



**BAKTERİYORODOPSİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI  
VE BİYO OPTOELEKTRONİK CİHAZLARDA  
KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE PRODUCTION,  
PURIFICATION AND APPLICATION POTENTIAL OF  
BACTERIORHODOPSIN FOR BIO OPTOELECTRONIC  
DEVICE**

**KÜBRA ERKAN TÜRKMEN**

**PROF. DR NİLÜFER AKSÖZ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

Hayatımın Işığı

Aileme

## ÖZET

### BAKTERİYORODOPSİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE BİYO OPTOELEKTRONİK CİHAZ POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

**Kübra ERKAN TÜRKMEN**

**Doktora, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ**

**Şubat 2020, 64 sayfa**

Bakteriyorodopsin (BR), halofilik mikroorganizmalardan *Halobacterium salinarum*'da bulunan bir transmembran proteindir. Proton pompası olarak görev yapan bu protein ışık ile aktive olarak güneş enerjisinden enerji eldesini sağlamaktadır. Ayrıca farklı fiziksel koşullara dayanıklılık göstermesi BR'yi ilgi çekici kılmaktadır. Birçok uygulama alanında önemli yere sahip olan BR yenilenebilir enerji alanında da kullanılmaktadır. Çalışmamızda Bakteriyorodopsin Temelli Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücresi (BR-BSSC) elde etmek amacıyla *Halobacterium salinarum* DSM 671 suşu kullanılmıştır. *H.salinarum* DSM 671'den BR üretimi gerçekleştirilmiş ve üretim koşullarının optimizasyonu için Deney Tasarım programından yararlanılmıştır. Ardışık olarak deney tasarımı programlarının (Plackett-Burman, Central Composite Design) kullanımı sonucunda  $95.3 \text{ mgL}^{-1}$  olacak şekilde BR eldesi sağlanmıştır. Sulu ikili faz sistemi ile saflaştırılan BR kullanılarak Cam/FTO/TiO<sub>2</sub>/BR/MoO<sub>3</sub>/Au (D1) ve Cam/FTO/ZnO/BR/MoO<sub>3</sub>/Au (D2) olacak şekilde iki farklı cihaz elde edilmiştir. Bu cihazlardan D1'in verimliliği 0.8989, D2'nin verimliliği 0.8429 olarak hesaplanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Halobacterium salinarum* DSM 671, Bakteriyorodopsin, Plackett Burman, Central Composite Design, Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücresi

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE PRODUCTION, PURIFICATION AND APPLICATION POTENTIAL OF BACTERIORHODOPSIN FOR BIO OPTOELECTRONIC DEVICE

**Kübra ERKAN TÜRKMEN**

**Doctor of Philosophy, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ**

**February 2020, 64 pages**

Bacteriorhodopsin (BR) is a transmembrane protein that found in *Halobacterium salinarum* which is a halophilic bacterium. BR, after being activated by solar energy, acts as a proton pump and creates energy. Besides this property, BR, also shows resistance to various physical conditions and hence makes it more interesting. Among many important implementations, BR also takes part in renewable energy applications. In this research, *H. salinarum* DSM 671 strain was used to obtain Bacteriorhodopsin Based Biomolecule Sensitized Solar Cell (BR-BSSC). For this purpose, BR was synthesized by *H. salinarum* DSM 671 and for optimization of growth conditions, an experimental design program was used. After sequential application of Plackett-Burman and Central Composite Design. BR was obtained in proportion of 95.3 mgL<sup>-1</sup>. Following aqueous-two-phase system purification, BR was used to produce two different devices named as Glass/FTO/TiO<sub>2</sub>/BR/MoO<sub>3</sub>/Au (D1) and Glass/FTO/ZnO/BR/MoO<sub>3</sub>/Au (D2). The efficiency of these devices were 0.8989 and 0.8429 respectively.

**Keywords:** *Halobacterium salinarum* DSM 671, Bacteriorhodopsin, Plackett-Burman, Central Composite Design, Biomolecule sensitized solar cell

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, ilgi ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer Aksöz'e,

Dünyanın diğer ucundan tezim için kıymetli katkılarda bulunan, çalışma disiplini ile kendisine hayran bırakan Prof. Dr. Raul Alberto Poutou Pinales'e,

Tez çalışmam için Gazi Üniversitesi Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezinin kapılarını açan merkez müdürü Prof. Dr. Süleyman Özçelik'e,

Bilimsel çalışmanın her zaman bir yol arkadaşlığı olduğunu bana öğreten, tez çalışmam boyunca omuz omuza çalıştığım arkadaşlarım Dr. Yunus Özen'e ve Dr. Öğr. Üyesi Özge Sürücü'ye,

Hayatımı anlamlandıran, her anımda yanımdaki destek arkamdaki güç olan, merhameti, sevgiyi öğreten sevgili babam Bilal Erkan, sevgili annem Fatma Erkan, canım kardeşim Tuğba Akıntaş'a

Aşkı, sevgiyi ve huzuru bulduğum, günlerimi aydınlatan, streslerimi çeken canım eşim M. Fatih Türkmen'e

Tezimin her aşamasında bana huzur veren minik meleğime ve teyzesi olarak beni seçtiği için bitanecik yeğenim Uras Efe Akıntaş'a

Lisansüstü hayatımı paylaştığım Hacettepe Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilimdalı değerli hocalarına ve sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Dostlukları ile hayatımı anlamdıran Demet Erdönmez, Hasan Akyıl, Özgecan Erdem, Ayşenur Gencer, Hatice Ercan, Erkay Özgör, Cansu Sevim'e

Çalışmalarına her daim destek olan sevgili öğrencilerim Ege Doruk Ulusman, A. Nur Karaca, İlayda Engin, Başak Kurin, Büşra Özyolci, Gül Keklik'e

Doktora eğitimim boyunca 2211-A Genel Yurtiçi Doktora Burs Programı ile beni destekleyen Tübitak Bideb'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Archaea.....	2
2.1.1. Archaea Domainin Özellikleri .....	2
2.1.2. Halofilik Archaea .....	4
2.1.3. <i>Halobacterium salinarum</i> .....	5
2.1.3.1. <i>H. salinarum</i> 'un Retinal Proteinleri .....	5
2.1.3.2. <i>H. salinarum</i> 'un Enerji Metabolizması .....	6
3.1. Bakteriyorodopsin .....	7
3.1.1. Genel Özellikleri ve Yapısı .....	7
3.1.2. Bakteriyorodopsinin Fotodöngüsü .....	9
3.1.3. Bakteriyorodopsinin Kullanım Alanları.....	10
3.2. Deney Tasarımı .....	12
3.2.1. Plackett-Burman Deney Tasarımı (Plackett-Burman Experimental Design PBED) .....	12
3.3. Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücreleri .....	12
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	14
3.1. Bakteriyorodopsin Üretimi.....	14
3.1.1. Mikroorganizma Eldesi ve Üretimi.....	14

3.1.2. Optimum Deney Koşullarının Deney Tasarımı Metodu İle Belirlenmesi ....	15
3.1.2.1.Plackett-Burman Deney Tasarımı (PBED).....	15
3.1.2.2. Yüzey Yanıt Yöntemi- Response Surface Methodology (RSM).....	17
3.1.2.2.1. Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım-CCD) 1 .....	17
3.1.2.2.2. Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım-CCD) 2 .....	18
3.1.3 Bakteriyorodopsinin Saflaştırılması .....	19
3.2. Bakteriyorodopsin Temelli Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücresi Eldesi (BR- BSSC) .....	20
3.2.1.Alttaşların Temizliği .....	21
3.2.2.Metal Oksit Tabakasının Kaplanması.....	21
3.2.3. Aktif Tabakanın Kaplanması .....	22
3.2.4.Metal Kontak Kaplama İşlemi .....	23
3.3. BR Temelli Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücrelerinin Elektriksel Ölçümü .....	25
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	26
4.1. Bakteriyorodopsin Üretimi .....	26
4.1.1. <i>Halobacterium salinarum</i> DSM 671 Üretimi .....	26
4.1.2.Optimum Deney Koşullarının Deney Tasarımı Metodu İle Belirlenmesi ....	27
4.1.2.2. Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım-CCD)-1 ile Elde Edilen Sonuçlar ve Değerlendirilmesi .....	35
4.1.2.3. Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım-CCD)-2 ile Elde Edilen Sonuçlar ve Değerlendirilmesi .....	42
4.1.3. Bakteriyorodopsinin Saflaştırılması ve Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi	48
4.2. Bakteriyorodopsin Temelli Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücresi (BR-BSSC) Ölçüm ve Karakterizasyonu.....	50
4.2.1. Bakteriyorodopsin Aktif Katmanının Eldesi ve Optik karakterizasyonu .....	50
4.2.2. Bakteriyorodopsin Aktif Katmanının Karakterizasyonu .....	51
4.2.3. Bakteriyorodopsin Temelli Güneş Hücrelerinin Karakterizasyonu.....	53
5. YORUM.....	56
6. KAYNAKLAR .....	58
EKLER.....	63



EK 1 – Deney Aşamalarında Kullanılan Solventlerin Hazırlanışı.....	63
ÖZGEÇMİŞ .....	64

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Halobacterium salinarum</i> 'da bakteriyorodopsin yapısının şematik olarak gösterilmesi [4] .....	7
Şekil 2.2. Mor membranı oluşturan trimerik yapılar [5].....	8
Şekil 2.3. Bakteriyorodopsin intermediantlarının fotodöngüdeki sıralaması[4].....	9
Şekil 2.4. Hücre membranında bakteriyorodopsinin ve all-trans retinal proteinin yerleşimi[13].....	10
Şekil 3.1. Bakteriyorodopsinin sulu ikili faz sistemi ile saflaştırılması.....	20
Şekil 3.2. Üretilen güneş hücresinin şematik çizimi.....	21
Şekil 3.3. Sputtering (Saçtırma) cihazı .....	22
Şekil 3.4. Cam/FTO alttaş yapısına BR tabakasının kaplanması .....	23
Şekil 3.5. Termal buharlaştırma sistemi .....	24
Şekil 3.6. Metal kontaktları oluşturulmuş BR-BSSC güneş hücreleri.....	24
Şekil 3.7. Tel bağlantıları yapılmış elektriksel ölçüme hazır BR-BSSC güneş hücresi ve Güneş Simülatörü .....	25
Şekil 4.1. <i>H.salinarum</i> DSM 671'in temel besiyerinde üreme görünümü .....	26
Şekil 4.3. Deney setlerinde bakteriyorodopsin üretim miktarları.....	28
Şekil 4.4. Elde edilen bakteriyorodopsin miktarının yüzey grafiği ( $\text{mgL}^{-1}$ ).....	30
Şekil 4.5. Elde edilen bakteriyorodopsin miktarının Kontur grafiği ( $\text{mgL}^{-1}$ ).....	31
Şekil 4.6. Bakteriyorodopsin üretimine faktörlerin faydasının yüzey grafiği .....	31
Şekil 4.7. Bakteriyorodopsin üretimine faktörlerin faydasının kontur grafiği .....	32
Şekil 4.8. <i>H.salinarum</i> DSM 671'in uygulanan deney setlerinde üreme eğrileri.....	35
Şekil 4.9. Deney setlerinde bakteriyorodopsin üretim miktarları ( $\text{mgL}^{-1}$ ) .....	36
Şekil 4.10. Elde edilen bakteriyorodopsin miktarının yüzey grafiği ( $\text{mgL}^{-1}$ ).....	38
Şekil 4.11. Elde edilen bakteriyorodopsin miktarının kontur grafiği ( $\text{mgL}^{-1}$ ).....	38
Şekil 4.12. Bakteriyorodopsin üretimine faktörlerin faydasının yüzey grafiği .....	39
Şekil 4.13. Bakteriyorodopsin üretimine faktörlerin faydasının yüzey grafiği .....	39
Şekil 4.14. <i>H.salinarum</i> DSM 671'in uygulanan deney setlerinde üreme eğrileri.....	42
Şekil 4.15. Deney setlerinde bakteriyorodopsin üretim miktarları ( $\text{mgL}^{-1}$ ) .....	43
Şekil 4.16. Elde edilen bakteriyorodopsin miktarının yüzey grafiği ( $\text{mgL}^{-1}$ ).....	45
Şekil 4.17. Elde edilen bakteriyorodopsin miktarının kontur grafiği ( $\text{mgL}^{-1}$ ).....	45

Şekil 4.18. Bakteriyodopsin üretimine faktörlerin faydasının yüzey grafiği.....	46
Şekil 4.19. Bakteriyodopsin üretimine faktörlerin faydasının kontur grafiği.....	46
Çizelge 4.6. Deneme sayılarına göre beklenen ve elde edilen bakteriyodopsin miktarı (mgL-1) .....	47
Şekil 4.20. a) PEG ve Fosfat zengin tabakalar arasında oluşan bant b) yüksek hızda çöktürme sonucu oluşan çökelti .....	49
Şekil 4.21. CHAPS uygulamasından sonra bakteriyodopsin ve mor renk oluşumu....	49
Şekil 4.22. BR'in Katı-Hal düzlemsel bir eklemede aktif tabaka olarak görev yapmasının temsili gösterimi[33] .....	50
Şekil 4.23. Cam alttaş üzerine hazırlanmış BR katmanına ait dalga boyuna bağlı optik soğurma spektrumu .....	51
Şekil 4.24. Cam alttaş üzerine hazırlanmış BR katmanına ait PL ölçümü.....	52
Şekil 4.25. Cam üzerine kaplanmış BR katmanına ait SEM görüntüsü.....	53
Şekil 4.26. D1 Güneş hücresine ait I-V grafiği .....	54
Şekil 4.27. D1 Güneş hücresine ait I-V grafiği .....	54

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>H.salinarum</i> DSM 671'den bakteriyodopsin üretim besiyeri [1].....	14
Çizelge 3.2. Plackett-Burman Deney Tasarımı ile tasarlanan deney setleri.....	16
Çizelge 3.3. CCD-1 değerlerini içeren deney tasarımı .....	17
Çizelge 3.4. CCD-2 değerlerini içeren deney tasarımı .....	18
Çizelge 4.1. PBED için istatistiksel analiz sonuçları.....	29
Çizelge 4.2. Farklı faktörlerin bakteriyorodopsin üretimi üzerine etkileri .....	30
Çizelge 4.3. Deneme sayılarına göre beklenen ve elde edilen bakteriyorodopsin miktarı (mgL-1).....	33
Çizelge 4.4. CCD-1 için istatistiksel analiz sonuçları .....	37
Çizelge 4.5. Deneme sayılarına göre beklenen ve elde edilen bakteriyorodopsin miktarı (mgL-1).....	40
Çizelge 4.5. CCD-2 için istatistiksel analiz sonuçları .....	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

mg	miligram
$\eta$	Güneş hücresi verimi

### Kısaltmalar

PEG	Polietilen Glikol
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
BR	Bakteriyorodopsin
BSSC	Biyomolekül duyarlı güneş Hücresi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

# 1. GİRİŞ

Archea domaini doğada ekstrem olarak adlandırılan koşullarda yaşayan bakterilerin bir kısmını barındırmaktadır. Bu bakteriler aşırı sıcak/soğuk koşullar veya yüksek tuz konsantrasyonu gibi ekstrem şartlarda canlılığını sürdürebilmektedir. Bu koşullarda canlılıklarını sürdürebilmek için diğer bakterilerde yer almayan özel yapılar ya da proteinler geliştirmişlerdir. Bu özel yapılar arasında membranda bulunan transmembran proteinleri de yer almaktadır.

Transmembran proteinlerden biri olan ve bulunduğu mikroorganizmaya farklı özellikler sağlayan bakteriyorodopsin (BR) oldukça ilgi çekmektedir. *Halobacterium salinarum*, BR yapısı ve üretimi için en kapsamlı incelenen arkeadır [1]. Bu mikroorganizma yüksek ışıklı, tuzlu ve yüksek sıcaklıklığa sahip ortamlarda yaşayabilmektedir [2].

BR yüksek fotokimyasal ve fotoelektrik dönüşüm verimliliğine sahip olmanın yanı sıra termal olarak da kararlıdır. Bahsedilen bu özellikleri yüksek sıcaklıklara, yüksek tuz oranına ve besinsel açıdan sınırlı ortamlarda dayanıklılık gösterebilmesini sağlamaktadır [3]. Bu özellikleri göz önünde bulundurularak birçok uygulama alanında yer edinen BR, güneş enerjisinden enerji eldesi çalışmalarında da oldukça ses getirmektedir.

Bu çalışmada BR temelli biyomolekül duyarlı güneş hücresi eldesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalar; BR üretim koşullarının deney tasarım metodları kullanılarak optimizasyonu ve optimum koşullarda elde edilen BR'in güneş hücresi uygulamasının yapılmasıdır. Elde edilen veriler ışığında biyomolekül duyarlı güneş hücreleri içerisinde BR kullanılarak yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen verim yüzdeleri bugüne değin yapılan benzer çalışmalara oranla daha yüksektir. Ayrıca ülkemizde biyomolekül duyarlı güneş hücresi çalışmaları içerisinde bakteriyorodopsin temelli güneş hücresi eldesi ilk kez yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Carl Woese canlıları 16 S ribozomal RNA (r RNA) gen bölgelerine göre üç domain ayırarak farklı bir sınıflandırma yapmıştır. Bu sınıflandırmaya göre domainler: Bacteria, Archaea, Eukarya domainleridir [4].

### 2.1. Archaea

Archaea domaini bakterilerden ve ökaryotlardan farklı moleküler özelliklere sahiptir. Archaea terimi Yunancada eski ve ilkel anlamına gelen “archaios” kelimesinden türetilmiştir. Adından da anlaşılacağı üzere archaea domaini üyeleri dünyanın daha önceki çağlarının ekstrem koşullarını barındıran ortamlarda canlılıklarını sürdürebilmişlerdir. Ekstremofil olarak adlandırılan bu canlılar genellikle Archaea domaininde bulunmaktadır. Ancak Bacteria ve Eukarya domainlerinde de ekstremofil özelliklere sahip canlılar bulunmaktadır. Ekstremofiller, farklı aşırı koşullarda hayatta kalabilen ve termofiller, asidofiller, alkalofiller, psikrofiller, halofiller, metalofiller, barofiller vb. gibi çeşitli sınıflara ayrılan organizmalardır. Örneğin, 113 °C'de yaşamını sürdüren ve hidrotermal menfezlerde canlı bulunan *Pyrolobus fumarii*; Japonya'daki asidik topraklardan izole edilen ve bilinen aside en toleranslı organizmalar olan *Picrophilus* türleri yaklaşık pH 0'da üreyebilmektedir. Ayrıca metabolik bir yan ürün olarak metan gazı üreten ve bataklıklar, kaplıcalar ve insanlar da dahil olmak üzere hayvanların bağırsakları gibi anaerobik ortamlarda bulunan metanojenler de gruba dahildir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ekstrem mikroorganizmaların endüstriyel alanlarda kullanımı zorlu koşullarda gösterdikleri dayanıklılık sebebiyle artmıştır [5].

#### 2.1.1. Archaea Domainin Özellikleri

Bakteriler, Archaea ve Eukarya alanları genetik kriterler üzerine kurulmuş olsa da biyokimyasal özellikler de archaeanın prokaryotlardan bağımsız bir grup oluşturduğunu ve hem bakteri hem de ökaryotlarla özelliklerini paylaştıklarını göstermektedir. Bu özelliklerin başlıcaları şunlardır:

1. Hücre duvarları: hemen hemen tüm bakteriler hücre duvarlarında peptidoglikan içerir; bununla birlikte, archaea ve ökaryotlarda peptidoglikan yoktur. Archaeada çeşitli tipte hücre duvarları bulunur. Bu nedenle, peptidoglikanın yokluğu veya varlığı, archaea ve bakteriler arasında ayırt edici bir özelliktir.

2. Yağ asitleri: bakteri ve ökaryotlar, ester bağları ile bir gliserol molekülüne bağlanan yağ asitlerinden oluşan membran lipitleri üretir. Archaealar yağ asitlerini gliserol moleküllerine bağlayan eter bağlarına sahiptir. Birkaç bakteri eter bağlantılı lipitler içermekle birlikte, ester bağlı lipitler içeren hiçbir archaea bulunmamıştır.

3. RNA polimerazının karmaşıklığı: her türlü organizma için transkripsiyon, bir DNA şablonunu bir RNA ürününe kopyalayan RNA polimeraz adı verilen bir enzim tarafından gerçekleştirilir. Bakteriler dört polipeptitten oluşan basit bir RNA polimeraz içerir. Bununla birlikte hem archaea hem de ökaryotlar, çoklu polipeptitler içeren çoklu RNA polimerazlara sahiptir. Örneğin, archaea RNA polimerazları sekizden fazla polipeptit içerir. Ökaryotların RNA polimerazları ayrıca yüksek sayıda polipeptitten (10-12) oluşur, göreceli polipeptit boyutları hipertermofilik archaea RNA polimerazinkine benzerdir. Bu nedenle, arkaik RNA polimerazları, bakterilerden ziyade ökaryotların RNA polimerazlarına daha çok benzemektedir.

4. Protein sentezi: arkeadaki protein sentezinin çeşitli özellikleri ökaryotlarınkine benzerdir. Bakterilerle aralarındaki belirgin bir fark ise bakterilerin modifiye edilmiş bir metiyonine sahip bir başlatıcı tRNA'ya (transfer RNA) sahip olması ancak ökaryotlar ve arkaiklerin modifiye edilmemiş bir metiyonine sahip bir başlatıcı tRNA'ya sahip olmasıdır.

5. Metabolizma: hem archaeada hem de bakterilerde azot fiksasyonu, denitrifikasyon, kemolithotrofi ve hipertermofilik ortamda üreme gibi çeşitli metabolizma türleri vardır. Metanojenez (metabolik bir yan ürün olarak metan üretimi) sadece Archaea domaininde, özellikle Euryarchaeota alt bölümünde görülür. Klorofil kullanan klasik fotosentez herhangi bir archaeada bulunmamıştır.

