasına neden olmuştur. Görüldüğü üzere, serisin eklenmesi ile fazladan bir artış olmamış; Film 3 için ıslak ağırlığın (W_w) kuru ağırlığa (W_d) oranı 3,0 iken serisiz filmde bu oran 2,7'ye düşmüştür. Bu sonuçlar, KIM (2007) tarafından elde edilen sonuçlara oldukça yakındır. Gluteraldehit ile çapraz bağlanan S/PVA membranlarında, serisin miktarının %1,34'ten %30,3'e çıkarılması ile su tutma oranı %114'ten %144'e yükselmiştir. Bahsedilen çalışmada saf PVA membranının su tutma oranı ise %106 olarak rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, PVA'ya eklenen serisin miktarının su tutma derecesini fazla etkilemediğini göstermektedir.

4.2.1.2. Nem Tutma Oranı

Gıda ürünlerinin öngörülen raf ömürlerini koruyabilmek için gıda paketleme malzemelerinin nemi geçirmemesi beklenmektedir. Bu nedenle, hazırlanan filmlerin nem tutma oranı (NTO) bakımından özellikleri belirlenmiştir. Tablo 4.33-4.36'da neme maruz bırakılan filmlerin ağırlıkları ve NTO'ları verilmiştir. Filmlerin tutulan nemi ne kadar hızlı bırakabildikleri de tespit edilmiş ve nem bırakma oranları (NBO) hesaplanmıştır (Tablo 4.37-4.38). Bunun için %86 bağıl neme (BN) maruz bırakılan filmler oda koşullarında (%50-60 BN) bekletilmiş ve tartılmıştır.

Tablo 4.33-4.34'te görüldüğü üzere, %5 BN değerinde ısıtma işlemi görmemiş olan saf PVA filminin nem tutma oranı 2 saatte %1,6'dan %4,2'ye çıkmış ve sabit kalmıştır. Benzer şekilde, ısıtılan PVA filminde 3 saatlik sürede NTO % 4,5 olmuş, ancak 24 saat sonunda %2,3'e düşmüştür. Bu azalmanın deneysel hata olduğu düşünülmektedir. Gliserol eklenen Film 3'te ise %55 BN'de nem tutulmamıştır. S/PVA karışımının 20/100 ve 40/100 olduğu filmlerde 20 dakika sonunda NTO değeri %2,7-3,0 olarak gerçekleşmiş, bekletme süresi 24 saat olduğunda da %2,3-2,4 olmuştur. S/PVA karışım oranı 60/100'e çıkarıldığında ise, NTO %1,1'e düşmüştür.

Tablo 4.33. Film ağırlıklarının zamanla artışı (%55 BN)

Film no.	W_d (t=0 sa)	W_1 (t=0,3 sa)	W_2 (t=1 sa)	W_3 (t=2 sa)	W_4 (t=3 sa)	W_5 (t=7 sa)	W_6 (t=24 sa)
1	0,0310	0,0315	0,0320	0,0323	0,0323	0,0324	0,0323
2	0,0177	0,0179	0,0184	0,0182	0,0185	0,0178	0,0181
3	0,0254	0,0250	0,0254	0,0253	0,0252	0,0255	0,0252
4	0,0222	0,0228	0,0232	0,0230	0,0224	0,0230	0,0227
5	0,0329	0,0339	0,0341	0,0340	0,0338	0,0338	0,0337
6	0,0448	0,0453	0,0455	0,0453	0,0453	0,0454	0,0453

Tablo 4.34. Filmlerin nem tutma oranları (%55 BN)

Film no.	NTO (%)					
	t=0,3 sa	t=1 sa	t=2 sa	t=3 sa	t=7 sa	t=24 sa
1	1,6	3,2	4,2	4,2	4,5	4,2
2	1,1	4,0	2,8	4,5	0,6	2,3
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
4	2,7	4,5	3,6	0,9	3,6	2,3
5	3,0	3,6	3,3	2,7	2,7	2,4
6	1,1	1,6	1,1	1,1	1,3	1,1

Bağıl nem oranının %55'ten %86'ya çıkarılması ile nem tutmada belirgin bir etki gözlenmiştir. Tablo 4.35 ve 4.36'da görüldüğü üzere, ısıtma işlemi görmemiş saf PVA filminin NTO'ı %4,2'den %9,4'e çıkmıştır. Benzer olarak, ısıtılan filmde %2,3'ten %5,1'e artış olmuştur (Film 2). S/PVA karışım oranı 20/100 ve 40/100 olan Film 4 ve 5'te ise BN'nin %55'ten %86'ya çıkarılması ile 33 dakika sonunda NTO %2,3-2,4'ten %10,8-10,3'e yükselmiştir. Karışım oranı 60/100 olduğunda ise %86 BN'de en yüksek NTO olan %13,4 elde edilmiştir. Bu sonuçlar, bağıl nemin yüksek olmadığı durumlarda serisin eklenmesi ile filmin nem tutma kapasitesinin artmadığını, ancak bağıl nemin %86'ya çıkarıldığı durumda serisli filmlerin nem tutma kapasitelerinin arttığını göstermektedir. Bu sonuçlar, yüksek nem içeren yerlerde serisli filmlerin gıda paketlenme malzemesi olarak kullanılmaya uygun olmayacağına işaret etmektedir.

Tablo 4.35. Film ağırlıklarının zamanla artışı (%86 BN)

Film no.	W_1	W_2	W_3	W_4	W_5
	(t=0,6 sa)	(t=1 sa)	(t=2 sa)	(t=3 sa)	(t=7 sa)
1	0,0340	0,0346	0,0343	0,0343	0,0339
2	0,0188	0,0188	0,0190	0,0186	0,0186
3	0,0266	0,0263	0,0263	0,0263	0,0261
4	0,0244	0,0238	0,0237	0,0242	0,0246
5	0,0363	0,0357	0,0365	0,0352	0,0363
6	0,0493	0,0482	0,0505	0,0506	0,0508

Tablo 4.36. Filmlerin nem tutma oranları (%86 BN)

Film no.	NTO (%)				
	t=0,6 sa	t=1 sa	t=2 sa	t=3 sa	t=7 sa
1	9,7	11,6	10,6	10,6	9,4
2	6,2	6,2	7,3	5,1	5,1
3	4,7	3,5	3,5	3,5	2,8
4	9,9	7,2	6,8	9,0	10,8
5	10,3	8,5	10,9	7,0	10,3
6	10,0	7,6	12,7	12,9	13,4

Filmlerin oldukça hızlı bir şekilde nemi tuttıkları ve bıraktıkları gözlenmiştir. Tablo 4.38'de görüldüğü üzere, saf PVA (Film 1-2) ve gliserollü yapılan (Film 3) filmlerin 5. dakika ile 15. dakikadaki nem bırakma oranları aynıdır. Serisin içeren filmlerde ise, tutulan nemin tamamı 15 dakikada bırakılmıştır.

Tablo 4.37. Film ağırlıklarının zamanla azalması

Film no.	W_0	W_1	W_2	W_3
	(t=0 dak) (BN=%86)	(t=5 dak) (BN=%50-60)	(t=10 dak) (BN=%50-60)	(t=15 dak) (BN=%50-60)
1	0,0339	0,0333	0,0332	0,0333
2	0,0186	0,0183	0,0182	0,0183
3	0,0261	0,0253	0,0255	0,0252
4	0,0246	0,0233	0,0227	0,0226
5	0,0363	0,0350	0,0338	0,0338
6	0,0508	0,0481	0,0465	0,0457

Tablo 4.38. Filmlerin nem bırakma oranları (NBO)

Film no.	NBO (%)		
	t=5 dak	t=10 dak	t=15 dak
1	1,8	2,1	1,8
2	1,6	2,2	1,6
3	3,1	2,3	3,4
4	5,3	7,7	8,1
5	3,6	6,9	6,9
6	5,3	8,5	10,0

4.2.2. Set-2 Filmleri ile İlgili Sonuçlar

4.2.2.1. Oksijen Geçirgenliği

Filmlerin oksijen geçirgenliklerini ölçmek için ilk olarak serisin içermeyen filmler kullanılmıştır. Aynı özelliklerde birden fazla dökülen filmler '1-1' ve '1-2' şeklinde etiketlenmiş, aynı filmde kesilen farklı parçalar ise 'A' ve 'B' ile işaretlenmiştir. Isıtmaya ek olarak metanol ile temas ettirilen filmlerin isimlerine ise 'a' eklenmiştir. Her film, test düzeneğinin bir parçası olan hücre içine yerleştirilmiş, hücreye üstten bağlı olan oksijen tüpü açılmış ve 45-55 psi arasında bir basınç uygulanmıştır. Ancak serisin içermeyen filmlerden gaz geçmediği farkedilmiştir (Tablo 4.39). Filmlerin gaz geçirimsiz olabilecekleri düşünülerek geçirimsizlik

testi yapılmıştır. Bunun için, film üzerindeki basıncın sabitlendiği andan başlayarak belirli zaman aralıklarında basınç değeri kaydedilmiştir. Filmler bu koşullarda 20-24 saat bekletilmiş ve deney sonunda basınç son kez okunmuştur. Bu deney için sistemdeki bağlantıların gaz kaçırmadığından emin olunmuştur. Daha sonra filmlerin geçirim (permeance) değerleri hesaplanmıştır. Geçirim, birim zamanda birim film yüzeyinden geçen gaz miktarının, filmin iki tarafındaki gaz basınçlarının farkına bölünmesi ile bulunmaktadır. Geçirim birimi $1 \text{ mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{sn} \cdot \text{Pa})$ 'dır.

Tablo 4.39. Serisinsiz filmlerin oksijen geçirim değerleri

Film no.	Test süresi (dak)	Basınç düşmesi (%)	Geçirim ($\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{sn} \cdot \text{Pa})$)
1-1	1093	5,1	$5,1 \times 10^{-17}$
1-2	1442	8,3	$6,6 \times 10^{-17}$
2-1	1455	9,9	$8,0 \times 10^{-17}$
2-2	1072	18,5	$21,3 \times 10^{-17}$
3-1	1120	6,3	$6,3 \times 10^{-17}$
3-2	1410	7,0	$5,7 \times 10^{-17}$

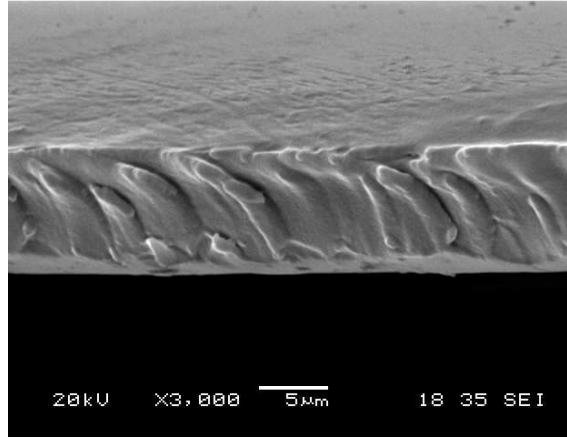
Tablo 4.40'tan görüldüğü üzere, gliserinsiz ve gliserinli PVA filmlerin geçirimleri oldukça düşüktür. Bu filmler oksijen geçirimsiz olarak kabul edilebilir. Bu sonuçlar, PVA'nın gıda paketlenme malzemesi hazırlamak için uygun bir polimer olduğunu ve plastikleştirici olarak gliserol eklenmesinin oksijen geçirimsizliğine olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Serisin içeren filmlerin ise bol miktarda oksijen geçirdikleri gözlenmiş, bu nedenle geçirimsizlik testi yapmak yerine filmlerin oksijen geçirgenlikleri (permeability) ölçülmüştür (Tablo 3.40). Burada oksijen geçirgenliği, birim kalınlıktaki filmin geçirimi olarak, geçirim ile film kalınlığının çarpımından hesaplanmaktadır. Tablo 3.40'tan görüldüğü üzere, S/PVA karışım oranı 10/100 olduğunda oksijen geçirgenliği oldukça yüksek çıkmış ve mevcut düzenerle okunamamıştır. Aynı özelliklerde hazırlanan fakat metanole temas ettirilen diğer filmlerde (Film 4-4a, Film4-6a-A ve 4-6a-B) ise oksijen geçirgenliği okunabilir seviyelere inmiş olmakla birlikte, oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Tablodan görüldüğü gibi, filmlerdeki serisin miktarı ile oksijen geçirgenliği arasında bir ilişki kurulamamıştır. Aynı özelliklere sahip Film 5-1 ve 5-2'den birincisinin oksijen geçirgenliği 757 Barrer iken, ikincisi oksijen geçirimsizdir. Geri kazanılan serisin ile hazırlanan Film 8'de de benzer sonuç elde edilmiş, aynı filmin bir parçası (8-1-A) geçirgen iken, diğer parçası (8-1-B) geçirimsiz çıkmıştır. Bu veriler, hazırlanan filmlerin homojen olmadığına işaret etmektedir.

Tablo 4.40. Serisinli filmlerin oksijen geçirgenlikleri

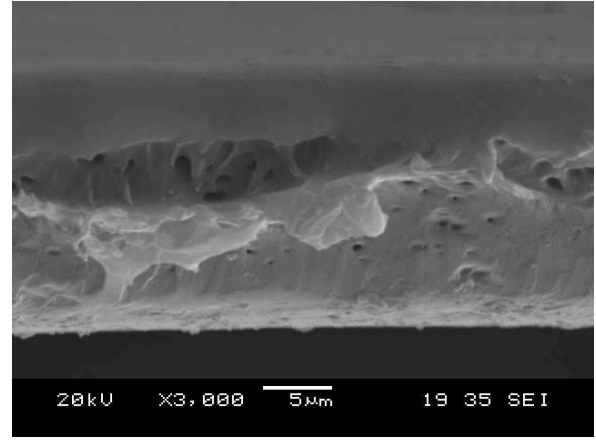
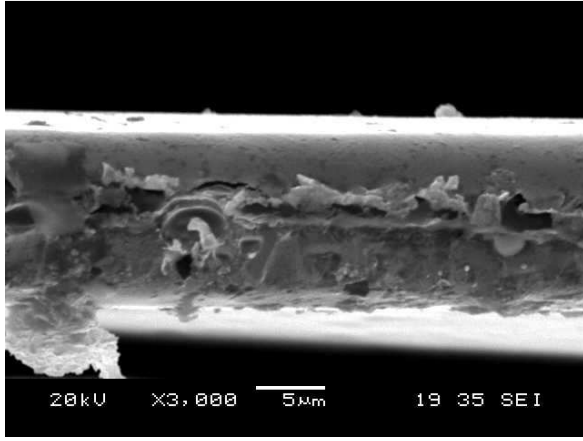
Film no.*	Serisin/PVA	Geçirgenlik Barrer ((cm ³ .cm)/(sn.cm ² .cmHg) x10 ⁻¹⁰)
4-1	10/100	çok yüksek (okunamadı)
4-2		çok yüksek (okunamadı)
4-4a	10/100	1258 ± 61
4-6a-A		11343 ± 1371
4-6a-B		151400 ± 19425
5-1	1/100	757 ± 100
5-2		geçirimsiz
5-3a-A	1/100	geçirimsiz
5-3a-B		geçirimsiz
6-3	2/100	6253 ± 553
6-4		geçirimsiz
7-1	5/100	3258 ± 93
8-1-A	5/100	1371 ± 88
8-1-B		geçirimsiz

* a ile gösterilen filmler ısıtmaya ek olarak metanolle temas ettirilmiştir.
A ve B ise aynı filmde kesilen iki ayrı parçayı göstermektedir.

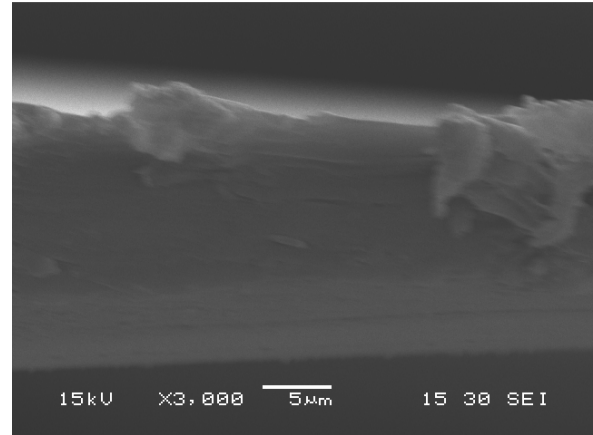
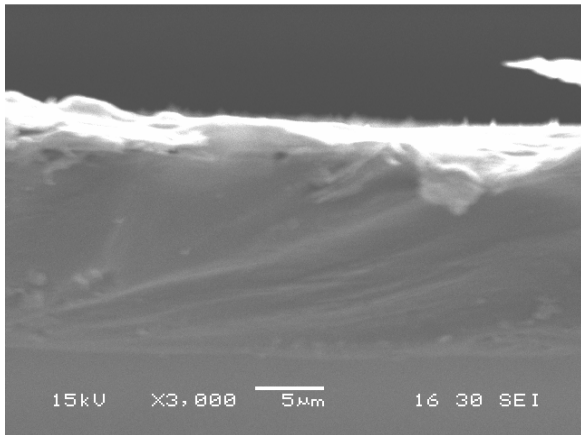
Oksijen geçirgenliklerindeki tutarsız sonuçları daha iyi yorumlayabilmek amacıyla filmlerin kesitleri alınarak SEM fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.46-4.51). Şekil 4.46'da PVA'dan yapılmış Film 1-1 görülmektedir. Bu film gözeneksiz, yoğun ve simetrik bir yapıya sahiptir. Bu görüntü, PVA'dan yapılan filmlerin oksijen geçirimsiz bulunmuş olmaları sonucu ile oldukça uyumludur. Şekil 4.47 ile 4.51 arasındakiler, serisin içeren filmlere aittir. Serisin eklendiğinde film kesitinde meydana gelen gözenekler açıkça görülmektedir. Bu gözeneklerin film kesiti boyunca düzenli olmadığı da tespit edilmiştir. Bu durum, oksijen geçirgenliği verilerindeki tutarsızlıkları açıklamaktadır. Serisin, PVA ile karıştırıldığında ortaya çıkan filmler oksijene oldukça geçirgen hale gelmiştir. Bu sonucun bir kaç nedeni olabilir; 1. Serisinin moleküler yapısı nedeniyle oksijeni geçirmesi, 2. Çapraz bağlanma sağlanamamış olması, 3. Film dökme yönteminin uygun olmaması, vb. Çalışmanın bu aşamasında serisinin, uygulanan koşullar altında gıda paketlenme malzemesi olmaya uygun olmadığı söylenebilir. Serisinin, oksijen geçirgenliğinin gerekli veya önemsiz olduğu başka alanlarda kullanılması daha uygun görünmektedir.



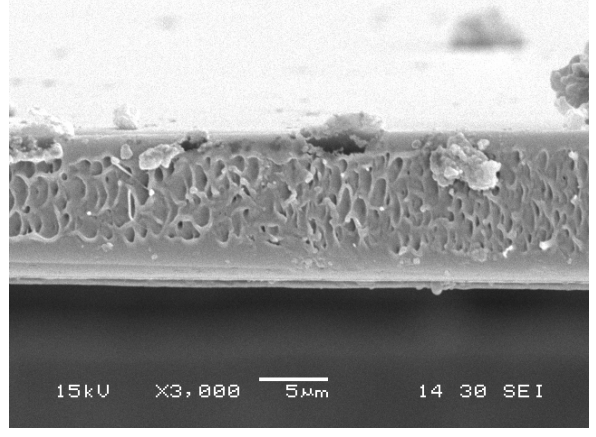
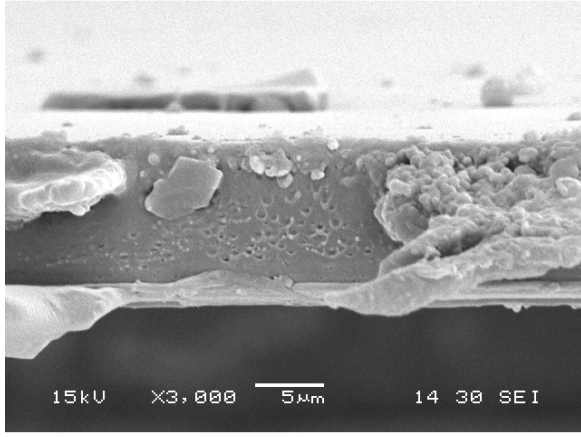
Şekil 4.46. Film 1-1 kesiti (PVA)



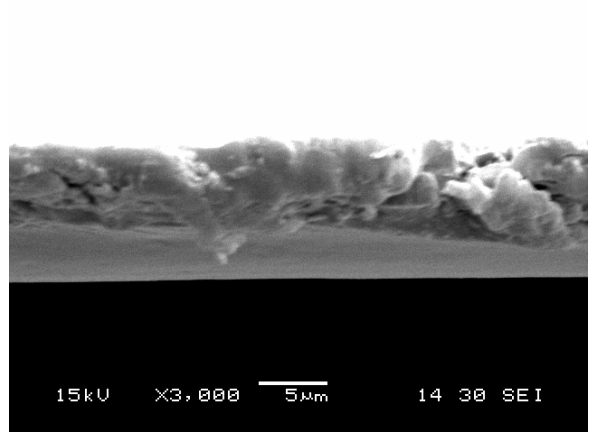
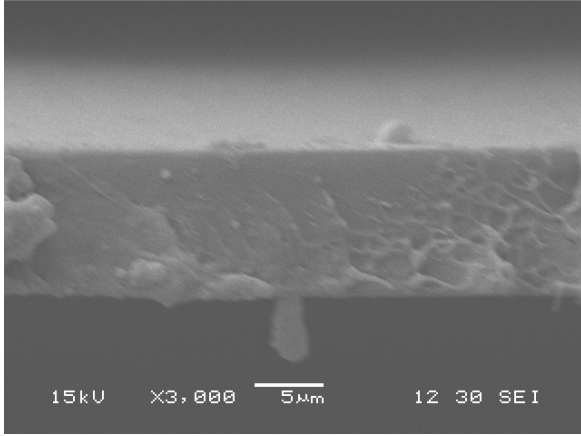
Şekil 4.47. Film 4-1 ve 4-4a kesitleri (Serisin/PVA = 10/100)



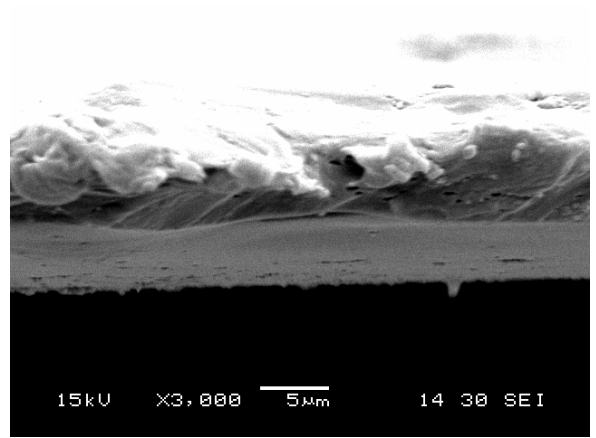
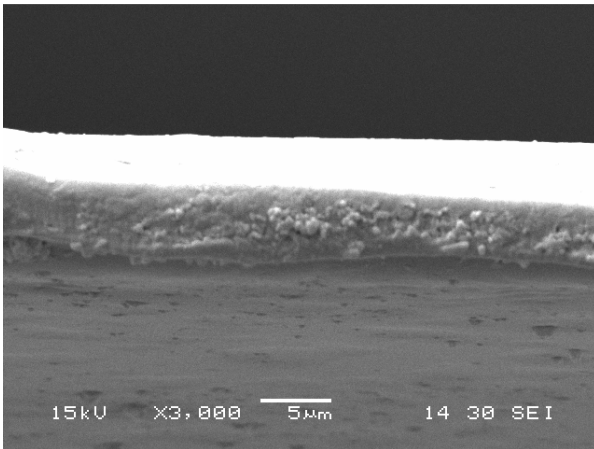
Şekil 4.48. Film 5-1 ve 5-2 kesitleri (Serisin/PVA = 1/100)



Şekil 4.49. Film 6-4 kesitleri (Serisin/PVA = 2/100)



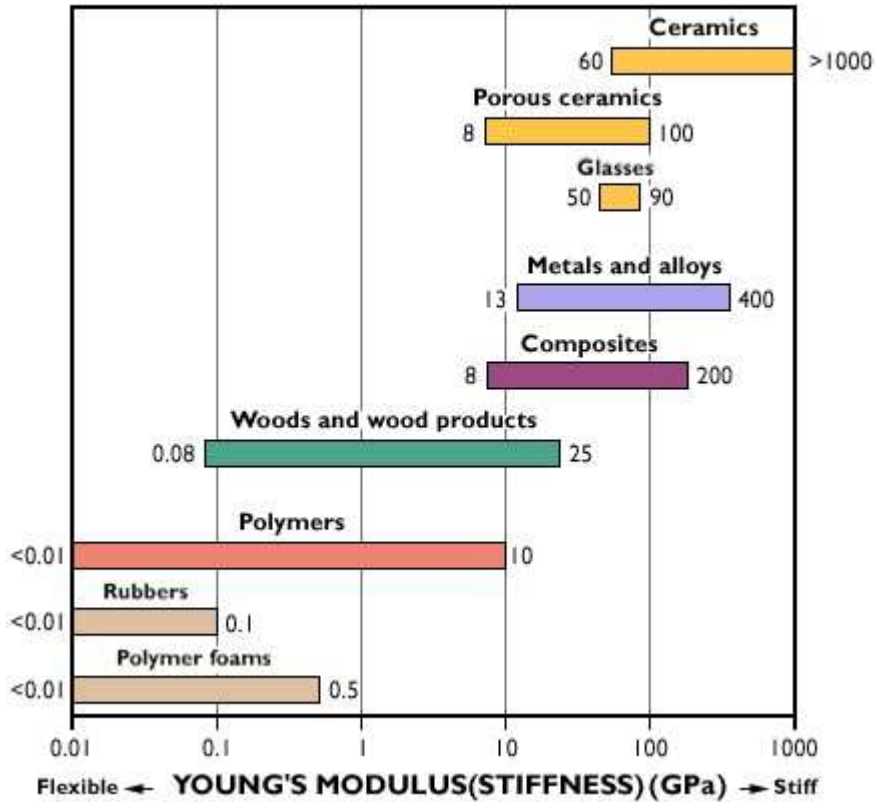
Şekil 4.50. Film 7-1 ve 7-2 kesitleri (Serisin/PVA = 5/100)



Şekil 4.51. Film 8-1-A ve 8-1-B kesitleri (Geri kazanılmış serisin/PVA = 5/100)

4.2.2.2. Mekanik Özellikler

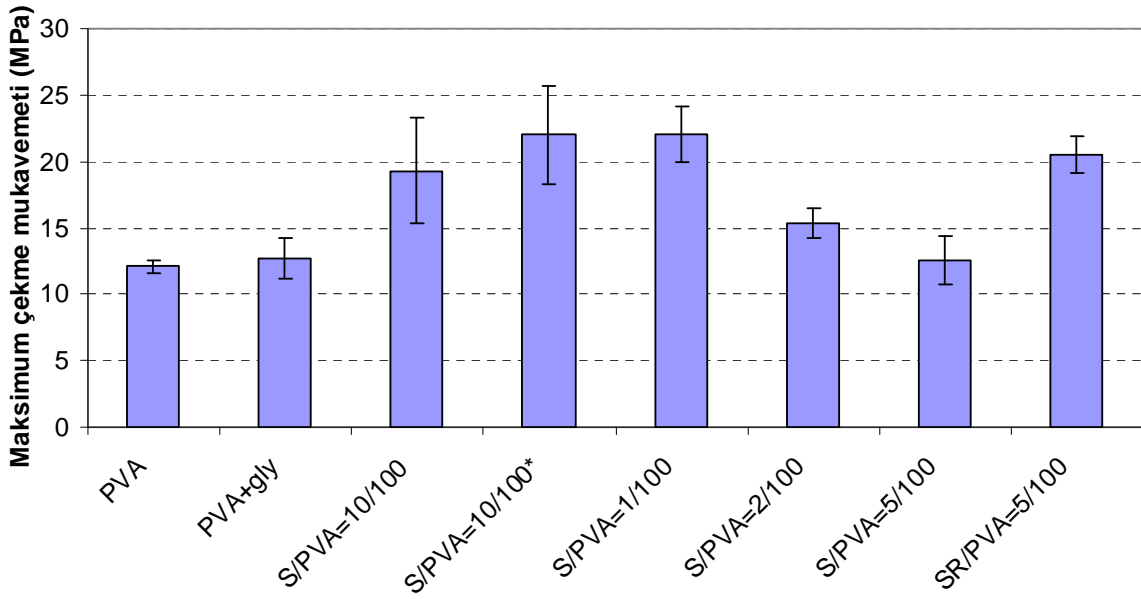
Serisinin iyi bir biyofilm malzemesi olup olmadığı sonucuna varabilmek için serisinin ile hazırlanan filmlerin mekanik özellikleri belirlenmiştir. Şekil 4.52-54'te serisiz ve serisiz filmlerin maksimum çekme mukavemeti (MÇM), elastisite (Young) modülü ve kopma noktasındaki birim uzama yüzdeleri verilmiştir. Maksimum çekme mukavemeti, bir filmde basit çekme deneyi sırasında oluşan maksimum gerilmeyi ifade etmektedir. MÇM, film bütünlüğünün bir ölçüsü olarak kullanılmakta ve filmlerin zor koşullarda kullanılabilme potansiyelini göstermektedir. Kopma anındaki birim uzama ise filmin esneme özelliğini göstermektedir. Elastisite modülü, basit çekme deneyinde elastik deformasyondaki normal gerilme ile birim uzama arasındaki doğrusal ilişki sabitidir ve birim uzama başına gerilme olarak tanımlanmaktadır (WIKIPEDIA, 2008). Elastisite modülü, filmin bükülmezliğini ve sağlamlığını ifade etmektedir. Yük altındaki bir malzemenin elastik deformasyona karşı gösterdiği direnci ölçmektedir. Şekil 4.52'de çeşitli malzemelerin elastisite modülleri gösterilmektedir.



