



**BACTERIORHODOPSIN'İN ÜRETİM
PROSESLERİNİN OPTİMİZASYONU VE
NANOBIYOMATERYAL KULLANIMINDA
FARKLI ALTTAŞLARA İMMOBİLİZASYONU**

Neslihan HİDİROĞLU İSPİRLİ

**Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kübra ÇINAR DEMİR**

Doktora Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı

2022

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

**BACTERIORHODOPSİN'İN ÜRETİM PROSESLERİNİN OPTİMİZASYONU VE
NANOBIYOMATERYAL KULLANIMINDA FARKLI ALTTAŞLARA
İMMOBİLİZASYONU**

(Optimization of Bacteriorhodopsin Production Procedures and Utilization as a
Nanobiomaterial by Immobilization onto Different Substrates)

DOKTORA TEZİ

Neslihan HİDİROĞLU İSPİRLİ

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kübra ÇINAR DEMİR

Erzurum
Aralık, 2022

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

BACTERIORHODOPSIN'IN ÜRETİM PROSESLERİNİN OPTİMİZASYONU VE NANOBİYOMATERYAL
KULLANIMINDA FARKLI ALTTAŞLARA İMMOBİLİZASYONU

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Neslihan HİDİROĞLU İSPİRLİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 14/12/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Güleray AĞAR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Bünyamin AYGÜN <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Burak ALAYLAR <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
İkinci Tez Danışmanı	Doç. Dr. Kübra ÇINAR DEMİR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../....tarih
ve sayılı kararı

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı ıslak imzalıdır

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: BAP-2015/100

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak **Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE** danışmanlığında sunulan “**BACTERIORHODOPSIN’İN ÜRETİM PROSESLERİNİN OPTİMİZASYONU VE NANOBİYOMATERYAL KULLANIMINDA FARKLI ALTTAŞLARA İMMOBİLİZASYONU**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	6	30
Kuramsal Temeller	4	30
Materyal ve Metot	30	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	6	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	11	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5’den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Neslihan HİDİROĞLU İSPİRLİ	Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE
28.11.2022	28.11.2022
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışma hayatım ve doktora tezim süresince sabır ve şefkatiyle maddi-manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyip daima yanımda olan ve yürüdüğüm akademi yolunda bilgi ve tecrübesi ile yoluma ışık tutan tez danışmanım ve kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye şükranlarımı ve saygılarımı sunuyorum.

Tecrübeleriyle yol gösteren, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN'a ve Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na saygılarımla teşekkür ediyorum. Ayrıca yıllardır desteklerini esirgemeyen Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı sekreteri Sayın Abdulmelik KÜÇÜK'e teşekkür ediyorum.

Desteği ve tecrübesi ile çalışmalarımın kolaylaşmasını ve ilerlemesini sağlayan, sağlık ve esenlikler dilediğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL'a saygı ile teşekkür ediyorum.

Destekleri ile beni onurlandıran ko-danışmanım Sayın Doç. Dr. Kübra ÇINAR DEMİR'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI'ya, Sayın Doç. Dr. Burak ALAYLAR'a, içten dileklerimle teşekkür ediyorum.

Yıllar içerisinde birlikte çalıştığım ve her zaman varlıkları ile mutluluk duyduğum; Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Selma SEZEN'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI'ya, Sayın Uzm. Biy. Selin DOĞAN'a, Sayın Uzm. Biy. Taha Yasin KOÇ'a, sevgiyle teşekkür ederim.

Karakterizasyon işlemlerinde her açıdan yardımcı olan; Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Aslı YILMAZ'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferhunde AYSİN'e, Sayın Dr. Arş. Gör. Volkan YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Son olarak minik oğlum Mehmet Kılıç Ali'ye ve onunla zorlu süreçlerimde şefkatle ilgilendikleri ve maddi-manevi desteklerini esirgemedikleri için değerli annem Sevim HİDİROĞLU'na, değerli kayınvalidem Hanife İSPİRLİ'ye, ve eşim Emin İSPİRLİ'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Neslihan HİDİROĞLU İSPİRLİ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BACTERIORHODOPSİN'İN ÜRETİM PROSESLERİNİN OPTİMİZASYONU VE NANOBİYOMATERYAL OLARAK KULLANIMINDA FARKLI ALTTAŞLARA İMMOBİLİZASYONU

Neslihan HİDİROĞLU İSPİRLİ

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kübra ÇINAR DEMİR

Amaç: Bu çalışmanın temel amacı; Tuz Gölü'nden alınan halofilik Arke türlerince sentezlenen ve ekonomik olarak oldukça değerli bir materyal olan bacteriorhodopsinin teknolojik çalışmalarda kullanım verimini arttırarak bir katma değer haline getirmek hedeflenmektedir.

Yöntem: Bu çalışma bacteriorhodopsin (bR) sentezleyici halofilik Arke türlerinin Tuz Gölü'nden alınan karışık kültür örneklerinden izolasyonu ve kültür şartlarının optimize edilmesine dayalıdır. İki aşamadan oluşan çalışmanın ilk adımı; bacteriorhodopsinin üretim süreçlerinin optimizasyonu, ikinci adım ise; saflaştırılmış bR'nin farklı alttaşlara immobilizasyonundan oluşmaktadır.

Bulgular: Halofilik Arke örneklerinden kültürlerin izolasyonu sağlanarak 11 adet bR sentezleyebilen saf izolat elde edilmiştir. Kültür ve bR üretim optimizasyon işlemleri *Halobacterium salinarum* olduğu saptanan NES5 suşu üzerinden gerçekleştirilmiştir. Kültürlerden saflaştırılan bR örnekleri, elektroforetik sedimantasyon ve damlatma-kurutma teknikleriyle alttaşlar üzerine immobilize edilmiştir. Immobilizasyon sonucunda yapılan karakterizasyon işlemleri ile ince filmlerin yapısı incelenmiştir.

Sonuç: Yapısal dayanıklılık, eşsiz fotokromizm ve stabilitesi sayesinde teknolojik çalışmalarda kullanılabilecek biyomateryaller arasında oldukça önemli bir yere sahip olan bR'nin biyolojik sentez ve izolasyon sürecindeki zorluklar dolayısıyla üretim optimizasyonu büyük önem taşımaktadır. Bu açıdan çalışmamızda gerçekleştirilen optimizasyon, immobilizasyon ve karakterizasyon işlemleri ile bR'nin teknolojik araçlarda kullanılabilir ürün haline getirilmesinde önemli bir gelişme kaydedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Halobacterium salinarum*, Bacteriorhodopsin, mor membran, proton pompası, protein saflaştırma, sıvı iki fazlı sistem, protein immobilizasyonu, elektroforetik sedimantasyon, drop-casting, SDS-Page, UV-Vis, XRD, XPS, SEM, TEM, Profilometre, Dönüşümlü voltametri

Aralık 2022, 139 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

OPTIMIZATION OF BACTERIORHODOPSIN PRODUCTION PROCEDURES AND UTILIZATION AS A NANOBIO MATERIAL BY IMMOBILIZATION ONTO DIFFERENT SUBSTRATES

Neslihan HIDIROĞLU İSPİRLİ

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Kübra ÇINAR DEMİR

Purpose: The essential aim within the context of this study is to render the commercial benefit from a very valuable biomaterial which is synthesized by halophilic archaeas of Tuz Lake and contribute to our country in the scope of the technical and economical advancement in this field.

Method: This study is based on isolation of bacteriorhodopsin-synthesizer haloarchaea species, and optimization of culture conditions. Optimizing the production processes of bR constitutes the first phase of this study. The next step is an investigation of the utilization of isolated bR in technical advances, through immobilization within different types of deposition techniques onto various substrates.

Findings: 11 different bR-producing haloarchaeal species were isolated from samples. Optimization of culture conditions, and bR production processes were carried out over NES5 isolate which is determined as *Halobacterium salinarum*. bR films were deposited via electrophoretic sedimentation and drop-casting techniques and characterized.

Results: Bacteriorhodopsin is one of the most important biomaterials that has a great capability of technical utilization thanks to its durable conformation, stability, and peerless photochromic properties. Optimization is crucial for rendering the utilization more practical, because some crucial drawbacks limit the usage; the exhausting isolation procedures, compelling biosynthesis. Utilization of bR as a biomaterial in technical research has been advanced in this research through optimization, immobilization, characterization experiments.

Keywords: *Halobacterium salinarum*, bacteriorhodopsin, purple membrane, proton pump, protein isolation, aqueous two-phase system (ATPS), protein immobilization, electrophoretic sedimentation, drop-casting, SDS-Page, UV-Vis, XRD, XPS, SEM, TEM, Raman, Profilometry, Cyclic Voltametry (CV)

December 2022, 139 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Biyomoleküler Elektronik ve Biyonanoteknoloji	3
Türkiye’deki Tuz Gölü ve Habitatı	4
Halofilik Arkeler	5
<i>Halobacterium salinarum</i>	7
Membran Proteinleri	7
Mor Membran	8
Bakteriyel Rodopsinler	9
Bacterioruberin.....	11
Bacteriorhodopsin	12
Fotodöngü	14
Fotoakım	19
bR’nin Kullanıldığı Alanlar	19
Solar Enerji Dönüşümü	22
Hareket Sensörleri.....	23
X-Ray Sensörleri.....	24
İmmüno-sensörler.....	24
Yapay Retina.....	24
Veri Depolama	25
Holografik İşlemler	25
Mor Membran İzolasyonu.....	26
bR Delipidasyonu.....	27
İmmobilizasyon Teknikleri ve bR İmmobilizasyonunda Kullanılan Substratlar.....	27

bR'nin immobilizasyonunda kullanılan thin-film hazırlama metodları.....	28
Langmuir-Blodgett (LB)	29
Elektroforetik Sedimentasyon (EPS)	31
Elektrostatik Self-Assembly (Layer-by-layer) (ESA-LbL)	32
Karakterizasyon.....	33
Optimizasyon	33
MATERYAL VE METOD	36
Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	36
bR İzolasyon ve Delipitasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	37
DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	37
SDS-Page işleminde kullanılan Çözeltiler	39
İmmobilizasyon İşlemlerinde Kullanılan Malzemeler.....	40
Kültür Çalışmaları.....	40
İzolasyon için gereken örneklerin temini	40
Bazal medya ile örneklerin çoğaltılması	41
bR Sentezleyen Halofilik Arkelerin İzolasyonu	42
Yayma ekim tekniği ile izolasyon.....	42
Çizgi ekim tekniği ile izolasyon.....	43
Seyrelterek yayma tekniği ile mikro kolonilerin seçilmesi.....	43
BR içeren kültürlerin saklanması ve stoklanma prosesi	44
Elde Edilen İzolatların Moleküler İdentifikasyonu.....	44
DNA izolasyon prosedürü.....	44
DNA derişim ölçümü ve çalışma solüsyonunun hazırlanması	46
DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonu derişiminin ($\mu\text{g/mL}$) belirlenmesi	46
Halofilik arke izolatının 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu	46
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için Master Mix solüsyonu hazırlanması	46
PCR amplifikasyon programı.....	47
16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforetik analizi	47
16S rDNA gen bölgesi sekans analizi ve GenBank karşılaştırması.....	47
Gram boyama ve TEM görüntüleme	48
Optimizasyon Çalışmalarında Kullanılacak Başlangıç Suşu ve Selektif Medya	
Seçimi.....	48
bR Üretici <i>Halobacterium salinarum</i> İzolatının Kültür Optimizasyonu	49
pH optimizasyonu	49
Sıcaklık optimizasyonu	49

Aydınlatma optimizasyonu	50
Havalandırma optimizasyonu	50
Aydınlatma ve havalandırma şartlarının bR üretimi üzerindeki etkisi	51
bR üretimi üzerinde besin kaynaklarının etkisi.....	51
bR Saflaştırma Çalışmaları ve Optimizasyonu	51
Sıvı iki fazlı sistem ile saflaştırma (ATPS).....	51
Tek adımda sıvı üç fazlı sistem ile saflaştırma (A3PS)	52
Delipitasyon Çalışmaları	53
Hidroksilamin metodu ile saf bR ürün miktar tayini	54
SDS-Page Analizi	54
bR saflık analizleri	55
bR İmmobilizasyonu	55
Alttaşıların yıkanması ve sterilizasyonu	55
Drop-casting (Damlatma-kurutma) tekniği ile immobilizasyon	55
Elektroforetik Sedimentasyon (EPS) tekniği ile immobilizasyon	55
İmmobilize Edilmiş bR'nin Karakterizasyonu	56
UV-Vis NIR	56
XRD	56
XPS	57
Raman	57
SEM ve TEM	58
Profilometri	58
Elektrokimyasal Ölçümler	59
ARAŞTIRMA BULGULARI	60
Tuz Gölü Numunelerinden bR Sentezleyen Halofilik Arkelerin İzolasyonu	60
Moleküler Tanılama	63
İzolatların 16S rRNA bölgelerinin PCR amplifikasyonu	63
16S rRNA sekans analiz sonucu	63
Başlangıç suşu seçimi	65
NES5 İzolatının Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Gram Boyama Sonucu	66
NES5 İzolatının Kültür Optimizasyonu	68
pH optimizasyonu	68
Sıcaklık optimizasyonu	69
Aydınlatma optimizasyonu	69
Havalandırma optimizasyonu	70

Optimizasyon sonucu	72
Aydınlatma ve havalandırma şartlarının bR üretimi üzerindeki etkisi	72
Farklı besin kaynaklarının bR üretimi üzerindeki etkisi	72
bR Saflaştırma Tekniklerinin Verim Analizi	74
Sıvı iki fazlı sistem (ATPS)	74
Tek adımda sıvı üç fazlı sistem (A3PS)	75
bR delipidasyonu	76
bR karakterizasyon işlemleri	77
SDS-Page analizi	77
bR UV absorbans analizi	78
XRD analizi	79
XPS	80
Raman	81
SEM ve TEM Sonuçları	82
Profilometri	85
Elektrokimyasal ölçümleri	90
TARTIŞMA VE SONUÇ	91
KAYNAKLAR	105
EKLER	115
ÖZGEÇMİŞ	121

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Halobacterium salinarum</i> Karakteristik Özellikler	7
Tablo 2. bR'nin ve PM'nin Karakteristik Özellikleri.....	13
Tablo 3. bR ile Hazırlanan İnce Filmlerde Kullanılan İmmobilizasyon Çalışmalarından Bazıları	29
Tablo 4. bR-Langmuir-Blodgett İnce Film Çalışmalarından Bazıları	30
Tablo 5. bR-Elektroforetik Sedimentasyon (EPS) İnce Film Çalışmalarından Bazıları	32
Tablo 6. bR-Elektrostatik Self-Assembly (ESA-LBL) İnce Film Çalışma Örnekleri	33
Tablo 7. Tuz Gölü'nden Alınan Numunelerin Koordinat ve Özellikleri.....	41
Tablo 8. Bazal Besiyeri Formülü	42
Tablo 9. Katı Besiyeri Formülleri.....	43
Tablo 10. Selektif Medya Seçiminde Kullanılan Alternatif Besiyerleri.....	48
Tablo 11. Besiyerinde Kullanılan Trace Metal Solüsyonu Formülü	48
Tablo 12. Ayırma ve Yığılma Jelleri Formülleri	54
Tablo 13. Petrilerde Yapılan Ekimlerde Elde Edilen Kolonilerin Gelişimi	62
Tablo 14. GenBank Dizi Analizi Sonuçlarına Göre 11 Adet İzolata Ait Veriler	64
Tablo 15. Başlangıç Suşu Seçiminde Yapılan Kombine Ekime Ait Absorbans Verileri	65
Tablo 16. NES5 Suşu Morfolojik Özellikleri	66
Tablo 17. pH Optimizasyonu Absorbans Verileri	68
Tablo 18. Sıcaklık Optimizasyonu Absorbans Verileri	69
Tablo 19. Aydınlatma Optimizasyonu Absorbans Verileri	70
Tablo 20. Havalandırma Optimizasyonu Absorbans Verileri.....	71
Tablo 21. Optimum Faktörlerin Belirlenmesinin Ardından Yapılan Ekimlere Ait Absorbans Verileri	72
Tablo 22. Aydınlatma-Havalandırma Şartlarının Korelatif Etkisinin Araştırılmasında Elde Edilen Absorbans Verileri.....	72
Tablo 23. Optimizasyon Sonrası S-2 Besiyerine Ek Olarak Besin Kaynaklarının bR Sentezi Üzerindeki Etkisinin Araştırılmasında Elde Edilen Absorbans Verileri	73
Tablo 25. A3PS Tekniği ile Elde Edilen bR'ye Ait Veriler	75
Tablo 26. Delipide Edilen bR'ye Ait Veriler.....	76
Tablo 27. NES5 Suşunun Özellikleri.....	92
Tablo 28. CV Ölçümü Gerçekleştirilen Literatürdeki Diğer Çalışmalara Ait Bilgiler.....	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nanobiyoteknoloji ve biyonanoteknoloji çalışmalarının ayırım noktalarını gösteren bir şema	4
Şekil 2. Halofilik arkelerin Tuz Gölü'nde oluşturdukları pembe-kırmızı görüntü	6
Şekil 3. Halofilik arkelerde mor membran yapısını gösteren şema	9
Şekil 4. Mikrobiyal rodopsinler ve fotosentetik merkezlerin absorbsiyon spektrumunda dağılımı	10
Şekil 5. Retinal kromofora sahip membran proteinleri	11
Şekil 6. Bakteriyoruberin sentezi.	11
Şekil 7. Mor membran yapısında bulunan bR	12
Şekil 8. bR'nin ara durumlarının absorbands maksimalleri	15
Şekil 9. bR'nin proton pompalama ve fotodöngüsü.....	16
Şekil 10. Görünür ışıqla (hv) başlayan bR fotodöngüsünde L ve M durumu süresinde gerçekleşen yapısal değişim.....	18
Şekil 11. bR fotodöngü şeması.....	19
Şekil 12. bR'nin kullanıldığı endüstriyel çalışmalardan bazılarının dağılımı.....	22
Şekil 13. bR bazlı hareket sensörü şeması.	23
Şekil 14. Alumina nanokanallar üzerine immobilize edilen bR.....	25
Şekil 15. bR bazlı yapılan holografik çalışma4).	26
Şekil 16. Langmuir-Blodgett metodu ile immobilizasyon görüntüsü.	31
Şekil 17. Elektrostatik self-assembly tekniği ile materyal depozisyonu uygulama şeması	33
Şekil 18. Bazal medya ile karışık kültürlerin inkübasyonuna ait görüntü.....	42
Şekil 19. Çizgi ekim ile elde edilen M kodlu ile izolatlara ait görüntü.....	44
Şekil 20. Optimizasyon sürecinde kültürle ait inkübatör görüntüsü	49
Şekil 21. ATPS metodu ile bR izolasyonunun aşamaları; (a) Kültivasyon sonucunda hücre peleti elde edilmesi, (b) Hücre peletinden saflaştırılmış bR ve delipidasyona kadar olan saflaştırma adımları	52
Şekil 22. Delipide bR'ye ait şeffaf mor görüntü	53
Şekil 23. Beher içerisinde bakır (Cu) elektrotla yürütölen elektroforetik sedimantasyon	56
Şekil 24. El yapımı kuvet içerisinde platin (Pt) elektrotla yürütölen elektroforetik sedimantasyon; solda ITO, sağda porosilikon görölmektedir.....	56
Şekil 25. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan (a) bR-ITO ve (b) bR-porosilikon ürünleri	58
Şekil 26. Ölçümlerin alımında kullanılan üç elektrotlu sistem şeması	59

Şekil 27. (a) ITO üzerine immobilize edilen bR ince filminin elektrokimyasal ölçümü sırasında alınan görüntü, (b) porosilikon üzerine immobilize edilen bR ince filminin elektrokimyasal ölçümü sırasında alınan görüntü.....	59
Şekil 28. Q-1 ve Q-2 katı besiyerlerinde yapılan ekim görüntüleri	60
Şekil 29. Yapılan çizgi ekim sonucunda elde edilen 23 adet saf koloni görüntüsü	61
Şekil 30. Saf izolatların elde edildiği petri görüntüsü	62
Şekil 31. 16S rRNA PCR sonuçlarına göre tek bant sonuç veren 11 izolatın SDS-Page görüntüsü.....	63
Şekil 32. NES izolatlarının taksonomik yakınlıklarının belirtildiği filogenetik ağaç. <i>Methanobacterium formicicum</i> out-group olarak kullanılmıştır.....	64
Şekil 33. S-2 besiyerinde gelişim gösteren NES5 izolatı	65
Şekil 34. NES5 suşunun gram boyama sonucunda immersiyon merceği ile alınan görüntüsü.....	66
Şekil 35. <i>H. salinarum</i> NES5 suşunun TEM görüntüsü	67
Şekil 36. pH optimizasyonunda bR sentezine ait gelişim grafiği	68
Şekil 37. Sıcaklık optimizasyonunda bR sentezine ait gelişim grafiği	69
Şekil 38. Aydınlatma optimizasyonunda bR sentezine ait gelişim grafiği	70
Şekil 39. Havalandırma optimizasyonunda bR sentezine ait gelişim grafiği.....	71
Şekil 40. Besin kaynaklarının bR sentezi üzerindeki etkisi	73
Şekil 41. Besin kaynaklarının hücre gelişim üzerindeki etkisi	73
Şekil 42. (a) NES5 izolatından saflaştırılan bR absorbans grafiği, (b) NES5 izolatı t arafından aydınlatma optimizasyonu aşamasında sentezlenen bacterioruberin grafiği	74
Şekil 43. (a) Bacteriorhodopsin saflaştırma aşamasında elde edilen bacterioruberin görüntüsü, (b) Nanodrop UV ölçüm plakasında bacterioruberin (solda) ve bR (sağda) görüntüsü.....	74
Şekil 44. (a) Sıvı iki fazlı sistem tekniğinde fazlar arasında toparlanan mor membran görüntüsü, (b) Arafazdan toplanan PM-deiyonize su süspansiyonu.....	75
Şekil 45. (a) Ultrasantrifüj ile yıkama sonrası mor membran peleti, (b) Saflaştırılmış mor membran bR solüsyonu, (c) Delipide bR solüsyonu, (d) Saflaştırılmış bR'nin quartz spektrofotometre küvetindeki görüntüsü	76
Şekil 46. NES kodlu izolatlardan saflaştırılan bR proteinlerinin SDS-Page görüntüsü.....	77
Şekil 47. EPS ile ITO alttaşa immobilize edilen bR ince filme ait absorbans grafiği.....	78
Şekil 49. EPS tekniği ile ITO üzerine immobilize edilen saflaştırılmış bR filmi XRD kırınım deseni.....	79

Şekil 50. Damlatma-kurutma tekniği ile lamel üzerine immobilize edilen saflaştırılmış bR filmi XRD kırınım deseni	79
Şekil 51. ITO ve porosilikon üzerine immobilize edilen bR ince filmlerinin XPS grafiği	80
Şekil 52. bR filmlerinin C 1s bağlanma enerjisi grafiği.....	80
Şekil 53. bR filmlerine ait N 1s bağlanma enerjisi grafiği.....	81
Şekil 54. bR filmlerine ait O 1s bağlanma enerjisi grafiği.....	81
Şekil 55. ITO-bR ince filmlerinin Raman analizi	82
Şekil 56. Porosilikon-bR ince filmlerinin Raman analizi	82
Şekil 57. Bakır elektrotu ile beher içerisinde EPS tekniği ile ITO üzerine immobilize edilen bR ince filminin görüntüsü.....	83
Şekil 58. Platin elektrot ile el yapımı eletroforez küvet içerisinde EPS tekniği ile ITO üzerine immobilize edilen bR ince filminin görüntüsü.....	83
Şekil 59. Platin elektrot ile el yapımı eletroforez küvet içerisinde EPS tekniği ile porosilikon üzerine immobilize edilen bR ince filminin görüntüsü	84
Şekil 60. Porosilikon üzerindeki bR filmi yakınlaştırılmış görüntüsü	84
Şekil 61. Saflaştırılmış bR'ye (mor membran yamaları) ait geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü.....	85
Şekil 62. Saflaştırılmış bR'nin 10.0k X yakınlaştırılmış TEM görüntüsü	85
Şekil 63. Saflaştırılmış bR'nin 20.0k X yakınlaştırılmış TEM görüntüsü	86
Şekil 64. (a) ITO üzerine damlatma-kurutma tekniği ile immobilize edilen bR ince filmine ait profilometri görüntüsü, (b) ITO üzerine EPS tekniği ile immobilize edilen bR ince filmine ait profilometre görüntüsü	87
Şekil 65. Boş ITO yüzey profilometri görüntüsü	87
Şekil 66. Porosilikon üzerine EPS tekniği ile immobilize edilen bR ince filmine ait profilometri görüntüsü	88
Şekil 67. Boş porosilikon profilometri görüntüsü	89
Şekil 68. ITO-bR ince film CV grafiği	90
Şekil 69. Porosilikon-bR ince film CV grafiği.....	90
Şekil 70. (a) Zeng <i>et al.</i> (2006) tarafından TEM ile alınan <i>H. salinarum</i> görüntüsü, (b) Çalışmamızda TEM ile alınan <i>H. salinarum</i> görüntüsü	92
Şekil 71. Halojen ampul kullanılan örneklerden alınan absorbans grafiğinde bacterioruberinin karakteristik pik görüntüsü	94
Şekil 72. Optimum havalandırma şartlarının araştırıldığı çalışmada bR sentezlerinin hücre gelişimlerine oranları. bR sentezinin halofilik arke oksijen stresine girdiğinde iyileştiği görülmektedir.	94

Şekil 73. Optimizasyon işlemleri süresince elde edilen bR miktarları.....	96
Şekil 74. (a) Brizzolara <i>et al.</i> (1995) tarafından yapılan çalışmada elde edilen XPS sonuçları. (b) Çalışmamızda elde edilen XPS sonuçları.	98
Şekil 77. (a) ZnO üzerine immobilize edilen bR'nin SEM görüntüsü (Kumar <i>et al.</i> 2016), (b) çalışmamızda ITO üzerine immobilize edilen bR'nin SEM görüntüsü.	101
Şekil 78. (a) Einati <i>et al.</i> (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada alınan CV voltamogramı, (b) 10 mM fosfat tamponu KH_2PO_4 pH 7,1 eklenmiş 100 mM Na_2SO_4 elektrolit içerisinde yürütülen çalışmamızda gerçekleştirilen ölçüm sonucunda alınan CV voltamogramı.	102



KISALTMALAR DİZİNİ

A3PS	: Sıvı üç fazlı sistem
AAO	: Anodik aluminyum oksit
APS	: Alkalın fosfat tamponu
Arg	: Arjinin
Asn	: Asparjin
Asp	: Aspartat
ATO	: Antimon kalay oksit
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPS	: Sıvı iki fazlı sistem
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bR	: Bacteriorhodopsin
CHAPS	: (3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate)
ChR	: Channelrhodopsin (Klamirodopsin)
CTAB	: cetyltrimethylammonium bromide
CV	: Dönüşümlü voltametri
DAYTAM	: Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
DDI	: Çift distile su
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNase	: Deoksiribonükleaz
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EPS	: Elektroforetik sedimantasyon
ESA	: Elektrostatik self-assembly
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GLS	: Glikolipid sülfat
Glu	: Glutamat
GPCR	: G-protein eşli reseptörü
hR	: Halorhodopsin
ILTPS	: İyonik likit iki fazlı sistem
ITO	: İndiyum kalay oksit
LB	: Langmuir-Blodgett
LbL	: Layer-by-layer
Lys	: Lisin
nA	: Nanoamper

ngr	: Nanogram
NP	: Nanopartikül
pA	: Pikoamper
PAH	: poly(allylamine hydrochloride)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDAC	: poly(dimethyldiallylammonium chloride)
PEI	: poly(ethylenimine)
PET	: polyethylene terephthalate
PGP	: Fosfatidil gliserol fosfat
PLL	: poly-L-lysine
PM	: Mor membran
POAS	: poly(o-anisidine)
PPY	: poly(pyrrole)
pR	: Phoborhodopsin
PRG	: Proton bırakma grubu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-Page	: Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi
SEM	: Taramalı elektron mikroskopi
SGU	: Sukroz gradyant tekniği
SnO₂	: Kalay oksit
sR	: Sensör rodopsinler
STE	: Sodyum klorid Tris EDTA
TBE	: Tris borat EDTA
TE	: Tris EDTA
TEM	: Geçirmeli elektron mikroskopi
TEMED	: Tetrametiletildiamin
Thr	: Threonin
TiO₂	: Titanyum dioksit
UV-Vis	: Ultraviyole görünür spektrofotometri
XPS	: X-ışını fotoelektron mikroskopi
XRD	: X-ışını kırınım spektroskopisi
YÜTAM	: Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
CNM	: Karbon nanomembran
ZnO	: Çinko oksit

GİRİŞ

21. yy'da teknolojik araç ve sistemlerin hayatımıza sağladığı kolaylıklar göz ardı edilemez boyuttur. Gordon Moore'un öngördüğü üzere elektronik teknoloji, günden güne algoritmik bir şekilde gelişim göstermektedir (Moore 1965). Bu ilerlemenin paralelinde, endüstri ve üretim her geçen gün genişlemektedir. Fakat bu gelişmeler beraberinde; doğal kaynakların tükenmesi, çevre kirliliği, küresel ısınma gibi çok önemli dezavantajlarla karşı karşıya kalmamıza sebep olmaktadır. Dünyamızın geleceğini etkileyen ve tüm yaşam formları için tehlikeler içeren bu problemlerin aşılması için, bilim dünyası daima yeni çözümler üretme arayışında olmuştur. Bu perspektif dahilinde biyo ve biyo-uyumlu materyallerin endüstriyel üretim aşamalarında kullanımlarının artırılması ve bu sayede karbon ve su ayakizlerinin en aza indirgenmesi, son yıllarda yapılan çalışmaların büyük kısmının odak noktasını oluşturmaktadır. Otomotivden bilgisayar teknolojilerine, gıdadan tekstile, tarımdan medikale kadar birçok alanda kullanılan biyomoleküller, endüstriyel açıdan büyük öneme sahiptir. Ayrıca biyoloji ve nanoteknoloji bilim dallarının birleşmesinden meydana gelen biyonanoteknoloji başlığı altında moleküler elektronik cihazlar geliştirme çalışmaları da hızla artmaktadır (Renugopalakrishnan *et al.* 2006; Knoblauch *et al.* 2014; Karadayı *et al.* 2021).

Bacteriorhodopsin (bR), belirli halofilik arkeler tarafından sentezlenen bir integral membran proteindir. Proton transportasyonundan sorumlu bu protein, hücre çeperinde oluşturduğu proton gradyanı sayesinde besin ve oksijen kaynaklarının tükendiği durumlarda gereken ATP sentezinin gerçekleşmesinde önemli bir enstrüman olarak kullanılmaktadır. İsminden anlaşılacağı üzere yapısında bulunan retinal sayesinde fotoduyarlı bir protein olan bR'nin proton pompalama mekanizması ve dolayısıyla fotovoltaj jenerasyonu bilimsel çalışmalarda ilgi odağı olmasını sağlamıştır. Ayrıca bR, halofilik arkelerin zorlu yaşam ortamlarının şartlarına ayak uydurabilecek dayanıklılığı, farklı absorpsiyon maksimallerinden oluşan fotodöngüsünden kaynaklı fotokromizmi, fotokromik biyomateryaller arasında yüksek kuantum verimi (~%70) ve yüksek kullanım ömrüne (10^6 fotodönüşüm) sahip olması bu proteinin teknolojik araçlarda kullanılmasına imkan tanımaktadır. Bahsedilen eşsiz özellikleri ışığında bR; fotovoltajik hücreler, fotosensörler, holografik hafıza ve işlemciler, 3-D hacimsel hafızalar, yapay retina gibi çeşitli teknolojik uygulamalarda yer almaktadır (Grzesiek and Dencher 1988; Birge *et al.* 1999; Hampp 2000; Imhof *et al.* 2014; Li *et al.* 2018).

