

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2011-DR-008**

**ÇEŞİTLİ BİRYOFİT TÜRLERİNİN PROTEİN-ANTİKOR
SAFLAŞTIRILMASINDA SPESİFİK SORBENT
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mithat Evrim DEMİR

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Adnan ERDAĞ
Doç. Dr. Sinan AKGÖL**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Mithat Evrim DEMİR tarafından hazırlanan “Çeşitli Biryofit Türlerinin Protein-Antikor Saflaştırılmasında Spesifik Sorbent Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı tez, 06.09.2011 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Adnan ERDAĞ	ADÜ
Üye :	Prof. Dr. Avni GÜVEN	Ege Üniv.
Üye :	Doç. Dr. Sinan AKGÖL	Ege Üniv.
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Mesut KIRMACI	ADÜ
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla .../.../..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

05/08/2011

Mithat Evrim DEMİR

ÖZET**ÇEŞİTLİ BİRYOFİT TÜRLERİNİN PROTEİN-ANTİKOR
SAFLAŞTIRILMASINDA SPESİFİK SORBENT ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mithat Evrim DEMİR

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adnan ERDAĞ
Doç. Dr. Sinan AKGÖL
2011, 82 sayfa

İmmunoglobulin G insan kanındaki temel antikor molekülüdür. IgG terapötik ve tedavi amacıyla tıbbi alanda önemli kullanıma sahip, ticari önemi yüksek olan bir antikordur. IgG saflaştırılması için günümüzde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada IgG saflaştırılması için doğal fitosorbent olarak karayosunu örnekleri ile çalışılmıştır. Bitki örnekleri doğal yayılışa sahip oldukları yerlerden toplanmış, laboratuvar ortamında temizlenmiş, kurutulmuş, öğütülmüş ve elek analizine tabi tutulmuştur. Deneylede 140 µm altı büyüklüğe sahip tanecikler kullanılmıştır. İlk olarak bitki örneklerinin FTIR, SEM ve mikroskopik incelemeler ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu incelemeler sonucunda bitki yüzeyinin önemli bir hidrofobikliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bitki örneklerine IgG adsorpsiyonu için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı tampon ile yapılan denemelerde bitkilerin tamamı için optimum tampon pH 5.0 olarak bulunmuştur. Derişim deneyleri sonucunda adsorpsiyon mekanizmasının Langmuir izotermine uygun olduğu, adsorpsiyonun tek tabakalı olduğu belirlenmiştir. Adsorbe edilen IgG miktarı ortalama 60 mg/g olarak bulunmuştur. Bitkilerde adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri sonunda adsorpsiyon kapasitesinde düşüş olmadığı, bitkilerin saflaştırma için tekrar tekrar kullanılabilirliği, bu sayede düşük maliyetli, doğal, geri dönüştürülebilir fitosorbent olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: immunoglobulin g, IgG, saflaştırma, karayosunu, fitosorbent

ABSTRACT**INVESTIGATION OF SEVERAL BRYOPHYTE SPECIES FOR SPECIFIC SORBENT ACTIVITY FOR PROTEIN – ANTIBODY PURIFICATION**

Mithat Evrim DEMİR

Ph.D. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Adnan ERDAĞ

Assoc. Prof. Dr. Sinan AKGÖL

2011, 82 pages

Immunoglobulin G is basic antibody molecule in human blood. IgG is an antibody which have therapeutic uses in medicine and have high commercial value. In recent years several methods are used for IgG purification. In this study mosses are used as a natural phytosorbent for IgG purification. Moss species were collected from their natural habitat, then cleaned, dried, grinded in laboratory and sieve analysis were performed. Laboratory experiment were done with particles smaller than 140 μm . Characterization of moss species were conducted using FTIR, SEM, and microscobical investigations. As a result of these analysis, important hyrophobicity on plant surface were determined. Adsorption of IgG onto plant speices were investigated in batch system under various medium conditions (i.e. pH, ionic strength, IgG concentration, temperature). During optimisation experiments, pH 5.0 buffer were found to be optimum buffer for all species. With the concentration experiments, adsorption mechanism were found suitable to Langmuir adsorption isotherm, which determines single layer adsorption onto plant surfaces. Adsorbed IgG amount were found approximately 60 mg/g. Adsorption-desorption experiments indicated that plants were reusable. Results indicated that moss species have the capacity to be used as biosorbent for IgG purification, with their low cost, natural and biodegradable structure.

Key Words: immunoglobulin g, IgG, purification, moss, phytosorbent

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince engin bilgilerinden yararlandığım, bana her konuda sonsuz sabırla destek olan danışman hocam Prof. Dr. Adnan ERDAĞ'a, tezimin gerçekleşmesinde bilgi birikimlerinden her zaman yararlandığım ikinci danışmanım Doç. Dr. Sinan AKGÖL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında bana laboratuvarlarında çalışma fırsatını sunan, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tez izleme komitemde yer alan, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Avni GÜVEN'e; Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN'e bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştıkları ve tez çalışmamın daha iyiye gitmesi yönünde yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

FTIR analizlerinin yorumlanmasına katkılarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Emin GÜNAY'a teşekkür ederim.

Arazi çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mesut KIRMACI'ya, Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Emre AĞCAGİL'e ve laboratuvar çalışmalarıma destek olan Ömer YAMANER'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımdaya deneyimlerimdeki yardımlarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a, Arş. Gör. Murat UYGUN'a, Arş. Gör. Nevra ÖZTÜRK ATAY'a, doktora öğrencisi M. Emin ÇORMAN'a, FTIR analizlerindeki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Semiha KUNDAKÇI'ya ve beraber aynı laboratuvarı paylaştığım, Adnan Menderes Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndaki çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez süresince olanaklarından faydalanma imkanı bulduğum Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Kimya Bölümüne teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleştirilmesindeki maddi – manevi katkılarını asla ödeyemeyeceğim, sonsuz desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili eşim ve meslektaşım Özge BAYKAN DEMİR'e ve tez çalışmamın son dönemlerinde hayatımıza dahil olan, dünyaya bakış açımı değiştiren sevgili kızım Deniz Ece DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mithat Evrim DEMİR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
2.1 Materyal	16
2.1.1. Kullanılan Ekipman	16
2.2 Yöntem.....	17
2.2.1. Bitkilerin toplanması ve Diğer İşlemlere Hazırlanması	17
2.2.2. Bitki Örneklerinin Karakterizasyonu	22
2.2.2.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) ölçümleri.....	22
2.2.2.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ölçümleri.....	22
2.2.3. Bitki Örneklerine HİgG Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi	24
2.2.3.1. Bitki örneklerine HİgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi ...	24
2.2.3.2. Bitki örneklerine HİgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi.....	25
2.2.3.3. Bitki örneklerine HİgG adsorpsiyonuna HİgG başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi.....	25
2.2.3.4. Bitki örneklerine HİgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi.....	26
2.2.3.5. Bitki örneklerinden HİgG desorpsiyonu	26
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
3.1. Bitki örnekleri	27
3.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Gözlemleri	32
3.3. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrometre) Ölçümleri	37
3.4. Bitki Örneklerinin HİgG Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının Belirlenmesi	41

3.4.1. <i>Leucodon sciuroides</i> türü için HIgG Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının Belirlenmesi.....	42
3.4.1.1. HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi	42
3.4.1.2. HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin belirlenmesi.....	43
3.4.1.3. HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin belirlenmesi	43
3.4.1.4. HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin belirlenmesi	45
3.4.1.5. Desorpsiyon koşullarının belirlenmesi	48
3.4.2. <i>Antitrichia californica</i> türü için HIgG adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşullarının incelenmesi.....	49
3.4.2.1. HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi.....	49
3.4.2.2. HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi	49
3.4.2.3. HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi.....	51
3.4.2.4. HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi	51
3.4.2.5. Desorpsiyon koşullarının incelenmesi.....	53
3.4.3. <i>Bartramia stricta</i> türü için HIgG adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşullarının incelenmesi	54
3.4.3.1. HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi.....	54
3.4.3.2. HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi	56
3.4.3.3. HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi.....	56
3.4.3.4. HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi	57
3.4.3.5. Desorpsiyon koşullarının incelenmesi.....	59
3.4.4. <i>Syntrichia papillosissima</i> türü için HIgG adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşullarının incelenmesi.....	59
3.4.4.1. HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi.....	59
3.4.4.2. HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi	60
3.4.4.3. HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi.....	61
3.4.4.4. HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi	61
3.4.4.5. Desorpsiyon koşullarının incelenmesi.....	65
3.4.5. Bitki örneklerine HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi.....	65
3.4.6. Bitki örneklerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi	65

3.4.7. Bitki örneklerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi	65
4. SONUÇ	69
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER DİZİNİ

HIgG	İnsan immunoglobulin G
IgG	İmmunoglobulin G
IvIg	Intravenöz İmmunoglobulin Tedavisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Transform İnfrared Spektrofotometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Ticari <i>Sphagnum</i> ürünleri.....	3
Şekil 1.2.	Afinite kromatografisi basamaklarının şematik gösterimi	6
Şekil 1.3.	İmmunoglobulinin temel yapısı.....	10
Şekil 2.1.	Karayosunu örneklerinin ön kurutma aşaması	19
Şekil 2.2.	Analitik eleme makinası.....	20
Şekil 2.3.	Eleklere dağılmış olan bitki parçacıkları.....	21
Şekil 2.4.	Farklı tanecik boylarına sahip bitkilerin muhafaza edilmesi.....	21
Şekil 2.5.	FTIR spektrofotometresi	22
Şekil 2.6.	İncelenecek örneklerin yapıştırılarak başlıklar üzerine yerleştirilmesi	23
Şekil 2.7.	SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)	23
Şekil 3.1.	<i>Leucodon sciuroides</i> türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği	27
Şekil 3.2.	<i>Antitrichia californica</i> türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği	28
Şekil 3.3.	<i>Bartramia stricta</i> türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği	28
Şekil 3.4.	<i>Syntrichia papillosissima</i> türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği	29
Şekil 3.5.	<i>Leucodon sciuroides</i> 140 µm altı parçaların mikroskop görüntüsü.....	30
Şekil 3.6.	<i>Antitrichia californica</i> 140 µm altı parçaların mikroskop görüntüsü	31
Şekil 3.7.	<i>Bartramia stricta</i> 140 µm altı parçaların mikroskop görüntüsü	31

Şekil 3.8.	<i>Syntrichia papillosissima</i> 140 µm altı parçaların mikroskop görüntüsü	32
Şekil 3.9.	<i>L. sciuroides</i> SEM görüntüsü (1500x büyütme).....	33
Şekil 3.10.	<i>L. sciuroides</i> SEM görüntüsü (1000x büyütme).....	33
Şekil 3.11.	<i>A. californica</i> SEM görüntüsü (2500x büyütme).....	34
Şekil 3.12.	<i>A. californica</i> SEM görüntüsü (2500x büyütme).....	34
Şekil 3.13.	<i>B. stricta</i> SEM görüntüsü (800x büyütme).....	35
Şekil 3.14.	<i>B. stricta</i> SEM görüntüsü (5000x büyütme).....	35
Şekil 3.15.	<i>B. stricta</i> SEM görüntüsü (800x büyütme).....	36
Şekil 3.16.	<i>S. papillosissima</i> SEM görüntüsü (1500x büyütme)	36
Şekil 3.17.	<i>L. sciuroides</i> bitkisine ait FTIR spektrumu	37
Şekil 3.18.	<i>A. californica</i> bitkisine ait FTIR spektrumu	38
Şekil 3.19.	<i>B. stricta</i> bitkisine ait FTIR spektrumu	38
Şekil 3.20.	<i>S. papillosissima</i> bitkisine ait FTIR spektrumu	39
Şekil 3.21.	Bitkilere ait FTIR spektrumlarının aynı grafikte gösterimi	39
Şekil 3.22.	<i>L. sciuroides</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	42
Şekil 3.23.	<i>L. sciuroides</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi	44
Şekil 3.24.	<i>L. sciuroides</i> üzerine IgG adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi.....	44
Şekil 3.25.	<i>L. sciuroides</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisi	45
Şekil 3.26.	<i>L. sciuroides</i> Langmuir adsorpsiyon izotermi grafiği	47
Şekil 3.27.	<i>L. sciuroides</i> Freundlich adsorpsiyon izotermi grafiği	48
Şekil 3.28.	<i>L. sciuroides</i> desorpsiyon grafiği.....	49
Şekil 3.29.	<i>Antitrichia californica</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	50

Şekil 3.30.	<i>A. californica</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi	50
Şekil 3.31.	<i>A. californica</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	51
Şekil 3.32.	<i>A. californica</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisi	52
Şekil 3.33.	<i>A. californica</i> Langmuir Adsorpsiyon İzotermi grafiği.....	53
Şekil 3.34.	<i>A. californica</i> Freundlich Adsorpsiyon İzotermi grafiği	54
Şekil 3.35.	<i>A. californica</i> desorpsiyon grafiği	54
Şekil 3.36.	<i>Bartramia stricta</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	55
Şekil 3.37.	<i>B. stricta</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi	55
Şekil 3.38.	<i>B. stricta</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	56
Şekil 3.39.	<i>B. stricta</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG derişiminin etkisi	57
Şekil 3.40.	<i>B. stricta</i> Langmuir adsorpsiyon izotermi grafiği	58
Şekil 3.41.	<i>B. stricta</i> Freundlich adsorpsiyon izotermi grafiği.....	58
Şekil 3.42.	<i>B. stricta</i> desorpsiyon grafiği	59
Şekil 3.43.	<i>Syntrichia papillosissima</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	60
Şekil 3.44.	<i>S. papillosissima</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi	61
Şekil 3.45.	<i>S. papillosissima</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	62
Şekil 3.46.	<i>S. papillosissima</i> üzerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG derişiminin etkisi	62
Şekil 3.47.	<i>S. papillosissima</i> Langmuir Adsorpsiyon İzotermi grafiği.....	63
Şekil 3.48.	<i>S. papillosissima</i> Freundlich Adsorpsiyon İzotermi grafiği	64
Şekil 3.49.	<i>S. papillosissima</i> adsorpsiyon-desorpsiyon grafiği	65

Şekil 3.50.	Bitki örnekleri üzerine HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	65
Şekil 3.51.	Bitki örnekleri üzerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	67
Şekil 3.52.	Bitki örnekleri üzerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisi	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar ve biyolojik ilişkilere örnekler	5
Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligandlar	8
Çizelge 1.3. Afinite kromatografisinin alt dalları.	9
Çizelge 1.4. İmmunoglobulinler ve temel görevleri	11
Çizelge 1.5. IvIg tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar ve fiyatları	14
Çizelge 2.1. Elek analizinde kullanılan büyüklük aralıkları	18

1. GİRİŞ

Ayrırma, bir karışımın birbirinden farklı iki veya daha fazla ürün haline getirilmesi işlemi olarak tanımlanabilir. Ayrırma işlemi kimya, petrokimya ve farmasötik sanayinde en büyük maliyeti oluşturan işlemlerden biridir. Adsorpsiyonda tutma işini gören madde adsorban veya sorbent adını alır. Adsorpsiyon yönteminde işlemin verimi sorbent kalitesi ve özellikleriyle doğrudan ilişkilidir (Yang, 2003).

Biyosorpsiyon işlemi cansız biyokütlenin sorbent ve sorbat arasındaki afinite ilişkisine dayanan pasif bir olaydır (Volesky, 2007). Sorbent olarak biyolojik ajanların kullanılması uzun yıllardır araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Günümüzde ise sorbent olarak bitkilerin kullanılması giderek artmaktadır. Düşük maliyetle elde edilebilmeleri ve geri dönüştürülebilir olmaları işlemin genel verimi açısından da önem taşımaktadır. Özellikle tarımsal faaliyetlerden oluşan atığın bol ve düşük maliyetli oluşu araştırmacıları bu konularda çalışma yapmaya itmiştir. Fitosorbentler ile yapılan çalışmalar ağır metal temizlenmesi, atıksulardan boyaların temizlenmesi, petrol ve türevlerinin temizlenmesi şeklinde ana gruplara ayrılabilir.

Atıksulardan ağır metallerin temizlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar arasında Cr(VI) tutulması için *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze meyveleri kullanılması (Vagheti vd., 2008), *Pinus sylvestris* L. kozalaklarının kullanılması (Ucun vd., 2002), fıstık kabuğunun kullanılması (Witek-Krowiak vd., 2011), *Passiflora edulis* Sims meyve kabuğunun kullanılması (Jacques, 2007), *Cocos nucifera* L. (hindistan cevizi) lifi kullanılması (Gonzales vd., 2008), Ni(II) tutulması için *Azadirachta indica* A. Juss. yapraklarının kullanılması (Bhattacharyya vd., 2009), *Moringa oleifera* Lam. kabuğu kullanılması (Reddy, 2011), *Cochlospermum gossypium* (L.) DC. sakızı kullanılması (Vinod vd., 2010), Cd için su bitkisi olan *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle (Bunluesin vd., 2007), *Scolymus hispanicus* L. (Barka vd., 2010) kullanılması, Cu(II) tutulması için *Acacia leucophala* Link ağaç kabuğu tozu (Munagapati vd., 2010), *Arachis hypogaea* L. meyve kabuğu kullanılması (Witek-Krowiak vd., 2011), Pb için *Pinus sylvestris* kozalağı (Ucun vd., 2003), *Phaseolus vulgaris* L., *Ficus religiosa* L. yaprakları (Özcan vd, 2009) kullanımı örnek olarak verilebilir. Atıksulardan boyar madde uzaklaştırılması için *Araucaria angustifolia* (Vagheti vd., 2008), *Pyracantha coccinea* M. Roem. meyvesi (Akar vd., 2009a), *Ananas comosus* (L.)

Merr. yaprakları (Chowdhury vd., 2011), *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. (Deniz ve Saygıdeğer, 2010), *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb (Şentürk vd., 2010), *Thuja orientalis* L. (Akar vd., 2008), *Cupressus sempervirens* L. (Fernandez vd., 2010), *Capsicum annuum* L. tohumları (Tunalı Akar vd., 2011), işlenmemiş zeytin atığı (prina) (Akar vd., 2009b) ve *Phaseolus vulgaris* kullanılan bitkilerden bazılarıdır.

Bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir diğer bitki grubu da karayosunlarıdır. Karayosunları 12,000 – 15,000 türle biryofitler içinde en büyük grubu oluşturmaktadır. Karayosunları dünya üzerinde denizler hariç, çöller ve kutup bölgeleri de dahil olmak üzere, fotosentetik bitkilerin bulunabildiği her ortamda varlıklarını sürdürebilmektedirler (Crum, 2001). Karayosunları yüzey yapıları ve kolay erişilebilir olmaları sebebiyle fitosorbent olarak da çalışmalarda kullanılmışlardır. Karayosunları kullanılarak yapılan çalışmalara Cd(II) ve Cr(III) tutulması için *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. kullanılması (Sarı vd., 2008), ¹³⁷Cs ve ⁹⁰Sr tutulması için *Funaria hygrometrica* Hedw. kullanılması (Balarama Krishna vd., 2004), Pd için *Racomitrium lanuginosum* (Hedw.) Brid. (Sarı vd., 2009) kullanılması, Co ve Sr için *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. (Maresova vd., 2011) kullanılması, atıksulardan boyar madde uzaklaştırılması için *Dicranella varia* (Hedw.) Schimp. kullanılması (Akkaya ve Özer, 2005) örnek olarak verilebilir.

Dünya üzerinde geniş yayılıma sahip bir karayosunu olan *Sphagnum*'un ağır metal tutma özellikleri çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Brown vd., 2000). Bu amaçla Amerikan Maden Bürosu yaptığı çalışmalarda gözenekli polisülfon kürecikler üzerine immobilize edilmiş mikroorganizmalara ek olarak immobilize *Sphagnum* da denemiştir. Bu şekilde çinko, kadmiyum ve diğer metallerin seçici olarak ortamdaki uzaklaştırıldığı sonucuna ulaşılmıştır (Ferguson vd., 1989).

Sphagnum'un ticari olarak kullanımı ise genellikle petrol ürünlerinin ortamdaki uzaklaştırılmasına yönelik olmuştur. Bu ürünler genellikle toz haline getirilerek hazırlanmış olarak piyasaya sürülmüştür. Hyro-Weed bu amaçla geliştirilmiş, petrol ürünleri ve kimyasal kirliliğin temizlenmesi için kullanılan ticari üründür (Şekil 1.1. a). Özellikle kuru haldeyken hidrofobik özellikler kazanan *Sphagnum*, petrolü tutarak kirlenmiş alanların temizliğinde kullanılmaktadır. Su üzerinde kaldığı için su üstü kirliliğin temizlenmesi amacıyla kullanılabilir. Hyro-

Weed Amerikan Deniz Kuvvetleri, Amerikan Ordusu ve Hava Kuvvetleri tarafından kullanılmaktadır (Innovative Technologies Group LLC). Peat-sorb bu amaçla ticari olarak kullanılan bir diğer üründür. Bu ürün de farklı petrol ve yağ türevlerinin temizlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Şekil 1.1. b) (Zorbit Technologies Inc.). Güney Afrika kıyılarında bulunan Dassen ve Robert adaları yakınlarında gerçekleşen petrol sızıntısı bu ürünle temizlenmiştir. Oclansorb Plus tatlı ve tuzlu sularda, sulak alanlarda ve diğer açık su ortamlarında, diğer tekniklerle temizlenemeyen petrol sızıntılarını temizlemek üzere geliştirilmiş bir diğer üründür (Şekil 1.1. c) (Hi Point Industries Ltd.). Yeni Zelanda’da kullanılan Enviropeat yağ ve petrol ürünleri için geliştirilen bir başka ticari üründür (Şekil 1.1. d) (Envirotech Solutions). Kallak Turba Fabrikası ise Norveç’de turba hasat ederek benzeri temizleme işlemleri için ticari ürün üreten bir başka şirkettir (Kallak Torustrofabrikk).



Şekil 1.1. Ticari *Sphagnum* ürünleri a. Hyro-Weed (Innovative Technologies Group LLC) b. Peat-Sorb (Zorbit Technologies Inc.) c. Oclansorb (Hi Point Industries Ltd.) d. Enviropeat (Envirotech Solutions).

Karayosunlarının bazı yapısal özellikleri, özellikle fitosorbent olarak kullanılmasında etkili olmaktadır. Karayosunları basit yapılı, genellikle tek hücre kalınlığına sahip yapıları olan bitkilerdir. Boyları sadece birkaç milimetre olan, sadece birkaç yaprağı olan karayosunları olduğu gibi (*Ephemeropsis* ve *Virividellis pulchellum*), yarım metreden uzun olabilen *Polytrichum commune* ve 70 cm boylanabilen *Dawsonia superba* türleri de vardır (Crum, 2001). *Fontinalis* türleri de 2 metreye kadar boylanabilirler. Karayosunlarının tercih edilmesinde önemli bir etken bu bitkilerin yayılış alanlarıdır. Karayosunları çok geniş yayılışa sahip bitkilerdir. Dünya üzerinde hemen her yerde varlıklarını sürdürebilirler. Bu özellikleri araştırmacılara karayosunlarının neredeyse her an ulaşılabilir olması avantajını sağlamaktadır. Kullanılacak materyalin kolay ulaşılabilir olması çalışmaların maliyetinin düşürülmesinde önemli bir faktördür. Bazı karayosunu türlerinde yaprak hücrelerinde süslemelerin olduğu bilinmektedir. Bu süslemeler genellikle kurak ortamlara adapte olmuş, su dengesi ile ilgili adaptasyonlardır. En yaygın görülen süsleme tipi papillalardır. Genel tanımıyla papilla, hücre yüzeyindeki farklı şekillere sahip çıkıntılardır. Basit, C-şekilli veya dallanmış yapıda olabilirler. Papillalar yoğun dizildiklerinde aralarında oluşturdukları kanal ile suyun hızlı şekilde aktarılmasını sağlarlar. Benzer şekilde mamillalar da hücre lümeninin dışarı doğru çıkarak oluşturduğu çıkıntıdır (Buck ve Goffinet, 2000). Bu yapıların diğer önemli özelliği de yüzey alanını önemli ölçüde artırıyor olmalarıdır. Yoğun papillaya sahip bir yaprağın yüzey alanı önemli ölçüde artarak tutunması istenen molekül için avantaj oluşturur.

Kromatografi, bir örnek içindeki birden fazla bileşenin durağan ve hareketli faz arasında, birbirlerine olan ilgileri prensibine dayanan, ayırma tekniklerinin genel adıdır (Sadek, 2004). Bir diğer ifadeyle kromatografi biri durağan, diğeri hareketli faz olmak üzere iki faza ayrılmış bileşenlerin fiziksel ayrılması tekniğidir (IUPAC, 1997). Durağan faz sıvı veya katı olabilir, hareketli faz ise sıvı veya gaz olabilir. Ayrılacak olan maddeler durağan ve hareketli faz arasında farklı derecelerde dağılırlar ve birbirlerinden ayrılırlar. Kromatografi analitik veya preparatif olabilir. Kromatografik teknikler biyokimyasal araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi adsorpsiyon kromatografisinin bir çeşidi olarak düşünülebilir. Bu sistemde katı matriks üzerine immobilize edilmiş komplementer

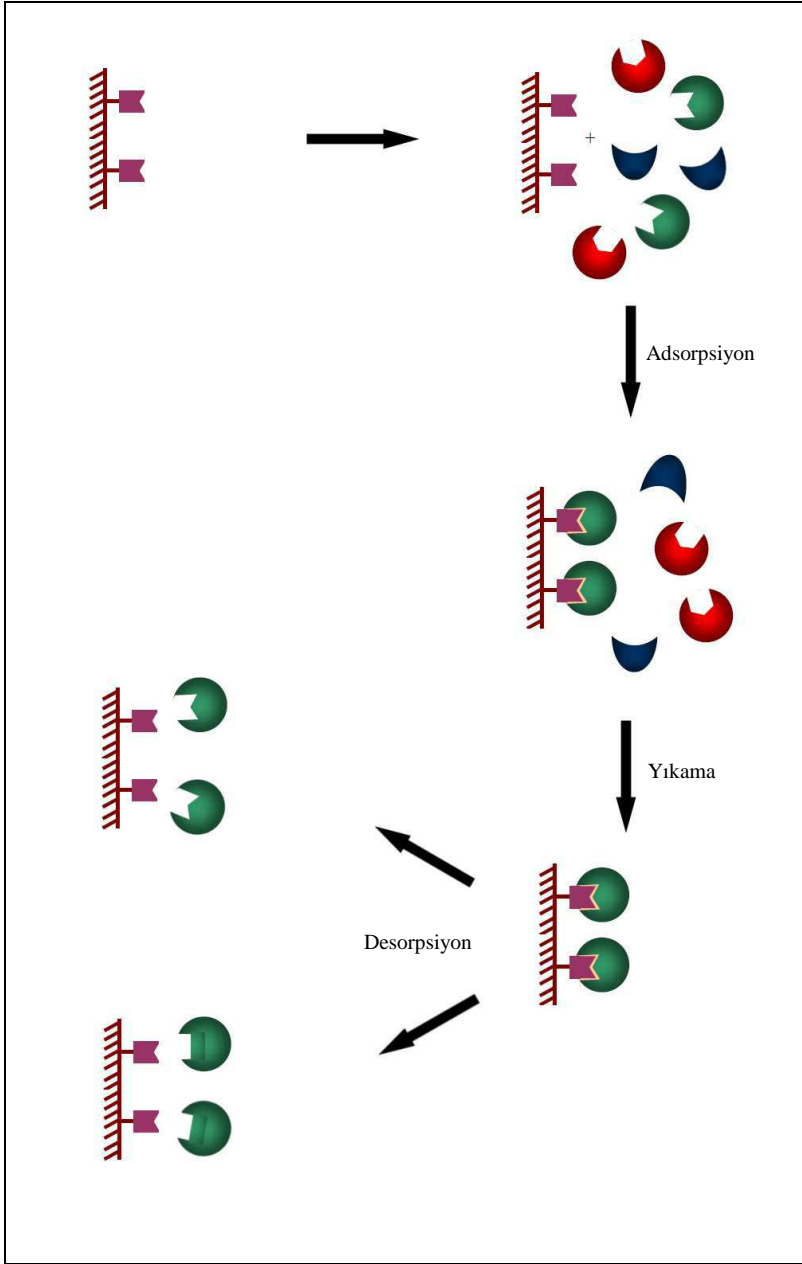
maddeler ile spesifik ve tersinir kompleksler oluşturan biyolojik moleküller vardır. Bunlar ligand, afinite ligandları veya affinantlar olarak adlandırılırlar. Enzimlerin substratları, inhibitörleri, kofaktörleriyle oluşturdukları kompleksler, antikorların antijenleriyle oluşturdukları kompleksler, lektinlerin glikoprotein veya polisakkaritlerle oluşturdukları kompleksler örnek olarak verilebilir (Turková, 2002).