Şekil 4.52. Çeşitli malzemelerin elastisite (Young) modülleri

(<http://www-materials.eng.cam.ac.uk/mpsite/properties/non-IE/stiffness.html>)

Filmlerin maksimum çekme mukavemeti Şekil 4.53'te verilmiştir. Görüldüğü üzere, plastikleştiricinin MÇM üzerinde belirgin bir etkisi olmamıştır. Serisin eklenmesi ise, saf PVA'dan yapılan filmin MÇM'inde artışa neden olmuştur. En yüksek mukavemet, S/PVA=1/100 filminde 22 MPa olarak elde edilmiştir. Geri kazanılmış serisinden yapılan (SR/PVA=5/100) film ile en yüksek oranda serisin içeren (S/PVA=10/100) filminin MÇM değerleri de 20,5 ve 19,3 MPa olarak bulunmuştur. Ayrıca metanol ile temas ettirilen filmin MÇM'i de 20 MPa'dır. Bu değerler, saf PVA'dan yapılan filmin MÇM'ne göre %60-82 daha fazladır. Ancak serisinin 1/100'den daha yüksek oranlarda karıştırıldığı filmlerde MÇM daha yüksek olmamış, aksine serisin oranı 2/100 ve 5/100'e çıkarıldığında MÇM'inde azalma meydana gelmiştir. Buna rağmen, serisiz filmlerin hepsinde MÇM artmıştır. Bu durumda, meydana gelen artışın serisin miktarı ile doğrudan ilişkili olmadığı, ancak serisinin MÇM üzerinde olumlu etkisi olduğu söylenebilir. Belirli bir eğilim gözlenememesi, filmlerin homojen yapıda olmayabileceğinden kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 4.53. Filmlerin maksimum çekme mukavemetinin karşılaştırılması

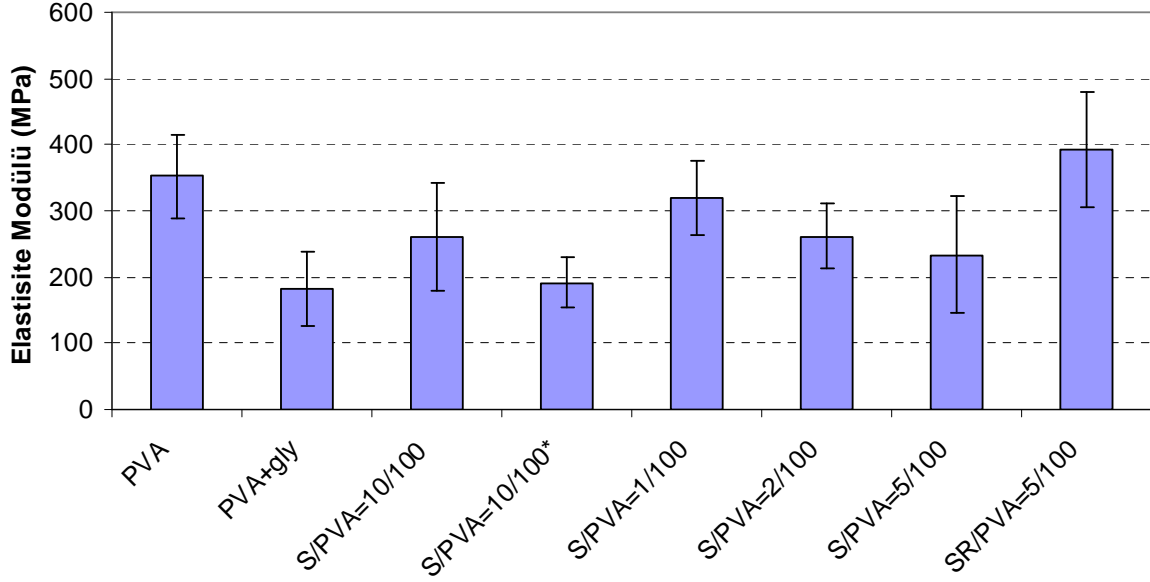
Serisiz filmler için elde edilen MÇM değerleri, sentetik olarak üretilen LDPE (low density polypropylene) ve HDPE (high density polypropylene) filmleri için rapor edilen 16 ve 28 MPa değerleri arasındadır (GARCIA vd., 2006). BETUL vd. (2003) tarafından yürütülen bir çalışmada ise, gıda paketlenme malzemesi olarak buğday gluteni ve ksilan karışımları ile yapılan filmler karakterize edilmiş ve filmlerin maksimum çekme mukavemeti farklı karışım oranları için pH 11'de 5-9 MPa olarak bulunmuştur. AUDIC vd. (2005) ise yine paketlenmeye

yönelik çevre dostu filmler üretmek amacıyla sodyum kaseinat (NaCAS) proteini ve plastikleştirici olarak gliserol kullanmıştır. Hazırlanan filmin MÇM'i 2,5 MPa olarak bulunmuştur. Bu değerler, serisin ve PVA karışımından yapılan filmlerin maksimum çekme mukavemetine göre çok daha azdır. Protein içeren filmlerin, sentetik polimere kıyasla genelde daha zayıf mekanik özelliklere sahip oldukları bilinmekle birlikte, serisli filmlerin çekme mukavemetinin, paketlenme malzemesi olarak kabul edilebilir seviyede olduğu anlaşılmıştır.

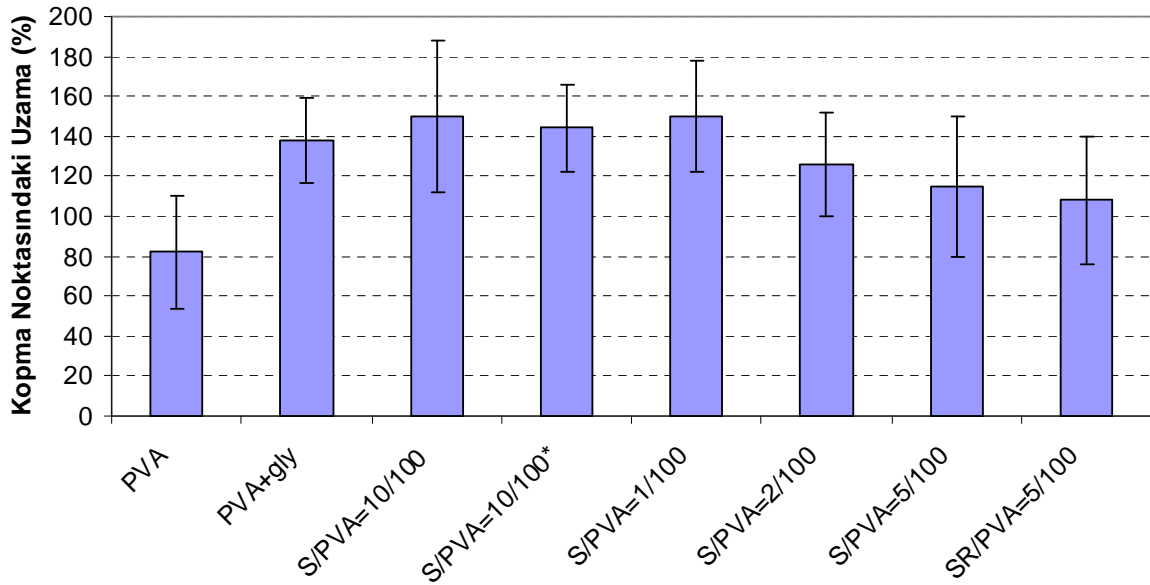
Elastisite modülünün en yüksek olduğu filmler ise Şekil 4.54'ten görüldüğü üzere, saf PVA ve geri kazanılmış serisin ile yapılan (SR/PVA=5/100) filmlerdir. Bu filmlerin elastisite modülleri sırasıyla 352 MPa ve 392 MPa olarak bulunmuştur. Bu değerler, polimer köpüklerin elastisite modülleri için rapor edilen 0,01-0,5 GPa değerleri arasındadır (Şekil 4.52). Saf PVA filmine plastikleştirici olarak gliserol eklendiğinde ise elastisite modülü 182 MPa'a düşmüş, plastikleştiriciye ek olarak serisin eklendiğinde ise yeniden artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar, plastikleştiricinin malzeme sağlamlığını olumsuz etkilediğini göstermektedir. AUDIC VD. (2005), protein olarak NaCAS ve plastikleştirici olarak gliserol kullandıkları filmlerde, elastisite modülünü %53 bağıl nem ortamında yaklaşık 25 MPa bulmuşlardır. BETÜL VD. (2003) ise, oda sıcaklığında kurutulmuş buğday glütenu ve ksilan karışımını filmlerde elastisite modülünü 150 MPa olarak bulmuştur. Serisin içeren diğer filmlerin (1/100-10/100) elastisite modülleri ise 234-319 MPa arasında değişmiş ve filmlerdeki S/PVA oranı arttıkça elastisite modülünde genel olarak azalma meydana gelmiştir. S/PVA oranı 10/100 olan filmin elastisite modülü 261 MPa olarak bulunmuş; filmin kurutma ve ısıtmaya ek olarak metanol ile temas ettirilmesi sonucunda elde edilen filmde ise bu değer 185 MPa'a düşmüştür. Dolayısıyla, metanolün elastisite modülünde %29 oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, bütün filmlerin esnek olduğunu, filmlere plastikleştirici ve protein eklendiğinde ise daha da esneklik kazandıklarını göstermektedir. Paketleme sektörüne yönelik hazırlanan filmlerin esnek olmaları beklendiğinden, plastikleştirici eklenmiştir. Bu nedenle, elde edilen bulgular şaşırtıcı olmamıştır.

Hazırlanan filmlerin kopma noktasındaki uzama miktarları ise Şekil 4.55'te verilmiştir. Görüldüğü üzere, saf PVA filmi kopma noktasında %80 uzama göstermiştir. Plastikleştirici eklenmiş filmde ise bu oran beklendiği üzere artmış ve %140 olarak belirlenmiştir. Serisin içeren filmlerin hepsi, saf PVA filmine göre daha fazla uzamış olmakla birlikte bunun daha çok gliserolden kaynaklandığı farkedilmiştir. Filmlerdeki serisin miktarı değişiminin, uzama miktarını fazla etkilemediği de anlaşılmıştır. Bütün bulgular değerlendirildiğinde, serisin ve

PVA karışimli filmlerin, paketlenme malzemesi olarak kullanılmaya mekanik özellikleri bakımından uygun oldukları anlaşılmıştır.



Şekil 4.54. Filmlerin elastisite modüllerinin karşılaştırılması



Şekil 4.55. Filmlerin kopma noktasındaki uzama miktarlarının karşılaştırılması

4.3. YANIK ÖRTÜSÜ OLARAK HAZIRLANAN SERİSİN-KOLLAJEN MEMBRANLAR İLE İLGİLİ SONUÇLAR

4.3.1. Yanık Örtüsü Olarak Kullanılmak Üzere Hazırlanan Serisin-Kollajen Membranların Kalınlık ve Uygulanabilirlik Yönünden Değerlendirilmesi

Yapılan deneylerde kollajen ve kollajen-serisin ince membran hazırlanması için teflon yüzeyinin en uygun yüzey olduğu belirlenmiştir. Dökme yöntemiyle hazırlanan membranlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra aynı kap içerisinde % 3'lük glutaraldehit çözeltisiyle çapraz bağlanmıştır. İnce membran kalınlıkları 10-13 µm, daha kalın dökülen membran kalınlıklarının da 17-34 µm kalınlık aralığında olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.41). İnce membranlar çok kolay statik elektriklenebilen bir yapıya sahip oldukları ve kolaylıkla kendi üstüne katlanabildikleri için kolay uygulanabilir olmadıkları sonucuna varılmıştır. Kalın 4X kollajen grubunun tüm gruplar arasında en kalın olduğu gözlenmiştir. Kollajen-serisin membranlara göre kollajen membranın daha kalın olmasının, çapraz bağlama aşamasında protein kaybının çok az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İnce membranlarda bu farklılık gözlenmemiştir. Bu sonucun İnce membran kalınlık ölçümlerinde membran kalınlığının çok az olması ve örneğin kolay tutulamaması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Fiziksel özellikler yönünden değerlendirildiğinde yara örtüsü olarak kalın membranların hem daha kolay uygulanabilen hem de deriye daha yakın kalınlıkta bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.

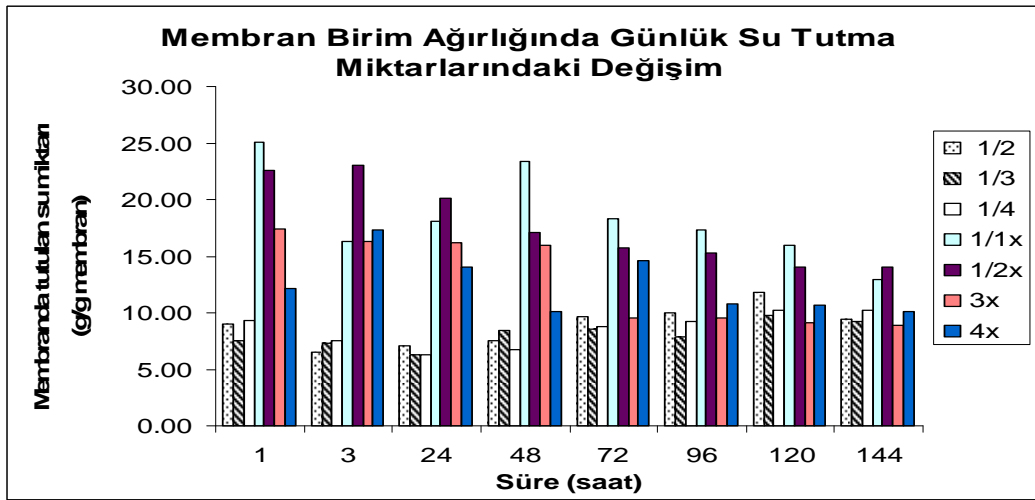
Tablo 4.41. Hazırlanan kollajen ve kollajen-serisin membranların kalınlıkları

	İnce Membran (mm)	Kalın Membran (mm)
1/1x	0,010 ± 0,001	0,017± 0,001
1/2x	0,012 ± 0,002	0,024± 0,001
2/1x	0,013 ± 0,001	0,019± 0,001
4x	0,010 ± 0,001	0,034± 0,003

4.3.2. Membranların Yanık Örtüsü Olarak Özelliklerinin Değerlendirilmesi

4.3.2.1. Membranların Su Tutma Özelliklerinin Değerlendirilmesi

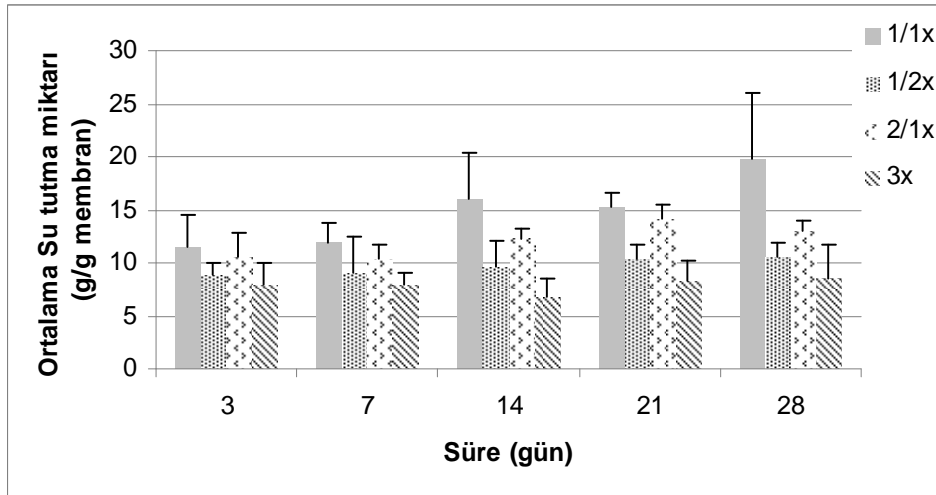
Yanık örtüsü olarak kullanılacak malzemenin su tutma kapasitesinin yüksek olması, kaybedilen suyun dokuya tekrar uzun süre sağlanması açısından gerekli bir özelliktir. Bu nedenle hazırlanan membranların su tutma kapasiteleri araştırılmıştır. Membranların birim ağırlığı ile normalize edilerek, günlük su miktarları Şekil 4.56'da sunulmuştur. Günlük ve toplam su tutma miktarlarının çarpaz bağlanan membran gruplarında daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Böylece çarpaz bağlama ile hidrojel özelliğindeki iki proteinin de yapıda tutulmasının sağlandığı ve su tutma kapasitesinin de artırıldığı görülmüştür. Çarpaz bağlanmayan gruplarda serisin oranı arttıkça su tutma miktarında bir değişim gözlenmemesi, serisinin bağlanmadığında hızla çözünerek yapıdan uzaklaşması ile açıklanmaktadır. Çarpaz bağlanan gruplarda ise serisinin beklenen etkisi gözlenmiş (1/1x ve 1/2x) ve yapıda tutulan bu protein, membranın sadece kollajen içeren gruplardan (3x ve 4x) daha yüksek su tutulmasını sağlamıştır (Şekil 4.56). Çarpaz bağlanmamış kollajen ve kollajen-serisin membranların su içinde bekletildiklerinde yapısal bütünlüklerini uzun süre koruyamadığı gözlenmiştir. Bu nedenle daha sonraki tüm çalışmalarda glutaraldehit ile çarpaz bağlanmış membranlar kullanılmıştır.



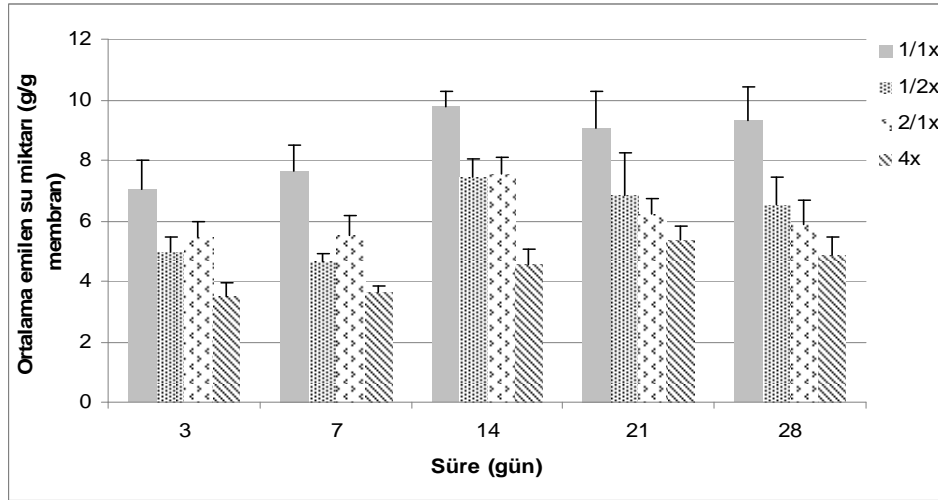
Şekil 4.56. Birim membran ağırlığında günlük su tutma miktarlarının karşılaştırılması

Çarpaz bağlanmış ince ve kalın membranlarının su tutma oranları 28 gün boyunca incelenmiştir (Şekil 4.57 ve 4.58). İnce ve kalın membranların toplam su tutma miktarlarının

zamana bağılı olarak arttığı gözlenmiştir. Tüm gruplarda ince membranların birim ağırlık bazında kalın membranlardan daha yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu sayısal farklılığının deneysel hatalardan kaynaklanabileceği gibi (ince membranlar çok kolay yırtılabilen ve katlanabilen yapıda olması nedeniyle) ince yapıdaki membranda yüzey hacim oranının azalması ile suyla reaksiyona girebilecek grup sayısının artması ile ilgili olabileceği de düşünülmektedir. Hazırlanan tüm ince ve kalın membran gruplarında 28 günün sonunda en yüksek toplam su tutma oranları kollajen-serisin 1/1 gruplarında ($19,88 \pm 6,24$ ve $9,30 \pm 1,13$ g/g membran), en düşük tutma oranı ise kollajen membranlarda ($8,43 \pm 3,20$ ve $4,84 \pm 0,62$ g/g membran) gözlenmiştir. 1/2 ve 2/1 kollajen-serisin membranlarının su tutma kapasitelerinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Kollajen ile serisin karıştırıldığında membranların su tutma kapasitelerinde istatistiksel anlamlı bir artış görülmüştür. Bu sonuçlarla serisinli membranların yaradaki iltihap sıvısını (pus-irin) daha etkin olarak emme kapasitesi olduğu düşünülmektedir.



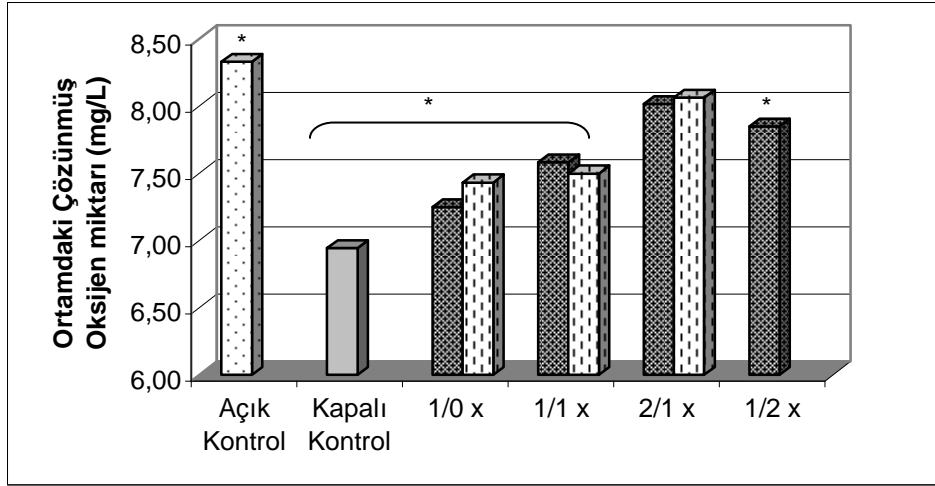
Şekil 4.57. Çapraz bağlanmış ince membranlarda birim membran ağırlığında günlük su tutma miktarlarının karşılaştırılması



Şekil 4.58. Kalın membranlarda birim membran ağırlığında toplam su tutma miktarlarının karşılaştırılması

4.3.2.2. Kollajen-Serisin Membranların Oksijen Geçirgenliği Özelliğinin Değerlendirilmesi

Oksijen geçirgenliği, yara-yanık örtüsü olarak hazırlanan membranların önemli bir özelliğidir. Hasarlı dokunun iyileşmesi yeterli miktarda oksijen almasına bağlıdır. Bu nedenle yara örtüsü olacak malzemenin oksijen geçirgenliğinin yüksek olması, uygulamada başarısını artıracak, istenen bir özelliktir. Şekil 4.59'da görüldüğü gibi membranların hepsinde oksijen geçirgenliği değerleri kapalı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksektir ($p < 0.05$) (Şekilde sadece açık kontrolden istatistiksel olarak farklı olan gruplar işaretlenmiştir). Benzer olarak açık kontrol ile membran örnekleri arasında yine istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Ancak yara bölgesinin mutlaka koruyucu bir malzeme ile kapatılması gerekliliği ve koruyucu amaçla kullanılan bir örtünün açık kontrole tamamen aynı miktarda oksijen almasının mümkün olmayacağı bilinmektedir. Bununla birlikte, 2/1x kollajen-serisin oranındaki ince ve kalın membranlarda açık kontrole yakın değerler elde edildiği, bu yüzden bu membranların açık kontrolden istatistiksel farklılığı olmadığı görülmüştür. Genel olarak değerlendirildiğinde, membranların hepsinin oksijen geçirgenliğinin yara-yanık örtüsü amacına uygun olduğu düşünülmektedir. Yine de geliştirilen membranın, özellikle yüksek oksijen geçirgenliği hedeflenen bir uygulamasında, 2/1x veya 1/2x kollajen-serisin membranlarının daha olumlu sonuç vereceği düşünülmüştür.

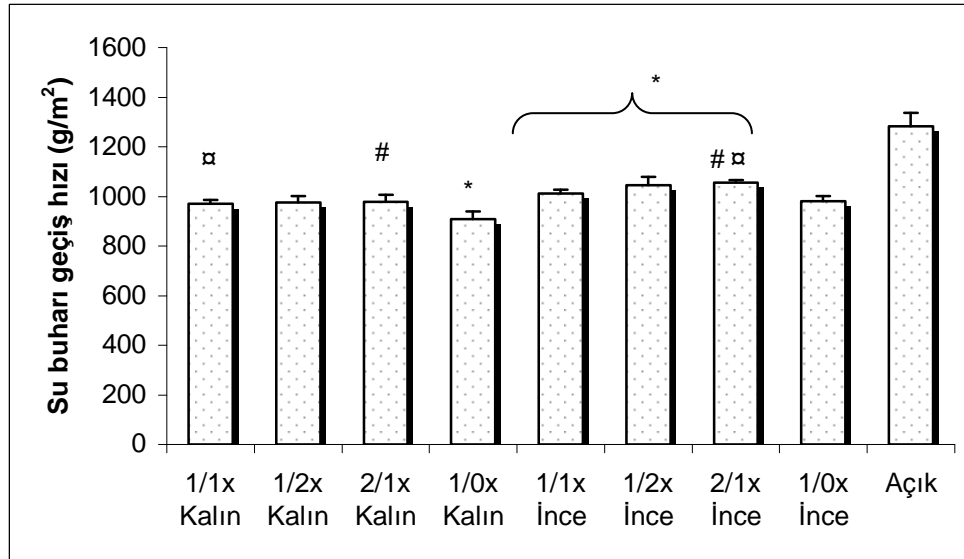


Şekil 4.59. İnce ve kalın membranların oksijen geçirgenliğinin kapalı ve açık kontrolle karşılaştırılması (ikili bar grafiklerinde soldaki örnek kalın membrana, sağdaki örnek ise ince membrana ait sonucu göstermektedir)

4.3.2.3. Kollajen-Serisin Membranların Su Buharı Geçirgenliğinin Değerlendirilmesi

Yara-yanıkda hasarlı dokunun iyileşmesi, malzeme tarafından yaradan dışarı atılan pusirinin emilmesini gerektirmektedir. Sünger gibi emme özelliği çok kuvvetli bir yara-yanık örtü malzemesi bu amaca yönelik olumlu sonuç verecektir. Ancak dokuda sıvı oluşumu sürekli olduğundan aynı malzemenin emilen (veya alt dokuda biriken) sıvıyı ne hızla dış ortama kaybettiği de büyük önem taşımaktadır. Çünkü hızlı bir su buharı kaybının malzemenin dokudan hedeflenen miktardan daha fazla sıvı almasına (yara bölgesinde kurumaya) sebep olacağı gibi, yavaş bir su buharı geçişinin de dokuda fazla sıvı kalmasına neden olacağı bilinmektedir. Dolayısıyla her iki durumda iyileşme sürecinin gecikmesi veya enfeksiyon riskinin artması açısından önemlidir. Bu nedenlerle deri tedavisinde kullanılacak örtü malzemesi optimum su buharı geçirgenliğinde olmalıdır. Bu değer yaranın derinliği, beklenen iyileşme süresi ve iyileşmenin hangi aşamada olduğu ile de değişmektedir. Çok derin bir doku kaybı içeren hasarlarda (1.derece yanık gibi) dokudaki su kaybı günlük yaklaşık 5100 g/m^2 iken hafif yaralanmalarda bu değer 280 g/m^2 civarındadır. Sağlıklı deride ise su kaybı değeri 200 g/m^2 'dir (MI, 2001). Su buharı geçirgenliği dış ortamdaki bağıl nem ve sıcaklıktan çok etkilenen bir parametre olduğu için bu deneyler her iki parametrenin de sabit tutulduğu kapalı bir sistemde yapılmıştır. Deneyler sonucunda membranların su buharı geçirme hızları Şekil 4.60'ta görüldüğü gibidir. Bu sonuçlara göre bütün membranlar için birim yüzey alanından birim zamanda geçen su buharı miktarları beklenildiği gibi membranların su buharı geçirgenlikleri açık bırakılmış örneklerden anlamlı olarak düşüktür.

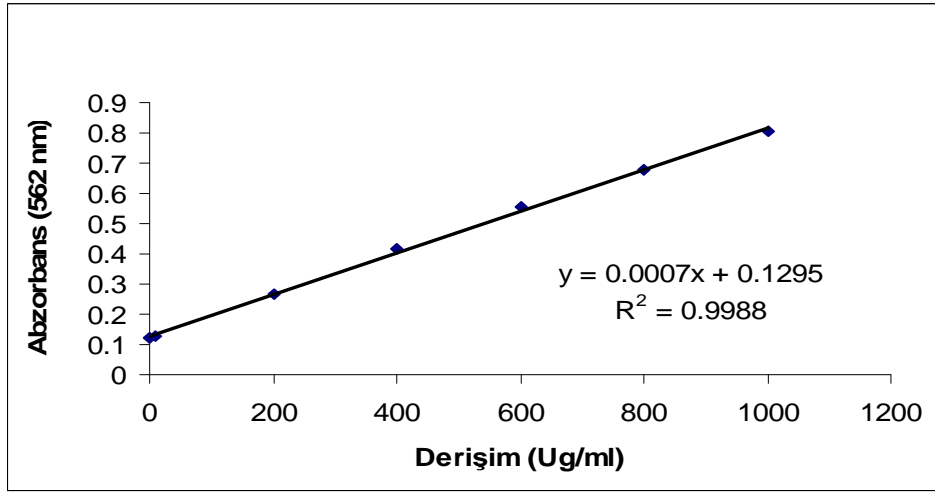
Ayrıca, genel olarak ince membranların su buharı geçiş hızı kalın membranlardan yüksek değerlerde bulunmuştur. Kalın membranlar içerisinde sadece 1/2x kollajen-serisin grubu ile ince membranlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu da membran kalınlığı kadar kompozisyonunun da önemli olduğunu göstermektedir. Su buharı geçirgenliği malzemelerin gözenekli yapısının yanısıra hidrofilitesi ve yüzey aktivitesi ile de doğrudan ilgili önemli bir özelliktir. Su buharı molekülleri oksijenden daha büyük moleküler yapıdadır ve hidrojen bileşeninden dolayı hidrojen içeren başka moleküllerle H-H bağları yapma potansiyelindedir. Bu nedenle gözenekli bir membranın gözenek boyutu ve dağılımı kadar kimyasal aktif grupları da bu özelliği etkileyebilmektedir. Serisinin doğadaki rolü nedeniyle su buharı geçişine uygun bir protein olduğu olgusunun yanısıra, kimyasal yapısında yüksek hidrofilik amino asitlerin bulunduğu bilinmesi, bu proteinin oranı yüksek olan 1/2x (kollajen- serisin) membranındaki bu farklılığı açıklamaktadır. Bu sonuca uygun olarak serisin içermeyen (1/0x, kollajen-serisin) kalın membran grubunda da tam tersine en düşük geçirgenlik verisi elde edilmiştir. Şekilde gruplararası istatistiksel farklılıklar daha ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



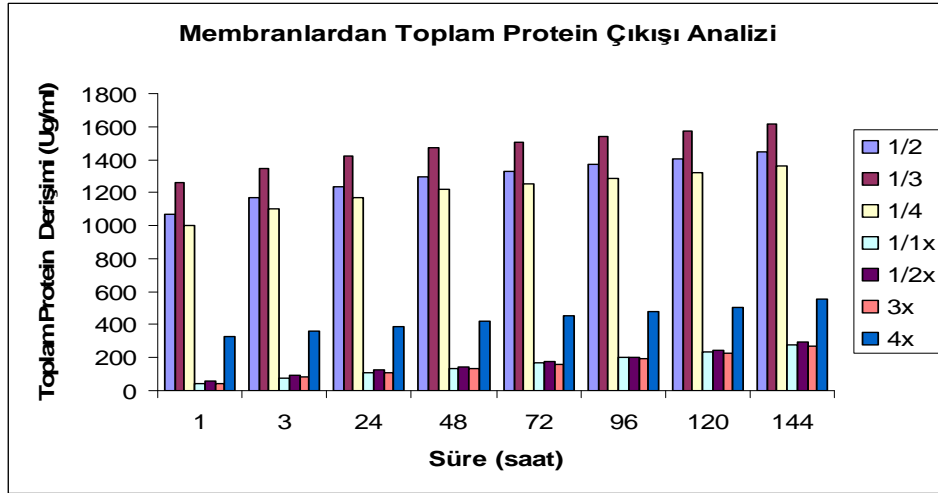
Şekil 4.60. İnce ve kalın membranlardan günlük ortalama su buharı geçiş hızının karşılaştırılması-(İstatistiksel olarak anlamlı bulunan farklılıklar: α: 1/1x kalın membranların su buharı geçiş hızı 2/1x ince membranlardan daha düşüktür, #: 2/1x kalın membranlardan su buharı geçiş hızı yine 2/1x ince membranlardan daha düşüktür, *: 1/0x kalın membranlardan su buharı geçiş hızı 1/0x ince membranlar dışındaki bütün ince membranlardan anlamlı şekilde azdır, p<0,05).