Archaeanın kullandığı metabolik stratejilerin doğada olağanüstü çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, halofilik archaealar yüksek tuzlu ortamlarda yaşayabilmektedir. Çünkü bu mikroorganizmalarda ozmozun sınırlayan bir metabolik yol için enzimleri kodlayan özel bir gen kümesi bulunmaktadır. Ozmozun sınırlayan bu metabolik yol metilaspirtat yolu olarak bilinmektedir. Bu metabolik yol, benzersiz bir anapleroz tipinin



bir örneğidir (metabolik ara maddelerin yerine koyulmasını yenileme işlemi; bu durumda ara madde metilaspirtattır). Bilimsel araştırmalarda kullanılan model bir organizma olan *Haloarcula marismortui*'yi içeren halofilik archaeaların, genlerin bir türden diğere geçirildiği yatay gen transferi olarak bilinen bir işlemle metilaspirtat yolağı diğere halofilik archaealara aktarılmaktadır.

### 2.1.2. Halofilik Archaea

Archaea domaininde, Euryarchaeota filumunda yer alan Halobacteriales ordosundaki tek familya olan Halobacteriaceae familyasına ait kırmızı pigmentli ekstrem halofilik archaea için Halobacteria terimi kullanılmaktadır [6]. Bu familya yaklaşık 26 genusa sahiptir. Bu sayı yeni türlerin keşfedilmesi ile artmaktadır. Bunlar; *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halobaculum*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas*, *Natronorubrum*, *Halomicrobium*, *Halobiforma*, *Halosimplex*, *Halalkalicoccus*, *Halovivax*, *Natronolimnobius*, *Halostagnicola*, *Halodaptatus*, *Haloquadratum*, *Haloplanus*, *Halopiger*'dir [7].

Halobacteria (ya da haloarchaea) bilinen en halofilik mikroorganizmalardır. Hipersalin sularda su doygunluk konsantrasyonlarına yaklaştığında baskın mikrobiyal popülasyon oluşmaktadır. Baskın mikrobiyal popülasyon ortama kırmızı rengini vermektedir. Mevcut kırmızı renk oluşumu halobacterianın karotenoid pigmentleri aracılığıyla oluşmaktadır. Karotenoid pigmentler güneş ışığı aracılığıyla gelen radyasyonu engellemektedir. Bunun yanı sıra ortam sıcaklığını ve buharlaştırma hızını arttırıcı etkiye sahiptir[8].

Halobacteria içerisinde bulunan türler C50 karotenoidlerinin varlığına bağlı olarak kırmızı ya da turuncu renkte görülmekle birlikte bazı türler renksizdir. Bu türlerin en belirgin örneği *Haloferax mediterranei*'dir[6].

Halofilik archaeaların çeper yapıları bakterilerden farklılık göstermektedir. Halofilik archaealar, bakterilerde mevcut olan peptidoglikan tabakasından farklı olarak lipid çift tabakasını çevreleyen glikoprotein yapısında S tabakasına sahiptirler. Bu S tabakası yapısal bütünlüğünü devam ettirmek için sodyuma ihtiyaç duymaktadır [9].

Halobacteria familyasında bulunan üyeler içerisinde retinal türevli pigment proteinlerine (ör; bakteriyorodopsin) sahip olan mikroorganizmalar mevcuttur. Bakteriyorodopsin

örneğinde olduğu gibi retinal proteinler ışık aracılığıyla aktive olarak iyon pompası işlevi görmektedir. İyon pompası işlevi ile ATP üretimi de gerçekleşmektedir [10].

Bakteriyorodopsinin ilgi çekici yapısı ve kullanım alanının artması nedeniyle halofilik archaea'lara olan ilgi artmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmaların odağında yer alan halofilik archaealar içerisinde yer alan *Halobacterium salinarum* bu tarz çalışmalarda kullanılan mikroorganizmlara örnek teşkil etmektedir.

### **2.1.3. *Halobacterium salinarum***

*Halobacterium salinarum* halofilik archaea'lar için model organizma olarak değerlendirilmektedir. Basit morfolojisine sahip, hareketli ve yüksek tuz içerikli ortamlarda (4M tuz konsantrasyonu veya daha yüksek konsantrasyonlarda) yaşayan bir mikroorganizmadır. *Halobacterium salinarum* ürettiğinde tipik koloni rengi olan kırmızımsı pembe rengi ile ayırt edilmektedir. Bu renk yapısında bulunan bacterioruberin sayesinde oluşmaktadır[11].

*H. salinarum* yapısında bulunan retinal bir protein olan bakteriyorodopsinin ışık ile aktive olarak proton pompası olarak işlev görmesi ile enerji elde etmektedir. Bakteriyorodopsin dışında farklı retinal proteinleri de yapısında bulunduran *H. salinarum* yapılan çalışmaların model mikroorganizma olarak kullanılmaktadır [12].

#### **2.1.3.1. *H. salinarum*'un Retinal Proteinleri**

*H. salinarum* dört adet retinal protein içermektedir. Bu retinal proteinler fotosentetik pigmentler olarak enerji dönüşümünde ve sinyal transdüksiyonunda görev yapmaktadır. Bu proteinler:

- Bakteriyorodopsin [13]
  - *Halobacterium*'un ışık varlığında üremesini sağlayan fotosentetik bir pigment olarak işlev görür.
  - Işık enerjisi ile aktif hale gelir ve ışık enerjisi aracılığıyla proton gradyenti oluşturmaktadır. Oluşan proton gradyenti ATP sentaz aracılığıyla ATP eldesinde kullanılmaktadır.
- Halorodopsin [14]

- Işık ile aktif olan klor pompasıdır. *Halobacterium*'un yüksek hücre içi tuz konsantrasyonunu korumasını sağlamaktadır.
- Sensory rodopsin I
  - Fototakside rol oynayan, turuncu renge fotofilik yanıt ve ayrıca UV ışığına fotofobik yanıt aracılığıyla etmektedir.
  - Transdüser protein htrI ile kompleks oluşturur.
- Sensory rodopsin II
  - Fototakside yer almaktadır ve mavi ışığa fotofobik cevap aracılığıyla etmektedir.
  - transdüser proteini htrII ile kompleks oluşturmaktadır [15].

### 2.1.3.2. *H. salinarum*'un Enerji Metabolizması

Halofilikler birçok ekstremofilin aksine aerobik ve anaerobik koşullar altında üreyebilmektedirler. *Halobacterium*'un enerji kazanmak için üç farklı sistemi vardır. Bunlar:

1. Aerobik koşullar altında çeşitli metabolitlerin oksidasyonu
  - Piruvatı trikarboksilik asit döngüsüne sokarak ferredoksin oksidoredüktaz aracılığıyla piruvatı okside eder [16].
  - *Halobacterium*, solunum zincirinin beş ana kompleksini de içerir.
2. Fotosentez
 

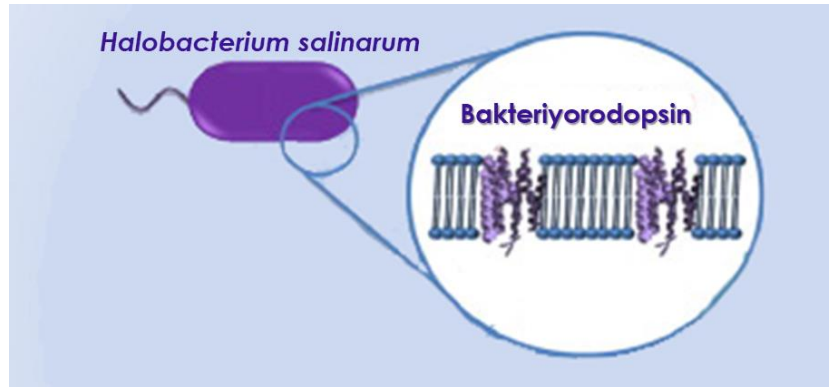
Işıkla çalışan bir proton pompası olan bakteriyorodopsin, bir proton gradyanı oluşturur. ATP sentaz, ATP sentezini sürmek için proton gradyanının enerjisini kullanmaktadır [17].
3. Arginin fermantasyonu
 

*Halobacterium*, arginin fermantasyon yolu ile ATP üretmektedir [18].

### 3.1. Bakteriyorodopsin

#### 3.1.1. Genel Özellikleri ve Yapısı

Bakteriyorodopsin (BR), archaea domaininde özellikle *Halobacterium salinarum*'da bulunan bir transmembran proteindir (Şekil 2.1.). BR ayrıca ışığa bağımlı bir proton pompası olarak işlev görmektedir. Bu işlevini aydınlatma/ışık altında protonları hücrenin iç kısmından çevresindeki ortama pompalayarak transmembran proton gradyenti oluşturarak gerçekleştirmektedir. *H. salinarum* ATP sentezi için BR aracılığıyla oluşturulan bu proton gradyentini kullanmaktadır. Bu durum BR'ın ışık enerjisinin kimyasal enerjiye dönüştürülmesi için bir ışık dönüştürücü olarak işlev görmesini de sağlamaktadır [4, 5].



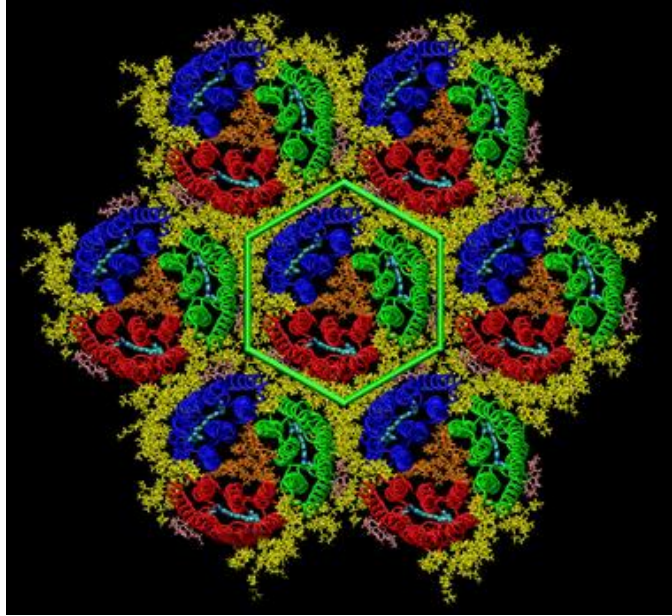
Şekil 2.1. *Halobacterium salinarum*'da bakteriyorodopsin yapısının şematik olarak gösterilmesi [21]

BR'ın tarihçesine kısaca bakılacak olursa, 1967'de Stoeckenius tarafından keşfedilmiştir. Temel fonksiyonu olan proton pompası işlevini 1972'de Oesterhelt açıklığa kavuşturmuştur [22]. Bu keşif bilim dünyasına yeni bir protein sunmakta ve aşağıda açıklanan iki farklı durumun ortaya çıkması bu proteine olan ilgiyi artırmaktadır. Bu durumlardan ilki hücre-membran reseptörleri için basit bir model oluşturmaktadır. Özellikle insanlarda en iyi bilenen ilaç hedeflerini içeren G-protein-coupled seven-heliks reseptörleri muhtemel benzer bir anahtar mekanizma ile çalışmaktadır. İkincisi ise membran taşıyıcılarının bir prototipi olmasıdır [7, 8].

*H. salinarum*'da bakteriyorodopsin yapısı iki membrana bağlı olarak bulunan ve ATPaz içeren bir sistemdir. Bu protein 2 boyutlu kristal kafes olarak bilinen mor membran (Purple Membran-PM) yapısı içerisinde bulunmaktadır. PM, *H. salinarum*'un hücre

membranında integral şekilde uzanan bir yapıdır. Bu yapı, hücre yüzeyinin büyük bir çoğunluğunu çevrelemekte ve birden fazla yama şeklinde bulunmaktadır. Hücrede görülen bu yamaların her biri mor membran (PM) olarak adlandırılmaktadır. PM'in genel yapısı 3/1 oranında protein lipit bileşenlerinden oluşmaktadır. Ayrıca bu yapı proton pompası gibi davranabilmesi için proton taşınımı işlevini sağlayan bir geçirgenliğe sahiptir.

PM'in yapısı ayrıntılı incelendiğinde yapıda iki boyutlu hekzagonal kristallerin yer aldığı görülmektedir. Hekzagonal kristallerin birleşimi ile trimer yapıları meydana gelmektedir. Bu iki boyutlu kristal yapının oluşturduğu her trimerik yapıda üç adet monomerik BR içermektedir (Şekil 2.2.) [24].



Şekil 2.2. Mor membranı oluşturan trimerik yapılar [22]

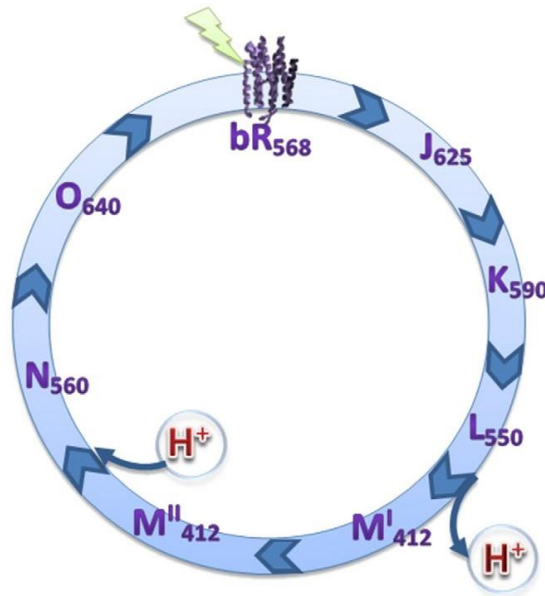
PM yamaları uygun koşullar altında, hücre membranının yaklaşık olarak %50'den fazlasını kaplayabilmektedir [25]. Daha önce bahsedildiği üzere PM yamaları içerdiği BR sayesinde, ışığı güçlü bir şekilde absorblayarak protonları hücrenin içinde plazma membranından dışarıya doğru pompalar ve ışığı elektrokimyasal gradyente dönüştürür. Bu gradyent ise ATPaz enzimi aracılığıyla ATP üretimi için kullanılmaktadır [11,12]. Mor membranda ayrıca 2 adet sensör rodopsin adı verilen yapıda bulunmaktadır. Bunlar sensory rodopsin ve phorodopsin olarak adlandırılır. Bu yapılar BR'nin ışık enerjisi ile gerçekleştirdiği enerji eldesini sağlayan fotodöngü için gerekli dalga boylarını (yeşil ve sarı ışık) tespit etmektedirler [28].

### 3.1.2. Bakteriyorodopsinin Fotodöngüsü

BR, mor membran olarak adlandırılan yapının içinde yer alan bir protein olup 7 adet heliksten ve heliks merkezinde retinal kromofor içeren iki boyutlu hegzagonal yapıdan oluşmaktadır. BR'ın foto uyarımı fotodöngü adı verilen bir süreci başlatmaktadır. Fotodöngü proton transportunu ve spektral olarak karakterize edilebilen intermediyantlar (ara formlar) içeren bir sürecin tamamını kapsamaktadır. İntermediyantlar (ara formlar) maksimum absorpsiyon karakteristiklerine göre J, K, L, M, N ve O olarak adlandırılmaktadır ve bu intermediyantlar (ara formlar) farklı fazlardan oluşmaktadır. İntermediyantlar (ara formlar) ve BR proton translokasyonu arasındaki şu sıra ile gerçekleşmektedir:  $BR \rightarrow J \rightarrow K \rightarrow L \rightarrow M^I \rightarrow M^II \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow BR$  şeklindedir (Şekil 2.3.) [29].

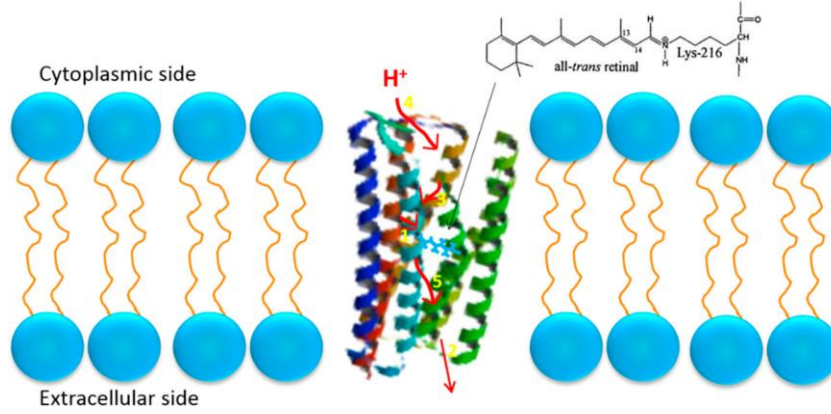
Bakteriyorodopsin bir foton absorbladığında, foton fotodöngü olarak adlandırılan siklik bir yolağı takip etmektedir. Foto döngünün nasıl gerçekleştiğini daha iyi anlamak için BR'in yapısal özelliklerine daha ayrıntılı bakılması gerekmektedir.

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, *H. salinarum*'dan elde edilen BR molekülü 248 amino asit içeren bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Bu polipeptid zinciri 7 adet (A-G) transmembran  $\alpha$ -heliks içermektedir (Şekil 2.4.). BR fotodöngüsü proton translokasyon aşamalarını içeren bir katalitik döngüdür.



Şekil 2.3. Bakteriyorodopsin intermediyantlarının (ara formlarının) fotodöngüdeki sıralaması[21]

Her bir BR molekülü retinal protein olarak adlandırılan bir kromofor içermektedir. Retinal protein, G heliks yapısı içindeki lizin-216 amino grubuna protonlanmış Schiff bazı aracılığıyla kovalent olarak bağlıdır. Schiff bazı, transmembran heliks tarafından çevrelenmiş olan kavitenin tam merkezinde yer almaktadır. Schiff bazının bu konumu proton kanalını etkin bir şekilde iki parçaya ayırmaktadır: ekstrasellüler yarı-kanal ve sitoplazmik yarı kanal.



Şekil 2.4. Hücre membranında bakteriyorodopsinin ve all-trans retinal proteinin yerleşimi[30]

Ekstrasellüler kısım ve sitoplazmik kısım çoğunlukla yüklü rezidüer (Asp 85) veya hidrofobik rezidüer içermektedir. Bu yapılar schiff bazı için sırasıyla proton alıcı veya proton verici olarak görev yapmaktadır. BR’de doğal olarak iki çeşit retinal kromofor bulunmaktadır. Bunlar: all-trans ve 13-cis’dir [31]. Karanlık koşullarda, BR’in retinal kromofor kısmında lizin-216 bağlı Schiff bazına bağlı all-trans yapılar bulunmaktadır. Işık altında, all-trans retinal 13-cis retinal kromofora dönüşmektedir. Retinal kromoforlarda gerçekleşen bu fotoizomerizasyon fotokimyasal reaksiyona yol açmaktadır [30].

### 3.1.3. Bakteriyorodopsinin Kullanım Alanları

Son zamanlarda oluşan alternatif ve sürdürülebilir enerji kaynaklarına olan ihtiyaç geniş bir tartışma konusudur. BR’in görünür ışık bölgesinde foto uyarım sonucunda proton pompası fonksiyonu görmesi sonucunda enerji elde etmektedir. Bu özelliği ile sürdürülebilir enerji kaynakları arasında yer alan güneş enerjisinden, alternatif ve sürdürülebilir enerji elde edilmesi konusunda güçlü bir aday olarak değerlendirilmektedir[32].

Ayrıca BR'nin sahip olduğu benzersiz özellikler birçok başka alanda da oldukça geniş aralıkta kullanım potansiyeli sağlamaktadır. Başlıca özellikleri arasında: 1. ışığı bir durum yüküne dönüştürmede yüksek kuantum etkinliği, (2) görünür ışığın geniş aralıkta emilimi, (3) yüksek termal ve fotokimyasal kararlılıklar, (4) çevresel bozulmalarla dejenerasyona dayanıklılık, (6) düşük üretim maliyeti, (7) çevre dostu olma ve (8) spesifik cihaz uygulamaları için geliştirilmiş spektral özelliklere sahip genetik varyantların varlığı [21] yer almaktadır.

BR yüksek verimli cihazların ve gelişmiş fonksiyonel malzemelerin üretimi için çeşitli nanomalzemelerle arayüz olabilmektedir. Son yıllarda, bakteriyorodopsin bazlı nano-biyo hibrid malzemeler, mükemmel fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri ve çeşitli tıbbi, optik, optoelektronik ve çevresel uygulamalarda potansiyel kullanımı nedeniyle geniş ilgi görmüştür [21] .

BR'nin yapısı ve özelliklerinde daha önce bahsedildiği üzere ilgi çeken bir protein olarak çeşitli çalışmalarda yer bulmaktadır. Yüksek fotokimyasal ve fotoelektrik dönüşüm verimliliğine sahip olması ve ışık enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürme yeteneği çeşitli alanlarda ve uygulamalarda kullanım olanağı sağlamıştır. Bu alanlar çeşitli temel başlıklar altında toplanmaktadır. Bunlar;

- Cihaz teknolojileri: optik cihazlar, elektronik cihazlar, kimyasal algılama, filtre cihazları kapsamaktadır.
- Teşhis ve terapötik uygulamalar: Bu proteinin terapötik uygulaması, dejenere retina körlüğü ve göz bozukluklarının tedavisini, terapötik aşı tedavisini, malign tümörlerin ve diğer hastalıkların tedavisini, gen transkripsiyon regülasyonunu, ilaçların taşınmasını ve salınmasını, hücre sinyalini, apoptozu veya neoplastik ölümünü içerir.
- Hücre sinyallemesinin kontrolü, nöro-stimülasyon cihazlarının üretimi ve farmasötik uygulamalar.
- Enerji dönüşümü: Yenilenebilir enerjiler, enerji tüketimindeki artış ve çevresel kaygılar nedeniyle giderek daha fazla dikkat çekmektedir. Yarı iletken nanoyapılara ve bakteriyorodopsin proteinine dayanan nano-biyo hibrid malzemeler, fotovoltaik hücreler ve fotoelektrokimyasal olarak suyun ayrışmasını sağlayan hücreler gibi güneş enerjisi dönüşüm sistemleri için başarıyla kullanılmıştır [27] [18–22].



Fotoelektrik özelliği ayrıca yapay retinalarda, optik bilgilerin ön işlemlerine izin veren pikseli fotoelektrik dedektörlerde [38] kullanılmaktadır. Fotokromik özelliklerinde optik işleme ve optik depolama alanlarında yararlanılmaktadır [24–26].