Bu çalışmalarda kullanılan doğal veya mutant bR ürünlerinin üretimi; gerek halofilik arkelerin kültivasyonu, gerekse bR'nin izolasyon işlemlerinin zor şartları ve düşük verimi dolayısıyla kısıtlanmaktadır. Bu sebepler göz önüne alındığında özel kimya şirketleri tarafından ticari üretimi yapılan bR'nin astronomik fiyatları daha kolay anlaşılabilir (Pfeifer *et al.* 2019). Teknik çalışmalarda kullanılması amacıyla bR üretimini daha verimli hale getirmeye yönelik literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. bR'nin teknik çalışmalarda kullanılmasında; izolasyon ve immobilizasyon olmak üzere iki temel aşama bulunmaktadır. Uygulamanın niteliğine dayalı olarak mor membran (PM) veya bacteriorhodopsin ürünleri; sukroz gradyanı, sıvı iki fazlı sistem (ATPS), diyaliz gibi teknikler kullanılarak elde edilmektedir (Oesterhelt and Stockenius 1973; Happe and Overath 1976; Sumper *et al.* 1976; Tan 1996; Stuart 1998; Shiu *et al.* 2013). İzole edilen bR ve PM ürünleri daha sonra teknik çalışmalarda kullanılmak üzere ITO, TiO₂, Au, Pt gibi alttaşlara, Langmuir-Blodgett (LB), Elektroforetik sedimantasyon (EPS), Layer-by-layer self-assemble (ESA-LbL) ve diğer metodlar vasıtasıyla immobilize edilmektedir (Li *et al.* 2010; Yen *et al.* 2010; Allam *et al.* 2011; Al-Arife *et al.* 2011; Guo *et al.* 2014; Moleirad and Rezaeian 2014; Lu *et al.* 2016; Okada-Shudo *et al.* 2016; Li *et al.* 2018). bR, yüksek dayanıklılığı sayesinde bu uygulamalarda uzun süre kullanılabilir.

Ayrıca, biyomateryallerin teknolojik uygulamalarda kullanımının ekonomik ve çevresel bir değere dönüştürülmesinin ilk basamağı üretim şartlarının optimizasyonu ve standardizasyonudur. Optimizasyon; protein, enzim, amino asit gibi belli başlı biyolojik kaynaklı ürünlerin üretiminde fiziki çevre şartları, biyolojik ve kimyasal besin miktarı, saflaştırma ve izolasyon gibi parametrelerin en yüksek verim sağlayacak değerlerinin araştırılmasına dayalıdır. Optimizasyon işlemlerinin endüstriyel düzeydeki en önemli hedefi; eldesi ve kompozisyonu zor olan biyomateryallerin ekonomik verimliliğini artırarak kullanım alanlarını genişletmektir (El-Sayed *et al.* 2002; Ghasemi *et al.* 2008; Manikandan *et al.* 2009; Seyedkarimi *et al.* 2015; Shiu *et al.* 2015; Mahler *et al.* 2018; Jeganathan *et al.* 2019).

Bu çalışmada, Tuz Gölü'nde bulunan ve ekonomik açıdan oldukça kıymetli olan bu biyomateryalin üretim ve kullanım süreçlerinin verimli hale getirilmesi amacıyla optimizasyon metodlarını gerçekleştirmek, bR ve PM'yi izole ederek sonraki teknik aşamalarda kullanıma hazır ürün haline getirmek ve son olarak teknik uygulamalarda kullanılacak bR bazlı komponentleri immobilize ederek hazırlamak vasıtasıyla Türkiye'nin doğal bir kaynağının katma değer haline getirilmesi temel hedef konumundadır.

KURAMSAL TEMELLER

Biyomoleküler Elektronik ve Biyonanoteknoloji

Biyomoleküler elektronik teriminin tanımlanmasında iki ayrı anlam karşımıza çıkmaktadır. İlk olarak elektronik biliminin elektronlar ve elektron akımlarıyla ilişkili konuları açıkladığı ele alınacak olursa, biyomoleküler elektronik; biyomoleküller tarafından gerçekleştirilen elektronsal işlemler üzerinde yoğunlaşan bir bilim dalı olarak tarif edilmelidir. Sitokromlar tarafından gerçekleştirilen veya fotosistem ve klorofiller arasında meydana gelen elektron transferi ve yük ayrımı, bu işlemlere örnek olarak verilebilir. Öte yandan, biyomoleküler elektronik kavramından asıl kastedilen; biyomoleküllerin elektronik cihaz ve uygulamalarda birer komponent olarak kullanılmasıdır. Biyosensörler, fotoçeviriciler gibi biyomolekül bazlı sistemler bunlara birer örnektir (Vsevolodov 1998; Walczak 2009).

En basit türler dahil canlılar, sürekli etkileşim halinde oldukları çevreden gelen sinyal ve bilgileri almak ve gerektiğinde kullanmak için birçok karmaşık mekanizmaya ihtiyaç duymaktadır. Canlılarda gerçekleşen işlemler ve bilgi depolama kabiliyeti dijital bilgisayarlarla bu açıdan benzerlik göstermektedir. Mikroskopik boyutlarda ise mikro elektronik cihazlarda olduğu gibi elektron ve iyonlar sayesinde bu işlemler meydana gelmektedir. Elektronik ve canlı sistemler arasındaki en belirgin fark; moleküler uyum ve tanılamanın canlılarda sürekli bir şekilde işlevsel oluşudur. Biyomoleküler elektroniğin en önemli icatlarından biri; hali hazırda günlük hayatımızda indikatör ve dedektör gibi amaçlarla kullanılmakta olan biyosensörlerdir. Nihai hedefinde daha gelişmiş biyobilgisayarların üretimi olan biyomoleküler elektronik bilim dalı; elektron ve iyonların, bilginin taşınımında kullanılan biyolojik ve biyolojik olmayan materyaller ile üretilmiş hibrid araçlar geliştirme üzerinde yoğunlaşmaktadır. Mikroelektronik komponentlerin hangi boyutlara kadar minyatürize edilebileceği ve gerçekleştirilebilecek çözünürlük limitleri bu cihazların üretimi konusunda en önemli faktörlerdir (Vsevolodov 1998).

Biyolojik materyallerin teknolojik cihazlarda kullanımında karşımıza çıkacak; boyut, stabilite, yanıt süresi, enerji tüketimi gibi zorlukların aşılması yapılan araştırmaların en önemli unsuru konumundadır. Bunun yanı sıra; biyolojik malzemelerin inorganik materyaller ile bir araya getirilirken çalışırlığını yitirmemesi ve istenen yanıtın maksimize edilmesi de başka zorluklar olarak karşımıza çıkmaktadır. Nanoteknoloji ve biyoteknoloji arasındaki etkileşim ve yapılan ortak çalışmalar, nano boyutlarda daha özgün cihazların üretiminin önünü açacak

potansiyele sahiptir. Bu iki disiplinin bir arada çalışması sayesinde; daha az biyolojik numune ile tanılamayı ve bu sayede hastaların daha az acı duymasını sağlayacak lab-on-a-chip gibi yeni tıbbi tekniklerin geliştirilmesi, hedef odaklı ilaçlar ve doku mühendisliği gibi teknolojileri içine alan nanobiyoteknoloji peptidler ve oligomerler gibi biyolojik materyallerin moleküler elektronik veya nanoelektromekanik cihazlarda kullanımını mümkün kılan biyonanoteknoloji alanları gelişmektedir (Şekil 1.) (Gazit and Mitraki 2007; Walczak 2009).



Şekil 1. Nanobiyoteknoloji ve biyonanoteknoloji çalışmalarının ayrım noktalarını gösteren bir şema (Gazit and Mitraki 2007)

Türkiye’deki Tuz Gölü ve Habitatı

1.665 km² yüzölçümü ile Türkiye’nin ikinci büyük gölü olan Tuz Gölü, %30’un üzerindeki tuz yoğunluğu sayesinde dünyadaki en tuzlu göller arasında bulunan hipertuzlu bir thalassohaline göldür. Mesozoik dönemin sonunda deniz suyunun iç kısımlara ulaşması ve Eosen devrinde bu bölgenin tekrar denizden ayrılmasının Tuz Gölü’nü meydana getirdiği düşünülmektedir (Mutlu *et al.* 2008; Ram-Mohan *et al.* 2016; İspirli *et al.* 2019; Kırtel 2021). Orta Anadolu’da kurak bir bölgede bulunan Tuz Gölü’nde yıllık yağış 300 mm/yıl civarında olmasından dolayı gölde bulunan su katmanı yüksekliği kış aylarında aldığı yağışlar ve yeraltı suları ile 1 m’ye yaklaşırken, yaz aylarında gölün yarısından fazlasında su kurumaktadır. Göl tabanında bulunan tuz katmanının kalınlığı 30 cm’ye kadar değişkenlik göstermektedir. Yıllık tuz üretiminin büyük kısmını karşılayan Tuz Gölü’nde endüstriyel öneme sahip ve biyoteknolojik çalışmalarda kullanılması mümkün olan ve yılın belirli dönemlerinde göle kırmızı-pembe görünüm veren halofilik canlılar da bulunmaktadır (Şekil 2.) (İspirli *et al.* 2019; Kırtel 2021).

Halofilik Arkeler

Omurgalı canlılar için sınır olan 1,5 M tuz yoğunluğu ılımlı halofil canlılar için gereken yoğunluğun başlangıç sınırındır. 1,5-3,0 M yoğunlukta haloversatil bakteriler, daha yüksek yoğunluklarda, (3,5-4,5 M NaCl) ve 35-50 °C sıcaklığa sahip ortamlarda ise halofiller kemoorganotrof olarak yaşam sürmektedir. Bazı türler tek karbon kaynaklı inorganik ortamlarda üreyebilmekle birlikte çoğunluğu aminoasit veya karbonhidratları C kaynağı olarak kullanmaktadır (Özcan 2004; Kahraman 2008).

Yüksek tuz yoğunluğuna sahip ortamlarda obligat aerob veya fakültatif anaerob halde yaşayan haloarkeler *Archaea* domainine ait olmalarına karşın *Bacteria* domaini ile yapısal olarak yakın benzerlikler taşımaktadır. Morfolojik yapıları genel olarak çubuk, kok veya düzlemsel pleomorfik haldedir. Doygunluğa varan seviyelerde, 10^8 hücre/ml yoğunluğa kadar gelişebilen ve gelişim hızları düşük olan halofilik arkeler; %12 ve üzeri tuz yoğunluğuna sahip ortamlarda yaşamakla birlikte, çoğunluğu %20-25 tuz ortamlarına adapte olmuş haldedir. Halofilik arkeler; tuz gölleri, tuzlalar, ham petrol ile kirlenen dere yatakları gibi hipertuzlu ortamlardaki yüksek iyonik yoğunluğa karşı, hücre membranı yapısında bulunan aminoasitlerin negatif yükü sayesinde dayanıklılık sağlamaktadır. Polar lipidlerden meydana gelen bu membran aynı zamanda halofilik arkelerin ayırt edici özelliğidir. Doygun tuz ortamlarındaki (5-6 M) yüksek ozmotik basınçla başa çıkmak için hücre içinde dışa kıyasla K^+ biriktirmelerinin yanı sıra, Cl^- iyonlarını klor pompası (Halorodopsin) vasıtasıyla hücre içlerinde depolamaktadır. KCl'ün oksidatif letal faktörlere karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir. Yüksek tuz ortamlarına tamamen adapte olan haloarkelerde bulunan çoğu enzim 3-4 M KCl ve NaCl yoğunluğuna sahip ortamlarda aktif ve stabil haldedir (Gao 2004; Özcan 2004; Fendrihan *et al.* 2006; Singh and Singh 2018).

Halofilik arkelerin filogenetik sistematğinde; tanımlayıcı bazı glikolipitlerin birkaç cinsten birden bulunabilmesi veya aynı cins üyelerinin farklı glikolipitlere sahip olabilmesi sebeplerinden dolayı 16S rRNA dizi analiz yöntemi, polar lipid kompozisyon yöntemine kıyasla daha çok tercih edilmektedir.

Halobacteriales takımı altında yeni tanımlanan her taksonda;

- Pigmentasyon
- Gram tepkimesi
- pH aralığı
- Sıcaklık aralığı
- Gelişimde tek C kaynağı kullanılabilmesi

- Polar lipid karakterizasyonu
- 16S rRNA dizi analizi ve DNA G+C verileri gibi faktörler incelenmektedir (Oren *et al* 1997; Özcan 2004; Kahraman 2008).

Bünyelerinde bulunan karotenoid pigmentleri (C₄₀, C₅₀) dolayısıyla tuz yoğunluğu yüksek ortamlarda kırmızı-pembe renge sebep olan haloarkelerin, oksijen kaynaklarının kısıtlı olmadığı durumlarda mor membran sentezlemediği bilinmektedir (Şekil 2). Buna karşın besin ve oksijen kaynaklarının tükendiği ve dolayısıyla oksidatif fosforilasyonun düştüğü durumlarda sentezlediği mor membran ve bitkilerdeki klorofil ile aynı işlevi gören retinal protein sayesinde ışık enerjisinden faydalanarak enerji konversiyonu gerçekleştirmektedir. Bakteriyel fotosentezden sorumlu mor membranda yer alan karotenoidler ise halobakterilere fotokoruma özelliği sağlamaktadır. Yüksek tuz yoğunluklarına adaptasyonun sağladığı eşsiz özellikler sayesinde haloarkeler birçok biyoteknolojik çalışmalarda yer almaktadır. Sentezledikleri proteaz, jelatinaz, DNaz, lipaz, ksilanaz, amilaz gibi hidrolitik enzimler; bacteriorhodopsin (bR) ve halorhodopsin (hR) gibi membran proteinleri; polihidroksialkanoat gibi polimerler ve ekzopolisakkaritler; kimya, ilaç, gıda, kozmetik, tarım, hayvancılık ve elektronik gibi daha birçok teknolojik çalışmada araştırılmaktadır. Ayrıca haloarkeler, biyolojik olarak direkt gıda fermentasyonu veya biyoremediasyon uygulamalarında kullanılmaktadır. (Sumper *et al.* 1976; El-Sayed *et al.* 2002; Xu 2003; Gao 2004; Kumar *et al.* 2007; Dyall-Smith 2008; Manikandan *et al.* 2009; Kalenov *et al.* 2016; Mahler *et al.* 2018)



Şekil 2. Halofilik arkelerin Tuz Gölü'nde oluşturdukları pembe-kırmızı görüntü

Halobacterium salinarum

Archaea domain, *Euryarchaeota* filum, *Halobacteria* sınıf, *Halobacteriales* ordo, *Halobacteriaceae* familyasına bağlı *Halobacterium salinarum*; aminoasit kaynaklarına sahip ve oksijen çözünürlüğü düşük, yüksek tuz doygunu ortamlarda yaşam süren bir ekstremofil olmasının yanında, bR üzerine yapılan çalışmalarda en bilinen halofilik arke türüdür (Tablo 1). Yüksek aydınlatma ve sıcaklık şartlarına da ayak uydurabilen bir ekstremofildir. Bunun gibi stresli durumlarda oksidatif fosforilasyondan fotosentetik sisteme geçen *H. salinarum*, gereken ATP'yi hücre çeperindeki mor membran (PM) adı verilen yamalarda bulunan bR tarafından fotonun absorbe edilmesi ile başlayan bir fotodöngü sonucunda intraselülden stoplazmik tarafa taşınan protonlardan oluşan elektrokimyasal gradyant sayesinde kemiozmotik olarak sentezlemektedir. İlk kez tamamen sekanslanan halobakteriyel genom, bir *H. salinarum* suşu olan NRC-1'e aittir. Tek büyük bir kromozom, iki büyük ve birkaç küçük plazmidten oluşmakta olup, 2,571,000 baz çiftine sahiptir. Genom boyunca atlayan transpezonlara ve aktif ek sekansa sahip olan *H. salinarum*, genetik olarak stabil olmamasından dolayı biyokütle üretim verimi düşüktür. Fizyolojik ve morfolojik tutarsızlığından dolayı kültürasyon işlemleri zorlaşmaktadır (Birge *et al.* 1999; Özcan 2004; Fendrihan *et al.* 2006; Dyall-Smith 2008; Ghasemi *et al.* 2008; Seyedkarimi *et al.* 2015; Kalenov *et al.* 2016).

Tablo 1. *Halobacterium salinarum*'un Karakteristik Özellikleri (Yang *et al.* 2006)

- Hücre morfolojisi	- Rod
- Pigmentasyon	- Kırmızı-pembe
- Optimum gelişim NaCl	- 3,5-4,5 M
- Optimum gelişim MgCl ₂	- 0,05-0,1 M
- Optimum gelişim pH	- 5,5-8,0
- Sıcaklık aralığı	- 20-55 °C
- DMSO ile anaerobik gelişim	- Evet

Membran Proteinleri

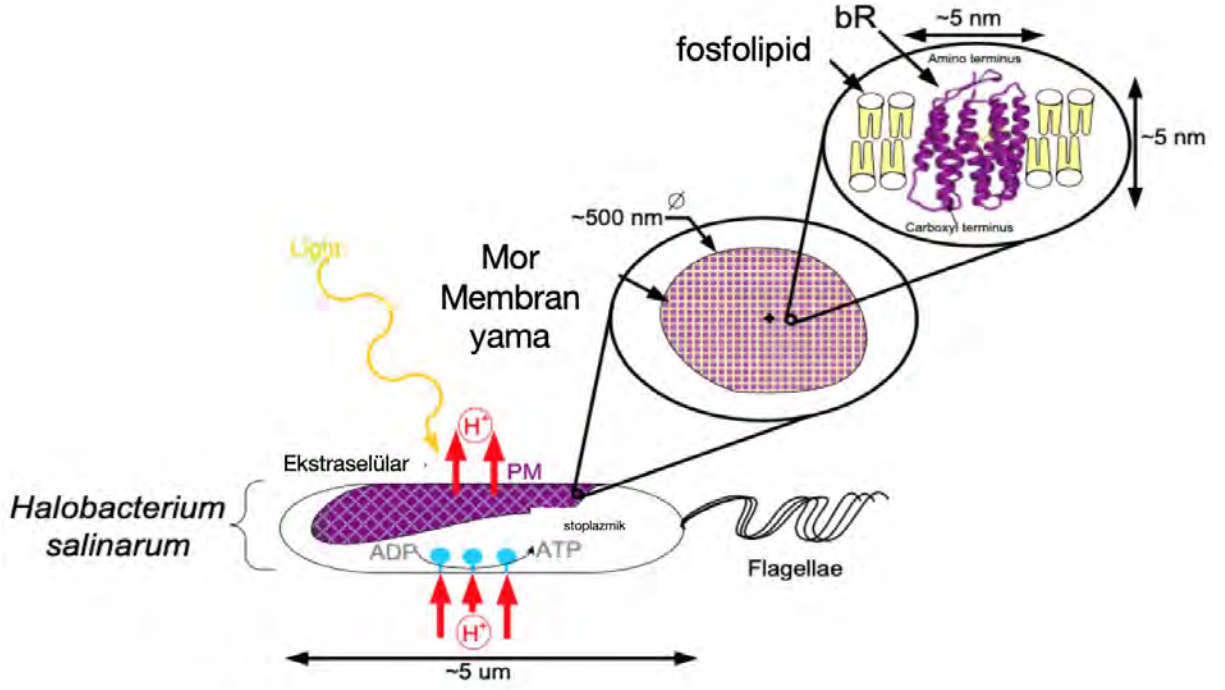
Bilayer dizilimli yapılarında genellikle polar kafa grubu ve hidrofobik kuyruğa sahip halde bulunan fosfolipidler sayesinde membranlar, doğal bir bariyer görevi üstlenmektedir. Membranların içerisinde mevcut olan özel proteinler sayesinde; sinyal toplama, enerji konversiyonu, hücre çeperindeki iyon ve moleküllerin taşınımı, ozmotik regülasyon gibi birçok elementel hayati görev gerçekleştirilmektedir. Membran proteinleri genel olarak integral ve periferik olmak üzere iki ayrı sınıfta incelenmektedir. Çift katmanın yüksekliği boyunca ve bu katmanlardan yalnız biriyle ilişik şekilde bulunan monotopik proteinler, integral membran

proteinleri olarak tanımlanmaktadır. Öte yandan periferel membran proteinleri, elektrostatik özellikleri sayesinde katmanlar ve integral membran proteinleri ile etkileşim içerisinde. Farklı iki ortam arasında geçiş ve bağlantı sağlaması dolayısıyla bir kapı statüsünde olması, membran proteinlerini biyoteknolojik çalışmalarda ön plana çıkarmaktadır. Membran proteinleri arasında üzerinde en çok çalışılan proteinlerden biri bacteriorhodopsindir (Rajamani 2003; Rhinow 2008; Curnow 2009; Krishnamani 2010).

Mor Membran

Bazı halofilik arkelerin hücre çeperlerinde ATP üretimi için sentezledikleri ve hücre içinden, hücre dışına proton taşınımından sorumlu mor membranın kristalin yapısını; bR trimerlerinden oluşan iki boyutlu altıgen kafesler ve lipidler oluşturmaktadır. Hücre yüzeyinin yaklaşık %80'ini kaplayan mor membranın yapısında 75/25 oranında bR ve lipid bulunmaktadır (Şekil 3.) (Luecke *et al.* 1999; Neutze *et al.* 2002; Gao 2004; Hillebrecht 2005; Pandey 2006; Shiu *et al.* 2014). PM'nin batmazlık yoğunluğunun $1,18 \text{ g/cm}^3$ ve kırınım (refraksiyon) indeksinin 1,44-1,55 olduğu saptanmıştır. 3M NaCl gibi yüksek iyonik dayanıklılığa sahip olan mor membran, katı durumda 140°C , sıvı durumda ise 80°C 'ye kadar stabilitesini koruyabilmektedir (Xu 2003; Ahmadi and Yeow 2011; Hıdıroğlu 2015).

bR trimerlerine bağlı bir şekilde mor membranın yapısını oluşturan lipidler genellikle polar halde bulunmaktadır. Non-polar olan squalene dışında PM'de var olan lipidler; fosfatidil gliserol fosfat (PGP) ve glikolipit sülfat'tır (GLS). Yaklaşık %60 fosfolipid, %30 glikolipid ve %10 nötr lipid dağılıma sahip PM lipidleri kendi içlerinde de bulundukları konuma göre sınıflandırılmıştır. Buna göre; trimer dışı-PGP, trimer dışı-squalene, trimer içi-hücre dışı GLS ve trimer içi hücre içi PGP'dir. PM lipidlerinin elimine edilmesiyle birlikte oluşan yapısal alterasyonun foto-döngü kinetiklerinde değişim meydana getirdiği, bundan dolayı lipidlerin foto döngü ve proton pompalama mekanizmasına büyük katkı sağladığı anlaşılmıştır (Gao 2004; Chon and Chu 2013). Işık altında PM'de bulunan her bR molekülü kullandığı 100 kuantum karşılığında saniyede ortalama 100 proton pompalamaktadır. Grzseiek ve Dencher (1988) tarafından yapılan çalışmaya göre 1 ışık kuantumu 0,8-1,2 protonun taşınmasında kullanılmaktadır. Bir PM'de 50 ila 150 bin bR molekülü olduğu düşünüldüğünde, bu yapının ne kadar dayanıklı olduğu karşımıza çıkmaktadır (Vsevolodov 1998).

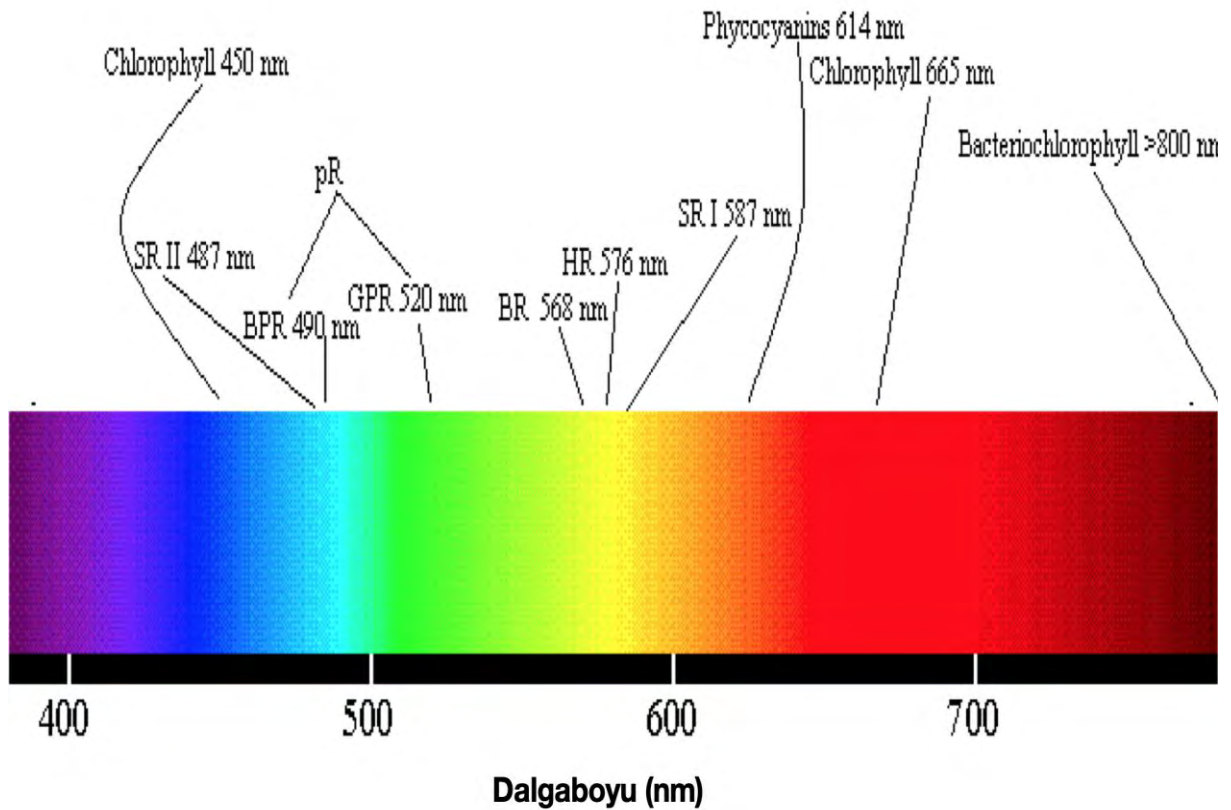


Şekil 3. Halofilik arkelerde mor membran yapısını gösteren şema (Walczak 2009).

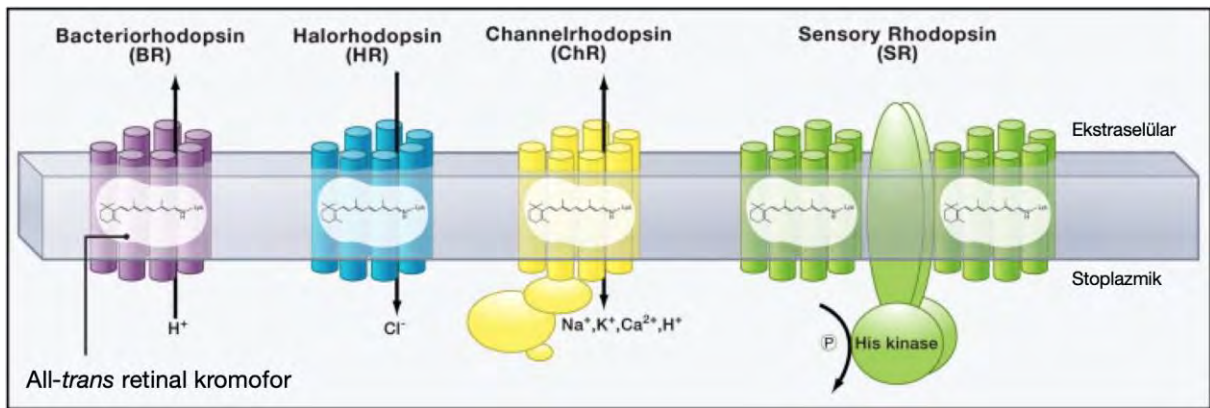
Bakteriyel Rodopsinler

Tek hücreli canlılarda rodopsinin varlığı 3 milyar yıl öncesine dayanmaktadır. 1973'te Stockenius tarafından keşfedilen bR, görsel rodopsinler de dahil olmak üzere bütün rodopsinlerin atası olan ilk rodopsin olma ihtimali taşımaktadır. Işık enerjisini kimyasal enerjiye çevirme gereksinimi duyan canlılarda çoğunlukla bulunan rodopsin, yüksek organizasyonlu gelişmiş canlılarda çevredeki cisimlerden yansıyan ışığı algılayıp beyine iletilecek sinyallere dönüştürmektedir. Tek hücreli canlılarda ise ışığa bağlı fotosensörler ve ATP jenerasyonunda önemli rol oynayan iyonların taşıyıcısı veya fizyolojik ozmotik basınç düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. Yapısal olarak opsin; genellikle apoprotein ve retinal kromofordan oluşan görüş proteinidir. G-protein eşli reseptörlerin ortak özelliği olan 7 transmembran α sarmalı ve hidrofobik iç kısımdaki oyukta bulunan retinalden oluşan tek polipeptid zinciridir. Işığın absorpsiyonu ile birlikte bir enzim dizisini tetikleyerek görüşün ilk olayı olan retinal izomerizasyonu gerçekleşmektedir (Şekil 4). Tip 1; mikrobiyal rodopsin ve tip 2; gelişmiş çok hücrelilerde bulunan rodopsin olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Mikrobiyal rodopsinler yaygın olarak enerji dönüşümü ve iyon pompası görevlerini yerine getiren proteinlerdir (Vsevolodov 1998; Rajamani 2003; Syed 2011). Bacteriorhodopsin ve proteorodopsin bunlar arasında önemli örneklerdir. bR'nin ardından yapılan keşifler sayesinde; bakteriyel rodopsin türünün bR ile sınırlı olmadığı gözlemlenmiştir. İlk çalışmalarda dışa dönük sodyum pompası olarak detaylandırılan fakat daha sonra içe dönük klor pompası olarak karakterize edilen halorhodopsin (hR), bR'nin ardından keşfedilen ilk mikrobiyal rodopsindir.