4.3.2.4. Membranların Toplam Protein Miktarının Değerlendirilmesi

Membranların yapısında bulunan kollajen ve serisinin suda çözünebilir yapıda iki protein olması (özellikle serisinin çözünürlüğünün yüksek olması) nedeniyle, zamanla membrandan çıkışları, toplam protein analizi ile incelenmiştir. Analiz sonuçlarından protein derişimi Şekil 4.61’de gösterilen sığır serum proteini ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır. Membrandan çıkan protein derişimlerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4.62’de gösterilmiştir. Bu sonuca göre, su tutma kapasitesi sonuçlarına paralel olarak, çapraz bağlanmayan gruplarda protein çıkışının çok yüksek olduğu gözlenmiştir. Çapraz bağlanan gruplardan, yine kollajen ve serisinin birlikte olduğu gruplar ve kollajenin tek olduğu düşük derişime sahip (3x) grubu, yapıdan protein çıkışının en az olduğu gruplar olarak bulunmuştur. Yüksek derişimdeki kollajenin, çapraz bağlanmasına rağmen bu gruplardan daha fazla protein çıkışı göstermesinin, bu derişimde kullanılan çapraz bağlanmanın yeterli gelmemesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca protein çıkışının çoğunlukla ilk günde olduğu, diğer günlerde çıkışın yavaşladığı görülmüştür.



Şekil 4.61. Serisin-kollajen membran protein analizlerinde kullanılan kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.62. Membranlardan toplam protein çıkışının karşılaştırılması

4.3.2.5. Membranların In situ Bozunumlarının Değerlendirilmesi

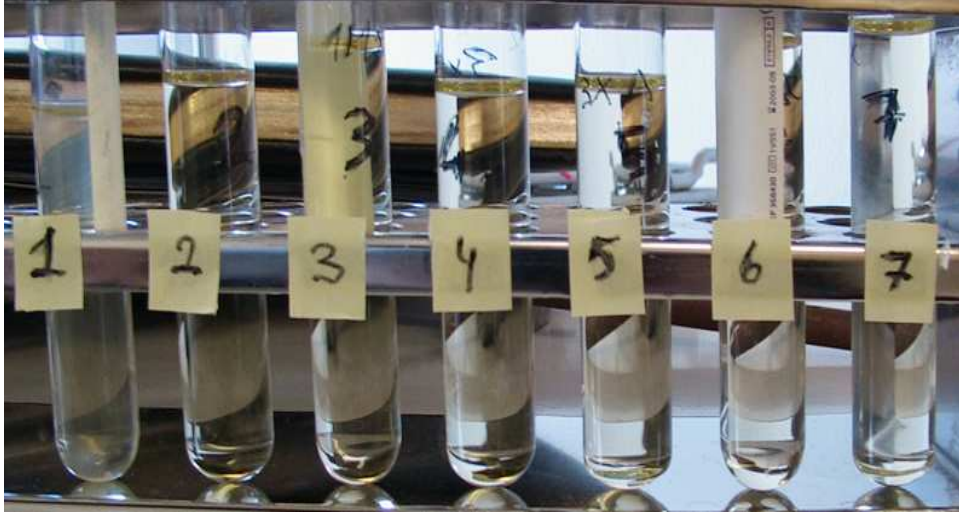
Kollajen-Serisin membranların bir haftalık in situ deneyler sonrasında genel olarak yapısal bütünlüklerini korudukları görülmüştür. Membranların kuru ağırlık kaybı, su tutma ve protein çıkışlarıyla orantılı olarak, çapraz bağlama yapılmayan gruplarda yüksek bulunmuştur (Tablo 4.42). Bu kaybın serisin oranı arttıkça da değer olarak az da olsa arttığı görülmüştür. Kalın membranlarda serisin oranı yüksek grupta (2/1) çapraz bağlanmamış gruptaki sonuca paralel olarak en yüksek ağırlık kaybı elde edilirken ince membranlarda bunun tam tersi olarak kompozit gruplardaki en düşük ağırlık kaybı görülmüştür. Bunun, ince membranların çok ölçüm hatalarından ve ölçüm yapılan sistemin hassasiyetinin yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 4.42. Kollajen-serisin membranların in situ bozunum sonuçları

Kollajen-serisin (ağırlık oranı)	Ağırlık (g)	Ortalama ağırlık kaybı (%)
1/2	0,0050	78,00 ± 0,00
1/3	0,0053	84,82 ± 1,67
1/4	0,0047	85,39 ± 2,06
1/1x (ince)	0,0024	23,63 ± 5,14
1/2x (ince)	0,0023	15,15 ± 2,14
2/1x (ince)	0,0023	23,37 ± 5,88
4x (ince)	0,0024	10,17 ± 8,23
1/1x (kalın)	0,0036	17,65 ± 2,74
1/2x (kalın)	0,0060	22,7 ± 1,93
2/1x (kalın)	0,0047	10,57 ± 1,63
4x (kalın)	0,0101	14,89 ± 2,82

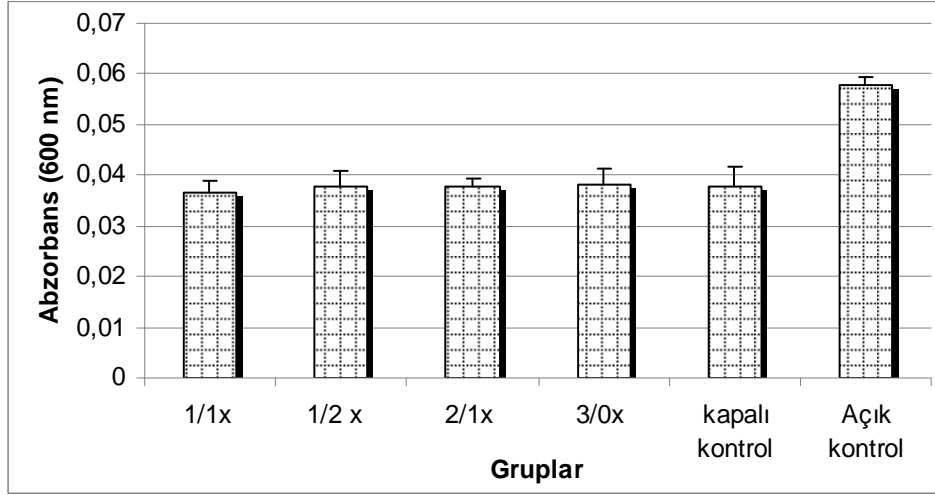
4.3.2.6. Membranların Mikrobiyal Geçirgenlik Özelliklerinin İncelenmesi

Mikrobiyal geçirgenlik testinde, pozitif kontrol tüpleri; deney koşullarının besiyeri ortamında mikroorganizma büyümesi açısından uygun olup olmadığını, negatif kontrol tüpleri ise; içsel (intrinsic) bir bakteri kontaminasyonundan bağımsız koşulların oluşturulabildiğini göstermek amacıyla kullanılmıştır. Bir haftalık laboratuvar ortamında inkübasyon sonucunda, sadece pozitif kontrol tüpleri içinde mikroorganizma ürediğini gösteren bulutlanma olduğu, bunun aksine, diğer kalın ve ince kollajen ve kollajen-serisin membranları ile kapatılmış olan bütün gruplarda gözle görülebilir bir kontaminasyon olmadığı gözlemlenmiştir. Şekil 4.63'te ince membranların kullanıldığı grupların fotoğrafı örnek olarak verilmiştir.

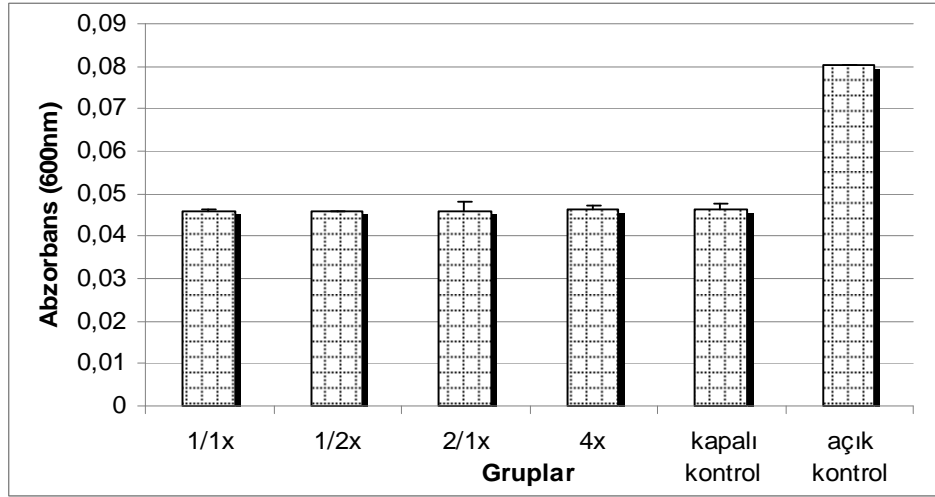


Şekil 4.63. Bir haftalık inkübasyon sonrasında (1) negatif kontrol, (2) pozitif kontrol ve (3-7) deney gruplarının mikrobiyal geçirgenlik sonuçları

Aynı testin sonuçları sıvı besiyerinde bakteri hücre sayımında kullanılan 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi yöntemiyle de kesinlik kazanmıştır. İnce ve kalın membran içeren tüplerin bakteri ölçüm sonuçları kapalı olan pozitif kontrollerle yakınlık gösterirken, üreme olduğu düşünülen negatif kontrol tüplerinde yüksek abzorbans elde edilmiştir (Şekil 4.64 a ve b). İnce veya kalın membran ile kapatılmış besiyerlerin 600 nm'deki okumalarının kapalı tüpdeki kontrol abzorbansından farklı olmadığı görülmüştür. Bunun yanında, açık tüplerde elde edilen abzorbans değerlerinin sayısal olarak en yüksek olduğu bulunmuştur. Elde edilen yüksek abzorbans değeri, bu tüp içinde bakteri büyümesi olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, ince ve kalın kollajen ve kollajen-serisin membranlarının yanık bölgesinde ikincil bakteri enfeksiyonlarını engelleme kapasitesi olduğunu göstermektedir.



a)



b)

Şekil 4.64. Bir haftalık inkübasyon sonrasında negatif kontrol, pozitif kontrol , ve çapraz bağlı kollajen-serisin a) ince, b) kalın membranlarının mikrobiyal geçirgenliklerinin spektrofotometre ölçümleriyle karşılaştırılması

4.3.2.7. Kollajen-Serisin Membranların Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Deri dokusunun normal şartlarda en çok maruz kaldığı etki çekme kuvvetleridir. Bu kuvvetler özellikle iyileşme sürecinde yara bölgesinde yeni hasarlar oluşturma riski taşımaktadır. Bu nedenle deriye yapışarak bu kuvvetlere maruz kalacağı düşünülen yara-yanık örtüsünün iyileşen dokuya zarar vermemesi ve iyileşme sürecinde bütünlüğünü koruyabilmesi için yeterli dayanımda olması gerekmektedir.

Membranların çekme mekanik testleri sonrasında elde edilen sonuçlar Tablo 4.43'te ve Şekil 4.65'te gösterilmektedir. Buna göre kollajenin tek olarak kullanılması ile hazırlanan membranın ultimate tensile stress (maksimum çekme gerilmesi) ve strain (maksimum birim uzama) değerlerinin kollajen ve serisinin beraber kullanımı ile hazırlanan membranlara göre daha yüksek olduğu ve bu farkın membran kalınlığı arttıkça daha belirginleştiği görülmüştür (Tablo 4.43b). Benzer olarak diğer membranlarda da aynı mekanik özelliklerdeki kalın membranların incelere göre farklılıklarının birim alanda kullanılan malzeme miktarındaki artışa dayalı olduğunu düşündürmektedir. Ancak 3. özellik olan elastisite modülü değerlerinde, diğer özelliklerin aksine, tek kollajen içeren kalın membranlarda hem incelere göre hem de kalın membranların ikili (kompozit) gruplarına göre daha düşük değerler bulunmuştur.

Kalın ve ince membranlarda serisin oranı arttıkça maksimum çekme gerilmesi ve birim uzama değerlerinin azaldığı görülmüştür. Yapıya serisinin eklenmesiyle, membranların daha kırılğan (brittle) özellik kazandığı görülmektedir. Ayrıca, kollajen oranının artması ile ikili kompozit gruplarında mekanik özelliklerde anlamlı farklılıklar oluşmadığı gözlenmiştir.

Membranların mekanik testlerinde standart sapmaların yüksek olması ve özellikle ince membranların deney zorluğu nedeniyle tutarsız sonuçlar üretmesi mekanik özelliklerin değerlendirilmesinde zaman zaman yorum güçlüğü doğurmuştur. Mekanik test sonuçlarını daha net karşılaştırabilmek için istatistiksel analiz yapılmıştır. Bütün grupların mekanik özelliklerinin ortalama değerleri arasında farklılık olup olmadığı, gruplararası tek yönlü ANOVA testi ile incelenmiş, grupların birbirleriyle olan ikili karşılaştırmaları için ise, TUKEY'in çoklu karşılaştırma testi (Post-hoc) kullanılmıştır (SPSS 9 İstatistiksel analiz paket programı). Bununla birlikte, sonuçların yayını aşamasında, gruplara yeni örnekler eklenmesi ve tekrar değerlendirilmesi planlanmaktadır.

Harley vd., tarafından yapılan bir araştırmada kollajen proteini glukosaminoglikan ile birlikte hücre taşıyıcısı olarak kullanılmıştır (HARLEY, 2007). Projedeki gibi iki biyomolekülün kullanımı ile hazırlanan bu malzemelerin başlangıç elastisite modülleri 2 MPa civarındadır. Park vd. liyofilizasyon yöntemi ile elde ettikleri kollajenin-hyaluronic asitle matrislerinde maksimum çekme gerilmesi değerleri yaklaşık 5 MPa'dır (PARK, 2004). Elastisite modülü değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. Maksimum çekme gerilmesi değerlerinde, 2/1x ve 1/1x oranlarındaki kollajen-serisin ince membranlarla aynı orandaki kalın membranlar arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). İnce

membranlar içerisinde en yüksek gerilme değerini, 1/1x kollajen-serisin oranındaki membran göstermiştir. Bu grup diğer ince membranlara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek gerilme değerine sahiptir ($p < 0,05$). Kalın membranlar içerisinde en yüksek değere sahip olan 1/0x oranındaki membran ise, sadece 2/1x oranındaki kalın membrandan istatistiksel anlamlı farklıdır. Maksimum çekme gerilmesi değerlerinde 1/0x ve 2/1x oranlarındaki kollajen-serisin ince membranlarla aynı orandaki kalın membranlar arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). İnce membranlar içerisinde en yüksek birim uzama değerindeki 1/1x, kollajen-serisin membran 2/1x ince ve 2/1x kalın membrana göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek gerilme değerine sahiptir ($p < 0,05$). Ayrıca, serisin içeren kalın membran gruplarında 2/1x membran, serisin miktarı daha yüksek olan 1/2x membrandan istatistiksel olarak anlamlı farklıdır.

Tablo 4.43. Kollajen-serisin membranların mekanik özellikleri

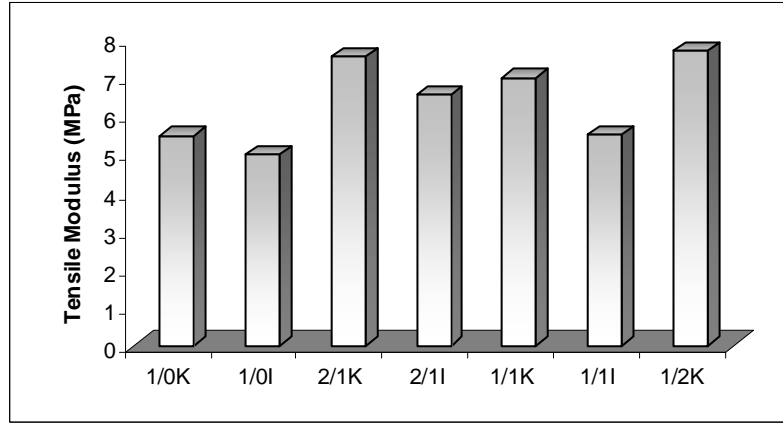
a) Kalın membranlar

Kalın membranlar	Elastisite modülü (MPa)	Ultimate tensile stress (MPa)	Ultimate tensile strain (%)
Kollajen-serisin			
1/0	5,48 ± 0,71	44,08 ± 1,89	11,76 ± 1,46
1/1	7,02 ± 0,39	33,47 ± 13,20	5,73 ± 2,27
2/1	7,56 ± 0,92	40,46 ± 6,22	6,60 ± 0,78
1/2	7,73 ± 1,32	26,74 ± 0,96	3,51 ± 0,22

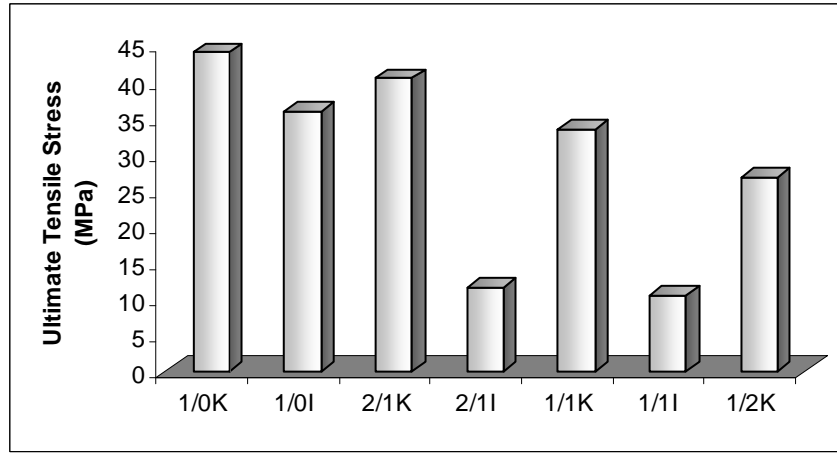
b) İnce membranlar

İnce membranlar	Elastisite modülü (MPa)	Ultimate tensile stress (MPa)	Ultimate tensile strain (%)
Kollajen-serisin			
1/0	5,50 ± 2,26	35,95 ± 7,45	4,73 ± 0,99
1/1	5,52 ± 0,77	10,11 ± 1,41	7,18 ± 0,86
2/1	6,55 ± 1,71	11,54 ± 2,41	2,17 ± 0,30
1/2	*	-	-

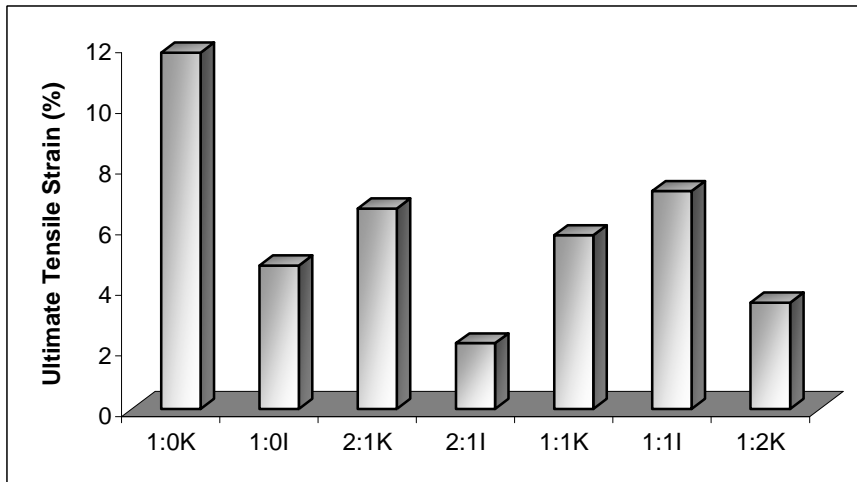
* Membranların çok hassas olması nedeniyle kalıpla kesme ve mekanik testler yapılamamıştır.



a)



b)

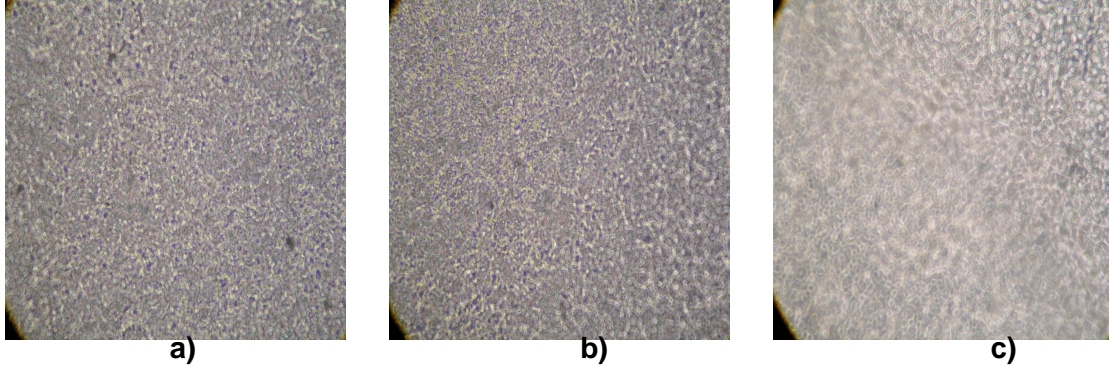


c)

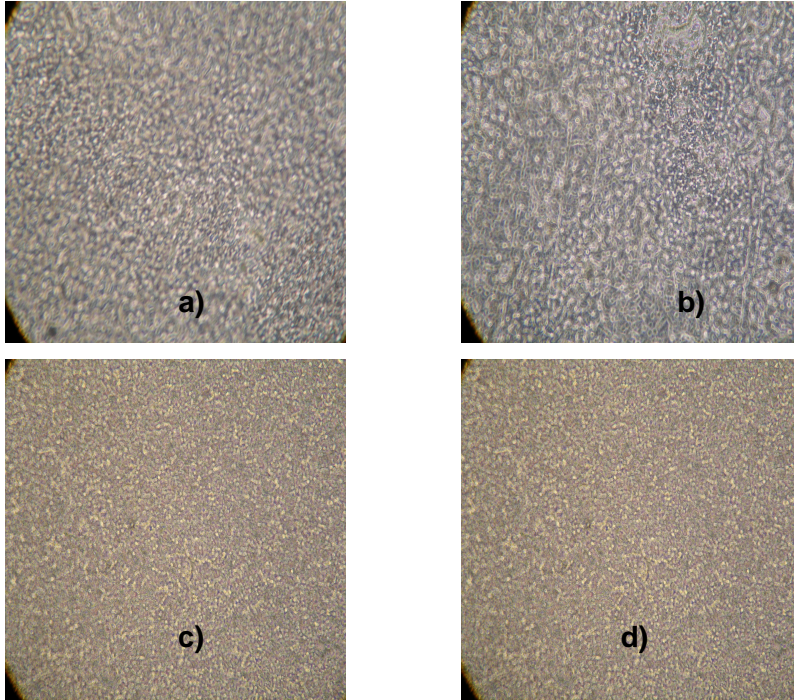
Şekil 4.65. İnce ve kalın membranların mekanik özelliklerinin karşılaştırılması a) Elastisite modülü, b) Maksimum çekme gerilmesi c) Maksimum birim uzama

4.3.2.8. Membranların Makroskopik ve Mikroskopik İncelenmesi

Kollajen-serisin membranlarda serisin oranı arttıkça, membran yüzeylerinin daha homojen bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Çapraz bağlanan farklı kollajen-serisin ve kollajen membranlar arasında görülen en belirgin farklılık ise, kollajen membranların yüzeylerinin daha heterojen ve pürüzlü olmasıdır (Şekil 4.66 ve 4.67).

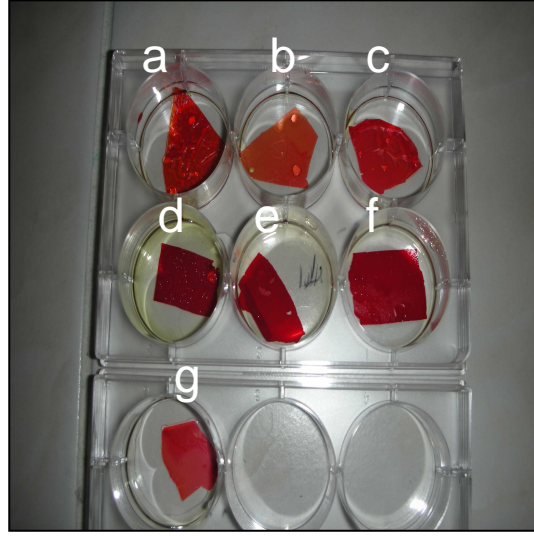


Şekil 4.66. Kollajen-serisin a) 1/2, b) 1/3, c) 1/4 bileşimlerine sahip membranların ışık mikroskobu görüntüleri (20X büyütme).



Şekil 4.67. Çapraz bağlanmış a) Kollajen (4 mg/ml), b) Kollajen (3 mg/ml), c) Kollajen-serisin, 1/1, d) Kollajen-serisin, 1/2 membranların ışık mikroskobu mikrografileri (20X büyütme)

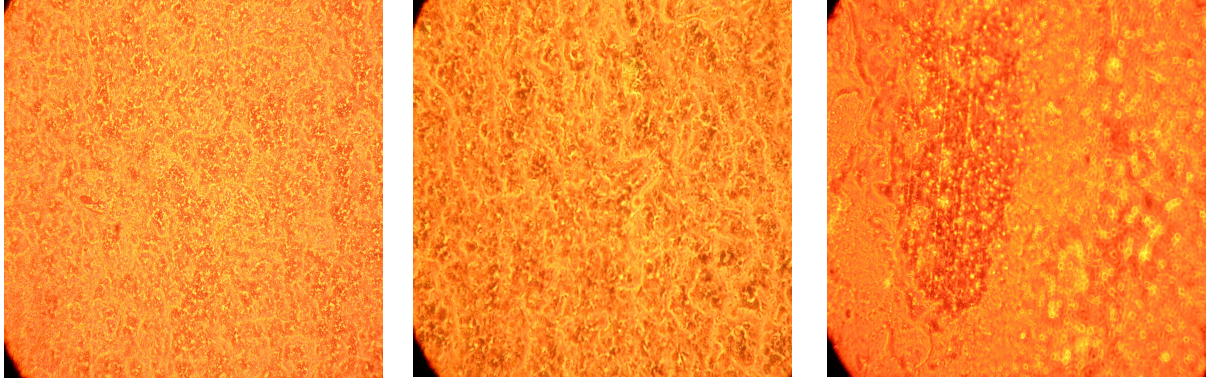
Ayrıca membran yapısındaki kollajenin dağılımı sirius kırmızısı ile boyama sonrası makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Şekil 4.68'de görüldüğü gibi çapraz bağlanmamış membranlarda kollajen boyaması daha yoğundur. Bunun, boyama sırasında bu gruplarda (Bölüm 4.2.2.9'de açıklandığı gibi) yapıdan serisinin çıkması ile kollajenin boyanabilirliğinin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4. 68. Sirius kırmızısı ile boyanmış membranların makroskopik görüntüleri:

- a) 4 mg/ml kollajen-çapraz bağlanmış, b) 3 mg/ml kollajen-çapraz bağlanmış,
- c) 1/1 oranında kollajen-serisin-çapraz bağlanmış, d) 1/2 oranında kollajen-serisin,
- e) 1/4 oranında kollajen-serisin, f) 1/3 oranında kollajen-serisin,
- g) 1/2 oranında kollajen-serisin-çapraz bağlanmış

Membranlarda kollajen dağılımını görmek için yapılan mikroskopik incelemelerde, serisin oranı arttıkça kollajen için boyamaların (kırmızı alanlar) bölgesel olarak yoğunluk kazandığı gözlenmiştir (Şekil 4.68). Elde edilen mikrografiler, serisin oranı arttıkça kompozit kollajen-serisin membranlarda faz ayrımı olduğunu düşündürmektedir. Makroskopik incelemelerde görüldüğü gibi, membranlar çapraz bağlandıktan sonra kollajen boyamalarının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.69-70).