## **3.2. Deney Tasarımı**

### **3.2.1. Plackett-Burman Deney Tasarımı (Plackett-Burman Experimental Design PBED)**

Faktöriyel tasarım karmaşık çok faktörlü ve çok düzeyli problemleri sadece birkaç deneme kullanarak çözmek için etkili bir matematiksel yöntemdir. Biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tasarımlar, incelenen faktörler için ana etkileri tanımlayabilir ve parametreler arasındaki mevcut etkileşimleri ortaya çıkarabilir. Bu yöntem çalışma sayısını azaltmakla birlikte deneysel verilerin mantıklı bir sonuçta toplanmasını sağlamaktadır. Bu amaçla kullanılan birçok deney tasarımı metodu bulunmakla birlikte en sık kullanılanlardan birisi Plackett-Burman deney tasarımıdır.

PBED ile tasarlanan deneylerde deneye etkili faktörler ve bu faktörlerin farklı seviyeleri incelenmektedir. Mevcut verilerin deney ortamına uygulanması ve elde edilen verilerin anlamlılığını değerlendirilmesi gerekmektedir. Optimal deneysel durumu belirlemek için tasarımların sonucunu yorumlamak için ise varyans analizi (ANOVA) ve t testi analizi kullanılmaktadır[27,28]. İstatistiksel analizlerin sonucunda hangi parametrenin etkili faktörlerden olduğu ve bu faktörlerin hangi seviyesinin istenilen verimi sağlayan deney koşulunu sağladığı belirlenmektedir. Mevcut üretim ortamının kompleks yapısı göz önüne alındığında besi ortamının içerdiği tüm koşullarla optimize edilmesi endüstriyel üretim aşamasına geçişlerde büyük kolaylık sağlamaktadır.

## **3.3. Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücreleri**

Son yıllarda yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgi hızla artmaktadır. Artan enerji ihtiyacı ile birlikte araştırmalar bu alanda yoğunlaşmış haldedir. Özellikle güneş enerjisinin dönüşümü ile enerji eldesi yenilenebilir enerji kaynakları içerisinde üst sıralarda yer almaktadır [44].

Biyomolekül duyarlı güneş hücreleri (Biomolecule-sensitized solar cells- BSSCs) düşük-maliyetli fotovoltaik enerji üretimi için yeşil teknoloji alanında gelişim göstermektedir. BSSC'in mekanizması boya duyarlı güneş hücreleri (Dye-sensitized solar cells-DSSCs) ile oldukça benzerdir. DSSCs iletken cam, yarı iletken katman, duyarlılığı sağlayan boya, elektrolit çözeltisi ve katalizörden oluşan temel elemanlara sahiptir [31].

BR temelli BSSC'lerde, fotoanod bakteriyorodopsin ile duyarlı hale getirilmiş gözenekli yarı iletken nanoparçacıklardan (çoğunlukla  $TiO_2$  veya  $ZnO$  NP'ler) oluşmaktadır. Görünür bölgede geniş bir absorsiyon aralığına sahip olan BR, güneş ışığını toplayarak uyarılmış bir duruma yükseltmektedir. Ayrıca foto-uyarılmış elektronları yarı iletken iletim bandına (Conductive Band-CB) iletmektedir.  $TiO_2$ 'nin CB'si, BR molekülünün en düşük dolu moleküler orbitalinden daha düşük bir enerji seviyesinde bulunmaktadır. Bu nedenle fotoelektronların BR'den  $TiO_2$ 'ye iletimi enerji olarak uygundur [22]. Elektronlar dış devre üzerinden karşı elektroda hareket ederler.

DSSC'ler ile kıyaslandığında BR temelli BSSC çeşitli avantajlara sahiptir. DSSC'lerin pahalı ve toksik rutenyum kompleksleri içermesi buna karşın BR temelli BSSC'lerin düşük maliyetli, yenilenebilir, çevre dostu ve nonkarsinojenik olması BR temelli BSSC'leri yükselen bir trend haline getirmiştir. Mevcut çalışmalarda, yabancı tip BR gibi yeni biyoduyarlaştırıcı kullanılıyor olması boya temelli duyarlılaştırıcılara iyi bir alternatif elde etme yolunda umut vaat etmektedir.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar iki ana başlık altında toplanmaktadır. Bunlar:

- I. Mevcut mikroorganizmadan bakteriyorodopsin üretimi ve elde edilmesi için yapılan çalışmalar
- II. Bakteriyorodopsin temelli biyomolekül duyarlı güneş hücresi eldesi

Bu bağlamda yapılan çalışmalar başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

#### 3.1. Bakteriyorodopsin Üretimi

##### 3.1.1. Mikroorganizma Eldesi ve Üretimi

Bakteriyorodopsin (BR) üretiminde kullanılan *Halobacterium salinarum* DSM 671 Alman Kültür Koleksiyonu (DSMZ)'dan temin edilmiştir. BR üretiminde kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Çizelge'de bulunan tüm kimyasallar Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. *H.salinarum* DSM 671'den bakteriyorodopsin üretim besiyeri [3]

Kimyasal madde	Miktar g/L
NaCl	250
Yeast ekstrakt	10.0
Kasamino asit	7.5
Na <sub>3</sub> -sitrat	3.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20
KCl	2.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2

*H. salinarum* DSM 671'in üretimi Çizelge 3.1.'de belirtilen besiyeri ile gerçekleştirilmiştir. Bakteriyorodopsin üretimi amacıyla kullanılan aynı besiyeri temel besiyeri olarak kullanılmış ve 40 Watt beyaz ışık aydınlatma sağlanmıştır. Mikroorganizmanın üretimi ve bakteriyorodopsinin temel besiyeri ile üretiminin sağlanması deneylerinde inkübasyon sıcaklığı 37 °C, inkübasyon süresi 7 ve 10 gün ve

çalkalama hızı 150 rpm olacak şekilde ilerlenmiştir. Bakteriyorodopsin üretim koşullarının optimizasyonu için optimum besiyeri içeriğın, inkübasyon süresi ve çalkalama sıcaklığı parametreleri deney tasarımı metodlarından Plackett-Burman deney tasarımı ve Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarımı) aracılığıyla belirlenmiştir.

### **3.1.2. Optimum Deney Koşullarının Deney Tasarımı Metodu İle Belirlenmesi**

#### **3.1.2.1.Plackett-Burman Deney Tasarımı (PBED)**

On faktör ve her bir faktör için iki seviye ile birlikte (+1 ve -1) değerlendirilmiştir. Tüm faktörler ve seviyeler şu şekildedir: yeast ekstrakt (5 ve 20 gL<sup>-1</sup>); Na<sub>3</sub>Citrate (1 ve 6 gL<sup>-1</sup>); KCl (1 ve 4 gL<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (0.03 ve 0.1 gL<sup>-1</sup>); MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (0.1 ve 0.4 gL<sup>-1</sup>); MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (15 ve 60 gL<sup>-1</sup>); Kasaminoasit (3.75 ve 15 gL<sup>-1</sup>); NaCl (125 ve 500 gL<sup>-1</sup>); çalkalama hızı (100 ve 150 rpm) ve sıcaklık (37 ve 39 °C). Ek olarak her deney tasarımı bir -center point- merkez noktası içermektedir [45] (Çizelge 3.2). Deneyler 500 mL hacimli Erlenmeyer'de 100 mL etkili çalışma hacmi (Working Effective Volume (WEV)) olacak şekilde, 10 gün boyunca sürdürülmüştür. Her 24 saatte bir örnek alınarak üreme (OD  $\lambda_{600 \text{ nm}}$ ) ve bakteriyorodopsin üretimi (mg/L) olacak şekilde ölçülmüştür. Design Expert (V9.0) software® (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN USA) deneylerin planlanmasında ve veri analizinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Plackett-Burman Deney Tasarımı ile tasarlanan deney setleri

Deneme sayısı	g <sup>L</sup> <sup>-1</sup>									rpm	°C
	Yeast Ekstrakt	Na-sitrat	KCl	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Kasamino asit	NaCl			
1	20,00	1,00	4,00	0,10	0,10	60,00	15,00	500,00	100	37	
2	5,00	6,00	4,00	0,03	0,40	60,00	15,00	125,00	100	37	
3	5,00	6,00	1,00	0,10	0,40	15,00	15,00	500,00	150	37	
<b>4</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38*</b>	
5	20,00	6,00	4,00	0,03	0,10	15,00	15,00	125,00	150	39	
6	20,00	6,00	1,00	0,10	0,40	60,00	3,75	125,00	100	39	
7	5,00	1,00	1,00	0,03	0,10	15,00	3,75	125,00	100	37	
8	5,00	1,00	4,00	0,03	0,40	60,00	3,75	500,00	150	39	
<b>9</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38*</b>	
<b>10</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38*</b>	
<b>11</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38*</b>	
12	5,00	6,00	4,00	0,10	0,10	15,00	3,75	500,00	100	39	
13	20,00	1,00	1,00	0,03	0,40	15,00	15,00	500,00	100	39	
14	20,00	6,00	1,00	0,03	0,10	60,00	3,75	500,00	150	37	
<b>15</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38*</b>	
16	20,00	1,00	4,00	0,10	0,40	15,00	3,75	125,00	150	37	
<b>17</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38*</b>	
18	5,00	1,00	1,00	0,10	0,10	60,00	15,00	125,00	150	39	

\*koyu deneme setleri merkez noktaları belirtmektedir.

### 3.1.2.2. Yüzey Yanıt Yöntemi- Response Surface Methodology (RSM)

#### 3.1.2.2.1. Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım-CCD) 1

PBED’de önceden seçilmiş olan her bir faktör için optimum konsantrasyonu belirlemek için CCD kullanılmış olup 5 merkez noktası, 8 merkezi olmayan nokta ve 2 eksensel nokta dahil edilerek tasarım oluşturulmuştur. Faktörler ve seviyelerin dahil edildiği CCD değerleri Çizelge 3.3’te verilmiştir. Deneyler 500 mL hacimli Erlenmeyer’de 100 mL etkili çalışma hacmi (Working Effective Volume (WEV)) olacak şekilde, 10 gün boyunca sürdürülmüştür. Her 24 saatte bir örnek alınarak üreme ( $OD_{\lambda 600\text{ nm}}$ ) ve bakteriyorodopsin üretimi (mg/L) optik dansiteye göre ölçülmüştür. Design Expert (V9.0) software® (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN USA) deneylerin planlanmasında ve veri analizinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. CCD-1 değerlerini içeren deney tasarımı

Deneme Sayısı	g <sup>L</sup> <sup>-1</sup>								rpm	°C
	Yeast Extract	Na-sitrat	KCl	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Kasamino asit	NaCl		
1	12,50	1,00	1,00	0,1	0,1	15,00	3,75	87,50	150	39
2	12,50							140,53		
3	12,50							34,47		
4	12,50							87,50		
5	20,00							50,00		
6	12,50							87,50		
7	1,89							87,50		
8	23,11							87,50		
9	12,50							87,50		
10	5,00							50,00		
11	20,00							125,00		
12	12,50							87,50		
13	5,00							125,00		

### 3.1.2.2.2. Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım-CCD) 2

CCD-1’de daha önceden seçilen faktörü geliştirmek ve aynı zamanda yeni bir faktör olarak glukozun (Glukoz  $gL^{-1}$ ) etkisini incelemek için ikinci bir Central Composite Design kullanılmıştır. Bu dizayn CCD-1 verilerini, 5 adet merkez noktasını, 4 adet faktöriyel noktasını ve 4 adet eksensel noktayı içermektedir. Faktörler ve seviyelerinin dahil olduğu CCD’ı Çizelge 3.4.’te verilmiştir. 8 adet faktör istatistiksel verilere göre (PBED’da pozitif veya negatif etkileri ve % katkılarına göre) sabit tutulmuştur. Bir faktör ise CCD-1’den elde edilen sonuçlara göre sabit tutulmuş ve yeni bir faktör (Glukoz  $gL^{-1}$ ) dahil edilmiştir.

Çizelge 3.4. CCD-2 değerlerini içeren deney tasarımı

Deneme sayısı	$gL^{-1}$							NaCl			rpm	$^{\circ}C$	Sıcaklık
	Yeast Extract	Na-sitrat	KCl	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Kazamino asit	$g L^{-1}$	% (w/v)	Glukoz			
1	12.50	1.00	1.00	0.10	0.10	15.00	3.75	212.50	21,25	10.00	150	39	
2								125.00	12,50	0.00			
3								212.50	21,25	10.00			
4								212.50	21,25	24.14			
5								336.24	33,62	10.00			
6								125.00	12,50	20.00			
7								88.76	8,88	10.00			
8								212.50	21,25	10.00			
9								212.50	21,25	10.00			
10								212.50	21,25	10.00			
11								212.50	21,25	0.00			
12								300.00	30,00	0.00			
13								300.00	30,00	20.00			

Tüm deneyler için etkili çalışma hacmi (WEV) 500 mL hacimli erlenmeyer’de 100 mL besiyeri olacak şekilde ayarlanmıştır. 10 gün boyunca tüm deneme setlerindeki deneyler sürdürülmüştür. Her bir deneme seti için her 24 saatte bir örnek alınarak üreme ( $OD_{\lambda 600}$

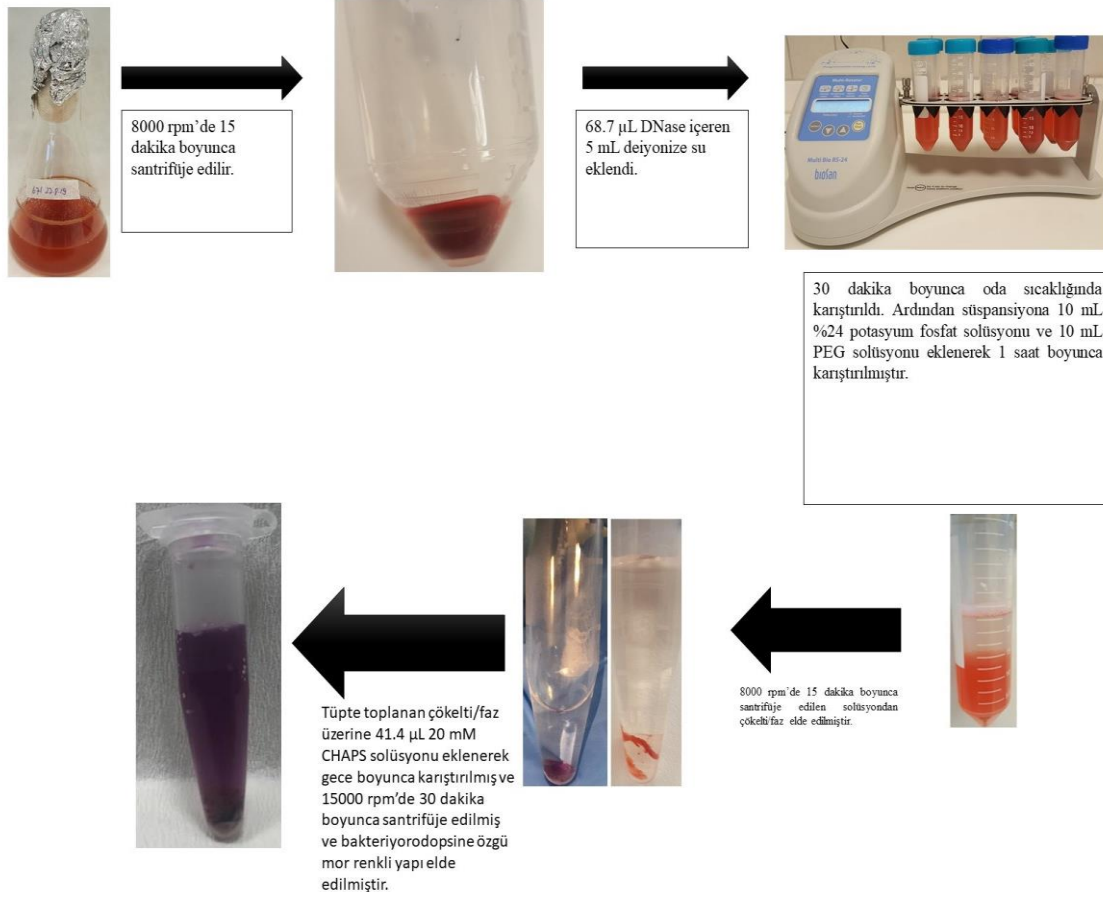
nm) ve bakteriyorodopsin konsantrasyonu ( $\text{mgL}^{-1}$ ) ölçülmüştür. Design Expert (V9.0) software® (Stat- Ease, Inc. Minneapolis, MN USA) deneylerin planlanmasında ve veri analizinde kullanılmıştır.

### 3.1.3 Bakteriyorodopsinin Saflaştırılması

Kısım 3.1.2’de belirtilen deney tasarım aşamalarının her biri için BR saflaştırma basamağı gerçekleştirilmiş ve tüm deneylerde aynı yöntem kullanılmıştır [46]. Shiu ve arkadaşlarının kullandığı bu yöntem çeşitli modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. İlk aşamada 100 mL *H. salinarum* kültürü 8000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüje edilmiştir. Elde edilen pellet içerisinde 68.7  $\mu\text{L}$  DNase (2000U/mL, NEB) enzimi içeren 5 mL deiyonize su ile süspanse edilmiştir. Dikey tüp karıştırıcıda ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Bu sürenin ardından süspansiyona, 10 mL %24 (w/w) pH:8 potasyum fosfat solüsyonu ve 10 mL %24 (w/w) PEG (Poli Etilen Glikol) 8000 solüsyonu eklenerek 1 saat boyunca karıştırılmaya devam edilmiştir. Ayırma fazının zenginleşmesi için mevcut karışım 8000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. PEG-zengin üst faz ile Fosfat zengin alt faz arasında bir bant oluşumu gözlenmiştir. Oluşan bu bant pipet yardımıyla toplanarak bir araya getirilmiştir. Çalışmamızda ayrıca mor bantı elde etmek için Shiu ve arkadaşlarının da önerdiği diğer bir yöntem de kullanılmıştır. 1 saat boyunca dikey tüp karıştırıcıda 1 saat boyunca karışan içerik 24000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Mor çökelti deiyonize su ile yıkanmıştır. Bu işlem iki kez daha tekrarlandıktan sonra elde edilen mor çökelti toplanmıştır. Bu aşamalar ile saflaştırılmış BR yapısı elde edilmeye çalışılmıştır. Son aşama olarak BR yapısının lipidlerinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için elde edilen mor çökelti 10 mL deiyonize su ile resüspanse edilmiştir. 0.6 mL BR solüsyonuna 41.4  $\mu\text{L}$  20 mM CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate) solüsyonu eklenerek gece boyunca oda sıcaklığında yavaş bir şekilde karıştırılmıştır.

Lipitleri uzaklaştırılmış BR 15000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüjlenerek toplanmıştır. Güneş Hücresi çalışmaları için +4  $^{\circ}\text{C}$ ’de muhafaz edilmiştir. Saflaştırma işleminin tüm basamakları şematik olarak şekil 3.1.’de verilmiştir.

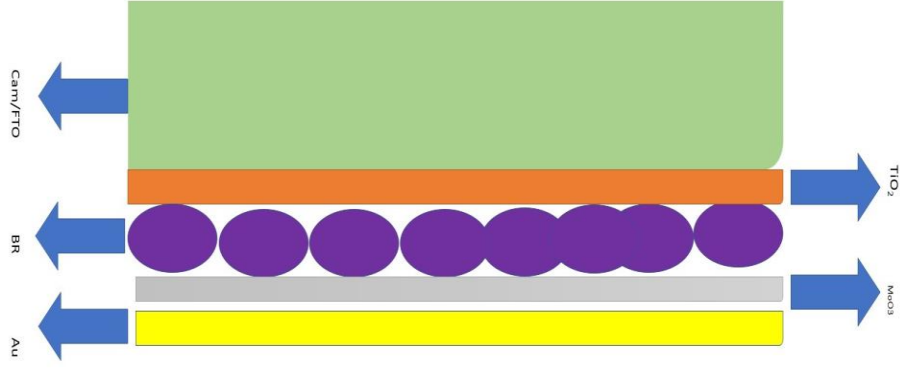




Şekil 3.1. Bakteriyorodopsinin sulu ikili faz sistemi ile saflaştırılması

### 3.2. Bakteriyorodopsin Temelli Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücresi Eldesi (BR-BSSC)

Bu çalışmada, hazır olarak temin edilen %85 optik geçirgenliğe sahip flor katkılı kalay oksit (FTO) kaplı cam alttaşlar kullanılmıştır. Cam/FTO/TiO<sub>2</sub>/BR/MoO<sub>3</sub>/Au ve Cam/FTO/ZnO/BR/MoO<sub>3</sub>/Au yapısına sahip iki adet BR-BSSC güneş hücresi numunesi üretilmiştir (Şekil 3.2.). Bu kapsamda yapılan deney alt aşamaları şu şekildedir.



Şekil 3.2. Üretilen güneş hücresinin şematik çizimi

### 3.2.1. Altaşların Temizliği

Üretimi gerçekleştirilecek olan güneş hücrelerinin kaplaması yapılmadan önce Cam/FTO altaşların, organik ve inorganik kirliliklerden arındırılması gerekmektedir. Cam/FTO altaşların temizleme işleminde öncelikli olarak deterjanlı saf suda (DI-H<sub>2</sub>O) ultrasonik ortamda 3 dakika bekletildi. Sonra saf su ile durulandı ve 5 dakika saf suda ultrasonik ortamda tutuldu. Bu altaşlar ultrasonik banyoda herbiri farklı beherin içerisine yerleştirilerek 5 dakika saf aseton ve 5 dakika boyunca saf izopropil alkol ile temizlendi. Tekrar saf su ile iyice durulandı. En son olarak yüksek saflıktaki azot (N<sub>2</sub>) gazı ile kurutuldu.