H. salinarum'da klor miktarının ve ozmotik basınç sayesinde hücre gelişiminin düzenlenmesinden sorumlu protein halorhodopsindir. Hücre membranında klor pompası görevini üstlenen halorhodopsin, bR'den daha az miktarda bulunmaktadır. hR retinali alfa sarmallarının arasında bulunmaktadır. Fotonla uyarılmasıyla içe dönük çalışan bir anyon pompası olan hR, mavi-mor ışık dalga boylarında klor transferi gerçekleştirirken yeşil ışık dalga (500 nm üstü) boyu klorun pompalama miktarını düşürmektedir. Sarı ışık altında ise tamamen aktivitesini yitirmektedir. Retinalin -cis kısmının aktif hale gelmesi ile birlikte, C ve G sarmalları klorun geçeceği yolun oluşmasında eşzamanlı olarak harekete geçmektedir. İyonun geçtiği miktarda bu kanalın açılması ve tekrar kapanması klorun geri gelmesini engellemektedir. Kanalın bu şekilde açılıp kapanması kinetik bir valf oluşturmaktadır. Bunun yanında; karanlık algılayıcı ve düzlemsel yönelimi sağlayan chlamyrodopsin (ChR-channelrhodopsin), phoborhodopsin (pR) ve halobakterinin ışığın şiddetine göre yönelmesini sağlayan aktivasyon reseptörü ve sinyal aktarıcı olarak tanımlanan sensör rodopsinler de (sR) bulunmaktadır (Şekil 5). Mikrobiyal rodopsinlerin bir diğer örneği de; okyanuslarda fotosentetik hayatın kaynağı olan proteorhodopsindir. Doğada rodopsin sayesinde fototrofik bakteriyel canlıların, normal fotosentez yapan canlılara göre çoğunlukta olduğu düşünülmektedir (Vsevolodov 1998; Wickstrand *et al.* 2015; Kamwa 2018).



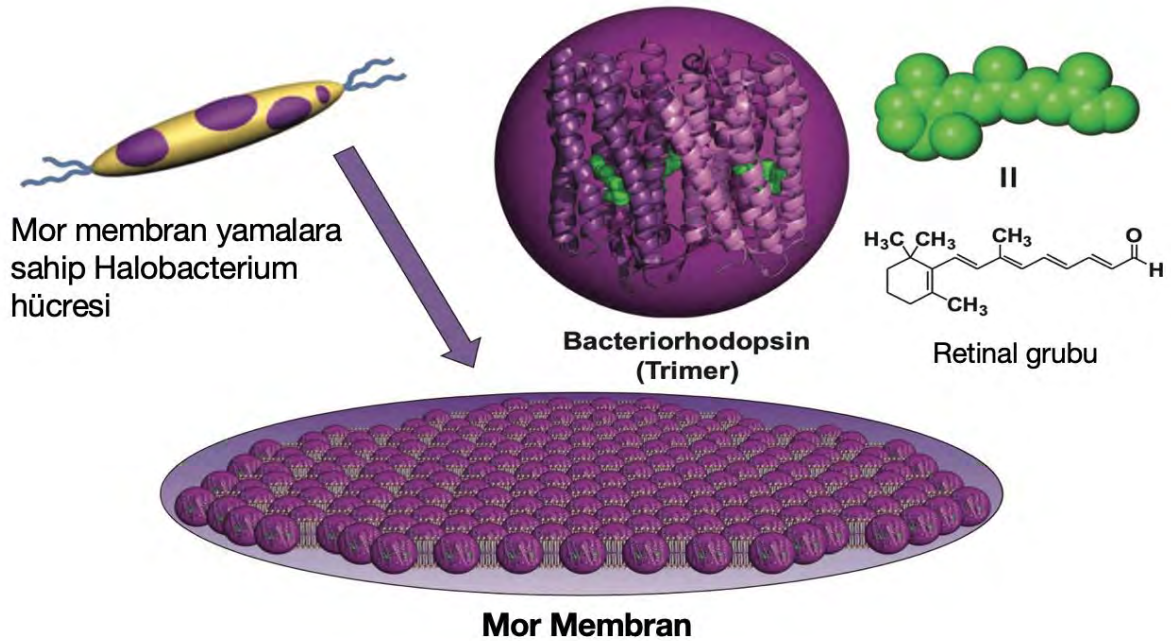
Şekil 4. Mikrobiyal rodopsinler ve fotosentetik merkezlerin absorpsiyon spektrumunda dağılımı (Syed 2011).



Bacteriorhodopsin

Doğada yalnızca bazı ekstrem halofiller tarafından sentezlenen mor membranda bulunan tek protein Bacterio-opsindir. Bu proteinin retinal kromofor ile birleşik hale gelmesi sonucunda Bacteriorhodopsin (bR) oluşmaktadır. bR, *H. salinarum*'un mor membranında (*H. halobium* olarak ta bilinmektedir) keşfedildiği günden bu yana, bilinen en basit proton pompasıdır (Shand and Betlach 1991; Vsevolodov 1998; Birge *et al.* 1999; Ghasemi *et al.* 2008; Walczak 2009; Wickstrand *et al.* 2015). bR, 7 α sarmallı G-protein eşli reseptör (GPCR) membran proteinleri sınıfına dahil olan kristalin yapıda bir proteindir. Kısa bağlarla birbirine bağlı 7 sarmaldan (A,B,C,D,E,F,G) oluşan kanal içerisinde retinal, protonlu *Schiff* bazıyla G sarmalında bulunan Lys-216 aminoasit kalıntısına bağlı haldedir. Bu kanal yapı içerisinde, bR'de; ekstraselüler ve stoplazmik taraflarında bulunan yüklü ve hidrofobik kalıntılarla birlikte toplam 248 aminoasit bulunmaktadır (Şekil 7.) (Stuart 1998; He *et al.* 1999; Gao 2004; Rhinow 2008; Walczak 2009; Winder 2010; Ashwini *et al.* 2017; Li *et al.* 2018; Riedel *et al.* 2021).

1973 yılında ışıkla çalışan iyon pompası olarak tanımlanan ve membranın kalınlığı boyunca, stoplazmik ve ekstraselüler taraf ile bağlantılı transmembran proteinleri sınıfına dahil olan bR, termal ve kimyasal değişimlere karşı stabilitesini korumasına yardımcı olan kristalize yapısı ve basit proton pompalama mekanizması sayesinde teknolojik araştırmalar ve araçlarda üzerinde en çok çalışılan membran proteini konumundadır (Tablo 2.) (Oesterhelt and Stockenius 1973; Vsevolodov 1998; Hampp 2000; Heberle *et al.* 2000; Singh 2001; Lanyi 2004; Rhinow 2008; Khizroev *et al.* 2008)



Şekil 7. Mor membran yapısında bulunan bR (Silveira *et al.* 2019).

In vitro şartlarda monomerik ve kristalize halde bulunan bR; sarmallardan oluşan yapısı içinde korunan ve gelişmiş canlı türlerinde öncül fotoreseptör olarak çalışan optik rodopsine benzer, β -karoten'den oluşan retinal kromofor sayesinde, ışığa duyarlı bir proton pompasıdır (Aboughanem 1996; Stuart 1998; Hampp 2000; Çakıcı 2004). Yapısında bulunan 248 adet aminoasit, 13 propeptit aminoasidin budaklanması sonucu oluşmuştur. Proteinin moleküler ağırlığının yaklaşık 26,7 kDa olduğu bilinmektedir. bR'nin izoelektrik noktası pH 4-5 aralığındadır.

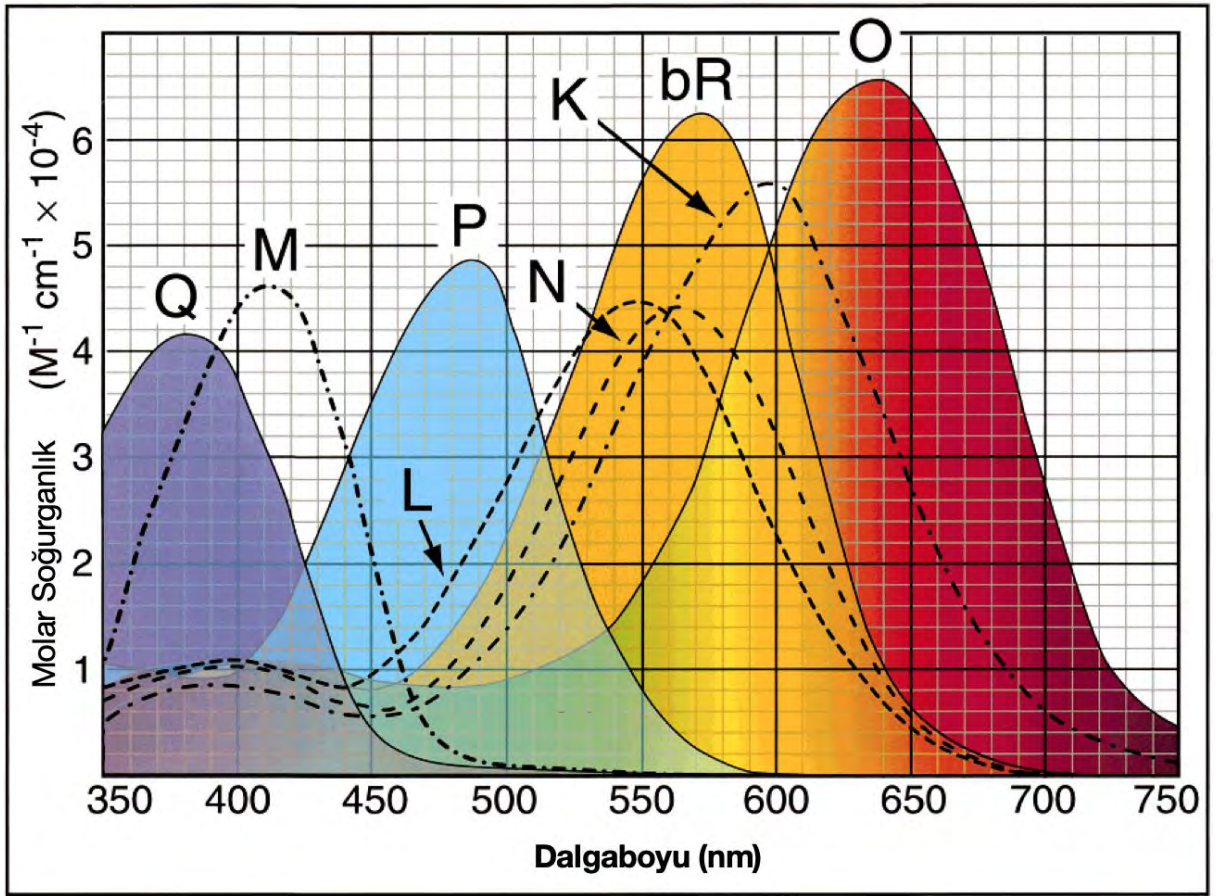
Kristalin yapı sayesinde kimyasal ve termal değişimlerde stabilitesini koruyan bR, bu sayede uzun süreler boyunca teknolojik araç ve araştırmalarda kalıcı olabilmektedir (Khizroev *et al.* 2008; Hıdıroğlu 2014). bR'nin eşsiz fotodöngüsü sayesinde gerçekleştirdiği proton taşınımı; retinalin *all-trans* ve *13-cis* formları arasındaki izomerizasyonu, ışığın absorpsiyonu ile tetiklenerek kanal içerisinde ekstraselüler tarafa doğru tek yönlü olarak gerçekleşmektedir (Stuart 1998; Adamov *et al.* 2008; Riedel *et al.* 2021). Proton kanalının hücre içi ve dışı kısımlarında bulunan yüklü aminoasitler, bu kanalın ortasında bulunan G sarmalındaki *Schiff* bazıyla proton alıcı-verici olarak eş zamanlı çalışmaktadır. Bir fotokromik materyalin yapısının bozulmadan fotodönüşüme karşı dayanıklılığı olarak tabir edilen fotokimyasal stabilite; normal sıcaklıklarda 10^6 kadar fotodönüşüm tekrarlayabilen bR'nin en önemli özelliklerinden biridir. Doğada bu değerde tekrarlılığa sahip çok az fotokromik materyal bulunmaktadır. Bunlar ise fotodönüşüm için düşük kuantum verimine sahiptir. Serbest radikallerden ve tek veya reaktif oksijenden korunan kromoforu sayesinde bR, yüksek tekrarlılığa sahiptir (Birge *et al.* 1999; Li *et al.* 2018). Normal proteinlerin genel olarak denatüre olacağı ortamlarda dahi işlevini kaybetmemesi ve olağandışı stabilitesi, bR'yi diğer rodopsinlerden ayırmaktadır. Bitki ve alglerde bulunan fotosentetik elementlere veya istikrarsız görsel rodopsine kıyasla bR, bu gezegende bulunmayan bir varlık gibi eşsizliğini gözler önüne sermektedir (Vsevolodov 1998).

Tablo 2. bR'nin ve PM'nin Karakteristik Özellikleri (Hampp 2000; Hıdıroğlu 2015)

bR'nin Karakteristik Özellikleri	PM'nin Karakteristik Özellikleri
- Moleküler ağırlığı ~26 kDa	- bR trimerlerinden oluşan 2-D heksagonal kafes
- Sönümleme katsayısı ~66.000 mol/cm	- Kalıcı dipol momenti
- Sınırsız döngü kabiliyeti	- 80-180 °C arası kararlılık
- Quantum verimliliği ~0.7	- 0-12 pH arası dayanıklılık
- Aydınlatma altında yüksek stabilite	- Yüksek iyonik dayanıklılık
- 350-650 nm arası fotoduyarlı bölge	
- Molekül boyutu ~5 nm	

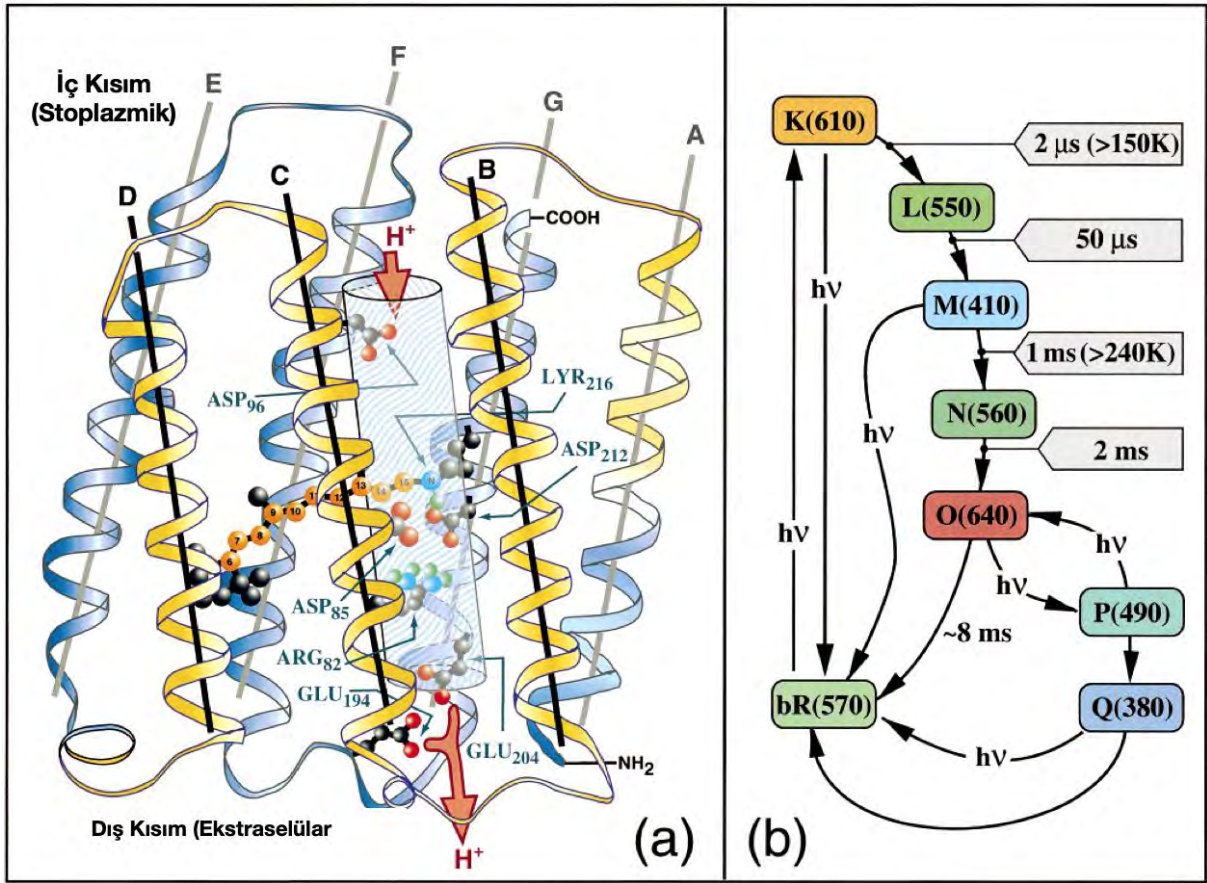
Fotodöngü

Fotodöngüyü oluşturan fotodurumların kendine has absorpsiyon maksimaları (Şekil 8.), kromoforun ve bağlanma tarafının yapısında oluşan değişimlerden kaynaklanmaktadır. bR'de oluşan ilk fotokimyasal olay, iki adet pikosaniye-altı işlemde meydana gelmektedir. İlk adımda, kromofor stimüle edilerek Frank-Condon uyarılmış bölgesi oluşturmaktadır. Bu ani oluşum, protonlu *Schiff* bazının uzun polyene zincirinin elektronsal olarak tetiklenmesiyle sonuçlanan ölçülebilir düzeyde bir elektron yoğunluk değişimine sebep olmaktadır. Bu elektron yoğunluğundaki büyük değişim, polyene zincirindeki elektronu yaklaşık 2,5 Å taşıyarak Nitrojen atomuna geçirip, $C_{14}C_{15}H=NH-Lys$ bağı daha negatif hale getirmektedir. Bu bağ ile yakınında bulunan negatif yüklü Aspartic asit kalıntılarının (Asp-85, Asp-212) arasındaki elektrostatik etkileşimin verimli hale gelmesi, *13-cis* çift bağının fotoizomerizasyonuna katkı sağlayarak ilk fotokimyasal olayı oluşturmaktadır. Uyarım işleminden kaynaklanan önemli bağ sırası tersinimi ile birleşen elektrostatik etkileşim, *all-trans*'tan *13-cis*'e fotoizomerizasyon için retinalin uyarılmış tarafı neredeyse engelsiz bir potansiyel yüzey haline getirmeye yetecek durumdadır. Bu sayede, başlangıç durumunda uyarılan tarafın izomerizasyonu engelleyici faktörü ortadan kalktığında oluşan durum; yüksek-elektron hareketli transistörün biyolojik olarak eşdeğeri konumundadır. Fotoizomerizasyon esnasında protonlu *Schiff* bazının negatif karşıtlarından uzaklaşan hareketi de fotovoltajik bir belirti oluşturmaktadır. Eksitasyon ve fotoizomerizasyonun bu pikosaniyelik fotovoltajik sinyali oluşturduğu düşünülmektedir. Yaklaşık %60 gibi yüksek oranda kuantum verimine sahip bR molekülünde tek yönlü protonun transferinde, kanalın tam merkez konumunda bulunan protonlu *Schiff* bazı önemli rol oynamaktadır. *Schiff* bazının Asp 85 ve Asp 96 arasındaki etkileşimi, retinalin fotonu absorbanası ile izomerizasyonu sayesinde katlanması ile gerçekleşmektedir. Bu sayede *Schiff* bazının stoplazmik taraftan ekstraselüler tarafa doğru proton taşıma işlemi tamamlanmaktadır (Stuart 1998; Birge *et al.* 1999; Singh 2001; Galan 2006; Pandey 2006; Khizroev *et al.* 2008; Ahmadi and Yeow 2011; Hıdıroğlu 2015).



Şekil 8. bR'nin ara durumlarının absorbans maksimalleri (Birge *et al.* 1999).

Aydınlatmanın olmadığı şartlarda bR'nin durumu, D ve B eşmolar aradurumlardan oluşmaktadır. Bu duruma aynı zamanda “dark-adapted” adı verilmektedir. Fotonun absorpsiyonu ile beraber bR, hızlı bir şekilde ışığa tepki vermektedir. 200 fs gibi kısa bir süre içerisinde retinal kromoforun *all-trans* formundan *13-cis* formuna izomerizasyonu sayesinde bR’de geri dönüşür bir süreç başlatılmaktadır. Foto-döngü; genel itibarıyla izomerizasyon, iyon taşınımı ve erişebilirlik değişikliği şeklinde üç ana durumdan oluşan, termal ve kimyasal değişimler içeren kompleks bir döngüdür (Rousso 1997; Frydrych *et al.* 2000; Pandey 2006; Rhinow 2008; Li *et al.* 2018). Normal durumda farklı absorbans maksimumlarına sahip K, L, M, N, O ara durumlarından oluşan ve mavi ışık, basınç, iyonlar, manyetik alanlar, dehidrasyon, viskozite, sıcaklık gibi faktörlerin etkisi altında başkalaşabilen foto-döngünün başlangıç noktası; bazı araştırmacılara göre J, bazılarına göre ise K olarak adlandırılan bR fotodöngüsünün ilk durumu, zaman-çözünürlüklü floresan çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında başlangıç ve uyarılmış iki durumun karışımı olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 9.) (Birge *et al.* 1999).



Şekil 9. bR'nin proton pompalama ve fotodöngüsü (Birge *et al.* 1999).

J durumunun ayırt edici özelliği $-269,15\text{ C}^\circ$ 'de termal olarak tuzaklanamamasıdır. Elde edilen verilere göre J durumu aslında titreşimsel olarak sıcak olan K durumudur. K durumu, kromoforun ışığın absorpsiyonu ile birlikte *all-trans*'tan *13-cis* formuna izomerize olmasıdır. bR fotodöngüsündeki tek fotokimyasal olay bu ilk adımdır. 600 nm 'deki ışığın absorpsiyonu ile tetiklenen K durumu termal fazların başlangıcı konumundadır ve $-123,15\text{ C}^\circ$ sıcaklığın altında durgun hale geçmektedir. Bu süre zarfında *13-cis* retinal aldığı proton nedeniyle bükülmektedir. Mikrosaniye seviyesinde bir sürede M durumunun hazırlık fazı olan L durumuna geçiş gerçekleşmektedir. L durumunda protonlu *Schiff* bazının deprotonasyonuna sebep olan yapısal değişim meydana gelmektedir. L durumundan M durumuna geçişte Asp 85, *Schiff* bazı tarafından proton almaktadır. Fotodöngüde yaşanan en önemli değişimlerden biri olan bu olay, absorbansı 412 nm 'ye düşürürerek M durumunu başlatmaktadır. M durumuna ait aynı absorbans değerine sahip, proteinin farklı konformasyonda olduğu iki alt durum bulunmaktadır (Şekil 10). Bu durumun başlangıcında Asp 85 protonlu iken *Schiff* bazı protonsız konumdadır. Kromofor çevresinde bulunan hidrojen bağlarından oluşan ağı dizilimi sonraki evre olan N durumuna geçişte değişerek, Asp 96 tarafından protonlanan *Schiff* bazı sayesinde retinal termal olarak reizomerize olmaktadır. N durumunda F ve G sarmallarının hareket etmesiyle birlikte absorbans 560 nm 'ye yükselerek, Asp 96 stoplazmik taraftan proton

almaktadır. Hala *13-cis* durumunda olan retinalin, O durumuna geçişte *all-trans* formuna dönüşümü gerçekleşmektedir. Bu esnada Asp 85'te bulunan proton transfer edilmektedir. 640 nm absorbans değeri ile fotodöngüde kırmızıya en yakın noktada olan O durumunda, retinal 490 nm kırmızı dalga boyunda ışık ile uyarıldığı durumda, P ve Q durumlarına yol açarak döngüyü çatalandırabilmektedir. Q durumu protonlu *Schiff* bazının hidrolize olmasıyla *9-cis* ve opsine dönüşerek, retinal kromofor bağlanma tarafında kısıtlanmaktadır. Yalnızca mavi ışıkla geri döndürülebilen bu kalıcı durum bR'nin stabilitesini artırarak, oda sıcaklığında dahi yaklaşık 10 yıl saklanabilen bir materyal haline getirmektedir (Rouso 1997; Stuart 1998; Vsevolodov 1998; Birge *et al.* 1999; Singh 2001; Hillebrecht *et al.* 2005; Galan 2006; Pandey 2006; Khizroev *et al.* 2008; Rhinow 2008; Kanwa 2014; Li *et al.* 2018). Fotodöngü sonrasında başlangıç pozisyonuna dönüp yeni bir döngüye başlamaya hazır halde bulunması bR'yi, fotodöngüsünü tamamlamak için enerji desteğine ihtiyaç duyan görsel rodopsinden ayırmaktadır (Vsevolodov 1998).

Fotodöngünün aradurumlarını kısaca özetlemek gerekirse;

Başlangıç durumu (bR₅₇₀): Fotodöngünün başlamadan önceki durgun halidir. Retinal *all-trans* pozisyonunda bulunmaktadır. Fotodöngünün başlaması için proteinin light-adapted durumunda olması gerekmektedir. *Schiff* bazı protonlu haldedir.

J durumu (J₆₁₀): Fotonun alınmasından itibaren 5 fs içerisinde J durumu başlamaktadır. Retinal, *all-trans* durumunda, *Schiff* bazı hala protonlu haldedir. Bu durum esnasında, çift ve tek bağlı C'lar ve retinal arasındaki elektron yükünde değişim meydana gelmektedir. Ayrıca retinalin poliyenik zincirinde önemli bir bükülme meydana gelmektedir.

K durumu (K₆₁₀): Retinal, J'den K durumuna geçerken *all-trans* durumundan *13-cis* durumuna izomerize olmaktadır. K aradurumunda gözlemlenen *13-cis(anti)* formu, dark-adapted bR'de bulunan *13-cis(syn)* formu ile farklılık göstermektedir. *Schiff* bazı hala protonlu halde bulunmaktadır.

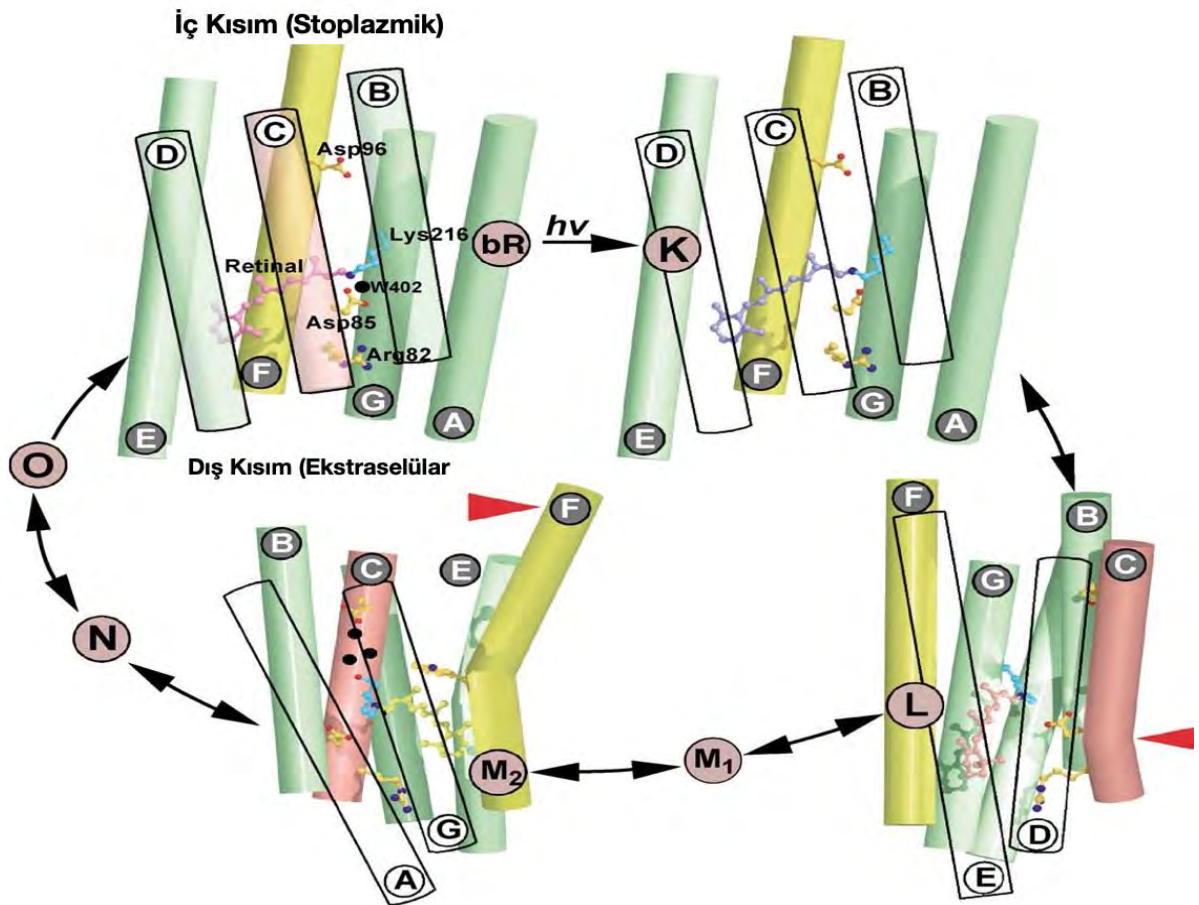
L durumu (L₅₅₀): *Schiff* bazına en yakın kalıntı olan Asp96 arasındaki su molekülleri, retinalin izomerizasyonundan sonra yer değiştirerek Asp96 çevresinde değişime neden olmaktadır. Bu hareketlilik sarmalların esnemesini sağlayarak retinalin yeni konformasyonunu çevrelemesini sağlamaktadır. Ayrıca C sarmalının bu süre zarfında kayda değer bir yapısal hareketi söz konusudur.

M durumu (M₄₁₀): bR proteinin en iyi bilinen bu aradurumunda *Schiff* bazı protonunu Asp 85 aminoasit kalıntısına bırakmaktadır. M aradurumu ayrıca kendi arasında M1 ve M2 olmak üzere iki ayrı duruma ayrılmaktadır. M1 durumunda protonun ilk hareketi *Schiff*

bazından Asp 85'e geçişi ile gerçekleşmektedir. Bu transfer, protonun "proton bırakma grubu" (PRG) olarak bilinen bir kompleks tarafından ekstraselüler tarafa geçişini tetiklemektedir. M2 durumunda ise retinalin ulaşılabilirliğı ekstraselüler taraftan stoplazmik tarafa geçerek, *Schiff* bazının N durumunda reprotonasyonuna hazırlanmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra F ve G sarmallarında, proteinin stoplazmik tarafından su moleküllerinin girişi için açılarak yapısal değışiklik meydana gelmektedir.