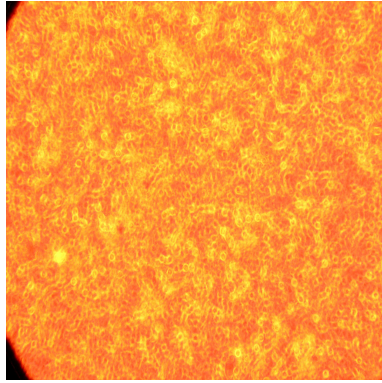


a)

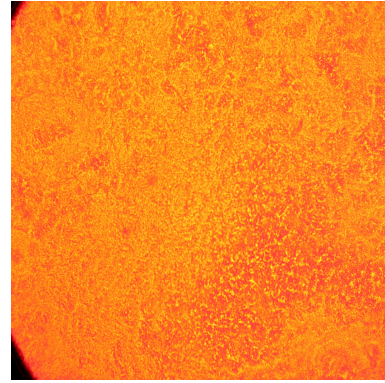
b)

c)

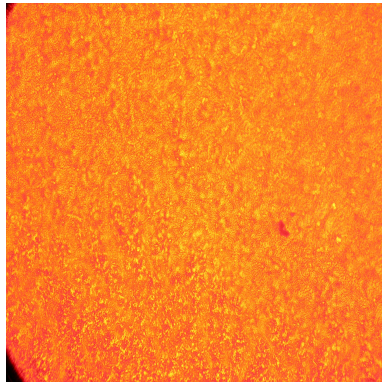
Şekil 4.69. a) 1/2, b) 1/3, c) 1/4 bileşim oranlarına sahip kollajen-serisin membranların kollajene bağlanan sirius kırmızısı ile boyandıktan sonra elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri (20X büyütme)



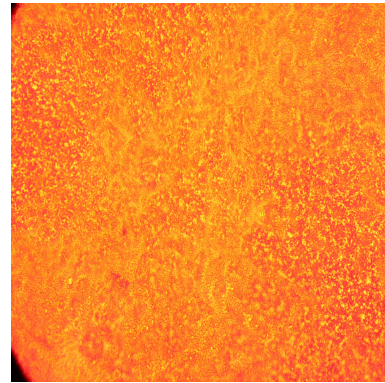
a)



b)



c)



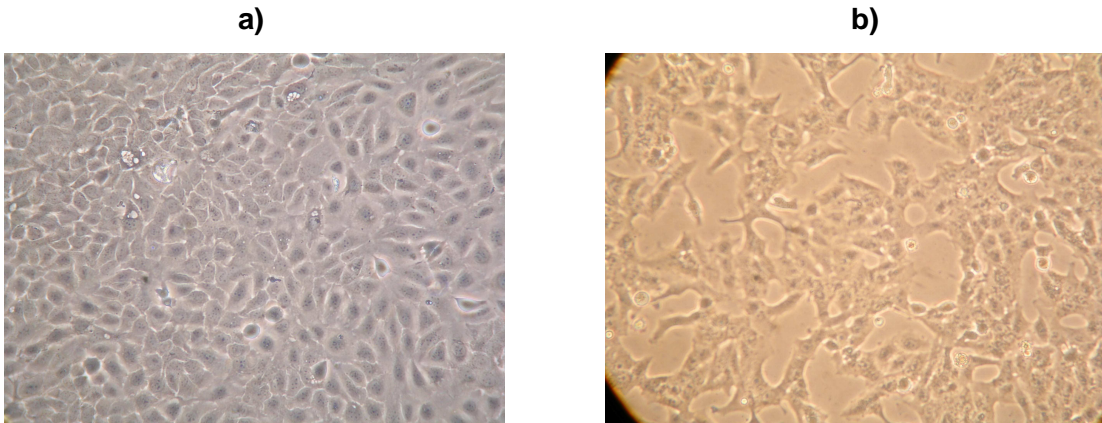
d)

Şekil 4.70. a) Çapraz bağlanmış a) Kollajen (4 mg/ml), b) Kollajen (3 mg/ml), c) Kollajen-serisin (1/1), d) Kollajen-serisin (1/2) membranların kollajene bağlanan sirius kırmızısı ile boyandıktan sonra elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri (20X büyütme)

4.3.2.9. Membranların Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi

Yanık örtüsü olarak geliştirilen geçici taşıyıcılarda aranan özelliklerin başında hücre yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlaması, bozunmaya bağlı ortama çıkan ürünlerinin hücrelere toksik etki göstermemesi ve bozunma hızının doku rejenerasyon hızına eş olması gelmektedir (VACANTI, 1997). Hazırlanan membranların, hem enfeksiyon riski ve su kaybının azaltılması için yarayı kapatması, hem de yarada rejenerasyonun sağlanması için epidermal ve/veya keratinosit hücrelerinin bağlanmasını sağlayan geçici bir alt katman oluşturması planlanmıştır.

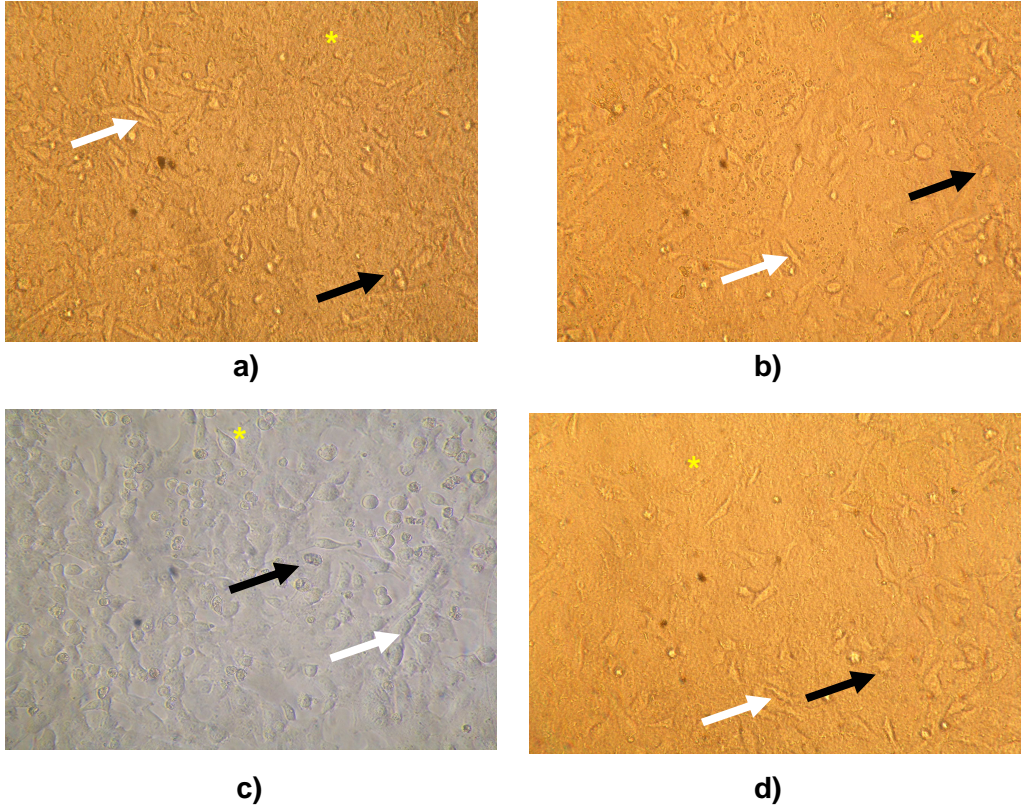
Çalışmada, öncelikle hazırlanan membranların hücreler üzerinde toksik etki gösterip göstermediği in vitro biyouyumluluk testleri ile incelenmiştir. Yapılan testlerde HaCaT keratinosit ve 3T3 fibroblast hücre hatları kullanılmıştır. HaCaT keratinosit hücreleri morfolojik ve farklılaşma özellikleri açısından tipik keratinosit hücrelerine benzemektedir. Keratinosit hücreleri konfluenseye ulaştıklarında karakteristik poligonol morfolojiye sahip olmaktadır. Ayrıca, hücreler yüzeyi sevdiklerinde filopod veya lamellipod gibi uzantılar vermektedir (Şekil 4.71a) (RHO, 2006). Primer keratinosit hücrelerin aksine, büyüme faktörlerine ihtiyaç olmadan hücre kültür ortamında çoğaltılabilmesi nedeniyle, sitotoksikite deneyleri için uygun bir hücre hattıdır. 3T3 hücre hattı biyouyumluluk testlerinde kullanılan referans hücre hatlarından biridir. Hücreler fibroblastik hücre morfolojisine sahiptir (Şekil 4.71b). Bölünme süreleri 18 saattir. Hücre kültür ortamında hızla çoğalan ve pasajlararası temel özelliklerini kaybetmeyen bir hücre hattıdır.



Şekil 4.71. a) HaCaT keratinosit, b) 3T3 hücrelerinin ışık mikroskopları (20X büyütme)

Değişik kollajen/serisin oranlarına sahip membranlara 3T3 hücreleri ekilmiş ve 24 saat sonra membranlara bağlanmış 3T3 hücrelerinin morfolojileri faz kontrast mikroskopu ile incelenmiş

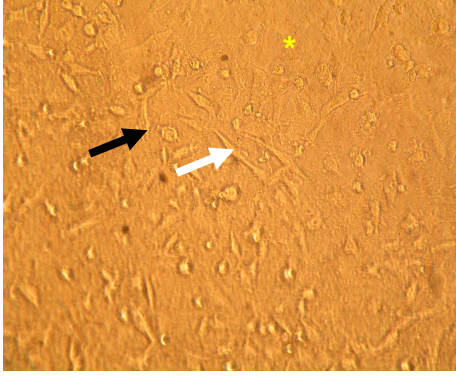
ve görüntülenmiştir. Kollajen, bağ dokusunu oluşturan temel proteindir (PARRY 1988). Fibroblast hücreleri başta gelmek üzere birçok hücre yüzeyinde kollajeni tanıyan reseptörler vardır. 3T3 hücreleri 24 saat sonunda membranlar üzerine yapışmıştır. Değişik kollajen-serisin oranlarına sahip membranlara yapışan 3T3 hücrelerinin çoğunun yüzeyde yayıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.72).



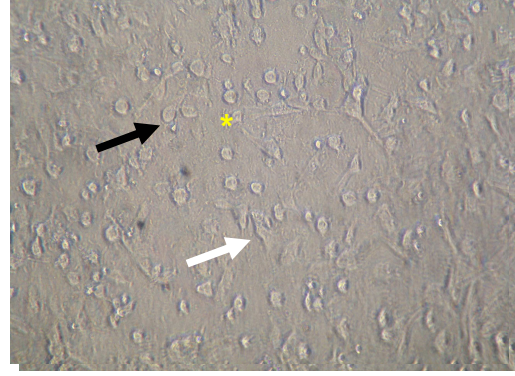
Şekil 4. 72. Kollajen-Serisin a) 1/2, b) 1/3, c) 1/4 kompozisyonlarına sahip membranlarına, d) hücre kültür kabına (kontrol) ekilen 3T3 hücrelerinin 24 saat sonra ışık mikroskopisi görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış yayılmış hücreleri, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmamış hücreler ve sarı yıldız ise membranı göstermektedir (20X).

Doğal kaynaklı bir polimer olan kollajen su tutma kapasitesi yüksek bir proteindir. Dehidrotermal veya kimyasal yöntemlerle kollajen zincirleri arasında çapraz bağlama yapılmadığı takdirde, kollajen sulu ortamda yapısal bütünlüğünü kaybetmektedir (KESKIN, 2005; LV, 2008). İpek kozasından saflaştırılan serisin, düşük moleküler ağırlığa sahip, suda çözünen bir proteindir. Serisinin kollajene oranla membranlardan daha çabuk çıktığı ve yapısal bütünlük kaybını hızlandığı düşünülmektedir. Yapısal bütünlüğünün belli bir süre korunması için membranlar kimyasal yöntemle çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlanmış

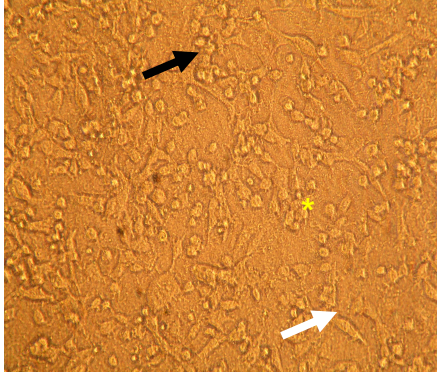
kollajen-serisin (1/2) membranlara ekilen hücrelerin (Şekil 4.73d) çapraz bağlanmamış membrana yapışan hücrelerden (Şekil 4.72a) farklı oldukları ve tipik fibroblastik morfolojilerini kayb ettikleri görülmüştür. Bu sonuç, çapraz bağlama için kullanılan glutaraldehitin membranlardan yıkama ile yeterince uzaklaştırılmadığını düşündürmektedir. Kimyasal reaksiyondan sonra reaktif kalan grupların nötralize edilerek glutaraldehitin hücreler üzerindeki negatif etkilerinin azaltılması planlanmıştır.



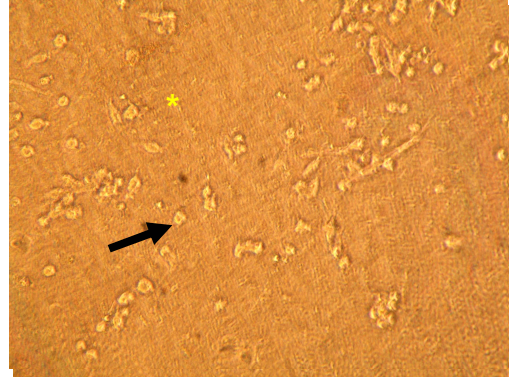
a)



b)

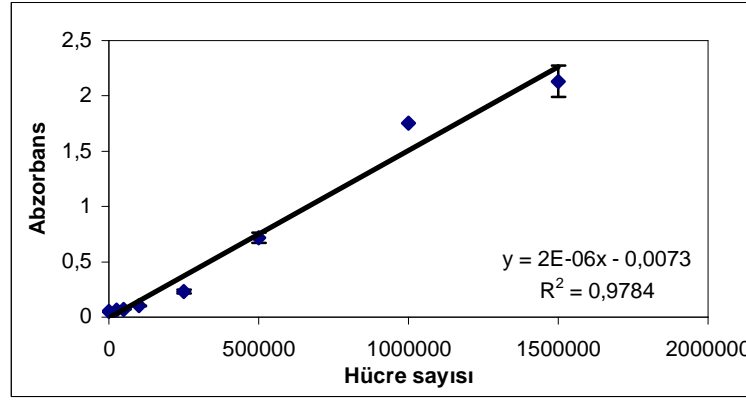


c)



d)

Şekil 4.73. a) Çapraz bağlanmış a) Kollajen (4 mg/ml), b) Kollajen (3 mg/ml)
c) Kollajen-serisin, 1/1, d) Kollajen-serisin, 1/2, membranlarına ekilen 3T3 hücrelerinin 24 saat sonra ışık mikroskopisi görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış yayılmış hücreleri, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmamış hücreleri ve sarı yıldız ise membranı göstermektedir (20X büyütme).

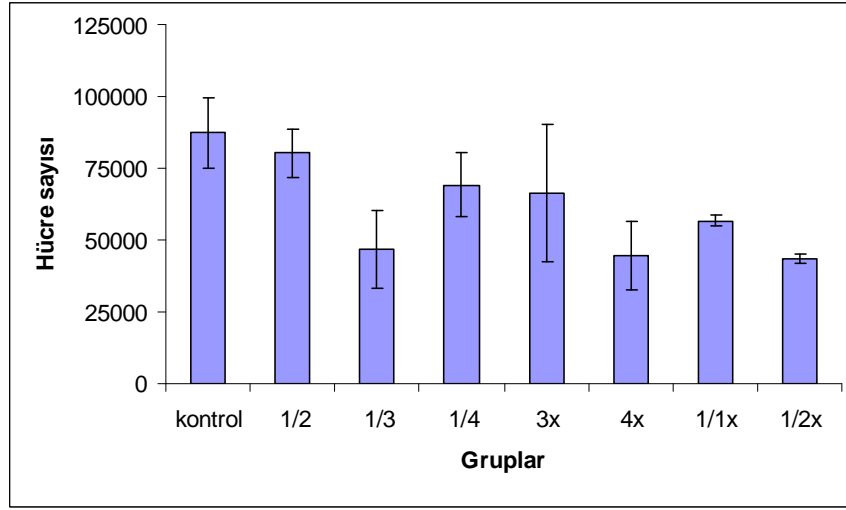


Şekil 4.74. 3T3 Hücreleri için oluşturulan kalibrasyon eğrisi

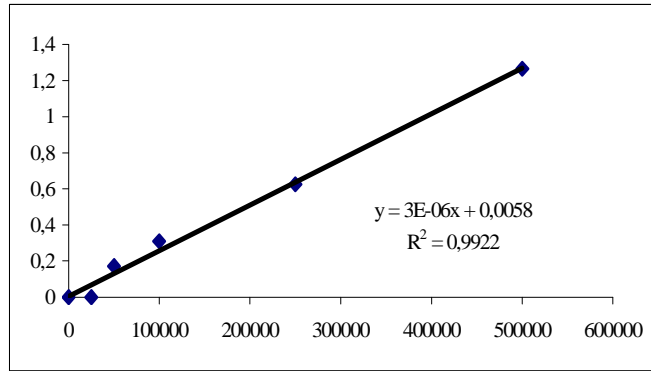
Serisinin, gösterdiği farklı biyolojik aktivitelerin ipliksi ağ yapılarıyla oluşturduğu fiziksel bağlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (PANILAITIS, 2003). Tsubouchi, insan kaynaklı deri fibroblast hücrelerinin kontrole (hücre kültür kabı) oranla, serisin filmlerine daha çok bağlandıklarını göstermiştir (TSUBOUCHI, 2005). Bu olumlu etki, projede kollajen-serisin membranlarında da görülmüştür.

Membranlara bağlanan hücre sayılarının belirlenmesi için bilinen hücre sayıları ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.74). 24 saat sonunda kollajen-serisin (1/2 ve 1/4) membranlara yapışan hücre sayısının kontrol grubundan farklı olmadıkları görülmüştür (Şekil 4.75). Serisinin yüksek hidrofilitateye sahip amino asit bileşimiyle kimyasal veya fiziksel yöntemlerle çapraz bağlanabildiği ve farklı polimerlerle kompozit yapılar oluşturabildiği gösterilmiştir (ZHANG, 2002; CHO, 2003). Projede de hazırlanan kollajen-serisinin glutaraldehit ile çapraz bağlanarak kompozit bir yapıda membran oluşturulması ve yapısal bütünlüğünü yarada yeni doku oluşumunu destekleyecek hedef sürede korumaları sağlanmıştır. 24 saat hücre inkübasyonu sonunda, çapraz bağlanmış membranlar üzerinde yapışmış hücre morfolojileri ile MTT canlılık analiz yöntemiyle bulunan hücre sayıları birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. Çapraz bağlanmış membranlara bağlanan hücre sayısının kontrol grubundan düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.75). Ayrıca, kollajen-serisin (1/2) membranlara bağlanan hücre sayısı, çapraz bağlama yapılmış membranda $80\ 250 \pm 8495$ 'den $43\ 500 \pm 1768$ 'e düşmüştür. Yukarıda tartışıldığı gibi, glutaraldehitin hücre üzerindeki negatif etkilerinin azaltılması için, yıkama aşamaları uzatılmış ve 0.2 M glisin ile yarım saat bekletilmiştir. Hazırlanan membranlar bu aşamalardan geçtikten sonra glutaraldehitin toksik etkisi 3T3 ve HaCaT hücre hatları ile incelenmiştir. Membranlar üzerine

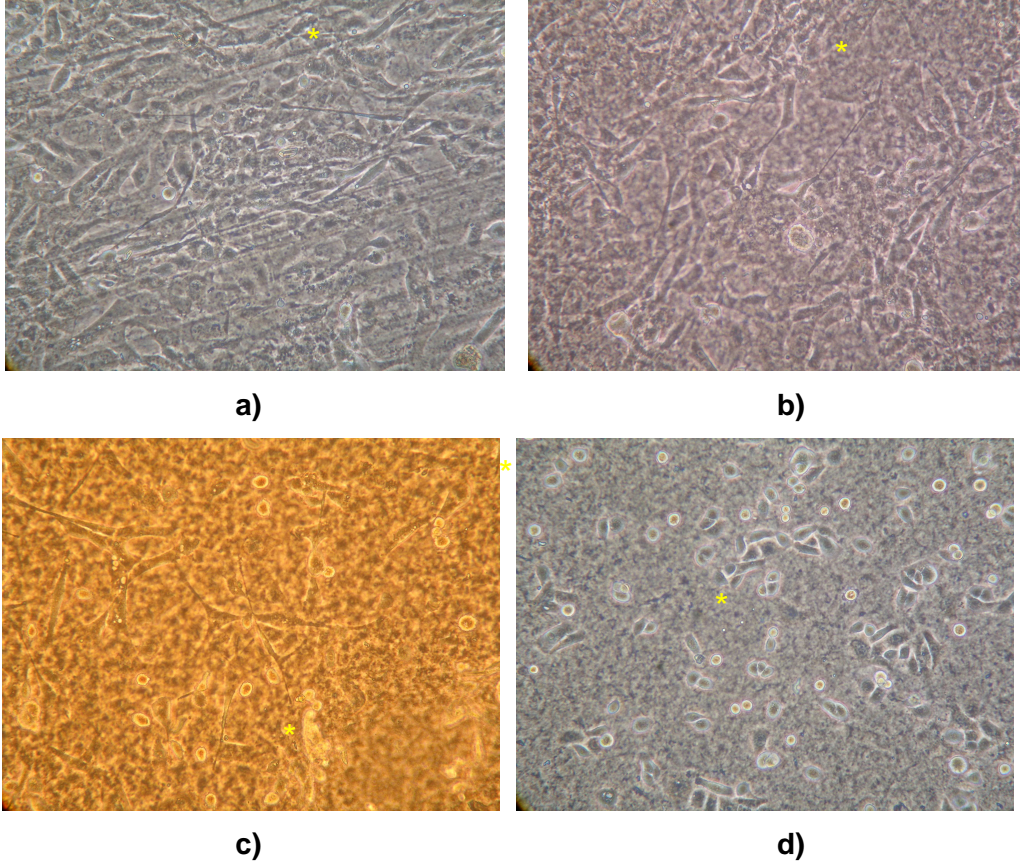
bağlanan keratinosit hücre sayısının belirlenmesi için Şekil 4.76'de verilen kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 4.75. 24 Saat sonunda membranlar üzerindeki 3T3 hücre sayıları



Şekil 4.76. HaCaT keratinosit hücreleri için oluşturulan kalibrasyon eğrisi

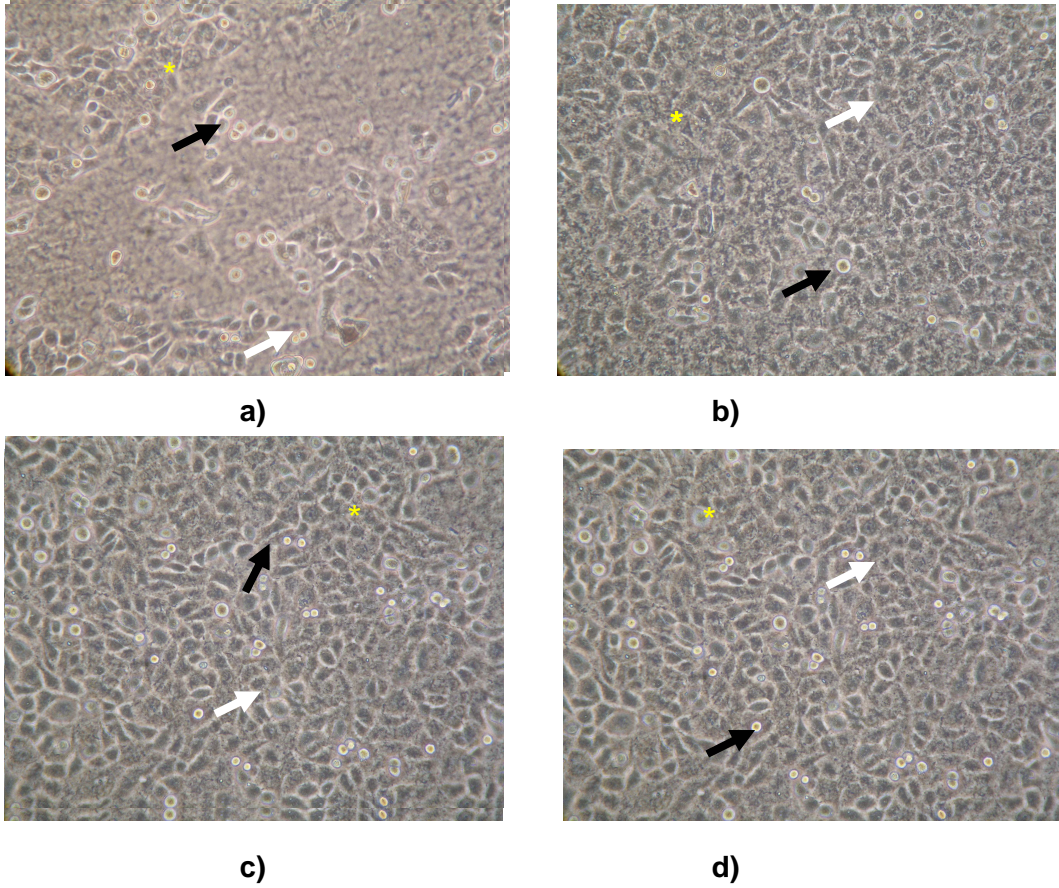


Şekil 4.77. Çapraz bağlanmış ince a) 3/0 Kollajen, b) Kollajen-serisin (1/1), c) Kollajen-serisin (1/2), d) Kollajen-serisin (2/1) membranlar üzerine ekilen 3T3 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri. (20X büyütme)

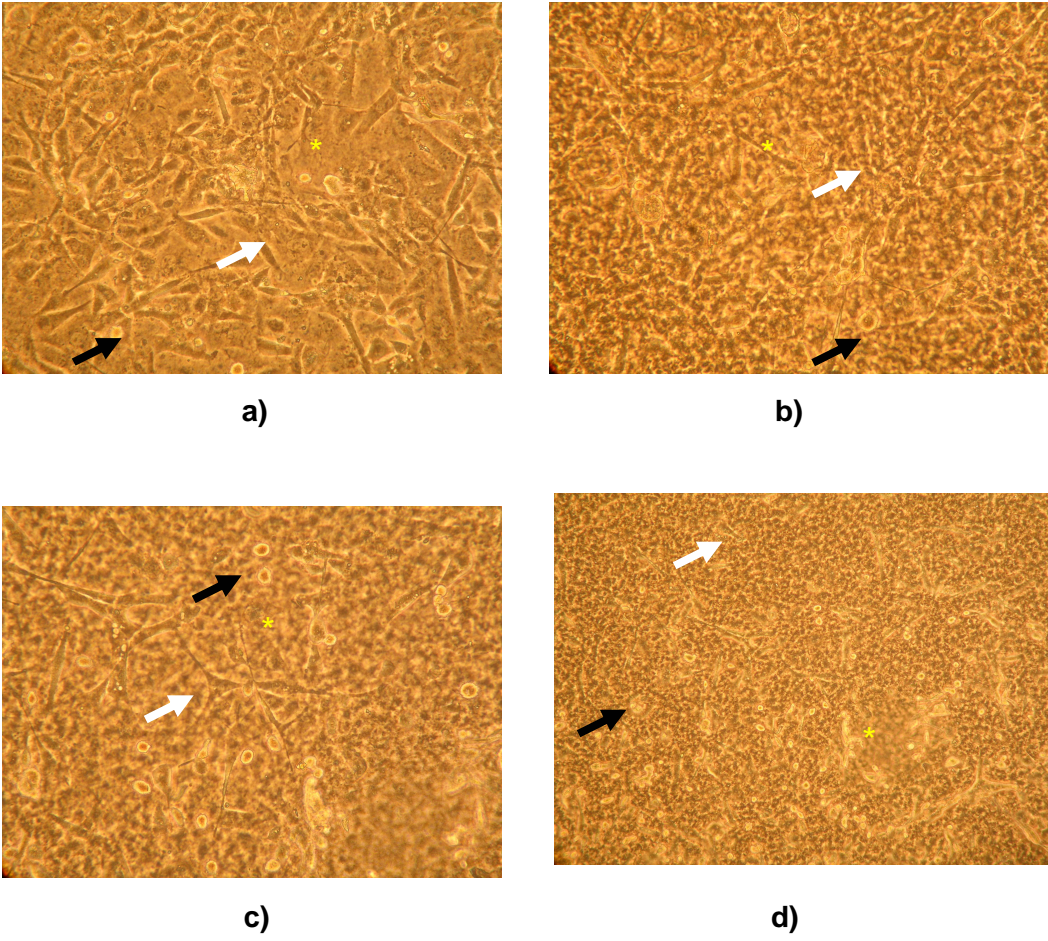
24 saat sonunda 3T3 hücrelerinin çoğunun çapraz bağlanmış ince ve kalın kollajen ve kollajen-serisin membranların yüzeyine bağlanmış ve yayılmış oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.77 ve 4.78). Bu da hücrelerin yüzeyi sevdiklerini ve çapraz bağlayıcı ile ilgili toksik etki yaşamadıklarını göstermektedir. Sadece Şekil 4.77'de ince kollajen-serisin membranların yüzeyinde diğer membranlara oranla daha fazla ölü veya yayılmamış hücreye rastlanmıştır. Bunun, örnekten kaynaklandığı düşünülmektedir. Kalın kollajen-serisin membranların kompozisyonunda serisin miktarı artırıldığında, hücrelerinin ışık mikroskopisi ile görüntülenmelerinde sıkıntılar yaşanmıştır. Serisin miktarı artırıldığında membranların yüzeyi daha heterojen bir görüntü kazandığı için, membrandan geçen ışık miktarı azalmış ve hücreleri ayırt edebilmek zorlaşmıştır (Şekil 4.79b ve d, Şekil 4.80b ve d)

24 saat sonunda keratonosit hücrelerinin tüm membran yüzeylerine yapıştıkları ve yayıldıkları gözlenmiştir. Yayılmış hücrelerin karakteristik poligonol keratonosit hücre

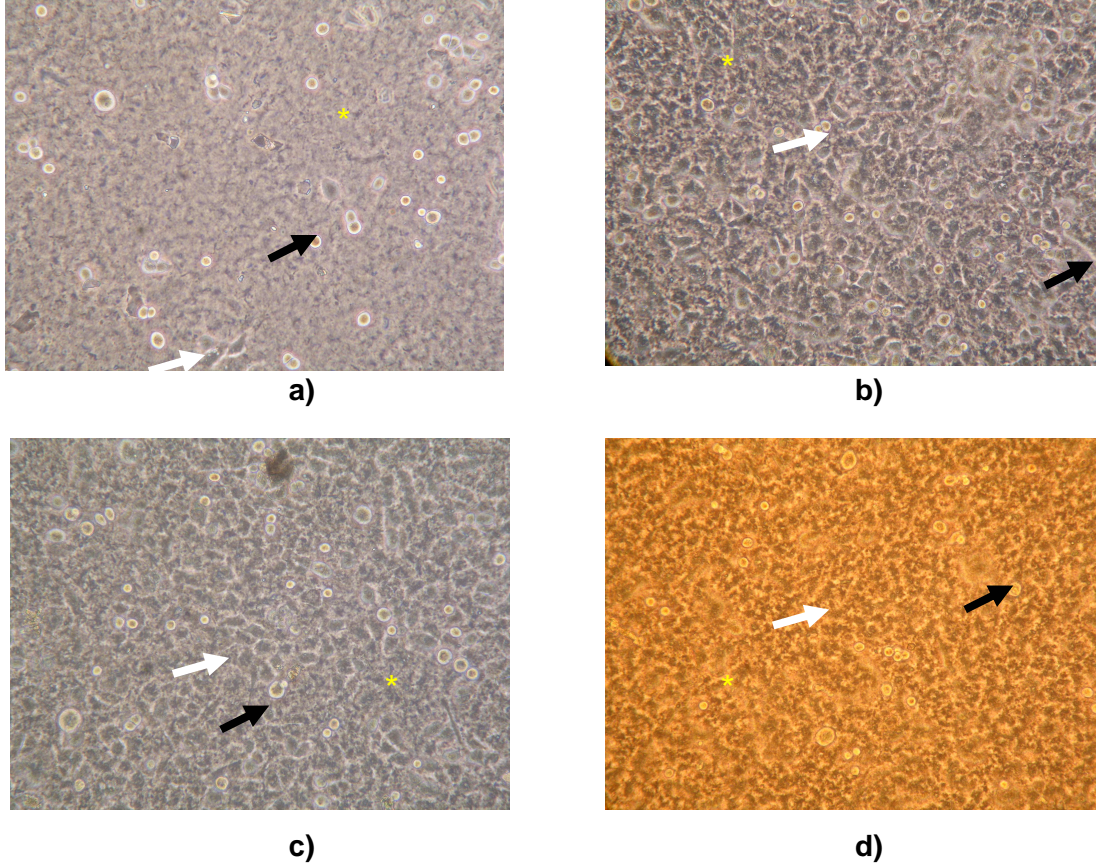
morfolojisi kazandıkları görülmüştür (Şekil 4.78 ve 4.80). RHO vd. yaptıkları çalışmalarda keratinosit hücrelerinin yüzeyinde bulunan integrin reseptörlerinin kollajeni tanıyan reseptörler olduğunu ve bu tip bağlanmanın hücrelerin farklılaşmasında olumlu etkileri olduğunu göstermiştir (RHO, 2006). Hazırlanan kollajen-serisin membranlarının da aynı tip olumlu etkisi olduğu ve serisin varlığının ve çapraz bağlayıcının negatif etkileri olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.78. Çapraz bağlanmış ince a) 3/0 Kollajen, b) Kollajen-serisin (1/1), c) Kollajen-serisin (1/2), d) Kollajen-serisin (2/1) membranlar üzerine ekilen HaCaT keratinosit hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış ve yayılmış hücreler, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmamış hücreler (20X büyütme).