Saflaştırılmak istenen enzim veya diğer biyomolekül biyoligand olarak adlandırılabilen bir moleküle afinite gösterir. Biyolojik olarak aktif ürünleri içeren ham karışım afinite adsorban kolonundan geçirildiğinde, belirlenmiş deneysel koşullar altında, immobilize afinite ligandına komplementer bağlanma bölgesi bulunmayan bütün bileşikler tutulmadan geçecektir. Buna karşın liganda afinite gösteren ürünler kolonda tutulacaktır. Bu ürünler daha sonra çözünür afinite ligandı ile yıkanarak veya ürün-ligand kompleksinin yapısını bozmak üzere koşulların (pH, iyonik şiddet, sıcaklık vb.) değiştirilmesiyle tekrar elde edilebilir (Turková, 2002) (Şekil 1.2). Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligandlar ve saflaştırılmak istenen moleküller tabloda verilmiştir (Çizelge 1.1).

Afinite kromatografisinde kullanılacak biyoseçici adsorbanın sentezlenmesi yöntemin uygulanması sürecinde önemli yer tutar. Saflaştırılmak istenen moleküle uygun sentezlenecek adsorban proteinin birkaç basamakta hızlı ve verimli şekilde saflaştırılmasını sağlayacaktır (Scouten, 1981). Günümüzde adsorbanın sentezlenmesi işlemi ticari ürünlerin de piyasaya çıkmasıyla nispeten kolaylaşmıştır.

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar ve biyolojik ilişkilere örnekler

Ligand	Saflaştırılan molekül
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (substrat analogları veya kofaktör analogları)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzeyi reseptörü, membran proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asit bağlayan protein (enzim veya histon)
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim veya diğer şeker bağlayan proteinler



Şekil 1.2. Afinitite kromatografisi basamaklarının şematik gösterimi 1. Afinitite ortamı tampon ile dengeye alınır. 2. Örnek, hedef molekülün komplementer liganda bağlanabilmesi için uygun koşullarda kolona uygulanır. 3. Hedef maddeler spesifik ve tersinir olarak liganda bağlanır. Bağlanmayan maddeler kolonda tutulmadan çıkar. 4. Hedef moleküller desorpsiyon işlemi ile tekrar elde edilir (Koç, 2007'ye göre düzenlenerek).

Tekniğin uygulanması aşamasında dikkat edilmesi gereken diğer bir konu da ligand-molekül arasındaki afinite. Eğer afinite çok zayıfsa adsorpsiyon gerçekleşmez. Buna karşın kuvvetli bir afinite olması durumunda adsorbe olmuş proteinin yıkanması zorlaşacaktır. Uygun koşulların elde edilmesi bu tekniğin verimli şekilde kullanılmasını sağlayacaktır.

Matriks seçimi

Katı desteğin ve matriks ile afinite ligandı arasındaki kovalent bağlanmanın doğru şekilde seçilmesi, afinite kromatografisinin başarısını doğrudan etkilemektedir. Katı desteklerin immobilize afinite ligandının kararlılığı üzerinde etkileri vardır. Bazı katı desteklerin kendileri de afinite ligandı içerebilirler. Kromatografi işleminde kullanılacak taşıyıcı matrikste bulunması gereken bazı özellikler şu şekilde sıralanabilir;

1. Çözünür olmamalıdır.
2. Yeterli geçirgenliğe ve geniş spesifik alana sahip olmalıdır.
3. Bağlanma, adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon koşullarına karşı kimyasal olarak kararlı olmalıdır.
4. Mikrobiyal ve enzimatik ataklara karşı dirençli olmalıdır.
5. Afinite ligandlarının bağlanmasına izin verecek kimyasal reaktiviteye sahip olmalıdır.
6. Proteinlerin nonspesifik etkileşimlerinden etkilenmemek için hidrofilik ve nötral karakterde olmalıdır.
7. Endüstriyel uygulamalar için ekonomik olmalıdır.

Ligand seçimi

Afinite kromatografisinde kullanılacak çok sayıda ligand olmasına karşın bir çoğu biyolojik kökenlidir. Kolon içinde biyolojik ligand kullanılması bu yöntemin bioafinite kromatografisi veya biospesifik adsorpsiyon olarak da adlandırılmasına yol açmıştır. Birçok biyolojik ligandın spesifikliğı bioafinite kromatografisini çoğu bileşiğin saflaştırılması için ideal yöntem haline getirmiştir (Hage ve Ruhn, 2006). Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligandlar tabloda verilmiştir (Çizelge 1.2). İyi bir ligand aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

1. Ligand izole edilebilecek şekilde protein ile tersinir kompleksler oluşturmalıdır.
2. Kromatografik uygulamaya uygun spesifiteye sahip olmalıdır.
3. İzole edilen protein veya ligandı etkilemeden ortamdaki basit bir değişimle kompleks kolayla ayrılabilmelidir.
4. Matrikse kolayca immobilize edilebilmek üzere birtakım kimyasal özelliklere sahip olmalıdır.
5. Kararlı komplekslerin oluşumu için kompleks sabiti yeterince yüksek olmalıdır.

Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligandlar (Hage ve Ruhn, 2006).

Yöntem	Ligand	Tutulan maddeler
İmmunoafinite kromatografisi	Antikorlar	Antijenler (örn. Hormonlar, peptidler, proteinler, virüsler, hücre bileşenleri)
Enzimlerin afinite kromatografisi	İnhibitörler, substratlar, kofaktörler, koenzimler ve çeşitli ligandlar	Enzimler
Lektin afinite kromatografisi	Lektinler	Şekerler, glikoproteinler ve glikolipidler
DNA afinite kromatografisi	DNA veya RNA	DNA/RNA'ya bağlanan proteinler, komplementer nükleotidler
Boya ligand afinite kromatografisi	Sentetik boyalar	Proteinler ve enzimler

Afinite kromatografisinin alt dalları

Afinite kromatografisinin alt dalları Çizelge 1.3'de verilmiştir (Wilchek ve Miron, 1999).

Çizelge 1.3. Afinite kromatografisinin alt dalları.

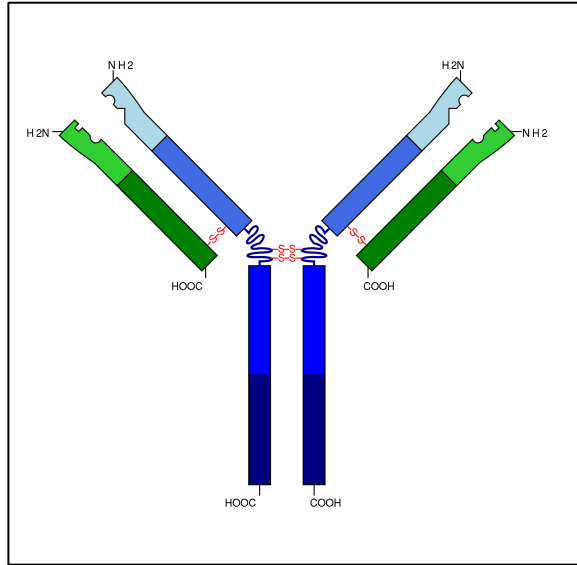
1. Hidrofobik kromatografi
2. İmmunoafinite kromatografisi
3. Kovalent afinite kromatografisi
4. Metal-şelat afinite kromatografisi
5. Moleküler baskılama afinite kromatografisi
6. Membran temelli afinite kromatografisi
7. Affinite kuyruk kromatografisi
8. Lektin afinite kromatografisi
9. Boya ligand afinite kromatografisi
10. Reseptör afinite kromatografisi
11. Perfüzyon afinite kromatografisi
12. Tiyofilik afinite kromatografisi
13. Yüksek performans afinite kromatografisi
14. Afinite yoğunluk pertubation
15. Kütüphane türevli afinite kromatografi
16. Afinite çöktürme
17. Afinite elektroforez
18. Afinite kapiler elektroforez
19. Santrifüj afinite kromatografisi
20. Afinite itme kromatografisi

İmmunoglobulin olarak da bilinen antikorlar çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemleri tarafından, kendi organizmalarına ait olmayan organik yapılara karşı geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. Bu moleküller organizmayı bakteri ve virüsler gibi yabancı moleküllerin yol açması muhtemel zarar verici etkilere karşı önceden uyararak koruyuculuk sağlarlar. Antikorlar hümmoral immün sisteminin önemli bir kısmını oluştururlar. Kendi antimikrobiyal özellikleri olmamalarına karşın farklı yöntemlerle hüccresel immün sistemini desteklerler:

1. Patojenlerin üzerlerindeki antijenlere bağlanarak bunların vücut hüccreleriyle etkileşimlerini önlerler (nötralizasyon).

2. Tek hücreli patojenleri agregatlara bağlayarak (immün kompleksleri) fagositler tarafından daha kolay alınmalarını sağlarlar (aglutinasyon).
3. Eşlenik sistemi etkin hale getirerek innate immün savunma sistemini harekete geçirirler (opsonizasyon).

Antikorlar B hücresi tarafından oluşturulurlar. Özelleşmelerinden bağımsız olarak dört polipeptid zincirinden oluşurlar. Bunlardan kovalent bağ ile oligosakkarit gruplarını taşıyan iki eş zincir ağır zincir (53-75 kDa) olarak, glikozillenmemiş diğer iki eş zincir ise hafif zincir (23 kDa) olarak adlandırılır. Ağır zincir ve hafif zincir birbirlerine disülfid bağı ile bağlanırlar. Ağır zincirler birbirlerine disülfid bağları ile bağlanırlar (Şekil 1.3). Bu bağların bulunduğu esnek bölge menteşe bölgesi olarak adlandırılır. Disülfid bağları sonucu polipeptid zincirlerinin katlanmasıyla oluşan kısımlar domain olarak adlandırılır. Her dört polipeptid zincirinde de sabit ve değişken bölgeler vardır. Hafif zincirde (L) karboksil ucuna yakın olan bölge sabit bölge (C_L), amino ucuna yakın olan bölge değişken bölge (C_V) olarak adlandırılır. Ağır zincirin (H) amino ucuna yakın kısım değişken bölge (H_V), diğer kısımdaki bölgeler ise sabit bölgeler (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) olarak adlandırılır. Ağır ve hafif zincirlerin değişken bölgeleri iki özdeş antijen bağlanma bölgesi oluşturur (Anonim, 2002).



Şekil 1.3. İmmunoglobulinin temel yapısı

İnsanlarda C_H bölgelerine göre değişiklik gösteren beş ağır zincir bulunur. γ , α , μ , δ ve ϵ şeklinde gösterilirler. μ ve ϵ domainleri genelin aksine üç değil dört CH domainine sahiptirler. Ağır zincirin tipi immunoglobulin sınıfını ve etki mekanizmasını belirler. Beş immunoglobulin sınıfı IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE'dir (Şekil 1.3; Çizelge 1.4) (Murray vd., 2003).

Çizelge 1.4. İmmunoglobulinler ve temel görevleri

İmmunoglobulin	Temel Görevleri
IgG	İkincil tepkideki ana antikordur. Bakteriye opsonize ederek fagositozlarını kolaylaştırır. Tamamlayıcı sisteme yardımcı olur. Bakteriyel toksinleri ve virüsleri nötralize eder. Plasentadan geçer.
IgA	Bakteri ve virüslerin mukoz membrana bağlanmasını önler. Tamamlayıcı sisteme etki etmez.
IgM	Antijene birincil tepki sonucunda üretilir. Tamamlayıcı sistem oluşturur. Plasentayı geçemez. B hücrelerinin yüzeylerindeki antijen reseptörüdür.
IgD	B hücrelerinin yüzeylerinde ve serumda bulunurlar.
IgE	Antijenle karşılaşılması durumunda mast hücreleri ve bazofillerden mediatörlerin salınımı ile ani hipersensitiviteyi oluşturur.

İmmunoglobulin G (IgG) insan kanındaki temel antikor molekülüdür. Bütün antikorların yaklaşık %80'ini oluşturur. Mentşe bölgesindeki ağır zincirlerin aralarındaki disülfid bağlarının farklarına göre dört alt grubu vardır. Papain aktivitesi sonucunda 50 kDa'lık üç kısma ayrılabilirler. Bu kısımlardan antijen bağlayan ikisine F_{ab} adı verilir. Diğer üçüncü kısım hemen kristallenebildiğinden dolayı F_c adını alır ve hedef hücrelerin sindirimi gibi diğer görevlerde iş görürler.

Antikorlar biyoloji, biyoteknoloji, tanı ve tıbbi amaçlarla geniş kullanım alanlarına sahiptirler. Antikorlar ve monoklonal antikorlar enflamasyon, kanser, otoimmün ve bulaşıcı hastalıklarda tedavi amaçlı olarak etkin şekilde kullanılmaktadır.

İmmunoglobulinlerdeki eksiklikler enfeksiyon riskinde artışa ve yetersiz immun tepkisine sebep olur. İmmunoglobulinler tedavi amacıyla ilk olarak 1952 yılında, X-bağlı agammaglobulinemia (XLA) ve tekrarlayan pnömokoksal sepsis hastalığı

bulunan pediatrik hastada kullanılmıştır (Bruton, 1952). Bu tedaviyi takiben Ig tedavisi birincil ve ikincil bağışıklık yetmezliği tedavilerinde kullanılmaya başlanmıştır (Reilly vd., 2010). IVIg tedavi yöntemine Amerika Birleşik Devletleri'nde de ilk kez 1981 yılında FDA tarafından onay verilmiş ve immun yetmezliği tedavilerinde kullanılması önerilmiştir (Kılıç, 2003). İlk olarak kas içine enjeksiyon ile uygulanan yöntem damardan immunoglobulin verilmesi yönteminin (IVIg) idyopatik trombositopenik purpura (ITP) tedavisinde daha etkili olduğu belirlendikten sonra yerini bu yönteme bırakmıştır. Zayıf immün sistemine sahip hastalara antikor tedavisi uygulanması enfeksiyon riskini azaltmaktadır. İmmunoglobulin ürünleri bağışıklık sistemi yetersizliklerinde, Kawasaki hastalığı tedavisinde, hematopoietik kök hücre naklinde, kronik B-hücresi lenfotik lösemide ve HIV tedavisinde kullanılmaktadır.

Son yıllarda biomedikal araştırma ve geliştirme çalışmalarında monoklonal antikorların önemi artmıştır. Monoklonal antikorların üretimi 2006-2010 yılları arasında üç kata yakın bir artış göstermiştir. Dünya çapındaki IgG tüketimi de 1992-2003 yılları arasında 19.4 tondan 52.6 tona çıkmıştır (Denizli, 2011). Buna paralel olarak antikor temelli tedaviler ve *in vivo* teşhis yöntemleri dünya çapında yetkili kuruluşlardan onay almaktadır (Guerrier vd., 2000). Tıbbi uygulamalar için genellikle yüksek saflıkta IgG gereklidir. Bu uygulamalar için immunoglobulinler çöktürme ve kromatografi başta olmak üzere çok çeşitli fizikokimyasal yöntemler kullanılarak saflaştırılmaktadır.

Cohn plazma fraksiyon yöntemi bu alanda yıllardır kullanılan bir yöntem olmuştur (Cohn vd., 1946). Bu yöntemde proteinlerin etanol-su karışımı içinde farklı çözünürlükleri olduğu prensibine dayanarak ayırım gerçekleştirilmektedir. Günümüzde etanol çöktürmesiyle fraksiyonlara ayırma yöntemi ticari ölçekte insan plazmasından IgG saflaştırmak için kullanılan en yaygın yöntemdir (27 ton/yıl) (Muronetz ve Korpela, 2003). Bu yöntemde ek olarak protein A bağlanmış adsorbanlar gösterdikleri yüksek seçicilik sayesinde pilot ölçekte tek basamakta antikor saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Her ne kadar protein A genetiği değiştirilmiş bakterilerden elde ediliyor olsa da, izolasyonu hala karmaşık ve maliyetlidir. Yüksek seçiciliğe sahip olmasına karşın protein A'nın göz önüne alınması gereken bazı dezavantajları vardır: (i) önemli miktar protein A matriksten sızabilir. Böyle bir durumda oluşacak kontaminasyon özellikle klinik uygulamalarda tolere edilemez; (ii) protein A'nın eldesi yüksek maliyetlidir. Buna

ek olarak protein A'nın uygun şekilde immobilizasyonu zordur. Ayrıca degradasyona oldukça duyarlıdır (Çanak vd., 2004, Denizli ve Arıca, 2000). Diğer taraftan, pseudo-seçici ligandlar bir çok biyomolekülün saflaştırılmasında kullanılabilir. Bu ligandların seçiciliği, elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağları ve van Der Waals etkileşimleri gibi zayıf etkileşimlerin ortak etkisiyle gerçekleşmektedir. Son dönemde, küçük amino asitler, pseudo-seçici ligandlar olarak endüstriyel biyoafinite ayırmada kullanılmaktadır. Bu ligandlar, protein ligandlarından daha kararlıdır ve biyolojik aktivite kaybı gibi sorunları yoktur. Ekonomik olmaları, kolay immobilizasyon ve yüksek adsorpsiyon kapasiteleri diğer avantajları olarak sayılabilir. Pseudoseçici ligand histidin, taşıdığı karboksil, amino ve imidazol grupları ile çeşitli proteinlerle izoelektrik noktalarında veya civarında etkileşebilir (El-Kak vd., 1991). Protein A afinite kromatografisine alternatif olarak iyon değişim, boya, histidin, tiyofilik, hidrofobik ve immobilize metal afinite kromatografisi de kullanılan yöntemler arasındadır. İmmobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) Porath tarafından 1975 yılında geliştirilen ve temel olarak antikor moleküllerinin yüzeylerindeki histidini kullanarak antikorları saflaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Kullanılan ligand (şelatlanmış metal iyonları) yüksek stabiliteye, kapasiteye ve özgünlüğe sahiptir (Vançan vd., 2002). Metal afinite kolonuna bağlanan antikor pH'nın düşürülmesiyle yıkanabilir. Bu yöntemle elde edilen IgG, Protein A yöntemi ile elde edilen saflığa erişmemektedir. Yine de iyon değişim kromatografisi ile birlikte kullanıldığında önemli bir alternatif oluşturmaktadır (Huse vd., 2002). Boya ligand afinite kromatografisi çeşitli proteinlerin saflaştırılması için kullanılan bir başka yöntemdir. Sentetik boyalar çeşitli reaktif gruplar içermeleri ve düşük maliyetli olmaları sebebiyle tercih edilmektedirler (Wongchuphan vd., 2009). Hidrofobik etkileşim kromatografisi de antikor saflaştırmasında kullanılan etkili yöntemlerden biridir (Aktaş Uygun vd., 2009).

Yukarıda sözü edilen yöntemler günümüzde kullanılan ve ticari ölçekte IgG saflaştırmada kullanılan yöntemlerdir. IgG'nin terapötik ve klinik teşhis amacıyla artan şekilde kullanılması kullanılan yöntemlerin maliyet / verim açısından sorgulanmasını gerekli kılmıştır. Saflaştırma işlemi için kullanılan katı destek ya mikrobiyolojik ajanlardan üretilmekte, ya da karmaşık polimerizasyon basamakları ile sentezlenmektedir. Katı desteğin elde edilmesi için gerekli her kimyasal basamak (özellikle ticari ölçekte düşünüldüğünde) maliyet artışı anlamına gelmektedir. Üretim aşamasında hammaddelerdeki maliyet artışının da

ürün fiyatına yansımaları kaçınılmazdır. Günümüzde İvİg tedavisi için kullanılan ilaçların fiyatlarının çok yüksek olması bunun en açık göstergesidir (Çizelge 1.5). Bu ilaçların ithal olması da fiyat artışında ayrı bir dezavantajdır. Yüksek fiyatına karşın geçtiğimiz yıllarda piyasada ilaç sıkıntısı yaşanması da bu konuda karşılaşılan ayrı bir sorundur (Anonim, 2007). Bu noktada maliyetlerin düşürülerek üretimin daha ekonomik hale getirilmesi ihtiyacı doğmaktadır. Safılaştırma maliyetinin önemli bir kısmının katı destek üretiminden kaynaklandığı düşünüldüğünde daha ekonomik, kolay ulaşılabilir, geri dönüştürülebilir bir katı destek birçok açıdan önemli faydalar sağlayacaktır. Maliyetin yanısıra kullanılacak olan materyalin geri dönüştürülebilir, doğal bir materyal olması uzun vadede ortaya çıkabilecek sorunların da önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Karayosunları yukarıda bahsedilen özellikleri ile alternatif bir katı destek olma potansiyeline sahiptir. Karayosunlarının yaygın olarak bulunuyor olmaları materyal teminindeki maliyeti önemli ölçüde düşürmektedir. Öyle ki planlı bir arazi çalışması ile kullanılacak bitkilerin kolaylıkla ve sürekli olarak temin edilmesi mümkündür. Karayosunlarının bazı türleri kurak koşullara adaptasyon için yaprak hücrelerinde bazı çıkıntılar oluştururlar. Papilla veya mamilla denilen bu uzantılar bitkilerin yüzey alanını çok büyük ölçüde artırmaktadır. Bu sebeple özellikle afinite kromatografisinde gerekli olan yüzey alanı, bu karayosunu türleri tarafından doğal olarak oluşturulmaktadır. Karayosunlarının yaprak yüzeyindeki kimyasal yapı tam olarak açıklanamamış olmasına karşın, yapılan incelemelerde önemli hidrofobik grupların olduğu belirlenmiştir. Yüzeylerinde bulunan kütikül tabakası ve bazı türlerin yapraklarında bulunan mum yapıları da bu hidrofobikliği artırmaktadır. Adsorpsiyon mekanizmasının belirlenmesi bu bitkilerin kullanımını daha mümkün hale getirecektir.

Çizelge 1.5. İvİg tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar ve fiyatları (Anonim, 2011).

İlaç Bileşeni	Üretici / İthalatçı Firma	İlaç Fiyatı
I.G. Vena 5 gr	Onko Eczacı San.	868.83 TL
Gamunex %10 50 ml IV	Biem İlaç Ltd.	1212.75 TL
Tegeline 5 gr 100 ml	Erkim İlaç	1095.55 TL
Octagam 5 gr 100 ml	Farmapek Tıbbi Ürünler	1221.27 TL
Gamunex %10 100 ml IV	Biem İlaç Ltd.	2396.71 TL
Octagam 5 gr 100 ml	Berk İlaç	2413.76 TL
Gamunex %10 200 ml IV	Biem İlaç Ltd.	4764.62 TL

Safılaştırma yöntemlerinde maliyeti artıran bir diğer husus da katı destek maddesinin ömrüdür. Yüksek maliyetle temin edilen desteğin ömrünün uzun olması, tekrar tekrar kullanılabilmesi, verimi ve dolayısıyla üretimin maliyeti açısından büyük önem taşımaktadır. Bu açıdan bakıldığında karayosunlarıyla yapılan çalışmalarda bu bitkilerin tekrar kullanılma kapasitelerinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu da, bu bitkilerin katı destek olarak kullanılmaları durumunda çok verimli bir şekilde üretime katkı sağlayacağı anlamına gelmektedir. kullanılan karayosunları basit temizlik ve hazırlık aşamaları dışında herhangi bir ek kimyasal işlem görmemiştir. Diğer bir deyişle bitkiler basit temizleme, ayıklama işlemlerinin ardından, doğadan toplandıkları gibi kromatografik yöntemlerle kullanılmaya hazırdır. Bahsedilen her biyokimyasal işlemin, sentezin ayrı bir maliyeti olduğu düşünöldüğünde bitkilerin ekonomik değeri bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Karayosunlarının bir diğer avantajı da doğal ve yenilenebilir olmasıdır. Üretim veya sentez gibi bir işleme gerek duyulmamasından dolayı IgG saflaştırılması için temin edilmesi sürecinde çevreye bir zarar vermemektedir.

Bütün özelliklerini göz önüne alındığında, karayosunlarının artan ihtiyaca karşılık verebilmek ve üretim maliyetlerini düşürebilmek amacıyla IgG saflaştırılmasında kullanılabilme potansiyelinin değerlendirilmesi, yeni ve doğal bir alternatif sorbent olarak bilim dünyasına kazandırılabilmesi olanaklarını araştırılması, bu tezin amacını oluşturmaktadır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Ekipman

Bitki teşhisi ve hazırlık aşamalarında Sigma pensler, Olympus stereo mikroskop, Olympus BX-50 araştırma mikroskobu, dijital fotoğraflama için Olympus BX10 ışık mikroskobu üzerine takılı Olympus Camedia 5050 dijital fotoğraf makinesi ve Heraeus (Function Line) etüv kullanılmıştır.

Kurutma sonrası öğütülen karayosunu örneklerinde partikül boyutlarını belirleme ve karakterizasyon (niteleme) çalışmalarında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan Retsch (AS 200 Digit) analitik eleme makinası, ADÜ Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Philips XL-30S FEG) kullanılmıştır.

Rutin laboratuvar çalışmalarında ise karıştırma işlemleri için Velp (Multistirrer 15) çoklu manyetik karıştırıcı, santrifüjleme işlemi için Hettich (Universal 32R) santrifüj, tamponların pH ayarlaması için Hanna (pH 211) pH metre, absorbans ölçümleri için Shimadzu (UV-1601) spektrofotometre, farklı sıcaklık denemeleri için Memmert (WB14) çalkalamalı su banyosu ve VWR (1180S) soğutmalı su banyosu, örneklerin çözünmesinde kullanılmak üzere Bandelin Sonorex (RK255H) ultrasonik banyo, tartım işlemleri için Shimadzu (AX 200) 0.1 mg hassasiyette terazi ve Brand (Transferpette) otomatik pipetler kullanılmıştır.

Adsorpsiyon-desorpsiyon denemelerinde kullanılan HIGG Sigma'dan, iyonik şiddet denemelerinde kullanılan NaCl Merck'den, etilen glikol, Tris-HCl Fluka'dan temin edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Diğer İşlemlere Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılmak üzere yüzeylerinde papilla, mum vb. yapılar olan karayosunu türleri tercih edilmiştir. Bu türlerin geniş yayılıma sahip olmasına dikkat edilmiştir. Bu amaçla belirtilen özellikleri taşıyan, Aydın yöresinde yayılışa sahip *Antitrichia californica* Sull., *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwaegr., *Bartramia stricta* Brid., *Syntrichia papillosissima* (Copp.) Loeske, *Pterogonium gracile* (Hedw.) Sm., *Orthotrichum rupestre* Schleich. ex Schwaegr. ve *Tortella tortuosa* (Hedw.) Limpr. türlerinin araştırmamızda materyal olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

Leucodon sciuroides: Orta boylu, sarımsı yeşil renkli öbekler halinde bulunan bir bitkidir. Yaprakları kuru olduğunda birbirine yapışık, nemli olduklarında ise dik durumdadır. Uzunlamasına plikattır. Lanseolat – ovat şekillidir. Marjin düzdür, üst kısımları dişlenmiştir. Yaprığın uç kısmına yakın bölgelerindeki hücreler oval ve kalın duvarlıdır. Uzun hücreler küçük ve çok sayıdaki yuvarlak hücreler ile çevrelenmiştir.