### 3.2.2. Metal Oksit Tabakasının Kaplanması

Cam/FTO altaşların temizlenmesi sonrası metal oksit tabakasının kaplaması aşamasına geçildi. Bu işlemde altaşlar üzerine TiO<sub>2</sub> ve ZnO metal oksit kaplamalar gerçekleştirildi. Altaşlar üzerine kaplamalar Gazi Üniversitesi Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Nanovak NVT500 Saçtırmalı (Sputtering) sistemi kullanılarak kaplandı (Şekil 3.3.). Temizlenmiş FTO kaplı cam altaşlar (Cam/FTO) saçtırma cihazının yükleme odasına yüklendi ve sistem vakuma alındı. Yüksek saflıkta TiO<sub>2</sub> (%99.999) hedeften 50 nm civarında bir kalınlıkta kaplandı.

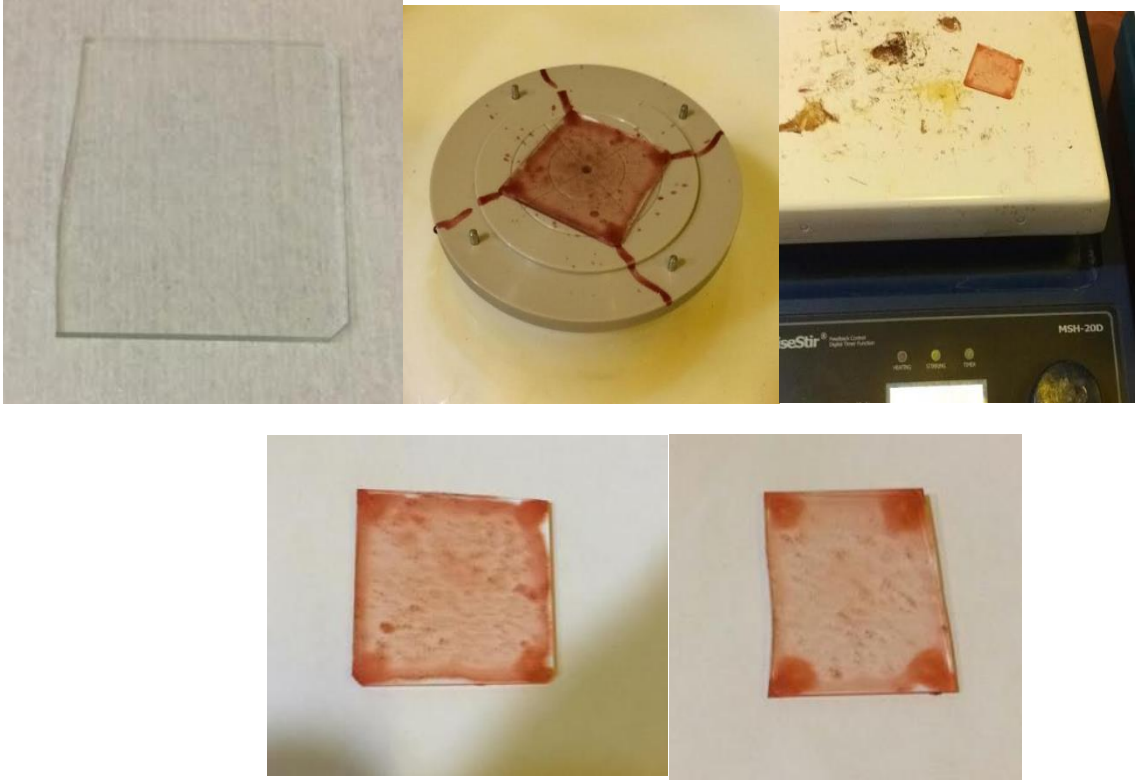
Elde edilen Cam/FTO/TiO<sub>2</sub> numune 250 °C sıcaklıkta ısıtılma tabi tutuldu. Aynı işlemler, yüksek saflıktaki ZnO (%99.999) hedef kullanılarak Cam/FTO/ZnO numuneleri için de uygulandı.



Şekil 3.3. Sputtering (Saçtırma) cihazı

### 3.2.3. Aktif Tabakanın Kaplanması

Metal oksit kaplaması gerçekleşen Cam/FTO/TiO<sub>2</sub> ve Cam/FTO/ZnO numunelerinin üzerine dönel kaplama cihazı (spin coating) yardımı ile hazırlanan BR çözeltisi kaplandı. Kaplama yapılan her bir örnek için 80 mg/mL BR içeren çözelti kullanıldı. Suss Microtec 6 RC marka dönel kaplama sisteminde (Suss Microtec 6 RC spin coater system) yapılan kaplamalarda en iyi optimize olan parametreler ve bu parametreler göz önünde bulundurularak malzemeler üzerine kaplamalar gerçekleştirildi. Numuneler ilk olarak 500 rpm hız 40 saniye süre ve sonra 750 rpm hız 9 saniye sürede döndürülerek BR tabakası ile kaplandı. BR tabakasının kuruması için numuneler ısıtılabilir tabla (hot plate) üzerinde 100 °C sıcaklığında 2 dakika bekletildi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Cam/FTO alttaş yapısına BR tabakasının kaplanması

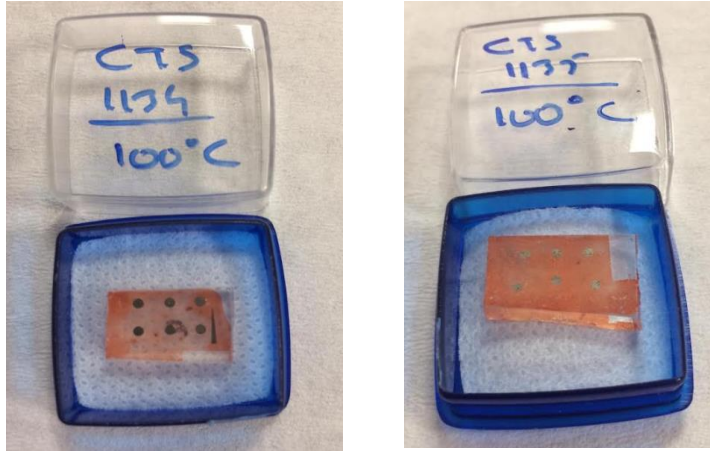
### 3.2.4. Metal Kontak Kaplama İşlemi

Cam/FTO/TiO<sub>2</sub>/BR ve Cam/FTO/ZnO/BR yapılarına metal dot kontaktları oluşturabilmek için uygun metal maskeler kullanıldı. Cam/FTO/TiO<sub>2</sub>/BR/MoO<sub>3</sub>/Au ve Cam/FTO/ZnO/BR/MoO<sub>3</sub>/Au yapısını elde etmek için üretilen numuneler BesTec marka termal buharlaştırıcı sistemi (BesTec thermal evaporation system-Şekil 3.5.) içerisine yerleştirildi ve vakuma alındı.



Şekil 3.5. Termal buharlaştırma sistemi

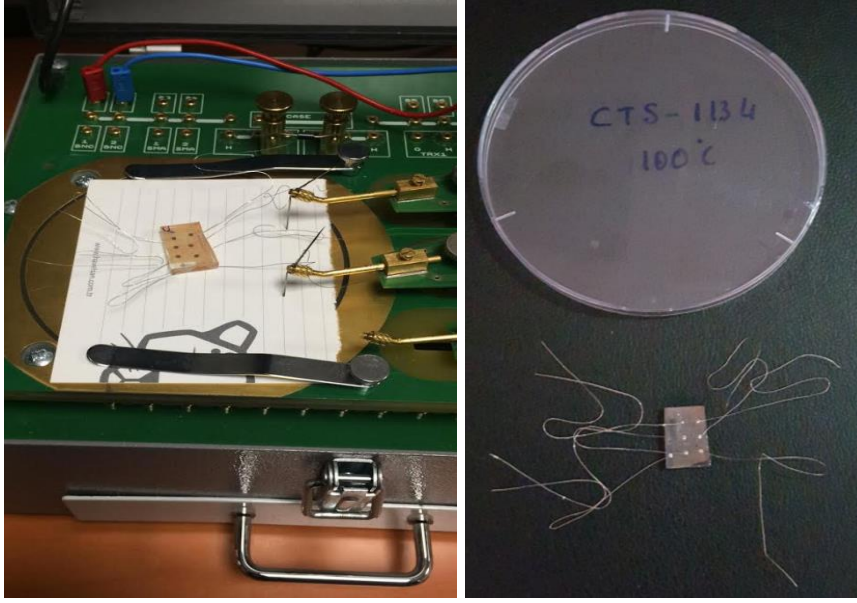
Birinci aşamada, BR katmanı üzerine  $10^{-6}$  mbar başlangıç basıncında, oda sıcaklığında elektron bloke edici ve hole taşıyıcı tabaka olarak 20 nm kalınlığında  $\text{MoO}_3$  tabakası kaplandı. Sonrasında aynı vakum çemberi içerisinde üst metal kontakt olarak kullanılmak için 150 nm kalınlığında Altın (Au) tabakası kaplandı. Bu proses ile iki adet BR-BSSC güneş hücre yapısı Şekil 3.6’te verildiği gibi elde edildi.



Şekil 3.6. Metal kontaktları oluşturulmuş BR-BSSC güneş hücreleri

Metalizasyon işlemi tamamlanan hücrelerin elektriksel ölçüm işlemlerini gerçekleştirebilmek için gümüş (Ag) pasta yardımıyla tel bağlantıları gerçekleştirildi.

Tel bağlantısı gerçekleştirilen ve solar simülasyon altında ölçüme hazır güneş hücresi Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7. Tel bağlantıları yapılmış elektriksel ölçüme hazır BR-BSSC güneş hücresi ve Güneş Simülatörü

### 3.3. BR Temelli Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücrelerinin Elektriksel Ölçümü

Üretilen Cam/FTO/TiO<sub>2</sub>/BR/MoO<sub>3</sub>/Au ve Cam/FTO/ZnO/BR/MoO<sub>3</sub>/Au güneş hücrelerinin elektriksel çıktı parametreleri Newport Oriel-Sol1A güneş simülatöründen AM 1.5G (1 Güneş değeri, 0,1 W/cm<sup>2</sup>) aydınlatması altında Keithley 4200 kaynak cihazlı bir I – V ölçüm sistemi kullanılarak belirlendi.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan bu çalışmada yapılan deneylerin sonuçları iki ana başlık altında toplanmıştır.

Bunlar:

- I. Mevcut mikroorganizmadan bakteriyorodopsin üretimi ve elde edilmesi için yapılan çalışmalara ait veriler
- II. Bakteriyorodopsin temelli biyomolekül duyarlı güneş hücresi eldesi amacıyla yapılan çalışmalara ait ölçüm, verim yüzdesi ve karakterizasyon çalışmalarına ait veriler

Bu ana başlıklar altında elde edilen veriler aşağıda belirtilmiştir.

### 4.1. Bakteriyorodopsin Üretimi

#### 4.1.1. *Halobacterium salinarum* DSM 671 Üretimi

*H. salinarum* DSM 671 Çizelge 3.1.'de verilen temel besiyeri ile ve bölüm 3.1.1'de belirtilen koşullarda altında üretilmiştir. Pembe-Kırmızımsı renge yakın üreme gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.).

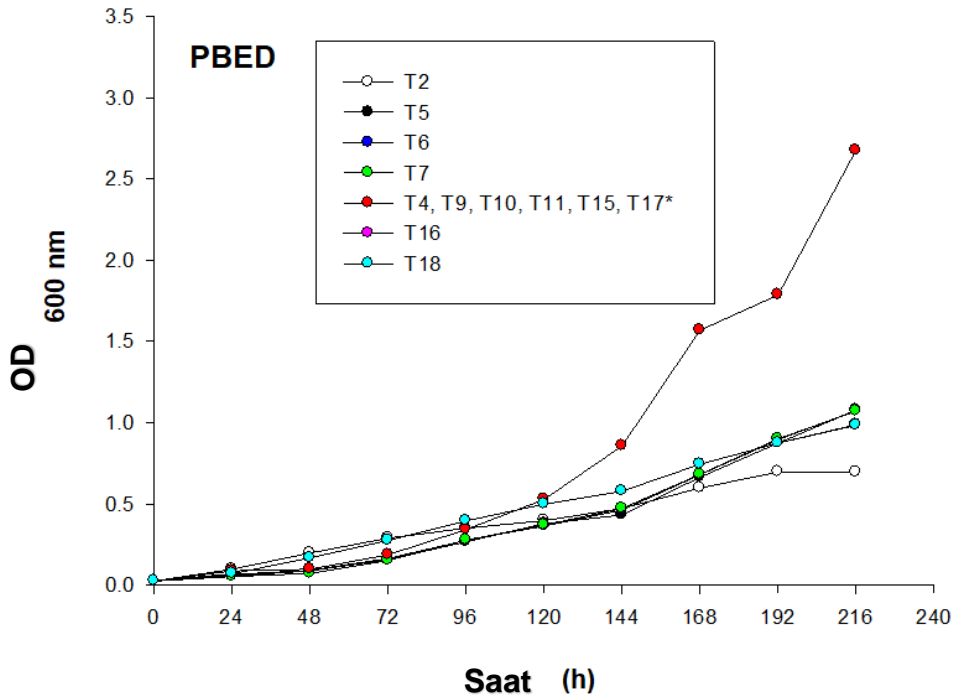


Şekil 4.1. *H.salinarum* DSM 671'in temel besiyerinde üreme görünümü

## 4.1.2. Optimum Deney Koşullarının Deney Tasarımı Metodu İle Belirlenmesi

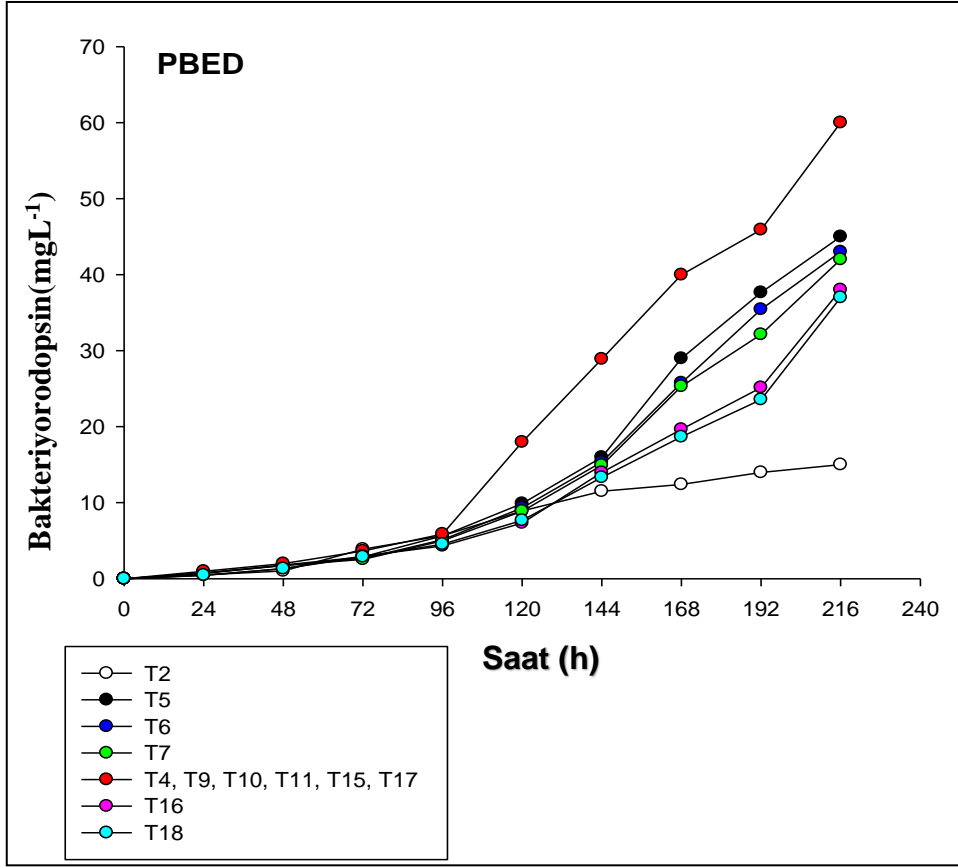
### 4.1.2.1. Plackett-Burman Deney Tasarımı (PBED) ile Elde Edilen Sonuçlar ve Değerlendirilmesi

Bölüm 3.1.2.1’de belirtilen on adet faktörün *H. salinarum* DSM 671’in üremesi ve bakteriyorodopsin üretimi üzerine temel etkilerini araştırmak üzere PBED uygulanmıştır. PBED uygulanırken kullanılan besiyeri içeriğinde yapılan değişiklikler *H. salinarum* DSM 671 üretimi için kullanılan temel besiyerinin içeriği üzerinden gerçekleştirilmiştir. Uygulamaların çoğunluğu (T5, T6, T7, T16 ve T18) hem üreme hem de bakteriyorodopsin üretimi için benzer davranışlar göstermektedir. Ancak faktörlerin merkez noktaları, mikroorganizma üremesi ve bakteriyorodopsin üretimi için en yüksek sonuçları (T4, T9, T10, T11, T15 ve T17) göstermiştir (n=6 SD=0) (Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.). Elde edilen bakteriyorodopsin miktarı (mg/L) ve üreme miktarının ölçüm sonuçları ( $OD_{\lambda 600\text{ nm}}$ ) Çizelge 4.3.’ de verilmiştir.



Şekil.4.2. *H. salinarum* DSM 671’in uygulanan deney setlerinde üreme eğrileri





Şekil 4.3. Deney setlerinde bakteriyorodopsin üretim miktarları

Uygulanan içeriklerden T1,T3,T8,T12,T13 ve T14'de mikroorganizma üremesi gerçekleşmemiştir.Şekil 4.2. ve 4.3.'de toplam 216 saat boyunca mikroorganizmanın üreme ve bakteriyorodopsin üretim miktarları görülmektedir. Beklenildiği üzere bakteriyorodopsin üretiminin bakteri üremesi ile paralel gittiği görülmektedir.

PDEB sonuçları için düzeltilmemiş eğrilik modeli istatistiksel analizde (ANOVA) kullanılmış olup Çizelge 4.1.' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. PBED için istatistiksel analiz sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Mean Square	F Değeri	p-değeri
					Prob > F
Model	4033,33	1,00	4033,33	8,54	<b>0,010</b>
H-NaCl	4033,33	1,00	4033,33	8,54	<b>0,010</b>
Residual	7553,78	16,00	472,11		
Lack of Fit	7553,78	11,00	686,71		
Pure Error	0,00	5,00	0,00		
Cor Total	11587,11	17,00			
R-Squared					0,3481
Adj R-Squared					0,3073
Pred R-Squared					0,2117
Adeq Precision					5,0626

Eğriliğe göre ayarlanmamış bir model uygulandıktan sonra farklı faktörlerin bakteriyorodopsin üretimi üzerindeki etkisi Çizelge 4.2.'te gösterilmektedir. Bakteriyorodopsin üretimini temsil eden polinom denklemi (Denklem I) şu şekildedir:

$$\text{Bakteriyorodopsin} = 62,77777778 - 0,0977777778 * \text{NaCl}$$

Gerçek faktörler cinsinden denklem I, her bir faktörün verilen seviyeleri için tepki hakkında tahminlerde bulunmak için kullanılabilir. Burada, seviyeler her bir faktör için orijinal birimlerde belirtilmelidir. Bu denklem her faktörün göreceli etkisini belirlemek için kullanılmamalıdır çünkü katsayılar her faktörün birimlerini içerecek şekilde ölçeklendirilir ve kesişme tasarım alanının merkezinde değildir.