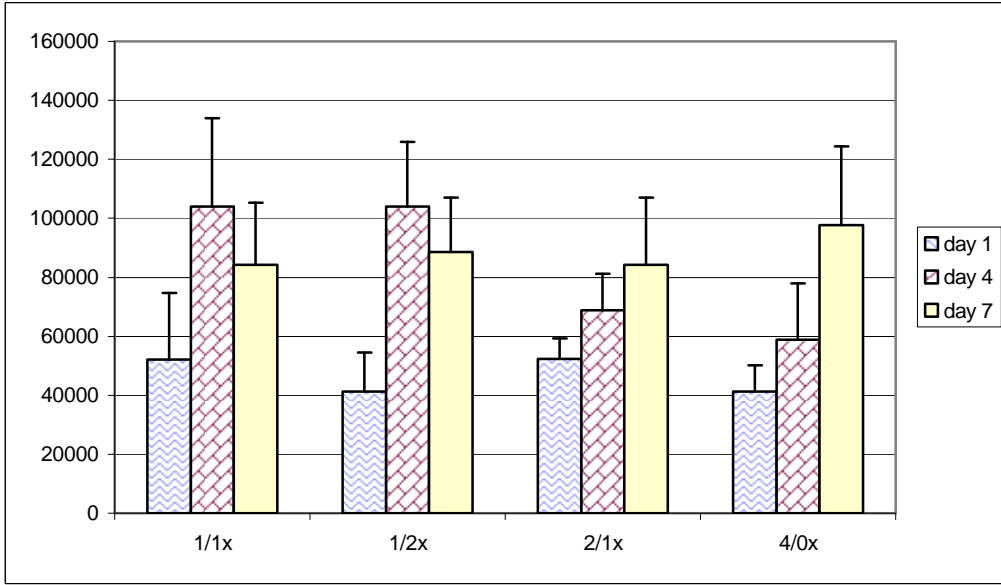


Şekil 4.79. Çapraz bağlanmış kalın a) 3/0 Kollajen, b) Kollajen-serisin (1/1), c) Kollajen-serisin (1/2), d) Kollajen-serisin (2/1) membranlar üzerine ekilen 3T3 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış ve yayılmış hücreler, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmamış hücreler (20X büyütme).

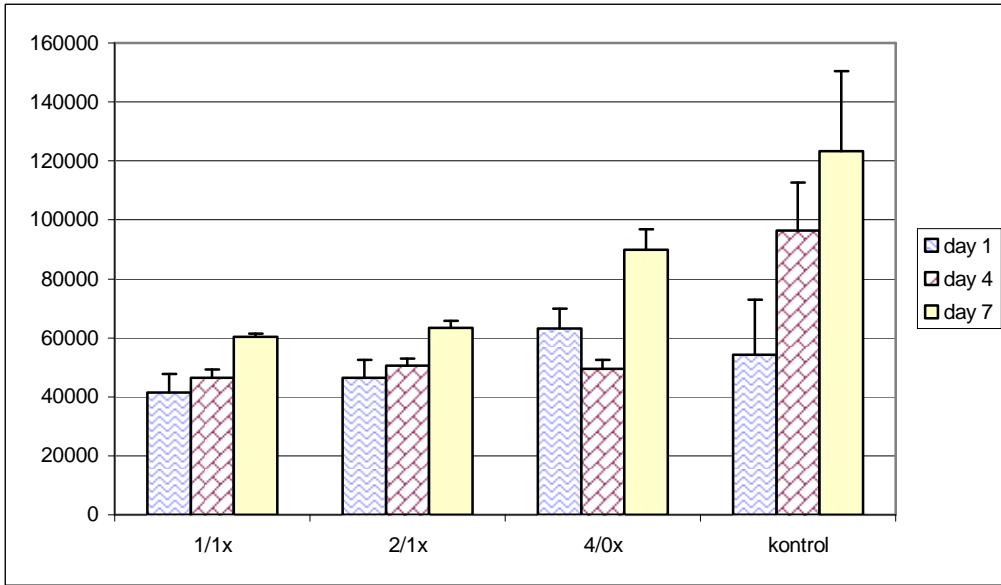


Şekil 4.80. Çapraz bağlanmış kalın a) 3/0 Kollajen, b) Kollajen-serisin (1/1), c) Kollajen-serisin (1/2), c) Kollajen-serisin (2/1) membranlar üzerine ekilen HaCaT keratinosit hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri. Beyaz ok membrana yapışmış ve yayılmış hücreler, siyah ok membrana yapışmış ama yayılmış hücreler (20X büyütme)

MTT canlılık testi keratonosit hücrelerinin kalın ve ince kollajen ve kollajen-serisin membranlar yüzeyinde çoğalmalarının incelenmesi için kullanılmıştır. Hücrelerin 1., 4. ve 7. günlerde sayıları hazırlanan kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.76) ile hesaplanmıştır. Membranlar yüzeyine 35 000 hücre ekilmiştir. 24 saat sonunda hücrelerin % 100 yüzeye yapıştıkları bulunmuştur. Bu sonuç, ışık mikroskopisinde hücrelerin membran yüzeylerini tercih ettikleri sonucu ile uyumludur (Şekil 4.78 ve 4.80). Keratonosit hücre sayılarının ince ve kalın membranlarda zamana bağılı olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.81). Keratonosit hücrelerinin çoğalmaları kalın membranlarda daha belirgin artış göstermektedir. Kalın membranlarda 2/1 kompozisyonu hariç tüm serisin içeren gruplar, kollajen membranlardan ve kontrol yüzeylerinden farksız hücre artışı göstermiştir (Şekil 4.81a).



a)



b)

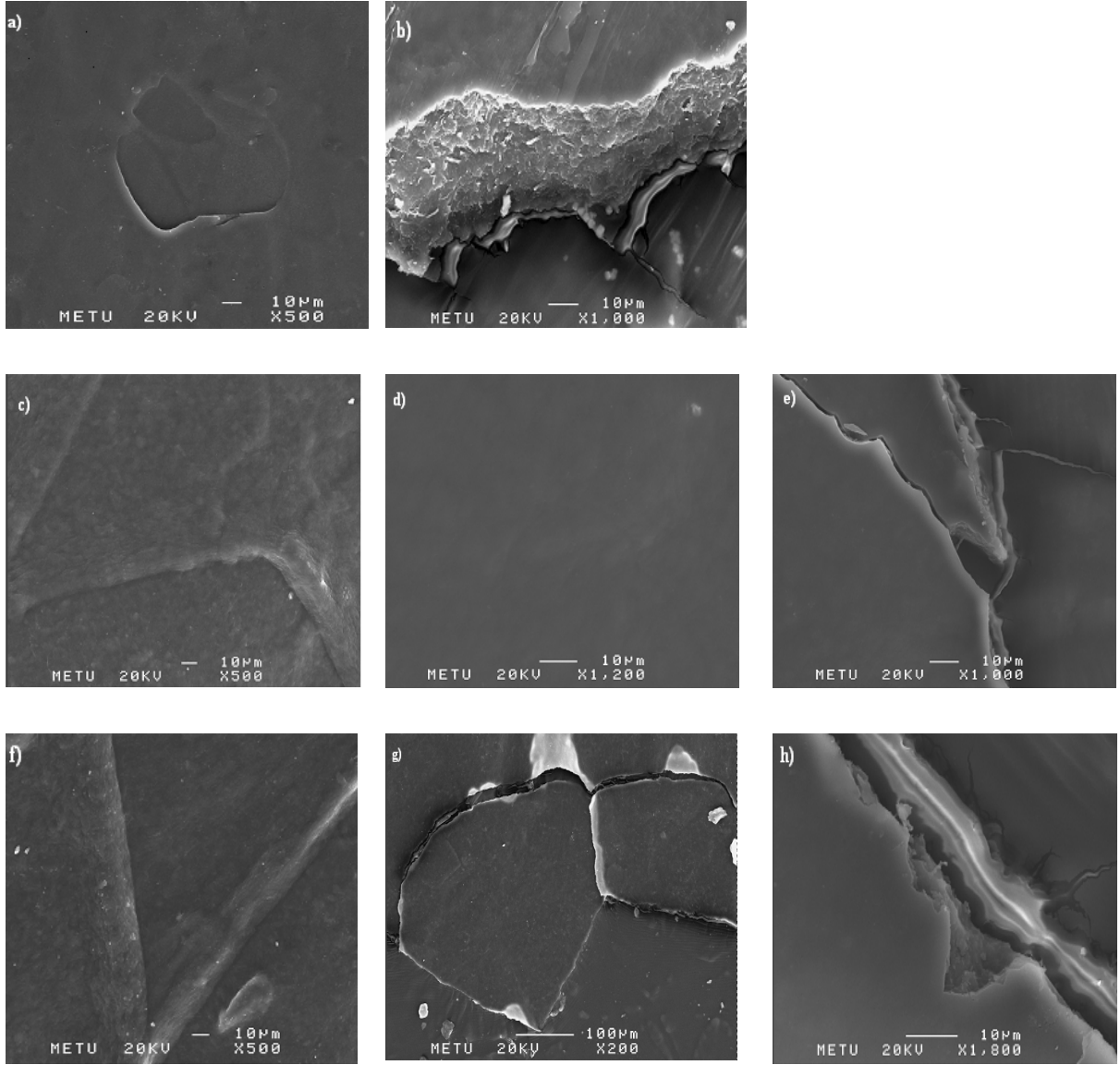
Şekil 4.81. HaCaT keratonosit hücrelerinin kollajen ve kollajen-serisin

a) Kalın, b) İnce membranlar yüzeyinde çoğalmaları.

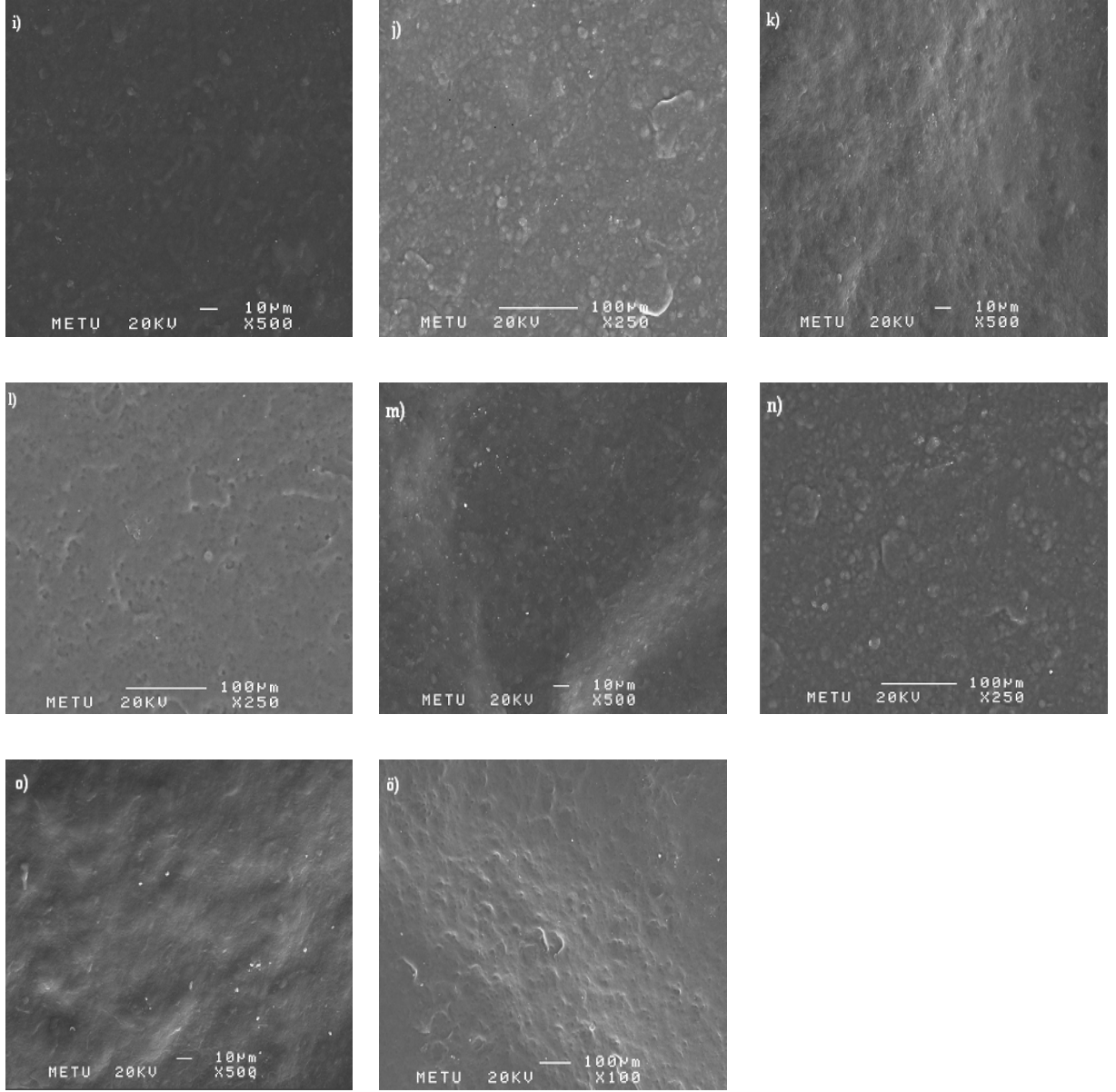
Kontrol yüzey olarak polistiren hücre kap yüzeyleri kullanılmıştır

Işık mikroskopisi yanında, ekilen hücrelerin membran yüzeyleri ile ilişkisi 24 saat sonunda hücre morfolojilerinin taramalı elektron mikroskopisi ile incelenmesi ile yapılmıştır. Hücrelerin membran yüzeylerinin incelenmesi için öncelikle hücre ekilmemiş çapraz bağlanmamış ve

bağlanmış membran yüzeyleri sıfırncı ve suda bekletildikten sonra incelenmiştir (Şekil 4.82). Farklı serisin-kollajen oranlarında hazırlanmış membranların sıfırncı zamanlarında membranların bazı bölgelerinde çatlaklar görüntülenmiştir (Şekil 4.82 b, d, h). Görüntülenen bu çatlakların çok ince olan membranların yüzeyden çıkarılma aşamalarında veya taramalı elektron mikroskopi için örnek hazırlama sırasında oluştuğu düşünülmektedir. Hazırlanan membranların suda bekletilmeleri ile de, membran yüzeylerinde derin çatlakların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.82 a, c, f, g). Ancak, aynı kompozisyonlarda hazırlanan ve çapraz bağlanan membran yüzeylerinde hem sıfırncı zaman hem su ortamında bekletildikten sonra çatlaklar veya yırtılmalar gözlenmemiştir (Şekil 4.82 i-ö). Bu da, çapraz bağlanmanın ince serisin-kollajen membranlarını daha sağlam yapılara dönüştürdüğünü göstermektedir.



Şekil 4.82. Farklı serisin-kollajen oranlarında hazırlanmış membranların taramalı elektron mikroskopi görüntüleri: a) 1/2 (suda bekletilmiş), b) 1/2 (sıfırncı zaman), c) 1/3 (suda bekletilmiş), d)1/3(sıfırncı zaman), e) 1/3 T0, f) 1/4 (suda bekletilmiş), g) 1/4 (suda bekletilmiş), h) 1/4 (sıfırncı zaman)

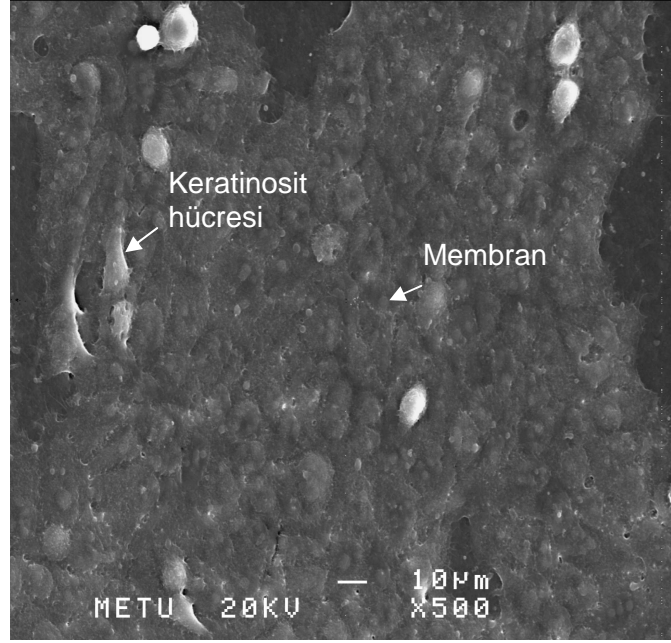


Şekil 4.82. (devamı) Farklı serisin-kollajen oranlarında hazırlanmış ve çapraz bağlanmış membranların taramalı elektron mikroskopi görüntüleri: i) 1/1X (çapraz bağlanmış, suda bekletilmiş), j) 1/1X (çapraz bağlanmış, sıfırinci zaman), k) 1/2X (çapraz bağlanmış, suda bekletilmiş), l) 1/2 (sıfırinci zaman), m) 3X (çapraz bağlanmış, suda bekletilmiş), n) 3X (çapraz bağlanmış, sıfırinci zaman), o) 4X (çapraz bağlanmış, suda bekletilmiş), ö) 4X, (çapraz bağlanmış, suda bekletilmiş)

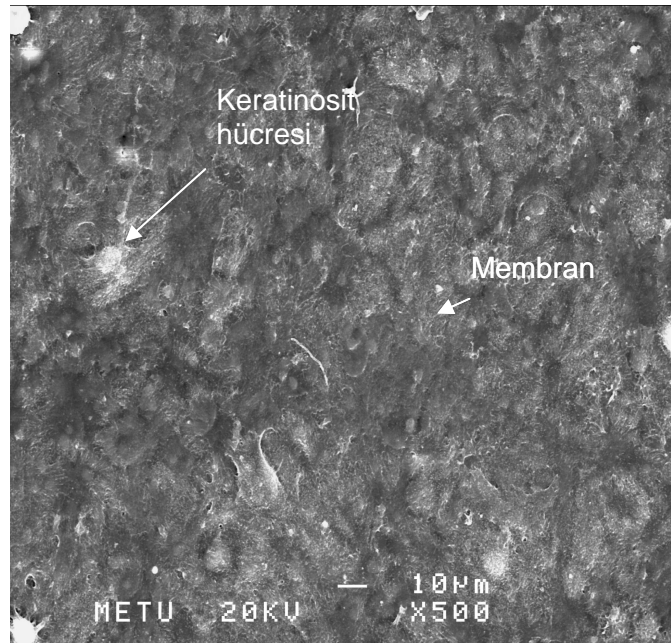
Kollajen-serisin membranlarına derinin epidermis tabakasında yer alan keratinosit hücreleri ve dermis tabakasında yer alan fibroblast (3T3) hücreleri ayrı ayrı ekilmiş ve membranların bu hücrelerle uyumluluğu taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir. Keratinosit ekilen ince ve kalın membranlarda hücrelerin membranın orta kısmında (ekildikleri bölgede) yoğun olarak tutundukları ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında bu yüzeyde canlılıklarını korudukları gözlenmiştir (Şekil 4.83). Aynı hücrelerin 7 günlük inkübasyon sonucundaki membran yüzeyinde sadece orta kısımda olmayıp daha geniş bir alana yayıldıkları, ama yine de ilk ekim bölgesinde üstüste 2.-3. katmanları oluşturarak ortada daha yoğun bir çoğalma oluşturdukları görülmüştür (Şekil 4.84). Hücrelerin ekilme bölgesindeki konfluent görüntüsü kalın ve ince membranlarda 24 saatlik süreçte farklılık göstermezken, 7 günlük süreçte kalın membranların ekilme bölgesinde incelere göre daha yoğun çoğalmaları, hücreler açısından ince membranda yayılmanın daha kolay olduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.85). İnce membranlarda hücrelerin membran yüzeyinde dağınık (bölgesel) olmaları da bunu desteklemektedir. Genel olarak keratinosit hücrelerinin hazırlanan tüm membranlarda yakın düzeyde tutunma ve çoğalma özelliğinde olduğu ancak kollajenin yüksek olduğu kompozit grupta (2/1) serisinin yüksek olduğu gruba göre (1/2) hücre tutunması ve yayılmasının daha iyi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.86)

Diğer hücre türü olan 3T3 hücrelerinde ise, bu hücrelerin yapısı gereği daha büyük ve fazla uzantılarla yüzeye tutundukları, bu nedenle membranların yüzeyinde keratinositler kadar yoğun bir hücre kaplanması gözlenmemiştir. Ancak, bu hücrelerin literatürden ve grubumuzun daha önceki çalışmalarından bilinen, yüzey tutunma yönünden değerlendirildiğinde yine hem kalın hem de ince membranlarda hücrelerin yüzeyi çok uyumlu buldukları ve istenen düzeyde yayılma gösterdikleri görülmüştür (Şekil 4.87). Yine kompozit grupları arasında değerlendirildiğinde, yüksek kollajen içeren kompozitin yüksek serisin içerenden daha iyi hücre yayılması sonucu bulunmuştur (Şekil 4.88).

Genel olarak membranların hepsinde 1. ve 7. günde hücrelerin çoğunlukla yüzeye tutundukları ve canlılıklarını korudukları, yüzeyde zamanla orantılı 3 boyutlu yayılma gösterdikleri görülmüştür. Bu sonuçla, membranların toksik etkisinin bulunmadığı görülmektedir.



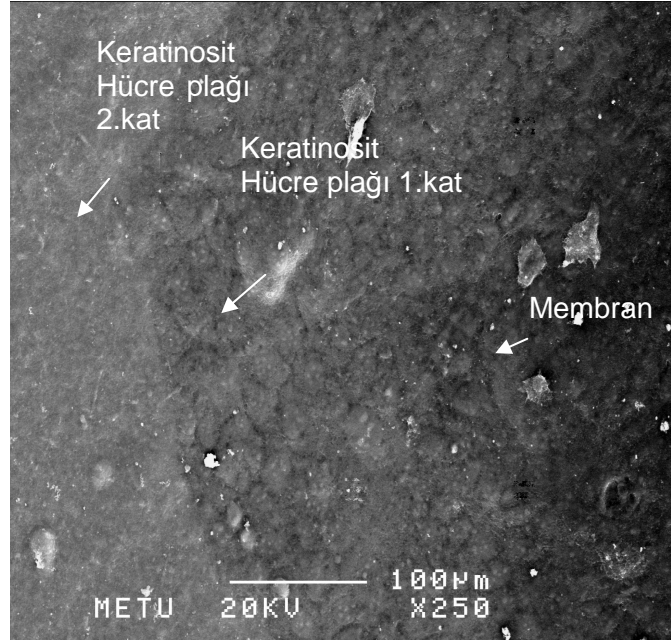
a)



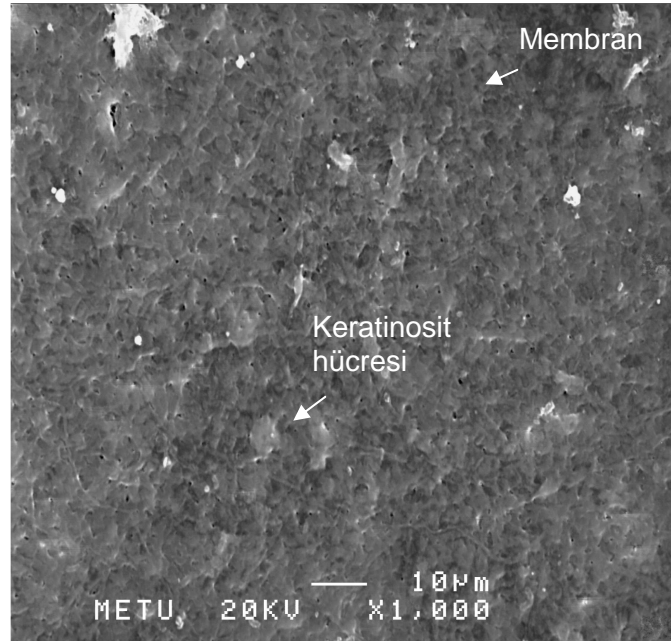
b)

Şekil 4.83. Kollajen membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin, 24 saat inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri

a) Kalın membran b) İnce membran



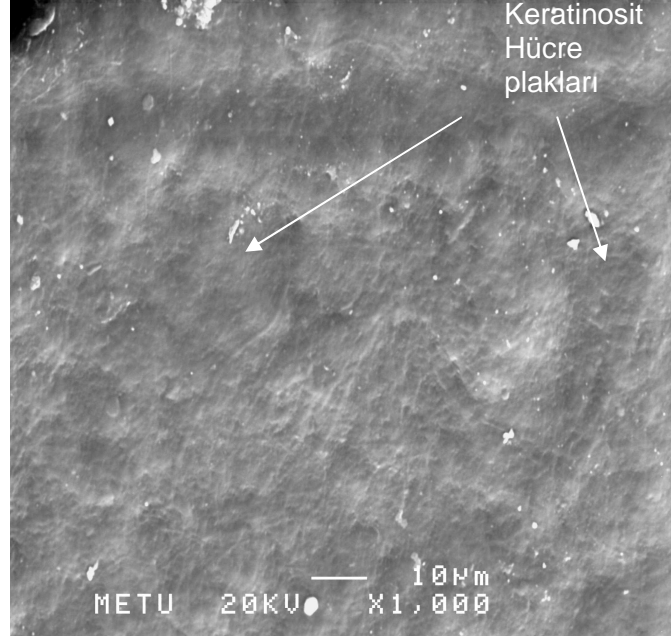
a)



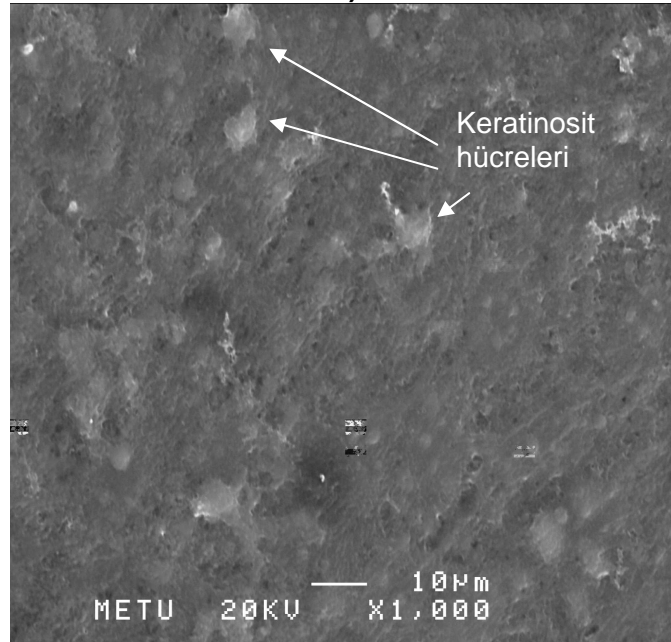
b)