Syntrichia papillosissima: Gövde 10-25 mm, yapraklar tabanda sıkı, kuru olduğunda geriye katlanmış ve gövde etrafında dolanmış şekilde, nemli olduğunda kuvvetlice geriye kıvrık şekildedir. Lingulat-ovat şekle sahip olur 2.5-4 x 1-1.6 mm boyundadır. Kalın hücre çeperiyle çevrelenmiştir, daha az papilloz hücre içerir. Kostanın yüzeysel hücreleri yuvarlak-kuadrat şekildedir, papillozdur. Bazı durumlarda yaprak ucuna yakın kısımlar elongat ve düzdür, dorsal olarak elongattır. Papilloz, dentikulat veya spinoz yapıdadır. Üst lamina hücreleri yuvarlak-kuadrat şekildedir ve iç kısımları gözeneklidir. Her iki tarafta da yüzeysel olarak konvekstir. Her lümende papilla vardır. Hücre çeperleri incedir ve düzensiz olarak gözeneklidir.

Bartramia stricta: Kümeler halinde bulunan, gövdeleri tomentoz, merkezi silindire sahip bitkilerdir. Kuru veya nemli olduklarında düz ve dik yapraklara sahiptir.

Antitrichia californica: Kuru olduğunda koyu yeşil, nemli olduğunda parlak yeşil renktedir. Substrat üzerinde halı oluşturan ve yayılan bir yapıya sahiptir.

Yaprakları kuru olduğunda imbrikat, nemli olduğunda dik-açık haldedir. Ovat-lanseolat, uç kısmı dentikulattır.

Belirlenen karayosunu türlerinin toplanması amacıyla 2008 yılı Ağustos ayında Aydın / Paşayaylası Mevkii'nde arazi çalışması gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmasında toplanan bitkiler uygun plastik torbalara alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Bitkiler burada tür bazında ayrılmış, araya karışma ihtimali olan yabancı türler stereo mikroskop da kullanılarak ayıklanmıştır. Bu işlemde sonra güncel bitki teşhis anahtarları (Smith, 1991 ve 2004, Zander, 1993, Munoz, 1997) kullanılarak türlerin teşhisi yapılmış ve daha sonraki işlemler için hazır hale getirilmiştir.

Toplanan karayosunu örnekleri yetiştikleri ortam itibariyle yoğun olarak tortu ve döküntü içermektedir. İlerleyen çalışmalarda sonuçları etkilememesi açısından bu tortuların mümkün olduğunca ayıklanmasına çalışılmıştır. Bu amaçla ilk aşamada bitkiler henüz tam olarak kurumadan alt kısımlarında yer alan kaba tortuları elle ve makasla ayıklanmıştır. Buna ek olarak kirli ve canlılığını yitirmeye başlamış olan kısımları kesilmiş, canlı ve nispeten temiz kısımlar kurutulma aşaması için ayrılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bitki örnekleri distile su kullanılarak yıkanmış ve yaprakların arasında kalması muhtemel tortulardan olduğunca arındırılmaya çalışılmıştır. Yıkama ve temizleme işlemlerinden geçirilen bitkiler kurutma kağıdı üzerinde oda sıcaklığında bekletilerek kabaca nemini vermesi sağlanmıştır (Şekil 2.1). Bitkiler son olarak 1 hafta süreyle 40 °C sıcaklıkta etüvde tutularak kurutulmuştur. Tamamen kuruyan bitkiler havan yardımı ile ezilmiş ve toz haline getirilerek kavanozlarda saklanmıştır.

Kavanozlarda saklanan bitki örnekleri Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında elek analizine tabi tutulmuştur.

Elek analizi, toz halindeki örneğin elek sistemine yukarıdan yüklenmesi ve cihazın titreşimler oluşturması sonucunda tanecik boyutlarına göre ayrılması işlemidir. Elek analizi için Retsch AS 200 Digit model analitik eleme makinası kullanılmıştır (Şekil 2.2). Analiz için temel olarak 5 farklı tanecik boyu aralığı tercih edilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Elek analizinde kullanılan büyüklük aralıkları

450 μm 'dan büyük tanecik boyu
450 μm – 355 μm tanecik boyu
355 μm – 250 μm tanecik boyu
250 μm – 200 μm tanecik boyu
200 μm – 140 μm tanecik boyu
140 μm 'den küçük tanecik boyu



Şekil 2.1. Karayosunu örneklerinin ön kurutma aşaması (Şekildeki örnek *Syntrophia papillosissima*'dır)



Şekil 2.2. Analitik eleme makinası

Ölçüm işlemine başlamadan önce metal elekler basınçlı hava yardımıyla temizlenerek gözeneklerin açılması ve varsa yabancı maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra sırasıyla 450 μm , 355 μm , 250 μm , 200 μm , 140 μm tanecik büyüklüğüne sahip metal elekler ve metal toplama kabı büyük gözenekli elek en üstte kalacak şekilde cihazın üstüne yerleştirilmiştir. En üstteki metal eleğe bitki örnekleri yüklendikten sonra cihaz 6 dakika süreyle % 60'lık sallama şiddetiyle çalıştırılmış ve toz haline getirilmiş bitki parçacıklarının eleklerle dağılması beklenmiştir. Süre sonunda elekler dikkatlice cihazdan ayrılarak her eleğin içeriği kağıt üzerine alınmış ve ağırlıkları tartılmıştır (Şekil 2.3). Ayrım sonunda oluşan fraksiyonlar ayrı kaplara alınarak muhafaza edilmiştir (Şekil 2.4). Bu işlem *Antitrichia californica*, *Leucodon sciuroides*, *Syntrichia papillosissima* ve *Bartramia stricta* türleri için sırasıyla tekrarlanmış, *Pterogonium gracile*, *Orthotrichum rupestre* ve *Tortella tortuosa* türlerinin miktarları analiz için yeterli olmadığından bu türlerle çalışılmamıştır. Ayrım ve tartım işlemi sonucunda her tür için grafik oluşturulmuştur.



Şekil 2.3. Eleklere dağılmış olan bitki parçacıkları



Şekil 2.4. Farklı tanecik boylarına sahip bitkilerin muhafaza edilmesi

2.2.2. Bitki Örneklerinin Karakterizasyonu

2.2.2.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) ölçümleri

Bitkilerin FTIR spektrumları FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 2.5). Bu amaçla kurutulmuş bitki parçaları (0.1 g) yaklaşık 0.1 KBr ile karıştırılmış ve özel aparat kullanılarak sıkıştırılarak pelet haline getirilmiştir. Daha sonra örnekler cihaza yerleştirilerek FTIR spektrum ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 2.5. FTIR spektrofotometresi

2.2.2.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) gözlemleri

SEM gözlemleri için her türe ait kurutulmuş bitki örnekleri kullanılmıştır. Karayosunu örnekleri daha önceden kurutulmuş toz haline getirildiği için ek bir kurutma işlemine ihtiyaç duyulmamıştır. Örnekler iletkenliğe sahip olmadıkları için inceleme başlıkları üzerine çift taraflı iletken bant ile yapıştırılarak sabitlenmiştir (Şekil 2.6). Yerleştirme işleminin ardından iletkenliği artırarak görüntü kalitesini iyileştirme amacıyla altın kaplama aşamasına geçilmiştir. 10 dakika süreyle vakum ortamında kaplaması gerçekleştirilen örnekler daha sonra SEM cihazının içine yerleştirilmiş ve görüntülenmeye hazır hale gelmiştir (Şekil 2.7). Görüntülerini almak üzere hem parçalanmamış, hem de parçalanmış bitki örnekleri kullanılmıştır. SEM gözlemleri taramalı elektron mikroskobu (Philips XL-30S FEG) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.6. İncelenecek örneklerin yapıştırılarak başlıklar üzerine yerleştirilmesi



Şekil 2.7. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) (İzmir Yüksek Teknoloji Ens.)

2.2.3. Bitki Örneklerine HIgG Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi

Kurutularak toz haline getirilmiş bitki örneklerinden 140 µm'den küçük partikül boyuna sahip olanlar adsorpsiyon (yüzeyde tutma) ve desorpsiyon (dışarı salma) incelemeleri için seçildi. Bitkilere HIgG adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistem kullanılarak incelendi. Bu amaçla bitkiler HIgG çözeltisi ile denge süresi boyunca (2 saat) manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Adsorpsiyona pH, iyonik şiddet, HIgG başlangıç derişiminin etkisi ve sıcaklık etkisi incelendi. Desorpsiyon deneyleri ile bitkilerin tekrar kullanılabilirliği araştırıldı.

2.2.3.1. Bitki örneklerine HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi

Farklı pH çözeltilerinde (pH 3.0-5.0 asetat tamponu; 6.0-8.0 fosfat tamponu; 9.0 karbonat tamponu) derişimleri 0.5 mg/mL olan HIgG çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerden 1'er mL alınarak spektrofotometrede 280 nm'de absorbansları okundu. Kalan çözeltilere 0.025 g bitki örneği konularak 2 saat süre ile manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Süre sonunda örneklerden 1'er mL alınarak 10 dakika süreyle 15,000 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant alınarak 280 nm'de absorbansı okundu. Elde edilen değer aşağıdaki denklem kullanılarak adsorpsiyon değerleri elde edildi ve grafik oluşturuldu.

$$Q = [(C_0 - C)V]/m$$

Eşitlikte yer alan Q, birim bitki üzerine adsorplanan HIgG kütlesini (mg/g); C₀ bitki ile etkileşime girmeden önceki HIgG derişimini; C bitki ile etkileşime girdikten sonraki HIgG derişimini; V toplam hacmi (mL), m deneylerde kullanılan bitki kütlesini (g) belirtmektedir. Adsorpsiyonun en yüksek olduğu pH değeri seçilerek diğer adsorpsiyon deneylerine belirlenmiş pH değeri ile devam edildi.

2.2.3.2. Bitki örneklerine HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi

HIgG adsorpsiyon deneyleri pH 5.0 asetat tamponunda gerçekleştirildi. İyonik şiddet hesaplamaları denklem kullanılarak yapıldı.

$$I = \frac{1}{2} \cdot \frac{n}{V} \cdot (Z^2)$$

Eşitlikte yer alan I, iyonik şiddeti; n, mol sayısını; V, hacmi (litre) ve Z, iyon yükünü belirtmektedir. Farklı iyonik şiddetlerde adsorplanan HIgG miktarı hesaplandı. İyonik şiddete karşı gram bitki başına adsorplanan HIgG miktarı grafiği çizilerek adsorpsiyonun en yüksek olduğu değer belirlendi.

2.2.3.3. Bitki örneklerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi

Adsorpsiyona HIgG başlangıç derişiminin incelenmesi amacıyla derişimleri 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 1.0; 2.0 mg/mL olan HIgG çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler 25°C'ta, pH 5.0 asetat tamponunda 2 saat boyunca bitki ile muamele edildi. Her derişimde adsorplanan HIgG miktarı hesaplanarak HIgG derişimine karşı adsorplanan HIgG miktarını gösteren grafik çizildi. Bu grafikten bitkinin maksimum adsorpsiyon kapasitesi bulundu. Bu verilerden yararlanarak Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi hesaplandı ve grafikleri çizildi.

2.2.3.4. Bitki örneklerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi

Adsorpsiyona sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla adsorpsiyon deneyleri 4, 15, 25, 35, 45 °C'taki sıcaklıklarda gerçekleştirildi. 4 °C için buzdolabı, diğer sıcaklıklar için su banyoları kullanıldı. HIgG ile bitkinin 2 saat muamele edilmesinin ardından adsorplanan HIgG miktarı hesaplandı ve sıcaklığa karşı adsorplanan HIgG miktarını gösteren grafik çizilerek sonuçlar değerlendirildi.

2.2.3.5. Bitki örneklerinden HIgG desorpsiyonu

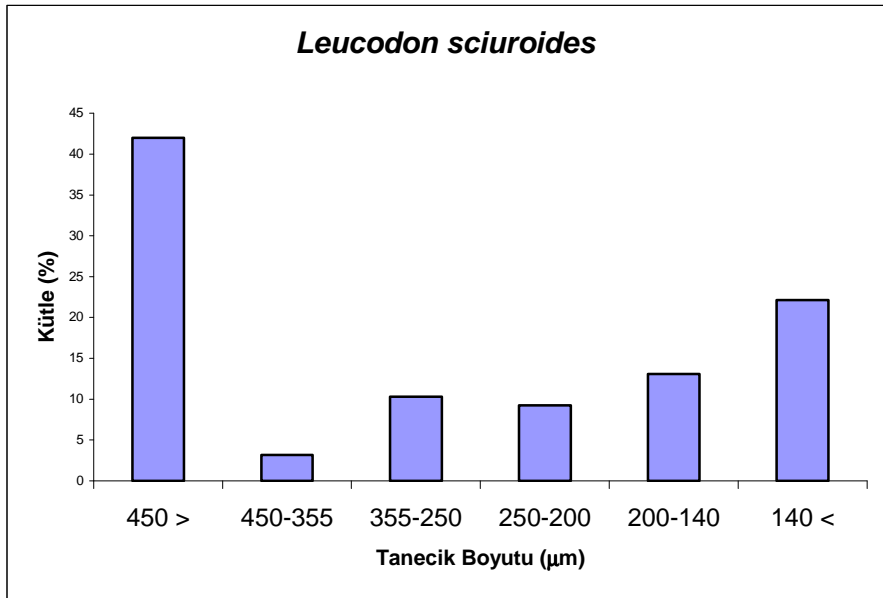
Optimum koşullar altında (pH:5.0 asetat tamponu, 25°C sıcaklık) bitkiye HIgG adsorpsiyonu gerçekleştirildi. Süre sonunda yapılan hesaplamalar ile bitkiye adsorbe edilen HIgG miktarı hesaplandı. HIgG adsorbe edilmiş bitki örnekleri bulunan çözelti 10 dakika süreyle 15,000 rpm'de santrifüjlenerek süpernatant

atıldı. Bitki örnekleri daha önceden hazırlanmış olan %50'lik etilen glikol çözeltisi içine alınarak 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Süre sonunda 1 mL örnek alınarak 10 dakika süreyle 15,000 rpm'de santriüjlendi. İşlem sonunda süpernatant alınarak 280 nm'de absorbansı okundu. Hesaplamalar ile desorbe edilen HIgG miktarı saptanmış oldu. Bu işlem 5 tekrarlı olarak gerçekleşti ve adsorpsiyon kapasitesinde düşüş olup olmadığı belirlendi.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

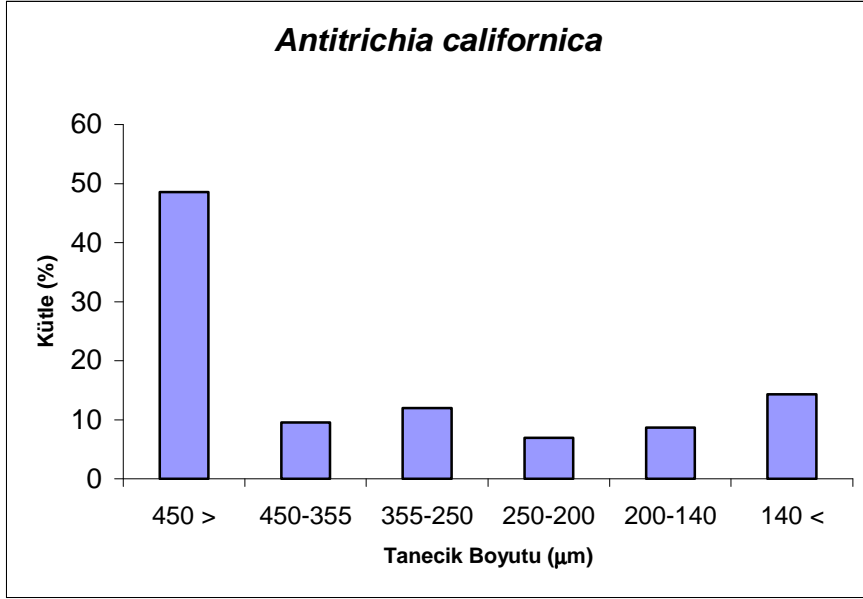
3.1. Bitki Örnekleri

Toplanarak kurutulmuş ve toz haline getirilen bitki örnekleri elek analizine tabi tutulmuş ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tartılarak muhafaza edilmiştir. Yapılan tartım işlemleri sonucunda ortaya çıkan dağılım Şekil 3.1 – 3.4’de sunulmuştur.



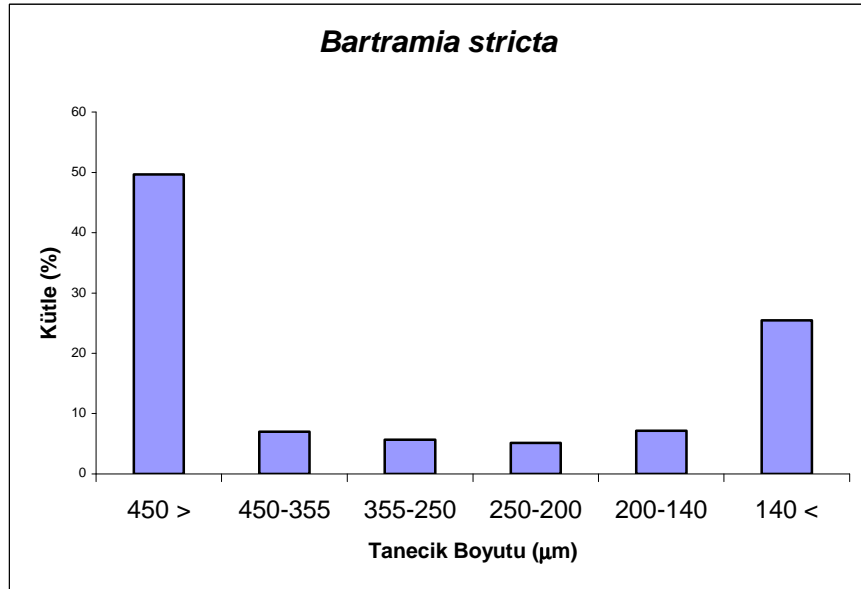
Şekil 3.1. *Leucodon sciuroides* türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği

L. sciuroides için tanecik boyutu 450 µm’den büyük olan partiküller toplam kütle için yaklaşık %42’sini oluştururken, deneylerde kullanılan 140 µm altı partiküller toplam kütle için yaklaşık %22’sini oluşturmaktadır.



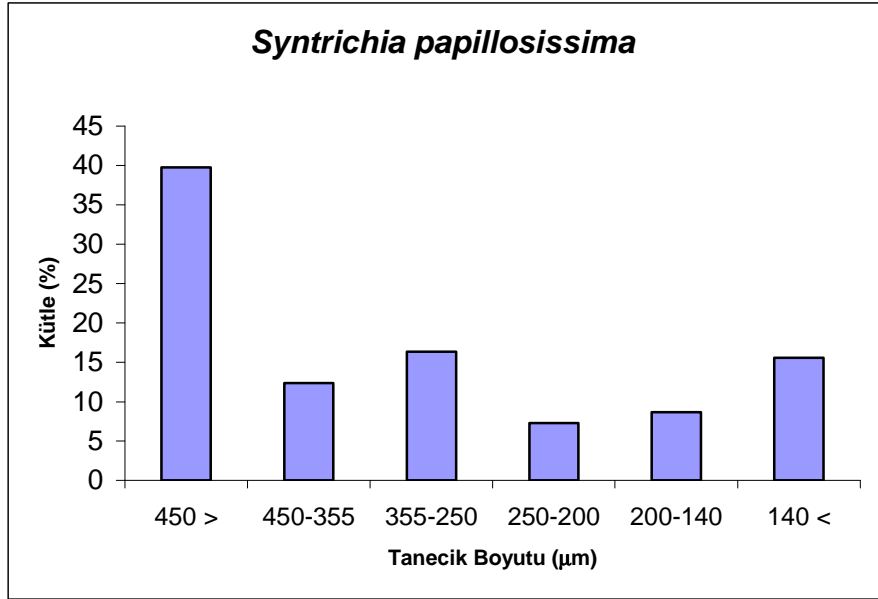
Şekil 3.2. *Antitrichia californica* türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği

A. californica için tanecik boyutu 450 µm'den büyük olan partiküller toplam kütle için yaklaşık %49'unu oluştururken, deneylerde kullanılan 140 µm altı partiküller toplam kütle için yaklaşık %14'ünü oluşturmaktadır.



Şekil 3.3. *Bartramia stricta* türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği

B. stricta türünde tanecik boyutu 450 μm 'den büyük olan partiküller toplam kütle için yaklaşık %50'sini oluştururken, deneylerde kullanılan 140 μm altı partiküller toplam kütle için yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır.



Şekil 3.4. *Syntrichia papillosissima* türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği

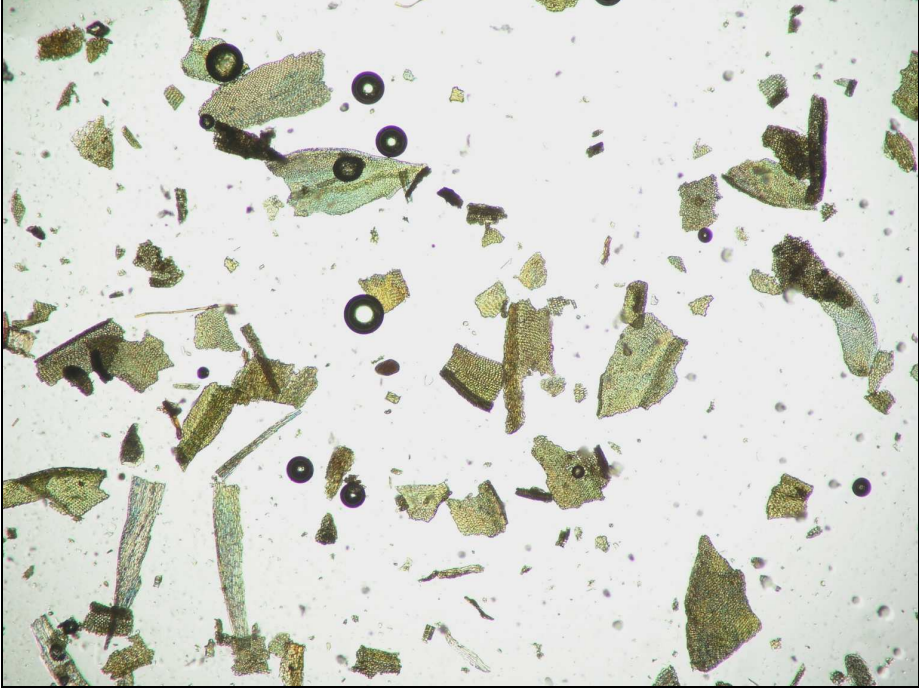
S. papillosissima türünde tanecik boyutu 450 μm 'den büyük olan partiküller toplam kütle için yaklaşık %40'ını oluştururken, deneylerde kullanılan 140 μm altı partiküller toplam kütle için yaklaşık %16'sını oluşturmaktadır.

Türler arasında bir karşılaştırma yapmak gerekirse yapılan öğütme ve eleme işlemleri sonrasında 140 μm altı parçaların kütle için toplam kütle oranında *B. stricta* türü %25 ile ilk sırada gelmektedir. Bu türü %22 ile *L. sciuroides* türü takip etmektedir. Aynı öğütme ve eleme işlemleri sonrasında bu iki türden daha fazla miktarda 140 μm altı kütle elde ediliyor olması bu iki türün tercih edilebilmesi açısından da önem taşımaktadır. Eleme işlemi sonrasında diğer tanecik büyüklüklerine sahip partiküller tekrar öğütme işlemine tabi tutularak kullanılabilirler.

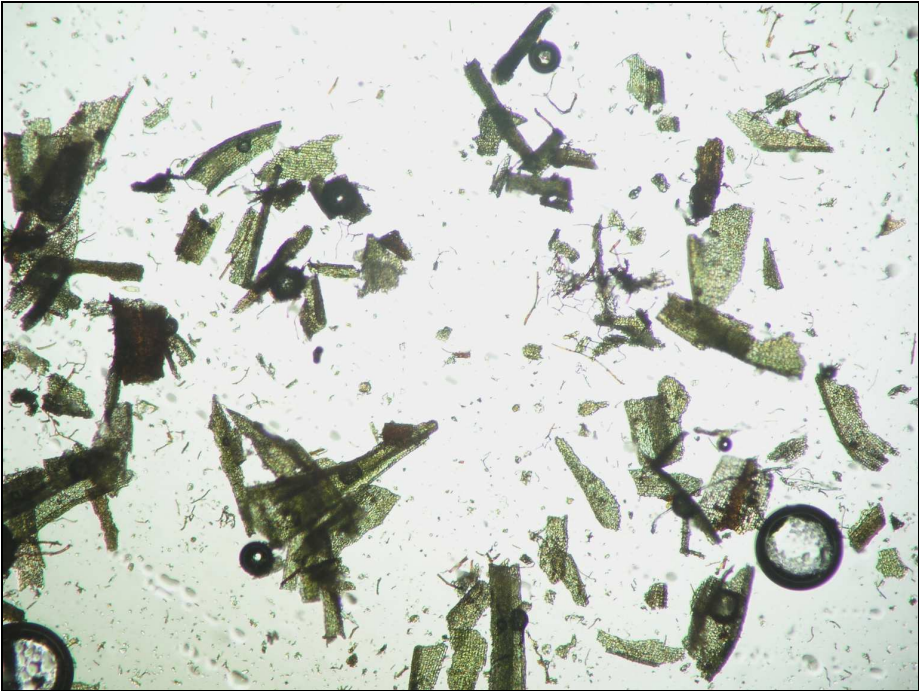
140 μm altı parçaların mikroskobik görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.5 – 3.8). Eni 140 μm altında olan bazı bitki parçaları elekten dik olarak geçebildiğinden bu dağılımda 140 μm 'den büyük parçalar bulunabilmektedir. Bu durum her eleme işleminde tekrar edebileceği için elde edilebilir en olası büyüklük tasnifi olarak değerlendirilmiştir.