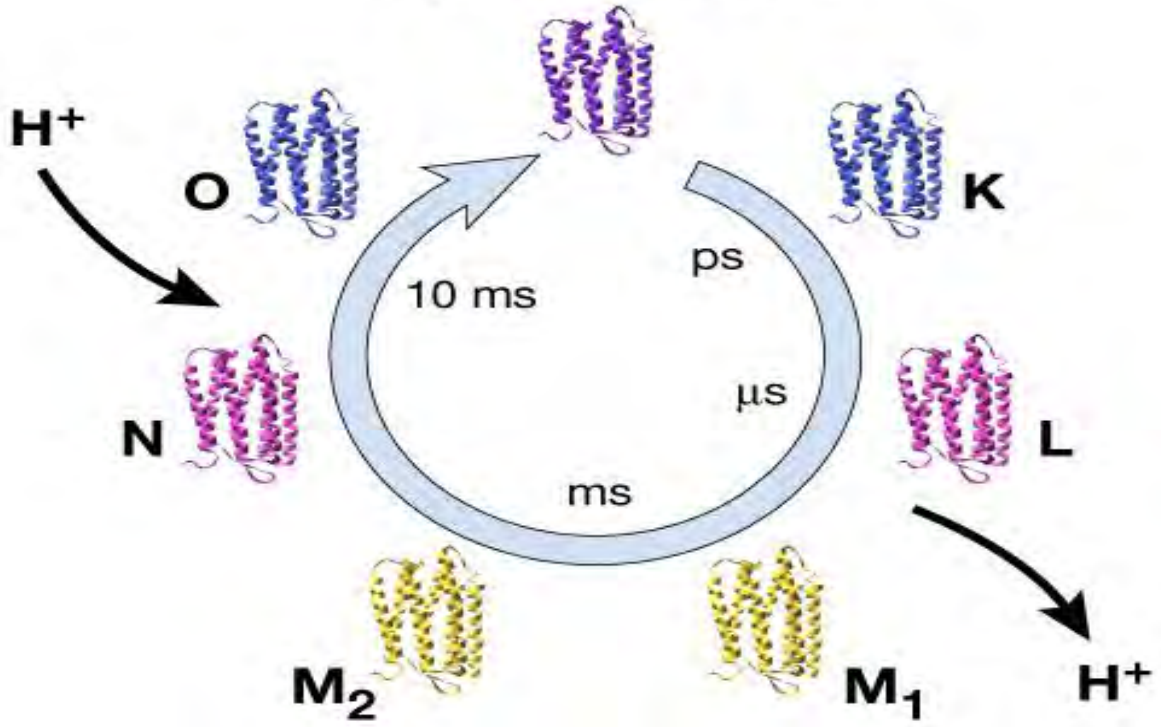
N durumu (N_{560}): M2 durumundan N durumuna geište, *Schiff* bazı aralarında bulunan hidrojen bağı ağı sayesinde Asp 96 tarafından tekrar protonlanmaktadır. M durumunda sarmalların açılarak su moleküllerinin ortama girmesiyle Asp 96'nın pKa'sındaki düşüş kendisinin deprotonasyonuna *Schiff* bazının ise reprotonasyonuna sebep olmaktadır.

O durumu (O_{640}): N durumundan O durumuna geište Asp 96 reprotonlanmaktadır. Retinal ise *13-cis* formundan *all-trans* formuna reizomerize olmaktadır. Bazı hipotezlere göre Asp 96 proteinin çatı kompleksi tarafından proton almaktadır. O durumu boyunca Asp 85 protonlu halde bulunmaktadır, fakat O durumundan bR başlangıç konumuna geište protonunu "proton bırakma grubuna" (PRG) aktarmaktadır (Marin 2005) (Şekil 11.).



Şekil 10. Görünür ışıkla ($h\nu$) başlayan bR fotodöngüsünde L ve M durumu süresinde gerçekleşen yapısal değışim (Neutze *et al.* 2002).

Işığa Adapte Durum



Şekil 11. bR fotodöngü şeması (Hirai and Subramaniam 2009)

Fotoakım

bR, foto eksitasyon ile gerçekleştirdiği proton transportasyonu sayesinde hücre membranında bir gradyan oluşturur (Rouso 1997). Bu sayede bir fotoakım meydana gelmektedir. Teknolojik uygulamalarda kullanım açısından oldukça önemli bir özellik olan fotoakım üzerine yapılan çalışmalar genel olarak proton gradyan diferansiyeli ve fotovoltaj diferansiyeline dayalıdır. Ayrıca bR'nin farklı nano-kompozitlerde kullanılması sonucunda fotoakımda gelişim gözlemlenmiştir (Li *et al.* 2018). Bunun yanında PM, saflaştırıldığında da fotoakımında artış meydana gelmektedir. Shiu *et al.* tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada ITO üzerinde immobilize edilen PM'nin fotoakımı; saflaştırma işlemlerinden önce 51,2 nA/ngr, saflaştırma işlemlerinden sonra ise 157 nA/ngr.bR/cm² olarak ölçülmüştür (Shiu *et al.* 2013).

bR'nin Kullanıldığı Alanlar

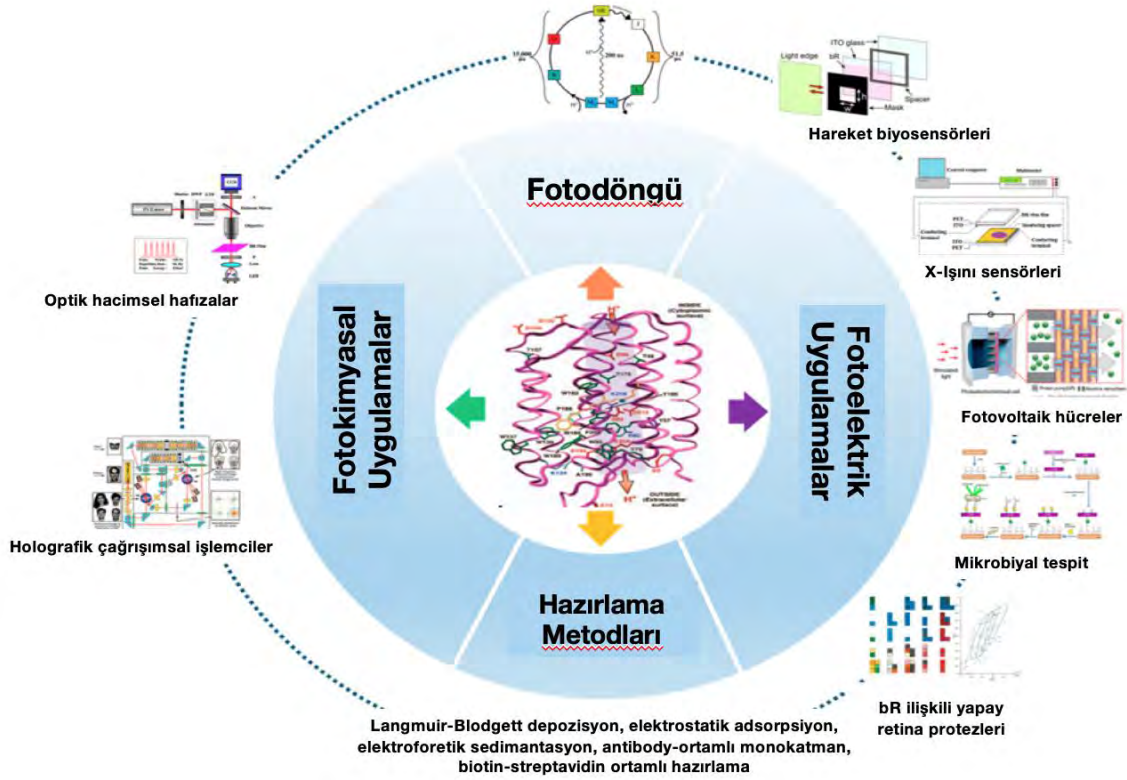
1970'lerde Shemyakin (Rusya) Biyoorganik Kimya Enstitüsü Başkanı olarak görev yapan Yuri Ovchinikov, bR'nin teknolojik çalışmalarda ön plana çıkmasında oldukça büyük öneme sahiptir. Sovyet bilgisayar teknolojisinin bu protein sayesinde diğer ülkelerin önüne geçeceğini savunan Ovchinikov, ordunun da büyük katkısıyla 'Proje Rodopsin' adı altında bR'yi derinlemesine araştırmış ve 'Biyokrom' isimli çalışmasında bR içeren holografik ve fotokromik film geliştirmiştir. bR'nin genetik mühendislik sayesinde holografik açıdan iyileştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmalar bu eşsiz proteinin ticari kullanımının önünü açmış

ve teknik uygulamalarda önemli bir biyomateryal olmasını sağlamıştır (Tan 1996; Birge *et al.* 1999; Wise *et al.* 2002; Khizroev *et al.* 2008; Hudgins 2011).

Kullanılan mutanta bağlı olarak, aydınlatma ve pH değişimleri ile harekete geçen supramoleküler bir aktüatör görevi üstlenen PM, geniş uygulama potansiyeline sahiptir (Rhinow 2008). Yüksek sıcaklık ve ışık şartlarına dayanıklılığı, kendi oluşturduğu yüksek pH ortamında dahi işlevselliğini kaybetmemesi ve tuzlu ortamların zorlu doğasını ele aldığımızda, bir mikroorganizma tarafından yaşamını sürdürmesi için fotosentetik enerji transdüksiyonu amacıyla sentezlenen bu proteinin aslında fotonik cihazlarda kullanılmaya oldukça elverişli olduğu görülmektedir. Proton pompalama fonksiyonu ve kendine özgü fotodöngüsü sayesinde fotokimyasal ve fotoelektrik uygulamalarında önemli bir yerde konumlanmıştır. bR'nin geniş kullanım alanı içinde; random access ince film hafızaları, nöral-tip logic anahtarlar, foton sayacı ve fotovoltaj çeviriciler, tersinir holografik medya, yapay retina, picosaniye fotodetektörler, uzamsal ışık modülatörleri, birleşik hafızalar, çift-foton hacimsel hafızalar, dinamik zaman-ortalama interferometreler, optik sınırlayıcılar, desen tanılayıcı sistemler, çoklu seviyeli logic anahtarlar, optik işlemciler bulunmaktadır. bR aradurumlarının sergilediği özelliklere göre farklı uygulamalar bulunmaktadır. Örneğin; K durumu, -123,15 C° sıcaklığın altında durgun hale geçmektedir. Bu özelliği sayesinde ikili fotokimyasal sistem oluşturmak mümkündür. J-K arası dönüşümlerin yüksek kuantum verimliliği, bu özelliğe dayalı kriyojenik ince film disklerin geliştirilmesine imkân tanımaktadır. Bu hafızalar, sıvı nitrojenle soğutuldukları müddetçe verimli ve hızlıdır. Ancak diskin oda sıcaklığına getirilmesi yüklenen verinin kaybolmasına sebep olduğundan dolayı uygulamanın elverişliliği kısıtlıdır. -33,15 C°'nin altında tuzaklanabilen M durumunun, intrinsik süresi kimyasal ve genetik müdahalelerle geliştirilerek, değişken sürelerle sahip farklı gerçek-zamanlı holografik filmler oluşturulabilmektedir. Normalde, teknolojik uygulamaların önemli çoğunluğu için kısa olan M durumunun sönümlenme süresi, bazı tekniklerle genişletilebilmektedir. Alan-odaklı mutajen vasıtasıyla *Schiff* bazıyla proton alışverişi yapan kalıntılar üzerinde modifikasyon yapmak mümkündür. Literatürde en çok üzerinde çalışılan mutasyon olan D96N, Asp-96'nın Asn-96 ile yer değiştirilmesi ile oluşturulmuştur. Bu mutantın M durumu, şartlara göre 200 ms ile 20 s arasında değişiklik göstermektedir. bR yapısına kimyasal müdahale edilerek oluşturulan geliştirmeler de bulunmaktadır. “*Biyokrom*” çalışmasında birçok ekleme üzerinde çalışılmış olup, en iyi verim; hidroklorid, guanidin, diaminopropan gibi polar veya yüklü aminlerin eklenmesiyle alınmıştır. bR'nin modifikasyonunun bir üst aşamasında ise doğal haldeki *all-trans* retinal kromoforun, analog bir kromofor olan *4-keto* ile yer değiştirilmesi bulunmaktadır. *4-keto* retinal, M durumunun ömrünü önemli bir biçimde değiştirmiştir. *4-keto* kromofora ek

olarak bazı aminoasit kalıntılarının da yer değiştirildiği (Thr-46→Asn-46, Asp-96→Asn-96) mutantların ise M durumunun birkaç saate kadar uzatıldığı saptanmıştır (Birge *et al.* 1999).

bR'nin fotodongüsünün ayrıca, bünyesinde bulunduğu halofilik arkeye herhangi bir katkısı olmadığı gözlemlenen budaklanmış ve daha uzun süre sabit kalabilen (tuzaklı) bir bölümü de bulunmaktadır. O durumunda retinalin stabil olmayan *9-cis* haline dönüşmesi ile başlayan bu durum; P durumudur. *9-cis*'in kararsız halinin sebebi, çevredeki kalıntılar, C9 ve C13 metil grupları arasındaki sterik etkileşimdir. Bu kararsızlık kromoforun hidroliz olarak serbest kalması ile sonlanır, kromofor hala proteinin iç kısmındadır. Serbest kromofor Q durumunun başlangıcı olarak kabul edilmektedir. P ve Q durumlarını, denatüre proteinden ayırt etmenin en önemli yolu; proteinin eski haline geri dönebilmesidir. Q durumunda nicel olarak sarı renkte bulunan bR, mavi ışıkla başlangıç konumuna dönüşmektedir. Ortamın hidrasyonu ve pH'sı, P durumunun süresini belirleyen faktörlerdir. Teknolojik çalışmalarda; ömrü daha uzun olduğu tahmin edilen (5-20 yıl) Q durumu daha elverişlidir. Bağlanma tarafındaki kromoforun *9-cis*'ten *9-trans*'a izomerizasyon sınırı termal olarak 45 kCal/mol-1 olarak hesaplanmıştır. Bu değer proteinin termal olarak denatürasyonuna yetecek düzeydedir. Fotokimyasal uygulamalar çerçevesinde; Q durumunun proteine uzun dayanıklılık sağlaması sayesinde veri depolama imkanı sağlayarak, bR'nin optik volumetrik hafıza çalışmalarında kullanılmasının önünü açmıştır. Ayrıca holografik işlemciler ve gerçek zamanlı işlemcilerde kullanılması üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Öte yandan; hareketsel uyarıma dayalı biyosensörler, fotovoltajik hücre gibi fotoelektriksel çalışmalar bulunmaktadır (Şekil 12.) (Popp *et al.* 1993; Birge *et al.* 1999; Frydrych *et al.* 2000; Fischer *et al.* 2003; Hillebrecht *et al.* 2005; Xu 2003; Khizroev *et al.* 2008; Kamwa 2018; Li *et al.* 2018).



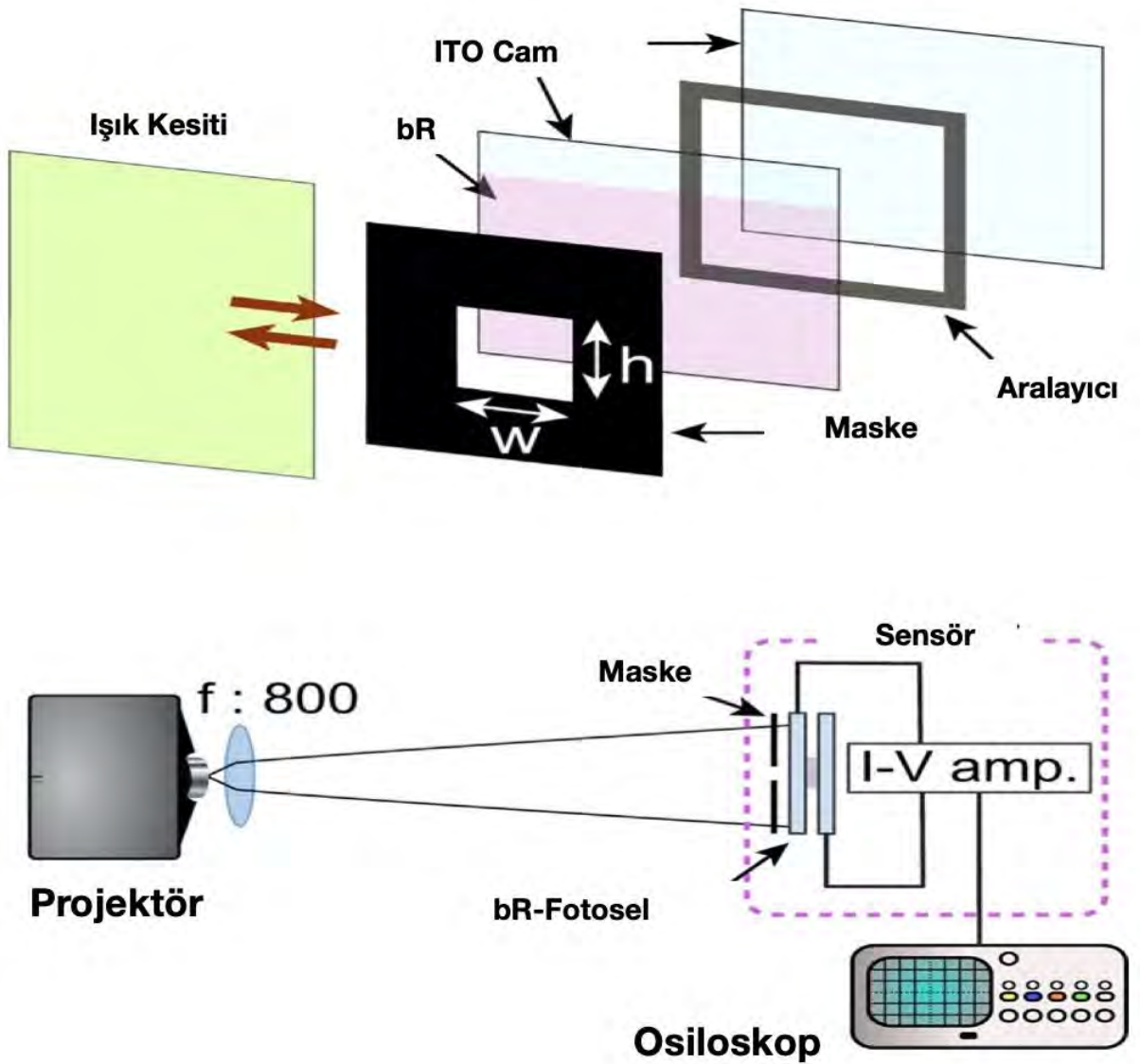
Şekil 12. bR'nin kullanıldığı endüstriyel çalışmalardan bazılarının dağılımı (Li *et al.* 2018).

Solar Enerji Dönüşüm

Oluşturduğu fotoakım sayesinde bR, fotovoltaik araştırmalara da konu olmaktadır. İnorganik materyallerle kompozit hale getirildiğinde, bu fotoakımdan sistemsel olarak faydalanmak üzerine çalışmalar mevcuttur (Li *et al.* 2018). Proton gradyanı jenerasyonu sayesinde sabit bir fotoakıma sahip olması ve solar enerji dönüşüm çalışmalarında önemli bir materyal olmasına rağmen, tekkatman başına geliştirdiği akım 0,2-40 pA gibi düşük değerlerle sınırlıdır (Yen *et al.* 2010; Allam *et al.* 2014). Allam *et al.* tarafından yapılan çalışmada fotodöngü TiO₂ nanopartiküllerinin plazmonik etkisiyle yaklaşık 70 μ s'ye kadar düşürülerek bR'nin oluşturduğu akım 25 nA/cm³ olarak ölçülmüştür. Bu gelişim fotodöngünün süresiyle bağlantılı olarak düşük verim gösteren bR'nin fotoakımında yaklaşık 15 kat fazla verimlilik sağlamıştır (Allam *et al.* 2014). Yen *et al.* tarafından yürütülen benzer bir çalışmada Ag ve Au-Ag kompozit nanopartiküllerinin fotoakımdaki etkileri araştırılmıştır. Buna göre saf bR'nin başlangıçta gözlemlenen 1,6 nA/cm³ olan fotoakım değeri, Ag NP ile birleştirildiğinde 25 nA/cm³, Au-AgNP ile birleştirildiğinde 11,3 nA/cm³ olarak ölçülmüştür (Yen *et al.* 2010). bR fotodöngüsünün geliştirilerek fotoakım veriminin artırıldığı bir başka çalışmada bR, altın nanopartiküller (bR/AuNP) ile birlikte anodik alüminyum oksit (AAO) nanokanallarına immobilize edilmiştir. Geliştirilen sistemin oluşturduğu fotoakım 350 nA/cm² olarak ölçülmüştür (Guo *et al.* 2014).

Hareket Sensörleri

Yapısında bulunan retinalin daha gelişmiş canlılarda olduğu gibi ışığı yakalaması ve oluşturduğu foto-akımı sayesinde bR, biyosensörlerde kullanılması mümkün olan bir biyomateriyaldir. Ultra kısa yükselme süresi ve fotovoltajik yanıtı sayesinde bR filmleri üzerine yüksek hızlı fotosensörler üzerinde çalışılmaktadır. Silikon bazlı sensörlere göre, yenilenebilir ve yüksek miktarda bulunmaları ve ayrıca üretim süreçlerinin nispeten kolay olmaları biyolojik temelli hareket sensörlerinin avantajları arasındadır (Xu 2003; Kamwa 2018; Li *et al.* 2018). bR’de bulunan retinalin yüksek çözünürlüklü ve gerçek zamanlı fotoyanıtı özelliğinden faydalanan bir çalışmada absorbanans aralığı ve yanıt hızı oldukça yüksek, ITO-bR-ITO sandviç yapısında bir hareket algılayıcı sistem geliştirilmiştir (Şekil 13.) (Okada-Shudo *et al.* 2016).



Şekil 13. bR bazlı hareket sensörü şeması (Okada-Shudo *et al.* 2016).

X-Ray Sensörleri

bR bazlı sensörler arasında; anlık radyasyon dozaj bilgilerini aktaran X-ray sensörü çalışması da yerini almıştır. Ahmadi and Yeow. (2011) tarafından yapılan çalışmada ITO kaplı polyethylene terephthalate (PET) substratı üzerine 3 mm yarıçaplı algılayıcı bölgeye bR immobilize edilerek yüzeyin geri kalan kısmı yalıtım amacıyla Kapton filmi ile kaplanmıştır. Sistem maruz bırakıldığı X-Ray ışının şiddetine göre bR'nin fotoakımındaki değişimler gözlemlenmiştir (Ahmadi and Yeow 2011).

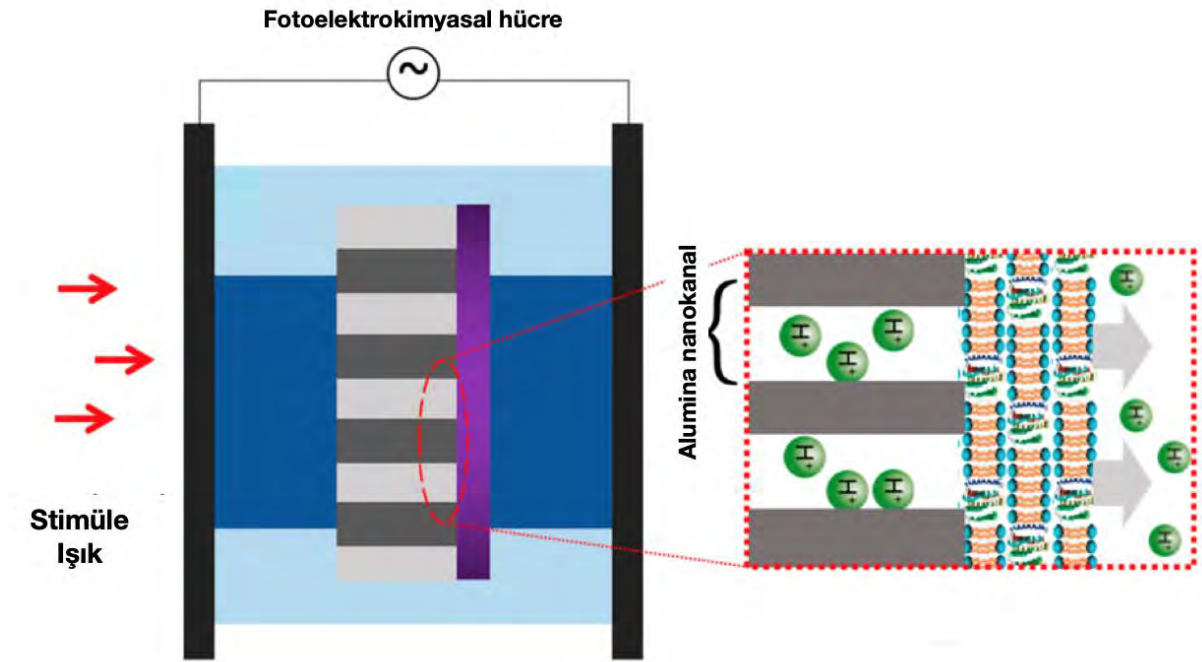
İmmünosensörler

Fotoelektrik karakteristiği ışığında bR, mikroorganizma tanılama amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır. bR bazlı hassas mikrobiyal sensör olan bir fotoelektrik immünosensör, Chen *et al.* (2017) tarafından geliştirilmiştir. PM kaplı elektrotlar üzerine affinite ile antikorlar sabitlenerek bir sistem üretilmiştir. Sensörde oluşan fotoakımın, *E.coli* kültürünün sistem ile inkübasyonu sonucunda düştüğü gözlemlenmiştir. Kültür popülasyonunun artışı ile fotoakımdaki düşüş doğru orantılıdır.

Yapay Retina

Moleküler seviyede kabul edilen çözünürlüğüne dayanarak yüksek çözünürlüklü görüntü algılama çalışmalarında bR ön plana çıkmaktadır (Xu 2003). Retinal bozunumu durdurma-yavaşlatma veya işlevini yitirmiş retinalin yerine kullanılması amacıyla, bR çoklu katmanlarından oluşan bir implant tasarlanmıştır. İyon geçirgen ve biyolojik açıdan nötr iki membran arasında hapsedilen bR katmanları nöral uyarımı sağlayacak miktarda proton gradyanı oluşturabilmektedir. bR'nin Q durumundan faydalanan bu implant, ayrıca hastaların değişen gereksinimlerine göre uyarlanabilmektedir (Kanwa 2018). bR'nin frekans-yanıt karakteristiği fotoakım sinyallerine dayalı çalışmalarda, fotoakım miktarından daha önemlidir. Lu *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada hayvansal retinalin frekans-yanıt karakteristiği mimike edilmiştir. bR'nin alümina kanallar üzerinde yapılandırıldığı hibrid nanosistemde, güçsüz ışık 130 Hz'a kadar çıkabilen yüksek frekanslı farkedilebilir bir fotoakıma dönüştürülmüştür. Yapay retina uygulamaları arasında oldukça önemli olan bu sistemde; proton konsantrasyonu, bR katman kalınlığı ve alümina nanopor genişliği fotoakımı etkileyen etmenlerdir (Şekil 14.). Başka bir çalışmada kolay yapısı ve yüksek renk tanılama performansı olduğu gözlemlenen bir sistem geliştirilmiştir. Frydrych *et al.* (2000) tarafından yapılan çalışmada bR varyantları olan 4-keto ve 3,4-dehydro kullanılarak renge duyarlı bir yapay retina matrisi oluşturulmuştur. Geliştirilen retina, fotoalgılayıcı ve önişlemci olmak üzere iki

katmandan oluşmaktadır. Fotoalgılayıcı katmanda bR görüntü girdisini elektrik sinyallerine çevirerek işlenmesi için önilemciye aktarmaktadır.



Şekil 14. Alumina nanokanallar üzerine immobilize edilen bR (Lu *et al.* 2016)

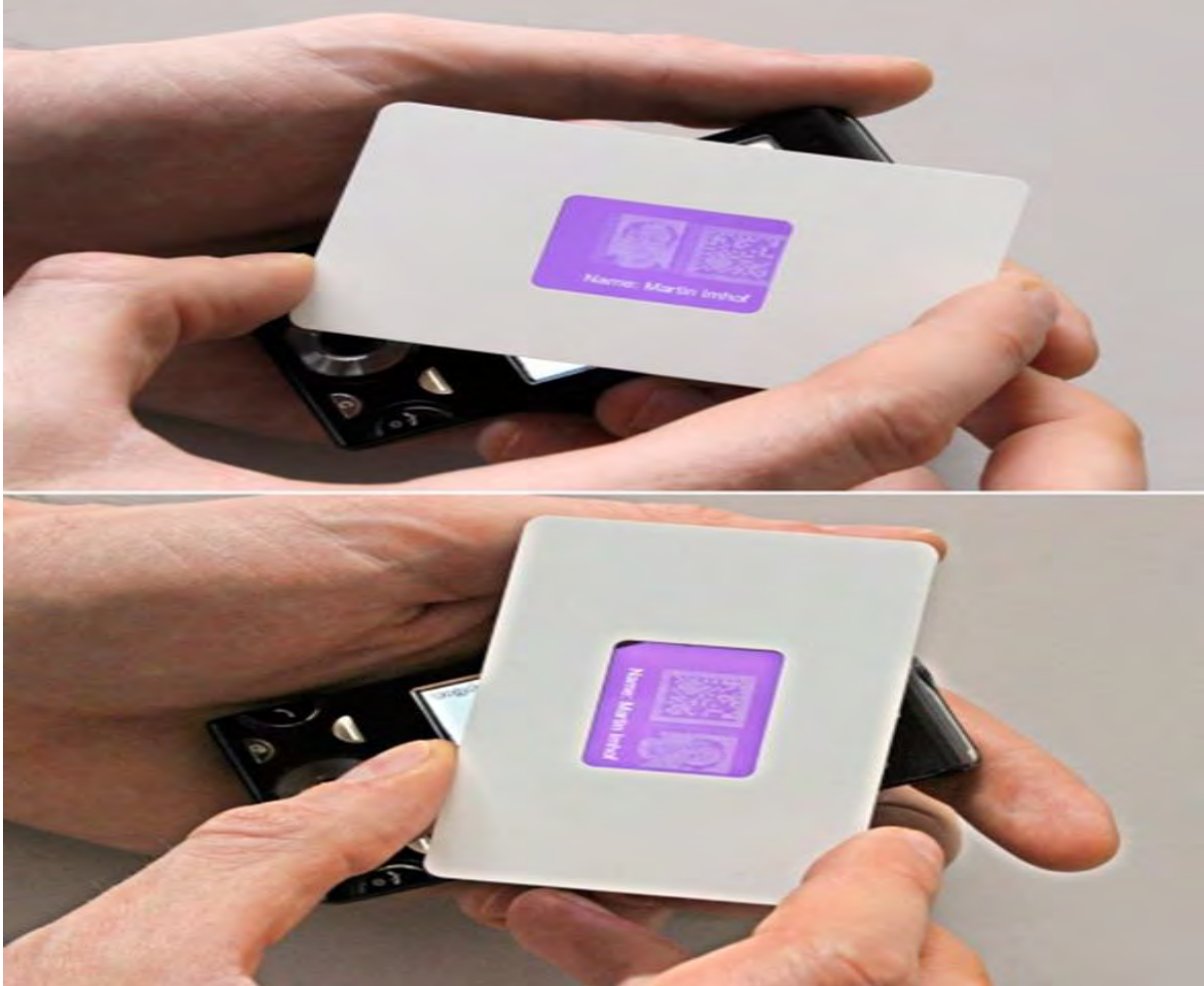
Veri Depolama

Fotoelektrik kabiliyeti ve fotokromik etkisi sayesinde bR, veri depolama, hologram ve RAM çalışmalarında da yer almaktadır. Yüksek hız kapasiteli fotodiyot ve hafıza tasarımı için fotoelektrik yanıtı oldukça hızlı olmasından ötürü bR kullanım potansiyeli yüksek bir materyaldir (Frydrych *et al.* 2000; Kanwa 2014). bR'nin M durumundaki fotokromik etkisine dayalı birçok uygulama bulunmasının yanında M durumunun düşük kuantum verimi pratik uygulamaları sınırlandırmaktadır. Ayrıca normal fotodöngüsü yanında P ve Q durumlarına sahip bR'nin bu arafazlardaki proton geçirgenliği ve 9-*cis* izomerizasyonu sayesinde, hacim holografisi ve sayfa odaklı optik hafıza uygulamalarında önemini, kuantum verimindeki düşüklüğe rağmen artırmaktadır (Li *et al.* 2018). 2003 yılında Fischer *et al.* (2003) tarafından geliştirilen tek yazımlık, kayıt yoğunluğu 125 kB/cm², kayıt kapasitesi 1 MB olan optik hafıza çalışmasında bR aktif katman olarak kullanılmıştır.