Şekil 4.84. Kollajen-serisin (2/1) membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri

a) Kalın membran b) İnce membran

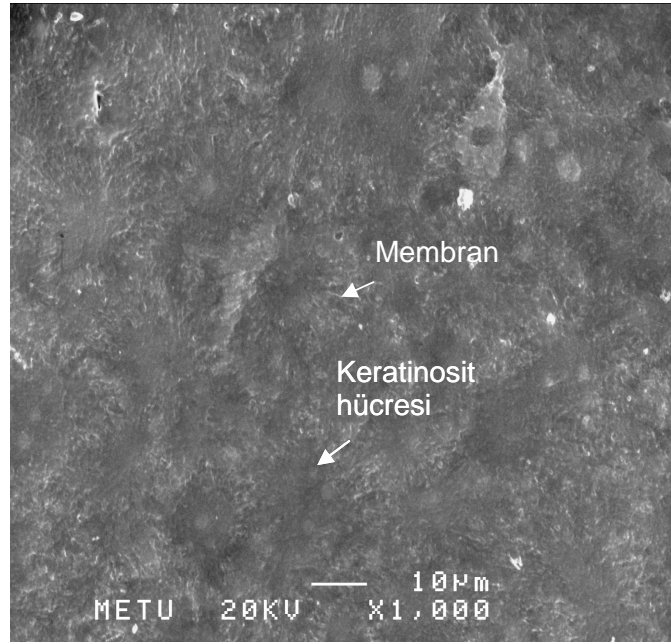


a)

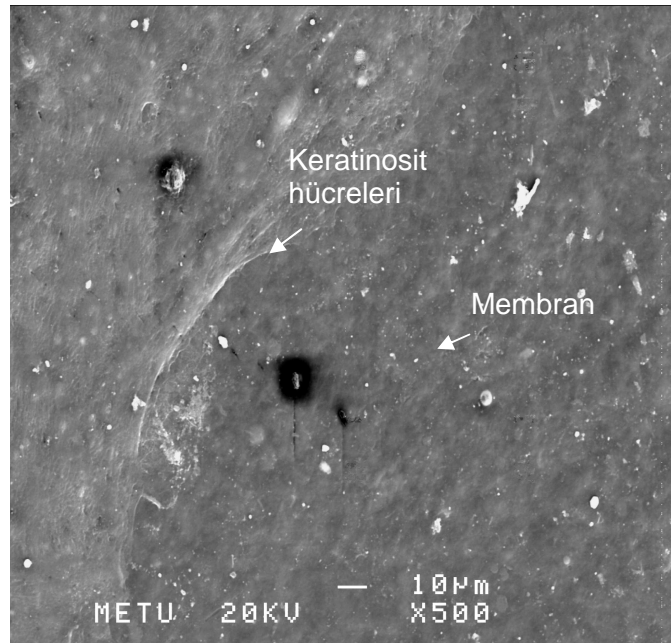


b)

Şekil 4.85. a) Kollajen-serisin (1/1) membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin 7 günlük inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri
a) Kalın membran b)İnce membran

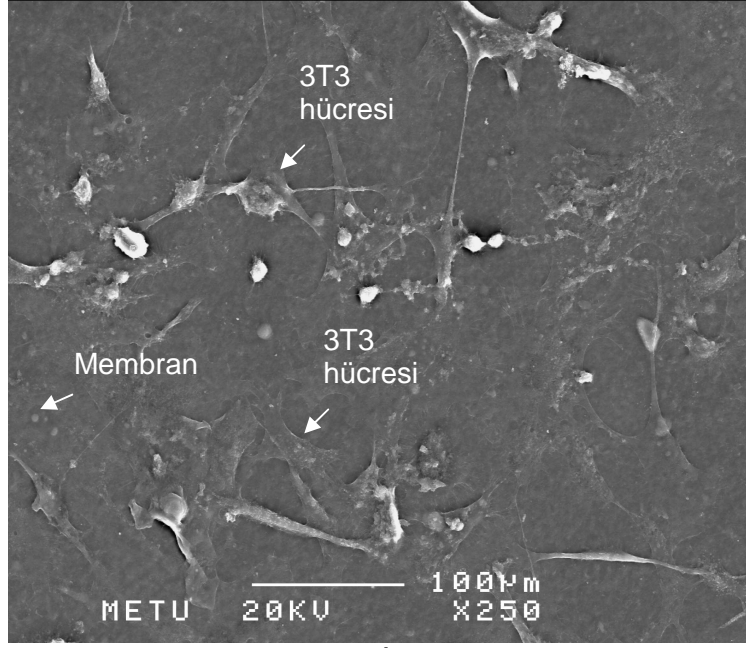


a)

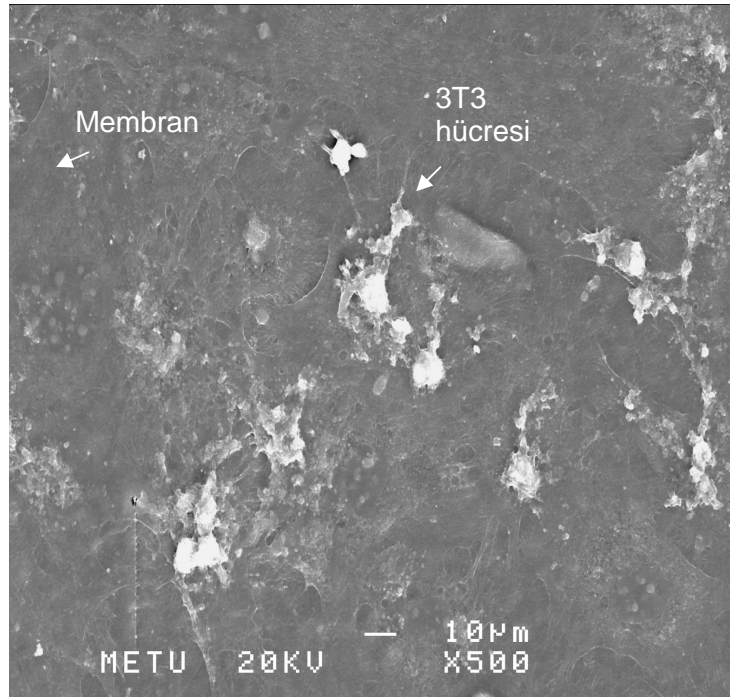


b)

Şekil 4.86. a) Kollajen-serisin (2/1) kalın membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin, b) Kollajen-serisin (1/2) kalın membranlara ekilmiş keratinosit hücrelerinin 7 günlük inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri



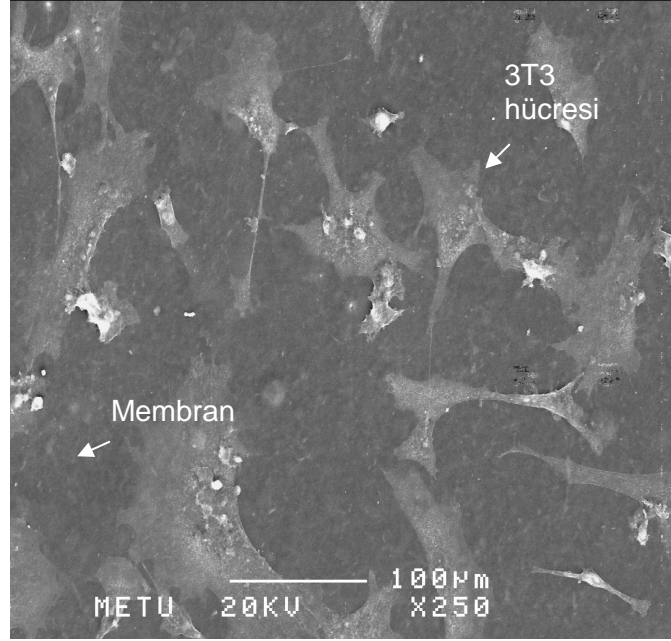
a)



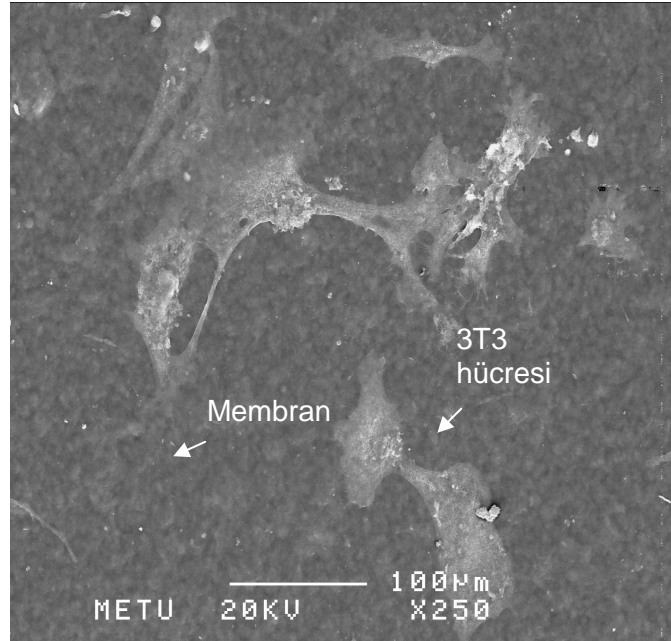
b)

Şekil 4.87. Kollajen-serisin (1/1) membranlara ekilmiş 3T3 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri

a) İnce membran, b) Kalın membran



a)

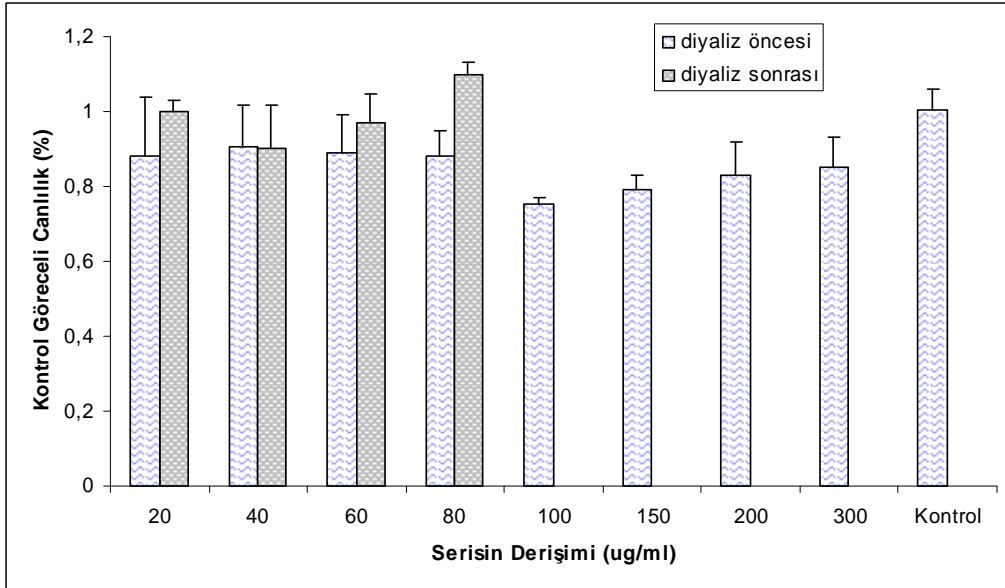


b)

Şekil 4.88. a) Kolajen-serisin (2/1) kalın membranlara ekilmiş 3T3 hücrelerinin, b) Kollajen-serisin (1/2) kalın membranlara ekilmiş 3T3 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri

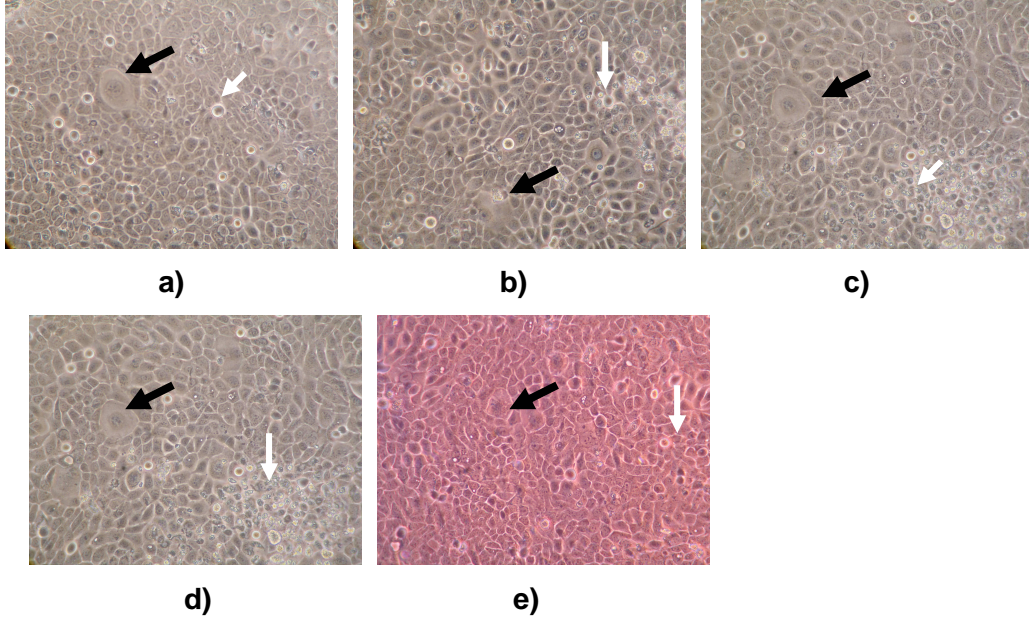
4.3.3. Geri Kazanılmış Serisinin Sitotoksite Sonuçları

Proje ekibi tarafından Bursa'da faaliyet gösteren bir boyahaneden temin edilen ipek ipliği pişirme atıksularından serisin geri kazanılmıştır. Elde edilen serisinin kollajen ile deri yama örtüsü olarak uygulanabilirliğinin incelenmesi HaCaT keratinosit hücreleri kullanılarak sitotoksite deneyleri ile gerçekleştirilmiştir. Böcekten gelen protein ve ortamda kalmış olabilecek deterjan artıklarından kurtulmak için elde edilen serisin 1 gece boyunca suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz öncesi ve sonrasında elde edilen serisin solusyonlar farklı derişimlerde keratinosit hücrelerinin üzerine ekildikten 48 saat sonra MTT canlılık testi ile mikroskopik incelemeler yapılmıştır (Şekil 4.89 -4.90).



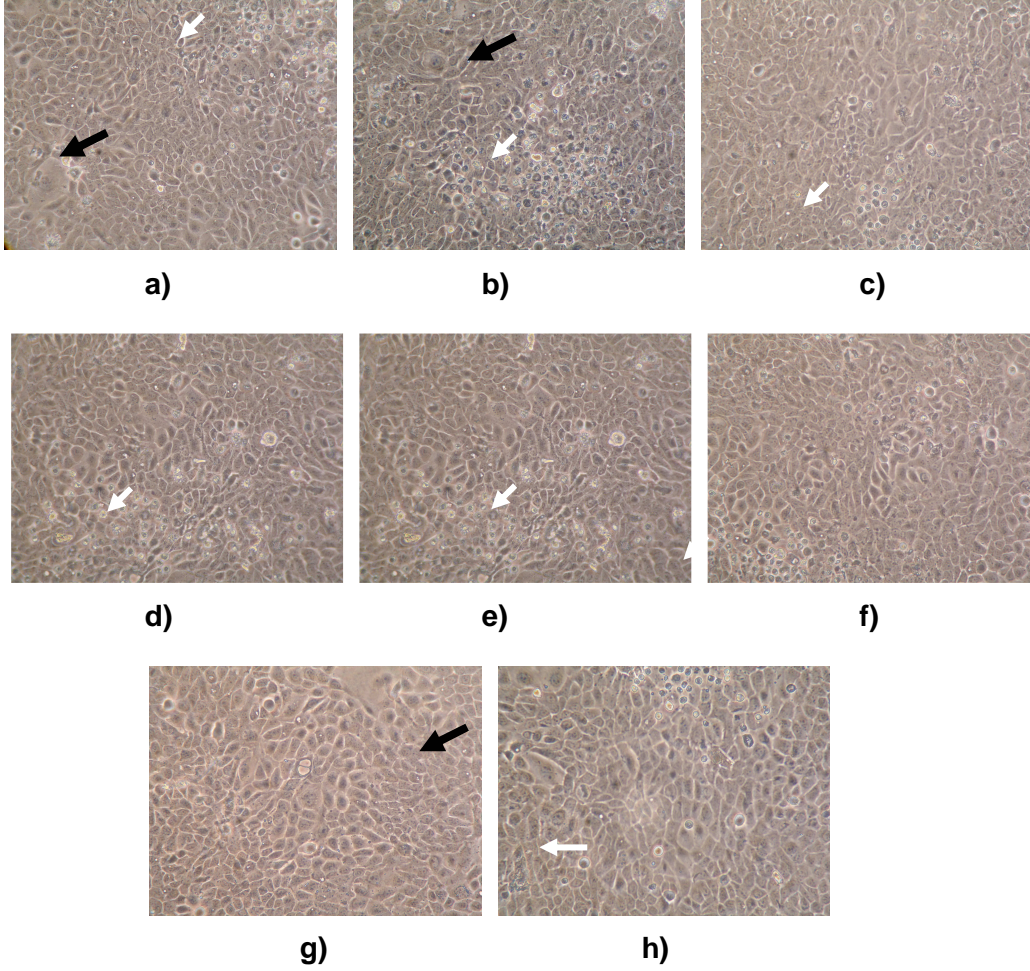
Şekil 4.89. Diyaliz öncesi ve sonrasında farklı derişimlerde geri kazanılmış serisinin HaCaT keratinosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerinin incelenmesi

Şekil 4.90'da görüldüğü gibi diyaliz yapılmayan serisin, kontrol hücelere göre (serisin eklenmeyen) derişime bağılı olarak % 10 ile % 20 arasında hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur. Bunun yanında diyaliz sonrasında elde edilen serisin için çalışılan derişim aralığında (20-80 $\mu\text{g/ml}$) elde edilen sonuçların kontrol hücrelerinin canlılığından farklı olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca diyaliz sonrasında elde edilebilen en yüksek konsantrasyon olan 80 $\mu\text{g/ml}$ eklenen gruplarda keratinosit hücrelerinin canlılığında diğer gruplardan daha fazla artışa neden olduğu görülmüştür. Bu sonucun, serisin proteinin literatürde verilen hücreler üzerinde koruyucu ve besleyici etkilerine bağılı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.90. HaCaT keratinosit hücrelerinin diyaliz yapılmış farklı derişimde serisin örnekleri ile 48 saatlik inkübasyon sonundaki faz kontrast ışık mikroskop fotoğrafları (20 X büyütme) a) 20 µg/ml, b) 40 µg/ml, c) 60 µg/ml, d) 80 µg/ml, e) Kontrol (serisin eklenmemiş). Siyah oklar morfolojik değişimi (örnek: hücreiçi vakulleşmeyi), beyaz oklar ölüme gitmiş hücreleri göstermektedir

Şekil 4.90 ve 4.91' de görüldüğü gibi, geri kazanılmış serisin diyaliz öncesi veya sonrasında hücre popülasyonunun büyük çoğunluğunda morfolojik değişimlere sebep olmamıştır. Işık mikroskopu grafiklerinde görülen yuvarlak hücre sayıları, derişime bağlı ve diyaliz yapılıp yapılmamasına bağlı olarak artmaktadır.

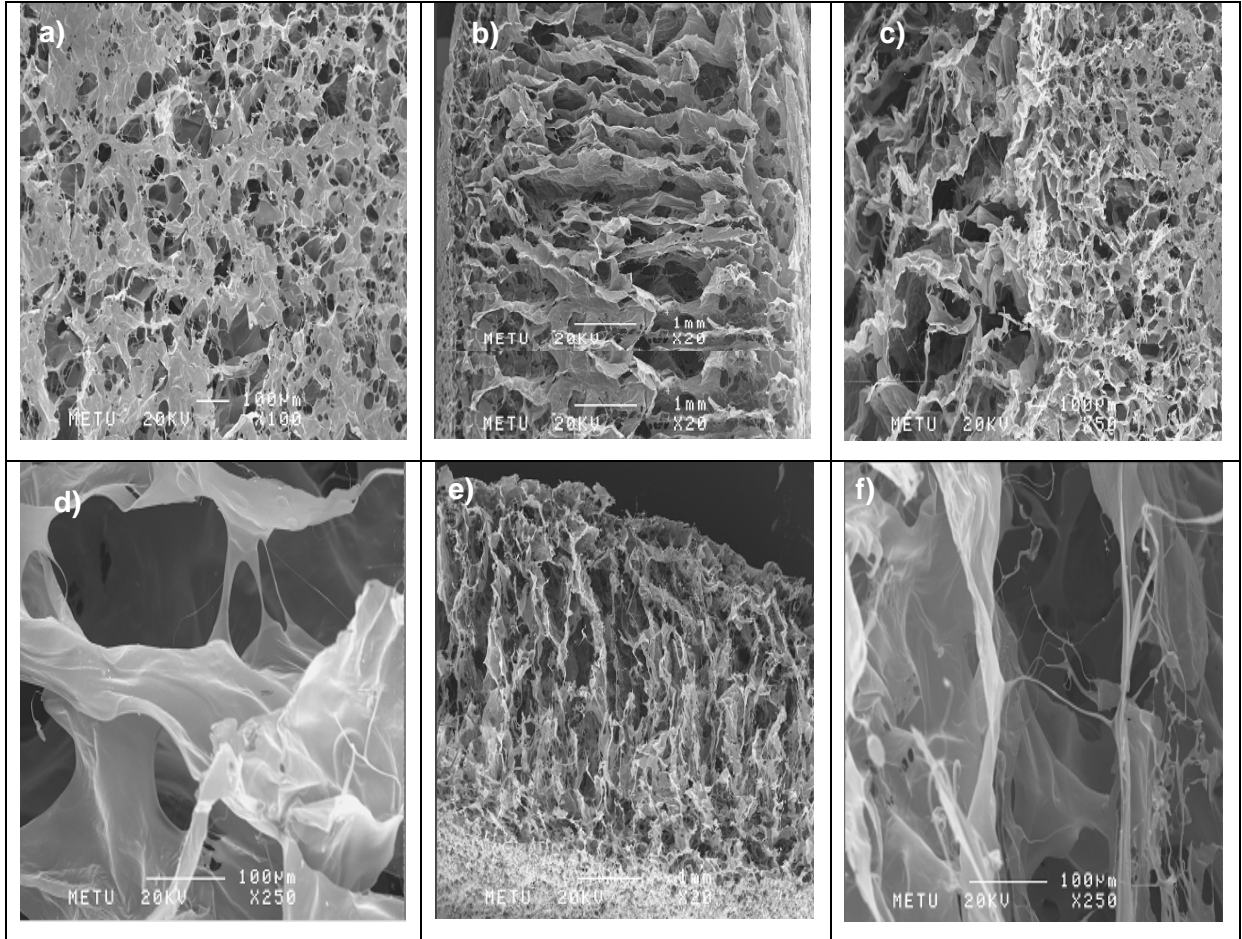


Şekil 4.91. HaCaT keratinosit hücrelerinin diyaliz yapılmamış farklı derişimde serisin örnekleri ile 48 saatlik inkubasyon sonundaki faz kontrast ışık mikroskop fotoğrafları (20 X büyütme). a) 20 µg/ml, b) 40 µg/ml, c) 60 µg/ml, d) 80 µg/ml, e) 100 µg/ml, f) 150 µg/ml, g) 200 µg/ml, h) 300 µg/ml. Siyah oklar morfolojik değişimi (örnek: hücreiçi vakulleşmeyi), beyaz oklar ölüme gitmiş hücreleri göstermektedir

4.3.4. Kollajen ve Kollajen-Serisin Köpükler Hazırlanması

Kollajen ve kollajen-serisin köpük hazırlanması proje planında bulunmamaktadır. Ancak, membranlarda iyi sonuç veren bu kompozisyonlar iki bileşenin jelleşme özellikleri kullanılarak dondurma ve liyofilizasyon yöntemiyle gözenekli köpükler hazırlanmıştır (Şekil 4.92). Ancak, köpükler çapraz bağlayıcı solusyonuna daldırma veya buharına maruz bırakma yöntemlerinde üç boyutluluklarında ve yüzey gözenekliliklerinde büyük kayıplar yaşandığı için bu çalışmaların ileride daha farklı bir projede gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Serisin/kollajen köpüklerinin genel özelliklerinin belirlenmesinden önce, gözeneklilik ve gözenek dağılımı özellikleri taramalı elektron mikroskopisi ile incelenmiştir (Şekil 4.92). Yüzeyde ve kesitte açık gözeneklilik bulunduğu ve gözeneklerin hücre büyütülmesine uygun boyutlarda olduğu görülmektedir. Köpüklerin yapısında görülen kırılgen özellikleri ile, yüksek gözeneklilikteki iç yapılarının uyumlu olduğu düşünülmektedir. Benzer nedenle, serisin oranının en yüksek olduğu 2/1 gruplarında gözenek boyutlarının büyüklüğü ve daha az bağlantılı olması nedeniyle, daha kırılgen köpükler elde edilmiştir. Morfolojik değerlendirmeler sonrasında en homojen köpük yapısının 1/1 serisin/kollajen oranıyla elde edilebildiği bulunmuştur. Ancak, bu yapının suda dayanıklılığının artırılması için, membranlarda olduğu gibi, çapraz bağlanma veya başka bir malzeme ile kuvvetlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.



Şekil 4.92. Gözenekli serisin/kollajen içeren köpüklerin taramalı elektron mikroskopi görüntüleri: a) 1/2 yüzey, b) 1/2 kesit, c) 1/2 yüzey kesit ayrımı, d) 1/2 gözenek yapısının yakından görüntüsü, e) 2/1 kesit, f) 2/1 gözenek yapısının yakından görüntüsü

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu projede koza pişirme ve ipek ipliği pişirme atıksularından membran işlemleri ile serisin geri kazanımı çalışılmıştır. En uygun ön-arıtma ve geri kazanım süreçleri belirlenmiştir. Ardından geri kazanılmış serisin ile paketleme sektörüne yönelik bir biyofilm hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Ayrıca yara/yanık örtüsü olabilecek kollajen-serisin bazlı membranlar hazırlanmış ve biyoyumluluk testleri yapılmıştır. Bu projede yürütülen bütün deneysel çalışmalardan elde edilen bulgularla aşağıdaki sonuçlara varılmıştır. Öneriler de bu bölümde sunulmuştur:

1. Türkiye’de tekstilin bir alt sektörü olan ipek işleme endüstrisinde üretilen atıksularda bol miktarda serisin bulunmaktadır. Koza pişirme atıksularında (KPA) 2006 yılında yaklaşık 1.4 ton serisinin atıksu ile birlikte atıldığı, ipek ipliği pişirme atıksularında (İPA) ise bu miktarın yaklaşık 11,7 ton olduğu tespit edilmiştir. Serisin oldukça değerli bir proteindir, piyasadaki satış fiyatı 80-90 AVRO/gram’dır. Dolayısıyla, Türkiye’de yaklaşık 12 ton olan serisin potansiyeli, geri kazanımı sağlandığında, bu maddenin ciddi bir ekonomik fayda sağlayacağı gerçeğini açıkça göstermektedir. Bu aşamada proje ekibinin önerisi, bu projenin devamında sanayi-üniversite işbirliğinin güçlendirilmesi ve bu proje kapsamında laboratuvar ölçeğinde elde edilen sonuçların pilot ölçekte test edilmesi ve hatta ipek işleme endüstrisinde bir serisin geri kazanım tesisinin kurulması için gerekli olan girişimlerin başlatılmasıdır.
2. KPA ve İPA karakterizasyonu sonucunda, KPA’nda 4 farklı serisin molekül ağırlığı tespit edilmiştir. Bunlar Serisin-1 (175-200 kDa), Serisin-2 (70-90 kDa), Serisin-3 (30-40 kDa) ve Serisin-4 (10-25 kDa) olarak adlandırılmıştır. Bu polipeptidler, atıksuda %5-25, %53-69, %4-8 ve %12-22 oranlarında bulunmuştur. KPA’nda en yüksek oranda Serisin-2 bulunduğu ortaya çıkmıştır. Molekül ağırlığının bu kadar geniş bir aralıkta dağılmış olması, literatür bilgileriyle uyumludur. Bunun nedeni, ipeğin işlenmesi aşamalarında serisinin daha küçük parçalara ayrılmasıdır. Diğer yandan, İPA’ndaki serisin için 110-120 kDa arasında tek bir molekül ağırlık aralığı tespit edilmiştir. Her iki atıksuda bulunan serisinin, biyo-bazlı malzeme üretimine uygun olan büyük molekül ağırlıklı serisin olduğu sonucuna varılmıştır.