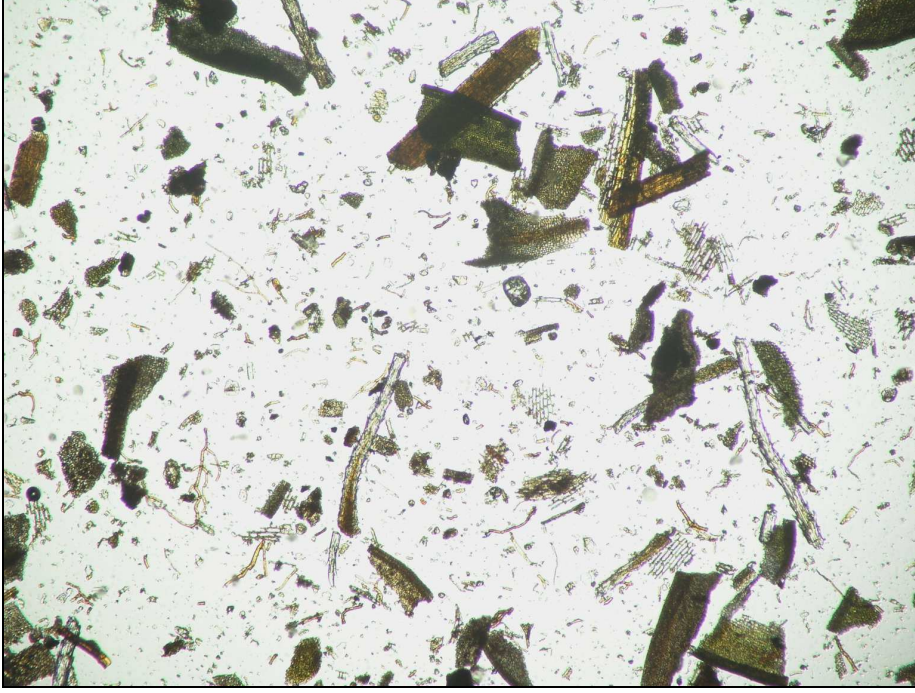
Şekil 3.5. *L. sciuroides* 140 μm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü
(Şekillerdeki yuvarlak alanlar hava kabarcıklarıdır)



Şekil 3.6. *A. californica* 140 µm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü



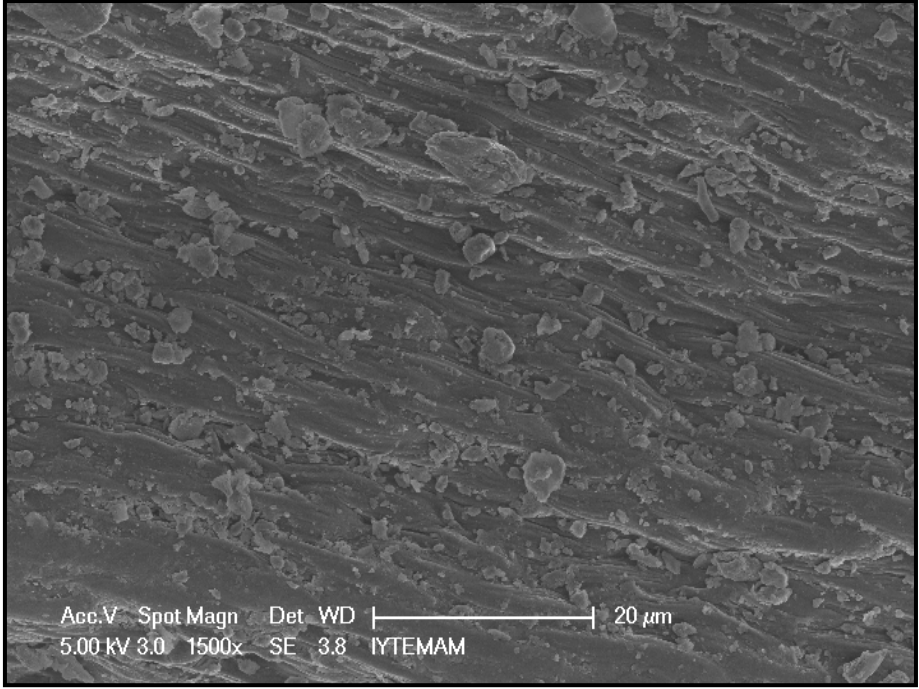
Şekil 3.7. *B. stricta* 140 µm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü



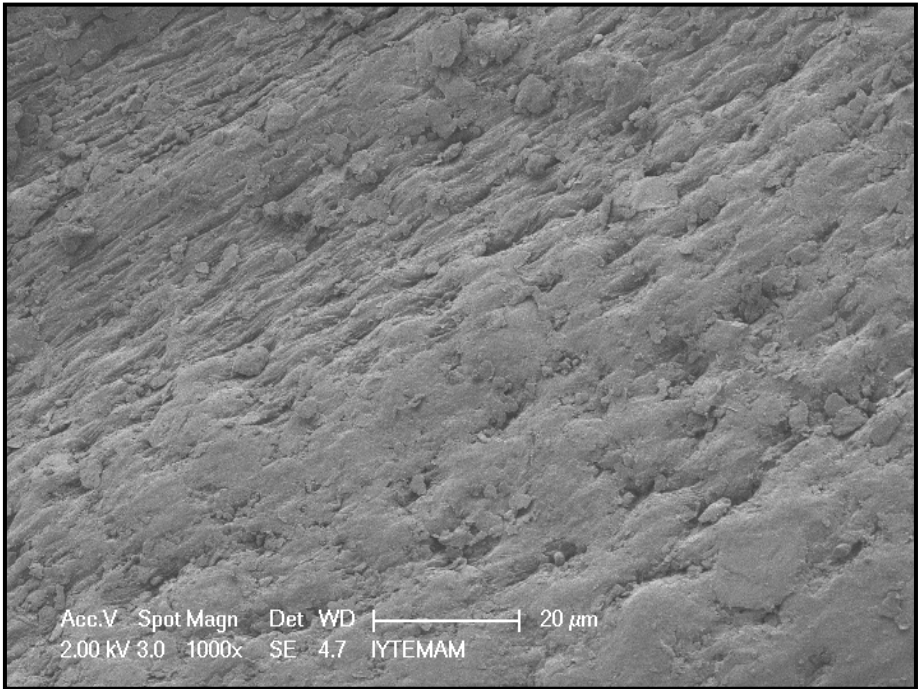
Şekil 3.8. *S. papillosissima* 140 µm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü

3.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Gözlemleri

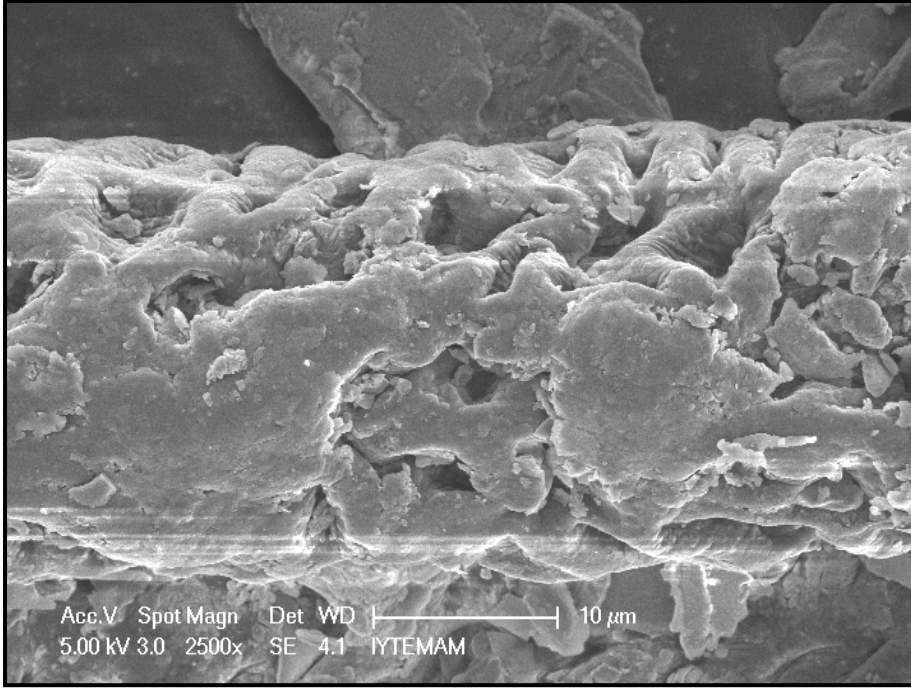
Her bitki örneği için SEM görüntülemesi yapıldı. Örneklerin görüntülenmesi aşamasında yüzey özelliklerini karakterize edebilecek bölgelerin seçilmesine özen gösterilerek ve farklı büyüklüklerde görüntü alınarak, fitosorbent olarak kullanılacak bitkilerin yüzey morfolojileri hakkında fikir sahibi olundu (Şekil 3.9 – 3.16). Bitkilerin üzerinde temizlenmesi mümkün olmayan mikroskobik partiküller ve mum yapıları gözlemlendi. Bitkilerin yüzeylerinde mikro ve makro gözeneklerin bulunması gerek kolon uygulamalarında basınç düşmesini azaltan, gerekse de fitosorbent etkinliğinin araştırıldığı bitkilerin yüzey alanlarını artıran bir unsur olarak belirlendi.



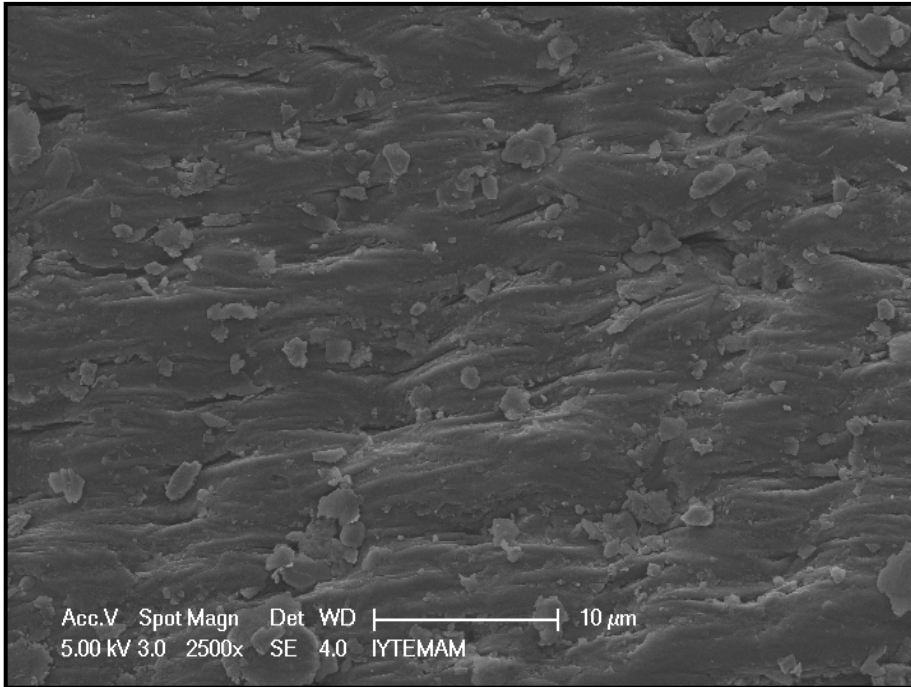
Şekil 3.9. *L. sciuroides* SEM görüntüsü (1500x büyütme)



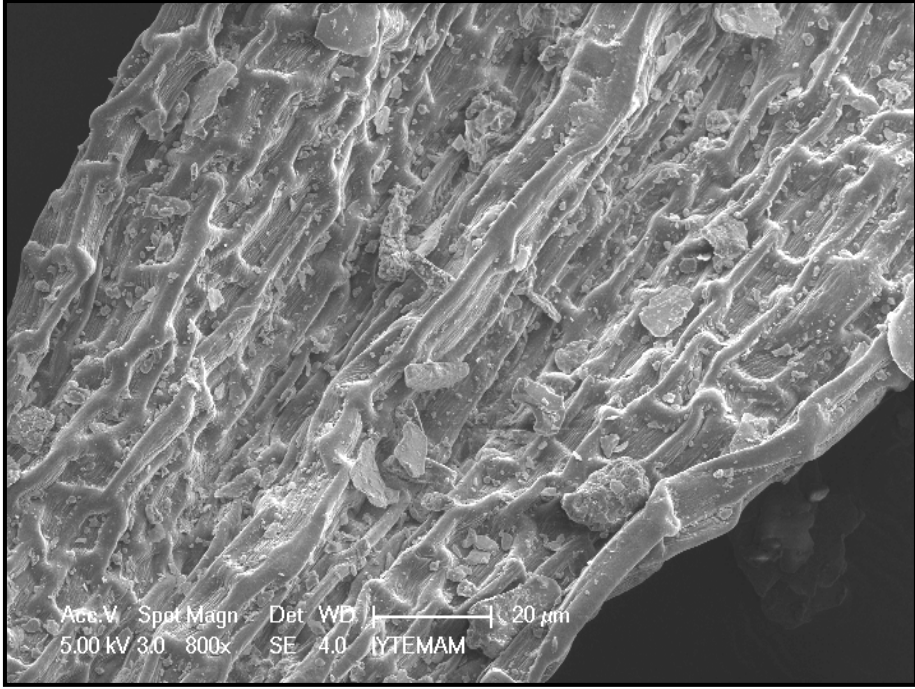
Şekil 3.10. *L. sciuroides* SEM görüntüsü (1000x büyütme)



Şekil 3.11. *A. californica* SEM görüntüsü (2500x büyütme)



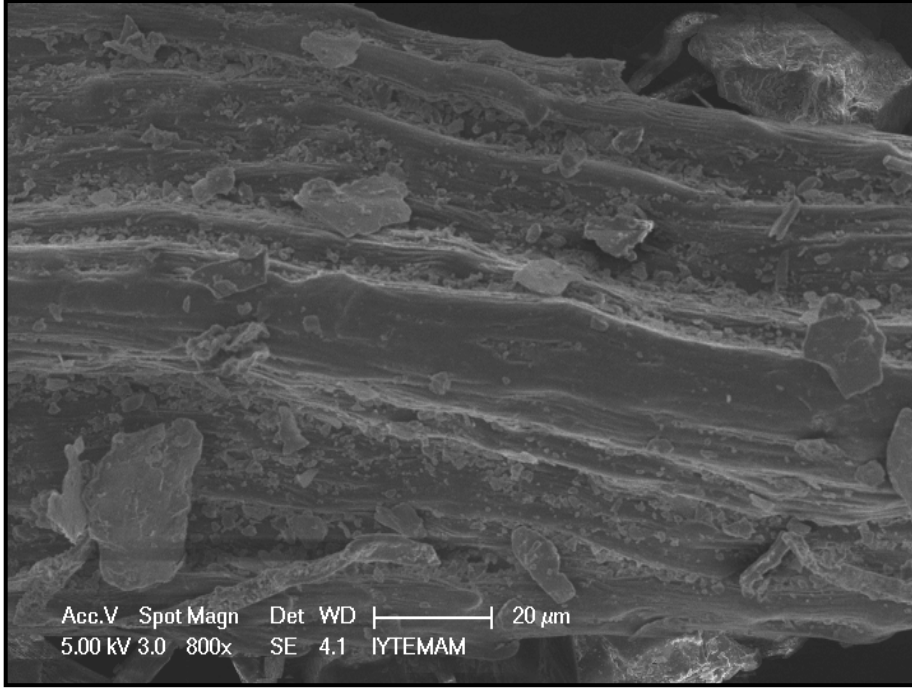
Şekil 3.12. *A. californica* SEM görüntüsü (2500x büyütme)



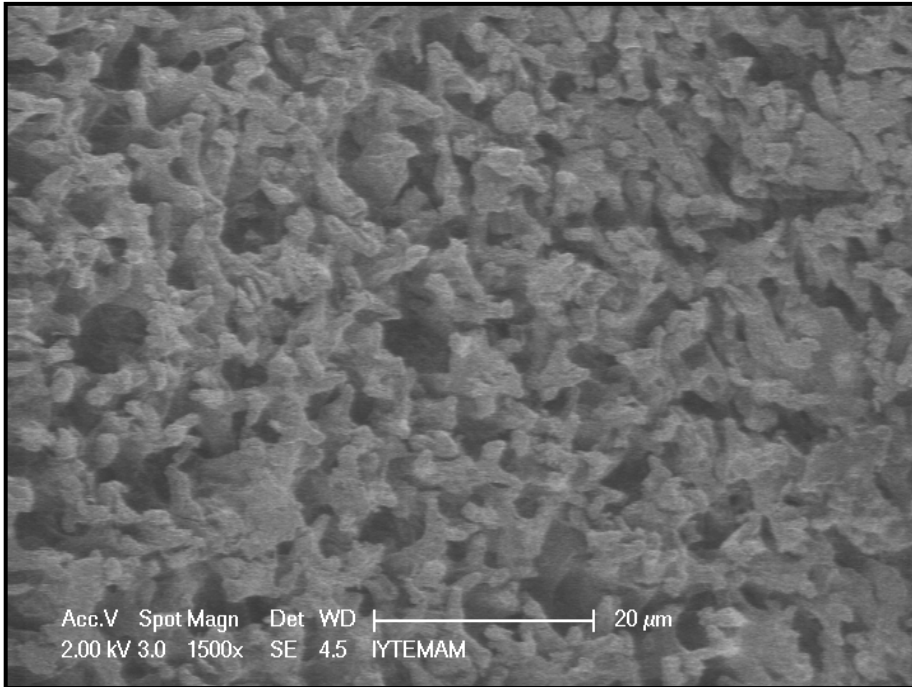
Şekil 3.13. *B. stricta* SEM görüntüsü (800x büyütme)



Şekil 3.14. *B. stricta* SEM görüntüsü (5000x büyütme)



Şekil 3.15. *B. stricta* SEM görüntüsü (800x büyütme)

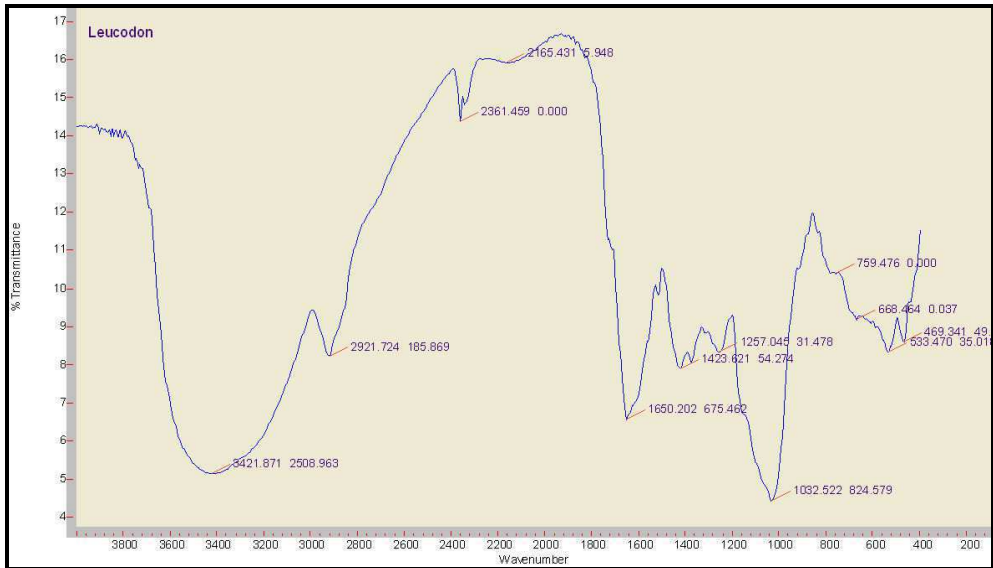


Şekil 3.16. *S. papillosissima* SEM görüntüsü (1500x büyütme)

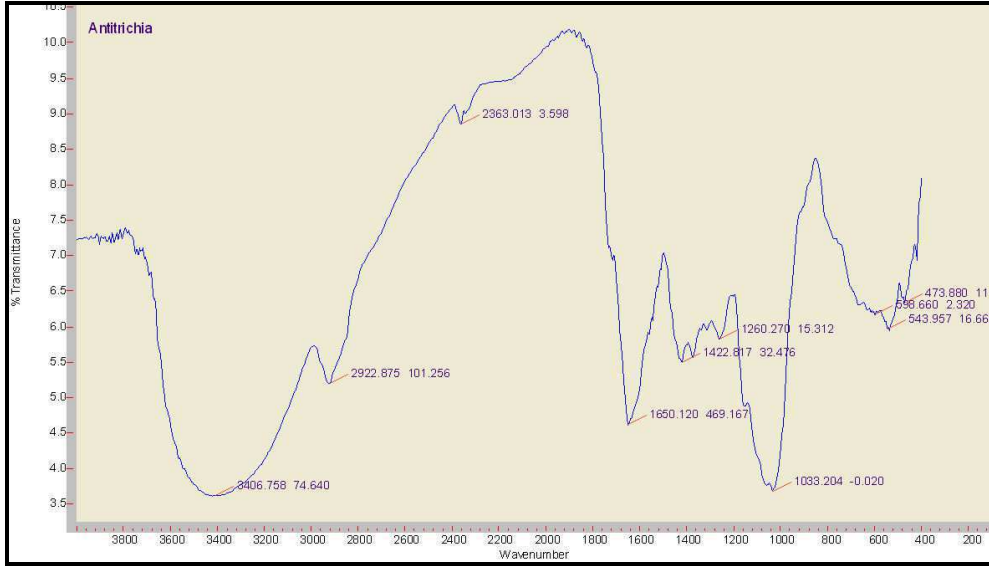
Bitki yüzeylerinin üzerinde, papillaların üzerinde çeşitli partiküller gözlenmiştir. Yıkama işlemleri sonucunda bile temizlenemeyen bu partiküller bitkilerin doğal ortamdan alınmalarının sonucudur. Kültür ortamında yetiştirilen bitkilerde bu tip kirlilikler olmayacaktır. Elde edilen adsorpsiyon sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında bitkilerin yüzeylerindeki adsorpsiyon bölgelerinin bir kısmının kirlilik sebebiyle kapalı olabileceği, bunun da bitkinin adsorpsiyon kapasitesini düşürebileceği söylenebilir. Bu noktadan hareketle maliyet/verim incelemesi yapılırken doğal ortamından alınan bitkiler ile elde edilecek verim ile kültüre alınacak bitkilerden elde edilecek verim karşılaştırılabilir.

3.3. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrometre) Ölçümleri

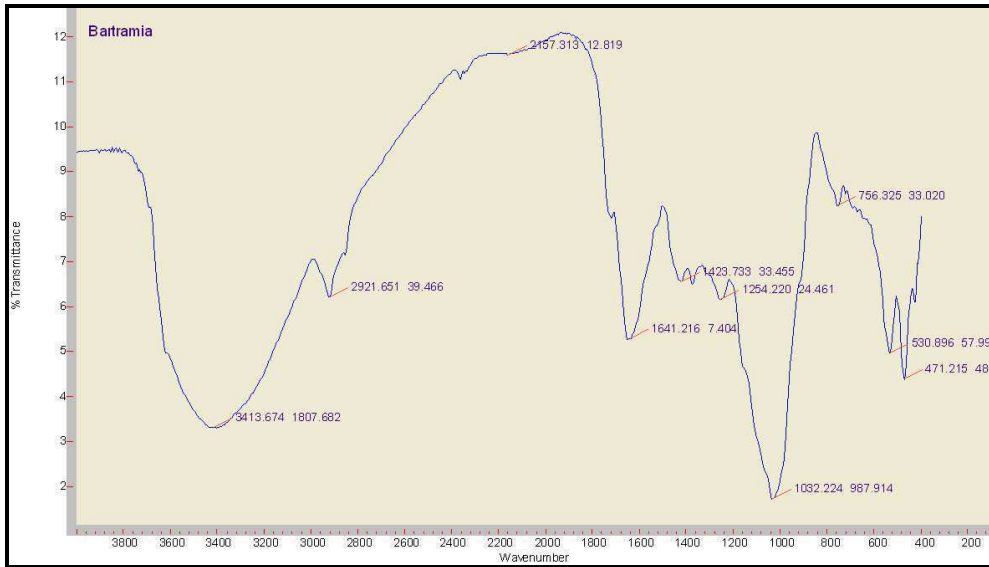
Bitki örneklerinin yüzeylerinde bulunan kimyasal grupların tespit edilmesi için FTIR ölçümleri gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrometresi bir ışın ayırıcı, sabit ve hareketli aynadan oluşan bir prensibe sahiptir. Örnek üzerine gönderilen ışınlar yapıyı oluşturan atomlar arasındaki bağlarda titreşim oluşturur. Farklı dalgalılarıyla tarama yapıldıktan sonra oluşan spektrum yorumlanarak yapının içerdiği kimyasal gruplar hakkında bilgi sahibi olunur (Jiang, 2003). İncelenen bitki örneklerinin FTIR spektrumları aşağıda verilmiştir (Şekil 3.17 – 3.21).



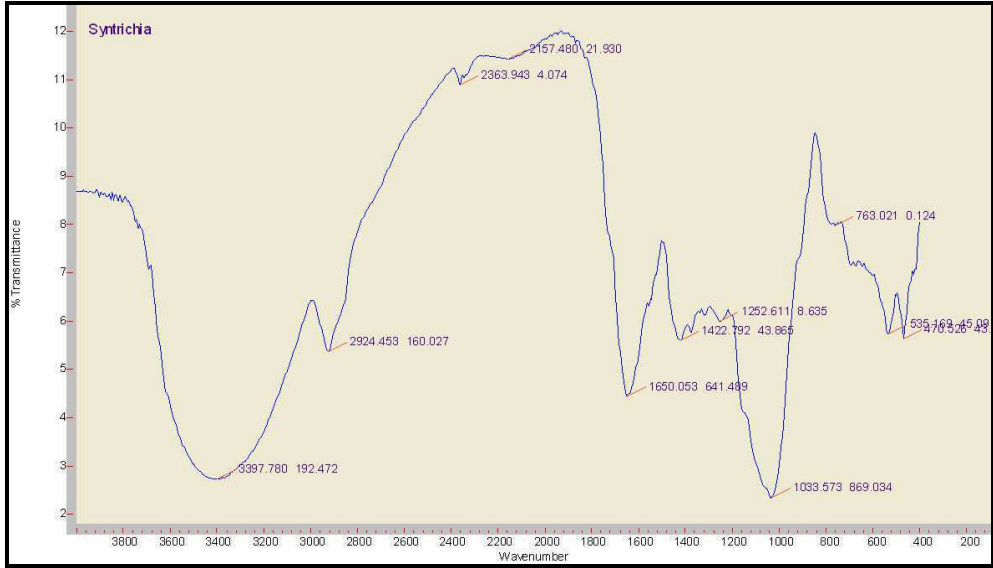
Şekil 3.17. *L. sciuroides* bitkisine ait FTIR spektrumu



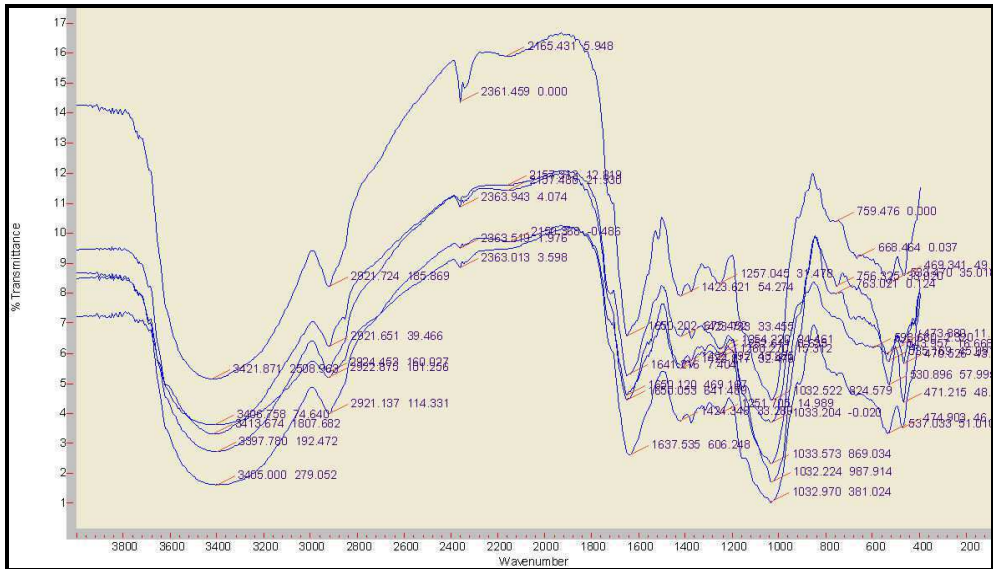
Şekil 3.18. *A. californica* bitkisine ait FTIR spektrumu



Şekil 3.19. *B. stricta* bitkisine ait FTIR spektrumu



Şekil 3.20. *S. papillosissima* bitkisine ait FTIR spektrumu



Şekil 3.21. Bitkilere ait FTIR spektrumlarının aynı grafikte gösterimi

Bitki örneklerinin FTIR spektrumlarının incelemesiyle elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

- Alifatik bileşiklerde C-H gerilme titreşimleri 3000 cm^{-1} 'in biraz altında gözlenir. Ayrıca 1400 cm^{-1} civarında bir çift C-H eğilme bandı vardır. Alken türü bileşiklerde C=C gerilme titreşimi 1650 cm^{-1} civarındadır. Allenlerin (C=C=C) 1950 cm^{-1} 'de ketenlerin (C=C=O) 2150 cm^{-1} 'de titreşimi gözlenir. İzosiyanatların (-N=C=O) 2250 cm^{-1} 'de belirgin bantları vardır. Alkinlerin 2200 cm^{-1} 'deki C=C gerilme titreşimi 3300 cm^{-1} 'de kuvvetli bir bantla birlikte çıkıyorsa terminal bir alkin (-C=C-H) söz konusudur.
- Aldehitlerde 1700 cm^{-1} 'deki C=O gerilme titreşimi, 2800 cm^{-1} civarında bir veya iki C-H gerilme bandı ile birlikte gözlenir. Ester, lakton ve karboksilli asitlerde C=O gerilme titreşimi $1100\text{ cm}^{-1} - 1300\text{ cm}^{-1}$ arasında çıkan C-O gerilme titreşimi ile birliktedir. Karboksilli asitlerde ayrıca 3000 cm^{-1} civarında O-H gerilme titreşimine ait bant da gözlenir. Amidlerde, 1650 cm^{-1} civarındaki C=O gerilme bandına 3200 cm^{-1} ve 3400 cm^{-1} civarında bir çift N-H gerilme bandı eşlik eder. Asit anhidritlerde 1840 cm^{-1} ve 1770 cm^{-1} civarında bir çift bant gözlenir.
- Alkol ve fenollerde serbest O-H gerilmesi 3600 cm^{-1} 'de keskin bir bant, hidrojen bağı O-H gerilmesi $3100\text{ cm}^{-1} - 3500\text{ cm}^{-1}$ arasında geniş bir bant şeklinde gözlenir. Bu bileşiklerin spektrumunda ayrıca 1300 cm^{-1} civarında C-O gerilme, $1000\text{ cm}^{-1} - 1200\text{ cm}^{-1}$ arasında ise O-H eğilme bantları vardır. Eterlerde 1100 cm^{-1} ile 1200 cm^{-1} arasında gözlenen C-O gerilme bandı belirgindir. Aminlerde N-H gerilme bantları $3200\text{ cm}^{-1} - 3500\text{ cm}^{-1}$ arasındadır ve hidrojen bağı oluşumundan O-H grubu kadar olmasa bile bir miktar etkilenir. Aminlerde N-H eğilme bandı 1600 cm^{-1} 'de, C-N gerilme bandı ise 1300 cm^{-1} 'de belirgin bir biçimde gözlenir. Nitril bileşiklerinin 2200 cm^{-1} 'deki bandı çok belirgindir. Nitro bileşiklerinde simetrik ve asimetrik N-O gerilme titreşimlerine ait bantlar, $1500\text{ cm}^{-1} - 1600\text{ cm}^{-1}$ ve $1300\text{ cm}^{-1} - 1400\text{ cm}^{-1}$ arasındadır.
- Spektrumda 1600 cm^{-1} 'lerde, 1580 cm^{-1} 'lerde, 1480 cm^{-1} 'lerde ve 1440 cm^{-1} 'lerde gözlenen absorpsiyon bantları aromatik halka C-C gerilme titreşimlerinin en tipik göstergesidir.