Holografik İşlemler

bR fotodöngüsü normal şartlarda tek fotonun alımıyla başlamaktadır. Çift foton absorpsiyon tekniğine dayalı yapılan tek yazım-çok okumalı bir holografik hafıza çalışmasında, proteinin çift fotonla eksite edilmesinin bR'deki aminoasitlerin dekarboksilasyonuna ve retinalin redüksiyonuna sebep olduğu ve bu durumun bR filmlerinde kalıcı optik anizotropiye

(eşyönsüzlük) yol açtığı gözlemlenmiştir (Şekil 15.) (Imhof *et al.* 2014). Yu *et al.* (2013) tarafından yapılan araştırmada bR'nin 790 nm'lik femtosaniyelik lazer tahriki ile farklı ve stabil bir duruma getirilmesi sağlanmıştır. F₅₄₀ şeklinde adlandırılan bu bR fotoürünle, holografik tek yazım-çok okumalı bir hafızada kullanmak için bR filmleri hazırlanmıştır.



Şekil 15. bR bazlı yapılan holografik çalışma (Imhof *et al.*2014).

Mor Membran İzolasyonu

Üstün özellikleri sayesinde bR üzerinde birçok çalışma mevcuttur. Teknik çalışmalarda kullanılabilmesi için bir dizi izolasyon işlemlerinden geçirilmesi gerekmektedir. İlk olarak Oesterhelt and Stockenius (1973) tarafından yapılan çalışmada mor membran saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma üzerine yapılan çalışmalarda linear sukroz gradyant ve non-linear sukroz gradyant teknikleri oldukça yaygındır (Oesterhelt and Stockenius 1973; Happe and Overath 1976; Sumper *et al.* 1976; Stuart 1998; Anton 2008; Knoblauch *et al.* 2014). Bu metodlar yüksek miktarda saflaştırılmış ürün verimi ve nispeten kolay ve hızlı süreçlerinden dolayı kullanılmıştır. Saflaştırılmış mor membranın elde edilmesi için kırmızı-turuncu renkteki bacterioruberin ile arasındaki batmazlık yoğunluk farklarından ötürü sukroz gradyant tekniği kullanılmıştır (Aboughanem 1996). Ayrıca yine bR'nin batmazlık yoğunluğuna dayalı bir

saflaştırma tekniği olan sıvı iki fazlı sistem (ATPS), sıvı üç fazlı sistem (A3PS) metodları da yüksek miktarda saf bR elde etmek için kullanılmaktadır (Knoblauch *et al.* 2014; Shiu *et al.* 2013, 2014; Hıdıroğlu *et al.* 2019). Huh *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada iyonik likid iki fazlı sistem (ILTPS) mikroakışkan cihaz kullanarak bR saflaştırması yapmıştır. Ayrıca mor membran saflaştırılmasında, ürünün kullanım amacına göre diyaliz, kromatografi gibi metodlarda kullanılmaktadır (Tan 1996; Lobasso *et al.* 2003).

bR Delipidasyonu

bR'nin teknolojik araç ve uygulamalarda kullanımını mümkün kılmak için bazı işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Bu işlemler içerisinde en önemlisi saflaştırma ve delipitasyondur. Bu noktada işlem tercihi kullanım amacına göre değişiklik göstermektedir. Bazı araştırmalarda daha pürüzsüz bir yüzey oluşturmak amacıyla mor membran halinde tercih edilirken, bazılarında ise gelişmiş fotovoltaiik tepki için bR delipitasyonu gerçekleştirilmektedir (Der *et al.* 2006; Shiu *et al.* 2014). Delipitasyon işlemlerinde genellikle; sodyum cholat, deoksicholat, Triton X-100, CHAPS (3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate), CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) gibi kimyasal sürfaktanlar kullanılmaktadır (Huang *et al.* 1980; Seigneuret *et al.* 1990; Huh *et al.* 2010; Chon and Chu 2013). bR'nin saflığı, aminoasit varlığını gösteren 280 nm'deki absorbans maksimumu ile kromoforun varlığını gösteren 560 nm'deki absorbans maksimumunun birbirine olan oranı ile ölçülmektedir (Huh *et al.* 2010). Buna göre bR'nin saf kabul edilmesi için absorbans değeri; $\frac{A_{280}}{A_{560}} \leq 1.5$ formülüne uygun olmalıdır (Becher and Cassim 1975; Miercke *et al.* 1989).

İmmobilizasyon Teknikleri ve bR İmmobilizasyonunda Kullanılan Substratlar

bR'nin immobilizasyonunda, fotoaktivitenin engellenmemesi oldukça önemlidir. Bu açıdan substrat malzemenin özenle seçilmesi gerekmektedir. bR üzerine yapılan birçok çalışmada altın (AuNP), gümüş (AgNP), TiO₂ gibi metalik nanopartiküllerinin plazmonik etkisinin bR fotodöngüsünde değişime sebep olarak, proton pompalama mekanizmasını geliştirdiği saptanmıştır (Li *et al.* 2010; Yen *et al.* 2010; Allam *et al.* 2011; Al-Arife *et al.* 2011; Guo *et al.* 2014). Bunların yanı sıra, farklı amaçlar doğrultusunda bugüne dek bR'nin immobilizasyonunda substrat olarak; quartz, mika, silikon wafer, ITO, ATO, ZnO, SnO₂, TiO₂, anodik alüminyum oksit (AAO), poly(ethylene terephthalate) (PET), poly(dimethyldiallylammonium chloride) (PDAC), poly(allyamine hydrochloride) (PAH), poly(ethylenimine) (PEI), poly(pyrrole) (PPy), poly-L-lysine (PLL), poly(o-anisidine) (POAS), Pt, Ag, Au gibi birçok materyal kullanılmıştır. Ayrıca bR molekülleri, fotoelektrik aktivitesinin ölçülmesi maksadıyla yapay lipid membranlara, kolodyum membranlara veya lipid adsorbe

edilmiş porlu seramik filtrelere de immobilize edilmiştir (Robertson and Lukashev 1995; Li *et al.* 1995; Maccioni *et al.* 1996; Wang *et al.* 1997; Choi *et al.* 1998; He *et al.* 1998; Vsevolodov 1998; Nicolini *et al.* 1999; Yuan *et al.* 1999; Min *et al.* 2001; Ueno and Shibata 2002; Chu *et al.* 2003; Chu *et al.* 2005; Ron *et al.* 2008; Li *et al.* 2010; Yen *et al.* 2010; Ahmadi and Yeow 2011; Allam *et al.* 2011; Al-Arife *et al.* 2011; Zaitsev *et al.* 2012; Guo *et al.* 2014; Moleirad and Rezaeian 2014; Lu *et al.* 2016).

bR'nin immobilizasyonunda kullanılan ince-film hazırlama metodları

Doğada ışığa vektörel bir şekilde yanıt veren mor membran yamaları, yönünden bağımsız bir şekilde ışığa duyarlı haldedir. Bir proton pompası olarak bR, ışık ile uyarıldığında H^+ atomlarını bir taraftan diğer tarafa iletmektedir. Doğru bir şekilde yönlendirildiğinde ölçülebilir bir elektrik potansiyeli oluşturan bu proteinin cihazlarda daha verimli hale getirilmesi için fotoelektrik yanıtının geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu açıdan bR ince film katman oryantasyonunun fotoyanıtı geliştirdiği bilinmektedir. Teknolojik araştırma ve araçlarda bR kullanımını mümkün kılmak için yapılan immobilizasyon işlemlerinde, farklı alttaşlar üzerinde katman oluşturma farklı metodları bulunmaktadır (Tablo 3). Elde edilmek istenen ürüne göre farklı teknikler kullanılan bu yöntemler arasında; Langmuir-Blodgett (LB), Elektroforetik sedimantasyon (EPS), biotin-streptavidin ortamlı monokatman, antibody ortamlı monokatman, Elektrostatik self-assembly (ESA-LbL), dip-coating vs. bulunmaktadır (He *et al.* 1998; Ueno and Shibata 2002; Chen *et al.* 2003; Anton 2008; Walczak 2009; Li *et al.* 2010; Zaitsev *et al.* 2012; Moleirad and Rezaeian 2014; Lu *et al.* 2016; Okada-Shudo *et al.* 2016; Riedel *et al.* 2021). Bu metodlar vasıtasıyla üretilen bR filmlerinin 85-140 °C arası sıcaklıklarda fotokimyasal özelliklerini kaybetmeden uzun süre boyunca aktivitesini koruduğu bilinmektedir. İmmobilizasyonun temel unsuru; bR'nin ekstraselüler ve stoplazmik tarafları arasındaki yük farkına dayalı dipol momentidir. Elektrik alanı, biotin bağlanma interaksyonu, elektrostatik self-assembly gibi yöntemler bu yük farkına göre uygulanmaktadır. Monokatman oluşturmada antibody ortamlı monokatman metodu kullanılmaktadır, fakat yönlendirilmiş bR miktarı az olduğundan dolayı fonksiyonellik düşmektedir. LB ve EPS teknikleri ise yönlendirme seviyesi yüksek ve düzenli filmler oluşturma kapasitesinden dolayı en çok kullanılan yöntemlerdendir. Ayrıca EPS tekniği, kalın katman oluşturmada oldukça verimlidir (Maximychiev *et al.* 1992; Min *et al.* 1998; Anton 2008; Ahmadi and Yeow 2011; Zaitsev *et al.* 2012; Moleirad and Rezaeian 2014; Li *et al.* 2018).

Tablo 3. bR ile Hazırlanan İnce Filmlerde Kullanılan İmmobilizasyon Çalışmalarından Bazıları

<i>Yıl</i>	<i>Yazar</i>	<i>Yayın</i>	<i>Teknik</i>	<i>Malzeme</i>	<i>Uygulama</i>
1998	He <i>et al.</i>	Oriented Bacteriorhodopsin/Polycation Multilayers by LBL	Layer-by-layer	PDAC & Kuvars & Cam	Moleküler Karak.
1998	Choi <i>et al.</i>	Molecular photoreceptor consisting of bacteriorhodopsin/flavin...	Langmuir-Blodgett	Flavin & ITO	Fotoakım Ölçümü
1998	Weetall ve Samuelson	Optical and electrical properties of bacteriorhodopsin Langmuir-Blodgett films	Langmuir-Blodgett	ATO	Fotoakım Ölçümü
1998	Min <i>et al.</i>	Photocurrent of bacteriorhodopsin films deposited by EPS	EPS & Langmuir-Blodgett	Platinyum & ITO	Fotoakım Ölçümü
1998	He <i>et al.</i>	Photoelectric Properties of Oriented Bacteriorhodopsin/Polycation...	Layer-by-layer	PDAC & ITO	Fotoakım Ölçümü
1999	Yuan <i>et al.</i>	Photoelectric responses of Langmuir-Blodgett...	Langmuir-Blodgett	Polipirol & ITO & Soya-PC	Fotoakım Ölçümü
1999	Nicolini <i>et al.</i>	Toward bR based photocells	Elektroforetik Sedimentasyon	Platinyum & ITO	Fotosel
2000	Kanthimathi <i>et al.</i>	Langmuir-Blodgett film properties of a donor-acceptor Schiff base	Langmuir-Blodgett	Kuvars	Moleküler Karak.
2000	Min <i>et al.</i>	Visual information processing using bacteriorhodopsin-based...	Langmuir-Blodgett	Kuvars & ITO & Spiropran	Fotoreseptör
2001	Choi <i>et al.</i>	Color image detection by biomolecular photoreceptor...	Langmuir-Blodgett	ITO & Pt & Elektrolit jel	Fotoreseptör
2001	Li <i>et al.</i>	Photovoltaic characteristics of BR/p-silicon heterostructures...	Langmuir-Blodgett	SnO ₂ & Altın & p-silicon	Moleküler Karak.
2002	Ueno ve Shibata	Redox potential of bacteriorhodopsin in oriented purple membrane films	EPS & Langmuir-Blodgett	Platinyum & ITO	Fotoakım Ölçümü
2002	Jussila <i>et al.</i>	Transient absorption and photovoltage study of self-assembled bR/polycation...	Layer-by-layer	PDAC & ITO & Kuvars	Fotoakım Ölçümü
2003	Chu <i>et al.</i>	Fabrication and photoelectric response of poly(allylamine hydrochloride)...	Layer-by-layer	ITO & PAH	Moleküler Karak.
2004	Chu <i>et al.</i>	Studies on poly(ethylenimine)/purple membrane multilayer films...	Layer-by-layer	PEI & Kuvars & ITO & Mika	Moleküler Karak.
2009	Li <i>et al.</i>	Fabrication of oriented poly-L-lysine/bacteriorhodopsin...	Layer-by-layer	Poli-L-lisin & Kuvars	Fotoakım Ölçümü
2011	Tsujiuchi ve Makino	An Observation of Diamond-Shaped Particle Structure in a Soya-PC...	Langmuir-Blodgett	Soya-PC & Kuvars	Moleküler Karak.
2012	Zaitsev <i>et al.</i>	Thin films and assemblies of photosensitive membrane proteins...	LBL & Langmuir-Blodgett	ITO & PEDOT & PSS & PLL & PDAC	Moleküler Karak.
2014	Molaeirad ve Rezaeian	Oriented assembly of bacteriorhodopsin on ZnO...	Langmuir-Blodgett	ITO & ZnO nanopor	biyofotovoltaik hücre
2017	Molaeirad <i>et al.</i>	Monolayer Immobilization of Bacteriorhodopsin...	Langmuir-Blodgett	Polikarbonat alttaş	Biyo-hafıza
2018	Li <i>et al.</i>	A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices	LB, EPS, Antikor-antijen, LBL tekniklerine genel bakış		

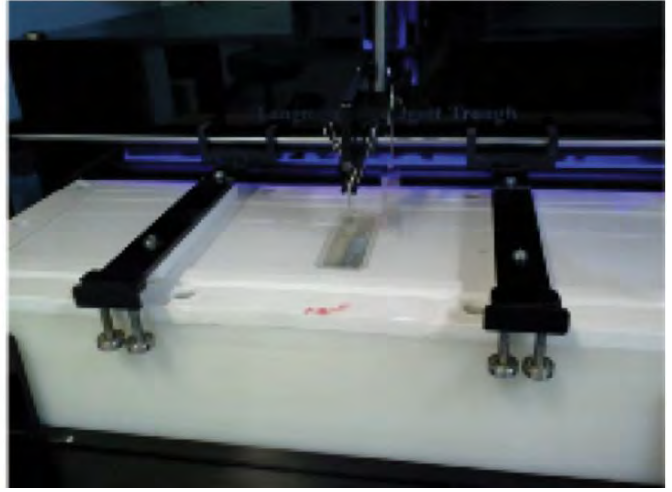
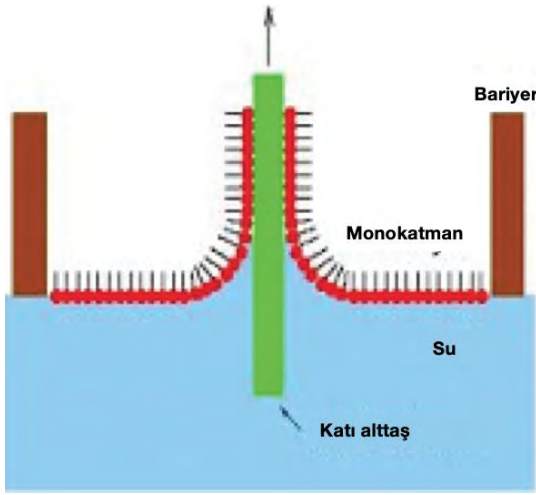
Langmuir-Blodgett (LB)

Hidrofobik taraflara sahip polar moleküller bir sıvı üzerine aktarıldığında, tek katmanlı bir arayüz meydana gelmektedir. Langmuir-Blodgett metodu, bu tek katman materyalin bir katı alttaş üzerine immobilize edilmesine dayanmaktadır. Katman kontrolünün sağlandığı bu metotta alttaş, sıvıya daldırılarak arayüzde toplanan materyalin katı yüzeye transferi gerçekleştirilmektedir. İmmobilize edilmek istenen materyal, yüzey basıncı mobil bariyerler

tarafından sürekli kontrol edilen distile su ile dolu küvete aktarılmaktadır. Bu küvet içerisine batırılan substrat belirli bir hızda yukarı çekilirken, mobil bariyerler yüzey gerginliğini ayarlamaktadır (Anton 2008; Hudgins 2011). İnce film üretiminde moleküler seviyede kontrol sağlaması ve tek katman oluşturma noktalarında LB metodu ön plana çıkmaktadır (Şekil 16.) (Nicolini *et al.* 1999; Ueno and Shibata 2002; Moleirad and Rezaeian 2014; Akbari *et al.* 2017). Stoplazmik tarafın hidrofilik özelliğinden dolayı bR, LB tankında bulunan sıvı yüzeyinde moleküller üst üste gelmeyecek şekilde sıkıştırılabilmektedir. bR'nin fotoaktivitesine dayalı uygulamalarda, yaklaşık %85 yönelimli tek katman oluşturma imkanı sağlayan LB tekniği birçok çalışmada kullanılmıştır (Tablo 4.) (Li *et al.* 1995; Choi *et al.* 1998; Nicolini *et al.* 1999; Yuan *et al.* 1999; Min *et al.* 2001; Ueno and Shibata 2002; Choi *et al.* 2003; Moleirad and Rezaeian 2014; Akbari *et al.* 2017). Bu gibi avantajlarının yanında uygulama aşamasında gereken özel araçlar, solüsyonlar, çevresel izolasyon gereksinimi, uzun işlem süreleri ve tek katman bR'nin fotoakım verimindeki nispeten düşüklük gibi nedenler LB metodunun uygulanmasını zorlaştırmaktadır (Min *et al.* 1998; Chu *et al.* 2003; Anton 2008).

Tablo 4. bR-Langmuir-Blodgett İnce Film Çalışmalarından Bazıları

Literatürdeki çalışmalar	bR kullanımı	Çalışmanın hedefi	Sonuç
Yuan <i>et al.</i> 1999	bR ince filmleri, yüksek iletkenliğe sahip bir proton alıcısı olan polypyrole (PPY) ile kaplı ITO filmleri üzerine immobilize edilmiştir.	bR'nin farklı iletken materyaller ile kompoze edildiğinde fotoyanıtındaki gelişim araştırılmıştır.	Normal bR-LB ince filmlerine oranla bR-PPY filmlerinin fotovoltaiik olarak daha iyi performans gösterdiği kaydedilmiştir.
Choi <i>et al.</i> 2001	Bu çalışmada bR, fotosentetik reaksiyon merkezi gibi işleve sahip bir mononükleotid olan Flavin ile katmanlı film oluşturulmasında kullanılmıştır.	Geliştirilen bR-Flavin çoklu katmanlarına dayalı bir fotoreseptör tasarımı yapılmıştır.	Renkli görüntü algılamaya yönelik geliştirilen fotoreseptörde bR-Flavin çoklu katmanları 9 piksellik retinal benzeri bir fotoreseptör üretiminde kullanılarak istenen performans elde edilmiştir.
Moleirad and Rezaeian 2014	Bu çalışmada bR, yüksek dayanıklılık ve bağlama enerjisine sahip ZnO nanopartikül kaplı ITO üzerine immobilize edilmiştir.	bR ince filmi ile oluşturulan elektrik potansiyelinin fotovoltaiik hücrelerde kullanılması araştırılmıştır.	Biyosolar panellerde LB tekniği ile hazırlanan bR ince filmlerinin fotovoltaiik verimi arttırdığı gözlemlenmiştir.



Şekil 16. Langmuir-Blodgett metodu ile immobilizasyon görüntüsü (Akbari *et al.* 2017).

Elektroforetik Sedimentasyon (EPS)

Yüzeyleri arasındaki yük farkından dolayı kolaylıkla yönlenen PM, nötr pH durumunda stoplazmik tarafındaki negatif yük sayesinde pozitif yüklü yüzeylere immobilize edilebilmektedir. Bu metodda PM ya da bR solüsyonu pozitif (+) ve negatif (-) yüklü iki farklı elektrot arasına aktarılmaktadır. Birkaç saniye süre içerisinde bR ince filmlerinin yönlendirilmiş olarak pozitif yüklü elektrota immobilizasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir. 4-40 V arası farklı varyasyonlarda elektrik uygulanan EPS metodunda elektrotlar arasındaki mesafe ve uygulanan elektrik alanı immobilizasyonu etkileyen faktörlerdir. (Anton 2008). PM solüsyon veya kompozit filmlerinin elektroforez kullanılarak substratlara immobilize edilmesi, yönlendirilmiş bR film üretiminde kullanılan en basit ve yaygın yöntemlerden biridir. Fotoelektrik yanıtını maksimuma çıkarmak maksadıyla yönlendirilmesi için PM süspansiyonuna elektrik alanı uygulanması durumunda, membranın yüzeyleri arasındaki yük farkından oluşan dipol momenti sayesinde PM kolaylıkla yönlenebilmektedir. EPS tekniği ile üretilen filmlerin ışık altında voltaj üretimi ve dayanıklılığı uzun süre devam ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda PM; jelatin, polistren, polivinil, poliakrilamid gibi polimer matrisler ile birlikte kullanılarak ekonomik açıdan daha verimli fotokromik malzemeler üretilmiştir. EPS metoduyla üretilen ince filmlerinin sergilediği; dinamik kararlılık, yüksek çözünürlük ve yüksek fotokromik hassasiyet gibi özellikler bR bazlı fotokromik komponentlerden verim alınabileceğini göstermektedir (Vsevolodov 1998; Zaitsev *et al.* 2012; Riedel *et al.* 2021). Dipol momenti ve asimetric yüzey yük dağılımı sayesinde elektrik uygulandığında, PM elektrik alanına karşı dikey bir şekilde yönlenebilmektedir. Yönlenen negatif yüklü PM tabakaları, ardından anot üzerine tutunmaktadır. Ayrıca, bu işlem esnasında uygulanan elektrikten ötürü metal yüzeylerde oksitlenme meydana gelebilmektedir (Min *et al.* 1998, 1998a; Ueno and Shibata 2002). Yönlendirilmiş bR filmleri birçok araştırmacı tarafından

EPS tekniği kullanılarak fotovoltaiik ve fotokromik uygulamalarda kullanılmak maksadıyla üretilmiştir (Tablo 5.) (Maximychiev *et al.* 1992; Min *et al.* 1998; Ueno and Shibata 2002). Langmuir-Blodgett tekniğine kıyasla, özel bir ekipmana ihtiyaç duymayan ve daha kolay bir yöntem olan EPS metodu aynı zamanda üretilen filmin kalınlığı kontrol edilememesi ve alttaşların iletken olması zorunluluğu gibi görece dezavantajlara da sahiptir (Anton 2008).

Tablo 5. bR-Elektroforetik Sedimentasyon (EPS) İnce Film Çalışmalarından Bazıları

Literatürdeki çalışmalar	bR kullanımı	Çalışmanın hedefi	Sonuç
Min <i>et al.</i> 1998	bR ince filmleri ITO alttaşlar üzerine EPS metodu vasıtasıyla immobilize edilmiştir.	EPS ile depoze edilen bR'nin fotoakım ölçümleri gerçekleştirilmiştir.	LB metodu ile hazırlanan bR ince filmlere göre daha verimli bir fotoyanıt gözlemlenmiştir.
Min <i>et al.</i> 2001	bR ince filmleri spyropran ile kompoze edilerek ITO alttaşlar üzerine EPS metodu ile yüklenmiştir.	bR-Spyropran-ITO yapısı görsel fotoreseptör cihaz geliştirtirilmesinde kullanılmıştır.	bR bazı ince filmlerin biyoelektronik cihazlarda kullanılabildiği ve moleküler seviyede bilgi aktarımı ve işlemi gerçekleştirilebildiği sonucuna varılmıştır.
Ueno ve Shibata 2002	Saflaştırılmış bR, ITO üzerine EPS ve LB metodları ile immobilize edilmiştir.	bR ince filmlerinin redüksiyon akım ölçümleri gerçekleştirilmiştir.	LB tekniği ile yapılan filmlerde EPS tekniği ile üretilenlere göre daha yüksek redüksiyon akımı gözlemlenmiştir.

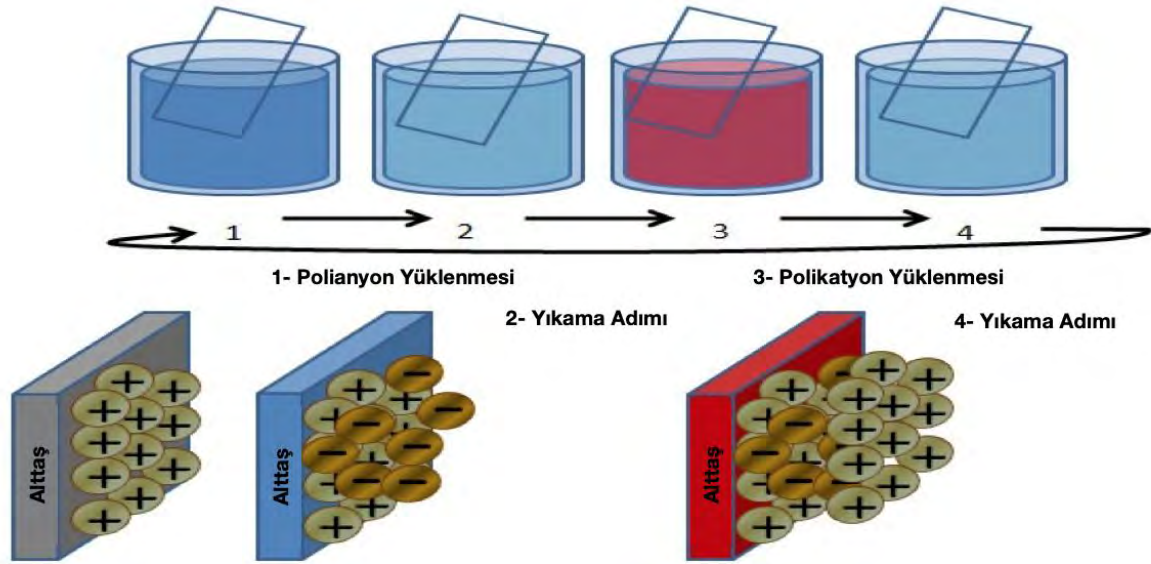
Elektrostatik Self-Assembly (Layer-by-layer) (ESA-LbL)

Elektrostatik yüklenme kullanılarak zıt yüklü materyallerin birbiri ile bağlanması sağlandığı tekniktir. Genellikle silika bazlı (quartz, cam vs) substratlar, solüsyon aracılığıyla hidroliz edilerek negatif hale getirilmektedir. Zıt yüklü polielektrolitler üzerinde çoklu katman oluşturmak için kullanılan bir metoddur. Bu teknik; enzimler, nanopartiküller, organik boyalar, DNA gibi birçok materyalin immobilize edilmesinde kullanılmıştır. Biyomateryaller için bu tekniğin kullanılmasında; suyla çözünür proteinlere uygulanabilirlik, uygulamada basitlik, biyomateryalin denatüre olmaması, katman parametrelerinin kontrol edilebilir olması gibi avantajlar bulunmaktadır. Depoze edilecek materyalin, substratla birlikte solüsyona aktarılması ile immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir (He *et al.* 1998; Hudgins 2011). LbL ve self-assemble tekniklerinin birbirlerine çok benzer olması ve uygulamanın genellikle aynı metodlar kullanılarak yapılmasından dolayı bu iki teknik çoğunlukla aynı başlık altında incelenmektedir. PM, sürfaktanların kovalent bağlarla kimyasal olarak sabitlendirilerek veya amin, alkol, hidrokarbon gibi malzemelerin non-kovalent, fiziksel yöntemlerle sabitlendirilerek modifiye edilmiş cam yüzeylerine immobilize edilmektedir. Sürfaktanlar yerine yüklü polimerlerin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (Tablo 6.) (He *et al.* 1998; Chu *et al.* 2003; Chu *et al.* 2005; Li *et al.* 2010; Zaitsev *et al.* 2012). bR, Anyonik özelliği sayesinde elektrostatik self-

assembly metodu ile kolaylıkla PDAC, PAH, PEI, PLL gibi katyonik materyaller üzerine immobilize edilebilmektedir. bR ince filmlerinin ucuz ve güvenli bir şekilde immobilizasyonuna imkan tanıyan ESA-LBL metodunda bR karşıt yüklü sıvı solüsyon içerisine daldırılarak immobilizasyon gerçekleşene kadar bekletilmektedir (Şekil 17.) (Li *et al.* 2010)

Tablo 6. bR-Elektrostatik Self-Assembly (ESA-LBL) İnce Film Çalışma Örnekleri

	bR kullanımı	Çalışmanın hedefi	Sonuç
He <i>et al.</i> 1998	Saflaştırılmış bR, PDAC polikasyonu ile kompoze edilerek LbL metodu ile quartz, cam ve silikon wafer altaşlara immobilize edilmiştir.	LbL metodu ile üretilen bR ince filmlerinin UV-Vis, AFM, elipsometri karakterizasyonları yapılarak LB ve EPS tekniği ile üretilen filmler ile kıyaslanmıştır.	LBL ile üretilen bR-PDAC ince filmlerinin second-order hassasiyetinin EPS ile üretilenden daha yüksek olduğu ve depoze edilen mor membran yamalarının LB tekniği ile üretilenden daha yoğun olduğu sonucuna varılmıştır.
Chu <i>et al.</i> 2003	bR, PAH polikasyonu ile bir araya getirilerek ITO altaşa immobilize edilmiştir.	bR-PAH ince filmlerinin fotoyant özellikleri bR-PDAC kompoziti ile karşılaştırılmıştır.	bR-PAH kompozit filminin bR-PDAC ince filminden %30 daha iyi light-on fotoakım gösterdiği gözlemlenmiştir.
Li <i>et al.</i> 2010	Bu çalışmada, bR-PM-PLL çoklu katmanları LbL tekniği ile üretilerek Au kaplı silikon wafer üzerine immobilize edilmiştir.	Au kaplı Si waferlar üzerine immobilize edilen bR-PLL ince filmlerinin karakterizasyonu ve fotoyant ölçümleri gerçekleştirilmiştir.	bR-PLL çoklu katman filmi içinde bir katmanın kaplama oranının %90 oranla LB tekniğine oldukça yakın olduğu, ayrıca LbL çoklu katmanlarının katman sayısı arttıkça dayanıklılığının arttığı gözlemlenmiştir. PLL'nin bR fotoyantında artış meydana getirdiği de rapor edilmiştir.