3. Koza pişirme atıksuyunda serisin haricinde yabancı bir madde tespit edilmiştir. Bu maddenin, MALDI-TOF analizi ile ipekböceğinden gelen bir protein olduğu bulunmuştur. Saf serisin elde edilebilmesi için bu maddenin uzaklaştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.
4. KPA için cazibeyle çöktürme, santrifüj ve mikrofiltrasyon işlemlerinin ayrı ayrı ve ardışık uygulanması sonucunda, en uygun ön-arıtma işleminin, santrifüj (SFJ) + mikrofiltrasyon (MF (1 µm) olduğu bulunmuştur. En iyi süzüntü suyu kalitesi ve kirlilik parametreleri için en yüksek giderim performansı seçilen işlemde elde edilmiştir. Ön-arıtma sürecinde ikinci kademe arıtma yöntemi olarak MF seçilmesi, ardından gelen UF (20 kDa) işleminde gözlenen akı azalmasını %88'den %80'e düşürmüştür. Ayrıca, öncesinde MF uygulanan UF (20 kDa) işleminde kimyasal yıkama ile akı geri kazanımı %83'ten %104'e çıkmıştır. Bu nedenle, KPA için en uygun ön-arıtma sürecinin SFJ + MF (1 µm) olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada MF deneyleri düz akış düzeninde yürütülmüş, dolayısıyla akı azalması MF aşamasında oldukça yüksek olmuştur. Çapraz akış düzeninde tekrarlanması önerilen deneylerle, MF'in akı performansı konusunda daha sağlıklı sonuçlar elde edilecektir.
5. Serisin geri kazanımı için en uygun membran işleminin seçilebilmesi amacıyla, UF (1 kDa, 5 kDa ve 20 kDa) ve NF (NF-DK and NF-90) membranları test edilmiştir. UF işlemlerinde serisin tutulma oranı %36-60 arasında kalmış, KOİ giderimi ise %41-52 olmuştur. UF membranları yalnızca en yüksek molekül ağırlık dağılımına sahip olan Serisin-1'i tamamen tutabilmiş, diğer serisin polipeptidlerini ise kısmen tutabilmiştir. Buna ek olarak, konsantrasyon polarizasyonu ve membranların yüzeyinde oluşan jel tabaka nedeniyle akı azalması %58-88 kadar yüksek olmuştur. Diğer yandan, NF membranlarının serisin tutma performansı %94-95 kadar yüksek olmuştur. Buna ek olarak, NF-DK ve NF-90 membranlarının KOİ, toplam katı madde, renk ve bulanıklık giderimleri de %90-99, %90-98, %97-100 ve %93-98 olmuştur. NF-90 süzüntü suyu kalitesi, ek bir arıtma gerektirmeden deşarj edilmeye uygun bulunmuştur. NF işleminde de akı azalması %70-75 kadar yüksek olmuştur. Konsantrasyon polarizasyonunun UF akı azalması üzerindeki etkisi %30-69 arasında değişmiş, NF'te ise %63-64 olmuştur. UF membranlarında kirlenme etkisi de %33-75 kadar yüksektir. Diğer yandan, kirlenme etkisi NF'te yalnızca %20-30 olmuştur. Bu bulgular, NF'in UF'ten hem tutma/giderim verimi hem de akı azalması bakımından daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymuştur. UF işlemi, kısmi geri kazanım sağlayacağı

için uygun bulunmamış, ancak serisinin farklı molekül ağırlık aralığına sahip polipeptidlerinin ayrılması amacıyla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

6. Yüksek akı azalması gözlenmesine rağmen, NaOH ve serbest klor kullanılan kimyasal yıkama işlemi ile membranların saf su akıları geri kazanılmıştır. Saf su geri kazanım oranı UF için %83-105, NF için ise %95-127 olmuştur.
7. Test edilen membranların hiç birisi serisin ile ipekböceği proteinini tam olarak ayıramamıştır. Buna ek olarak, NF-90 membranı ipekböceği proteinini daha yüksek oranda tutmuştur. Bu da, NF-90 ile geri kazanılan serisinin NF-DK'ya kıyasla daha fazla safsızlık içermesi anlamına gelmektedir. Bu, gerikazanılan ürünün kalitesi bakımından arzu edilen bir durum değildir. Yine de, serisinin yoğunlaştırılması deneylerinde her iki membran da kullanılmıştır. Hacim azaltma faktörü, 4,2-4,6 olacak şekilde atıksu yoğunlaştırılmış, NF-DK ve NF-90 membranları için akı azalma oranları %62-78% ve %95 olmuştur. Kimyasal yıkama işlemi ile, NF-DK'nın akıları %81-118 arasında iyileştirilmiş, ancak NF-90'ın akıları için elde edilen geri kazanım oranı %75'te kalmıştır. Dolayısıyla, NF-DK'nın KPA'dan serisin geri kazanımı için daha uygun bir membran olduğu sonucuna varılmıştır.
8. Yoğunlaştırılan serisin çökeltmesi aşamasında en uygun kimyasalın bulunması amacıyla 4 çeşit asit ve alkol denenmiştir. Asit olarak HNO₃, HCl, H₂SO₄, C₂H₄O₂, alkol olarak da C₂H₆O kullanılmıştır. Geri kazanılan serisin örneklerinin kalitesi elementel analiz, çözünürlük ve UV-tarama ile değerlendirilmiştir. Elementel analiz, referans serisinin C, H, N, ve S içeriğine en yakın örneklerin HCl ve C₂H₆O ile elde edildiğini göstermiştir. Ancak, HCl ile çökeltilen örneğin çözünürlüğü, asidik pH koşulunda %53-66 kadar düşük olmuş, ancak alkali pH (11) koşulunda tam çözünürlük sağlanmıştır. Diğer yandan, etanol ile çökeltilen serisin örneği bütün pH aralığında (3-11) tamamen çözünür olmuştur. Bu bulgulardan, serisin için en uygun çökeltme kimyasalının etanol olduğu sonucuna varılmıştır.
9. Geri kazanılan serisin örneklerinin HPLC analizi ile, elde edilen tozda serisinin %39-46 oranında bulunduğu, geri kalan kısmın ise ipekböceği proteini olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, 'SFJ + MF (1 µm) + NF + etanol ile çökeltme' işlemlerinden oluşan geri kazanım süreci ile, serisin/ipekböceği proteini karışımı elde edilmiştir. Bu karışımda serisinin molekül ağırlığı 90 kDa ve geri kazanım verimi %76'dır. Bu ürün

'düşük kaliteli serisin' olarak adlandırılmış ve uygulama alanı olarak hayvan yemi üretimi, yün, pamuk gibi tekstil ürünlerinin güçlendirilmesi vb. önerilmiştir.

10. Geri kazanılan serisin/ipekböceği proteininde bulunan serisinin tanımlanması için, iyon değişimi kromatografisi, 2-D jel elektroforezi ve MALDI-TOF analizleri yaptırılmıştır. Bu analizler, geri kazanılan serisinin asidik bir protein olduğunu ve izoelektrik noktasının 5-6 olduğunu göstermiştir. İki protein grubu tespit edilmiş ve MALDI-TOF analizi ile, ExPASy protein veri tabanında molekül ağırlıkları 9161 Da olan SER1 serisin (O96614) ve 20302 Da olan SER2 serisin (O96615) ile uyumlu oldukları bulunmuştur. Sonuç olarak, geri kazanılan proteinin serisin olduğu kanıtlanmıştır.
11. Serisin ve ipekböceği proteinini ayırabilmek amacıyla diyaliz işlemi uygulanmıştır. İpekböceği proteini tamamen uzaklaştırılmış ve saf serisin elde edilmiştir. Bu durumda, serisin geri kazanımı için 'SFJ + MF (1 µm) + NF + diyaliz + etanol ile çökeltme' işlemlerinden oluşan alternatif bir süreç önerilmiştir. Bu süreçte geri kazanılan serisinin %20'sinin molekül ağırlığı 44 kDa ve %80'inin molekül ağırlığı 85 kDa olarak bulunmuştur. Bu ürün 'yüksek kaliteli serisin' olarak adlandırılmış ve biyomalzeme üretiminde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.
12. İpek ipliği pişirme atıksuyu için en uygun ön-arıtma işleminin asidik pH (3,5) koşulunda SFJ + soğukta cazibelye çökeltme (4 °C, 24 saat) olduğu bulunmuştur. Bu süreçte atıksuda bulunan serisinin sabundan ayrılması sağlanmıştır. Soğukta çökeltme yerine oda sıcaklığında bekletmenin de uygulanabileceği görülmüş, ve bunun endüstriyel ölçekte daha uygun olabileceği düşünülmüştür. Ancak, laboratuvar koşullarında soğukta çökeltme daha kolay uygulanmıştır.
13. İPA'dan serisin geri kazanımı için üç alternatif süreç denenmiştir: 1. SFJ (pH 7,7, 10 dak) + UF (20 kDa) (pH 7,7) 2. SFJ (pH 7,7, 10 dak) + UF (20 kDa) (pH 3,5), 3. SFJ (pH 3,5, 10 dak) + Cazibelye çökeltme (4 °C, 24 saat) + UF (5 kDa) (pH 3,5). Birinci ve ikinci süreçlerde serisinin sabundan membran işlemi ile ayrılamadığı farkedilmiştir. Üçüncü süreçte ise, serisin sabundan ön-arıtma işlemi ile ayrılmış, UF ise serisini yoğunlaştırma amacıyla kullanılmıştır. Kirlilik parametrelerinin giderim verimleri UF (20 kDa)'da UF (5 kDa)'a kıyasla daha iyi olmuştur. Buna ek olarak, UF (5 kDa) membranının serisin tutma oranı %59'da kalmıştır. UF (20 kDa) ise serisinin tamamen tutabilmiş, ancak sabundan ayıramamıştır. Her iki membranda da aki

azalması ciddi boyuttadır; UF (20 kDa)'da pH 7,7'de %85 ve pH 3,5'te %94; UF (5 kDa)'da ise pH 3,5'te %88 olmuştur. Kimyasal yıkama ile UF (20 kDa)'nın akıları tamamen (%89-97) geri kazanılmıştır. Ancak UF (5 kDa)'da bu oran yalnızca %31 olmuştur. Bunun nedeni, besleme suyunda oldukça yüksek derişimde serisin bulunması, ve ön-arıtma aşamasında sabunun tamamen giderilmesi nedeniyle serisinin membran yüzeyini daha fazla kirletmesidir. Bu bulgular değerlendirildiğinde, İPA'ndan serisin geri kazanımı için en uygun sürecin 'SFJ (pH 3,5, 10 dak) + Cazibeyle çökeltme (4 °C, 24 saat) + membran filtrasyonu' olduğu sonucuna varılmıştır. Proje süresinin sona ermesi ve mali kaynakların tükenmesi nedeniyle deneysel çalışmalar bu noktada sonlandırılmıştır. Proje ekibinin önerisi, gelecekte en uygun membranın bulunması için membran deneylerinin farklı pH koşullarında tekrarlanmasıdır.

14. Sabunun atıksudan tamamen uzaklaştırıldığından, yağ asitlerinin GS-MS analizi ile emin olunmuştur. UF (5 kDa) membranının besleme ve süzöntü suları analiz edilmiş ve yağ asitlerine rastlanmamıştır. Sonuç olarak, serisinin sabundan tamamen ayrıldığı kesin olarak anlaşılmış ve geliştirilen sürecin başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu aşamada proje ekibi, sabunun da geri kazanılabileceğini öngörmekte ve gelecekte bu konuda çalışmalar yapılmasını önermektedir.

15. Atıksudaki sabun, İPA'ndan serisin geri kazanımını zor bir iş haline getirmiştir. Buna ek olarak, İPA'ndan ciddi bir çevresel kirlilik kaynaklanmaktadır. İpek ipliğininin pişirilmesi için çevreye daha az zararlı bir yöntem olarak literatürde sabunsuz pişirme önerilmiştir. Bunun için gerekli olan, 3-4 bar basınçta ve yüksek sıcaklıkta çalışacak kazanların temin edilmesidir. Bu kazanlarda yalnızca su kullanılarak ipek ipliğinden serisinin uzaklaştırılması mümkündür. Proje kapsamında olmasa dahi, bu yöntemin uygulanabilirliğini anlamak amacıyla laboratuvar ortamında otoklav kullanarak yaklaşık 2 bar basınç altında ipek ipliği pişirme işlemi simüle edilmiştir. Konvansiyonel işlemde serisinin uzaklaşması ile iplikte oluşan %25-27'lik ağırlık kaybı, bu deneyde %24 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, basıncın önerilen seviyelerde kullanılması ile daha yüksek oranda serisin giderimi sağlanacağı düşünülmektedir. Bu sonuçlar, çevreye daha az zarar verecek bir yöntemin rahatlıkla uygulanabileceğini göstermektedir. Proje ekibi, endüstriyel ölçekte bu uygulamanın hayata geçirilmesi için gerekli girişimlerin başlatılmasını önemle önermektedir. Böylece sabun kullanımı sona erecek, ipek ipliği pişirme atıksularınının çevreye verdiği zarar önlenmiş olacak ve

atıksuda serisin dışında önemli bir kirlilik olmayacağı için serisin geri kazanımı daha kolay bir yöntemle geri kazanılabilecektir.

16. Geri kazanılan serisin/ipekböceği proteini karışımı ile paketleme sektörüne yönelik bir biyofilm hazırlanmıştır. Bu film, serisin/PVA karışımı ile yapılmıştır. Serisin içeren filmlerin mekanik özelliklerinin paketleme malzemesi olmaya uygun olduğu bulunmuştur. Ancak, serisin filmlerin oksijen geçirgenliğini önemli ölçüde artırmıştır. Bu durumda, üretilen malzemenin projede önerildiği gibi gıda sektöründe kullanıma uygun olmadığı, ancak gıda dışı paketleme amacıyla rahatlıkla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Projenin bu kısmındaki deneysel çalışmalar, Imperial College, London ile kurulan bilimsel işbirliği kapsamında İngiltere’de yürütülmüş ve bunun için toplam 11 haftalık iki ziyaret gerçekleştirilmiştir. Zaman kısıtlaması ve Bölümümüz alt yapı olanaksızlıkları nedeniyle çalışmanın bu kısmı daha derinlemesine araştırılamamıştır. Bu proje kapsamında serisinin paketleme malzemesi olarak kullanılabilmesi konusunda bir fikir oluşturulmuştur. Ancak, konunun geniş kapsamlı olması nedeniyle, devamının ancak yeni bir proje ile gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

17. Proje kapsamında hazırlanan ikinci biyobazlı malzeme, yara/yanık örtüsü olarak kullanılması öngörülen membrandır. Farklı ağırlık oranlarına sahip kollajen-serisin membranlar ince ve kalın olarak hazırlanmıştır. Kollajen ve kollajen-serisin membranların sulu ortamda ve yaraya uygulandıktan sonra yapısal bütünlüklerini uzun süreli korumaları amacıyla glutaraldehit ile çapraz bağlanmışlardır. Çapraz bağlanma ile membranların sulu ortamda ağırlık kaybı azalmıştır. Bu nedenle membranları Yara-yanık örtüsü olarak değerlendirmek amacıyla yapılan tüm deneyler çapraz bağlanmış membranlar kullanılarak sürdürülmüştür. Serisin içeren farklı oranlardaki membranlarda su buharı geçirgenliği açısından bir farklılık gözlenmemiştir. Elde edilen değerler, su buharı geçirgenliklerinin istenilen standart üzerinde olduğunu, yaranın nemli tutulabileceğini ve kuruma riskinin azaltıldığını göstermektedir.

18. Bütün membranların bakteri geçirgenlik testlerinde bakteri geçmesinde bariyer görevini yerine getirme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu da, membranların hedeflenen diğer bir özellik olan yaranın bakteri enfeksiyonlarına karşı korunması kapasitesine olduğunu göstermiştir. Tüm serisin içeren membranların, su tutma

yüzdeleri ve oksijen geçirgenlik değerlerinin kollajen membranlardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu da kompozit yapıdaki membranların yarada oluşan pusun daha iyi emilebilmesini ve dokunun daha iyi nefes alabilmesini sağlayacağını düşündürmektedir.

19. Tüm kollajen-serisin kompozisyonları yara-yanık örtüsü olarak olumlu mekanik ve biyouyumluluk özelliklerini göstermiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, kalın kollajen-serisin membranların yara örtüsü olarak klinikte uygulanabilirlik potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Geri kazanılan serisin proteinin diyaliz sonrası hücreler üzerinde toksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır. Geri kazanıldıktan sonra, bu proteinin biyomedikal amaçlı olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda gelecekte aşağıdaki çalışmaların yapılması önerilmektedir:

- a. Hazırlanan membranlarının in vivo hayvan deneyleri ile test edilmeleri,
- b. Hazırlanan membranlara antibiyotik ve/veya büyüme faktörleri eklenerek yara bölgesinde enfeksiyonun azaltılmasını ve yara iyileşmesinin hızlandırılması ile ilgili çalışmalar yapılması,
- c. Doku mühendisliği amaçlı üç boyutlu ve gözenekli Kollajen-Serisin köpüklerinin Hazırlanması ve in situ/in vitro deneylerle değerlendirilmesi.

KAYNAKÇA

- AVUSTRALYA HÜKÜMETİ, Çevre, Su, Miras ve Sanat Bölümü, Madde Özellikleri Sayfaları, <http://www.npi.gov.au/database/substance-info/profiles/>, son giriş tarihi: 15/10/2008 (2007).
- ADEKOGBE, I., Ghanem, A., Fabrication and Characterization of DTBP-crosslinked Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering, *Biomaterials*, 26, 7241-7250, (2005).
- AKDAĞ, B., Kişisel İletişim, Kirman İplik San. Tic. Ltd. Şti., (2007).
- ALTMAN, G. H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R. L., Chen J., Lu H., Richmond J., Kaplan D. L., Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, 24, 401–416, (2003).
- ANNAMARIA, S., Maria R., Tullia M., Silvio S., Orio C., The microbial degradation of silk: a laboratory investigation, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 42(4), 203–11, (1998).
- APHA/AWWA/WEF Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. (Editors: A. D. Eaton, L. S. Clesceri and A. E. Greenberg); American Public Health Association, Washington DC, USA, 1995.
- ARAMWIT, P., Sangcakul, A., The Effects of Sericin Cream on Wound Healing in Rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2473-2477, (2007).
- ASABE (American Society of Agricultural and Biological Engineers), Thermal Properties and Inorganic Composition of Silk Fiber, <http://asae.frymulti.com/abstract.asp?aid=9235&t=2>, son giriş tarihi: 15/10/2008, (2008).
- ASTM D882 (Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting), <http://www.astm.org/Standards/D882.htm>, son giriş tarihi: 15/10/2008.
- ASTM E96-00 (Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials), <http://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/E96-00.htm>, son giriş tarihi: 15/10/2008.
- AUDIC, J. L., Chaufer, B., Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate, *European Polymer Journal*, 41, 1934-1942, (2005).
- BARREDO-DAMAS, S., Alcaina-Miranda, M.I., Iborra-Clar, M.I., Bes-Pià, A., Mendoza-Roca, J.A., Iborra-Clar, A., Study of the UF Process as Pretreatment of NF Membranes for Textile Wastewater Reuse, *Desalination*, 200, 745-747, (2006).

- BİYOTEKNOLOJİ PROJESİ, The UV Absorbance Spectra of Nucleic Acids and Proteins, http://matcmadison.edu/biotech/resources/methods/labManual/unit_4/exercise_15.htm, son giriş tarihi: 21/07/2008, (2008).
- BTTG, Report 5: Waste Minimization and Best Practice, British Textile Technology Group, http://www.e4s.org.uk/textileonline/content/6library/fr_library.htm, (1999).
- CARIC, M.D., Milanović, S.D., Krstić, D.M., Tekić, M.N. Fouling of Inorganic Membranes by Adsorption of Whey Proteins, *Journal of Membrane Science*, 165, 83-88, (2000).
- CHEN, J. P., Chang, G-Y., Chen, J. K., Electrospun Collagen/chitosan Nanofibrous Membrane as Wound Dressing, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 313-314, 183-188, (2007).
- CHO, K. Y., Moon, J. Y., Lee, Y. W., Lee, K. G., Yeo, J. H., Kweon, H. Y., Kim, K. H., Cho, S. C., Preparation of Self-assembled Silk Sericin Nanoparticles, *Int. J. Biol. Macromol.*, 32, 36-42, (2003).
- CHOVE, B.E, Grandison, A.S., Lewis, M.J., Some functional properties of fractionated soy protein isolates obtained by microfiltration. *Food Hydrocolloids*, 21, 1379-1388, (2007).
- CRAWFORD, J.G., Stober, S.R., Preparation of Soluble Chymosin or Prochymosin from Recombinant E.Coli-by Solubilizing with Urea and Renaturing, with Removal of Urea by Ultrafiltration for Recycle and Specific Membrane Cleaning Procedure[R]. EP0657466. (1995).
- CORTEZ, J., Anghieri, A., Bonner, P.L.R., Griffin, M., Freddi, G., Transglutaminase Mediated Grafting of Silk Proteins onto Wool Fabrics Leading to Improved Physical and Mechanical Properties, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1698-1704, (2007).
- ÇAPAR, G., Development of a Membrane Based Treatment Scheme for Water Recovery from Textile Effluents, Doctor of Philosophy's Thesis, Middle East Technical University, Ankara, Turkey, (2005).
- DAVIDSOHN, J., Better, E.J., Davidsohn, A., Soap Manufacture, Interscience Publishers, Inc., New York, (1953).
- DEMLING, R. H., Desanti, L., Orgill, D. P., Biosynthetic Skin Substitutes: Purpose, Properties and Clinical Indications, Use of Skin Substitutes, *Biosurgery.org*, <http://www.biosurgery.org>, (2003).

- DOLE, P., Jolya, C., Espuche, E., Alric, I., Gontard, N., Gas Transport Properties of Starch Based Films, *Carbohydr. Polym.*, 58, 335-343, (2004).
- DUBOIS, M, Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28, 350-356, (1956).
- EWA (European Water Association), *Efficient Use of Water in the Textile Finishing Industry*, (2005).
- FABIANI, C., Pizzichini, M., Spadoni, M., Zeddita, G., Treatment of Waste Water from Silk Degumming Processes for Protein Recovery and Water Reuse, *Desalination*, 105, 1-9, (1996).
- FAKHURI, F. M., Tanada-Palmu, P. S., Grosso, C. R. F., Characterization of Composite Biofilms of Wheat Gluten and Cellulose Acetate Phthalate, *Braz. J. Chem. Eng.*, 21, 261-264, (2004).
- FERSI, C., Gzara, L., Dhahbi, M., Treatment of Textile Effluents by Membrane Technologies, *Desalination*, 185, 399-409, (2005).
- FROGET, S., Barthelemey, E., Guillot, F., Soler, C., Courdet, M.C., Benbaunan, M., Dosquet, C., Wound Healing Mediator Production by Human Dermal Fibroblasts Grown within A Collagen-GAG Matrix for Skin Repair in Humans, *Eur Cytokine Netw*, 14, 60-64, (2003).
- GARCIA, M. A., Pinotti, A. Zaritzky, N. E., Physicochemical, Water Vapor Barrier and Mechanical Properties of Corn Starch and Chitosan Composite Films, *Starch/Stärke*, 58, 453–463, (2006).
- GAREL, A., Deleage, G., Prudhomme, J.C., Structure and Organization of the *Bombyx Mori* Sericin 1 Gene and of the Sericins 1 Deduced from the Sequence of the Ser 1B Cdna, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27, 469–477, (1997).
- GEÇİT, M.R., Çapar, G., Keskin, D., Tezcaner, A., Tekstil Atıksularından Serisin Proteininin Geri Kazanılması ve Serisinin Yeniden Kullanım Olanaklarının Araştırılması, TÜBİTAK MAG 106 M 062 no'lu Araştırma Projesi 2. Gelişme Raporu, (2007a).
- GILBERT, V., Rouabhi M., Wang H., Arnould A. Remondetto G., Subirade M., Characterization and evaluation of wheyprotein-based biofilms as substrates for in vitro cell cultures, *Biomaterials*, 26, 7471–7480, (2005).

- GOMATHI, K., Gopinath, D., Rafiuddin, M. A., Jayakumar, R., Quercetin Incorporated Collagen Matrices for Dermal Wound Healing Process in Rat, *Biomaterials*, 24, 2767-2772.
- GONTARD, N., Guilbert, S., Bio-packaging: Technology and Properties of Edible and/or Biodegradable Material of Agricultural Origin, *Food Packaging and Preservation*, ed: Mathlouthi, M., Blackie Academic & Professional, New York, 159-181, (1994).
- HATAKEYAMA, H., Biodegradable sericin-containing polyurethane and its production. Japan Patent 08-012738A, (1996).
- HIROTSU, T., Nakajima, S., Water-alcohol separation by pervaporation through silk fibroin membranes, *Sen'i Gakkaishi*, 44(2), 70-77, (1988).
- HORCH, R. E., Kopp, J., Kneser, U., Beier, J., Bach, A. D., Tissue Engineering of Cultured Skin Substitutes, *J Cell Mol Med*, 9(3), 592-608, (2005).
- KABAYAMA, M., Synthetic resin pumice and its production, Japan Patent 2000-014592A, (2000).
- KAYSERİLİOĞLU, B.S., Bakır, U., Yılmaz, L., Akkaş, N., Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: Mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties, *Bioresource Technology*, 87, 239-246, (2003).
- KEISER, H. W., Stark, G. B., Koop, J., Balcerkiewicz, A., Spilker, G., Kreysel, H.W., Cultured Autologous Keratinocytes in Fibrin Glue Suspension, Exclusively and Combined with STS allograft, *Burns*, 20, 23-29, (1994).
- KESKİN, D. S., Tezcaner, A., Korkusuz, P., Korkusuz, F., Hasırcı, V., Collagen-chondroitin Sulfate-based PLLA-SAIB Coated rhBMP-2 Delivery System for Bone Repair, *Biomaterials*, 26, 18, 4023-4034, (2005).
- KIM CHI, D., Wastewater from Production Activities in Craft Villages and Some Mitigation Solutions, (2005).
- KIM, S. J., Gas Permeation Through Water-swollen Sericin/PVA Membranes, (Master Thesis), University of Waterloo, Ontario, Canada, (2007).
- KING, S. R., Hickerson, W. L., Proctor, K. G., Beneficial Actions of Exogenous Hyaluronic Acid on Wound Healing, *Surgery*, 109, 76-84, (1991).
- KODAMA, K. (1926), The Preparation and Physico-Chemical Properties of Sericin, 1208-1222, <http://www.biochemj.org/bj/020/1208/0201208.pdf>.

- KRIEG, R.C., Dong, Y., Schwamborn, K., Knuechel, R., Protein Quantification and Its Tolerance for Different Interfering Reagents Using the BCA-Method with Regard to 2D SDS PAGE, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65, 13-19, (2005).
- KROCHTA, J. M., De Mulder-Johnston, C., Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities, *Food Technol.*, 51, 61-74, (1997).
- KURIOKA, A., Kurioka, F., Yamazaki, M., Characterization of Sericin Powder Prepared from Citric Acid-Degraded Sericin Polypeptides of the Silkworm, *Bombyx mori*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (4), 774-780, (2004).
- KURIOKA, A., Yamazaki, M., Purification and Identification of Flavonoids from the Yellow Green Cocoon Shell (Sasamayu) of the Silkworm, *Bombyx mori*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1396-1399, (2002).
- KWON, B., Molek, J., Zydney, A. L., Ultrafiltration of PEGylated Proteins: Fouling and Concentration Polarization Effects, *Journal of Membrane Science*, 319, 206-213, (2008).
- LIU, C., Caothien, S., Hayes, J., Caothuy, T., Otoyoy, T., Ogawa, T., Technical Papers, Membrane Chemical Cleaning, From Art to Science, Pall Corporation, (2004). <http://www.pall.com/pdf/mtcpaper.pdf>, son giriş tarihi: 15/10/2008.
- LV, Q., Hu, K., Feng, Q., Cui, F., Fibroin/collagen Hybrid Hydrogels with Crosslinking Method: Preparation, Properties, and Cytocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 84, 1, 198-207, (2008).
- MIZOGUCHI, K., Iwatsubo, T., Aisaka, N., Separating Membrane Made of Cross-Linked Thin Film of Sericin and Production Thereof, Japan Patent 03-284337A, (1991).
- MONDAL, M., Trivedy, K., Nirmal Kumar, S., The Silk Proteins, Sericin and Fibroin in Silkworm, *Bombyx mori*, *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 5, 63-76, (2007).
- MORI, H., Tsukada M., New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials, *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74, 95-103, (2000).
- MORRISON, R.T., Boyd, R.N., Organic Chemistry, 6th ed., Prentice Hall, (1992).
- MURASHITA, Y., Nakayama, Y., Hirano, T., Ohashi, S., Acceleration of Granulation Tissue Growth by Hyaluronic Acid in Artificial Skin, *Br J Plast Surg*, 49, 58-63, (1996).
- NAKAMURA, K., Koga Y., Sericin-containing polymeric hydrous gel and method for producing the same, Japan Patent 2001-106794A, (2001).

- NOMURA, M., Iwasa Y., Araya H., Moisture absorbing and desorbing polyurethane foam and its production, Japan Patent 07-292240A, (1995).
- OGINO, M., Tanaka, R., Hattori, M., Yoshida, T., Yokote, Y., Takahashi, K., Interfacial Behavior of Fatty-acylated Sericin Prepared by Lipase-catalyzed Solid Phase Synthesis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 1, 66-75, (2006).
- PANILAITIS, B., Altman, G. H., Chen, J., Jin, H. J., Karageorgiou, V., Kaplan, D. L., Macrophage Response to Silk, *Biomaterials*, 24, 3079-3085, (2003).
- PARK, S. N., Kim, J. K., Suh, H., Evaluation of Antibiotic-loaded Collagen-hyaluronic Acid Matrix as a Skin Substitute, *Biomaterials*, 25, 3689-3698, (2004).
- PARRA, D. F., Tadini, C. C., Ponce, P., Lugao, A. B., Mechanical Properties and Water Vapor Transmission in Some Blends of Cassava Starch Edible Films, *Carbohydr. Polym.*, 58, 475-481, (2004).
- PARRY, D. A. D., Craig, A. S., Collagen Fibrils During Development and Maturation and Their Contribution to the Mechanical Attributes of Connective Tissue, *Collagen*, ed: Nimni, M. E., Vol: 2, CRC Press, Boca Raton, FL., 1-24, (1988).
- RHO, K. S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B. M., Park, Y. J., Electrospinning of Collagen Nanofibers: Effects on the Behavior of Normal Human Keratinocytes and Early-stage Wound Healing, *Biomaterials*, 27, 1452-146, (2006).
- RIGUERIO, J.P., Elices, M., Llorca, J., Viney, C., Tensile Properties of Silkworm Silk Obtained by Forced Silking, *Journal of Applied Polymer Science*, 82, 1928-1935, (2001).
- RUSZCZAK, Z, Effect of Collagen Matrices on Dermal Wound Healing, *Adv Drug Del Rev*, 55, 1595-1611, (2003).
- SAI, K. P., Babu, M., Collagen Based Dressings-a Review, *Burns*, 26, 54-62, (2000).
- SASAKI, M., Kato, N., Yamada, H., Consumption of Silk Protein Sericin Elevates Intestinal Absorption of Zinc, Iron, Magnesium and Calcium in Rats, *Nutrition Research*, 20(10), 1505-1511, (2000).
- SHEN, Y., Johnson, M.A., Martin, D.C. Microstructural Characterization of *Bombyx Mori* Silk Fibers, *Macromolecules*, 31, 8857-8864, (1998)
- SIEDLER, S., Schuller-Petrovic, S., Allogenic Keratinocytes Suspended in Human Fibrin Glue Used for Wound Healing Support in Chronic Leg Ulcers, *Arch. Dermatol*, 136, 676-678, (2000).