- 1650 cm^{-1} 'de oluşan pik için (C=O grubu) denilebilir. Buna 3400 cm^{-1} civarında N-H gerilme bandı eşlik eder.
- Aynı zamanda alkenlerde (C=C) gerilme titreşimi de 1650 cm^{-1} 'de gelebilir.
- N-H gerilme bantları (3200-3500 cm^{-1}) denilebilir (3406 cm^{-1}).
- Aynı zamanda O-H gerilme bantları da 3100-3500 cm^{-1} 'de görülür. Yapıda O-H bağı da olabilir.
- C-H gerilme bandı 2900 ve 1260 cm^{-1} 'de olabilir.
- C-O gerilme bantları 1000-1270 cm^{-1} 'de gelebilir. 1033 cm^{-1} 'deki C-O piki denilebilir.
- 740 – 750 cm^{-1} civarındaki pik aromatik halkayı işaret etmektedir.

Bu genel yaklaşım göz önüne alınarak spektrumlar incelendiğinde ortaya çıkan sonuçlar şu şekildedir:

Tüm türlerde aldehit grupları, fenol ve alkol grupları, amin grupları, eter grupları, alkil zincirleri, aromatik halkaların ve buna bağlı olarak önemli bir hidrofobikliğin söz konusu olduğu sonucuna ulaşılabilir.

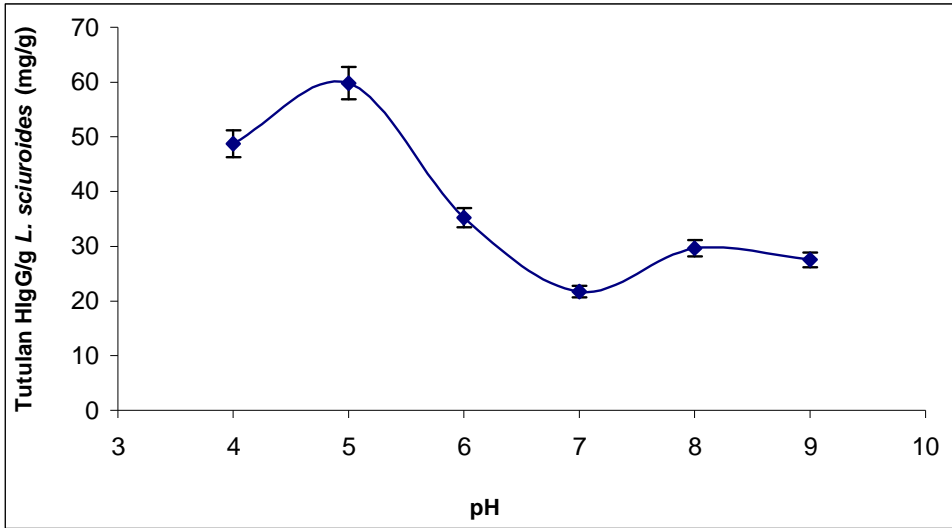
3.4. Bitki Örneklerinin HIgG adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşullarının belirlenmesi

Her bitki örneği için pH, iyonik şiddet, HIgG başlangıç derişimi, sıcaklık ve desorpsiyon deneyleri yapılarak sonuçlar grafiklere aktarılmıştır. Bu sayede HIgG adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşulları belirlenmiştir.

3.4.1. *Leucodon sciuroides* türü için HIgG adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşullarının belirlenmesi

3.4.1.1. HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi

Leucodon sciuroides bitkisinde HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisine ait grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 3.22). Grafikte de görülebileceği gibi bitki üzerine yaklaşık 60 mg HIgG/g olarak gerçekleşen maksimum HIgG adsorpsiyonu pH 5.0'da gerçekleşmiştir. Bu değerin üstünde ve altında adsorpsiyonda düşüş olduğu gözlenmiştir. HIgG'nin izoelektrik noktası 6.2'dir (Yavuz ve ark., 2006). Proteinlerin izoelektrik noktalarında net yükleri sıfırdır. Bu değerde hidrofobik etkileşimler maksimum, elektrostatik etkileşimler minimumdur. Bu sebeple sulu çözeltilerden maksimum protein adsorpsiyonu genellikle izoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde gerçekleşir. Grafikte maksimum adsorpsiyonun pH 5.0 değerinde gerçekleşmesi hidrofobik etkileşimlere ek olarak elektrostatik etkileşimlerin de etki ettiği sonucunu gösterebilir. Ayrıca izoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde gerçekleşen konformasyonel değişikliklerin de adsorpsiyona olumlu yönde etki ettiği düşünülebilir.



Şekil 3.22. *L. sciuroides* üzerine HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi: HIgG derişimi 0.5 mg/mL; sıcaklık 25 °C.

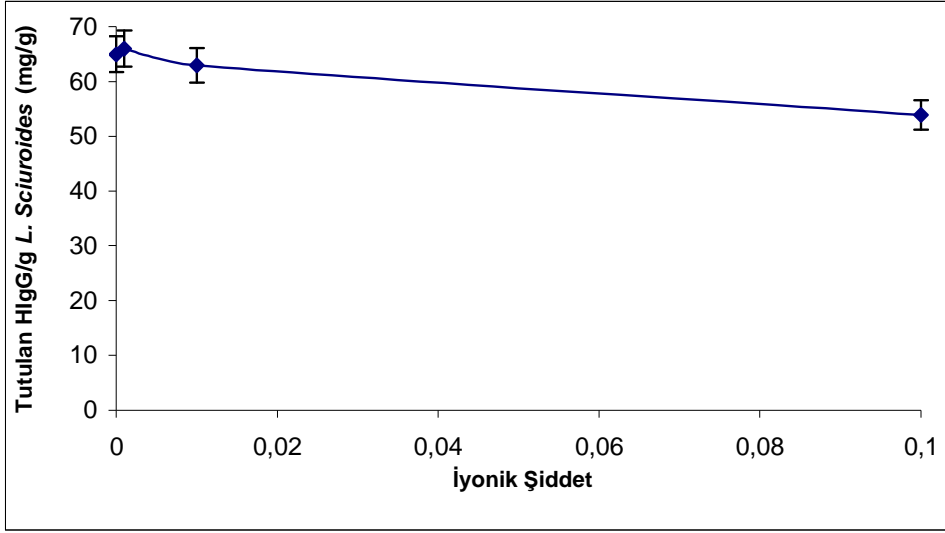
3.4.1.2. HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin belirlenmesi

Leucodon sciuroides türünün HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi aşağıda verilmiştir (Şekil 3.23). Buna göre iyonik şiddetin artışıyla beraber adsorpsiyon kapasitesinde düşüş gözlenmiştir. Bu durum için iki olası seçenek söz konusudur. Tampon iyonları ve ilgili zıt iyonlar yük-yük etkileşimleri ile IgG moleküllü ile etkileşime girerek IgG bağlanma bölgelerini kapatıyor olabilirler. İyonik şiddetin artmasıyla beraber adsorpsiyon kapasitesindeki düşüş bitki ve IgG molekülleri arasındaki itici elektrostatik kuvvetlerle de ilişkili olabilir. Yüksek iyonik şiddette mevcut tuz köprülerinin de bozulmasının adsorpsiyon kapasitesinde azalmaya sebep olduğu düşünülebilir.

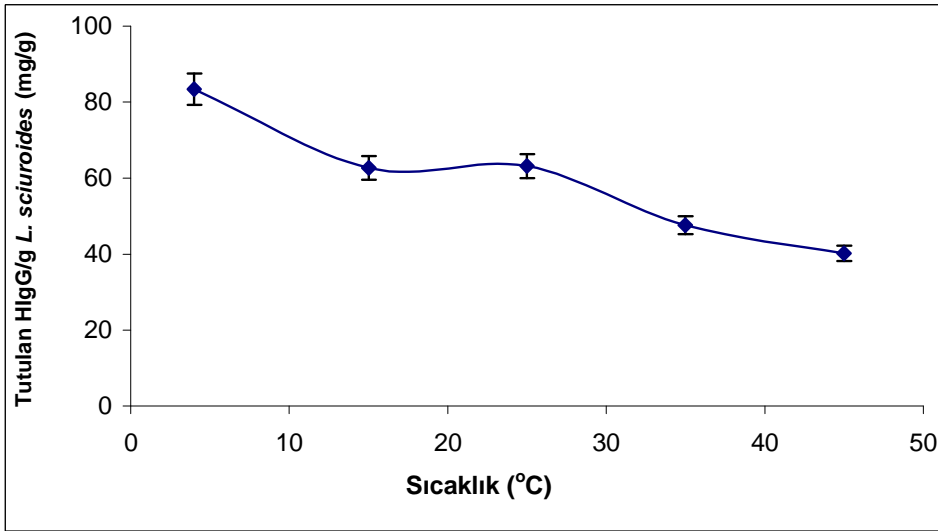
3.4.1.3. HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Leucodon sciuroides bitkisinde HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4-45°C arasında çalışılmıştır. Bu deneye ait grafik (Şekil 3.24) incelendiğinde sıcaklıktaki artışla beraber HIgG adsorpsiyon kapasitesinde azalma meydana geldiği görülebilir. Bu azalma adsorpsiyonun egzotermik mekanizması ile açıklanabilir. Egzotermik reaksiyon dışarıya sıcaklık verilen kimyasal reaksiyondur. Reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli enerji dışarıya verilen toplam enerjiden daha azdır. Bunun sonucu olarak fazla enerji sıcaklık olarak dışarıya verilir. Bu mekanizmaya göre dış ortamdaki sıcaklığın artışı reaksiyonu olumsuz yönde etkileyerek adsorpsiyonda düşüğe yol açmıştır.

Maksimum adsorpsiyon 4°C'ta, yaklaşık 80 mg/g olarak gerçekleşmiştir. Adsorpsiyon 15-25°C aralığında yaklaşık 60 mg/g seviyelerinde seyretmiştir. Bu değerlere bakıldığında bitkinin oda sıcaklığına (25°C) yakın değerlerde IgG adsorpsiyon kapasitesinde önemli değişim göstermediği ve bu aralıkta sıcaklık değişimine hassas olmadığı söylenebilir. Bitkinin 4°C'ta kullanılması her ne kadar adsorpsiyon kapasitesini artırıyor da olsa, bu işlem ek bir maliyet getirecektir. Diğer taraftan bu bitkinin oda sıcaklığında ekonomik olarak kullanılabileceği söylenebilir.



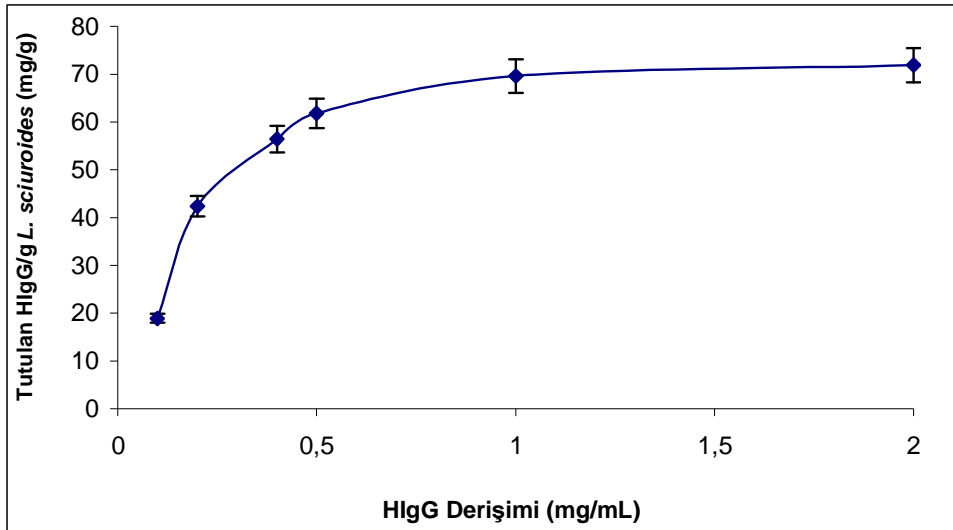
Şekil 3.23. *L. sciuroides* üzerine HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi: HIgG derişimi 0.5 mg/mL; sıcaklık 25 °C.



Şekil 3.24. *L. sciuroides* üzerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi: HIgG derişimi 0.5 mg/mL; pH 5.0.

3.4.1.4. HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin belirlenmesi

Leucodon sciuroides bitkisinde HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisini aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.25). Buna göre IgG derişiminin artmasıyla beraber IgG adsorpsiyonunda artış gözlenmiş, IgG 1.0 mg/mL derişimine ulaştığında doygunluğa ulaşılmıştır. Bu noktadan sonra IgG derişimindeki artış adsorpsiyon kapasitesinde belirgin bir artış gözlenmemiştir. Doygunluğa ulaşılan noktada bitki yüzeyinde IgG molekülleri ile etkileşime girebilecek bölgelerin tamamı IgG molekülü ile etkileşime girmiştir. Ortamdaki IgG derişimi artırılrsa bile bitki yüzeyinde serbest bölge olmayacağı için adsorpsiyon değeri artmamıştır.



Şekil 3.25. *L. sciuroides* üzerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisi: pH 5.0; sıcaklık 25 °C.

Adsorpsiyon İzotermeleri

Adsorpsiyon mekanizmaları genellikle adsorbat ve adsorban arasındaki ilişkiyi açıklayan izoterm fonksiyonları ile tanımlanır. Adsorpsiyon işlemini açıklayan

farklı izotermler vardır. Deneylerimizde elde edilen bulguların Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermlerine uygunluğu hesaplandı.

Langmuir Adsorpsiyon İzotermi

Irvin Langmuir tarafından 1916 yılında geliştirilen izotermin temel aldığı dört hipotez bulunmaktadır:

- i) Adsorbanın yüzeyi uniformdur, Bütün adsorpsiyon bölgeleri eşittir.
- ii) Adsorplanan moleküller etkileşime girmezler.
- iii) Bütün adsorpsiyon işlemi aynı mekanizma ile gerçekleşir.
- iv) Maksimum adsorpsiyon durumunda sayede tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleşir. Adsorplanan moleküller birbirleri üzerine bağlanmazlar.

Bu model aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

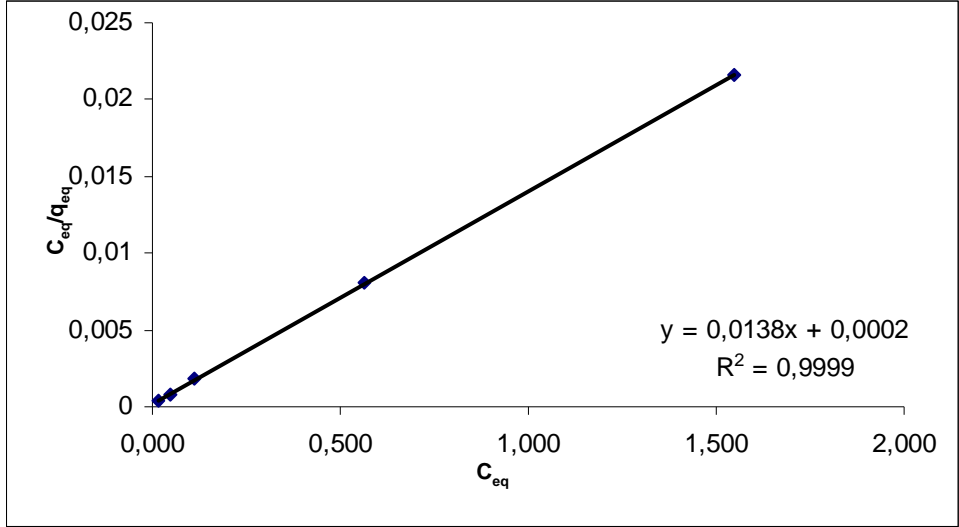
$$q_{eq} = q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} / (1 + b \cdot C_{eq})$$

Eşitlikteki q_{eq} , denge anında adsorbana bağlı IgG derişimi (mg/g); C_{eq} , çözeltideki denge IgG derişimi (mg/mL); b , Langmuir sabiti (mL/mg) ve q_{max} , maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesidir (mg/g). Bu eşitlik aşağıdaki gibi doğrusal hale getirilebilir:

$$C_{eq}/q_{eq} = 1/q_{max} \cdot b + C_{eq}/q_{max}$$

C_{eq} 'a karşı C_{eq}/q_{eq} grafiği çizildiğinde oluşan doğrunun kesimi $1/q_{max} \cdot b$ 'yi, eğimi ise $1/q_{max}$ 'ı verir.

Hesaplamalar sonucunda *Leucodon sciuroides* türü için çizilen Langmuir adsorpsiyon izoterm grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 3.26). Hesaplamalar sonucu q_{max} değeri 72.46 olarak bulunmuştur. Oda sıcaklığında deneysel sonuçlarda bitkinin teorik kapasitesinin yaklaşık %80'ine ulaştığı görülmüştür.



Şekil 3.26. *L. sciuroides* Langmuir adsorpsiyon izotermi grafiği: pH 5.0; sıcaklık 25 °C.

Freundlich Adsorpsiyon İzotermi

Freundlich adsorpsiyon izotermi 1909 yılında Freundlich tarafından geliştirilen ve genellikle heterojen adsorpsiyon sistemlerine uygulanan bir izotermdir. Bu sistemde adsorpsiyon çok tabakalı olarak gerçekleşir. Adsorplanan moleküller adsorbanın yüzeyinde olabileceği gibi daha önceden adsorplanmış moleküllerin üzerinde de olabilirler. Adsorplanan maddenin miktarı, tüm bölgedeki adsorpsiyonun toplamıdır.

Bu model aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır:

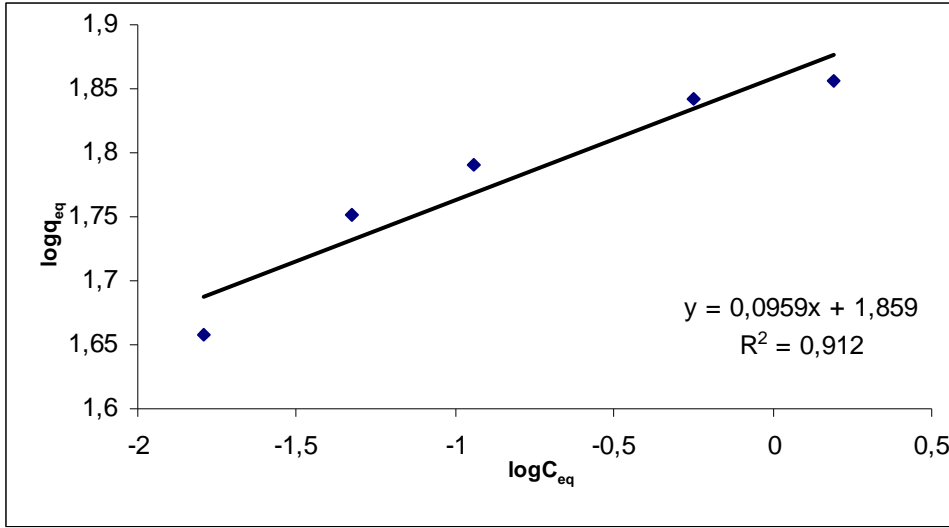
$$q_{eq} = K_f \cdot (C_{eq})^{1/n}$$

Burada q_{eq} , denge anında adsorpsiyonun birim kütlesi başına adsorplanan IgG miktarı (mg/g); C_{eq} , çözeltideki IgG denge derişimi (mg/mL); K_f , adsorbanın bağlı adsorpsiyon kapasitesi sabiti (mg/g); $1/n$, adsorpsiyon şiddeti sabitidir. Bu eşitlik aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir:

$$\log q_{eq} = \log K_f + 1/n \cdot \log C_{eq}$$

$\log C_{eq}$ 'e karşı $\log q_{eq}$ grafiği çizildiğinde oluşan doğrunun eğimi $1/n$ 'i, kesimi $\log K_f$ 'yi verir.

Hesaplamalar sonucunda *Leucodon sciuroides* türü için çizilen Freundlich adsorpsiyon izoterm grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 3.27).



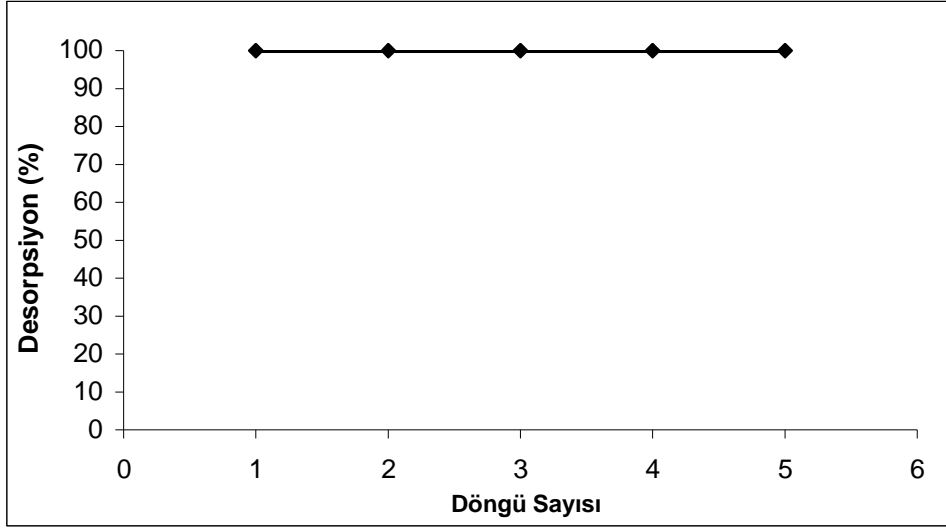
Şekil 3.27. *L. sciuroides* Freundlich adsorpsiyon izotermi grafiği: pH 5.0; sıcaklık 25 °C.

Çizilen grafiklerin korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında (0.999; 0.912) *Leucodon sciuroides* türündeki adsorpsiyonun Langmuir Adsorpsiyon İzotermine daha uygun olduğu görülmüştür. Bunun sonucu olarak bu bitkideki adsorpsiyonun tek tabakalı olduğu ve birincil etkileşimler sonucunda adsorpsiyonun gerçekleştiği söylenebilir.

3.4.1.5. Desorpsiyon koşullarının belirlenmesi

Leucodon sciuroides bitkisinde HIgG desorpsiyonu deneylerinde bitkinin adsorbe ettiği HIgG miktarının tamamını desorbe ettiği gözlenmiştir (Şekil 3.28). Yapılan tekrar çalışmalarında da 5 tekrara kadar adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş olmadığı belirlenmiştir. Bitkinin adsorpsiyon kapasitesinde düşüş olmaması bitkinin uzun süreli kullanımına olanak tanımaktadır. Bu noktadan hareketle bu

türün IgG saflaştırılmasında kullanılması işlem maliyetinin düşüklüğü açısından ekonomik bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 3.28. *L. sciuroides* HIgG desorpsiyon grafiği: HIgG derişimi 0.5 g/mL; pH 5.0; sıcaklık 25 °C.

3.4.2. *Antitrichia californica* türü için HIgG adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşullarının incelenmesi

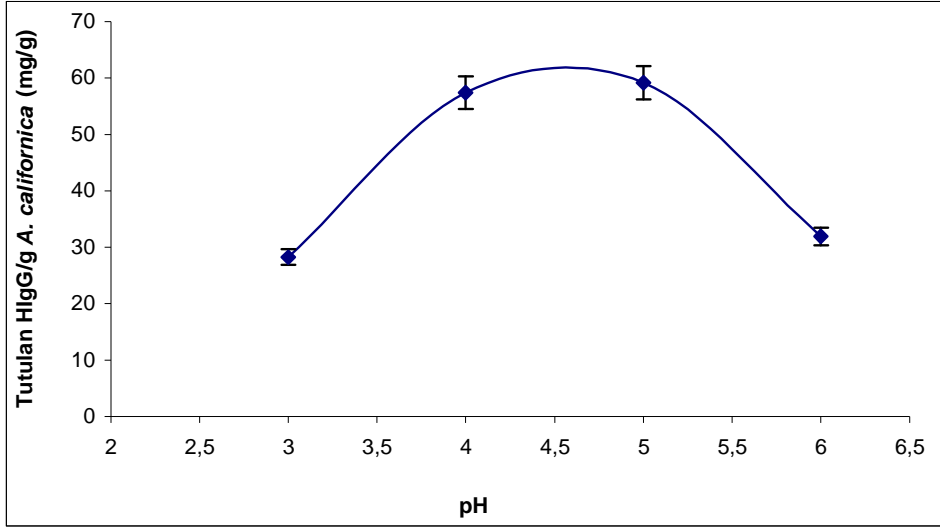
3.4.2.1. HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi

Antitrichia californica türünde pH'ın HIgG adsorpsiyonuna etkisine ait grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 3.29). Yaklaşık 60 mg/g olarak gerçekleşen maksimum adsorpsiyon işlemi pH 5.0'de gerçekleşmiştir. IgG izoelektrik noktasına (6.2) yakın bir değerde gerçekleşen adsorpsiyonda, çeşitli hidrofobik etkileşimlerin ve bazı konformasyonel değişikliklerin adsorpsiyona olumlu etki ettiği düşünülebilir. Bu bitkide pH 4-5 aralığında adsorpsiyonda belirgin bir fark görünmemektedir. Bitki bu aralıktaki pH değerlerinde maksimum adsorpsiyonu gösterebilmektedir.

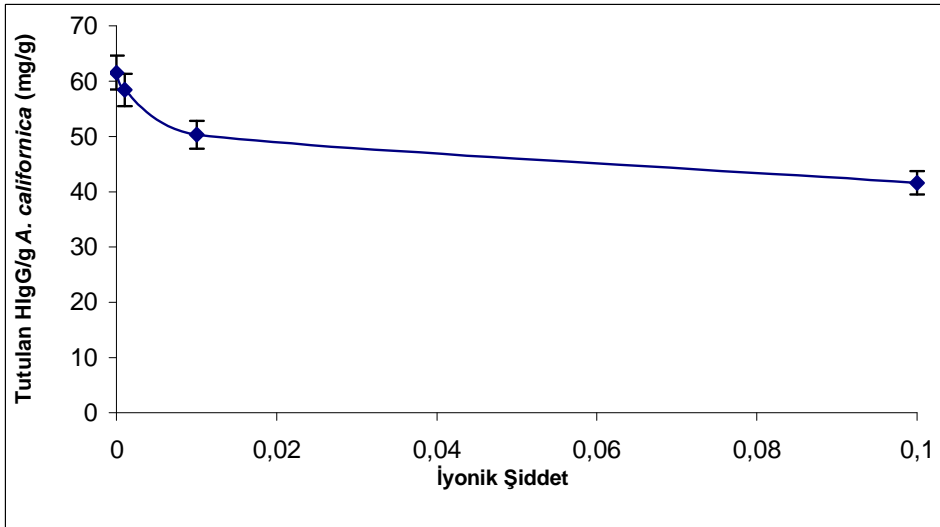
3.4.2.2. HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi

Antitrichia californica türünün IgG adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi için farklı derişimlerde NaCl çözeltisi kullanılmış, ve adsorpsiyonun

iyonik şiddetin artmasıyla beraber azaldığı görülmüştür (Şekil 3.30). Bu durumda itici elektrostatik kuvvetlerin etkisi sonucunda adsorpsiyon kapasitesinin düştüğü düşünülebilir. Yüksek iyonik şiddette mevcut tuz köprülerinin de bozulması benzer şekilde adsorpsiyon kapasitesinde düşüğe yol açmış olabilir.