Faktörlerin cevap çeşitliliği (bakteriyorodopsin için  $\text{mgL}^{-1}$ ) ve faydasının grafiksel olarak analizi (Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.) en az iki besiyeri içeriğinin sonuçlarının oldukça benzer değerlere (tahmini bakteriyorodopsin miktarı  $50 \text{ mgL}^{-1}$ ) sahip olduğunu göstermiştir. Bu besiyeri içeriklerinin hepsi  $5 \text{ gL}^{-1}$  yeast ektrat ve  $125 \text{ gL}^{-1}$  NaCl ya da  $20 \text{ gL}^{-1}$  yeast ekstrakt ve  $125 \text{ gL}^{-1}$  NaCl şeklindedir (Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2. Farklı faktörlerin bakteriorodopsin üretimi üzerine etkileri

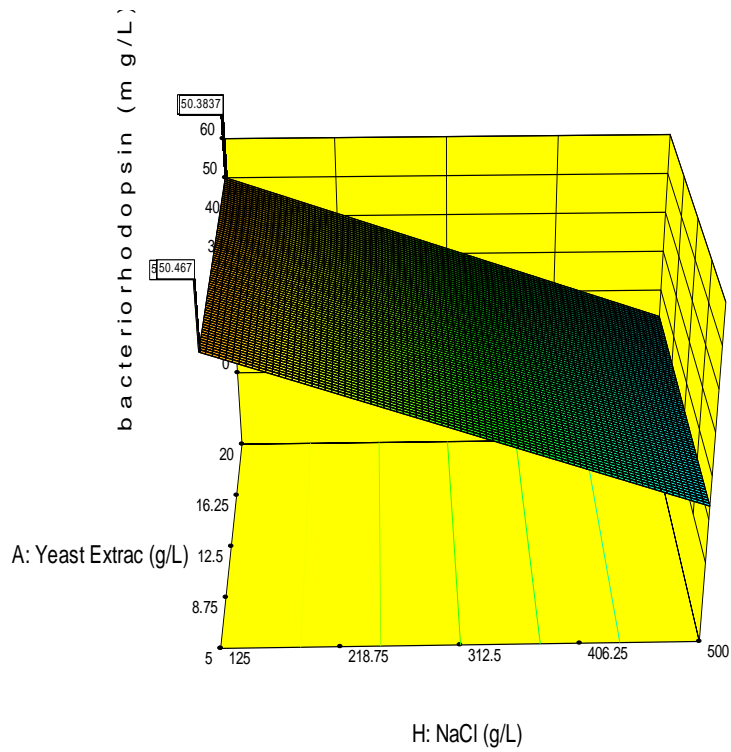
Faktör	Stdized Effect	Karelerin Toplamı	% Katkı
A-Yeast Extract	5,3	85,33	0,74
B-Sodium Citrate	-2,3	16,33	0,14
C-KCl	-4,0	48,00	0,42
D-FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,7	21,33	0,18
E-MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	-4,7	65,33	0,57
F-MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	-5,0	75,00	0,65
G-Kazamino asit	-4,3	56,33	0,49
<b>H-NaCl</b>	<b>-36,7</b>	<b>4033,33</b>	<b>34,95</b>
J-r.p.m.	3,3	33,33	0,29
K-Temp.	5,0	75,00	0,65

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
bacteriorhodopsin (mg/L)

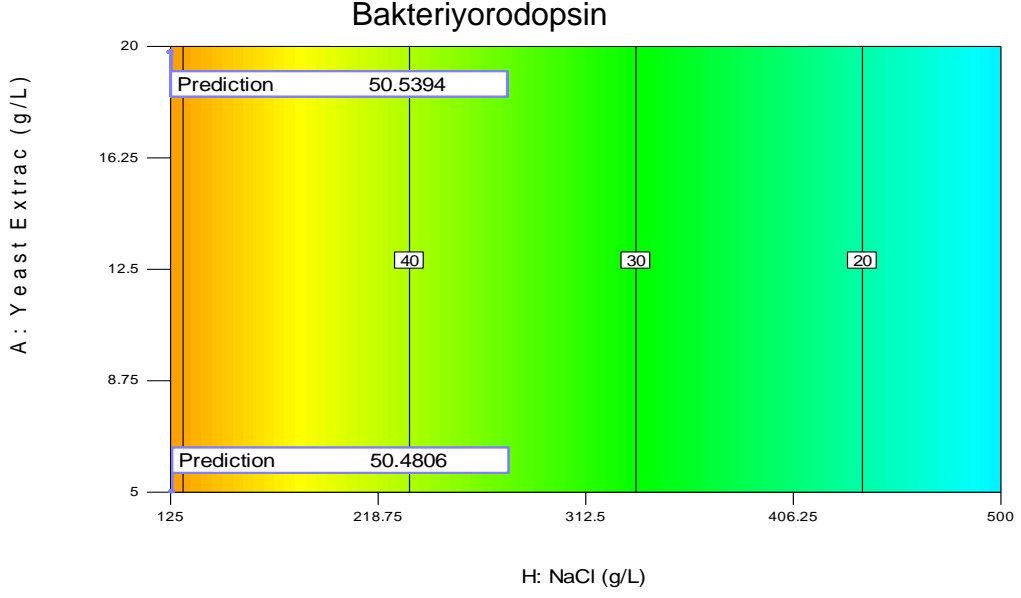


X1 = H: NaCl  
X2 = A: Yeast Extrac

Actual Factors  
B: Sodium Citrate = 1.00008  
C: KCl = 1  
D: FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O = 0.028328  
E: MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O = 0.124363  
F: MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O = 15.0179  
G: Casaminoacids = 3.81403  
J: rpm = 148.782  
K: Temp = 39



Şekil 4.4. Elde edilen bakteriorodopsin miktarının yüzey grafiği (mgL<sup>-1</sup>)



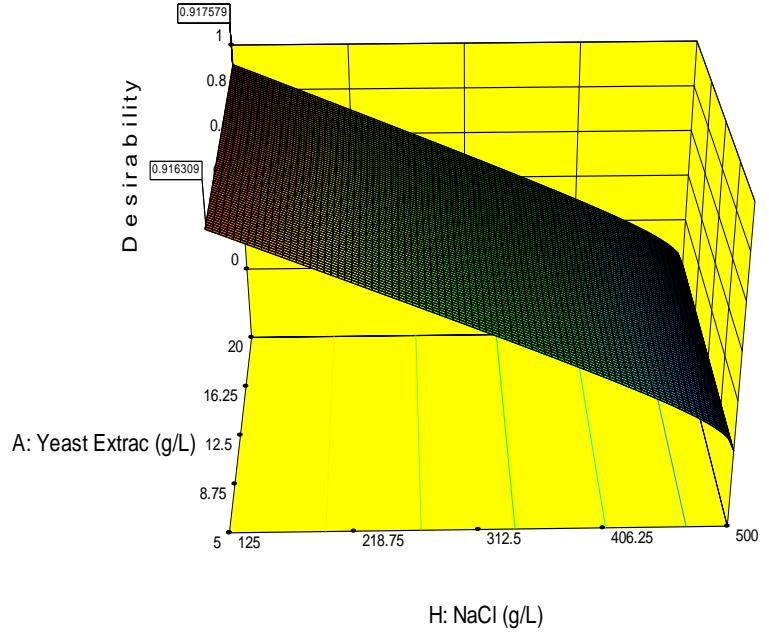
Şekil 4.5. Elde edilen bakteriyorodopsin miktarının Kontur grafiği ( $\text{mgL}^{-1}$ )

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Desirability

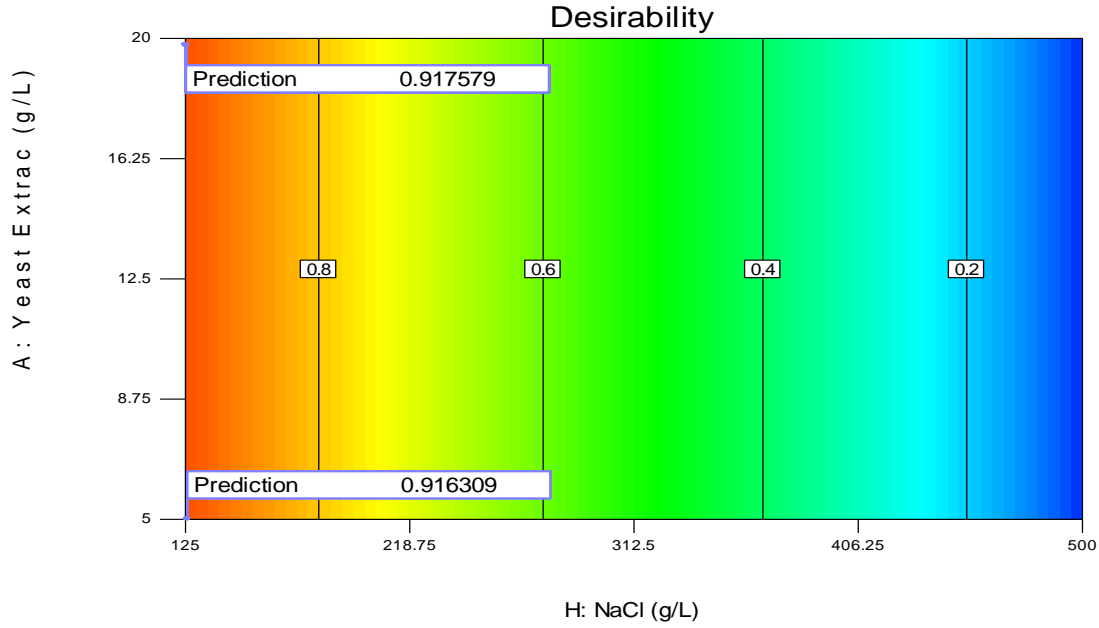
1  
0

X1 = H: NaCl  
 X2 = A: Yeast Extract

Actual Factors  
 B: Sodium Citrate = 1.00008  
 C: KCl = 1  
 D:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 0.028328  
 E:  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 0.124363  
 F:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 15.0179  
 G: Casaminoacids = 3.61404  
 J: rpm = 148,782  
 K: Temp = 39



Şekil 4.6. Bakteriyorodopsin üretimine faktörlerin faydasının yüzey grafiği



Şekil 4.7. Bakteriyorodopsin üretimine faktörlerin faydasının kontur grafiği

ANOVA iki şekilde sunulmaktadır: regresyon modelinden ayrılmış (ayarlanmış) merkez nokta bilgisi (eğrilik) ve regresyon modeline dahil edilen merkez noktaları (düzeltilmemiş). Eğrilik önemliyse, kuadratik terimleri tahmin edebilecek çalışmalar eklemek için tasarım araçları aracılığıyla tasarımın artırılması gerekmektedir. Öte yandan, eğer eğrilik önemli değilse, ayarlanmış ve düzeltilmemiş modeller benzer olacaktır ve (modelin önemli olduğunu ve uyum eksikliğinin önemsiz olduğunu varsayarak) tahmin için kullanılabilir. Çalışmamızda, eğriliğin anlamlı olduğu düşünüldüğünde düzeltilmemiş modeli seçilmiştir. (Çizelge 4.3); bu modelde katsayılar tüm veriler kullanılarak uygun (merkez noktaları dahil) tahminleri merkez noktası bilgisine göre daha yüksek veya daha düşük bir sapma göstereceği beklenmekteydi.

Çizelge 4.3. Deneme sayılarına göre beklenen ve elde edilen bakteriyorodopsin miktarı (mgL-1)

Tasarım Noktaları	Deneme Sayısı	g <sup>L</sup> -1									rpm	°C	Bakteriyorodopsin (mg/L)	
		Yeast Ekstra-ct	Na-sitrat	KCl	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Kazam ino asit	NaCl	Gözlenen			Beklenen	
													216 h	
Faktöriyel	1	20,00	1,00	4,00	0,10	0,10	60,00	15,00	500,00	100	37	0,000	13,8889	
Faktöriyel	2	5,00	6,00	4,00	0,03	0,40	60,00	15,00	125,00	100	37	15,000	50,5556	
Faktöriyel	3	5,00	6,00	1,00	0,10	0,40	15,00	15,00	500,00	150	37	0,000	13,8889	
<b>Merkez noktası</b>	<b>4</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38</b>	<b>60,000</b>	<b>32,22</b>	
Faktöriyel **	5	20,00	6,00	4,00	0,03	0,10	15,00	15,00	125,00	150	39	45,000	50,5556	
Faktöriyel **	6	20,00	6,00	1,00	0,10	0,40	60,00	3,75	125,00	100	39	43,000	50,5556	
Faktöriyel **	7	5,00	1,00	1,00	0,03	0,10	15,00	3,75	125,00	100	37	42,000	50,5556	
Faktöriyel	8	5,00	1,00	4,00	0,03	0,40	60,00	3,75	500,00	150	39	0,000	13,8889	
<b>Merkez noktası</b>	<b>9</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38</b>	<b>60,000</b>	<b>32,22</b>	
<b>Merkez noktası</b>	<b>10</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38</b>	<b>60,000</b>	<b>32,22</b>	
<b>Merkez noktası</b>	<b>11</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38</b>	<b>60,000</b>	<b>32,22</b>	
Faktöriyel	12	5,00	6,00	4,00	0,10	0,10	15,00	3,75	500,00	100	39	0,000	13,8889	
Faktöriyel	13	20,00	1,00	1,00	0,03	0,40	15,00	15,00	500,00	100	39	0,000	13,8889	
Faktöriyel	14	20,00	6,00	1,00	0,03	0,10	60,00	3,75	500,00	150	37	0,000	13,8889	
<b>Merkez noktası</b>	<b>15</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38</b>	<b>60,000</b>	<b>32,22</b>	
Faktöriyel **	16	20,00	1,00	4,00	0,10	0,40	15,00	3,75	125,00	150	37	38,000	50,5556	
<b>Merkez noktası</b>	<b>17</b>	<b>12,50</b>	<b>3,50</b>	<b>2,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>37,50</b>	<b>9,38</b>	<b>312,50</b>	<b>125</b>	<b>38</b>	<b>60,000</b>	<b>32,22</b>	
Faktöriyel **	18	5,00	1,00	1,00	0,10	0,10	60,00	15,00	125,00	150	39	37,000	50,5556	

Çizelge 4.2.'de görülen 8.54 Model F değerine göre, bu modelin önemli olduğu anlaşılmaktadır ve bu programa göre bu büyüklükteki F değerinin hata kaynaklı olma olasılığı sadece% 1,00 olarak belirtilmektedir.

0.0500'den düşük "Prob> F" değerleri ise model terimlerinin önemli olduğunu gösterir. Bu durumda H (NaCl) parametresi önemli bir model terimidir. Regresyon katsayılarının düşük değerleri yerine, 0.2117'nin "Pred R-Squared" değeri 0.3073'teki "Adj R-Squared" ile makul bir uyum içindedir, çünkü fark 0.2'den azdır. Diğer taraftan "Adeğ Precision" oranı 5.063 olup yeterli sinyali gösterir, çünkü arzu edilen 4'ten büyük olmasıdır, yani bu model tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir.

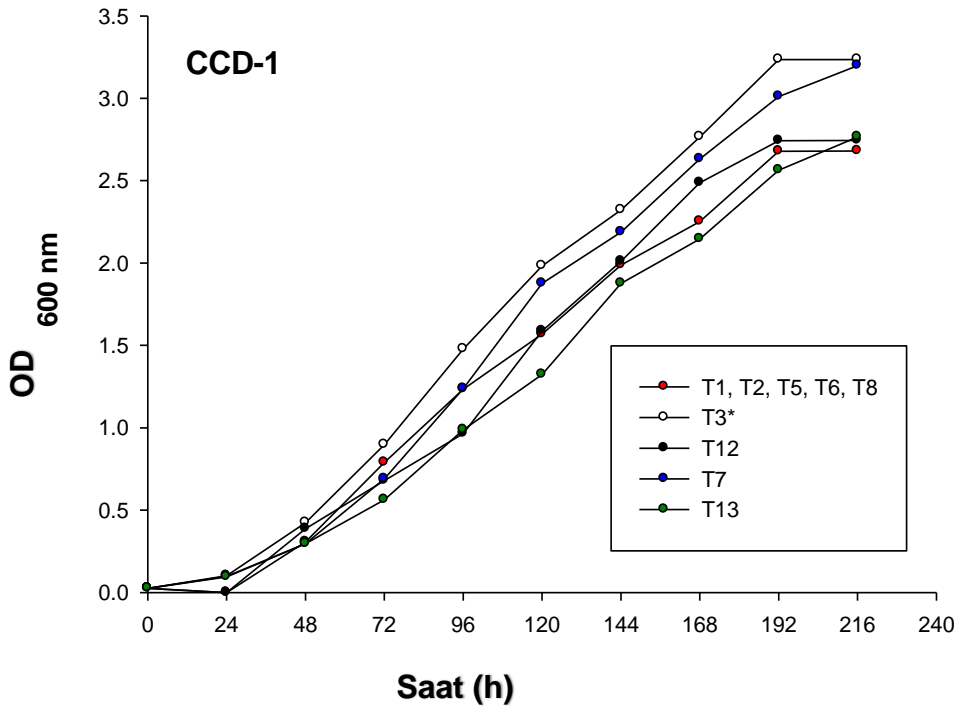
Çizelge 4.2.'de, faktörlerin cevap değişkeni (bakteriyodopsin konsantrasyonu ( $\text{mgL}^{-1}$ ) üzerinde olumlu veya olumsuz etkisini gösterir; bu sonuçların analizi A, J ve K faktörlerinin pozitif etkili olduğunu göstermektedir. Bu durum da daha yüksek faktör değerinin çalışılabileceği anlamına gelmektedir. Ancak katkı faktörleri J ve K'nin düşük katkı yüzdesinin olması nedeniyle, bir sonraki istatistiksel aşamada PBED'in +1 konsantrasyonunda devam edildi. Faktör A'nın katkı payı düşüktür, ancak şekil 4.4. ve şekil 4.5.'de görüldüğü üzere yeast ekstraktın birkaç kombinasyonunun  $125 \text{ gL}^{-1}$  NaCl ile yüksek bir bakteriyodopsin konsantrasyonunu ( $\text{mgL}^{-1}$ ) göstermektedir. Bu nedenle bu faktör bir sonraki istatistiksel adımda incelenmiştir.

B, C, D, E, F, G ve H faktörlerinin bakteriyodopsin üretimi ( $\text{mgL}^{-1}$ ) üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu çizelge 4.2.'de gösterilmektedir. Bu nedenle katkı yüzdelерinin düşük olduğu göz önüne alınarak faktör H hariç hepsinin PBED -1 konsantrasyonu ile devam edilmiştir. Faktör H-NaCl'ın, bakteriyodopsin üretimi ( $\text{mgL}^{-1}$ ) üzerindeki katkı yüzdesi ve olumsuz etkisinin yüksek olması nedeniyle bir sonraki istatistik tasarımında incelenmesi zorunluluğu doğmuştur.

Tüm bu analizler göz önünde bulundurularak, iki faktörün konsantrasyonunu değiştirerek (yeast ekstrakt ve NaCl), bakteriyodopsin ( $\text{mgL}^{-1}$ ) üretimi için kültür ortamının bileşimini optimize etmek adına Merkezi Kompozit Tasarıma- Central Composite Design (CCD) geçilmiştir.

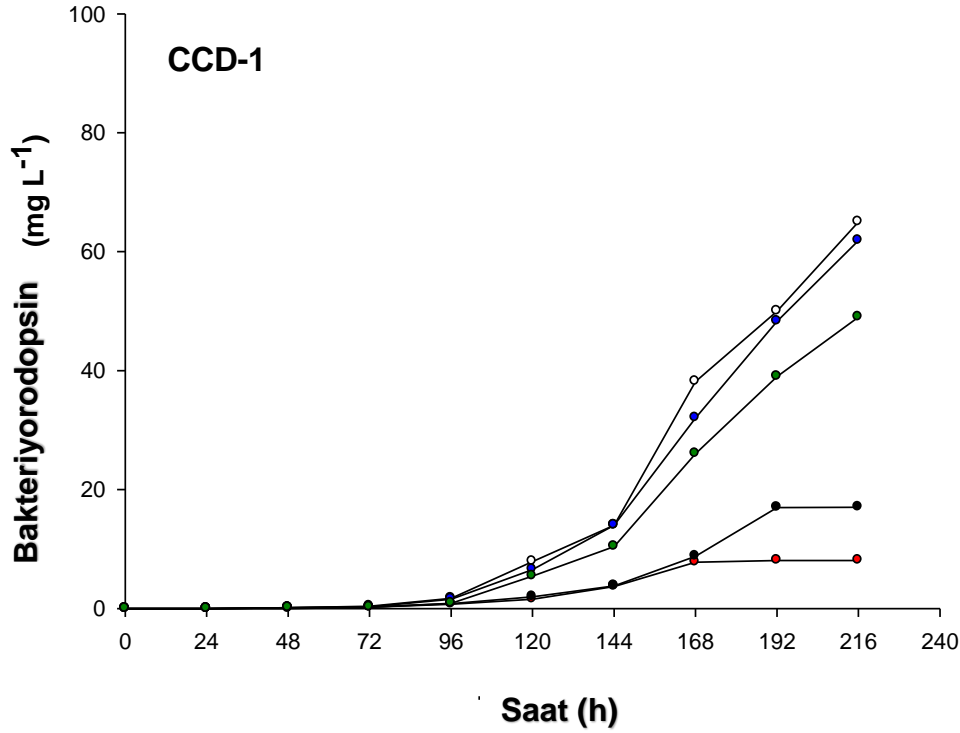
#### 4.1.2.2. Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım-CCD)-1 ile Elde Edilen Sonuçlar ve Değerlendirilmesi

CCD-1'de iki faktör (yeast ekstrakt ve NaCl) için bölüm 3.1.2.2.1'de ve çizelge 3.3.'te verilen içerikler uygulanmıştır. CCD-1-T4, CCD-1-T9, CCD-1-T10 ve CCD-1-T11 uygulama setlerinde herhangi bir üreme gözlenmemiştir. Bunların dışındaki tüm uygulama setlerinde üreme davranışı ( $OD_{\lambda 600 \text{ nm}}$ ) ve bakteriyorodopsin üretim miktarı paralel şekilde ilerlemektedir (Şekil 4.8.). Mikroorganizma üremesi gözlemlenen uygulama setleri içerisinde CCD-1-T3 ve CCD-1-T7 bakteriyorodopsin üretim miktarları (sırasıyla  $65.0 \text{ mgL}^{-1}$  ve  $61.8 \text{ mgL}^{-1}$ ) ile farklılık göstermektedir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. *H. salinarum* DSM 671'in uygulanan deney setlerinde üreme eğrileri





Şekil 4.9. Deney setlerinde bakteriorodopsin üretim miktarları ( $\text{mgL}^{-1}$ )

Çizelge 4.4.'te bakteriorodopsin üretimi için quadrik model kullanılarak yapılan istatistiksel analiz (ANOVA) sonuçları görülmektedir. Çizelgede önemli faktör ve modeller koyu renkle yazılmıştır. Aşağıda verilen polinomial denklem bakteriorodopsin üretimini temsil etmektedir.

Denklem II:

$$\begin{aligned}
 \text{Bakteriorodopsin} = & \\
 & +35.58697 \\
 & -1.27724 * \text{Yeast Extract} \\
 & -1.20971 * \text{NaCl} \\
 & +0.011440 * \text{Yeast Extract} * \text{NaCl} \\
 & +0.035667 * \text{Yeast Extract}^2 \\
 & +9.95822\text{E-}003 * \text{NaCl}^2
 \end{aligned}$$

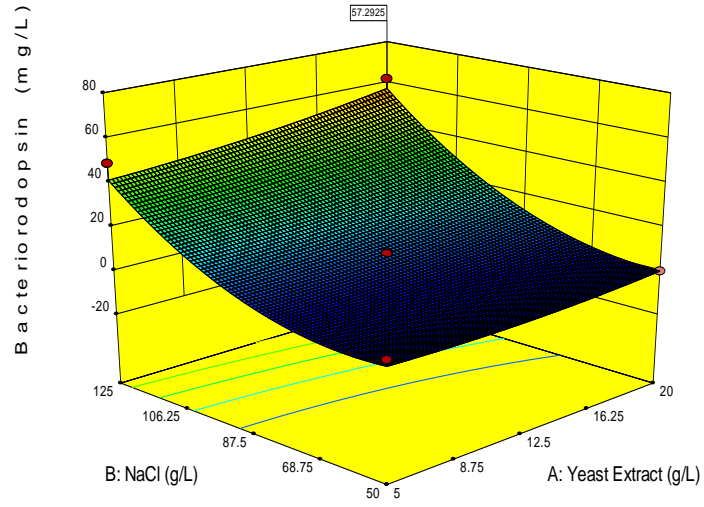
Gerçek faktörler yönünden denklem II, her bir faktörün verilen seviyeleri için cevap hakkında tahminlerde bulunmak adına kullanılabilir. Burada, seviyeler her bir faktör için orijinal birimlerde belirtilmelidir. Bu denklem her faktörün göreceli etkisini belirlemek için kullanılmamalıdır çünkü katsayılar her faktörün birimlerini içerecek şekilde ölçeklendirilir ve kesişme tasarım alanının merkezinde değildir.