Şekil 17. Elektrostatik self-assembly tekniği ile materyal depozisyonu uygulama şeması (Hudgins 2011)

Karakterizasyon

bR ince filmlerinin farklı altaşlar üzerine farklı teknikler kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyonu sonucunda üretilen yapıların tanımlanmasında; genellikle W veya ^2H ampüllerinin ışık kaynağı olarak kullanılarak bir materyalin konsantrasyonu doğru orantılı bir

şekilde yöneltlen ışın demetini soğurmasına dayalı UV-Vis NIR spektrofotometrisi, materyallerin kristalin yapılarının analiz edildiği bir yöntem olan ve monokrom bir X-ışın demetinin yöneltmesi sonucu gerçekleşen kırınımına dayalı X-ışığı kırınım (XRD) analizi, X-ışınlarının foton kaynağı olarak kullanılarak oluşturulan fotoelektrik etki sayesinde materyallerin yüzey kimyasal analizinde tercih edilen X-ışığı fotoelektron spektroskopisi (XPS), Ultraviyole veya infrarede yakın dalgaboylarında monokrom bir lazer vasıtasıyla analizi edilmek istenen materyale yöneltlen fotonların yüzeyde oluşturduğu kırınım ve titreşimlerine dayalı Raman analizi, materyallerin kızılötesi spektral analizi sayesinde yapısal ve kimyasal özelliklerinin incelenmesinde kullanılan Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), 3-D optik mikroskop vasıtasıyla yüzey topografisinin analiz edildiği profilometri, Örnek yüzeyinin yüksek enerji eşikli elektronlar ile taranarak incelendiği geçirmeli elektron mikroskopisi (SEM), elektron ışınlarının örnek içinden iletilerek objektif lens ile görüntü alınan taramalı elektron mikroskopisi (TEM), nanometre boyutlarda aşırı hassas prob ile yüzeye uygulanan basınç aracılığıyla yüksek çözünürlüklü yüzey analizine olanak sağlayan atomik kuvvet mikroskopisi ve daha bir çok analitik yöntem kullanılmaktadır (Sumper *et al.* 1976; Henderson 1977; Michel *et al.* 1980; Brizzolara *et al.* 1995; Brown *et al.* 1997; Essen *et al.* 1998; Frydrych *et al.* 2000; Hampf 2000; Bergo *et al.* 2003; Sezen 2011; Akhavan 2014; Knoblauch *et al.* 2014; Hıdıroğlu 2015; Kumar *et al.* 2016; Jeganathan *et al.* 2019; Akdağ 2020; Akçan 2021; Güngör 2022).

Optimizasyon

Archaea domainine ait canlılar ilgi çekici fizyolojik özelliklerinin yanında ekolojik açıdan büyük öneme sahiptir. Arkelerin ticari hücre üretimi, diğer mikroorganizmaları normalde zehirleyebilecek ucuz besin kaynaklarının kullanılabilmesi ve sterilizasyona ihtiyaç duyulmaması gibi avantajları sayesinde artmaktadır. Arke hücre fabrikasyonunda elde edilen ürünler arasında bacterioruberin, squalene, bR, dieter-tetraeter lipidler, bakteriyosin gibi halofiller tarafından sentezlenen biyomoleküller bulunmaktadır. Bunun yanında polihidroksialkanoat ve metan gibi ürünlerin üretimi geliştirilmektedir. %8-10 tuz yoğunluğuna sahip ortamlarda yaşayan türler de bulunmasına rağmen, halofilik arkelerin yaşam ortamlarının optimum tuz oranı genellikle %15-25 arasında değişmektedir. Düşük yoğunlukta yaşayabilen türler genellikle yüksek yoğunluklu ortamlarda gelişim gösterirken, yüksek yoğunluğa ihtiyaç duyan türler düşük konsantrasyonda gelişim sağlayamamaktadır. Yüksek sıcaklık ve tuz yoğunluğuna sahip ortamlarda oksijen miktarının düşük olması problemi halofilik arkelerin nihai oksidaz özellikleri ile dengelenmektedir (Dyall-Smith 2008; Güllüce *et al.* 2013; Pfeifer *et al.* 2019).

Su arıtma, karotenoid üretimi, gıda (aroma) gibi endüstriyel çalışmalarda da üretimi yapılan haloarkelelerin yavaş büyüme oranları, kültivasyon şartlarının zorluğu, maliyetlerin yüksek ve üretim veriminin düşük olmasından dolayı üretim optimizasyonu üzerinde birçok çalışma mevcuttur. Kompleks amino asit kaynakları, C ve N kaynakları (tripton, casamino asit, pepton, jelatin, meat ekstrakt, yeast ekstrakt vs.) ve trace metaller (Mn, Zn, Fe, Cu) gibi enzimatik yardımcı komponentler içeren besiyeri formülleri bulunmaktadır. Ayrıca bu besiyerlerinde toksik kirliliklerin önlenmesi açısından corn-steep powder, nişasta gibi elementler kullanılmaktadır. Metabolitler ve diğer gelişim inhibitörlerine direkt bağlanan bu elementler halobakteriyel gelişim olumlu yönde etkilemektedir. Bu inhibitörlerin etkisiz hale getirilmesi açısından tamamen sentetik besiyeri kullanımı da mümkündür, fakat hem kullanılan malzemelerin nispeten pahalılığı ve karşılığında alınan düşük verim hem de hücre dışı metabolitlerin engellenememesi dolayısıyla sentetik besiyerlerinin geniş çapta kullanımı elverişli değildir. Bunun dışında gelişime engel materyallerin oluklu lif vasıtasıyla toplanması da uygulanan bir metoddur. bR sentezleyen birçok halofilik arke bulunmasına rağmen, *H. salinarum* endüstriyel olarak ön plana çıkmaktadır. Fakat üretilen bR miktarındaki düşüklük ve kültivasyon zorluklarından dolayı üretim kapasitelerini artırmak ve maliyetleri düşürmek daha önemli hale gelmiştir. Bu koşulların oluşturduğu talep karşısında yapılan optimizasyon çalışmaları kapsamında; besiyeri formülleri, aydınlatma, oksijen miktarı, çalkalama vs gibi parametreler üzerinde incelemeler bulunmaktadır (Lee *et al.* 1998; El-Sayed *et al.* 2002; Ghasemi *et al.* 2008; Manikandan *et al.* 2009; Atlas 2010; Seyedkarimi *et al.* 2015; Shiu *et al.* 2015; Kalenov *et al.* 2016; Mahler *et al.* 2018; Jeganathan *et al.* 2019). Yapılan optimizasyon çalışmalarında üretimin arttırılması için genellikle sıcaklık, pH, aydınlatma, besin kaynakları, çalkalama hızı, havalandırma gibi ortam parametrelerinin optimum seviyeleri araştırılmaktadır.

MATERYAL VE METOD

Kullanılan Alet ve Cihazlar

Otomatik pipetler (Eppendorf, GERMANY)
UV-Visible Spektrofotometre (PG Instrument, T80 UV/VIS Spektrofotometre, USA)
Microplate Spektrofotometre (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA)
İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)
Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)
Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)
Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)
Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)
pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)
Derin Dondurucu (Nuair -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)
Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)
Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)
Su Banyosu (Mettmert WNB14, GERMANY)
Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)
Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)
Santrifüj (Hettich EBA 21, GERMANY)
Mikrodalga Fırın (Beko MD1505, TÜRKİYE)
Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)
Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIDI, Inc., Newark, GERMANY)
PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)
Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)
Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)
Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)
Ultra Santrifüj (Beckman- Coulter ProteomeLab™ XL-A/XL-I, U.S.A.)
Multimetre (Hung-Chang HC-3030S, CHINA)
Potansiyostat (Gamry Reference 600 Potentiostat/Galvanostat/ZRA, U.S.A)
Işık Kaynağı (Voss GmbH HelioSim CL-60, Germany)
9V Pil (Duracell, Kodak, CHINA)

bR İzolasyon ve Delipitasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Potasyum Fosfat çözeltisi (100 mL %24): 220 g monobazik KH_2PO_4 , 20 g K_2HPO_4 , pH 8'e ayarlanarak 1000 mL saf su içinde çözülmüştür (Hıdıroğlu 2015).

İzotonik Çözelti (1000 mL): 250 g NaCl, 20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g KCl, 1000 ml saf su içinde çözülüp, pH 7.2'ye ayarlanarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

PEG (Polietilen glikol) çözeltisi (100 mL %24): %40'lık polietilen glikol solüsyonundan 120 mL alınarak üzeri deiyonize su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır (Hıdıroğlu 2015).

CHAPS 3-[(cholamidopropyl) (dimethylammonio) propane sulfonate] çözeltisi (41,4 µL, 20 mM): 0,0123 g CHAPS Hidrat 1 mL steril saf su içinde çözülmüştür (Hıdıroğlu 2015).

DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Sodium Chloride Tris EDTA (STE) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) çözeltisi: 1,21 g Tris, 1,75g NaCl ve 3,72 g EDTA saf su içerisinde çözülüp, 1 N HCl ile pH 8'e ayarlanıp, toplam hacim 200 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

Tris EDTA (TE) (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu: 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözülüp, pH 8'e ayarlanarak, son hacim 250 ml'ye tamamlanıp otoklavda steril edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

5 M NaCl çözeltisi: 29,22 g NaCl, 100 mL saf su içerisinde çözülerek, otoklavda steril edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

1X TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) çözeltisi: 0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA saf su içerisinde çözülüp, pH'sı 8'e ayarlanarak, son hacim 200 ml'ye tamamlanıp otoklavda steril edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

%10 SDS (sodyum dodesil sülfat) çözeltisi: 10 g SDS nin 100 mL saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlanarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

Dimetil sülfoksit (DMSO): %100'lük DMSO 2ml'lik eppendorf tüplere aktararak, kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

%10 CTAB (Hexadecyl trimetyl-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi: 80 mL saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözüldü. NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g

CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlanıp, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi: 25 mL fenol, 24 mL kloroform ve 1 mL izoamilalkol karıştırılıp hazırlanarak -20°C'de muhafaza edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi: 24 mL kloroform ve 1 mL izoamilalkol karıştırılıp hazırlanarak, -20°C'de muhafaza edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

%70'lik Etil alkol: 70 mL saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 mL ye tamamlanmıştır, -20°C'de muhafaza edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

Proteinaz K: 1 mL steril distile su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlanarak, -20°C'de muhafaza edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

5x TBE Tamponu (pH: 8): 54 g Tris, 27,5 g borik asit ve 20 mL 0,5 M EDTA 500 mL steril distile su içerisinde çözüldükten sonra karışımın pH'sı 8'e ayarlanarak, toplam hacim steril distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır (Hıdıroğlu 2015).

0,5x TBE Tamponu: 100 mL 5X TBE'nin hacmi steril distile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Hıdıroğlu 2015).

Ethidium bromide çözeltisi: 100 mL distile su içerisinde, 1 g ethidium bromide (10 mg/ml) magnetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözülmüş, amber şişe içinde, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

6x yükleme tamponu: 100 mL için, %100'lük gliserolden 40 mL alınıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırılmış, hacmi 1X TBE ile 100 mL'ye tamamlanarak, otoklavda steril edildikten sonra +4°C de muhafaza edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

DNase (Deoxyribonuclease) Solüsyonu: 2000 U liyofilize DNase 1 ml distile su ile çözülmüş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

1 M 100 mL'lik Tris-HCl çözeltisi (pH:8.8): 12.11 g Trizma tartıldı, 80 mL saf suda çözülmüştür. pH'sı 8.8'e ayarlanarak son hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır (Hıdıroğlu 2015).

%30 Akrilamid ve Bisakrilamid (%30-%0.8) çözeltisi: 30 g Akrilamid ve 0,8 g Bisakrilamid tartılıp, 128 mL dH₂O içerisinde çözülerek, 37°C'de karıştırılmıştır. 0,45 µm filtre kağıdı ile filtre edilerek pH'sı 7'ye ayarlanmıştır (Hıdıroğlu 2015).

Coommassie Brilliant Blue G250 hazırlanması: 100 mg Coommassie Brilliant Blue G250, 50 mL %95'lik etanolda çözülerek üzerine 100 mL %89'luk fosforik asit ilave edilmiştir. Daha sonra çözeltinin hacmi saf su ile 1 litre'ye tamamlanmıştır (Hıdıroğlu 2015).

Elektroforezde kullanılan Boyama çözeltisi: 50 mL metanol+10 mL asetik asit pipet vasıtasıyla alınarak 40 mL saf su içerisinde, 0,1 g Commassie Brilliant Blue reaktifi ile birlikte çözülmüştür. Son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır (Hıdıroğlu 2015).

Elektroforez çözeltisi: 50 mL metanol+10 mL asetik asit + 40 mL saf su, pipet vasıtasıyla alınarak, küçük beher içerisinde iyice karıştırılmıştır (Hıdıroğlu 2015).

%10 SDS çözeltisi: 10 g SDS tartılıp, 50 mL saf su içerisinde ısıtılarak çözülmüştür. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır (Hıdıroğlu 2015).

Ayrırma jelin hazırlanması: 15 mL 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 10,7 mL %30'luk akrilamid, %0.8'lik bisakrilamid, 0,61 mL %0.1 SDS ve 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N' - tetrametil etilen diamin), 11,9 mL suda karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1.5'lik amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ ilave edilmiştir (Hıdıroğlu 2015).

SDS-Page işleminde kullanılan çözeltiler

Acrylamide/Bis

87.6 g Acrylamide ve 2.4 g N'N'-bis-methylene-acrylamide diH₂O içinde çözülür. Çözelti 300 ml'ye tamamlanır. 200 ml çözelti hazırlanması için 58.4 g Acrylamide ve 1.6 g N'N'-bis-methylene-acrylamide kullanılır. Çözelti alüminyum folyoya sarılarak 30 gün boyunca 4 C°'de saklanır (Hıdıroğlu 2015).

Ayrırma Jeli için;1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (150 ml)

27.23 g Tris base, 80 ml diH₂O içinde çözülür. Ardından pH 8.8'e 6 M HCl ile ayarlanır. Elde edilen çözelti diH₂O ile 150 ml'ye tamamlanır. 4 C°'de saklanır (Hıdıroğlu 2015).

Yığılma Jeli için;0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

6 g Tris base, 60 ml diH₂O içinde çözülür. 6 M HCl kullanılarak pH 6.8'e ayarlanır. Elde edilen çözelti 100 ml'ye tamamlanır. 4 C°'de saklanır (Hıdıroğlu 2015).

10% (w/v) SDS (100 ml)

10 g SDS, 90 ml diH₂O içinde yavaşça karıştırılarak çözülür. 100 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır (Hıdıroğlu 2015).

10% (w/v) APS (fresh daily)

0.10 g Ammonium persulfate 1 ml diH₂O içinde çözülür. SDS-Page jeli hazırlanmadan önce günlük olarak hazırlanır (Hıdıroğlu 2015).

4X Sample Buffer (Numune Tamponu)

Önceden hazırlanan 0.5 M Tris-HCl çözeltisinden 2.5 ml alınıp, 250 mg SDS ve 2,5 ml %87 'lik Glycerol çözeltisi ile karıştırılır. Üzerine Bromophenol blue koyu mavi renk alana kadar eklenir. (Bu çözelti genellikle çabuk bozulmaması için konsantre hazırlanır.) Bu çözeltinin her kullanımında alınan miktarın %5'i kadar β -mercaptoethanol eklenir (Hıdıroğlu 2015).

10X SDS-Page Running Buffer (Yürütme Tamponu)

30.3 g Tris base, 144.1 g Glycine, 10 g SDS diH₂O içinde çözülüp, 1 L'ye tamamlanır. Çalışmamızda genelde 500 ml olacak şekilde formüle edilmektedir (Hıdıroğlu 2015).

İmmobilizasyon İşlemlerinde Kullanılan Malzemeler

El yapımı EPS yürütme küvetleri

Çalışma boyunca yürütülen elektroforetik sedimantasyon işlemleri; 0,5 x 1,5 x 0,5 cm (genişlik, uzunluk, derinlik) ölçülerine sahip el yapımı elektroforez küveti ve 25 ml'lik beher glass içerisinde gerçekleştirilmiştir.

ITO kaplı cam

İmmobilizasyon çalışmalarında kullanılan Sigma&Aldrich markalı ITO kaplı cam alttaşlar Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul tarafından temin edilmiştir. ITO camlar, el yapımı elektroforez ve elektrokimyasal ölçüm küvetlerine sığdırılması için 0,3 x 3 cm boyutlarında kesilmiştir.

Porosilikon kaplı cam

İmmobilizasyon çalışmalarında kullanılan Porosilikon kaplı cam alttaşlar Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dr. Öğretim Üyesi Ömer Çoban tarafından kaplama işlemleri dahil olmak üzere 0,4 x 0,5 cm boyutlarında hazır halde temin edilmiştir.

Kültür Çalışmaları

İzolasyon için gereken örneklerin temini

Çalışmamızın ilk safhasında Bacteriorhodopsin (bR) üretme potansiyeline sahip halofilik arkelerin kültürasyon işlemlerinde kullanılmak üzere numuneler steril şartlarda alınıp laboratuvar ortamına aktarılması planlanmıştır. Bu doğrultuda Şereflikoçhisar/Ankara Tuz Gölü mevkiinde belirli koordinatlardan numune alma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bahsedilen koordinatlar ve numune özellikleri Tablo 7.'de verilmiştir.

Tablo 7. Tuz Gölü'nden Alınan Numunelerin Koordinat ve Özellikleri

No	Numune Kodu	Koordinat	Numune Yer Özelliği
1	<i>N-1</i>	38°59'33.7'' N 33°27'27.8'' E	<i>Katı(Açık Pembe)</i>
2	<i>N-2</i>	38°59'33.7'' N 33°27'27.8'' E	<i>Katı-Sıvı(Koyu Pembe)</i>
3	<i>N-3</i>	38°59'33.7'' N 33°27'27.8'' E	<i>Katı-Sıvı(Koyu Pembe)</i>
4	<i>N-4</i>	38°59'33.7'' N 33°27'27.8'' E	<i>Sıvı(Açık Pembe)</i>
5	<i>N-5</i>	38°59'33.7'' N 33°27'27.8'' E	<i>Katı-Sıvı(Koyu Pembe)</i>
6	<i>N-6</i>	38°59'33.7'' N 33°27'27.8'' E	<i>Katı(Açık Pembe)</i>
7	<i>N-7</i>	38°59'47.4'' N 33°26'09.1'' E	<i>Katı(Açık Pembe)</i>
8	<i>N-8</i>	38°59'47.4'' N 33°26'09.1'' E	<i>Katı-Sıvı(Koyu Pembe)</i>
9	<i>N-9</i>	38°59'47.4'' N 33°26'09.1'' E	<i>Katı-Sıvı(Açık Pembe)</i>
10	<i>N-0</i>	38°59'47.4'' N 33°26'09.1'' E	<i>Katı-Sıvı(Koyu Turuncu)</i>
11	<i>N-11</i>	38°59'47.4'' N 33°26'09.1'' E	<i>Sıvı(Renksiz)</i>
12	<i>N-12</i>	39°00'03.5'' N 33°27'16.0'' E	<i>Sıvı(Açık Pembe)</i>
13	<i>N-13</i>	39°00'03.5'' N 33°27'16.0'' E	<i>Katı-Sıvı(Açık Turuncu)</i>
14	<i>N-14</i>	39°00'03.5'' N 33°27'16.0'' E	<i>Katı-Sıvı(Açık Turuncu)</i>
15	<i>N-15</i>	39°00'03.5'' N 33°27'16.0'' E	<i>Katı-Sıvı(Koyu Turuncu)</i>
16	<i>N-16</i>	39°00'13.7'' N 33°27'10.8'' E	<i>Sıvı(Açık Pembe)</i>
17	<i>N-17</i>	39°01'29.5'' N 33°26'26.3'' E	<i>Katı-Sıvı(Sarı-pembe)</i>
18	<i>N-18</i>	39°04'23.4'' N 33°24'32.6'' E	<i>Sıvı(Açık Pembe)</i>
19	<i>N-19</i>	39°04'23.4'' N 33°24'32.6'' E	<i>Katı(Açık Pembe)</i>
20	<i>N-00</i>	39°04'23.4'' N 33°24'32.6'' E	<i>Katı-Sıvı(Koyu Pembe)</i>

Bazal medya ile örneklerin çoğaltılması

Bakteriyorodopsin sentezleme potansiyeline sahip Haloarkeal organizma içeren bu örnekler, sonraki kültürasyon işlemlerinde kullanılmak üzere bazal medya ile çoğaltılmıştır. Bu doğrultuda alınan sıvı ve katı numunelerden 1 ml ve 1 g alınarak %25'lik NaCl çözeltisi içerisinde 24 saat süreyle 37 °C'de çalkalama yöntemiyle homojenize edilmiştir. Süre sonunda her bir örnekten 10 ml alınıp, 250 ml'lik kapaklı kültür şişelerinde bulunan 150 ml'lik sıvı bazal medyaya inoküle edilmiştir. 37 °C' de 40 W gün ışığı aydınlatma, 120 rpm, pH 7.3 şartlarında kültür şişeleri parafilm ile yalıtılarak inkübasyon başlatılmıştır (Şekil 18). Bazal medya formülasyonu Tablo 8.'de verilmiştir (Özcan 2004).



Şekil 18. Bazal medya ile karışık kültürlerin inkübasyonuna ait görüntü

Tablo 8. Bazal Besiyeri Formülü

Bazal Besiyeri (Özcan, 2004)	
Litre başına kullanılan besiyeri içeriği	
<i>NaCl</i>	250.0 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	20.0 g
<i>Trisodium citrate·2H₂O</i>	3.0 g
<i>KCl</i>	2.0 g
<i>Yeast</i>	1,0 g
<i>Casamino asit</i>	7,5 g
<i>Fe₂SO₄·7H₂O</i>	0,023 g

bR Sentezleyen Halofilik Arkelerin İzolasyonu

Kültivasyon işlemlerinde halofilik arke izolatlarını saflaştırma ve farklı türde saf kolonileri elde etmek amacıyla, bazal medyada çoğaltılan karışık halofilik arke kültürlerinden yayma ekim, çizgi ekim ve seyrelterek yayma yöntemleri kullanılarak inokülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Yayma ekim tekniği ile izolasyon

En efektif agarlı besiyeri ortamını seçmek ve daha sonraki kültivasyon işlemlerinde saf kolonileri elde etmek amacıyla özellikle *Halobacterium sp.* türleri için kullanılan iki farklı

içeriğe sahip katı besiyeri (Q1, Q2) petri ortamına sıvı karışık kültürlerden 1'er ml alınarak Drigalski özesi yardımıyla yayma ekim tekniği ile ekim yapılmış ve belirtilen koşullar altında inkübe edilmiştir. Kullanılan bu besiyerlerinin formülasyonları Tablo 9'da verilmiştir. Besiyerleri 1 lt içine agar dışındaki materyaller katılıp pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra %2 agar ilave edilerek hazırlanmıştır.

Tablo 9. Katı Besiyeri Formülleri

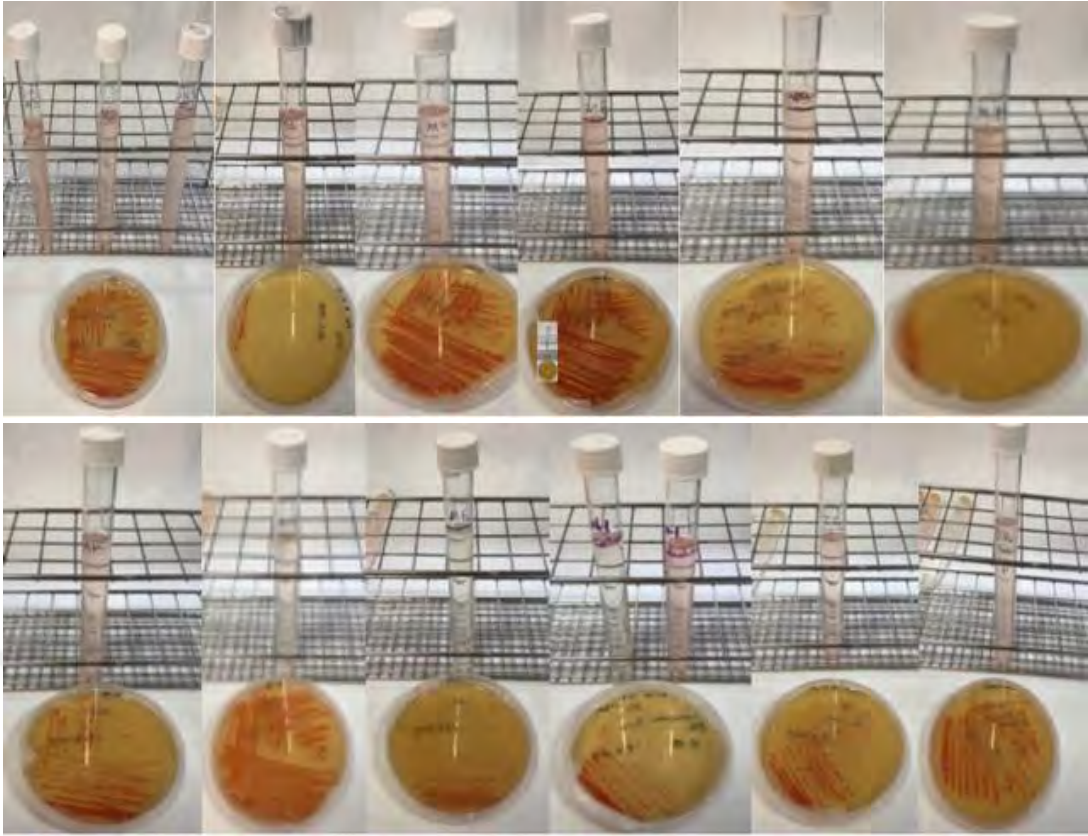
	II.Katı besiyeri (Q2) (Atlas 2010)	I. Katı besiyeri (Q1) (Çakıcı 2004)
<i>NaCl</i>	250,0 g	250,0 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	20,0 g	20,0 g
<i>Trisodium citrate·2H₂O</i>	3,0 g	3,0 g
<i>KCl</i>	2,0 g	2,0 g
<i>Peptone</i>		10,0 g
<i>Yeast</i>	10,0 g	1,0 g
<i>Agar</i>	20,0 g	20,0 g
<i>MnSO₄·H₂O</i>	0,2 g	
<i>Casamino asit</i>	7,5 g	
<i>Fe₂SO₄·7H₂O</i>	0,05 g	

Çizgi ekim tekniği ile izolasyon

Yayma ekim tekniğinde izolatlar için en efektif olan uygun agarlı besiyeri belirlendikten sonra farklı kolonileri birbirlerinden ayrı ve tek tek düşecek şekilde elde etmek amacıyla yayma tekniğinde elde edilen izolatlardan platin öze yardımıyla uygun miktarda alınıp 23 adet M (M1, M2,...M23) kodlu agarlı besiyeri petri ortamına çizgi ekim tekniği ile aseptik şartlar altında ekim yapılarak transfer işlemi gerçekleştirilmiş ve belirtilen koşullar altında inkübe edilmiştir.

Seyrelterek yayma tekniği ile mikro kolonilerin seçilmesi

Çizgi ekim tekniği ile elde edilen M kodlu kültürlerden uygun koloniler seçilerek aseptik olarak, sıvı besiyerlerine inoküle edildikten sonra önceden belirtilen kültürasyon şartları altında inkübe edilmiştir ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4 °C'de saklanmıştır. Elde edilen saf halofilik arke izolatlarının her birinden mikro kolonilerin seçilmesi, birbirlerinden yeterince uzaklıkta ve tek tek düşmesini sağlamak amacıyla seyrelterek yayma kültür tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte seyreltme işlemi için sıvı besiyeri kullanılmıştır. İzolatlardan 1'er ml alınıp, 9 ml'lik besiyeri sıvısı içine bırakılarak 1:10 (10^{-1}) oranında seyreltilmiştir. Ardından, tekrar seyreltilen numuneden 1 ml alınıp besiyeri sıvısı içine bırakılarak işlem 10^{-1} ... 10^{-9} 'a kadar tekrar edilmiştir. Seyreltilen numunelerden 1'er ml alınıp petrilere yayma yöntemi ile ekim yapılarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından belirgin suşlar alınıp saf kültür izolatları oluşturulmuştur (Şekil 19) (Tunail 2009).



Şekil 19. Çizgi ekim ile elde edilen M kodlu ile izolatlarla ait görüntü

BR içeren kültürlerin saklanması ve stoklanma prosesi

İzole edildikten sonra uygun besiyerinde geliştirilen halofilik arkeler, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanmıştır. Bu amaçla halofilik arkelerin besiyeri ortamına, son konsantrasyonu %20 olacak şekilde, önceden 121 °C’de otoklavla steril edilen gliserol eklenip iyice karışması sağlanmıştır. Kültür, 1’er ml hacimlerde bölünerek steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Bu tüpler nitrojen buz içerisinde dondurulduktan sonra -70 °C’de saklanmıştır (Özcan 2004; Kahraman 2008).

Elde Edilen İzolatların Moleküler İdentifikasyonu

DNA izolasyon prosedürü

Seyrelterek yayma tekniği ile izolasyonu gerçekleştirilen 11 adet saf halofilik arke izolatına ait NES kodlu (NES-1,...NES-11) koloniler, petrilerden bazal medya içerisine aktararak inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 4 günlük inkübasyon süresi sonunda 10’ar ml kültürler, santrifüj edilerek elde edilen pelet DNA izolasyonu için hazır hale getirilmiştir. DNA izolasyon işlemleri aşağıda belirtildiği gibi sırasıyla uygulanmıştır;

- Önceden sterilize edilen Eppendorf tüplerinde, 2 ml sıvı kültür santrifüj edilerek elde edilen arke hücre peleti, 1000 µl STE tamponu ile süspanse edilmiştir.