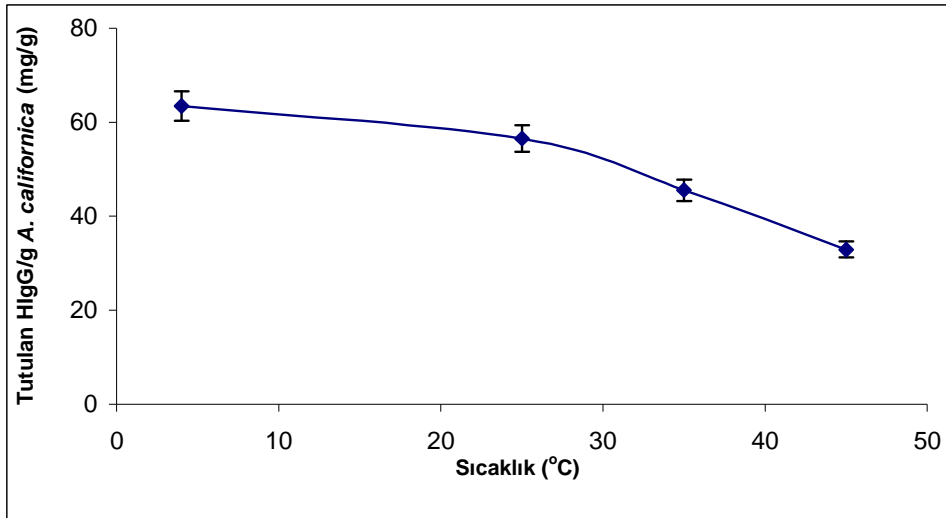
Şekil 3.29. *A. californica* üzerine HlgG adsorpsiyonuna pH'nın etkisi: HlgG derişimi 0.5 g/mL; sıcaklık 25 °C.



Şekil 3.30. *A. californica* üzerine HlgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi: HlgG derişimi 0.5 g/mL; pH: 5.0; sıcaklık 25 °C.

3.4.2.3. HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi

Antitrichia californica türüne HIgG adsorpsiyonunda sıcaklığın etkisi incelendiğinde adsorpsiyonun sıcaklıkla beraber azaldığı görülebilir (Şekil 3.31). Adsorpsiyon miktarının azalması adsorpsiyonun egzotermik mekanizması ile açıklanabilir. Bitkinin maksimum adsorpsiyon gösterdiği sıcaklık 4°C'dir. Bitki bu sıcaklıkta 65 mg/g seviyesinde adsorpsiyon göstermiştir. Oda sıcaklığına gelindiğinde ise adsorpsiyon 60 mg/g seviyelerine inmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında 4-25°C aralığında adsorpsiyonda küçük bir düşüş olduğu görülmektedir. Adsorpsiyon 25°C'tan sonra önemli ölçüde azalmıştır. Değerlere bakıldığında bitkinin düşük sıcaklıklarda daha etkin olarak kullanılabileceği söylenebilir.

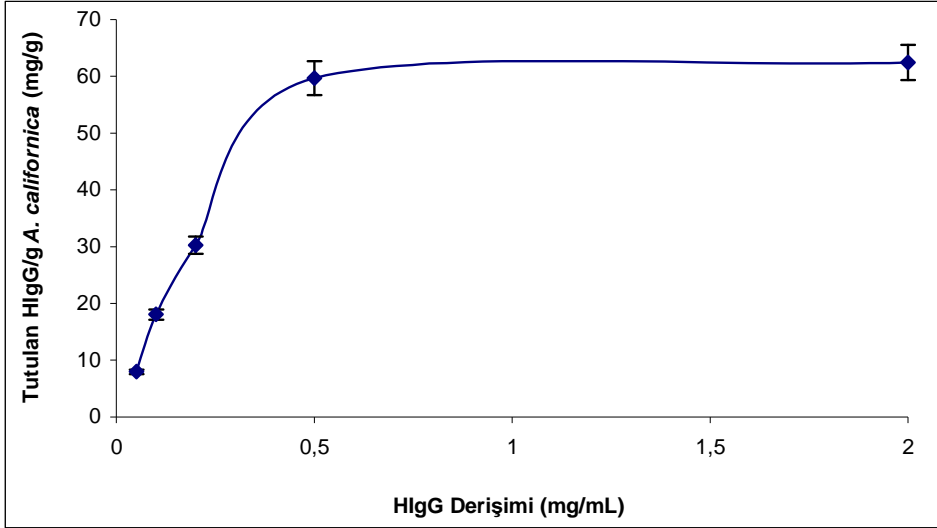


Şekil 3.31. *A. californica* üzerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi: HIgG derişimi 0.5 g/mL; pH: 5.0.

3.4.2.4. HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi

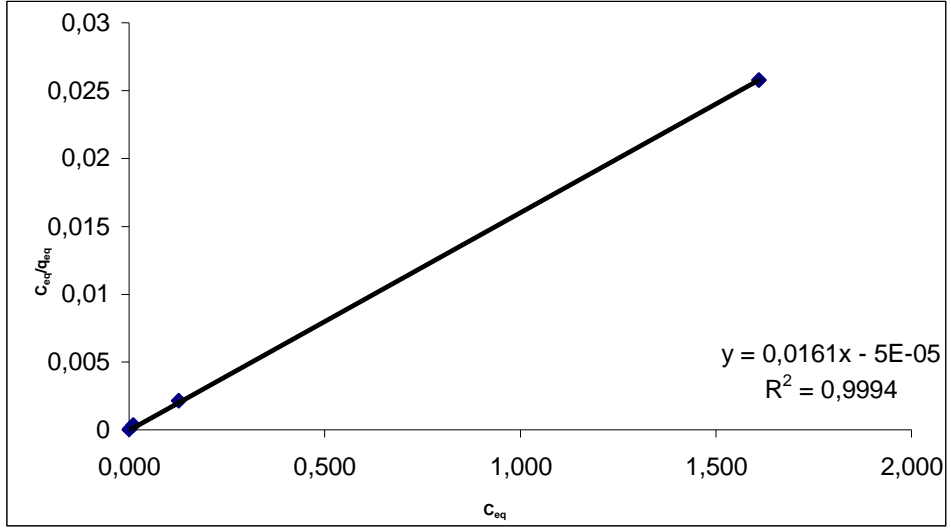
Bitkide HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisi incelendiğinde derişimin artmasıyla beraber adsorpsiyonda artış görülmüş, 0.5 mg/mL değerinden itibaren doygunluk gözlenmiş, adsorpsiyon bölgelerinin dolmasıyla beraber grafik de plato seviyesine ulaşmıştır (Şekil 3.32). Veriler incelendiğinde bitkinin daha seyreltik derişimlerde doygunluğa ulaştığı söylenebilir. Dolayısıyla daha seyreltik

HIgG kullanılarak bitkinin adsorpsiyon kapasitesinin tamamının kullanılarak saflaştırma yapılması mümkündür.

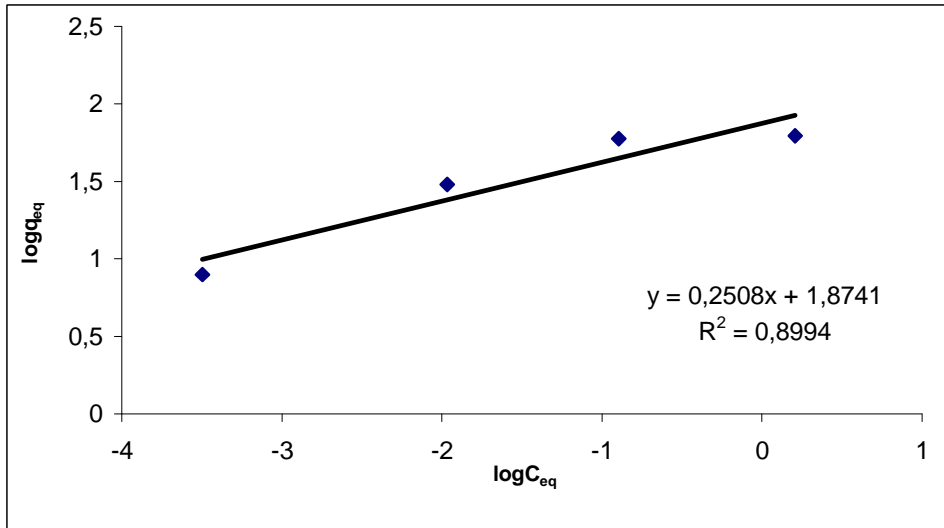


Şekil 3.32. *A. californica* üzerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisi: pH: 5.0; sıcaklık 25°C.

Elde edilen veriler doğrultusunda Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermeleri de hesaplanarak grafik haline getirilmiştir (Şekil 3.33 – 3.34). Buna göre Langmuir izoterminin buradaki adsorpsiyona daha uygun olduğu, bu bitkinin HIgG adsorpsiyonunun tek tabakalı olarak gerçekleştiği, adsorplanan moleküllerin ikincil etkileşimler gerçekleştirmediği görülmüştür. q_{max} değeri hesaplandığında 62.11 mg/g değeri elde edilmiştir. Bu değer bitkinin oda sıcaklığı olan 25 °C'ta adsorpsiyon kapasitesinin tamamına yakınına kullandığını göstermektedir.



Şekil 3.33. *A. californica* Langmuir Adsorpsiyon İzotermi grafiği: pH: 5.0; sıcaklık 25°C.

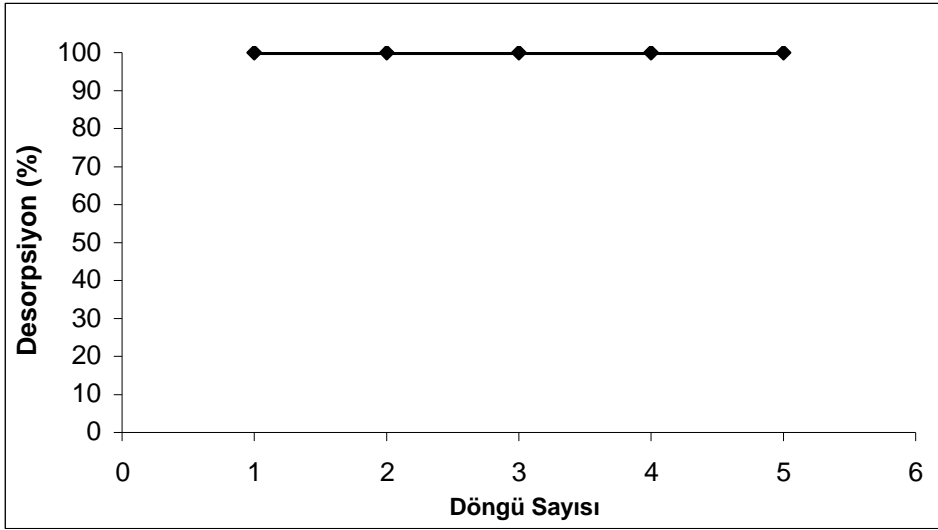


Şekil 3.34. *A. californica* Freundlich Adsorpsiyon İzotermi grafiği: pH: 5.0; sıcaklık 25°C.

3.4.2.5. Desorpsiyon koşullarının incelenmesi

Antitrichia californica bitkisinde yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon deneylerinde bitkinin yüzeyine adsorbe ettiği HIgG miktarının tamamının desorbe edildiği gözlemlendi (Şekil 3.35). Yapılan tekrar çalışmalarında da 5 tekrara kadar

adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş olmadığı, bitkinin tekrar eden adsorpsiyon-desorpsiyon işleminde kullanılabileceği belirlendi. Bitkinin kapasitesini kaybetmeden uzun süreli olarak kullanılabilmesi, düşük maliyetle saflaştırma işleminin gerçekleştirilmesine olanak tanımakta, ekonomik bir adsorban olarak alternatifler arasında yer almasına olanak sağlamaktadır.



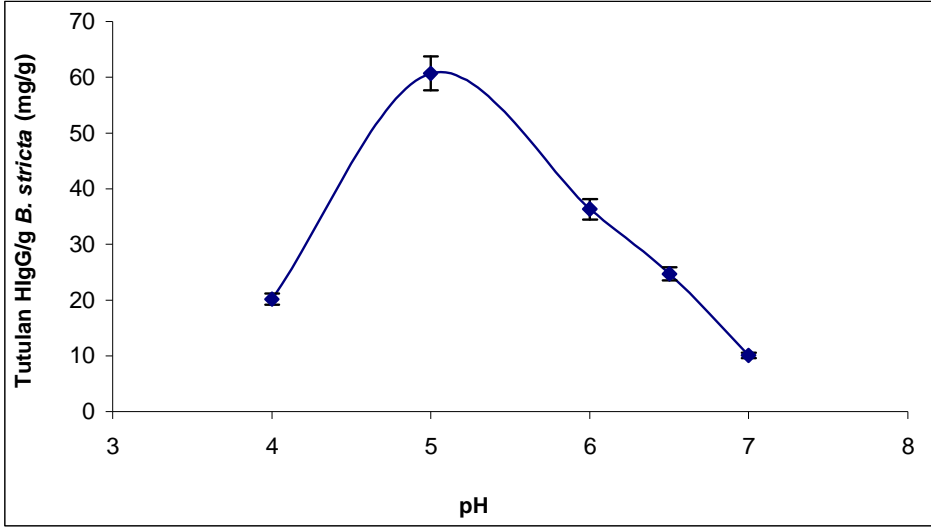
Şekil 3.35. *A. californica* desorpsiyon grafiği: HIgG derişimi 0.5 g/mL; pH: 5.0; sıcaklık 25°C.

3.4.3. *Bartramia stricta* türü için HIgG adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşullarının incelenmesi

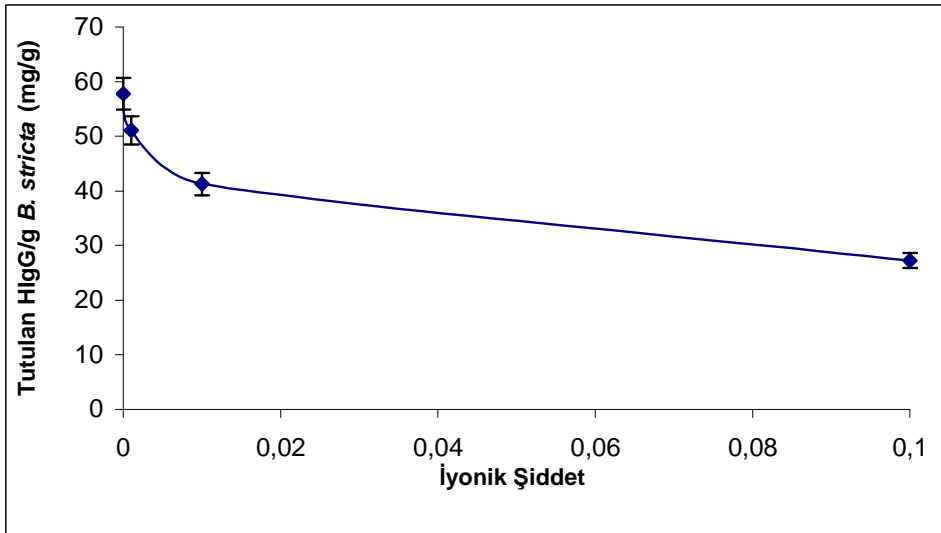
3.4.3.1. HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi

Bartramia stricta bitkisinde HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisine ait grafikte sonucu bu bitkinin optimum pH'ı pH 5.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.36). Bu değer üstünde ve altında adsorpsiyon kapasitesinde önemli düşüş olduğu gözlenmiştir. Bitkinin pH değişimine hassas olduğu, pH değerindeki artışın veya azalmanın adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir düşüğe yol açtığı grafikten görülmektedir. Adsorpsiyon IgG'nin izoelektrik noktasına (6,2) yakın bir değerde gerçekleşmiştir. Bu noktada hidrofobik etkileşimlere ek olarak elektrostatik

etkileşimlerin de etkili olduğu söylenebilir. pH 5.0 değerinde konformasyonel değişikliklerin de adsorpsiyona olumlu etkileri olduğu düşünülebilir.



Şekil 3.36. *B. stricta* üzerine HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi: HIgG derişimi 0.5 g/mL; sıcaklık 25°C.



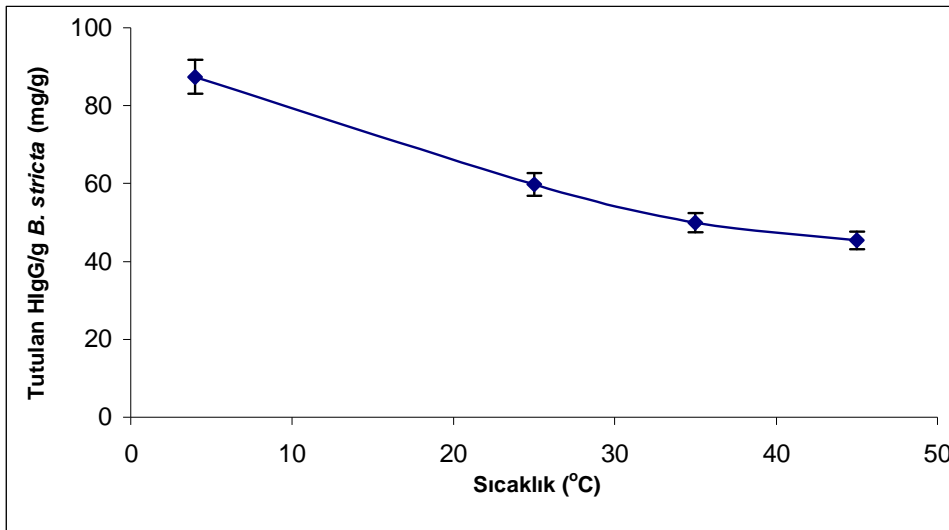
Şekil 3.37. *B. stricta* üzerine HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi: HIgG derişimi 0.5 g/mL; pH 5.0; sıcaklık 25°C.

3.4.3.2. HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi

Bartramia stricta türünün HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi incelendiğinde iyonik şiddetin artmasına bağlı olarak adsorpsiyon kapasitesinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 3.37). Bu durumda tampon iyonları ve ilgili zıt iyonların yük-yük etkileşimi ile IgG molekülü ile etkileşime girdiği ve IgG bağlanma bölgelerini kapatmaları sonucunda adsorpsiyonun azaldığını düşünmek mümkündür. Buna ek olarak bitki ve IgG molekülleri arasındaki elektrostatik kuvvetlerin veya mevcut tuz köprülerinin bozulmasının da adsorpsiyon kapasitesinde azalmaya yol açması mümkündür.

3.4.3.3. HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi

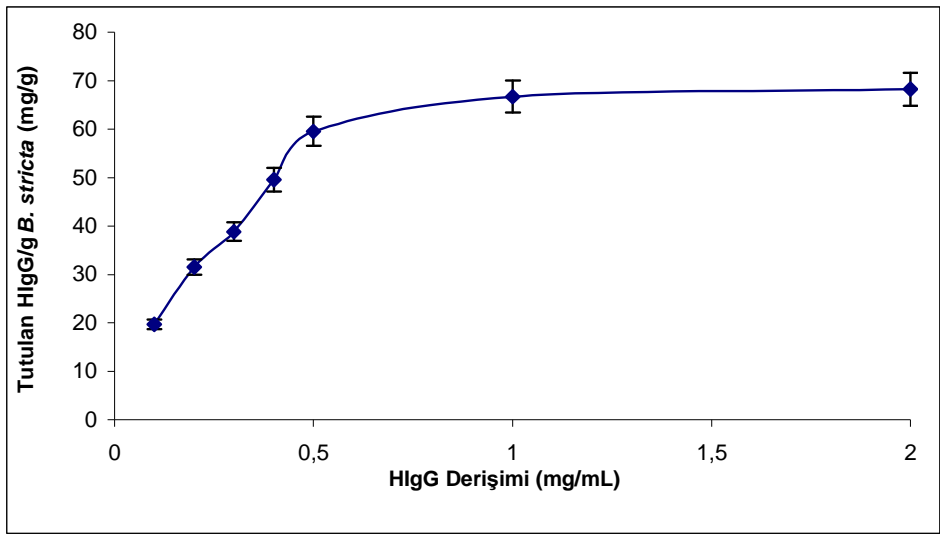
Bartramia stricta bitkisinde HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.38). Grafikte de görüleceği gibi sıcaklıktaki artışla beraber HIgG adsorpsiyonunda azalma meydana gelmektedir. Adsorpsiyondaki azalma adsorpsiyonun egzotermik mekanizması ile açıklanabilir. Maksimum adsorpsiyon 4°C'ta gerçekleşmiştir. Sıcaklığın 25°C'a çıkmasıyla bitki adsorpsiyon kapasitesinin yaklaşık %25'ini kaybetmiştir. Bitki düşük sıcaklıklarda daha fazla IgG adsorbe edebilmektedir.



Şekil 3.38. *B. stricta* üzerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi: HIgG derişimi 0.5 g/mL; pH 5.0.

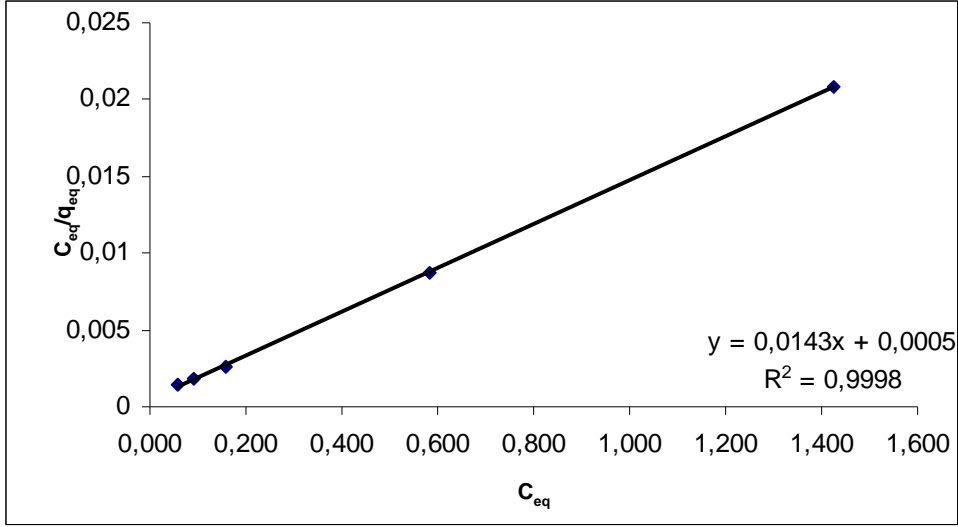
3.4.3.4. HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi

Artan HIgG başlangıç derişimine göre *Bartamia stricta* bitkisinde IgG adsorpsiyonu aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.39). Derişimin artmasıyla beraber adsorpsiyon da artmış, 1.0 mg/mL değerinden sonra doygunluğa ulaşılmıştır. Bu değerden sonra bitki yüzeyinde IgG molekülleri ile etkileşime girebilecek serbest bölge kalmadığından derişim artışına karşın adsorpsiyon kapasitesinde belirgin bir artış gözlenmemiştir.

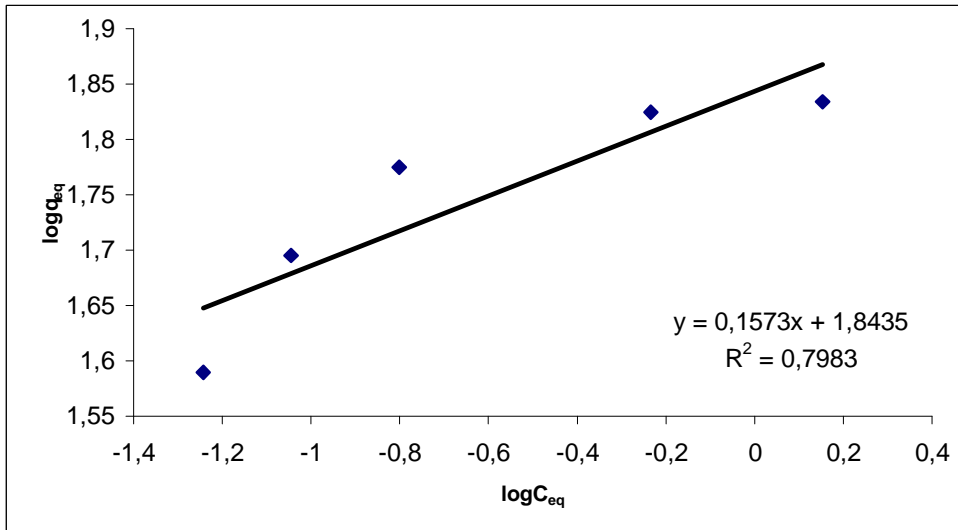


Şekil 3.39. *B. stricta* üzerine HIgG adsorpsiyonuna HIgG derişiminin etkisi: pH 5.0; sıcaklık 25°C.

Elde edilen veriler ile yapılan hesaplamalar sonucunda *Bartramia stricta* türü için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.40 – 3.41).



Şekil 3.40. *B. stricta* Langmuir adsorpsiyon izotermi grafiği: pH 5,0; sıcaklık 25°C.



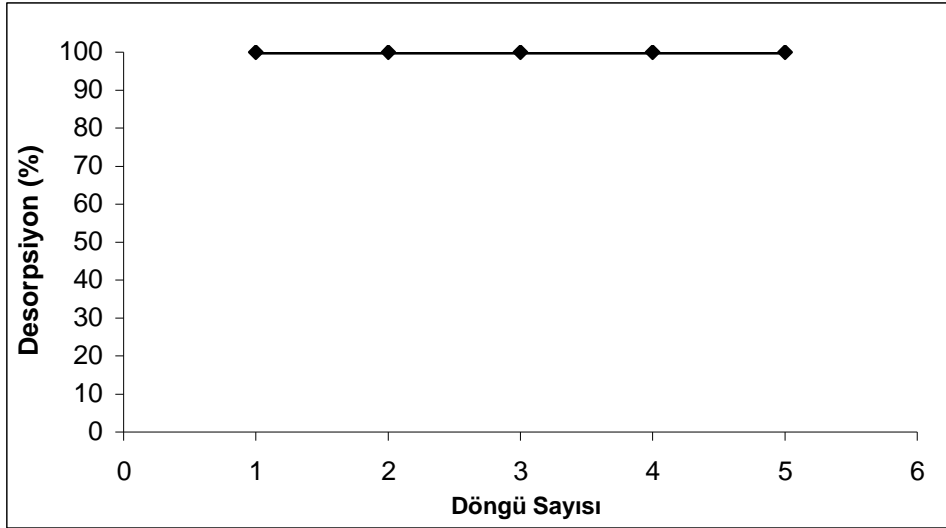
Şekil 3.41. *B. stricta* Freundlich adsorpsiyon izotermi grafiği: pH 5,0; sıcaklık 25°C.

Adsorpsiyon izotermi hesaplamaları sonucunda grafiklerin korelasyon sayıları karşılaştırıldığında *Bartramia stricta* üzerine HIgG adsorpsiyonunun Langmuir Adsorpsiyon İzotermi modeline uygun olduğu görülmüştür. Bunun sonucu olarak bu bitkideki adsorpsiyonun tek tabakalı olduğu ve sadece birincil etkileşimler sonucunda adsorpsiyonun gerçekleştiği söylenebilir. Langmuir izotermine göre

q_{max} değeri 69.93 mg/g olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre bitkinin oda sıcaklığında adsorpsiyon kapasitesinin yaklaşık %85'ini kullanabildiği söylenebilir.