Çizelge 4.4. CCD-1 için istatistiksel analiz sonuçları

Kaynak	Karelerin toplamı	df	Mean Square	F değeri	p-değeri
					Prob > F
Model	6716.96	5	1343.391	57.123	<b>0.000</b>
A-Yeast Extract	170.44	1	170.439	7.247	<b>0.031</b>
B-NaCl	5140.67	1	5140.670	218.590	<b>0.000</b>
AB	41.41	1	41.409	1.761	0.226
A <sup>2</sup>	28.00	1	28.000	1.191	0.311
B <sup>2</sup>	1364.21	1	1364.209	58.008	<b>0.000</b>
Residual	164.62	7	23.517		
Lack of Fit	164.62	3	54.874		
Pure Error	0.00	4	0.000		
Cor Total	6881.58	12			
R-Squared					0.9761
Adj R-Squared					0.9590
Pred R-Squared					0.8299
Adeq Precision					22.642

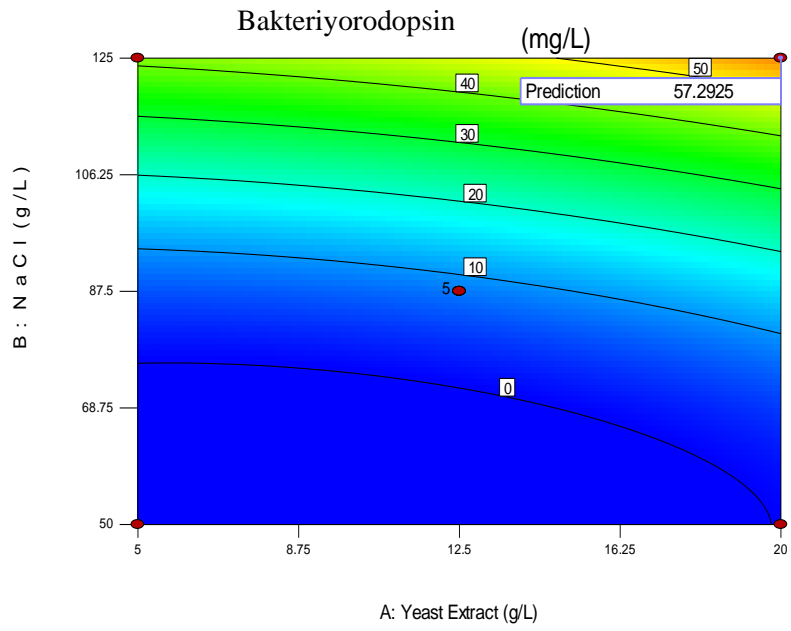
Faktörlerin yanıt değişkenliği (BR üretimi mgL<sup>-1</sup>) ve faydasını belirlemek için yapılan grafiksel analizler (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13) 20 gL<sup>-1</sup> yeast ekstrakt ve 125 gL<sup>-1</sup> NaCl (Çizelge 4.5.) ile en iyi sonuç elde edildiğini göstermektedir.

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Bakteriorodopsin (mg/L)  
● Design points above predicted value  
● Design points below predicted value  
65  
0  
X1 = A: Yeast Extract  
X2 = B: NaCl



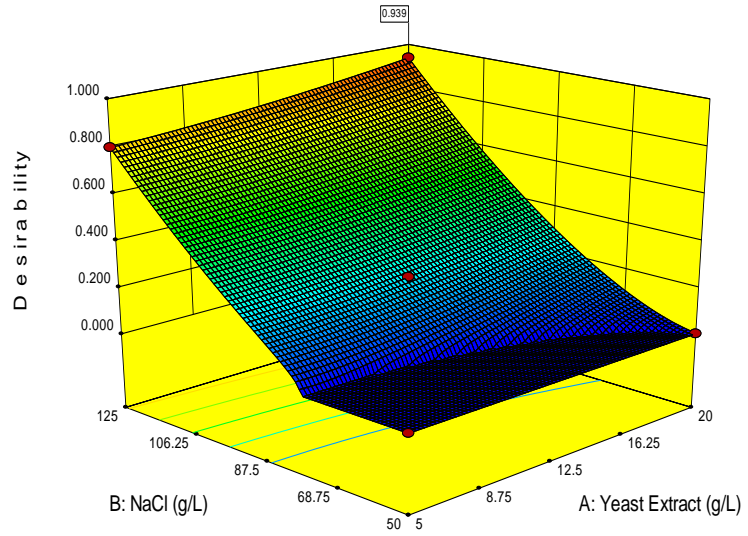
Şekil 4.10. Elde edilen bakteriorodopsin miktarının yüzey grafiği ( $\text{mgL}^{-1}$ )

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Bakteriorodopsin (mg/L)  
● Design Points  
65  
0  
X1 = A: Yeast Extract  
X2 = B: NaCl



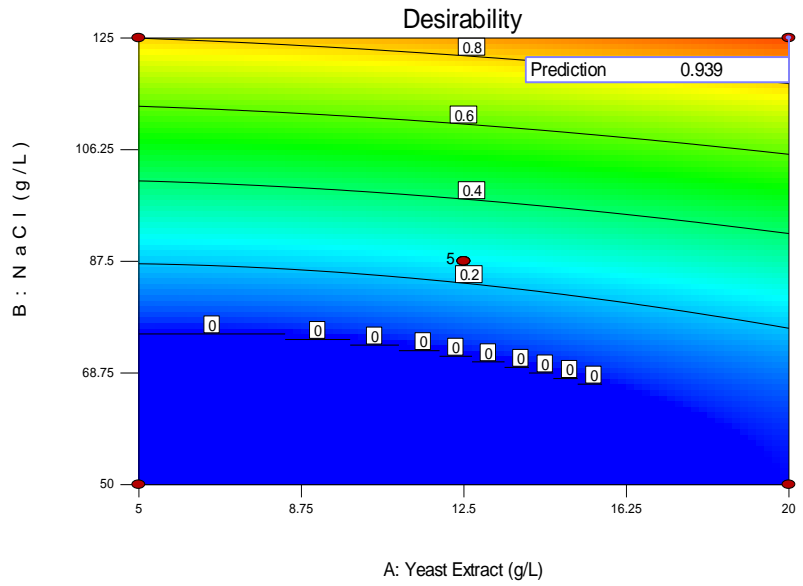
Şekil 4.11. Elde edilen bakteriorodopsin miktarının kontur grafiği ( $\text{mgL}^{-1}$ )

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Desirability  
 1.000  
 0.000  
 X1 = A: Yeast Extract  
 X2 = B: NaCl



Şekil 4.12. Bakteriyodopsin üretimine faktörlerin faydasının yüzey grafiği

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Desirability  
 • Design Points  
 1.000  
 0.000  
 X1 = A: Yeast Extract  
 X2 = B: NaCl



Şekil 4.13. Bakteriyodopsin üretimine faktörlerin faydasının yüzey grafiği

Çizelge 4.5. Deneme sayılarına göre beklenen ve elde edilen bakteriyorodopsin miktarı (mgL-1)

Tasarım Noktası	Deneme	gL <sup>-1</sup>									rpm	°C	Bakteriyorodopsin (mg/L)	
		Yeast Ekstrakt	Na-sitrat	KCl	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Kazamino asit	NaCl	Sıcaklık			Gözlenen	Beklenen
													216 h	
Merkez noktası	CCD-1-T1	12.50								87.50			8.100	8.100
Merkez noktası	CCD-1-T2	12.50								87.50			8.100	8.100
Eksensel	CCD-1-T3	12.50								140.53			65.000	71,6597
Eksensel	CCD-1-T4	12.50								34.47			0.000	0,2583
Merkez noktası	CCD-1-T5	12.50								87.50			8.100	8.100
Merkez noktası	CCD-1-T6	12.50								87.50			8.100	8.100
Faktöriyel	CCD-1-T7	20.00	1	1	0,1	0,1	15	3.75		125.00	150	39	61.870	57,2925
Merkez noktası	CCD-1-T8	12.50								87.50			8.100	8.100
Eksensel	CCD-1-T9	1.89								87.50			0.000	5,5849
Faktöriyel	CCD-1-T10	5.00								50.00			0.000	0.000
Faktöriyel	CCD-1-T11	20.00								50.00			0.000	0,1590
Eksensel	CCD-1-T12	23.11								87.50			17.010	18,64
Faktöriyel	CCD-1-T13	5.00								125.00			13.000	41,63

Şekil 4.8 ve Şekil 4.9.'da görüldüğü üzere bakteriyorodopsin üretimi en yüksek değerlere 216 saatlik kültür koşullarında CCD-1-T3 ve CCD-1-T7 kodlu deneme setlerinde ulaşmıştır. Bahsi geçen deneme setlerinde mikroorganizma üremesi bakteriyorodopsin üretimi ile paralel olarak gözlemlenmiştir. CCD-1 tasarımı için istatistiksel analiz sonuçlarına bakıldığında (Çizelge 4.4.) PBED'e göre daha yüksek regresyon katsayısına sahiptir.

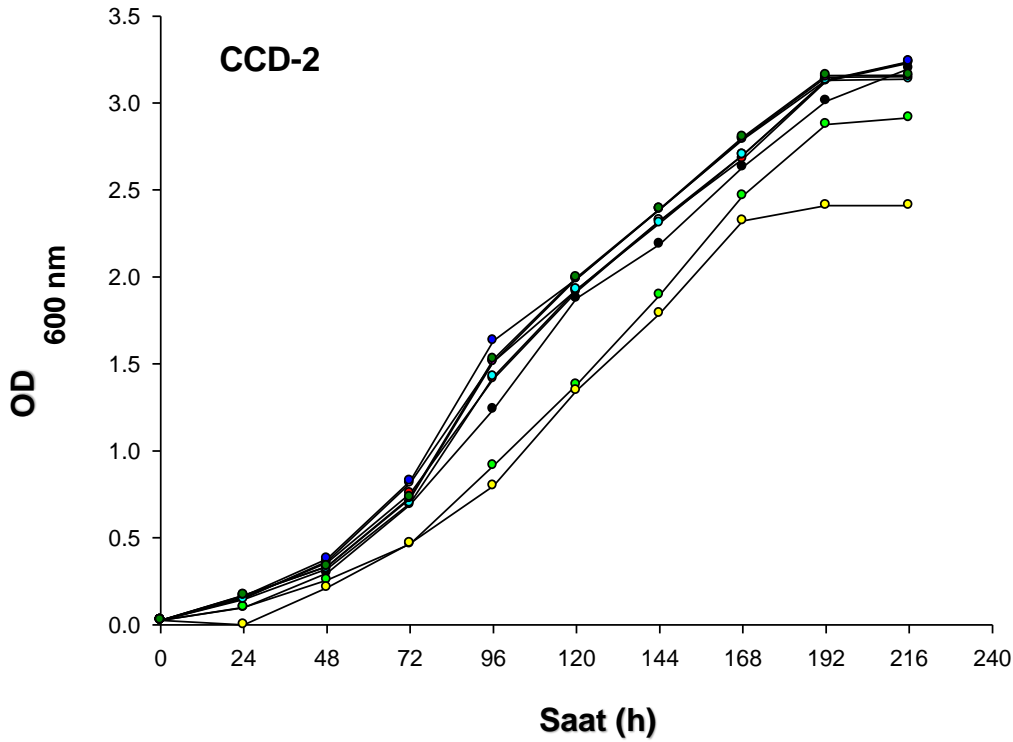
Çizelge 4.4.'de görüldüğü üzere model F-değeri 57,12 olarak verilmektedir. Bu değere göre model anlamlıdır ve bu büyüklükteki bir F-değerinin varsayımsal bir hata (noise-gürültü) nedeniyle oluşma ihtimali %0.01'dir. Mevcut durumda A, B, B<sup>2</sup> önemli model terimleridir (Çizelge 4.4.'te koyu renkle belirtilmiştir).

“Pred R-Squared” değerinin 0.8299 olması “Adj R-Squared” değerinin 0.9590 olması ile uyumluluk göstermektedir. Çünkü aradaki fark 0.2'den düşüktür. “Adeq Precision” oranının 22.642 olması yeterli bir sinyal varlığını işaret etmektedir. Bir diğer ifade ile bu durum quadrik model tasarım alanında gezinebilmek için kullanılabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca çizelge 4.4.'de görülen AB ve A<sup>2</sup> terimleri anlamlı olmamasına rağmen önemli bir quadrik model göstermektedir. Bu dizayn PBED'a önerildiği üzere yalnızca yüksek NaCl konsantrasyonunda çalışılmasının uygun olduğunu vurgulamaktadır. Son olarak, çizelge 4.4. ve çizelge 4.5 azalan yeast ekstrakt konsantrasyonunun ve artan NaCl konsantrasyonunun CCD-1-T3 deneme setinde beklenen bakteriyorodopsin değerinden daha fazla bakteriyorodopsin üretiminin gerçekleştiğine işaret etmektedir. Bu nedenle, bir sonraki tasarım için (CCD-2) yeast ekstrakt konsantrasyonu 12.5 gL<sup>-1</sup> olarak devam edilmiştir. NaCl konsantrasyonu ise artırılarak bir sonraki tasarıma devam edilmiştir. Çünkü sonuçlar N: Na oranının mikroorganizma üremesi ve bakteriyorodopsin üretimi için kritik olabileceğine işaret etmektedir.

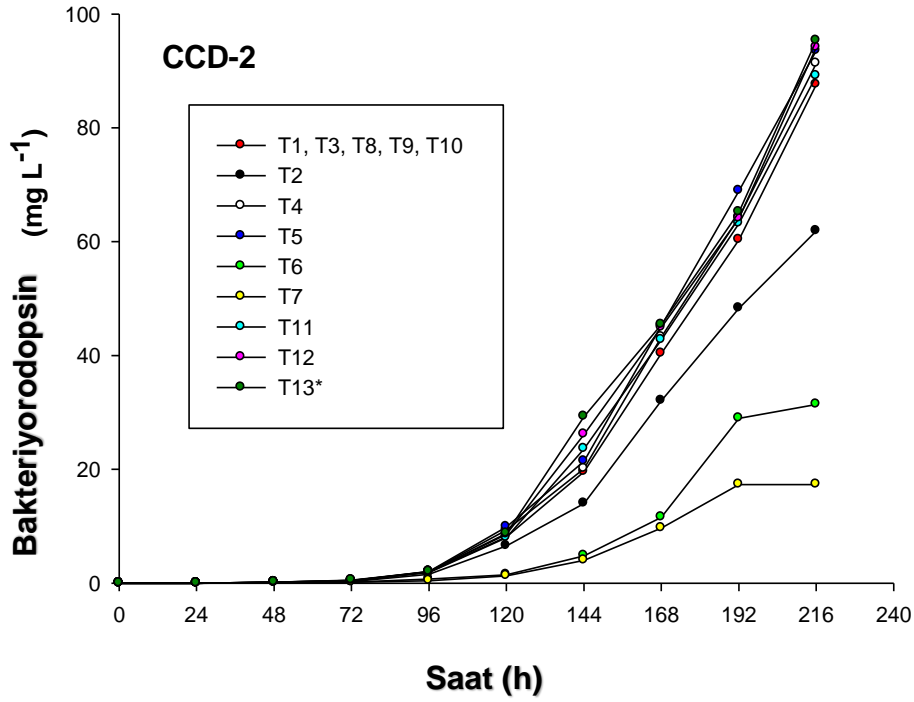
### 4.1.2.3. Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım-CCD)-2 ile Elde Edilen Sonuçlar ve Değerlendirilmesi

Bu dizayn ile bakteriyorodopsin üretimi için kullanılan basal besiyerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda uygun NaCl konsantrasyonunun belirlenmesinin yanı sıra besiyerinin ozmotik basıncını artırmak amacıyla yaklaşık  $20 \text{ gL}^{-1}$  glukoz kullanılmıştır.

Bütün deneme setlerinde mikroorganizmanın üreme eğrisi çok benzer seyretmiştir. CCD2-T6 ve CCD2-T7 setlerinde diğerlerine nazaran daha farklı bir üreme eğilimi gözlenmiştir (Şekil 4.14). Bakteriyorodopsin üretimi açısından bakıldığında CCD2-T13 ve CCD2-T12 setlerinde en yüksek değerler elde edildiği gözlenmektedir. Bu değerler sırasıyla  $94.1 \text{ mgL}^{-1}$  ve  $95.3 \text{ mgL}^{-1}$ 'dir (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. *H. salinarum* DSM 671'in uygulanan deney setlerinde üreme eğrileri



Şekil 4.15. Deney setlerinde bakteriorodopsin üretim miktarları ( $\text{mgL}^{-1}$ )

Çizelge 4.6.'da bakteriorodopsin üretimi için quadrik model kullanılarak yapılan istatistiksel analiz (ANOVA) sonuçları görülmektedir. Çizelgede önemli faktör ve modeller koyu renkle yazılmıştır. Aşağıda verilen polinomial denklem bakteriorodopsin üretimini temsil etmektedir.

#### Denklem III

$$\begin{aligned}
 \text{Bakteriorodopsin} = & \\
 & -50,00629719 \\
 & 1,135578981 \quad * \text{ NaCl} \\
 & -2,291746248 \quad * \text{ Glukoz} \\
 & 0,009048571 \quad * \text{ NaCl} * \text{ Glukoz} \\
 & -0,002199503 \quad * \text{ NaCl}^2
 \end{aligned}$$

Gerçek faktörler yönünden denklem III, her bir faktörün verilen seviyeleri için cevap hakkında tahminlerde bulunmak adına kullanılabilir. Burada, seviyeler her bir faktör için orijinal birimlerde belirtilmelidir. Bu denklem her faktörün göreceli etkisini belirlemek



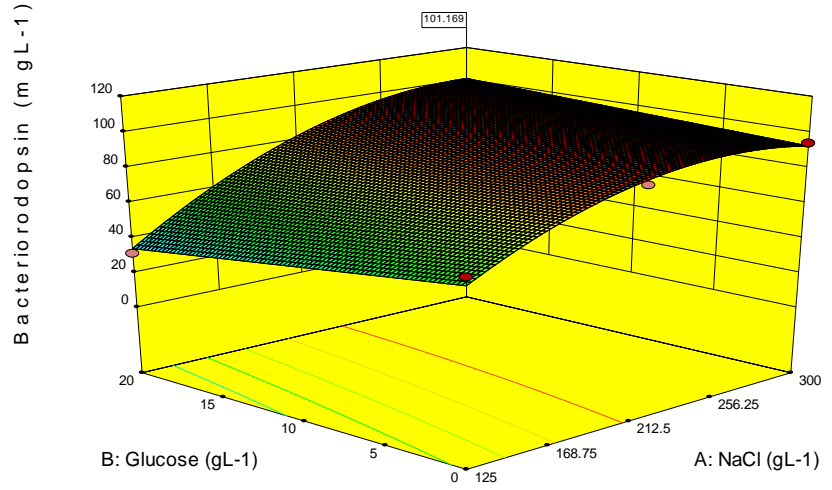
için kullanılmamalıdır çünkü katsayılar her faktörün birimlerini içerecek şekilde ölçeklendirilir ve kesişme tasarım alanının merkezinde değildir.

Çizelge 4.5. CCD-2 için istatistiksel analiz sonuçları

Kaynak	Karelerin toplamı	df	Mean Square	F değeri	p-değeri
					Prob > F
Model	7517,618	4,000	1879,405	98,875	<b>0,0000</b>
A-NaCl	5196,548	1,000	5196,548	273,390	<b>0,0000</b>
B-Glucose	94,969	1,000	94,969	4,996	0,0558
AB	250,747	1,000	250,747	13,192	<b>0,0067</b>
A <sup>2</sup>	2004,264	1,000	2004,264	105,444	<b>0,0000</b>
Residual	152,063	8,000	19,008		
Lack of Fit	152,063	4,000	38,016		
Pure Error	0,000	4,000	0,000		
Cor Total	7669,681	12,000			
R-Squared					0,9802
Adj R-Squared					0,9703
Pred R-Squared					0,9096
Adeq Precision					30,5486

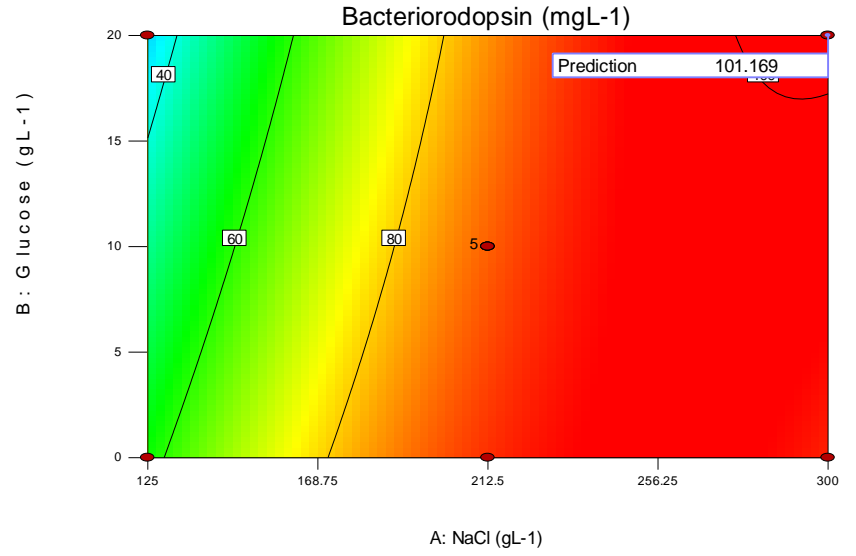
Faktörlerin yanıt değişkenliği (BR üretimi mgL<sup>-1</sup>) ve faydasını belirlemek için yapılan grafiksel analizler (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19) 20 gL<sup>-1</sup> glukoz ve 300 gL<sup>-1</sup> NaCl (Çizelge 4.6.) ile en iyi sonuç elde edildiğini göstermektedir.