- Solüsyonun maksimum oranda homojenize edilmesi maksadıyla yüksek hızlı vorteks işlemi uygulanmıştır.
- Ardından karışım 10.000 rpm'de 10 dak süreyle santrifüj işleminden geçirilerek, süpernatant kısım ortamdan mikropipet vasıtasıyla ayrıştırılmıştır.
- Elde edilen pelet 1000 µl STE tamponu ile resüspanse edilerek, 10 dak 10.000 rpm'de gerçekleştirilen santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Santrifüj adımı süpernatant kısım berrak hale gelene kadar tekrar edilmiştir.
- Santrifüj işlemi sonucunda ayrıışan süpernatant kısım ortamdan kaldırılarak, elde edilen peletin üzerine 500 µl STE tamponu ilave edildikten sonra mikropipet yardımıyla süspansiyon, homojen olacak şekilde karıştırılmıştır.
- 75 °C'ye ayarlanmış sıcak su küvetinde, 30 dk. inkübasyona bırakılan karışımla dolu tüp, 15. dakikasında 4-5 kez yavaş bir şekilde çalkalanarak inkübasyona devam edilmiştir.
- Su banyosunun ardından karışıma, 50 µl %10'luk SDS ve 7 µl proteinaz K eklenerek, 40 °C'ye ayarlı su küvetinde inkübasyon, 1 saat süreyle tekrar gerçekleştirilmiştir.
- İnkübasyon sonrası karışımın tuz konsantrasyonunun 0,75-0,8 M ayarlanması için, 5M NaCl ve 0,1 hacim %10'luk CTAB/0,7 M NaCl ile süspanse edilmiştir.
- 65°C'ye ayarlı su küvetinde, karışım 15 dk. inkübe edilmiştir. Ardından karışıma, eşit hacimde 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol ilave edilerek, oda sıcaklığında 15 dk. dikey tüp karıştırıcı ile karıştırılmıştır.
- Karıştırma işleminin sonunda tüp, 16.000 rpm'de 15 dk santrifüj işlemine tabi tutularak oluşan süpernatant kısım, yeni steril ependorf tüplere aktarılıp, 0,1 hacim %10 CTAB/ 0.7 M NaCl ile süspanse edilmiştir.
- 65 °C'ye ayarlı su banyosunda 15 dk. bekletilen süspansiyona eşit hacimde 24:1 kloroform: izoamilalkol eklenerek, oda sıcaklığında 15 dk. çalkalanmıştır.
- Santifüj işlemi, 16.000 rpm'de 15 dk. tekrar edilerek, oluşan süpernatant kısım, tekrar yeni steril bir tüpe aktarılıp, 0,6 hacim izopropanol ile süspanse edilmiştir.
- -20 °C'de 1 gece boyunca bekletilmesinin ardından, 15.000 rpm'de 15 dk. santrifüj işlemine tabi tutulan karışıma, daha önceden -20°C'de bekletilen %70 lik etanolden 500-600 µl eklenerek, tekrar 15.000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant kısmının dikkatlice ortamdan ayrıştırılmasının ardından pelet, 600 µl %70'lik etanol ile süspanse edilerek, 15.000 rpm'de 15 dk. tekrar santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım dikkatlice alınarak, etil alkolün ortamdan arındırılması ve

DNA'nın şeffaf bir görünüm alması amacıyla tüp, ağzı açık olacak şekilde 3 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

- Kurutma işleminin ardından, DNA ürünleri 70 µl TE içinde oda sıcaklığında 30 dk. çözündürülüp, 3 µl RNase ile süspanse edilerek, 4 °C'de stoklanmıştır (Adıgüzel 2006; Alaylar 2017).

DNA derişim ölçümü ve çalışma solüsyonunun hazırlanması

DNA miktarı 260 nm'de gerçekleştirilen UV-Vis Spektrofotometre ölçümü ile belirlenip, genetik materyalin proteinlerden arındırılması 280 nm'deki absorpsiyon ölçümü ile tespit edilmiştir. Kuvars absorbans küveti içerisine 0,998 ml TE çözeltisi eklenerek 260 nm'de kör numune değeri kaydedilmiştir. 2 µl DNA eklenen, TE ile dolu küvetin 260 nm'de tekrar ölçüm yapılarak alınan değerden kör numune değeri çıkarılmıştır. Ardından, 280 nm'de alınan ölçümler için yapılan işlemler aynen tekrar edilmiştir. $A_{260}/A_{280}=1,8$ denkliği, ölçülen değerler doğrultusunda örnek çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanılmıştır (Adıgüzel 2006; Brown 2006; Alaylar 2017).

DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonu derişiminin (µg/mL) belirlenmesi

Elde edilen çözeltinin DNA Konsantrasyonu; $\text{DNA kons.}(\mu\text{g/ml})=A_{260}\times 500$ (Seyreltme Faktörü) $\times 50$ (DNA Sabit Değeri) formülü vasıtasıyla belirlenmiştir. DNA çalışma solüsyonu konsantrasyonun ayarlanmasında ise; $(100 \text{ ng}/\mu\text{l} (\text{istenen kons.})\times 200 \mu\text{l} (\text{istenen hacim}))/(\text{Stok DNA kons. } \mu\text{g/ml})$ formülü kullanılmıştır (Alaylar 2017).

Halofilik arke izolatının 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

İzolatlara ait halofilik arke genomunun 16S rRNA gen bölgeleri, universal primerler (P1f ve P1r) kullanılarak *in vitro* koşullar altında polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yardımı ile çoğaltılmıştır. Bu reaksiyonda 5'-ATT CCGTTGATCCTGCCGG-3' ve 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3' primerleri, ileri ve geri primerler olarak kullanılmıştır (İspirli *et al* 2019).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için Master Mix solüsyonu hazırlanması

PCR'ı yapılacak her bir örnek için;

- 3 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %0.01 jelatin pH: 8.3)
- 0.6 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10mM),
- 4 µl P1f (5'-ATT CCG GTT GAT CCT GCC GG - 3')

- 4 µl P1r (5'-AGG AGG TGA TCC AGC CGC AG - 3')
- 1.2 µl DMSO
- 1.8 µl MgCl₂(50 µM)
- 0.3 µl (5 unit/ µl) Taq DNA polimeraz
- 12.1 µl sdH₂O kullanılarak toplamda 27 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanıp, karışıma son olarak 3 µl template DNA (100 ng/µl) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır (Alaylar 2017).

PCR amplifikasyon programı

Hazırlanan örnekler hedef bölge amplifikasyonu;

- 96°C'de 3 dk. denatürasyon
- 94°C'de 1'er dk. 36 tekrar denatürasyon
- 65°C'de 1'er dk. 36 tekrar bağlanma
- 72°C'de 2'ser dk. 36 tekrar uzama
- 72°C'de 5 dk'lık final uzama adımından oluşan program ile, PCR termal döngü (Thermocycler) cihazında gerçekleştirilmiştir (Wen *et al.* 2009).

16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforetik analizi

100 mL 0.5x TBE (%1'lik agaroz jel) tamponu, 1 gr Agaroz ile karıştırılarak, mikrodalga fırın vasıtasıyla çözününceye dek kaynatılmıştır. Ardından, 50 °C'ye kadar soğutulan Agaroz jele 0.6 g/mL olacak şekilde ethidium bromide eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş elektroforez jel küvetine doldurulmuştur. Dondurulması amacıyla 30 dk'lık bekletilen jelden taraklar dikkatlice çıkarılmıştır. Ardından, içerisinde 0.5x TBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. 10 µl, 10 kb DNA markırı [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000- 3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) jel üzerinde ilk sıradaki çukura yüklenmiştir. Diğer çukurlara sırasıyla her bir örnek için 2,5 µl 6x yükleme tamponu, 10 µl PCR ürünü ile karıştırılarak yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 90 V, 1 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ethidium bromide ile boyanan jel üzerindeki DNA bantları, dökümantasyon sistemi ile görüntülenerek, bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edilmiştir (Adıgüzel 2006; Alaylar 2017).

16S rDNA gen bölgesi sekans analizi ve GenBank karşılaştırması

16s rDNA gen sekansı MacroGen firması tarafından yapılmıştır. Nükleotid sekans benzerliği, NCBI'a ait arama programı olan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) kullanılarak belirlenmiştir.

Gram boyama ve TEM görüntüleme

Optimizasyon işlemlerinde kullanılan suşun saflığını, morfolojik yapısını ve S-layer yapısını görüntülemek amacıyla gram boyama işlemi uygulanmıştır. Saf su ve alkol ile temizlenmiş lam üzerine, suşdan bir damla damlatılarak, basit bir smear preparat hazırlanmıştır. Smear preparatı %2'lik asetik asit ile fikse edildikten sonra % 0,25'lik kristal viyole ile 3 dk. süreyle boyanarak, 6 sn. % 95'lik etanol ile işleme tabi tutulmuştur. Ardından 30 sn. boyunca safranin ile boyama yapılarak ışık mikroskopunda immersiyon merceği ile incelenmiştir (Özcan 2004; Kahraman 2008). TEM görüntüleri Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde alınmıştır.

Optimizasyon Çalışmalarında Kullanılacak Başlangıç Suşu ve Selektif Medya Seçimi

16S rDNA sonuçlarına göre *Halobacterium salinarum* olduğu saptanan NES1, NES2, NES5, NES7 izolatları optimizasyon işlemlerinde kullanılacak başlangıç suşu ve selektif medya seçimi amacıyla S-1, S-2, S-3 kodlu 3 farklı sıvı besiyerinde; 250 ml'lik şişelerde 90 ml besiyerine 10 ml kültür olacak şekilde ve 38 °C, 40 W, 150 rpm şartlarında inoküle edilmiştir. Başlangıç suşunun belirlenme işlemi; UV-Vis spektrofotometre (A₅₆₈, A₆₆₀) sonuçları ve saflaştırılan bR miktarları baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Besiyeri formülasyonları Tablo 10-11'de gösterildiği gibidir.

Tablo 10. Selektif Medya Seçiminde Kullanılan Alternatif Besiyerleri

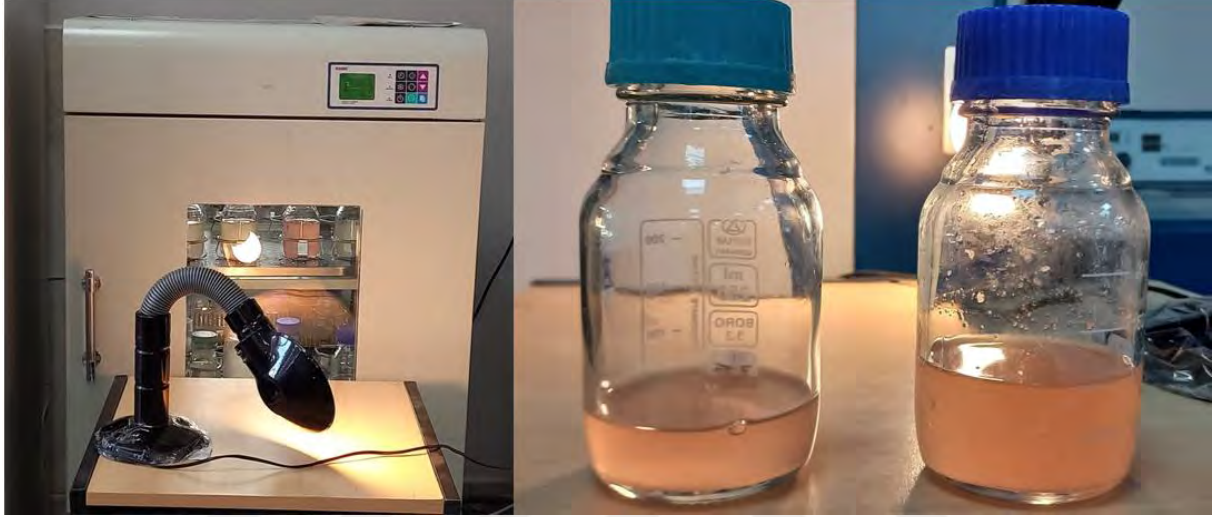
	S-1 Kodlu Besiyeri Formülü (Atlas 2010)	S-2 Kodlu Modifiye Besiyeri Formülü (Çakıcı 2004; Shiu <i>et al.</i> 2014)	S-3 Kodlu Besiyeri Formülü (Ghasemi <i>et al.</i> 2008)
<i>NaCl</i>	250.0 g	250,0 g	250,0 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	20.0 g	20,0 g	20,0 g
<i>Trisodium citrate·2H₂O</i>	3.0 g	3,0 g	3,0 g
<i>KCl</i>	2.0 g	2,0 g	2,0 g
<i>Yeast</i>			1,0 g
<i>Peptone</i>	2,0 g	10,0 g	
<i>Casamino asit</i>			7, 5 g
<i>Fe₂SO₄·7H₂O</i>			0,05 g
<i>MnSO₄·H₂O</i>			0,2 g
<i>Trace metal solüsyonu</i> ¹	0,1 ml	0,1 ml	

Tablo 11. Besiyerinde Kullanılan Trace Metal Solüsyonu Formülü

¹ Litre başına kullanılan Trace Metal Solüsyonu (Atlas 2010)	
<i>ZnSO₄·7H₂O</i>	1.32 g
<i>Fe(NH₄)₂SO₄·7H₂O</i>	0.78 g
<i>MnSO₄·H₂O</i>	0.34 g
<i>CuSO₄·5H₂O</i>	0.14 g

bR Üretici *Halobacterium salinarum* İzolatının Kültür Optimizasyonu

bR üretim verimine göre önceden belirlenen *Halobacterium salinarum* suşunun kültürasyon şartlarının optimizasyon işlemleri, pH, sıcaklık, aydınlatma-havalandırma ve besin kaynaklarının etkisi olmak üzere dört ana başlık altında incelenmiştir. İnkübasyon işlemlerinde gelişim kültürleri; tazelandirmenin 2. gününde, $OD_{660} \approx 0,25$ olacak şekilde farklı deney ortamlarına inkübe edilmiştir (Şekil 20). Çalışma tek seferde tek faktör tekniği ile empirik yöntemle gerçekleştirilmiştir.



Şekil 20. Optimizasyon sürecinde kültürler için inkübatör görüntüsü

pH optimizasyonu

Kültürasyon şartlarının optimize edilmesinde belirlenen izolat, farklı pH ortamlarına sahip besiyerlerine, henüz optimize edilmemiş faktörler için önceden belirlenmiş medya şartları kullanılarak inkübasyon gerçekleştirilmiştir (150 rpm, 40 W, 37 °C). Toplamda 500 ml olacak şekilde distile su içerisinde 125 g NaCl, 10 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5 g $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 1 g KCl, 5 g bakteriolojik peptone (Oxoid L37) karıştırılmış ve 1.32 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.78 g $Fe (NH_4)_2 SO_4 \cdot 7H_2O$, 0.34 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.14 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ içeren iz metal solüsyonundan 0.05 ml eklenerek besiyeri hazırlanmıştır (Çakıcı 2004). 250 ml'lik ayrı şişelerde, pH; 7, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8'e fikse edilen 6 farklı 90 ml'lik besiyeri ortamına 10'ar ml'lik $OD_{660} \approx 0,25$ olan gelişim kültürü steril şartlarda inoküle edilmiştir. Hücre gelişimi ve mor membran sentezi, üreme ve dolayısıyla renk değişimi başlanan 3. Gün itibariyle 48 saatlik aralıklarla optik yoğunluk (OD_{660} , OD_{568}) sonuçlarına bakılarak takip edilmiştir.

Sıcaklık optimizasyonu

bR üretici *H.salinarum* izolatı diğer inkübasyon şartları sabit kalacak şekilde 4 farklı sıcaklık ortamında (30, 34, 38, 42 °C) inkübe edilmiştir (150 rpm, 40 W, pH 7,2). Toplamda

500 ml olacak şekilde distile su içerisinde 125 g NaCl, 10 g MgSO₄7H₂O, 1.5 g Na₃C₆H₅O₇2H₂O, 1 g KCl, 5 g bakteriolojik peptone (Oxoid L37) karıştırılmış ve 1.32 g ZnSO₄7H₂O, 0.78 g Fe (NH₄) 2SO₄7H₂O, 0.34 g MnSO₄4H₂O, 0.14 g CuSO₄5H₂O içeren iz metal solüsyonundan 0.05 ml eklenerek besiyeri hazırlanmıştır (Çakıcı 2004). 250 ml'lik ayrı şişelerde, 90 ml besiyeri ortamlarına 10'ar ml OD₆₆₀≈ 0,25 gelişim kültürü steril şartlarda inoküle edilmiştir. İnkübatör sıcaklığı her bir kültür için ayrı olarak; 30, 34, 38, 42 °C'ye ayarlanmıştır. 3. Gün sonunda renklenmeye başlayan medyalarda kültür gelişimi için OD₆₆₀ ve mor membran sentezi için OD₅₆₈ değerleri kaydedilmiştir.

Aydınlatma optimizasyonu

bR üretici suşun kültürasyonunda standart şartların yanı sıra (150 rpm, pH 7.2, 37 °C) her bir kültür için ayrı olarak; 30, 40, 60, 80 W'lık ışık kaynakları ile aydınlatılmış ortamlarda inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplamda 500 ml olacak şekilde distile su içerisinde 125 g NaCl, 10 g MgSO₄7H₂O, 1.5 g Na₃C₆H₅O₇2H₂O, 1 g KCl, 5 g bakteriolojik peptone (Oxoid L37) karıştırılmış ve 1.32 g ZnSO₄7H₂O, 0.78 g Fe (NH₄) 2SO₄7H₂O, 0.34 g MnSO₄4H₂O, 0.14 g CuSO₄5H₂O içeren iz metal solüsyonundan 0.05 ml eklenerek besiyeri hazırlanmıştır (Çakıcı 2004). 250 ml'lik şişelerde, 90 ml besiyeri ortamlarına 10'ar ml OD₆₆₀≈ 0,25 gelişim kültürü steril şartlarda inoküle edilmiştir. OD₆₆₀ ve OD₅₆₈ verileri değerlendirilmiştir.

Havalandırma optimizasyonu

bR sentezleyen *H.salinarum* üretiminin havalandırma şartlarının optimizasyon sürecinde, belirlenmiş diğer faktörler (150 rpm, pH 7.2, 37 °C, 40 W) sabit halde bırakılmıştır. Toplamda 250 ml olacak şekilde distile su içerisinde 62,5 g NaCl, 5 g MgSO₄7H₂O, 0.75 g Na₃C₆H₅O₇2H₂O, 0.5 g KCl, 2.5 g bakteriolojik peptone (Oxoid L37) karıştırılmış ve 1.32 g ZnSO₄7H₂O, 0.78 g Fe(NH₄)2SO₄7H₂O, 0.34 g MnSO₄4H₂O, 0.14 g CuSO₄5H₂O içeren iz metal solüsyonundan 0.025 ml eklenerek besiyeri hazırlanmıştır (Çakıcı 2004). 250 ml'lik şişelerde 200 ml besiyeri ortamlarına 25'er ml OD₆₆₀≈ 0,25 gelişim kültürü steril şartlarda inoküle edilerek, havalandırılmalı, yarı-havalandırılmalı (3.günden itibaren kapak kapalı), yarı-havalandırılmalı (5.günden itibaren kapak kapalı), havalandırmasız (100/100 ml), havalandırmasız (50/100 ml), havalandırmasız (75/100 ml) olmak üzere altı ayrı durum altında inkübe edilmiştir. Hücre gelişimi ve bR sentezi; OD₆₆₀ ve OD₅₆₈'de alınan değerlere göre takip edilmiştir.

Aydınlatma ve havalandırma şartlarının bR üretimi üzerindeki etkisi

Optimum üreme şartlarının belirlenmesinin ardından, *H.salinarum* izolatının bR üretimi üzerinde aydınlatma ve havalandırma şartlarının korelatif etkisi, dört varyasyon altında incelenmiştir. bR üretim verimi hidroksilamin metodu ile miktar tayin edilerek belirlenmiştir. Kültür ortamları aydınlatmalı-havalandırmalı, aydınlatmasız-havalandırmalı, aydınlatmalı-havalandırmasız, aydınlatmasız-havalandırmasız dört varyant olarak, bR üretiminin gözetlenmesi amacıyla izolat, 250 ml'lik şişelerde 90 ml besiyeri ortamına 10'ar ml OD₆₆₀≈ 0,25 gelişim kültürü inoküle edilerek 150 rpm, pH 7.8, 60 W, 38 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kültür ortamından izole edilen bR miktarları, hidroksilamin metodu ile saptanmıştır.

bR üretimi üzerinde besin kaynaklarının etkisi

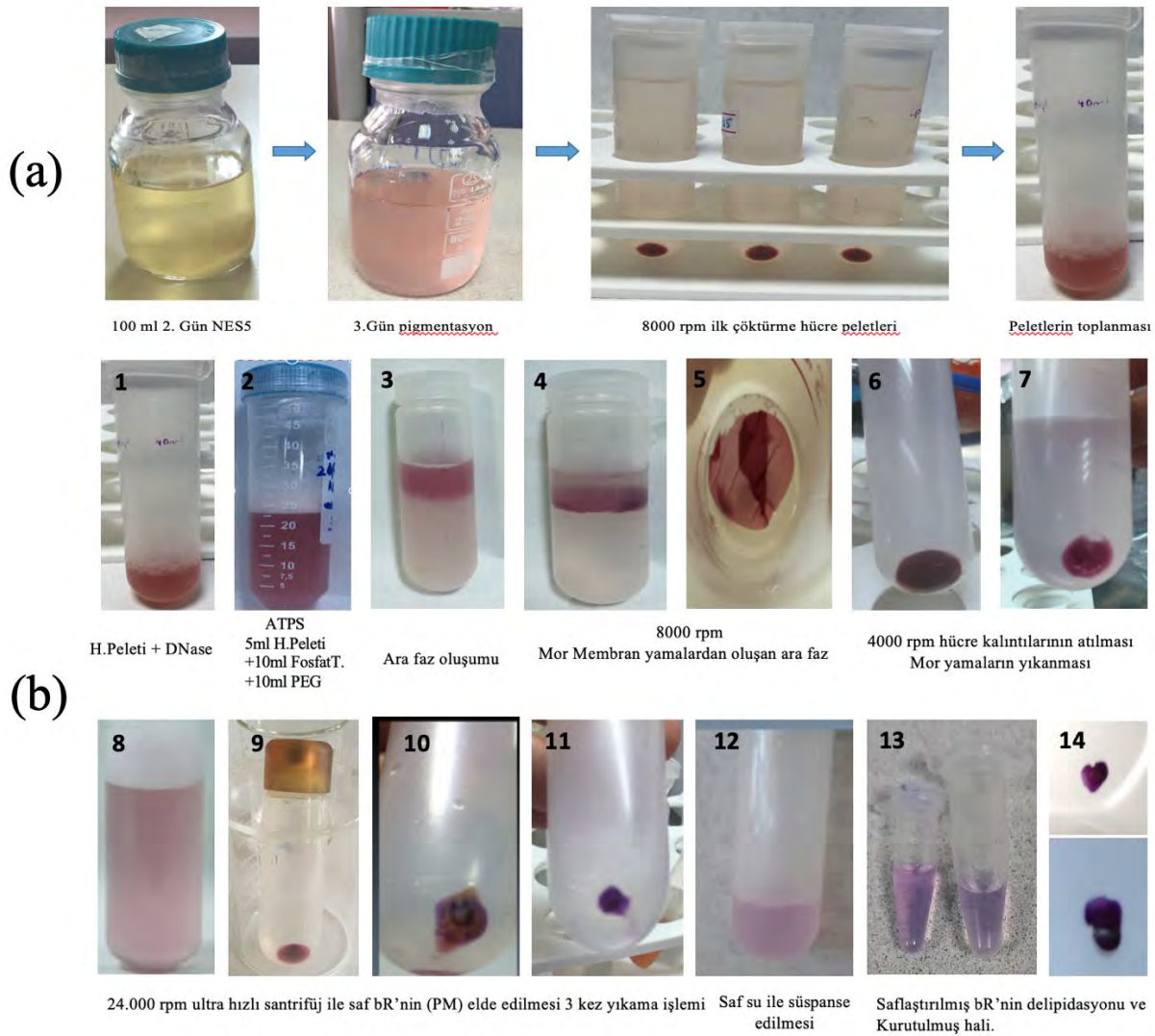
bR sentezinin optimizasyonu dahilinde farklı besin kaynaklarının etkisinin araştırılması maksadıyla selektif medyaya ek olarak; 10 g corn steep powder, 10 g casamino asit, 10 g bakteriyolojik peptone (Oxoid), 10 g yeast extract ayrı ayrı kullanılarak besiyeri varyantları oluşturulmuştur. bR üretimi A₅₆₈'de alınan absorbans değerleri ile takip edilmiştir. Elde edilen bR miktarı hidroksilamin metodu ile belirlenmiştir.

bR Saflaştırma Çalışmaları ve Optimizasyonu

Sıvı iki fazlı sistem ile saflaştırma (ATPS)

- bR izolasyonu için 100 ml'lik kültürler 50 ml'lik test tüplerine bölünerek, 8000 rpm, 15 °C'de 15 dk. santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak, elde edilen peletler bir araya getirilmiştir.
- Ardından viskoziteyi düşürmek amacıyla 82.5 U/µl DNase içeren 5 ml deiyonize su ile süspanse edilmiştir.
- Oluşturulan hücre lizat solüsyonu, dikey karıştırıcı ile 30 dk karıştırıldıktan sonra, 10 ml %24'lük (w/w) potasyum fosfat (22 g monobazik potasyum fosfat, 2 g dibazik potasyum fosfat pH 8) ve 10 ml %24'lük (w/w) Polyethylene glycol (PEG) solüsyonu eklenmiştir. Bu aşama; hücre lizat solüsyonu (10:10:5 oranında) ayrı ayrı deneylerde 2 ml'lik Eppendorf tüplerine, 15 ml'lik tüplere veya 50 ml'lik tüplere aktarılacak üzere farklı varyasyonlarda gerçekleştirilmiştir.
- Solüsyon, 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra 8000 rpm, 4 °C'de 15 dk. santrifüj edilmiştir.

- İki faz arasında oluşan zar şeklinde mor membran toplanarak yeni test tüpüne aktarılmıştır.
- 4000 rpm, 4 °C'de 15 dk. tekrar santrifüj edilerek kalıntılardan arındırılan süpernatant, 10 ml deiyonize su ile süspanse edilmiştir.
- bR içeren solüsyon; 20000 rpm, 4 °C, 30 dk. ultra hızlı santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bu adım yıkama amacıyla 3 kez tekrar edilmiştir.
- Elde edilen pelet 10 ml deiyonize su ile resüspanse edilmiştir (Şekil 21.) (Shiu *et al.* 2014).



Şekil 21. ATPS metodu ile bR izolasyonunun aşamaları; (a) Kültivasyon sonucunda hücre peleti elde edilmesi, (b) Hücre peletinden saflaştırılmış bR ve delipidasyona kadar olan saflaştırma adımları

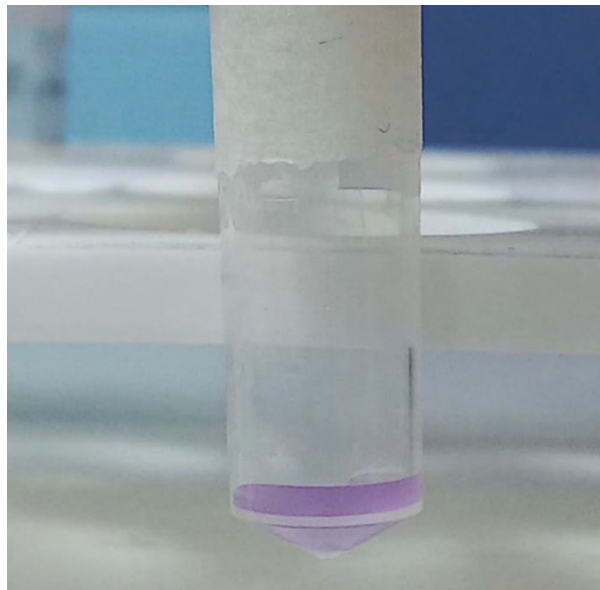
Tek adımda sıvı üç fazlı sistem ile saflaştırma (A3PS)

- 100 ml'lik kültürler 50 ml'lik test tüplerine bölünerek 8000 rpm. 15 °C, 15 dk. santrifüj edilmiştir.

- Elde edilen pellet toplanarak, 82.5 U/ μ l DNase içeren 5 ml deiyonize su ile süspanse edilmiştir.
- 30 dk'lık karışımdan sonra delipidasyon için 3.6 ml 40 mM CHAPS solüsyonu ile 1 saat boyunca karıştırılmıştır.
- Ardından, %24'lük (w/w) potasyum fosfat (22 g monobazik potasyum fosfat, 2 g dibazik potasyum fosfat), 10 ml %24'lük (w/w) Polyethylene glycol (PEG) solüsyonu ve 5 ml polypropylene glycol (PPG) eklenerek 30 dk boyunca dikey karıştırıcı ile oda sıcaklığında karıştırılmıştır.
- Solüsyon, 8000 rpm, 4 °C, 15 dk santrifüj edildikten sonra PEG ve fosfat fazları arasında oluşan mor bant toplanarak ultrafiltrasyon santrifüj filtresi ile yıkanmıştır.
- 5 ml deiyonize su ile süspanse edilerek 5000 rpm 4 °C 30 dk santrifüj edilerek bir başka yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu adım 3 kez tekrarlanmıştır.
- Ultrafiltrasyon filtresi ile toplanan delipide bR, 10 ml deiyonize su ile süspanse edilmiştir (Shiu *et al.* 2014).

Delipitasyon Çalışmaları

123 μ g CHAPS 10 ml distile su ile karıştırılarak 20 mM'lık solüsyon hazırlanmıştır. 1.5 ml saflaştırılmış bR solüsyonu lipidlerinden arındırılmak üzere, 103.5 μ l 20 mM CHAPS solüsyonu ile oda sıcaklığında gece boyunca karışıma bırakılmıştır. Ardından 15000 rpm, 4 °C, 30 dk santrifüj edilerek, bu işlem yıkama amacıyla üç kez deiyonize su ile tekrarlanmıştır. Elde edilen delipide bR, UV-Vis spektrofotometre ölçümleri için 1.5 ml deiyonize su ile resüspanse edilmiştir (Şekil 22.) (Shiu *et al.* 2014).



Şekil 22. Delipide bR'ye ait şeffaf mor görüntü

Hidroksilamin metodu ile saf bR ürün miktar tayini

Saflaştırılmış ve delipide edilmiş bR ürünlerinin ayrık olarak, üretim miktarının belirlenmesi maksadıyla hidroksilamin metodu uygulanmıştır. 30 ml, 2 M, pH 7 hidroksilamin solüsyonu hazırlanmıştır. 600 µl'lik bR solüsyonlarına 60 µl hidroksilamin solüsyonu eklenmiştir. Solüsyonların başlangıç absorbansları UV-Vis spektrofotometre ile A_{568} 'de ölçülmüştür. Ardından 24 saatlik süre boyunca 40 W aydınlatma altında bırakılmıştır. UV-Vis spektrofotometre analizi aynı dalga boyunda tekrar edilmiştir. Elde edilen bR miktarları, absorbanslar arasındaki fark ve molar ekstinksiyon katsayısı dikkate alınarak; bR konsantrasyonu (g/L) = $26800 \times \frac{A_{568}^0 - A_{568}^{48}}{63000}$ denklemine göre hesaplanmıştır (Shiu et al. 2014; Jeganathan *et al.* 2019).

SDS-Page Analizi

2 ml Acrylamide/Bis, 1.25 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 50 µl %10'luk SDS, 1.67 ml diH₂O, 2.5 µl TEMED, 25 µl APS (taze) içeren ayırma jeli solüsyonu hazırlanarak cam plakalar arasına yüklenmiştir. 0.30 ml Acrylamide/Bis, 0.63 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 25 µl %10'luk SDS, 1.5 ml diH₂O, 2.5 µl TEMED, 12.5 µl APS (taze) içeren yığılma jeli hazırlanıp, plakalar arasında donan ayırma jeli üstüne yüklenmiştir (Tablo 12). Kuyucuklar tarak vasıtasıyla oluşturulmuştur. 4X sample tamponu; 2.5 ml 0.5 M Tris-HCl, 250 mg SDS, 2.5 ml %87 gliserol solüsyonu karıştırılarak mavi renk elde etmek için Bromophenol blue eklenerek hazırlanmıştır. Uygulamada örnek tamponuna, toplamın %5 miktarında β-Mercaptoethanol eklenmiştir. 10X SDS yürütme jeli; 30.3 g Tris bazi, 144.1 g glycine ve 10 g SDS 1 lt distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Saflaştırılmış ve delipide bR örnekleri, örnek tamponu ile beraber 1/3 oranında kuyucuklara yüklenmiştir. 125 V elektrik ile örnekler 1 saat boyunca yürütülmüştür. Bantların oluşumundan sonra jel Coomassie brilliant blue ile boyanmıştır.