3.4.3.5. Desorpsiyon koşullarının incelenmesi

Bartramia stricta bitkisinde yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon deneylerinde bitkinin adsorbe ettiği HIgG miktarının tamamını desorbe ettiği gözlendi (Şekil 3.42). Adsorpsiyon-desorpsiyon döngülerinde de 5 döngüye kadar adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş olmadığı gözlenmiştir. Bitkinin tekrar kullanılabilir olması maliyetin düşürülebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu sayede bu türün ekonomik bir adsorban olarak kullanılması mümkündür.



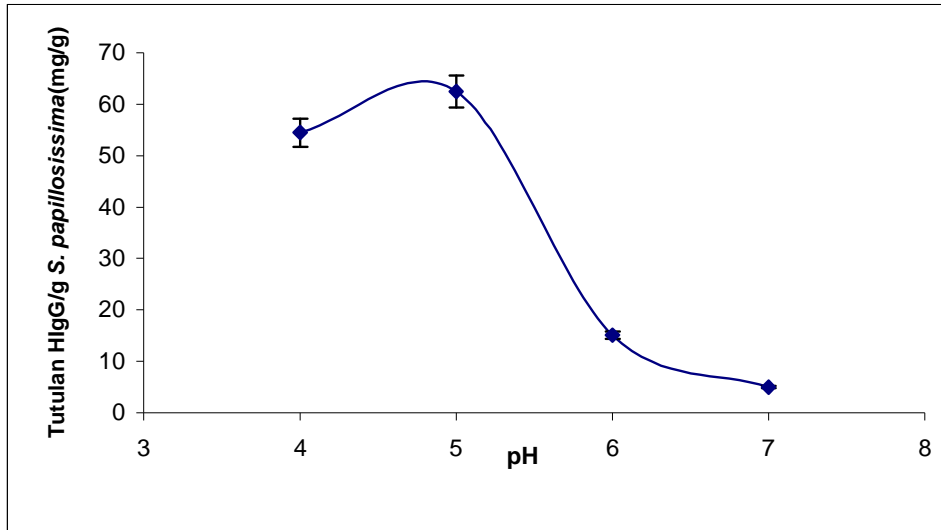
Şekil 3.42. *B. stricta* desorpsiyon grafiği: HIgG derişimi 0.5 g/mL; pH: 5.0; sıcaklık 25°C.

3.4.4. *Syntrichia papillosissima* türü için HIgG adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşullarının incelenmesi

3.4.4.1. HIgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi

Syntrichia papillosissima türünde pH'ın HIgG adsorpsiyonuna etkisine bakıldığında optimum pH'ın en yüksek adsorpsiyonun gözlendiği pH 5.0 olduğu

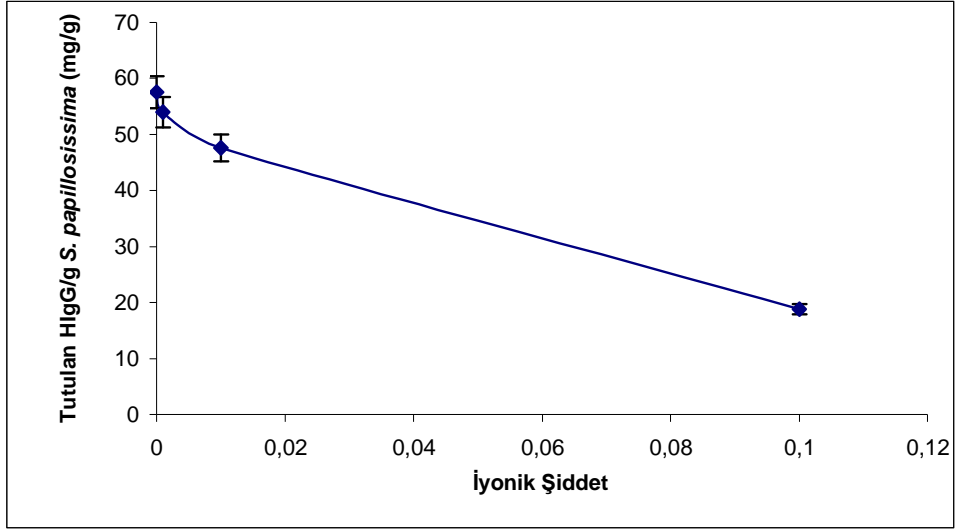
görülmüştür (Şekil 3.43). Özellikle IgG molekülünün izoelektrik noktasına (6.2) yakın olarak gerçekleşen adsorpsiyonda hidrofobik etkileşimlere ek olarak elektrostatik etkileşimlerin de etki ettiği sonucu çıkarılabilir. Buna ek olarak IgG molekülünde gerçekleşen konformasyonel değişikliklerin de adsorpsiyona olumlu etki ettiği düşünülebilir. pH 5.0 değerinin üstünde ve altında adsorpsiyonda düşüş olduğu gözlenmiştir. Özellikle ortamın bazik hale gelmesi adsorpsiyon kapasitesinde çok büyük bir düşüşe yol açmıştır. Buna karşın pH 5.0'dan 4.0'a düşürüldüğünde adsorpsiyon kapasitesinde sadece yaklaşık %10'luk bir düşüş gözlenmiştir. Bu bitkinin pH 4-5 gibi düşük pH değerlerinde verimli olarak kullanılması mümkündür.



Şekil 3.43. *S. papillosissima* üzerine HIgG adsorpsiyonuna pH'in etkisi: HIgG derişimi 0.5 g/mL; sıcaklık 25°C.

3.4.4.2. HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi

Syntrichia papillosissima türünün HIgG adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi için farklı derişimlerde NaCl çözeltisi kullanılmış, ve adsorpsiyonun iyonik şiddetin artmasıyla beraber azaldığı görülmüştür (Şekil 3.44). Burada görülen azalma bitki ile IgG molekülü arasındaki itici elektrostatik kuvvetlerle ilişkili olabilir. Yüksek iyonik şiddette mevcut tuz köprülerinin bozulmasının da adsorpsiyon kapasitesinde azalmaya yol açması mümkündür.



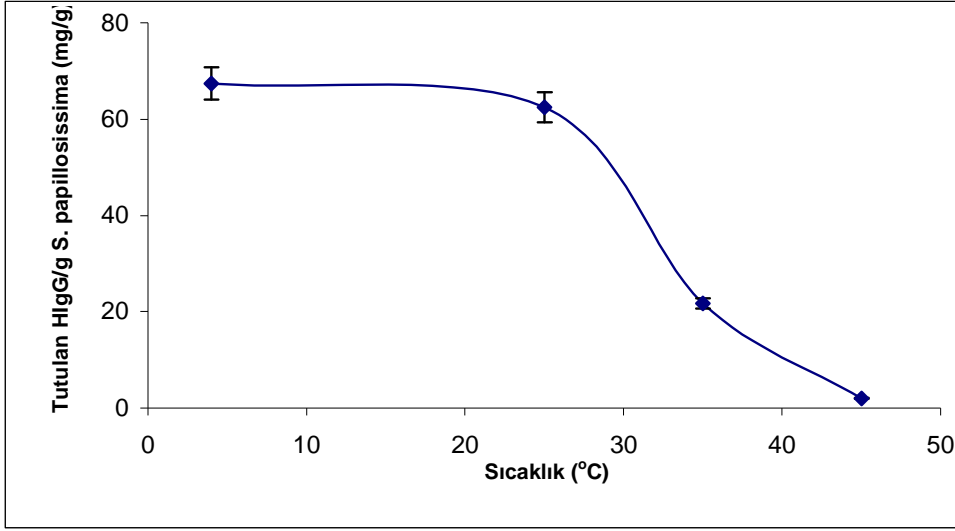
Şekil 3.44. *S. papillosissima* üzerine HIgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi: HIgG derişimi 0.5 g/mL; pH 5.0; sıcaklık 25°C.

3.4.4.3. HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi

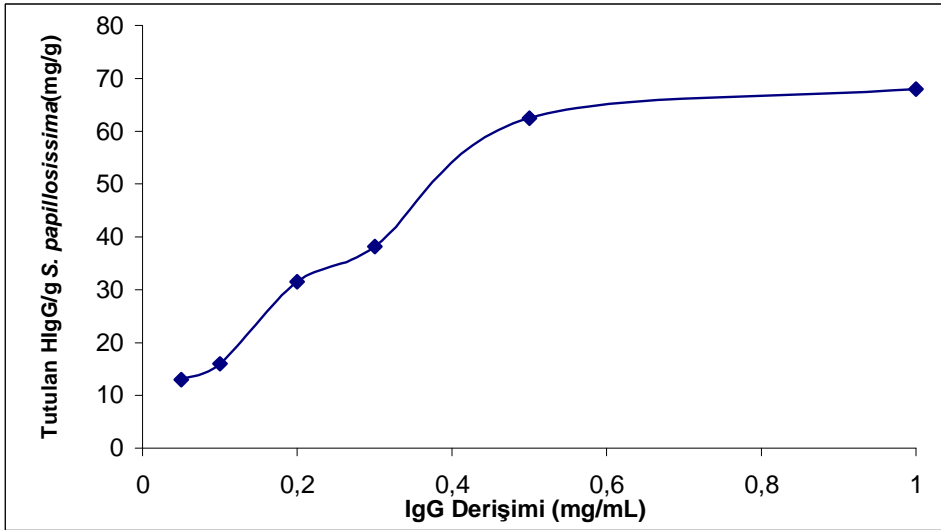
Syntrichia papillosissima türüne HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4-45°C arasında çalışılmıştır. Grafik incelendiğinde adsorpsiyonun sıcaklıkla beraber azaldığı görülmektedir (Şekil 3.45). Maksimum adsorpsiyon 4°C'ta yaklaşık 65 mg/g olarak gerçekleşmiştir. Adsorpsiyon 4-25°C arasında 60 mg/g seviyelerinde gerçekleşmiş, 25°C'den sonra düşüş görülmüştür. Bu bitkinin de düşük sıcaklıklarda tam kapasiteye yakın şekilde IgG adsorbe edebileceği sonucuna varılabilir.

3.4.4.4. HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi

Bitkide HIgG adsorpsiyonuna HIgG başlangıç derişiminin etkisine bakıldığında derişimin artmasıyla beraber adsorpsiyonun arttığı, 0.5 mg/mL seviyelerinde adsorpsiyonun doyunluğa ulaştığı görülmektedir (Şekil 3.46). Bitkinin daha düşük derişimlerde doyunluğa ulaşması bitkinin bu derişimlerde adsorpsiyon bölgelerinin tamamının dolması, tam kapasiteyle adsorpsiyon gerçekleştirme anlamına gelmektedir. Bu tür ile daha seyreltik IgG derişimleriyle saflaştırma yapılabilmesi mümkündür.

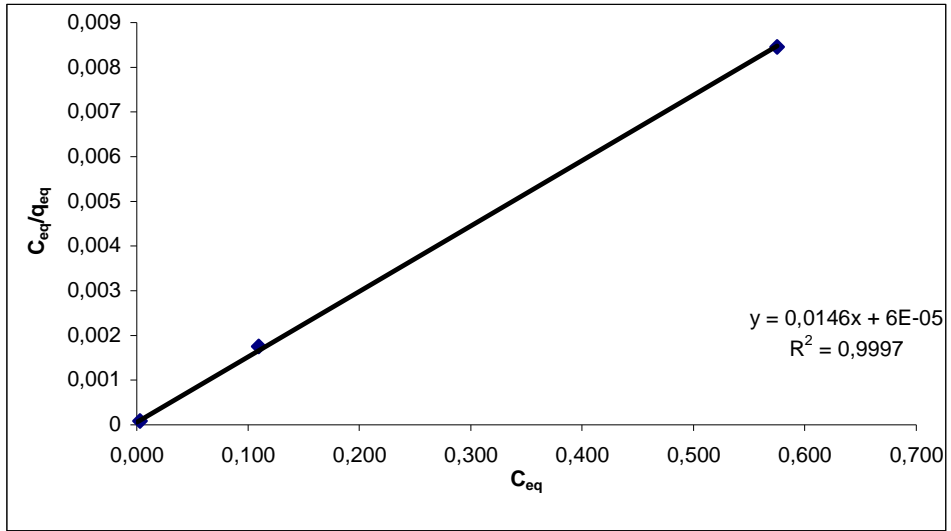


Şekil 3.45. *S. papillosissima* üzerine HgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi: HgG derişimi 0.5 g/mL; pH 5.0.

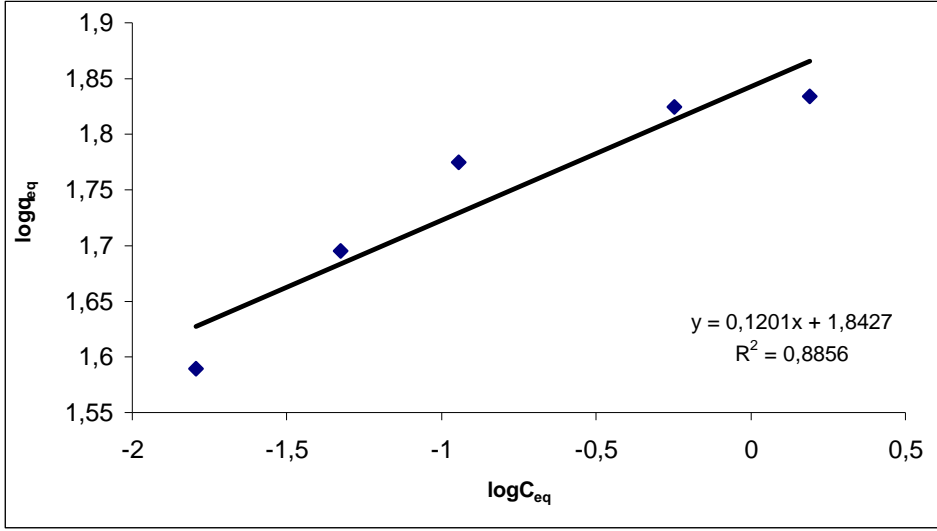


Şekil 3.46. *S. papillosissima* üzerine HgG adsorpsiyonuna HgG derişiminin etkisi: pH 5.0; sıcaklık 25°C.

Derişim deneyleri sonucu elde edilen veriler sonucunda Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi hesaplanmış ve bunlara ait grafikler çizilmiştir. Buna göre Langmuir izotermi buradaki adsorpsiyona daha uygun olduğu, dolayısıyla bu bitkinin IgG adsorpsiyonunun da tek tabakalı olarak gerçekleştiği, moleküller arası ikincil etkileşim olmadığı görülmüştür (Şekil 3.47 – 3.48). Langmuir izotermine göre q_{max} değeri 68.49 mg/g olarak bulunmuştur. Bitki 25 °C sıcaklıkta adsorpsiyon kapasitesinin %90'ına yakın bir kısmını kullanmaktadır. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünde kapasitenin tamamına yakınının kullanılabilir olması saflaştırmanın daha verimli şekilde gerçekleştirilmesine de imkan tanıyacaktır.



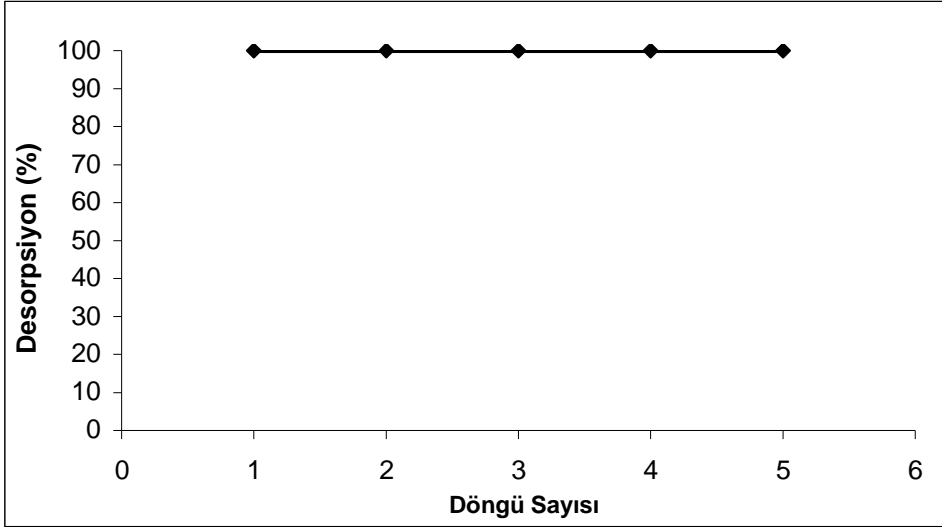
Şekil 3.47. *S. papillosissima* Langmuir Adsorpsiyon İzotermi grafiği: pH 5.0; sıcaklık 25°C.



Şekil 3.48. *S. papillosissima* Freundlich Adsorpsiyon İzotermi grafiği: pH 5.0; sıcaklık 25°C.

3.4.4.5. Desorpsiyon koşullarının incelenmesi

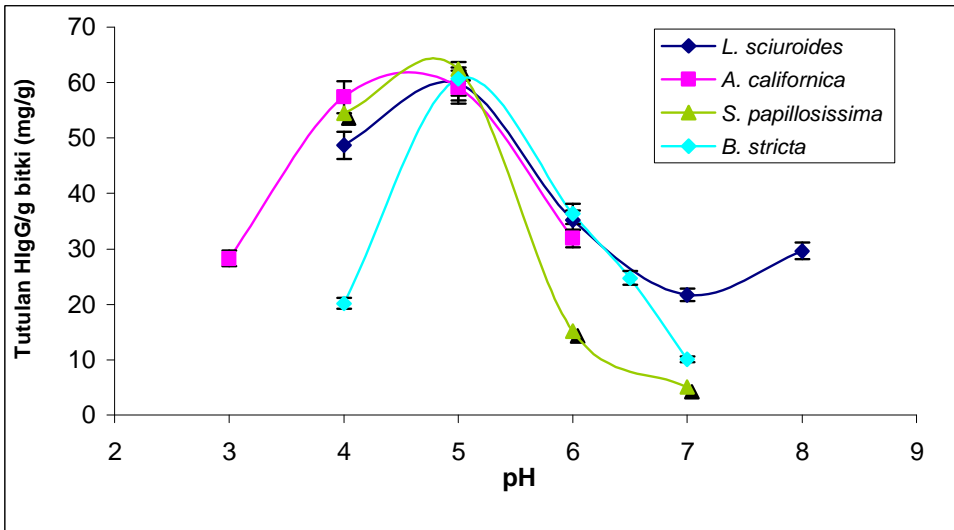
Syntrichia papillosissima bitkisinde yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon deneylerinde bitkinin adsorbe ettiği HIgG miktarının tamamını desorbe ettiği gözlenmiştir (Şekil 3.49). Yapılan tekrar çalışmaları da 5 tekrara kadar adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş olmadığı, bitkinin tekrar eden adsorpsiyon-desorpsiyon işleminde kullanılabilirliği belirlendi. Bu sonuçlarla bu türün de ekonomik ve düşük maliyetli bir adsorban alternatifi olarak kullanılabilirliği söylenebilir.



Şekil 3.49. *S. papillosissima* desorpsiyon grafiği: HİgG derişimi 0.5 g/mL; pH: 5.0; sıcaklık 25°C.

3.4. 5. Bitki Örneklerine HİgG Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Bitki örneklerinde pH'ın etkisi pH 3.0-9.0 aralığında çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafikte toplu olarak görülebilmektedir (Şekil 3.50).

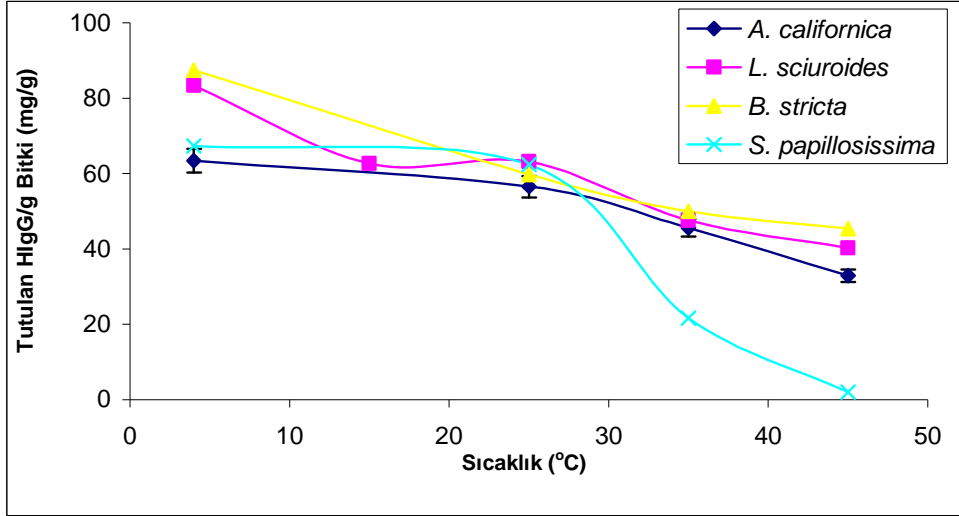


Şekil 3.50. Bitki örnekleri üzerine HİgG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi: HİgG derişimi 0.5 g/mL; sıcaklık 25°C.

Grafik incelendiğinde çalışılan bütün türlerde maksimum adsorpsiyonun pH 5.0 değerinde olduğu görülebilir. HIgG'nin izoelektrik noktası 6.2'dir. Proteinlerin izoelektrik noktasında net yükleri sıfırdır. Bu sebeple sulu çözeltilerden maksimum protein adsorpsiyonu genellikle izoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde gerçekleşir. Deneysel maksimum adsorpsiyonun izoelektrik noktasına yakın bir değerde bulunması hidrofobik etkileşimlere ek olarak elektrostatik etkileşimlerin de etki ettiği sonucunu gösterebilir. pH değerinin artması veya azalması bitki yüzeyindeki grupların protonlanması veya deprotonlanması anlamına gelecektir. Burada gerçekleşen net etkileşimlerin anlaşılabilmesi için yüzey gruplarının kesin olarak bilinmesi gerekecektir. Bu ise daha ileri, detaylı çalışmaları gerektirecek başka bir çalışma konusunu oluşturmaktadır. Bitkilerin geneline bakıldığında pH 5.0 değerinin altında ve üstünde adsorpsiyon kapasitesinin düştüğü görülmektedir. *A. californica* ve *B. stricta* türlerinde bu düşüş %50-60 seviyesinde olmasına karşın *L. sciuroides* ve *S. papillosissima* türlerinde bu düşüş %10 civarında kalmaktadır. Bu noktadan hareketle bu iki türün düşük pH değerlerinde de adsorpsiyon kapasitelerinin önemli bir kısmını kullanarak HIgG adsorbe edebilecekleri düşünülebilir.

3.4.6. Bitki Örneklerine HIgG Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

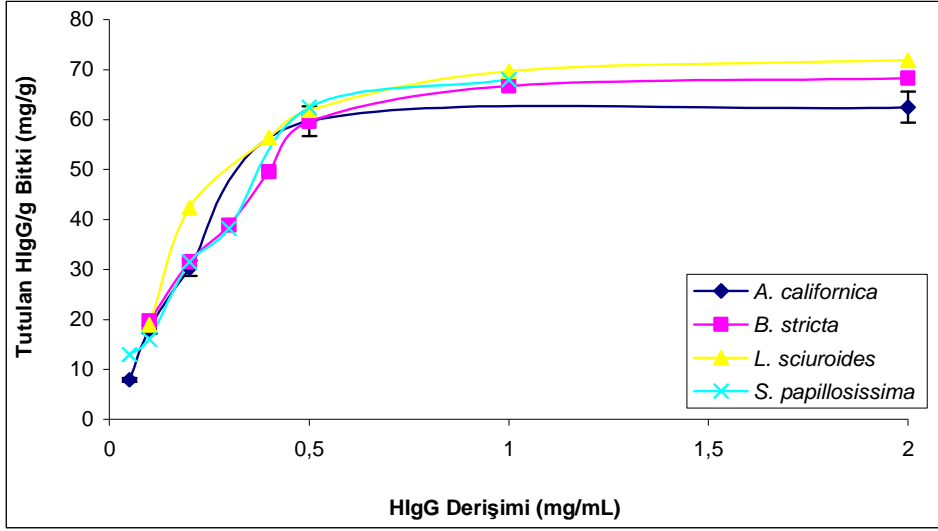
Bitki örneklerinde sıcaklığın etkisi 4-45 °C aralığında çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafikte toplu olarak görülebilmektedir (Şekil 3.51). Grafik incelendiğinde tüm türlerde sıcaklık artışıyla beraber adsorpsiyon kapasitesinde düşüş gözlenmiştir. En yüksek adsorpsiyon 4 °C'ta gerçekleşmiştir. *L. sciuroides* ve *B. stricta* türleri için 4-25 °C arası adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık %25 azalırken aynı sıcaklık aralığında *A. californica* ve *S. papillosissima* türlerinde bu azalma yaklaşık %10 seviyelerindedir. Bu sonuç *A. californica* ve *S. papillosissima*'nın düşük sıcaklıklarda da etkin olarak kullanılabilceği sonucunu ortaya koymaktadır.



Şekil 3.51. Bitki örnekleri üzerine HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi: HIgG derişimi 0.5 g/mL; pH 5.0.

3.4.7. Bitki Örneklerine HIgG Adsorpsiyonunda HIgG Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Bitki örneklerinde başlangıç HIgG derişiminin etkisi 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 1.0; 2.0 mg/mL'lik çözeltiler ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafikte toplu olarak verilmiştir (Şekil 3.52). Grafik incelendiğinde derişimin artmasıyla beraber adsorpsiyonun da arttığı, bitki yüzeyinde etkileşime giren bölgelerin dolmasıyla beraber adsorpsiyonun doygunluk seviyesine ulaştığı görülmektedir. Adsorpsiyon *B. stricta* ve *L. sciuroides* türlerinde plato seviyesine 1.0 mg/mL seviyelerinde ulaşılmıştır. Buna karşın *A. californica* ve *S. papillosissima* türlerinde 0.5 mg/mL değerlerinden sonra doygunluğa ulaşıldığı görülmektedir. Bu türlerin daha düşük derişimlerde doygunluğa ulaşması daha düşük derişimlerde adsorpsiyon kapasitelerinin tamamı ile adsorpsiyon yapabilecekleri şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 3.52. Bitki örnekleri üzerine HlgG adsorpsiyonuna HlgG başlangıç derişiminin etkisi: pH 5.0; sıcaklık 25 °C.

4. SONUÇ

Bu çalışmada terapötik olarak kullanılan, ticari öneme sahip İmmunoglobulin G saflaştırılmasında doğal bir sorbent olan karayosunlarının kullanılabilirliği incelenmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere geniş yayılışa sahip, kolaylıkla erişilebilecek, yüzeyinde papilla ve/veya mamilla gibi yüzey alanını artırıcı yapıları olan karayosunu türleri belirlenmiştir. Arazi çalışmaları ile karayosunu örnekleri doğal yayılışa sahip oldukları yerlerden toplanmış, laboratuvar ortamına getirilmiş, burada temizlenerek kurutulmuştur. Kurutulmuş örnekler daha sonra öğütülmüş ve elek analizine tabi tutularak deneysel işlemlere hazır hale getirilmişlerdir. Deneylerde yüzey alanından yüksek ölçüde yararlanabilmek üzere 140 µm altı büyüklüğe sahip bitki parçaları kullanılmıştır.

Hazırlık aşamalarından sonra bitkilerin karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir. Bitki parçalarının SEM ve mikroskopik incelemeler ile yüzey yapıları incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda bitki yüzeylerinin çok gözenekli olduğu, bunun da yüzey alanını artırdığı tespit edilmiştir. Bitkilerin yüzeylerindeki kimyasal grupların araştırılması amacıyla yapılan FTIR ölçümlerinde bitkilerde yüzey kimyasalları açısından önemli bir hidrofobikliğinin olduğu belirlenmiştir.