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Bacteriorodopsin (mgL-1)  
 ● Design points above predicted value  
 ○ Design points below predicted value  
 95.3  
 17.3  
 X1 = A: NaCl  
 X2 = B: Glucose



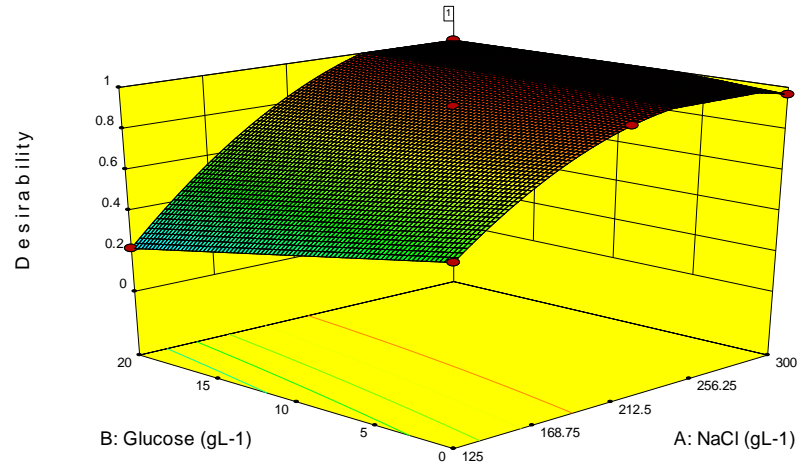
Şekil 4.16. Elde edilen bakteriorodopsin miktarının yüzey grafiği (mgL<sup>-1</sup>)

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Bacteriorodopsin (mgL-1)  
 ● Design Points  
 95.3  
 17.3  
 X1 = A: NaCl  
 X2 = B: Glucose



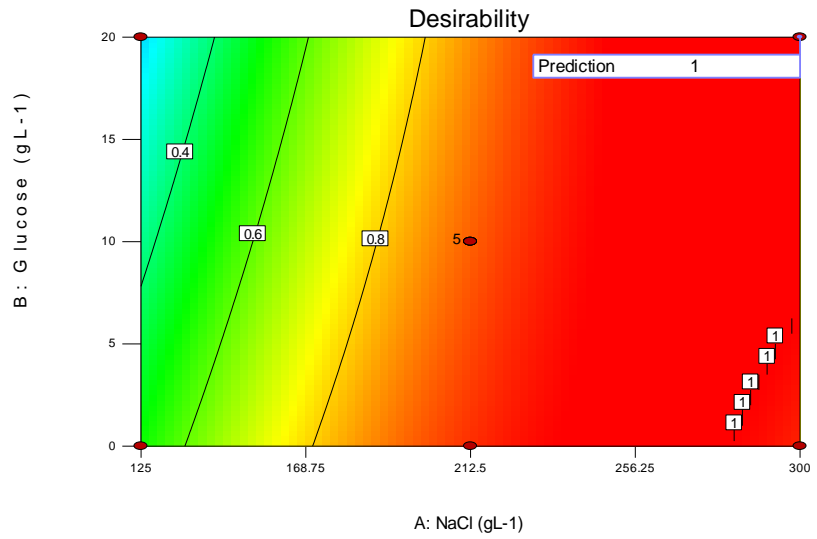
Şekil 4.17. Elde edilen bakteriorodopsin miktarının kontur grafiği (mgL<sup>-1</sup>)

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Desirability  
1  
0  
X1 = A: NaCl  
X2 = B: Glucose



Şekil 4.18. Bakteriyorodopsin üretimine faktörlerin faydasının yüzey grafiği

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Desirability  
1  
0  
• Design Points  
X1 = A: NaCl  
X2 = B: Glucose



Şekil 4.19. Bakteriyorodopsin üretimine faktörlerin faydasının kontur grafiği

Çizelge 4.6. Deneme sayılarına göre beklenen ve elde edilen bakteriyorodopsin miktarı (mgL<sup>-1</sup>)

Tasarım noktası	Deneme Setleri	mgL <sup>-1</sup>								rpm	Sıcaklık	Bakteriyorodopsin (mg/L)		
		Yeast Ekstract	Na-sitrat	KCl	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Kazamino asit	NaCl			Glukoz	Gözlene	Beklenen
Merkez noktası	CCD-2-T1	12,50	1,00	1,00	0,10	0,10	15,00	3,75	212,50	10,00	150	39	216 h	
Faktöriyel	CCD-2-T2								125,00	0,00			87,540	88,2937
Merkez noktası	CCD-2-T3								212,50	10,00			87,540	88,2937
Eksensel	CCD-2-T4								212,50	24,14			91,300	83,0763
Eksensel	CCD-2-T5								336,24	10,00			93,500	90,6573
Faktöriyel	CCD-2-T6								125,00	20,00			31,400	34,3603
Eksensel	CCD-2-T7								88,76	10,00			17,300	18,5702
Merkez noktası	CCD-2-T8								212,50	10,00			87,540	88,2937
Merkez noktası	CCD-2-T9								212,50	10,00			87,540	88,2937
Merkez noktası	CCD-2-T10								212,50	10,00			87,540	88,2937
Eksensel	CCD-2-T11								212,50	0,00			89,100	91,9829
Faktöriyel	CCD-2-T12								300,00	0,00			94,100	92,7121
<b>Faktöriyel</b>	<b>CCD-2-T13</b>	<b>300,00</b>	<b>20,00</b>	<b>95,300</b>	<b>101,169</b>									

Şekil 4.15'te belirtildiği üzere 216 saatlik üretim süresince en yüksek bakteriyorodopsin üretim miktarları CCD2-T13 ve CCD2-T12 deneme setleri görülmektedir. Bakteriyorodopsin üretimi aynı deneme setlerinde mikroorganizmanın OD<sub>λ600 nm</sub>'de gösterdiği üreme davranışı ile uyumlu bir şekilde ilerlemektedir. CCD-2 için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına bakıldığında (Çizelge 4.5.) PBED ve CCD-1'e kıyasla daha yüksek regresyon katsayısına sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.5.'de görüldüğü üzere model F-değeri 98,88 olarak verilmektedir. Bu değere göre model anlamlıdır ve bu büyüklükteki bir F-değerinin varsayımsal bir hata (noise-gürültü) nedeniyle oluşma ihtimali %0.01'dir. Mevcut durumda A, AB, A<sup>2</sup> önemli model terimleridir (Çizelge 4.5.'te koyu renkle belirtilmiştir). Glukoz önemli bir değer olmasa da glukoz ve NaCl'ün etkileşimi bu deney tasarımı için önem teşkil etmektedir.

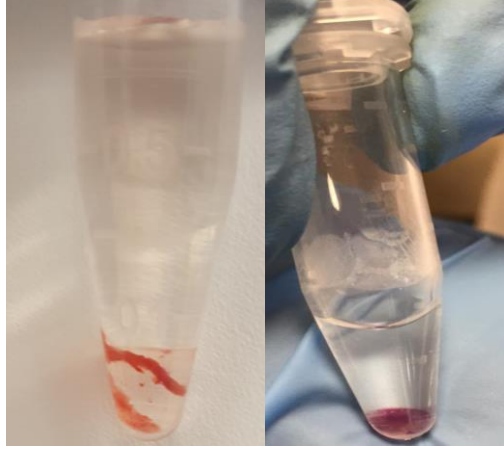
“Pred R-Squared” değerinin 0.9096 olması “Adj R-Squared” değerinin 0.9703 olması ile uyumluluk göstermektedir. Çünkü aradaki fark 0.2'den düşüktür. “Adeq Precision”

oranının 30.549 olması yeterli bir sinyal varlığını işaret etmektedir. Bir diğer ifade ile bu durum quadrik model tasarım alanında gezinebilmek için kullanılabilmesine işaret etmektedir. CCD2-T5, CCD2-T12 VE CCD2-T13 deneme setlerine ait sonuçlar karşılaştırıldığında 0 ila 20 gL<sup>-1</sup> glukoz ve %30 ila 33.62 (w/v) NaCl konsantrasyonunda görülen farklılıklardan yola çıkılarak glukoz: NaCl oranının bakteriyorodopsin üretimi üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Yapılan tüm istatistiksel ardışık dizaynlar (PBED, CCD-1 ve CCD-2) bakteriyorodopsin üretim miktarını 75 mgL<sup>-1</sup>'den 95.3 mgL<sup>-1</sup>'e çıkarmak için besiyerinin içeriğinin geliştirilmesine (12.5 gL<sup>-1</sup> yeast extract, 1gL<sup>-1</sup> Na-sitrat, 1 gL<sup>-1</sup> KCl, 0.1 gL<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.1 gL<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 15 gL<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 3.75 gL<sup>-1</sup> Kazamino asit, 300 gL<sup>-1</sup> NaCl ve 20 gL<sup>-1</sup> glukoz) yardımcı olmuştur. Üretim şartları ise 150 rpm çalkalama hızında 39 °C'de ve 1/5 oranında etkili çalışma hacmi olacak şekilde devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel deney dizaynı yapan diğer çalışmalara kıyasla [3] litre bazında daha fazla üretim göstermektedir [47].

#### **4.1.3. Bakteriyorodopsinin Saflaştırılması ve Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi**

Bölüm 3.1.2.'de belirtilen deney basamakları kullanılarak deney dizaynı yapılan her basamakta bakteriyorodopsin eldesi sağlanmıştır. Tüm deney tasarımları için aynı basamaklar uygulanmıştır. Shiu ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemle literatürde yer alan çok basamaklı saflaştırma işlemlerine nazaran daha verimli bir saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Glukoz gradyentine göre ayırma yönteminin de sıklıkla kullanıldığı literatürde görülmekle birlikte bu çalışmada uyguladığımız yöntem adımların azlığı ve yöntem verimi açısından daha fazla tercih edilmektedir. Yapılan bu çalışmada Shiu ve arkadaşlarının önerdiği PEG-zengin faz ile Fosfat-zengin faz arasında bant oluşumu ile bakteriyorodopsinin toplanması ve yüksek hızda bakteriyorodopsinin çöktürülmesi ayrı ayrı denenmiştir (Şekil 4.20.). Her iki durumda da çökelti/bant elde edilmekle birlikte yüksek hızda çöktürerek yapılan çalışmada daha fazla yararlanılmıştır.



Şekil 4.20. a) PEG ve Fosfat zengin tabakalar arasında oluşan bant b) yüksek hızda çöktürme sonucu oluşan çökelti

CHAPS uygulanarak yapıdaki lipitlerin uzaklaştırılmasının ardından bakteriyorodopsinin bilinen mor rengi belirgin bir şekilde artmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. CHAPS uygulamasından sonra bakteriyorodopsin ve mor renk oluşumu

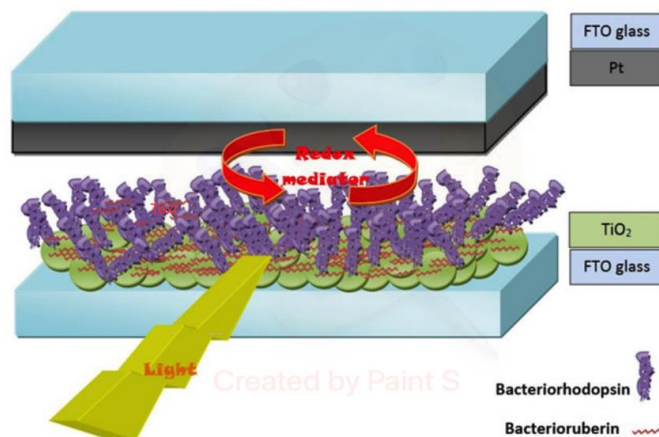
Yapılan bu çalışmada elde edilen bakteriyorodopsin miktarı mevcut literatüre göre değerlendirildiğinde erlenmeyer boyutundaki araştırmalara kıyasla en yüksek miktarı vermektedir. Kalenov ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada derin fermentasyon ile bakteriyorodopsin elde edilmiş ve  $1,750 \text{ mgL}^{-1}$  bakteriyorodopsin varlığı tespit edilmiştir [47]. Tez çalışmasında CCD-2 deney dizaynı ile  $95,300 \text{ mgL}^{-1}$  bakteriyorodopsin miktarı elde edilmiştir. Bu diğer benzer çalışmalara kıyasla oldukça yüksek bir oran olarak kabul edilebilir. Lee ve arkadaşları yaptıkları çalışmada  $64,5 \text{ mgL}^{-1}$  bakteriyorodopsin eldesi ile

mevcut çalışmamızın çok gerisinde kalan bir miktar elde etmişlerdir [46]. Çalışmamızda kullanılan mikroorganizmanın yabancı tip olması mevcut sonuçlar açısından oldukça dikkat çekicidir. Borshchevskiy ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada bakteriorodopsinin *E.coli*'ye aktarımı sağlanmış ve  $2.4 \pm 1.3 \text{ mgL}^{-1}$  bakteriorodopsin eksprese edilmiştir [48]. Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bakteriorodopsin miktarı literatüre kıyasla yüksek miktardadır.

## 4.2. Bakteriorodopsin Temelli Biyomolekül Duyarlı Güneş Hücresi (BR-BSSC) Ölçüm ve Karakterizasyonu

### 4.2.1. Bakteriorodopsin Aktif Katmanının Eldesi ve Optik karakterizasyonu

Bakteriorodopsinin üzerinden geçen akım çok küçük seviyelerde ise katı hal aygıtlarda (kuru halde) kullanılabilme yeteneğine sahip bir proteindir. Akım iletimi tıpkı ağ tabaka üzerinden geçen protonlar gibi bir güzergahı izlemektedir. Bakteriorodopsinin bu özelliği ilk olarak Yongdong Jin ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir [49]. Şekil 4.22'de gösterildiği gibi, bakteriorodopsin katmanı Katı-Hal Düzlemsel bir ekleme (örneğin; güneş hücreleri) entegre edildiğinde aktif tabaka gibi davranarak fotoiletken hale gelmektedir[50] Bu tez çalışmasında, *H. salinarum* DSM 671'den elde edilen bakteriorodopsinin katı-hal eklemi uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kuru halde cam üzerinde oluşturulan BR-temelli güneş hücresinin fiziksel özelliklerinin karakterizasyonu ve optik özelliklerinin hesaplanması bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmiştir.



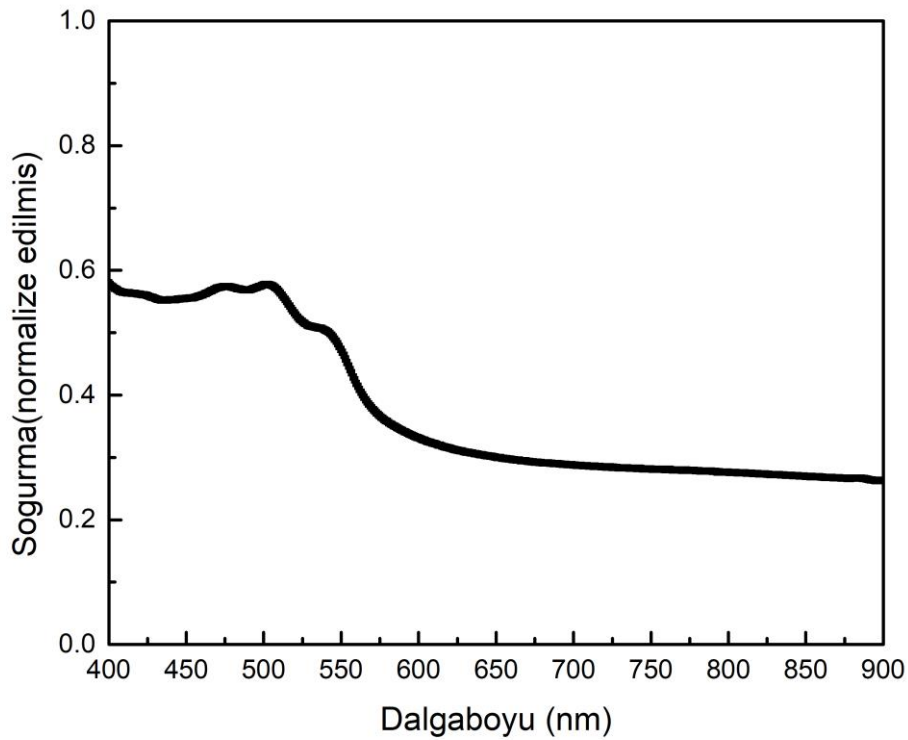
Şekil 4.22. BR'in Katı-Hal düzlemsel bir ekleme aktif tabaka olarak görev yapmasının temsili gösterimi[51]

#### 4.2.2. Bakteriyorodopsin Aktif Katmanının Karakterizasyonu

BR aktif katmanının optik özelliklerini belirlemek için bölüm 3.2.3'te bahsedilen şekilde hazırlanmış olan cam alttaşların BR katmanına ait soğurma spektrumunu elde etmek için UV-Vis spektrofotometresi kullanılmıştır. BR katmanına ait optik geçirgenlik ölçümleri 400-900 nm dalga boyu aralığında yapılmıştır. Elde edilen geçirgenlik ölçümleri yardımıyla BR katmanına ait optik soğurma katsayısı verilen formül ile hesaplanmıştır [52].

$$T = \exp(-ad)$$

$\alpha$  soğurma katsayısı,  $T$  optik geçirgenlik oranı,  $d$  ise üzerinden ışık geçen katmanın kalınlığıdır. Elde edilen soğurma katsayısının gelen ışığın dalga boyuna göre değişim grafiği Şekil 4.23'de verilmiştir.

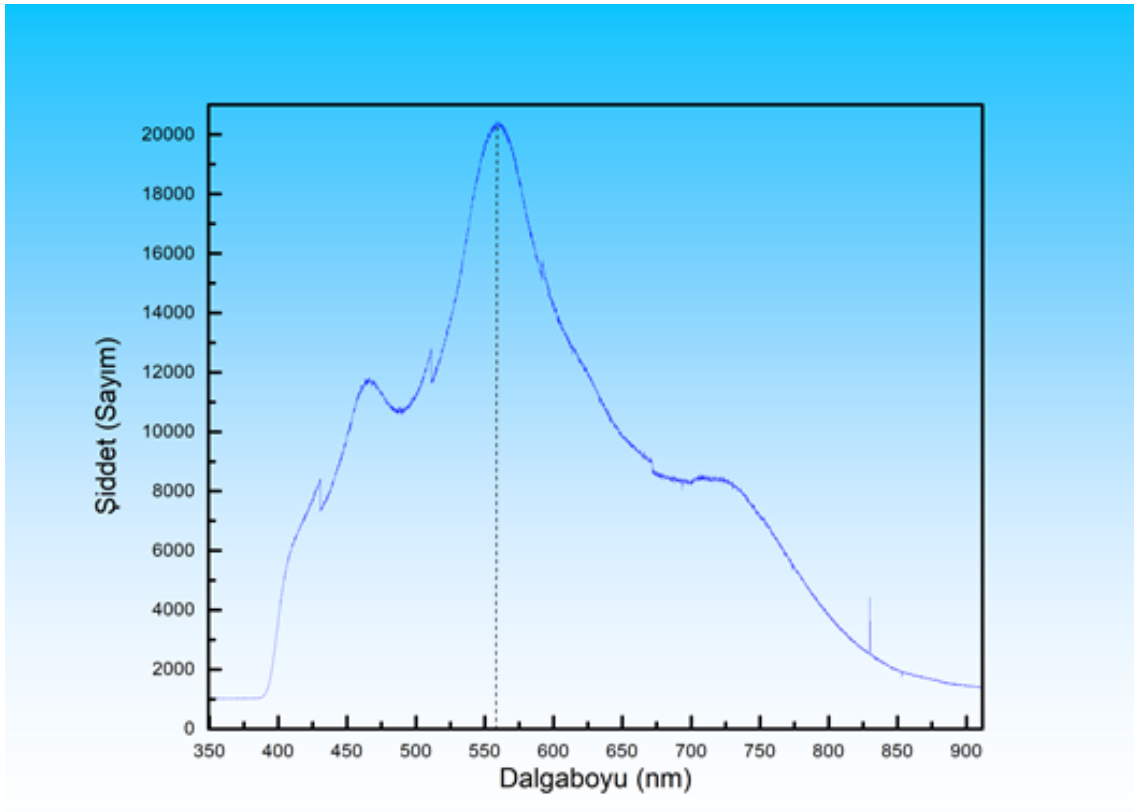


Şekil 4.23. Cam alttaş üzerine hazırlanmış BR katmanına ait dalga boyuna bağlı optik soğurma spektrumu



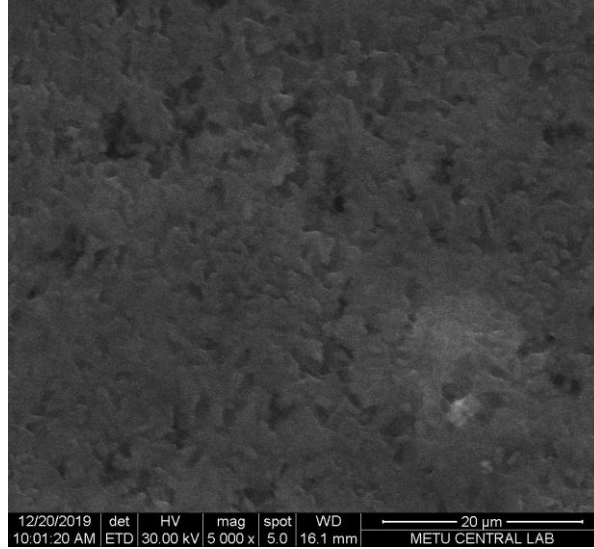
Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği üzere bakteriyorodopsin mor renkte olmasına rağmen, cam alttaş üzerine kaplandığında rengi mor renkten uzaklaşmaktadır. Soğurma spektrumundan da anlaşıldığı gibi maksimum soğurma 400-500 nm arasındadır. Mor rengin dalga boyunun 380-450 nm arasında olduğu göz önünde bulundurulduğunda elde edilen soğurma spektrumunun anlamlı olduğu görülmektedir. Soğurma spektrumundaki maksimum değerin 500 nm değerine doğru kayması ise kaplama sonrası BR'e ait katmanın rengindeki kaymadan olduğu düşünülmektedir. Elde edilen soğurma spektrumu literatür ile kıyaslandığında sonucun gayet uyumlu olduğu görülmüştür [53].