- SILK Biochemical Co. Ltd. <http://www.alibaba.com/catalog/10624740/Sericin.html>, son giriş tarihi: 21/07/2008.
- SİPAHIOĞLU, T. Kişisel İletişim, Batmaz Tekstil Sanayi ve Ticaret Ltd.Şti, (2007).
- SU KİRLİLİĞİ KONTROLÜ YÖNETMELİĞİ, Çevre Mevzuatı, Ankara, (2004).
- TAMADA, Y., Anticoagulant and Its Production, Japan Patent 09-227402A, (1997).
- TANADA-PALMU, P., Helen, Y., Hyvonen, L., Preparation, Properties and Applications of Wheat Gluten Edible Films. *Agr. Food Sci. Finland*, 9, 23-35, (2000).
- TANAKA, T., Antifrosting Method, Antifrosting Agent and Snow Melting Agent, Japan Patent 2001-055562A, (2001).
- TANODEKAEW, S., Prasitsilp, M., Swadison, S., Thavornytikarn, B., Pothsree, T., Patepasen, R., Preparation of Acrylic Grafted Chitin for Wound Dressing Application, *Biomaterials*, 25, 1453-1460, (2004).<
- TERAMATO, H., Miyazawa, M., Molecular Orientation Behavior of Silk Sericin Film as Revealed by ATR Infrared Spectroscopy, *Biomacromolecules*, 6, 2049-57, (2005).
- TERATOMO, H., Nakajima, K., Takabayashi, C., Chemical Modification of Silk Sericin in Lithium Chloride/Dimethyl Sulfoxide Solvent with 4-Cyanophenyl Isocyanate, *Biomacromolecules*, 5, 1392-1398, (2004).
- TSUBOUCHI, K., Igarashi, Y., Takasu, Y., Yamada. H., Sericin Enhances Attachment of Cultured Human Skin Fibroblasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 403-405, (2005).
- TÜFEKÇİ, N., Sivri, N., Toroz, İ., Pollutants of Textile Industry Wastewater and Assessment of its Discharge Limits by Water Quality Standards, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7, 97-103, (2007).
- VACANTI, J. P., Vacanti, C. A., The Challenge of Tissue Engineering, *Principles of Tissue Engineering*, ed: Lanza, R. P., Langer, R., Chick, W. L., Academic Press, (1997), 1-6.
- VAITHANOMSAT, P., Kitpreechavanich, V., Sericin Separation from Silk Degumming Wastewater, *Separation and Purification Technology*, 59, 129-133, (2008).
- WEI, T., Li, M. Z., Xie, R. J., Preparation and Structure of Porous Silk Sericin Materials, *Macromolecular Materials and Engineering*, 290, 188–194, (2005).
- WERE, L., Hettiarachchy, N. S., Kalapathy, U., Modified Soy Proteins with Improved Foaming and Water Hydration Properties, *Journal of Food Science*, 62(4), 821–823, (1997).

- WHEMELL, C. S. Fibres, Animal, Silk, Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, by J. F. Thorpe, M. A. Whiteley, and contributors, 4th Edition, Longmans Green and Co., New York, 5, 87-93, (1941).
- WIKIPEDIA, The Free Encyclopedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Om>, son giriş tarihi: 15/10/2008.
- WITTAYA-AREEKUL, S., Prahsarn, C., Development and In Vitro Evaluation of Chitosan–polysaccharides Composite Wound Dressings, *Int. J. Pharmaceutics*, 313, 123-128, (2006).
- WU, Y., Ahmed, A., Waghmare, R., Kahn, D., Cleaning Polyethersulfone Membranes after Ultrafiltration-diafiltration in Monoclonal Antibody Production, *Biopharm Int.*, 19, 4, 67-71, (2006).
- WU, J.H., Wang, Z., Xu, S.Y., Preparation and Characterization of Sericin Powder Extracted from Silk Industry Wastewater, *Food Chemistry*, 103, 1255-1262, (2007).
- YAMADA, H., Fuwa, N., Nomura, M., Synthetic Fiber Having Improved Hygroscopicity, Japan Patent 05-339878A, (1993).
- YOSHIKAWA, M., Murakami, A., Okushita, Y., A Blend Film Containing Agar or/and Agarose, and Sericin and Production, Japan Patent 2001-129371A, (2001).
- YOSHII, F., Kume, T., Makuuchi, K., Sato, F., Hydrogel Composition Containing Silk Protein, Japan Patent 2000-169736A, (2000).
- ZHANG, H., Magoshi J., Becker M., Chen J. Y., Matsunaga R., Thermal Properties of Bombyx Mori Silk Fibers, *J. Appl. Polym. Sci.*, 86, 1817-1820, (2002).
- ZHANG, Y.Q., Tao, M.L., Shen, W.D., Mao, J.P., Chen, Y., Synthesis of Silk Sericin Peptides-L-Asparaginase Bioconjugates and Their Characterization, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 136-145, (2006).
- ZHAORIGETU, S., Sasaki, M., Watanabe, H., Kato, N., Supplemental Silk Protein, Sericin, Suppresses Colon Tumorigenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-treated Mice by Reducing Oxidative Stress and Cell Proliferation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(10), 2181-2186, (2001).

EKLER

EK A

KPA'nın Saklama Koşullarının Membran Performansına Etkisi

Koza çekimi yalnızca sonbahar mevsiminde yapıldığından, koza atıksuları her zaman bulunamamaktadır. Dolayısıyla, Bursa'dan getirilen atıksu dondurularak saklanmış ve ihtiyaç duyuldukça çözülmüştür. Dondurularak çözülen atıksularda okunan toplam protein, renk ve bulanıklık değerlerinin, dondurulmamış atıksuya göre oldukça düşük olduğunun farkedilmesi nedeniyle, UF (5 kDa) deneyleri öncesinde atıksu hafif ısıtılarak içindeki protein miktarı eski seviyesine çıkarılmıştır (Tablo A.1). Burada, dondurulan atıksuda serisinin kristalleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Serisinin sıcak suda çözünürlüğü artan bir protein olması ve kozadan da sıcak suda pişirilerek çıkarılabilmesi nedeniyle deneylerde kullanılmak üzere serisin içeren atıksuyun ısıtılmasında bir sakınca görülmemiştir. Ancak yine de yapılan dondurma-çözme-ısıtma işleminin atıksu özelliğini ve UF performansını nasıl etkilediğini anlamak amacıyla laboratuvar koşullarında koza atıksuyu üretilmesine ve bu atıksu ile hem dondurma işlemi yapılmadan hem de dondurma-çözme-ısıtma işlemi yaparak UF deneyleri yapılmasına ve sonuçların karşılaştırılmasına karar verilmiştir.

Tablo A.1. Dondurma-çözme-ısıtma işlemlerinin atıksu özelliklerine etkisi

Parametre	Atıksu özellikleri		
	İşlem görmemiş	Dondurularak çözülmüş	Çözüldükten sonra 60 dakika ısıtılmış
T. Protein (mg/L)	9443	6208	9883
KOİ (mg/L)	11600	13220	14920
TKM (mg/L)	10238	11700	13130
Renk (Pt-Co)	8650	3180	25000
Bulanıklık (NTU)	771	122	1050

Isıtma işlemi renk ve bulanıklık değerlerini olumsuz etkilemiştir. Bu parametreler oldukça yükselmiş, renk 3180 Pt-Co'dan 25000 Pt-Co'a, bulanıklık ise 122 NTU'dan 1050 NTU'ya çıkmıştır. Diğer yandan, diğer parametreler için belirgin farklar gözlenmemiştir. Sonuç olarak, donmuş-çözülmüş ve ek olarak ısıtılmış örneklerin toplam protein ve KOİ değerleri arasındaki farklar oldukça büyük olduğundan, ısıtma işlemi gerekli görülmüştür.

Atıksu örneklerinin bozulmasını önlemek amacıyla yapılan dondurma-çözme-ısıtma (DÇİ) işleminin, membran performansı üzerinde olası etkilerini belirlemek amacıyla, laboratuvar koşullarında koza pişirme işlemi simüle edilmiş ve elde edilen atıksu (KPA-S), UF (5 kDa) membranı ile süzölmüştür. Simüle edilmiş atıksu (Tablo A.2) ile DÇİ işlemi öncesinde ve sonrasında UF (5 kDa) deneyi yapılmış ve sonuçlar Tablo A.3'te verilmiştir. UF (5 kDa) membranı ile elde edilen giderim verimleri, KOİ, TKM ve toplam protein için DÇİ öncesinde % 50-55 olmuş, DÇİ sonrasında ise % 48-54 olarak gerçekleşmiştir. Göröldüğü üzere, bu giderim verimleri oldukça yakındır. Benzer olarak, serisin gideriminde de önemli bir fark gözlenmemiş, % 33 olan giderim verimi, DÇİ işlemi sonrasında % 27 olarak elde edilmiştir. Ancak bu farkın, DÇİ işleminden kaynaklandığını söylemek mümkün değildir. Ön-arıtma ve UF (5 kDa) işlemleri birlikte değerlendirildiğinde ise, oldukça yakın sonuçlar elde edilmiştir. UF (5 kDa) membranları ile elde edilen süzöntü suyu kaliteleri de oldukça yakındır. Elde edilen verilerle, DÇİ işleminin uygulanmasında herhangi bir sakınca olmadığı sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla, deneysel çalışmalara dondurulmuş-çözölmüş ve ısıtılmış atıksularla devam edilmiştir.

Tablo A.2. Simüle edilen KPA özellikleri

Parametre	Atıksu Kalitesi	
	KPA-S	KPA-S (DÇİ)*
T. Protein (mg/L)	6159	5993
KOİ (mg/L)	7925	9030
TKM (mg/L)	7360	8050
Renk (Pt-Co)	5690	3970
Bulanıklık (NTU)	301	234
pH	7,1	6,7

*DÇİ: Donmuş, çözülmöl, ısıtılmış

Tablo A.3. DÇI işleminin UF (5 kDa) performansına etkisi

Atıksu	Uygulanan işlem	Çıkış kalitesi, Ölçülen değer (<i>Giderim, %</i>)						
		KOİ (mg/L)	Renk (Pt-Co)	Bulanıklık (NTU)	TKM (mg/L)	T. Protein (mg/L)	Serisin (mg/L)	pH
KPA-S (DÇI öncesi)	1. SFJ	7655 (3)	5380 (5)	276 (8)	7190 (2)	5531 (10)	-	6,5
	2. MF (1 µm)	7320 (4)	4480 (17)	192 (30)	7110 (1)	5285 (4)	4872 (-)	6,6
	3. UF (5 kDa)	3490 (52)	1170 (74)	17 (91)	3525 (50)	2379 (55)	3255 (33)	6,6
	SFJ+MF+UF	(56)	(79)	(94)	(52)	(61)	(-)	
KPA-S (DÇI sonrası)	1. SFJ	7005 (22)	2370 (40)	108 (54)	7290 (9)	4747 (21)	-	6,5
	2. MF (1 µm)	6875 (2)	2010 (15)	65 (40)	7120 (2)	5086 (0)	5083 (-)	6,6
	3. UF (5 kDa)	3565 (48)	850 (58)	16 (75)	3700 (48)	2337 (54)	3722 (27)	6,5
	SFJ+MF+UF	(61)	(79)	(93)	(54)	(61)	(-)	

EK B

Kimyasal Yıkamanın Membran Performansına Etkisi

Kirlenen membranları temizlemek amacıyla yıkama işleminde uygulanan NaOH ve serbest klor, bir filtre üreticisi firma tarafından UF membranları için önerilen kimyasallardır (WU vd., 2006). Klorun asidik ortamda daha zararlı etkileri olduğu, NaOH ile birlikte bazik ortamda uygulandığında zararlı etkilerinin olmayacağı da ayrıca rapor edilmektedir (LIU vd., 2004). Ancak, klor oldukça güçlü bir oksidan olduğundan, membran yüzeyinde aşınma ve gözeneklerin büyümesi gibi etkileri olabileceği düşünülerek klorun membran performansını nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bunun için, atıksu ile kirlenilen UF membranları, klor ve sodyum hidroksit ile bir defa yıkandıktan sonra ikinci kez atıksu ile kullanılmış ve tekrar aynı şekilde yıkamıştır. Elde edilen giderim performansları ve süzüntü suyu kalitesi Tablo B.1'de ve ikinci yıkama işleminin akı üzerine etkileri Tablo B.2'de verilmiştir.

Tablo B.1. Kimyasal yıkama işleminin UF performansına etkisi

Parametre	Süzüntü suyu kalitesi (<i>Giderim, %</i>)			
	Santrifüj + MF (1 µm) + UF (20 kDa)		Santrifüj + MF (1 µm) + UF (5 kDa)	
	Yıkama öncesi	Yıkama sonrası	Yıkama öncesi	Yıkama sonrası
KOİ (mg/L)	5205 (29)	5975 (28)	6210 (41)	6120 (44)
Renk (Pt-Co)	570 (53)	690 (55)	790 (64)	800 (71)
Bulanıklık (NTU)	7.2 (36)	6.1 (40)	9.9 (43)	8.0 (67)
TKM (mg/L)	6500 (14)	7175 (28)	5975 (68)	6625 (36)
Toplam protein (mg/L)	1624 (77)	-	3108 (44)	2731 (67)
Serisin (mg/L)	2080 (51)	-	3292 (52)	3989 (49)

Tablo B.2. Kimyasal yıkamanın membran akısı üzerine etkisi

İşlem	Akı (L/m ² /sa)				Akı azalması (%)				Akı geri kazanımı (%)
	Saf su I	Atıksu W	Saf su, temizlik öncesi F	Saf su, temizlik sonrası C	1 (F-W)/F	2 (I-F)/I	3 (C-F)/C	4 (I-C)/I	
Santrifüj +MF(1 µm) +UF(20 kDa)	54.3	10.9	24.4	48.9	55.5	55.0	50.0	10.0	90
Santrifüj +MF(1 µm) +UF(5 kDa)	46.2	6.1	9.5	43.4	35.7	79.4	78.1	5.9	94

- 1: Konsantrasyon polarizasyonu
2: Toplam kirlenme
3: Geri döndürülebilen kirlenme,
4: Geri döndürülemeyen kirlenme

Süzüntü suyu kalitesinde ve giderim performansında ikinci yıkama işlemi sonucunda önemli bir değişim gözlenmemiştir (Tablo B.1). İkinci yıkama sonunda elde edilen akı geri kazanım oranları da birinci yıkama işleminde olduğu gibi yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla uygulanan yıkama işleminin uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

EK C

Otoklav Süresinin Serisin Çözünürlüğüne Etkisi

Serisinin ağırlık olarak kozanın ne kadarını oluşturduğu ve otoklav süresinin suda çözünen serisin miktarına etkisi araştırılmıştır. Bunun için, 1 g'lık üç adet koza örneği hazırlanmış, kurutulmuş ve ağırlıkları belirlenmiştir. Kozalar, otoklavda 1, 2, ve 5 saat olmak üzere üç farklı süre boyunca 120 °C'de su içinde bekletilmiştir. Tablo C.1'den görüldüğü üzere, suda çözünen serisin miktarında, otoklav süresinin 1 saatten 2 saate çıkarılması ile % 4,5, 5 saate çıkarılması ile de % 7,7 oranında bir artış sağlanmıştır. Elde edilen artış, serisinin uzun süre otoklav yapıldığında uğrayacağı bozunma dikkate alındığında önemli bulunmamış ve otoklav süresinin 1 saat olarak uygulanmasına karar verilmiştir.

Tablo C.1. Otoklav süresinin serisin çözünürlüğüne etkisi

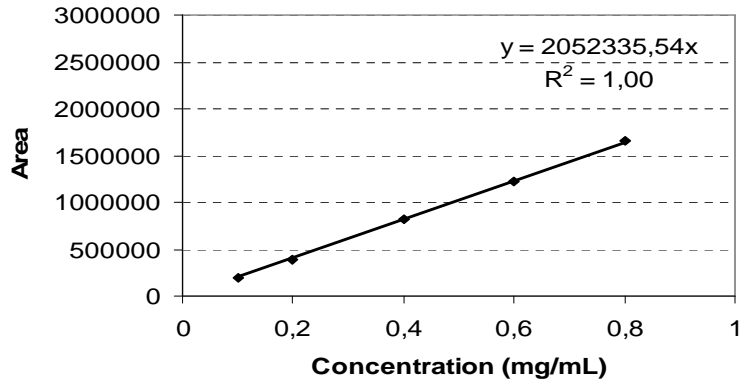
Otoklav süresi (saat)	Suda çözünme oranı (%)	Artış yüzdesi
1	22,2	-
2	23,2	4,5
5	23,9	7,7

EK D

Serisin ve T. Protein Analizleri için Kalibrasyon Standardının Seçilmesi

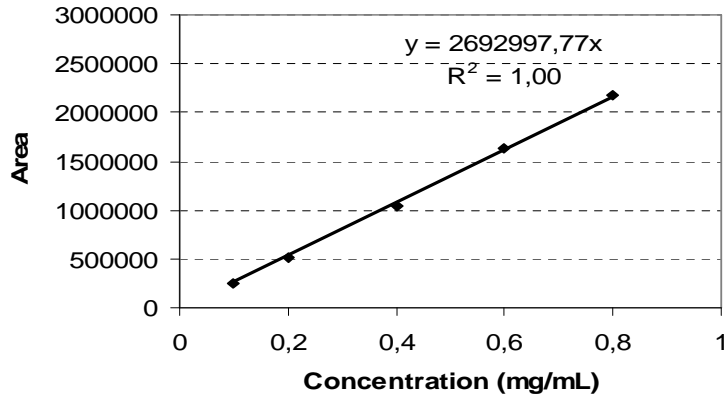
Kalibrasyon standardı olarak kullanılmak üzere S_C örneğinden hazırlanan çözeltilerde toz serisinin tam olarak çözünmediği ve çökelti oluştuğu farkedilmiştir. HPLC ile yapılan kalibrasyonlarda da S_C ile daha küçük alanlar okunmuştur; $y = ax$ biçiminde elde edilen kalibrasyon eğrilerinde, S_C kullanıldığında bulunan a değeri, S_N ile elde edilen değerlerin %76'sı kadar olmuştur. Şekil F.1'de görüldüğü üzere, S_C ile elde edilen alanın S_N ile elde edilen alan oranı 0,76'dır. Bu da serisin derişiminin olduğundan fazla hesaplanması demektir. Serisinin çözünürlüğünün pH 3,8'de en az olduğu ve proteinin bu pH değerinde çöktüğü bilinmektedir (KODAMA, 1926). Breziya'dan temin edilen serisinin pH değeri de 3,9 olduğundan, suda tam olarak çözünmemiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada kalibrasyon standardı olarak yerli serisinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Calibration with Brazilian sericin (S_C)



(a)

Calibration with native sericin (S_N)

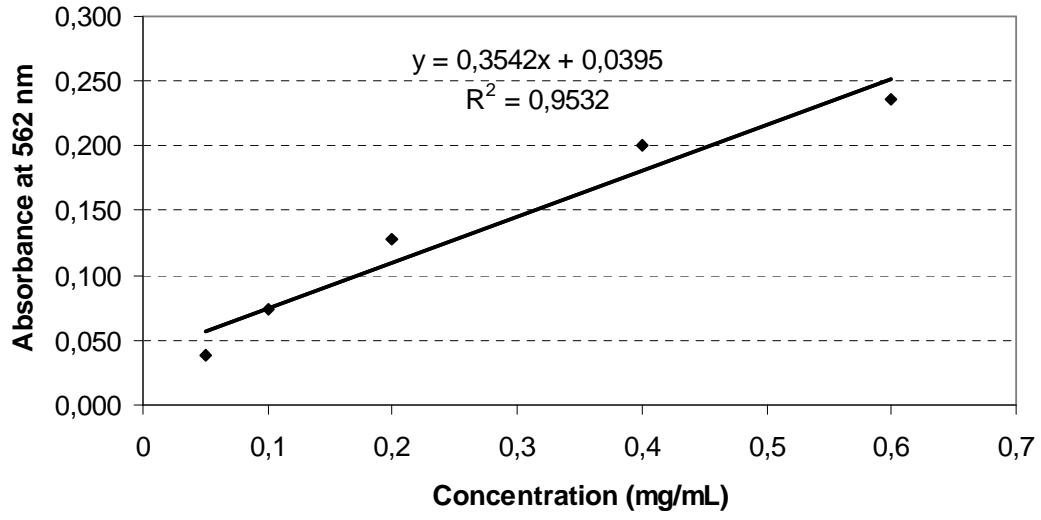


(b)

Şekil D.1. (a) S_C (b) S_N ile elde edilen kalibrasyon eğrileri

EK E

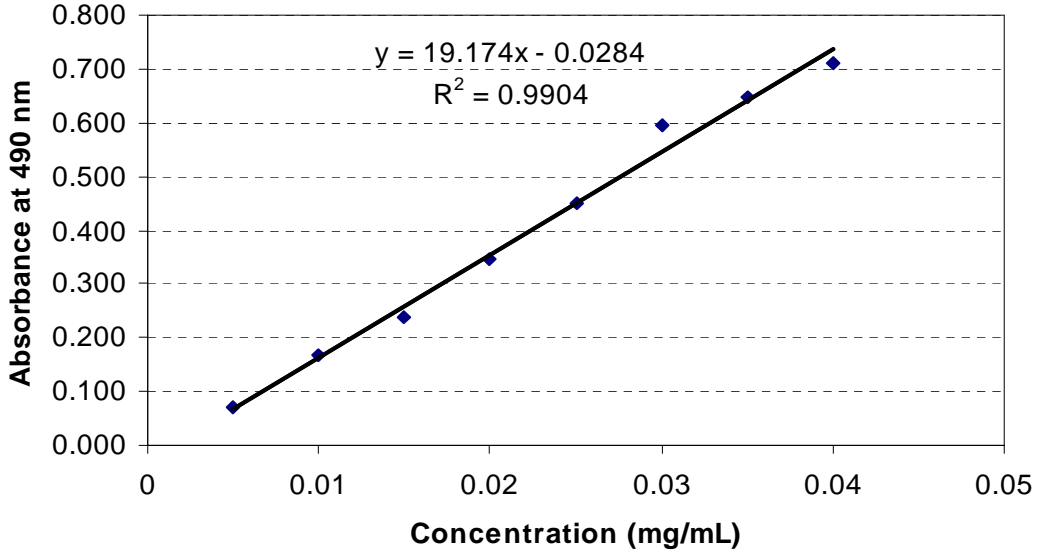
Toplam Protein Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi



Şekil E.1. T. Protein analizi için kullanılan kalibrasyon eğrisi

EK F

Karbonhidrat Analizinde Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi



Şekil F.1. Karbonhidrat analizinde kullanılan kalibrasyon eğrisi

EK G

Serisin, Sabun ve KOİ Arasındaki İlişki

İpek ipliği pişirme atıksuyunda bulunan sabun derişimi doğrudan belirlenemediğinden, serisin, sabun ve KOİ arasındaki ilişki bulunarak sabun derişimi hesaplanmıştır. Üç farklı serisin derişimi hazırlanmış ve KOİ değerleri ölçülmüştür (Tablo H.1). Görüldüğü üzere, 1 g serisin 1 g KOİ'ye eşittir. Aynı deney sabun için tekrarlanmış ve Tablo H.2'de verilen değerler elde edilmiştir. Görüldüğü üzere, 1 g sabun 2,5 g KOİ'ye eşittir. Daha sonra eşit miktarlarda serisin ve sabun karıştırılarak ortak etkilerine bakılmıştır (Tablo H.3). Görüldüğü üzere, serisin ve sabun (1/1 w/w oranı) birlikte 1,9 g KOİ'ye eşittir.

Tablo G.1. Serisin ve KOİ arasındaki ilişki

Serisin Derişimi (mg/L)	KOİ Derişimi (mg/L)	KOİ/Serisin
180	182	1
360	307	0,9
1200	1361	1,1

Tablo G.2. Sabun ve KOİ arasındaki ilişki

Sabun Derişimi (mg/L)	KOİ Derişimi (mg/L)	KOİ/Sabun
200	499	2,5
400	978	2,4
600	1473	2,5
1000	2460	2,5

Tablo G.3. Serisin, sabun ve KOİ arasındaki ilişki

Serisin (mg/L)	Sabun (mg/L)	Serisin + Sabun (mg/L)	Ölçülen KOİ (mg/L)	Beklenen KOİ (mg/L)
200	200	400	867	700
500	500	1000	2137	1750
800	800	1600	2905	2800

EK H

Koza Pişirme Atıksuyu Bileşenlerinin Analizi

HPLC kromatogramlarında serisine ek olarak, 11,5. dakika ile 13,5. dakika arasında kolondan çıkan başka bir madde daha gözlenmiştir. Bu maddenin, kolondan daha geç çıkması, serisinden çok daha küçük bir molekül ağırlığına sahip olduğunu göstermektedir. Molekül ağırlık kalibrasyonu kullanıldığında, bu maddenin molekül ağırlığının yaklaşık 3000 Da olduğu bulunmuştur. Bu maddenin, koza pişirme işlemi sırasında oldukça küçük peptidlere bölünmüş serisin olabileceği düşünülmüş; ancak standart olarak kullanılan serisin çözeltisinde bulunmaması nedeniyle, serisin olarak adlandırılması mümkün olmamıştır. Yalnızca atıksuda görüldüğünden, atıksuda kozaların içinde bulunan ipek böceğine ait bir başka protein, karbohidrat veya yağ olabileceği düşünülmüştür.

İsmlendirilemeyen bu maddeyi daha iyi açıklamak amacıyla, atıksu bileşenleri ayrı ayrı incelenmiştir. Bunun için, laboratuvar koşullarında üç ayrı çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden birincisi 3,99 g kuru kozanın 100 mL saf su içinde 120 °C'de 1 saat otoklav edilmesi ve çözeltinin 1,6 µm filtreden süzülmesiyle elde edilmiştir. İkinci çözeltide de aynı işlem uygulanmış, ancak koza yerine 3,73 g ağırlığında ipek böceği kullanılmıştır. Üçüncü çözeltide ise toplam 8,04 g ağırlığında olan koza ve ipek böceği birlikte otoklav edilmiştir. Hazırlanan birinci çözelti, deneylerde kullanılan serisin standardını, üçüncü çözelti de atıksuyun içeriğini yansıtmaktadır. İkinci çözelti ise, serisin standardı ile atıksuda bulunan serisin arasındaki farkı açıklamak amacıyla hazırlanmıştır. Örneklerde KOİ, toplam protein ve serisin analizleri yapılmış ve birbirlerine oranları hesaplanmıştır (Tablo G.1).

Yalnızca kozadan oluşan birinci çözeltide KOİ/T. Protein ve KOİ/Serisin oranları 1,0 ve 1,1 olarak bulunmuştur. Bu oranlar, sadece ipek böceği bulunan ikinci çözeltide en yüksek olmuş, yani 3,6 ve 2,5 olarak bulunmuştur. Atıksuyu yansıtan üçüncü çözeltide 1,6 ve 1,5, gerçek atıksularda ise 1,9 ve 2,4'tür. Gerçek atıksudaki KOİ/T. Protein oranı, beklendiği üzere üçüncü çözeltideki orana en yakın çıkmıştır. Diğer yandan, gerçek atıksudaki KOİ/Serisin oranı üçüncü çözeltiliye yakın çıkmamıştır. Bunun nedeni, atıksuyun kullanılmadan önce dondurma-çözme ve ısıtma işlemine maruz bırakılması olabilir. Uygulanan 45 dakikalık ısıtma süresinin, dondurulmuş olan serisinin suda tamamen çözülmesi için yeterli gelmemiş olabileceği ve atıksuyun taze iken içerdiği serisin derişiminin, ısıtma sonrasında daha düşük ölçülmüş olabileceği düşünülmektedir. Bu durumda elde edilen KOİ/Serisin oranı beklenenden yüksek olmuştur. Bu sonuçlardan, atıksudaki serisin kaynağının yalnızca koza olmadığı, ipek böceğinin kendisinde de serisin bulunduğu

anlaşılmaktadır.İkinci ve üçüncü çözeltilerdeki serisin derişimlerinin oranı, KPA'ndaki serisinin %28'inin ipekböceğinden geldiğini, %72'sinin ise kozadan geldiğini göstermektedir. Yabancı maddenin daha sonra FPLC ve MALDI-TOF ile yapılan analizleri sonucunda bu maddenin ipekböceği kaynaklı bir protein olduğu bulunmuştur.

Tablo H.1. Atıksu bileşenlerinin incelenmesi

Örnek	KOİ (mg/L)	T. Protein (mg/L)	Serisin (mg/L)	KOİ/T. Protein	KOİ/Serisin
Koza (1. çözelti)	10180	10733	9609	1,0	1,1
İpek böceği (2. çözelti)	9440	2632	3791	3,6	2,5
Koza + İpek Böceği (3. çözelti)	20570	12616	13705	1,6	1,5
Gerçek atıksu*	15041	8079	6252	1,9	2,4

* KPA-A, KPA-B, KPA-C, KPA-D, KPA-E ve KPA-F örneklerine ait ortalama değerler verilmiştir.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: 106M062
Proje Başlığı: Tekstil Atıksularından Serisin Proteininin Geri Kazanımı ve Serisinin Yeniden Kullanım Olanaklarının Araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. M. Ruşen Geçit, Yrd. Doç. Dr. Dilek Keskin, Yrd. Doç. Dr. Ayşen Tezcaner, Dr. Gökşen Çapar
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Bölümü İnönü Bulvarı 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere Ankara BRITISH COUNCIL Turkey Posta Kutusu 34 Çankaya Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.08.2006-01.08.2008
Öz (en çok 70 kelime) İpek işleme atıksularından değerli bir protein olan serisinin geri kazanımı sağlanmıştır. İki farklı atıksu kaynağındaki serisinin geri kazanılması için en uygun ön-arıtma ve membran süzme işlemleri belirlenmiştir. Serisinin kullanım alanlarının araştırılması amacıyla iki adet bio esaslı malzeme üretimi denenmiştir. Bunlardan ilki, paketleme sektörüne yönelik serisinli bir biyofilm üretimi olup, partner üniversite Imperial College, London'da hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. İkinci malzeme olarak da serisinli bir yanık örtüsü hazırlanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır.
Anahtar Kelimeler: İpek işleme atıksuları, serisin, membran, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon, biyofilm, oksijen geçirgenliği, yanık örtüsü
Projeden Yapılan Yayınlar: <ol style="list-style-type: none">1. ÇAPAR G., AYGÜN S. S. and GEÇİT M. R. Treatment of silk production wastewaters by membrane processes for sericin recovery, <i>J. Membrane Science</i>, kabul edildi.2. AYGÜN S. S. Recovery of Sericin Protein from Silk Processing Wastewaters by Membrane Technology, MS Thesis, METU, Temmuz 2008.3. Kollajen ve Kollajen-Serisin Membranların Yara Örtüsü olarak kullanılması, Ulusal Biyomedikal Kongresi'nde (BİYOMUT 2008) sözlü bildiri olarak Y. Lisans Öğrencisi Ömer Aktürk tarafından sunulmuştur.4. AKTÜRK Ö. Preparation of Sericin Based Wound Dressing and Investigation of its Biomaterial Properties, MS Thesis, METU, tez yazım aşamasında.