Burada gözlenen hidrofobikliğinin önemli bir sebebi de kütikül tabakasıdır. Bilindiği üzere kütikül dokulardan sıvı kaybını önleyen bir bariyer görevi görmektedir. Polimerik lipidlerden ve çözünür mumlardan oluşan tabaka karayosunlarında sporofitlerde ve gametofitlerde gözlenebilir. Yapılan araştırmalarda karayosunlarındaki kütikül yapısının çiçekli bitkilere benzer olduğu belirlenmiştir. *Sphagnum palustre* çiçekli bitkilerin temel bileşenlerinden olan 10,16-dihidroksi hegzadekanoik asit içermektedir. *Sphagnum fimbriatum* protoneması ile yapılan çalışmalarda da çiçekli bitkilerdeki prokütikül benzeri yapı olduğu görülmüştür (Jeffrey, 2006).

Karakterizasyon çalışmalarından sonra adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bütün bitki türleri için farklı pH tamponları denenmiş (pH 3.0–5.0 asetat tamponu; 6.0–8.0 fosfat tamponu; 9.0 karbonat tamponu) ve maksimum adsorpsiyonun gerçekleştiği pH değeri bulunmuştur. Devam eden optimizasyon deneyleri optimum pH değerinde gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın adsorpsiyona etkisi 4-45°C aralığında incelenmiş ve

sıcaklığın değişiminin adsorpsiyon kapasitesine olan etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. İyonik şiddetin adsorpsiyon kapasitesine etkisini belirlemek amacıyla farklı tuz derişimleri ile deneyler yapılmış ve sonuçlar gözlenmiştir. Adsorpsiyon kapasitesine HIgG başlangıç derişiminin etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı HIgG derişimleri ile adsorpsiyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler ile adsorpsiyon izotermi (Langmuir ve Freundlich) hesaplanmış ve bitki yüzeylerine HIgG adsorpsiyonunun mekanizması belirlenmeye çalışılmıştır. Adsorpsiyon deneylerinin ardından bitkide tutulan HIgG, desorpsiyon deneyleri ile desorbe edilerek bitkilerin kapasiteleri ve tekrar kullanım olanakları araştırılmıştır.

Leucodon sciuroides ile yapılan çalışmalarda farklı pH tamponları kullanılmış ve maksimum adsorpsiyonun pH 5.0 değerinde olduğu belirlenmiştir. Adsorpsiyon pH'ın artmasıyla beraber azalma eğilimi göstermiştir. Bu türle ilgili diğer denemeler pH 5.0 tamponunda gerçekleştirilmiştir. *L. sciuroides*'in maksimum HIgG adsorpsiyonu pH 5.0 tamponunda 0.5 mg/mL derişimde, yaklaşık 60 mg/g olarak bulunmuştur. Yapılan sıcaklık denemelerinde sıcaklığın artışı ile adsorpsiyonda düşüş olduğu bulunmuştur.

Derişim çalışmaları sonucunda adsorpsiyon izotermi (Langmuir ve Freundlich) incelendiğinde Langmuir adsorpsiyon izoterminin uygun olduğu görülmüştür. Buna göre adsorpsiyon mekanizmasının tek tabakalı olduğu, birincil etkileşimler ile adsorpsiyonun gerçekleştiği bulunmuştur. Bu türe ait q_{max} değeri 72.46 mg/g olarak bulunmuştur. Desorpsiyon ajanı olarak %50'lik etilen glikol ile yapılan çalışmalarda desorpsiyonun %100 olduğu bulunmuş, 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş olmadığı gözlenmiştir.

Antitrichia californica ile yapılan çalışmalarda farklı pH tamponları denenmiş ve bu türün maksimum HIgG adsorpsiyonunun pH 5.0 değerinde olduğu belirlenmiştir. Bu türün maksimum HIgG adsorpsiyonunun pH 5.0 tamponunda 0.5 mg/mL derişimde, yaklaşık 60 mg/g olduğu gözlenmiştir. Adsorpsiyona sıcaklığın etkisi 4-45°C aralığında incelenmiş ve sıcaklığın artışı ile adsorpsiyonda düşüş olduğu bulunmuştur.

Derişim çalışmaları sonucunda adsorpsiyon izotermi (Langmuir ve Freundlich) incelendiğinde Langmuir adsorpsiyon izoterminin adsorpsiyon mekanizmasına

uygun olduğu görülmüştür. Langmuir adsorpsiyon izotermine göre adsorpsiyon mekanizmasının tek tabakalı olduğu, birincil etkileşimler ile adsorpsiyonun gerçekleştiği bulunmuştur. Bu türe ait q_{max} değeri 62.11 mg/g olarak bulunmuştur. Desorpsiyon ajanı olarak %50'lik etilen glikol ile yapılan çalışmalarda desorpsiyonun %100 olduğu bulunmuş, 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş olmadığı gözlenmiştir.

Bartramia stricta ile farklı pH tamponlarında yapılan çalışmalarda pH 5.0 değerinde bu türün maksimum IgG adsorpsiyonunun olduğu belirlenmiştir. Bu türün maksimum IgG adsorpsiyonunun pH 5.0 tamponunda 0.5 mg/mL derişimde, yaklaşık 60 mg/g olarak bulunmuştur. Sıcaklığın adsorpsiyona etkisi de incelenmiş, 4-45°C aralığında yapılan çalışmalarda sıcaklığın artışı ile adsorpsiyonda düşüş olduğu bulunmuştur.

Derişim çalışmaları sonucunda adsorpsiyon izotermi (Langmuir ve Freundlich) incelenmiş ve *B. stricta* IgG adsorpsiyon mekanizması için Langmuir adsorpsiyon izotermine uygun olduğu görülmüştür. Buna göre adsorpsiyon mekanizmasının tek tabakalı olduğu, birincil etkileşimler ile adsorpsiyonun gerçekleştiği bulunmuştur. Bu türe ait q_{max} değeri 69.93 mg/g olarak bulunmuştur. Desorpsiyon ajanı olarak %50'lik etilen glikol ile yapılan çalışmalarda bitkiden desorpsiyonun %100 olduğu bulunmuş, 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş olmadığı gözlenmiştir.

Syntrichia papillosissima ile yapılan çalışmalarda farklı pH tamponları denenmiş ve bu türün maksimum IgG adsorpsiyonunun pH 5.0 değerinde olduğu bulunmuştur. Bu türün maksimum IgG adsorpsiyonunun pH 5.0 tamponunda 0.5 mg/mL derişimde gerçekleştiği ve adsorpsiyonun 60 mg/g olduğu bulunmuştur. Sıcaklığın adsorpsiyona etkisinin incelenmesi sonucunda 4-45°C aralığında yapılan çalışmalarda sıcaklığın artışı ile adsorpsiyonda düşüş olduğu bulunmuştur.

Derişim çalışmaları sonucunda adsorpsiyon izotermi (Langmuir ve Freundlich) incelenmiş ve bu türe IgG adsorpsiyon mekanizması için Langmuir adsorpsiyon izotermine uygun olduğu görülmüştür. Adsorpsiyon mekanizmasının tek tabakalı olduğu, birincil etkileşimler ile adsorpsiyonun gerçekleştiği bulunmuştur. Bu türe ait q_{max} değeri 68.49 mg/g olarak bulunmuştur. Desorpsiyon ajanı olarak %50'lik etilen glikol ile yapılan çalışmalarda bitkiden desorpsiyonun %100 olduğu

bulunmuş, 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş olmadığı gözlenmiştir.

Bitkilerden elde edilen sonuçlar toplu olarak ele alındığında bütün türlerin maksimum adsorpsiyon gösterdiği tamponun pH 5.0 olduğu görülmüştür. Bu değerin HIgG'nin izoelektrik noktası olan 6.2 değerine yakın olması hidrofobik etkileşimlere ek olarak elektrostatik etkileşimlerin de etkili olduğu şeklinde yorumlanabilir. pH değerindeki artış veya azalış bitki yüzeyindeki grupların protonlanması veya deprotonlanması sonucunu doğuracaktır. Burada bitki yüzeyinde buna sebep olan grupların (alkol, aldehit) tam olarak bilinmesi mümkün değildir. Yüzey yapısının kesin olarak araştırılması ise ayrı bir çalışma konusunu oluşturacaktır.

Bitkilerin pH sonuçları incelendiğinde *B. stricta* türünün pH değişimlerine oldukça hassas olduğu, görülmektedir. Bunun yanı sıra *L. sciuroides* ve *S. papillosissima* türlerinin düşük pH değerlerinde maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin %90'ına yakın seviyede adsorpsiyon gerçekleştirebildikleri sonucuna ulaşılabilir. Bu türler düşük pH ortamından HIgG saflaştırılmasında kullanılabilirler.

Bitkilerin sıcaklık değişikliklerine etkileri incelendiğinde adsorpsiyonun sıcaklıktaki artışla beraber azaldığı görülmektedir. Maksimum adsorpsiyon bütün türlerde 4 °C'ta gerçekleşmiştir. *L. sciuroides* ve *B. stricta* türleri için 4-25 °C arası adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık %25 azalırken aynı sıcaklık aralığında *A. californica* ve *S. papillosissima* türlerinde bu azalma yaklaşık %10 seviyelerinde kalmıştır. *A. californica* ve *S. papillosissima* oda sıcaklığında maksimum adsorpsiyon kapasitelerine yakın adsorpsiyon gerçekleştirebilecek türlerdir. Sıcaklığın azaltılmasının saflaştırma sürecinde ek maliyet getireceği de göz önüne alınırsa bu türlerin ekonomik önemi artmaktadır.

Bitkilerde başlangıç derişimlerinin adsorpsiyon kapasitesine olan etkisi incelendiğinde bazı türlerin daha düşük derişimlerde doyunluğa ulaştığı görülmüştür. Adsorpsiyon *B. stricta* ve *L. sciuroides* türlerinde plato seviyesine 1.0 mg/mL seviyelerinde ulaşılmıştır. Buna karşın *A. californica* ve *S. papillosissima* türlerinde 0.5 mg/mL değerlerinden sonra doyunluğa ulaşıldığı görülmektedir. Bitkilerin daha düşük derişimlerde doyunluğa ulaşmaları, daha

seyreltik ortamlarda tam kapasiteyle saflaştırma yapabilmelerine imkan tanımaktadır.

Bitkilerin etkili olarak kullanılabilmesi saflaştırma yapılacak ortamın pH değeri, sıcaklığı ve HIgG derişimi ile doğrudan ilgilidir. Bütün veriler incelendiğinde *A. californica* ve *S. papillosissima* türleri oda sıcaklığında ekonomik olarak HIgG saflaştırması için kullanılabilir türler olarak öne çıkmaktadır.

İmmunoglobulin G insan kanındaki temel antikor molekülüdür. HIgG terapötik ve tedavi amacıyla tıbbi alanda önemli kullanıma sahip, ticari önemi yüksek olan bir antikordur. HIgG saflaştırılması için günümüzde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Büyük ölçekli, ticari çalışmalarda maliyetin önemli bir bölümünün saflaştırma aşamasından kaynaklandığı bilinmektedir. Bu sebeple, ticari olarak düşünüldüğünde düşük maliyetli, ekonomik çözümlerin, alternatif sorbent sistemlerinin bulunması ve kullanılması HIgG saflaştırılmasında büyük önem taşımaktadır. Yapılan tez çalışmasında doğal olarak geniş yayılış gösteren, ek kimyasal işleme gerek duymayan, düşük maliyetli sorbent olarak kullanılabilir karayosunu türlerinin HIgG saflaştırılmasında katı destek olarak kullanılabilir potansiyelleri incelenmiştir. Bu türlerin optimum koşullar altında kandan IgG adsorbe-desorbe edebildiği ve bu işlemin çok tekrarlı olarak adsorpsiyon kapasitesinde düşüş olmadan yapılabildiği görülmüştür. Bu bitkilerin geniş yayılışa sahip olmaları dolayısıyla doğadan kolaylıkla ve çok düşük maliyetle bulunabiliyor olmaları, ek kimyasal işleme ihtiyaç duymamaları, doğal ve geri dönüşümlü olmaları saflaştırma maliyetinin düşürülmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Benzer yöntemlerle farklı türlerin araştırılması, farklı bitki kombinasyonlarının geliştirilmesi ve kolon dolgu materyali halinde kullanıma sunulması bu çalışmaların gelecekteki basamaklarını oluşturmaktadır. Geliştirilecek bir saflaştırma sistemi HIgG saflaştırma sürecini daha ekonomik hale getirerek ülkemizin dışa bağımlılığı da azaltma yolunda önemli bir basamak oluşturacaktır. Sunulan bu tez çalışması literatüre önemli katkılar sağlayacak ve farklı saflaştırma uygulama alanlarına yol açacaktır.

KAYNAKLAR

- Akar, T., Özcan, A.S., Tunalı, S., Özcan, A. 2008. Biosorption of a textile dye (acid blue 40) by cone biomass of *Thuja orientalis*: Estimation of equilibrium, thermodynamic and kinetic parameters. **Bioresource Technology**. 99: 3057-3065.
- Akar, T., Anılan, B., Görgülü, A., Tunalı Akar, S. 2009a. Assessment of cationic dye biosorption characteristics of untreated and non-conventional biomass: *Pyracantha coccinea* berries. **Journal of Hazardous Materials**. 168: 1302-1309.
- Akar, T., Tosun, İ., Kaynak, Z., Özkara, E., Yeni, O., Şahin, E.N., Tunalı Akar, S. 2009b. An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace. **Journal of Hazardous Materials**. 166: 1217-1225.
- Akkaya, G., Özer, A. 2005. Biosorption of acid red 274 (AR 274) on *Dicranella varia*: Determination of equilibrium and kinetic model parameters. **Process Biochemistry**. 40: 3559-3568.
- Aktaş Uygun, D., Uygun, M., Karagözler, A., Öztürk, N., Akgöl, S., Denizli, A. 2009. A novel support for antibody purification: fatty acid attached chitosan beads. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 70: 266-270.
- Anonim, 2002. Antibody Purification Handbook. Amersham Biosciences, 112 p. A.B.D.
- Anonim, 2007. IVIG Tedavisi Genelgesi, T. C. Sağlık Bakanlığı, Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Anonim, 2011. İlaç Fiyat Listesi. T. C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Balarama Krishna, M.V., Rao, S.V., Arunachalam, J., Murali, M.S., Kumar, S., Manchanda, V.K. 2004. Removal of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr from actual low level radioactive waste solutions using moss as a phyto-sorbent. **Separation and Purification Technology**. 38: 149-161.
- Barka, N., Abdennouri, M., Boussaoud, A., Makhfouk, M. 2010. Biosorption characteristics of Cadmium(II) onto *Scolymus hispanicus* L. As low-cost natural biosorbent. **Desalination**. 258: 66-71.
- Bhattacharyya, K.G., Sarma, J., Sarma, A. 2009. *Azadirachta indica* leaf powder as a biosorbent for Ni(II) in aqueous medium. **Journal of Hazardous Materials**. 165: 271-278.

- Brown, P. A., Gill, S. A., Allen, S. J. 2000. Metal removal from waste water using peat. **Water Research**. 34: 3907-3916.
- Bruton O. C. 1952. Agammaglobulinemia. **Pediatrics**. 9(6): 722-728 in Reilly, T., Massoomi, F. F., Cox, G., Hamilton, M. 2010. IVIg Switching to Privigen: A Case-Based Examination. **Pharmacy Practice News**, McMahon Publishing.
- Buck, W. R., Goffinet, B. 2000. Morphology and Classification of Mosses, In: Bryophyte Biology (Shaw, A. J., Goffinet, B. eds) Cambridge University Press.
- Bunluesin, S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, Prayad, Upatham, S., Lanza, G.R. 2007. Batch and continuous packed column studies of cadmium biosorption by *Hydrilla verticillata* biomass. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 103: 509-513.
- Chowhurdy, S., Chakraborty, S., Saha, P. 2011. Biosorption of basic green 4 from aqueous solution by *Ananas comosus* (pineapple) leaf powder. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 84: 520-527.
- Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, Jr., W. L., Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Melin, M., Taylor, H. L. 1946. Preparation and properties of serum and plasma proteins. **J Am Chem Soc.** ; 68: 459-475.
- Crum, H. 2001. Structural Diversity of Bryophytes. University of Michigan Herbarium, Ann Arbor. 379 pp.
- Çanak, Y., Özkara, S., Akgöl, S., Denizli, A. 2004. Pseudo-specific bioaffinity chromatography of immunoglobulin-G. **Reactive & Functional Polymers**. 61: 369-377.
- Deniz, F., Saygıdeğer, S.D. 2010. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies of acid orange 52 dye biosorption by *Paulownia tomentosa* Steud. leaf powder as a low-cost natural biosorbent. **Bioresource Technology**. 101: 5137-5143.
- Denizli, A., Arica, Y. 2000. Protein A-immobilized microporous polyhydroxyethyl-methacrylate affinity membranes for selective sorption of human-immunoglobulin-G from human plasma. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition, 11 (4), 367-382.
- Denizli, A. 2011. Purification of antibodies by affinity chromatography. **Hacettepe J. Biol & Chem**. 39 (1): 1-18.
- El-Kak, A., Manjini, S., Vijayalakshmi, M. A. 1992. Interaction of immunoglobulin G with immobilized histidine: mechanistic and kinetic aspects. **Journal of Chromatography A**. 604: 29-37.

- Envirotech Solutions, 2011. Enviropeat [http://www.envirotechsolutions.co.nz/enviropeat.html], Erişim Tarihi: 01.07.2011.
- Ferguson, C. R., Peterson, M. R., Jeffers, T. H. 1989. Removal of metal contaminants from waste waters using biomass immobilized in polysulfone beads. *Biotechnology in Minerals and Metal Processing*.
- Fernandez, M.E., Nunell, G.V., Bonelli, P.R., Cukierman, A.L. 2010. Effectiveness of *Cupressus sempervirens* cones as biosorbent for the removal of basic dyes from aqueous solutions in batch and dynamic modes. **Bioresource Technology**. 101: 9500-9507.
- Gonzales, M.H., Araujo, G.C.L., Pelizaro, C.B., Menezes, E.A., Lemos, S.G., de Sousa, G.B., Nogueira, A.R.A. 2008. Coconut coir as biosorbent or Cr(VI) removal from laboratory wastewater. **Journal of Hazardous Materials**. 159: 252-256.
- Guerrier, L., Girot, P., Schwartz, W., Boschetti, E., 2000, New method for the selective capture of antibodies under physiological conditions. **Bioseparation**, 9, 211.
- Hage, D. S. ve Ruhn, P. F. 2006. An Introduction to Affinity Chromatography. Handbook of Affinity Chromatography (ed. D. S. Hage). Taylor and Francis, 860 p., New York.
- Hi Point Industries Ltd., 2011. Oclansorb: Natural Oil Absorbent [http://www.oclansorb.com], Erişim Tarihi: 01.07.2011.
- Huse, K., Böhme, H-J., Scholz, G. H. 2002. Purification of antibodies by affinity chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. 51: 217-231.
- Innovative Technologies Group LLC, 2011. Hyro-weed [http://www.innovativetech.us/Hydroweed.htm], Erişim Tarihi: 01.07.2011.
- IUPAC. 1997. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Jacques, R.A., Lima, E.C., Dias, S.L.P., Mazzocato, A.C., Pavan, F.A. 2007. Yellow passion-fruit shell as biosorbent to remove Cr(III) and Pb(II) from aqueous solution. **Separation and Purification Technology**. 57: 193-198.
- Jeffree, C. E. 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: *Biology of the Plant Cuticle* (Riederer, M. ed). 430 p. Blackwell Publishing.

- Jiang, E. Y. 2003. Advanced FTIR Spectroscopy. Thermo Electron Corporation. 57 p.
- Kallak Torustrofabrikk, 2011 [<http://www.kallaktorv.no>], Erişim Tarihi: 01.07.2011.
- Kılıç, S. ř. 2003. İmmun yetmezlikli hastalarda intravenöz immünoglobulin tedavisi. **Güncel Pediatri**. 92-95.
- Langmuir, I. 1916. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. **J. Am. Chem. Soc.** 38 (11): 2221-2295.
- Koç, İ. 2007. Synthesis and Characterisation of Macroporous Poly(acrylamide-methacrylamido histidine) Cryogels and Their Use in Antibody Purification. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Maresova, J., Pipiska, M., Rozložnik, M., Hornik, M., Remenarova, L., Augustin, J. 2011. Cobalt and strontium sorption by moss biosorbent: Modeling of single and binary metal systems. **Desalination**. 266: 134-141.
- Munagapati, V.S., Yarramuthi, V., Nadavala, S.K., Alla, S.R., Abburi, K. 2010. Biosorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) by *Acacia leucocephala* bark powder: Kinetics, equilibrium and thermodynamics. **Chemical Engineering Journal**, 157: 357-365.
- Munoz, J. 1999. A Revision of *Grimmia* (Musci, Grimmiaceae) in The Americas. 1: Latin America. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 86, pp:118-191.
- Muronetz V. I., Korpela T. 2003. Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** 790: 53-66.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. 2003. Harper's Illustrated Biochemistry, McGraw-Hill, 693 p., New York.
- Özcan, A.S., Tunalı, S., Akar, T., Özcan, A. 2009. Biosorption of lead(II) ions onto waste biomass of *Phaseolus vulgaris* L.: estimation of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters. **Desalination**. 244: 188-198.
- Reddy, D.H.K., Ramana, D.K.V., Seshaiyah, K., Reddy, A.V.R. 2011. Biosorption of Ni(II) fro aqueous phase by *Moringa oleifera* bark, a low cost biosorbent. **Desalination**. 268: 150-157.
- Reilly, T., Massoomi, F. F., Cox, G., Hamilton, M. 2010. IVIg Switching to Privigen: A Case-Based Examination. **Pharmacy Practice News**, McMahon Publishing.

- Sadek, P.C. 2004. Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography. John Wiley & Sons, 227 p., New Jersey.
- Sarı, A., Mendil, D., Tüzen, M., Soylak, M. 2008. Biosorption of Cd(II) and Cr(III) from aqueous solution by moss (*Hylocomnium splendens*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Chemical Engineering Journal**. 144: 1-9.
- Sarı, A., Mendil, D., Tüzen, M., Soylak, M. 2009. Biosorption of palladium(II) from aqueous solution by moss (*Racomitrium lanuginosum*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Journal of Hazardous Materials**. 162: 874-879.
- Scouten, W. H. 1981. Affinity Chromatography: Bioselective Adsorption on Inert Matrices, John Wiley and Sons, New York
- Smith, A. J. E., 1991, The Liverworts of Britain and Ireland, Cambridge Univ. Press, London.
- Smith A. J. E., 2004. The Moss Flora of Britain and Ireland. (Second Edition) Cambridge Univ. Press.
- Şentürk, H.B., Özdeş, D., Duran, C. 2010. Biosorption of rhodamine 6G from aqueous solutions onto almond shell (*Prunus dulcis*) as a low cost biosorbent. **Desalination**. 252: 81-87.
- Tunalı Akar, S., Görgülü, A., Akar, T., Çelik, S. 2011. Decolorization of reactive blue 49 contaminated solutions by *Capsicum annuum* seeds: Batch and continuous mode biosorption applications. **Chemical Engineering Journal**. 168: 125-133.
- Turková, J. 2002. Affinity Chromatography. Biochromatography: Theory and Practice (ed. M. A. Vijayalakhmi). Taylor and Francis, 526 p., New York.
- Ucun, H., Bayhan, Y.K., Kaya, Y., Çakıcı, A., Algur, O.F. 2002. Biosorption of chromium(VI) from aqueous solution by cone biomass of *Pinus sylvestris*. **Bioresource Technology**. 85: 155-158.
- Ucun, H., Bayhan, Y.K., Kaya, Y., Çakıcı, A., Algur, O.F. 2003. Biosorption of lead (II) from aqueous solution by cone biomass of *Pinus sylvestris*. **Desalination**. 154: 233-238.
- Vagheti, J.C.P., Lima, E.C., Royer, B., Brasil, J.L., Cunha, B.M., Simon, N.M., Cardosa, N.F., Norena C.P.Z. 2008. Application of Brazilian-pine fruit coat as a biosorbent to removal of Cr(VI) from aqueous solution—Kinetics and equilibrium study. **Biochemical Engineering Journal**, 42: 67–76.

- Vançan, S., Miranda, E. A., Bueno, S. M. A. 2002. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems. **Process Biochemistry**. 37: 573-579.
- Vinod, V.T.P., Sashidhar, R.B., Sreedhar, B. 2010. Biosorption of nickel and total chromium from aqueous solution by gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A carbohydrate biopolymer. **Journal of Hazardous Materials**. 178: 851-860.
- Volesky, B. 2007. Biosorption and me. **Water Research**, 41: 4017 – 4029.
- Wilchek, M., Miron, T. 1999. Thirty years of affinity chromatography. **Reactive and Functional Polymers**. 41, 263-268.
- Witek-Krowiak, A., Szafran, R.G., Modelski, S. 2011. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions onto peanut shell as a low cost biosorbent. **Desalination**. 265: 126-134.
- Wongchuphan, R., Tey, B. T., Tan, W. S., Taip, F. S., Kamal, S. M. M., Ling, T. C. 2009. Application of dye-ligands affinity adsorbent in capturing of rabbit immunoglobulin G. **Biochemical Engineering Journal**. 45: 232-238.
- Yang, T.Y. 2003. Adsorbents: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons, 410 p., New Jersey.
- Yavuz, H., Akgöl, S., Say, R., Denizli, A. 2006. Affinity separations of immunoglobulin G subclasses on dye attached poly(hydroxypropyl methacrylate) beads. **International Journal of Biological Macromolecules**. 39: 303-309.
- Zander R.H. 1993. Genera of The Pottiaceae: Mosses of Harsh Environments. Bulletin of the Buffalo Society of Nature Sciences Vol. 32
- Zorbit Technologies Inc., 2011. Peatsorb [<http://www.peatsorb.ca>], Erişim Tarihi: 01.07.2011.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mithat Evrim DEMİR
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara / 1978

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-SCI

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslar arası

1. Demir, M. E., Aktaş Uygun, D., Erdağ, A., Akgöl, S., Denizli, A. Investigation of *Bartamia stricta* Sull. (Bryophyta) As a Natural Biosorbent on Immunoglobulin G Purification. Vth International Bioengineering Congress, 16-19 Haziran 2010, İzmir.
2. Kırmacı, M. Demir, M. E. The Epiphytic Bryopytes of Babadağ (Muğla/Turkey). 5th Balkan Botanical Congress, 7-11 Eylül 2009, Belgrad – Sırbistan.

-Ulusal

1. Şen B., Demir, E., Demir, M. E., Kırmacı, M. Bir Karayosunu Türü Olan *Timmiella barbuloidea* (Brid.) Mönk.'in Ortamsal Özellikleri Üzerine Araştırmalar, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Denizli.
2. Demir, M. E., Aktaş Uygun, D., Erdağ, A., Akgöl, S., Denizli, A. *Syntrichia papillosissima* (Copp.) Loeske (Bryophyta) Kullanılarak Immunoglobulin G'nin Doğal Yollardan Saflaştırılmasının Araştırılması, 6. Ulusal Afinitive Teknikleri Kongresi, 26-27 Mayıs 2010, Aksaray.
3. Demir, M. E., Aktaş Uygun, D., Erdağ, A., Akgöl, S., Denizli, A. Doğal Bir Karayosununun (*Antitrichia californica* Sull) İmmunoglobulin G Saflaştırılmasında Kullanılabilirliğinin Araştırılması, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 13-16 Aralık 2009, Antalya.
4. Demir, M. E., Aktaş Uygun, D., Erdağ, A., Akgöl, S., Denizli, A. Antibadi Saflaştırılmasında Doğal Bir Antibadi Adsorbenti: *Leucodon sciuroidea* (Hedw.) Schwaegr. Kromatografi 2009, 26-29 Eylül 2009, Trabzon.

5. Demir, M. E., Erdağ, A. *Orthotrichum sprucei* Mont. Türünün biyolojisi hakkında araştırmalar. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası – Aydın.

c) Katıldığı Projeler

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi, 2002 –

İLETİŞİM

E-posta Adresi : medemir@adu.edu.tr; evrim@evrimdemir.com.tr

Tarih : 05/08/2011