BR katmanının optik özelliklerinin belirlenmesi için ayrıca Fotoluminesans (Photoluminescence-PL) ölçümleri alınmıştır. BR katmanına ait PL spektrumu Şekil 4.24'de verilmiştir.



Şekil 4.24. Cam alttaş üzerine hazırlanmış BR katmanına ait PL ölçümü

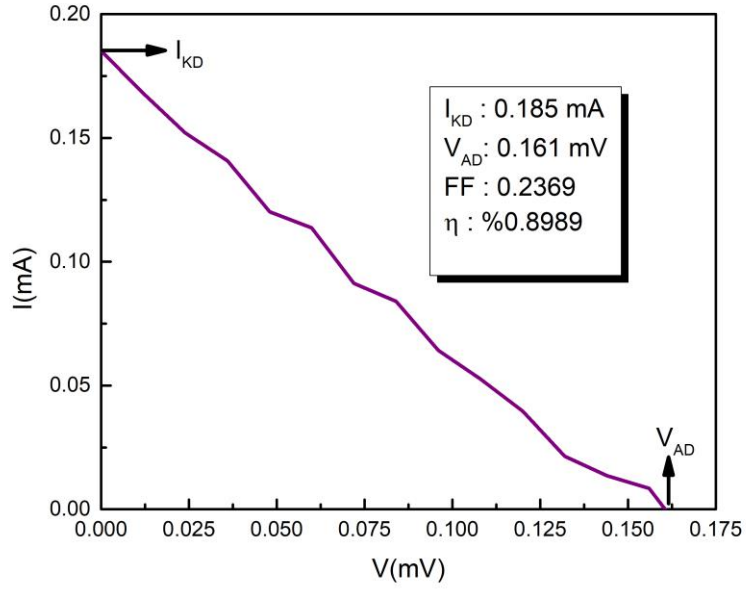
Elde edilen PL spektrumundan da görüldüğü gibi maksimum şiddet 550-600 nm aralığında ölçülmüştür. Bu sonuç literatürdeki mor renkli BR ile yapılan deneylerde elde edilen sonuçlarla gayet uyumludur [54]. Cam üzerine kaplanmış BR katmanına ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 4.25 'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere hazırlanan BR katmanı nispeten pürüzsüz yapıdadır ve bu durumda aktif katman olarak kullanılabilceği oldukça açık bir şekilde görülmektedir.



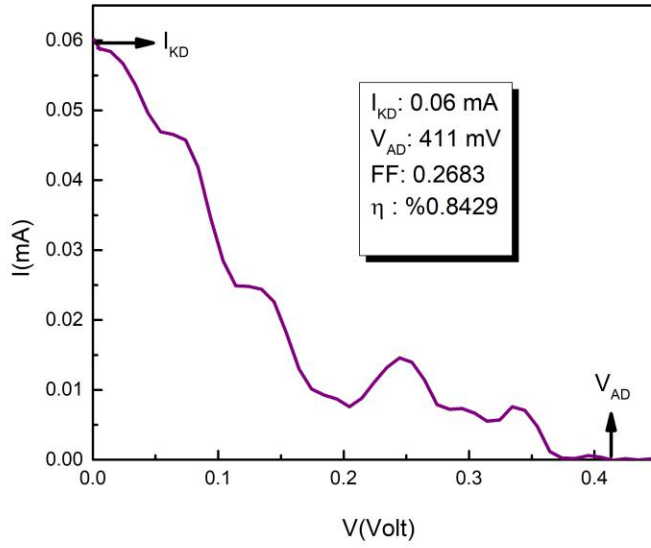
Şekil 4.25. Cam üzerine kaplanmış BR katmanına ait SEM görüntüsü

#### 4.2.3. Bakteriyorodopsin Temelli Güneş Hücrelerinin Karakterizasyonu

Bölüm 3.2.'de anlatıldığı üzere bakteriyorodopsin kullanılarak elde edilen Cam/FTO/TiO<sub>2</sub>/BR/MoO<sub>3</sub>/Au (D1) ve Cam/FTO/ZnO/BR/MoO<sub>3</sub>/Au (D2) güneş hücrelerine ait ışık altı akım-voltaj (*I-V*) ölçümleri yapıldı. Bu ölçümlere ait sonuçlar sırasıyla D1 ve D2 güneş hücreleri için Şekil 4.26 ve Şekil 4.27 'de verilmiştir.



Şekil 4.26. D1 Güneş hücresine ait I-V grafiği



Şekil 4.27. D1 Güneş hücresine ait I-V grafiği

Şekil 4.26’da gösterilen grafiğe göre D1 güneş hücresine ait kısa devre akımı ( $I_{KD}$ ) 0.185 mA ve açık devre voltajı ( $V_{AD}$ ) 0.161 V’dur.  $I - V$  karakteristiğinin bir diğer ölçütü ise doldurma faktörü (Fill Factor (FF)) olarak ifade edilen büyüklüktür. Doldurma faktörü güneş hücresinin kalitesini de belirlemektedir. FF’ne ait hesaplama şu şekilde yapılır;

$$FF = \frac{P_{max}}{V_{AD}I_{KD}} = \frac{V_{max}I_{max}}{V_{AD}I_{KD}}$$

Burada,  $P_{max}$  hücre için en verimli çalışma noktasını verir ve bu nokta maksimum güç elde edilen noktadır. D1 güneş hücresine ait FF değeri 0.2369 olarak hesaplanmıştır. Bu değer “1” e yaklaştıkça güneş hücresinin kalitesi de artar.

Bir güneş hücresinin en önemli karakteristiği ise onun çevirim verimliliği ile belirlenmektedir. Güneş hücresi verim ( $\eta$ ) hesabı ise şu şekilde yapılır;

$$\eta = \frac{P_{çıkış}}{P_{giriş}} = \frac{V_{AD}I_{KD} FF}{P_{giriş}}$$

Burada, güneş hücresine gelen ışığın gücü  $P_{giriş}$  ile verilmektedir. D1 için yapılan ışık altı I-V ölçümleri AM 1.5G (1 Güneş değeri, 0,1 W/cm<sup>2</sup>) koşullarında yapılmıştır. D1 hücresi için elde edilen güneş hücresi verimi  $\eta$  yaklaşık olarak 0.8989 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu değer literatür ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir[51], [55]. BR katmanının zorlu fiziksel koşullara dayanıklılığı ve güneş hücresinin fabrikasyonu sırasında tamamen inorganik malzemelerin kullanılması zorlu şartlara dayanıklı bir BR güneş hücresi elde edildiğini göstermektedir.

Şekil 4.27’de ise D2 güneş hücresine ait  $I_{KD}$  değeri 0.06 mA ve  $V_{AD}$  0.411 V’tur. D2 güneş hücresi D1 güneş hücresine göre daha düşük  $I_{KD}$  değerine sahip olmasına rağmen daha yüksek  $V_{AD}$  değerine sahiptir. D2 güneş hücresi için FF değeri 0.2683 olarak hesaplanmıştır. D2 hücresinin verimi ise 0.8429 olarak elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan da anlaşıldığı gibi D1 güneş hücresi daha yüksek verimliliğe sahiptir. Bu veriler elde edilen güneş hücresinin kullanılabilir olacağını işaret etmektedir.

## 5. YORUM

Yapılan bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalar ve literatüre olan katkısı maddeler halinde sıralanacak olursa:

- *Halobacterium salinarum* DSM 671suşu Alman kültür koleksiyonundan elde edilmiştir.
- Bakteriyorodopsin üretimi için gerekli temel besiyeri çalışmalarımız sonucunda optimize edilmiştir.
- Bakteriyorodopsin üretim miktarını artırmak ve üretim şartlarını optimize etmek için deney tasarım programlarından yararlanılmıştır.
- Ardışık olarak üç farklı deney tasarımı kullanılmış olup bunlardan ilki Plackett Burman deney tasarımıdır (PBED).
- PBED'dan elde edilen sonuçların ışığında ikinci tasarım modeli için Merkezi Kompozite Tasarıma (CCD) geçilmiştir. Bu tasarım sonucunda bir takım besiyeri içerikleri ve ortam koşulları (çalkalama hızı, sıcaklık ve inkübasyon süresi) sabit tutularak NaCl'ün miktarını artırmak ve glukozun bakteriyorodopsin üretimine etkisini incelemek için üçüncü tasarıma geçilmiştir.
- CCD tekrar kullanılarak yapılan son tasarımda 12.5 gL<sup>-1</sup> yeast extract, 1gL<sup>-1</sup> Na-sitrat, 1 gL<sup>-1</sup> KCl, 0.1 gL<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.1 gL<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 15 gL<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 3.75 gL<sup>-1</sup> kazaminoasit, 300 gL<sup>-1</sup> NaCl ve 20 gL<sup>-1</sup> glukoz kullanılarak 95,300 mgL<sup>-1</sup> bakteriyorodopsin elde edilmiştir. Elde edilen bu miktar, mevcut literatürde erlenmeyer bazında yapılan çalışmalar içerisinde en yüksek değerlerden birine sahiptir.
- Deney tasarımları ile yapılan tüm bakteriyorodopsin üretimlerinde bakteriyorodopsin saflaştırılması için sulu ikili faz sistemi kullanılmıştır. Bu saflaştırma yöntemi ile kayıp az yaşanmakta ve işlem basamakları azalmaktadır.
- Saflaştırma işlemi yapılan bakteriyorodopsin proteini iki farklı cihazda kullanılmış ve bu cihazlar Cam/FTO/TiO<sub>2</sub>/BR/MoO<sub>3</sub>/Au (D1) ve Cam/FTO/ZnO/BR/MoO<sub>3</sub>/Au (D2) olacak şekilde üretilmiş böylece literatüre katkıda bulunulmuştur.

- D1 ve D2 cihazları için yapılan ölçümlerden elde edilen verimlilik yüzdesi sırasıyla verimliliği 0.8989 ve 0.8429 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere D1 cihazı daha yüksek verimlilik yüzdesine sahiptir.
- Literatürde biyomolekül duyarlı güneş hücreleri arasında bakteriyorodopsin temelli güneş hücrelerine kıyasla D1 ve D2 cihazı daha fazla verimlilik yüzdesine sahiptir.
- Yapılan bu tez çalışması ile yabanıl tip *H. salinarum* DSM 671 suşundan elde edilen bakteriyorodopsinin koşullarının optimizasyonu ile miktarının literatüre göre oldukça yüksek olması sağlanmıştır. Bu durum yapılan çalışmada maliyeti artırmadan veya deney sayısını daha az tuturarak verimin artırılabilceğini ispatlamaktadır. Ayrıca yenilenebilir enerji eldesi alanında oldukça dikkat çekici bir yere sahip olan güneş hücresi çalışmalarına yeni bir kapı açmaktadır. Güneş hücresi çalışmalarında toksik bileşen içeriği az olan ve biyolojik temelli güneş hücresi eldesi oldukça popüler bir çalışma sahasıdır.
- Bu bağlamda tez çalışması kapsamında kullanılan bakteriyorodopsin duyarlılaştırıcı özelliği sağlayan bir biyomolekül olarak güneş hücresinde kullanılmış ve güneş hücreleri ölçümleri ve verimlilik yüzdesi hesaplamaları yapılmıştır. Literatüre kıyasla daha yüksek verim değerine sahip olan çalışmamız bu yönüyle mevcut çalışmalar arasında ön plana çıkmaktadır. Ayrıca ülkemizde bu alanda yapılan çalışmalar açısından bakteriyorodopsin kullanımı bir ilktir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. S. Um, and S. H. Hong, “Bacteriorhodopsin production by cell recycle culture of *Halobacterium halobium*,” *Biotechnol. Lett.*, 1998.
- [2] N. Hampp and D. Oesterhelt, “Bacteriorhodopsin and Its Potential in Technical Applications,” in *Nanobiotechnology*, 2005.
- [3] M. S. Seyedkarimi, A. Aramvash, and R. Ramezani, “High production of bacteriorhodopsin from wild type *Halobacterium salinarum*,” *Extremophiles*, vol. 19, no. 5, pp. 1021–1028, 2015.
- [4] C. R. Woese and G. E. Fox, “The concept of cellular evolution,” *J. Mol. Evol.*, 1977.
- [5] D. C. Demirjian, F. Morís-Varas, and C. S. Cassidy, “Enzymes from extremophiles,” *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001.
- [6] W. D. Grant, R. T. Gemmell, and T. J. McGenity, “Halobacteria: The evidence for longevity,” *Extremophiles*. 1998.
- [7] M. Mevarech, F. Frolow, and L. M. Gloss, “Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt,” in *Biophysical Chemistry*, 2000.
- [8] Y. Yang *et al.*, “Complete biosynthetic pathway of the C50 carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*,” *J. Bacteriol.*, 2015.
- [9] S. Winker and C. R. Woese, “A Definition of the Domains Archaea, Bacteria and Eucarya in Terms of Small Subunit Ribosomal RNA Characteristics,” *Syst. Appl. Microbiol.*, 1991.
- [10] S. Berhanu, T. Ueda, and Y. Kuruma, “Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis,” *Nat. Commun.*, 2019.
- [11] Y. Kinoshita, N. Uchida, D. Nakane, and T. Nishizaka, “Direct observation of rotation and steps of the archaellum in the swimming halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*,” *Nat. Microbiol.*, 2016.
- [12] H. Strahl and J. C. Greie, “The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* R1 responds to potassium limitation by expression of the K<sup>+</sup>-transporting KdpFABC P-type ATPase and by a decrease in intracellular K<sup>+</sup>,”

*Extremophiles*, 2008.

- [13] C. Ganea, J. Tittor, E. Bamberg, and D. Oesterhelt, "Chloride- and pH-dependent proton transport by BR mutant D85N," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1998.
- [14] M. Kolbe, H. Besir, L. O. Essen, and D. Oesterhelt, "Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å Resolution," *Science (80-. )*, 2000.
- [15] I. Lutz *et al.*, "Primary reactions of sensory rhodopsins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001.
- [16] W. Plaga, F. Lottspeich, and D. Oesterhelt, "Improved purification, crystallization and primary structure of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Halobacterium halobium*," *Eur. J. Biochem.*, 1992.
- [17] R. Renthall, "Bacteriorhodopsin," *New Compr. Biochem.*, vol. 23, no. C, pp. 75–101, 1992.
- [18] A. Oren and C. D. Litchfield, "A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 173, no. 2, pp. 353–358, 1999.
- [19] M. Hassanshahian and J. Mohamadian, "Isolation and characterization of *Halobacterium salinarum* from saline lakes in Iran," *Jundishapur J. Microbiol.*, vol. 4, no. SUPPL. 1, pp. 59–66, 2011.
- [20] J. K. Lanyi, "Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps," *Nature*, vol. 375, no. 6531, pp. 461–463, 1995.
- [21] B. Mahyad, S. Janfaza, and E. S. Hosseini, "Bio-nano hybrid materials based on bacteriorhodopsin: Potential applications and future strategies," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 225, pp. 194–202, 2015.
- [22] Ö. Çakıcı, "Biochemical and Genetic Characterization Of *Halobacterium salinarium* Strain Isolated From Tuz Lake In Central Anatolia," 2004.
- [23] S. Subramaniam and R. Henderson, "Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin," *Nature*, vol. 406, no. 6796, pp. 653–657, 2000.
- [24] N. Hıdıroğlu, "Bakteriyorodopsin Üretme Potansiyeline Sahip Halofilik Arke *Halobacterium salinarum*'un İzolasyonu Ve Nanobiyomolekül Olarak Kullanılabilecek Bakteriyorodopsinin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu," 2015.



- [25] R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, and K. H. Downing, “Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy,” *J. Mol. Biol.*, 1990.
- [26] W. Stoeckenius and R. Rowen, “A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration.,” *J. Cell Biol.*, 1967.
- [27] M. K. Koch and D. Oesterhelt, “MpcT is the transducer for membrane potential changes in *Halobacterium salinarum*,” *Mol. Microbiol.*, 2005.
- [28] G. Dai *et al.*, “Photoreaction cycle of phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II) from *Halobacterium salinarum* expressed in escherichia coli,” *Photochem. Photobiol.*, 2010.
- [29] L. K. Chu, C. W. Yen, and M. A. El-Sayed, “Bacteriorhodopsin-based photo-electrochemical cell,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 2, pp. 620–626, 2010.
- [30] Y. T. Li *et al.*, “A review on bacteriorhodopsin-based bioelectronic devices,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 5, pp. 1–21, 2018.
- [31] S. Janfaza, A. Molaeirad, R. Mohamadpour, M. Khayati, and J. Mehrvand, “Efficient Bio-Nano Hybrid Solar Cells via Purple Membrane as Sensitizer,” *Bionanoscience*, vol. 4, no. 1, pp. 71–77, 2014.
- [32] C. Wickstrand, R. Dods, A. Royant, and R. Neutze, “Bacteriorhodopsin: Would the real structural intermediates please stand up?,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1850, no. 3, pp. 536–553, 2015.
- [33] M. J. Grout, “Application of bacteriorhodopsin for optical limiting eye protection filters,” *Opt. Mater. (Amst.)*, 2000.
- [34] J. K. Lanyi and A. Pohorille, “Proton pumps: Mechanism of action and applications,” *Trends in Biotechnology*. 2001.
- [35] A. V. Patil, T. Premaraban, O. Berthoumieu, A. Watts, and J. J. Davis, “Engineered bacteriorhodopsin: A molecular scale potential switch,” *Chem. - A Eur. J.*, 2012.
- [36] A. M. Dummer, J. C. Bonsall, J. B. Cihla, S. M. Lawry, G. C. Johnson, and R. F. Peck, “Bacterioopsin-Mediated regulation of bacterioruberin biosynthesis in *Halobacterium salinarum*,” *J. Bacteriol.*, 2011.
- [37] N. Kahya, D. A. Brown, and P. Schwille, “Raft partitioning and dynamic behavior

- of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles,” *Biochemistry*, 2005.
- [38] T. Miyasaka, K. Koyama, and I. Itoh, “Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor,” *Science (80-. )*, 1992.
- [39] R. Birge, “Photophysics And Molecular Electronic Applications Of The Rhodopsins,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1990.
- [40] R. C. H. del Rosario, C. Oppawsky, J. Tittor, and D. Oesterhelt, “Modeling the membrane potential generation of bacteriorhodopsin,” *Math. Biosci.*, vol. 225, no. 1, pp. 68–80, 2010.
- [41] N. N. Vsevolodov and T. V. Dyukova, “Retinal-protein complexes as optoelectronic components,” *Trends in Biotechnology*. 1994.
- [42] L. Murray, R. L. Mason, R. F. Gunst, and J. L. Hess, “Statistical Design and Analysis of Experiments: With Applications to Engineering and Science.,” *J. Am. Stat. Assoc.*, 1990.
- [43] G. E.P.Box, J. S. Hunter, and W. G.Hunter, “Basics (Probability, Parameters, and Statistics),” *Stat. Exp. Des. Innov. Discov.*, 2005.
- [44] D. P. B. T. B. Strik, R. A. Timmers, M. Helder, K. J. J. Steinbusch, H. V. M. Hamelers, and C. J. N. Buisman, “Microbial solar cells: Applying photosynthetic and electrochemically active organisms,” *Trends Biotechnol.*, vol. 29, no. 1, pp. 41–49, 2011.
- [45] L. D. Ardila-Leal *et al.*, “Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*,” *3 Biotech*, 2019.
- [46] P. J. Shiu, H. M. Chen, and C. K. Lee, “One-step purification of delipidated Bacteriorhodopsin by aqueous-three-phase system from purple membrane of *Halobacterium*,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 92, no. 2, pp. 113–119, 2014.
- [47] S. V. Kalenov, M. M. Baurina, D. A. Skladnev, and A. Y. Kuznetsov, “High-effective cultivation of *Halobacterium salinarum* providing with bacteriorhodopsin production under controlled stress,” *J. Biotechnol.*, vol. 233, pp. 211–218, 2016.
- [48] D. Bratanov *et al.*, “An approach to heterologous expression of membrane

- proteins. The case of bacteriorhodopsin,” *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 1–16, 2015.
- [49] J. A. Stuart, D. L. Marcy, K. J. Wise, and R. R. Birge, “Volumetric optical memory based on bacteriorhodopsin,” in *Synthetic Metals*, 2002.
- [50] R. R. Birge *et al.*, “Biomolecular Electronics: Protein-Based Associative Processors and Volumetric Memories,” *J. Phys. Chem. B*, 1999.
- [51] A. Molaeirad, S. Janfaza, A. Karimi-Fard, and B. Mahyad, “Photocurrent generation by adsorption of two main pigments of *Halobacterium salinarum* on TiO<sub>2</sub> nanostructured electrode,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2015.
- [52] A. Slav, “Optical characterization of TiO<sub>2</sub>-Ge nanocomposite films obtained by reactive magnetron sputtering,” *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, vol. 6, no. 3, pp. 915–920, 2011.
- [53] A. V. B. Sankaram, “Phytochemistry,” *Phytochemistry*. 1987.
- [54] V. Oleinikov *et al.*, “Extension of the spectral range of bacteriorhodopsin functional activity by energy transfer from quantum dots,” *Nanobiosystems Process. Charact. Appl. V*, vol. 8464, p. 84640Z, 2012.
- [55] R. Mohammadpour and S. Janfaza, “Efficient Nanostructured Biophotovoltaic Cell Based on Bacteriorhodopsin as Biophotosensitizer,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 3, no. 5, pp. 809–813, 2015.

## **EKLER**

### **EK 1 – Deney Aşamalarında Kullanılan Solventlerin Hazırlanışı**

**Potasyum Fosfat çözeltisi (100 mL %24):** 220 g monobazik  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1000 mL saf su içinde çözülmüş ve pH 8'e ayarlanmıştır.

**PEG (Polietilen glikol) çözeltisi (100 mL %24):** %40'luk polietilen glikol solüsyonundan 120 mL alınarak üzeri deiyonize su ile 200 mL 'ye tamamlanmıştır.

**CHAPS 3-[(cholamidopropyl) (dimethylammonio) propane sulfonate] çözeltisi (41,4  $\mu\text{L}$ , 20 mM):** 0,0123 g CHAPS Hidrat 1 mL steril saf su içinde çözülmüştür.