Tablo 12. Ayırma ve Yığılma Jelleri Formülleri

Ayırma jeli (Separating Gel) İçeriği		Yığılma jeli (Stacking Gel) İçeriği
<i>Acrylamide/Bis</i>	2000 nl	330 nl
<i>0.5 M Tris</i>	-	630 nl
<i>1.5 M Tris</i>	1250 nl	-
<i>%10 SDS</i>	50 nl	25 nl
<i>d H₂O</i>	1670 nl	1500 nl
<i>TEMED</i>	2,5 nl	2,5 nl
<i>APS (taze)</i>	25 nl	12,5 nl

bR saflık analizleri

Saflaştırılmış ve delipide edilmiş bR ürünlerinin saflık analizi, UV-Vis spektrofotometre vasıtasıyla A_{568} ve A_{260} absorbans değerleri ile hesaplanmıştır. $[bR \text{ saflık oranı } (\%) = \frac{A_{568}/A_{280}}{0.5}]$, $\frac{A_{280}}{A_{568}} \leq 1.5$ ve $\frac{A_{568}}{A_{280}} \geq 0.45$ formülleri bR ürünlerinin saflık oranlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Becher and Cassim 1975; Miercke *et al.* 1989; Huh *et al.* 2010; Shiu *et al.* 2013).

bR İmmobilizasyonu

İzole edilen bR ürünleri drop-casting (Damlatma-kurutma) (Patil *et al.* 2011) ve Elektroforetik sedimantasyon (EPS) (Walczak 2009) teknikleri kullanılarak ITO ve porosilikon kaplı cam alttaşlar üzerine immobilize edilmiştir.

Alttaşların yıkanması ve sterilizasyonu

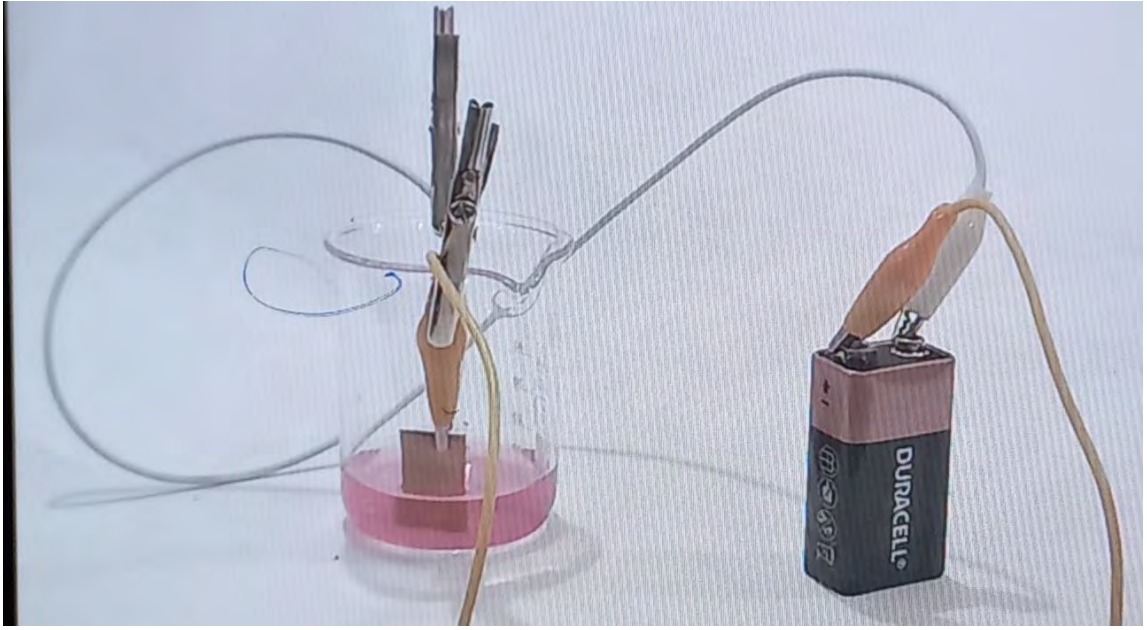
İmmobilizasyon işlemi öncesinde fotoakım ve depozisyonu olumsuz etkileyecek kirliliklerden kurtulmak amacıyla ITO ve porosilikon alttaşları; 5 dk. 30 °C Metanol, 5 dk, 30 °C Aseton, 5 dk. 30 °C İzopropanol, 5 dk 30 °C DDI Su ile sterilize edildikten sonra nitrojen akışı ile kurutularak cam petripler içerisinde saklanmıştır (Shiu *et al.* 2014).

Drop-casting (Damlatma-kurutma) tekniği ile immobilizasyon

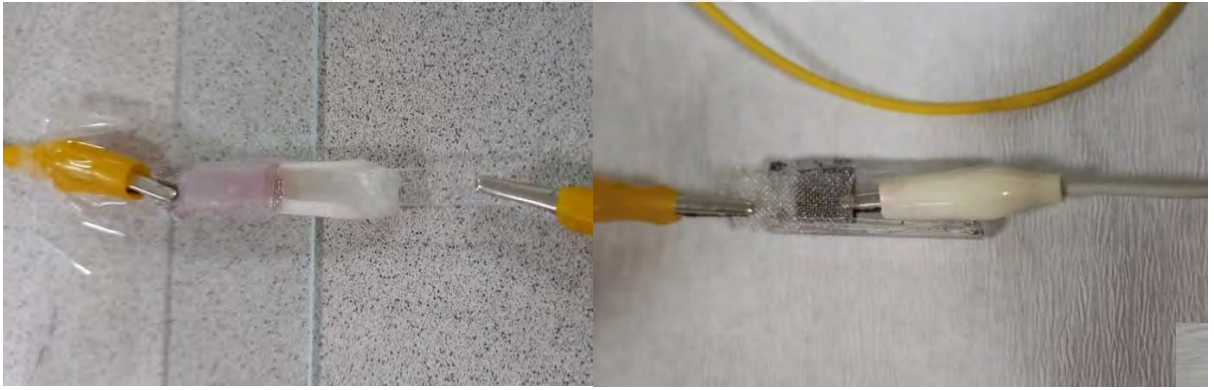
~ 50 mg/l bR içeren 25 µl bR (pH 6,9 DDI su) solüsyonu ITO ve porosilikon üzerine pipet yardımıyla depoze edilmiştir. Işık geçirmeyen bir kutuda 4 °C sıcaklıkta gece boyunca kurumaya bırakılmış ve ardından nitrojen akışı ile yüzey temizlenmiştir (Patil *et al.* 2011).

Elektroforetik Sedimantasyon (EPS) tekniği ile immobilizasyon

İki farklı varyantta gerçekleştirilen EPS işlemlerinin ilkinde; ~ 50 mg/l bR içeren 10 ml DDI su solüsyonu 25 ml'lik behere aktararak, içerisine aralarındaki mesafe ~ 2 cm olacak şekilde bakır ve ITO elektrotları yerleştirilmiştir (Şekil 23). Yapılan diğer EPS işleminde ise; ~ 50 mg/l bR içeren 100 µl, 0,75 mM KH_2PO_4 (pH 6,9) solüsyonu, el yapımı immobilizasyon küveti içerisindeki ITO (+) elektrotu üzerine depoze edilmiştir (Şekil 24). Aralarındaki mesafe 0,8 mm olacak şekilde Platin (-) elektrotu ITO üzerinde konumlandırılmıştır. 9 V'luk elektrik potansiyeli 45 sn. boyunca elektrotlara uygulanarak elektroforetik sedimantasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemler porosilikon alttaşı için de uygulanarak immobilizasyon yürütülmüştür. Depozisyonun ardından alttaşlar nitrojen akışı ile kurutulmuştur (Min *et al.* 1998; Walczak 2009).



Şekil 23. Beher içerisinde bakır (Cu) elektrotla yürütülen elektroforetik sedimantasyon



Şekil 24. El yapımı küvet içerisinde platin (Pt) elektrotla yürütülen elektroforetik sedimantasyon; solda ITO, sağda porosilikon görülmektedir.

İmmobilize Edilmiş bR'nin Karakterizasyonu

ITO ve porosilikon alttaşlara immobilize edilmiş bR ince filmlerinin (Şekil 25.) karakterizasyonu çalışmalarında taramalı elektron mikroskopu (SEM), geçirmeli elektron mikroskopu (TEM), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), X-ışını kırınımı (XRD), Micro-Raman, UV-VIS NIR, Profilometri ölçümleri Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) ve Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (YÜTAM) alınmıştır.

UV-Vis NIR

Genellikle tungsten veya döteryum ampül ışık kaynağı olarak kullanıldığı, incelenmek istenilen materyalin bir ışın demetine maruz bırakılması il örneğin konsantrasyonu ile doğru orantılı bir şekilde ışığın soğurulması sonucunda elde edilen verilere dayalı bir analitik

spektroskopi yöntemi olan UV-Vis NIR kullanılarak ITO üzerine EPS ve damlatma-kurutma teknikleri ile immobilize edilen saflaştırılmış bR'deki retinal kromoforun varlığı incelenmiştir (Akdağ 2020). Üretilen ince filmlerin absorpsiyon değerleri, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Shimadzu 3600 Plus spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür.

XRD

Materyallerin kristalin yapılarının analiz edilmesinde kullanılan bir yöntem olan X-ışını kırınım analizinde monokrom bir X-ışın demeti örnek üzerine yönlendirilmektedir. Yüzeydeki moleküller tarafından kırınımına uğrayan X-ışınlarının yönelim ve kırınım açıları (θ , 2θ) vasıtasıyla elde edilen veriler doğrultusunda kristalin yapı incelenmektedir (Akdağ 2020). ITO üzerine EPS ve lam üzerine damlatma-kurutma teknikleri ile immobilize edilen bR'nin kristalin yapısı X-ışını kırınım (XRD) analizi ile araştırılmıştır. bR ince filmlerinin XRD analizi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan PANalytical Empyrean XRD cihazı vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir.

XPS

Yüzey kimyasal analizinde yaygın olarak kullanılan bu teknikte, X-ışınları foton kaynağı olarak kullanılmaktadır. Oluşturulan fotoelektrik etki sayesinde moleküllerin karakteristik özellikleri incelenerek yüzeyde bulunan elementler analiz edilmektedir (Sezen 2011). ITO ve porosilikon alttaşlar üzerine damlatma-kurutma tekniği ile immobilize edilen bR'nin yüzey nitelikleri X-ışını fotoelektron spektroskopisi ile incelenmiştir. bR ince filmlerinin XPS analizi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan SPECS Flex XPS cihazı vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir.

Raman

Ultraviyole veya infrarede yakın aralıkta genellikle görünür monokrom bir lazer ile analiz edilmek istenen örnek üzerine gönderilen ışık, moleküller ile etkileşime girdiği anda Rayleigh saçılması olarak adlandırılan fotonların dağılımı meydana gelmektedir. Fakat aynı zamanda moleküller üzerine gelen fotonların bir kısmı belirli bir frekansta saçılma gerçekleştirmektedir ki buna Raman etkisi adı verilmektedir. Raman spektroskopisi vasıtasıyla moleküllerin titreşimsel olarak karakterizasyonu yapılmaktadır (Akçan 2021). ITO ve porosilikon alttaşlar üzerine EPS tekniği ile immobilize edilen bR'nin elementel özelliklerinin incelenmesi amacıyla Raman spektroskopi işlemi gerçekleştirilmiştir. bR ince filmleri Raman

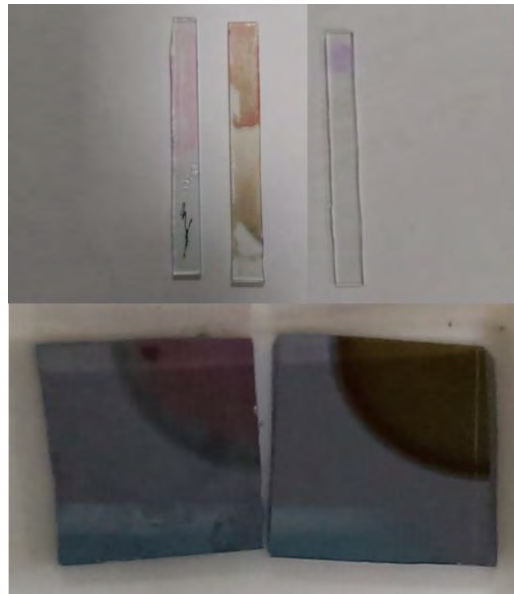
analizi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan WITec Alpha 300 R cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

SEM ve TEM

Örnek yüzeyini yüksek enerji eşikli elektronlar ile tarayan geçirmeli elektron mikroskopunun (SEM) standart mikroskoplardan farkı ışık dalgaları yerine elektron dalgalarını görüntü oluşturmak için kullanmasıdır. Materyallerin yüzey analizi SEM ile yüksek çözünürlükte gerçekleştirilebilmektedir. Geçirmeli elektron mikroskopunda (TEM) ise elektron ışınları örnek içinden interaktif şekilde iletilerek objektif lens vasıtasıyla iyileştirilen bir görüntü alınmaktadır (Hıdıroğlu 2015). ITO üzerine EPS tekniği ile bakır ve platin elektrotlar kullanılarak, porosilikon üzerine EPS tekniği ile platin elektrot kullanılarak immobilize edilen bR'nin yüzey üzerindeki görüntüleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) ile alınmıştır. Görüntüleme işlemleri Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Zeiss Sigma 300 SEM, Hitachi HighTech HT7700 TEM ve Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi'nde bulunan Quanta FEG 250 SEM vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir.

Profilometri

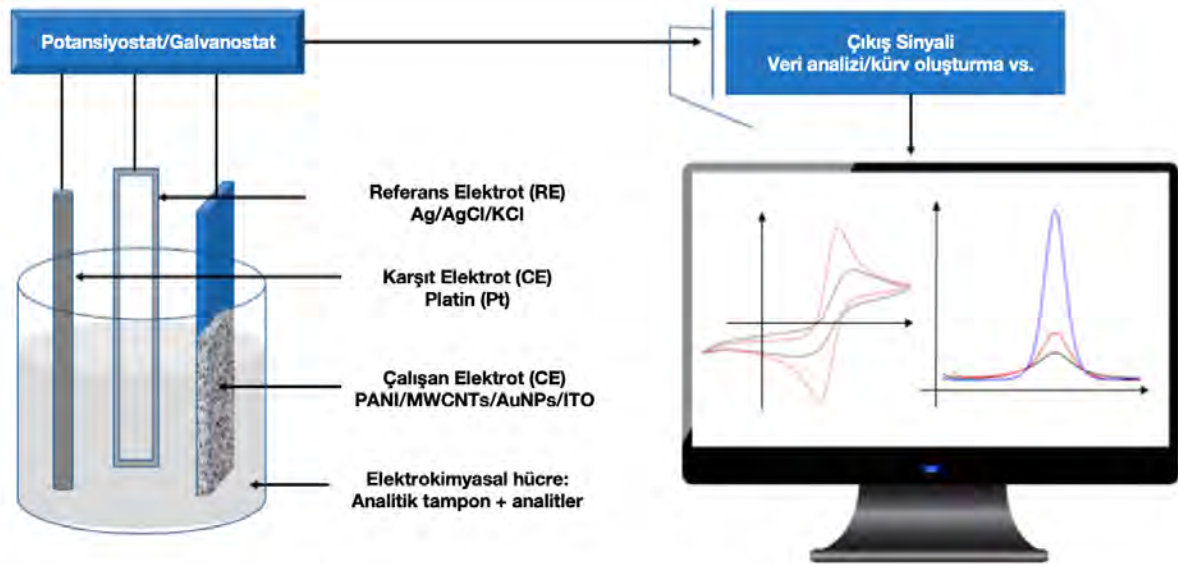
3-D optik mikroskop kullanılarak, materyallerin yüzey topografisinin incelenmesinde kullanılan profilometre yöntemi ile ITO ve porosilikon alttaşlar üzerine EPS ve damlatma-kurutma teknikleri ile bR ince filmlerinin immobilizasyon işlemlerinin başarısı araştırılmıştır. Örnekler, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi'nde bulunan Bruker-Contour GT 3D Optik mikroskobu vasıtasıyla incelenmiştir.



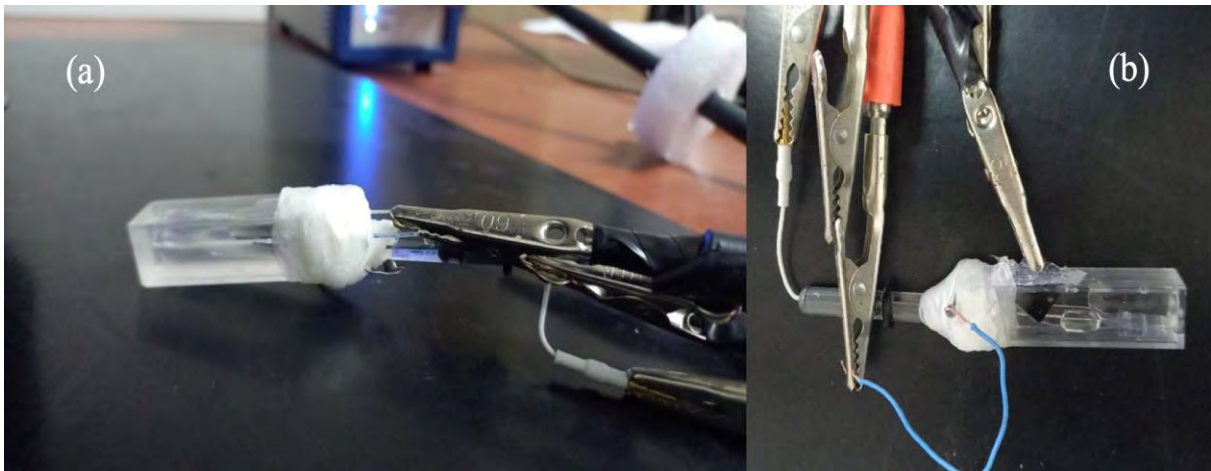
Şekil 25. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan (a) bR-ITO ve (b) bR-porosilikon ürünleri

Elektrokimyasal Ölçümler

EPS ve Damlatma-kurutma metodları ile bR immobilize edilen ITO ve porosilikon alttaşlar, elektrolit çözelti (10 mM fosfat tamponu KH_2PO_4 pH 7,1 içerisinde 100 mM Na_2SO_4) ile dolu quartz ve mika spektrofotometre küvetleri içerisinde sabitlenerek bir elektrokimyasal hücre oluşturulmuştur. ITO için; -1,2 V ile -0,5 V arasında, porosilikon için; -1,5 V ile 1 V arasında, 50 mV/sn tarama hızı ile 25 °C oda sıcaklığında dönüşümlü voltametri ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümlerde çalışan elektrot olarak ITO ve porosilikon, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak Platin kullanılan düzenekler hazırlanmıştır (Şekil 26. ve Şekil 27.). Elektrokimyasal dönüşümlü voltametri (CV) ölçümleri Gamry yazılımları vasıtasıyla kronoamperometrik modda Gamry Reference 600 potansiyostat ile alınmıştır. Işık kaynağı olarak Voss GmbH HelioSim CL-60 solar simülatör kullanılmıştır.



Şekil 26. Ölçümlerin alınımında kullanılan üç elektrotlu sistem şeması (Bohari *et al.* 2020)

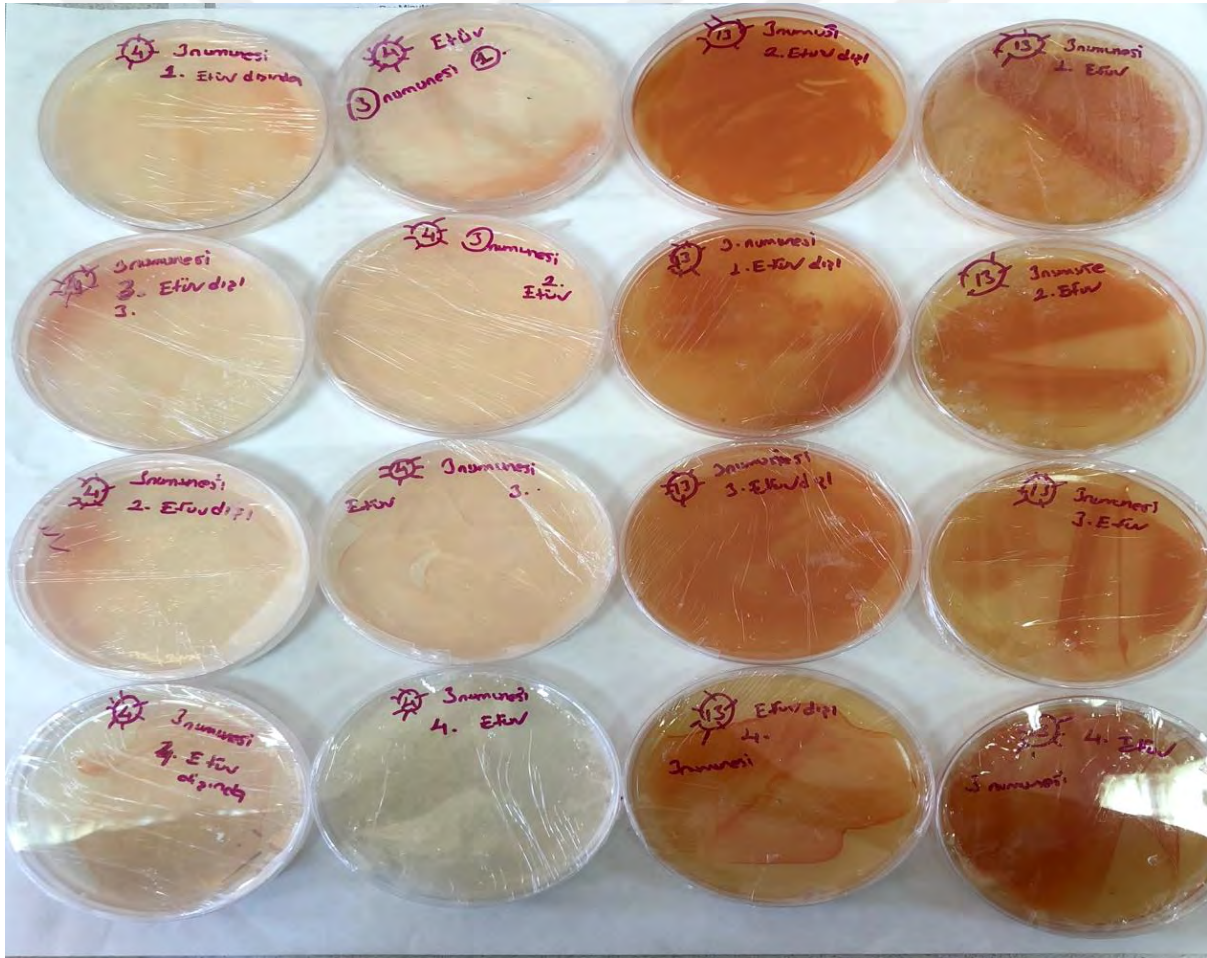


Şekil 27. (a) ITO üzerine immobilize edilen bR ince filminin elektrokimyasal ölçümü sırasında alınan görüntü, (b) porosilikon üzerine immobilize edilen bR ince filminin elektrokimyasal ölçümü sırasında alınan görüntü

ARAŞTIRMA BULGULARI

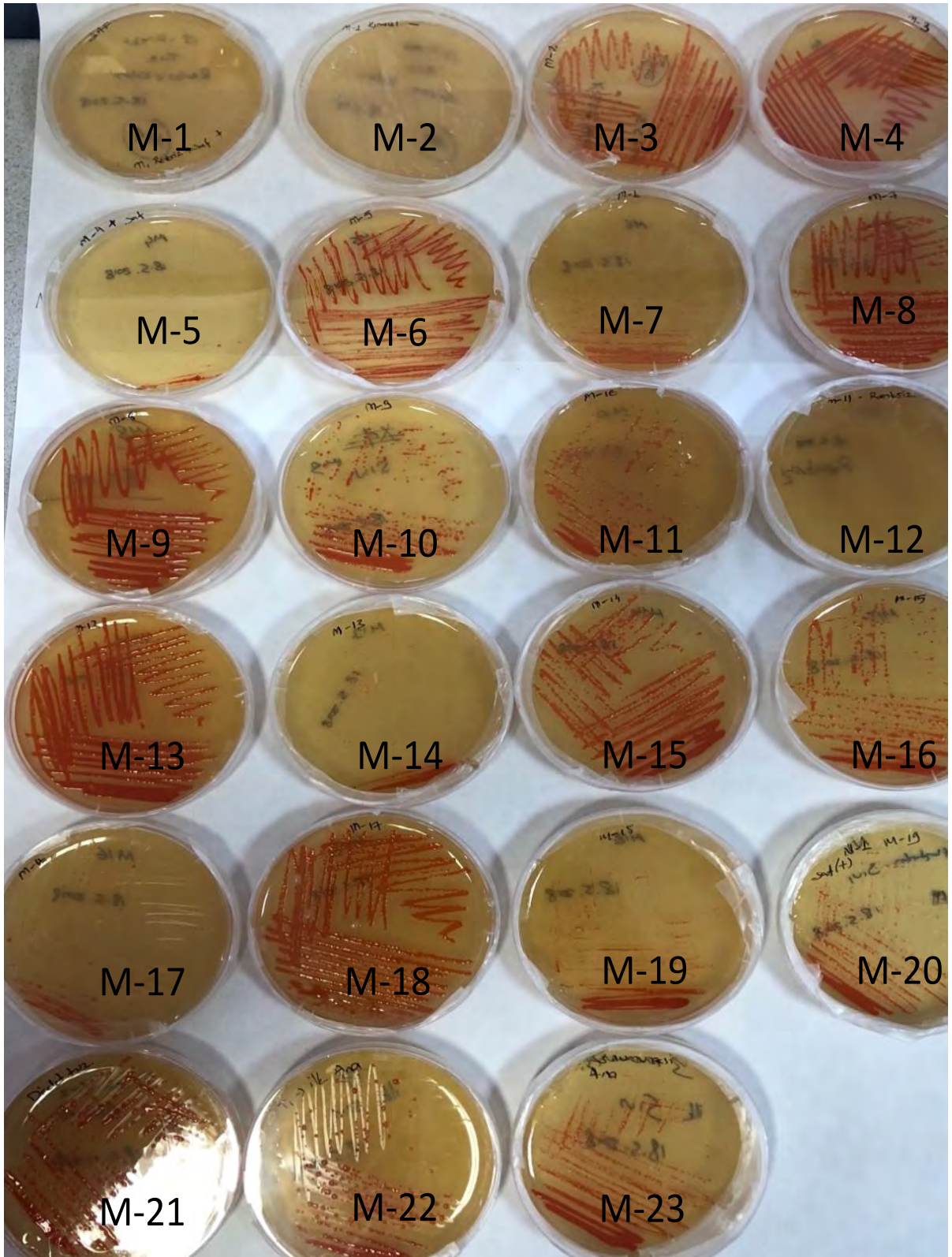
Tuz Gölü Numunelerinden bR Sentezleyen Halofilik Arkelerin İzolasyonu

Bazal medyada karışık olarak üretilen halofilik arke kültürlerinden saf kolonilerin izole edilmesi maksadıyla ilk aşamada Q-1 ve Q-2 kodlu iki farklı içeriğe sahip besiyerlerine toplamda yapılan 16 adet yayma ekim sonucunda; Q-1 kodlu besiyerinde inkübasyon süresi yaklaşık 15 gün, üreme ve pigmentasyonun zayıf olduğu gözlemlenirken, Q-2 kodlu besiyerinde inkübasyon süresi 7-10 gün, üreme ve pigmentasyon güçlü olarak gözlemlenmiştir (Şekil 28.).



Şekil 28. Q-1 ve Q-2 katı besiyerlerinde yapılan ekim görüntüleri

Ardından, çizgi ekim tekniği ile gerçekleştirilen izolasyon işlemi sonucunda; 3 adet renksiz, 20 adet renkli koloni elde edilmiş ve kodlanmıştır (Şekil 29.). Kodlanan isolatlar Tablo 13.'te gösterilmiştir.

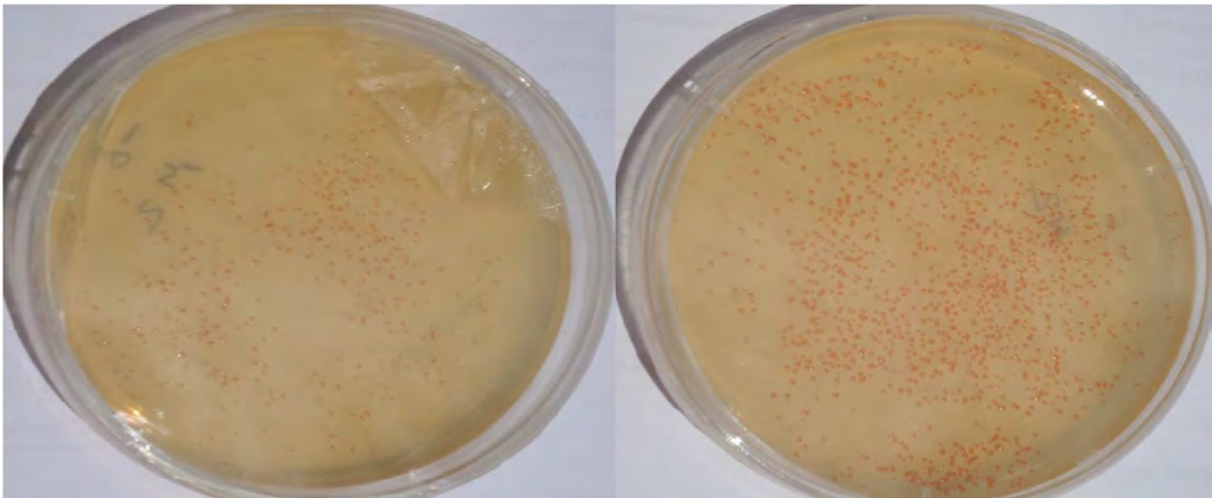


Şekil 29. Yapılan çizgi ekim sonucunda elde edilen 23 adet saf koloni görüntüsü

İzolasyon işlemleri kapsamında son olarak; çizgi ekim ile elde edilen M kodlu izolatlardan seyrelterek yayma tekniği ile yapılan tekrarlı ekimler sonucunda; bacteriorhodopsin proteini sentezleyebilen 19 adet saf halofilik arke kültürü izole edilmiştir. Saf kolonilere ait petri görüntüsü Şekil 30.'da gösterilmiştir.

Tablo 13. Petrilerde Yapılan Ekimlerde Elde Edilen Kolonilerin Gelişimi

Kodlanan kültürler	Pigment sentezi ve koloni oluşumu
M1	-
M2	-
M3	+
M4	+
M5	+
M6	+
M7	+
M8	+
M9	+
M10	+
M11	+
M12	-
M13	+
M14	+
M15	+
M16	+
M17	+
M18	+
M19	+
M20	+
M21	+
M22	+
M23	+

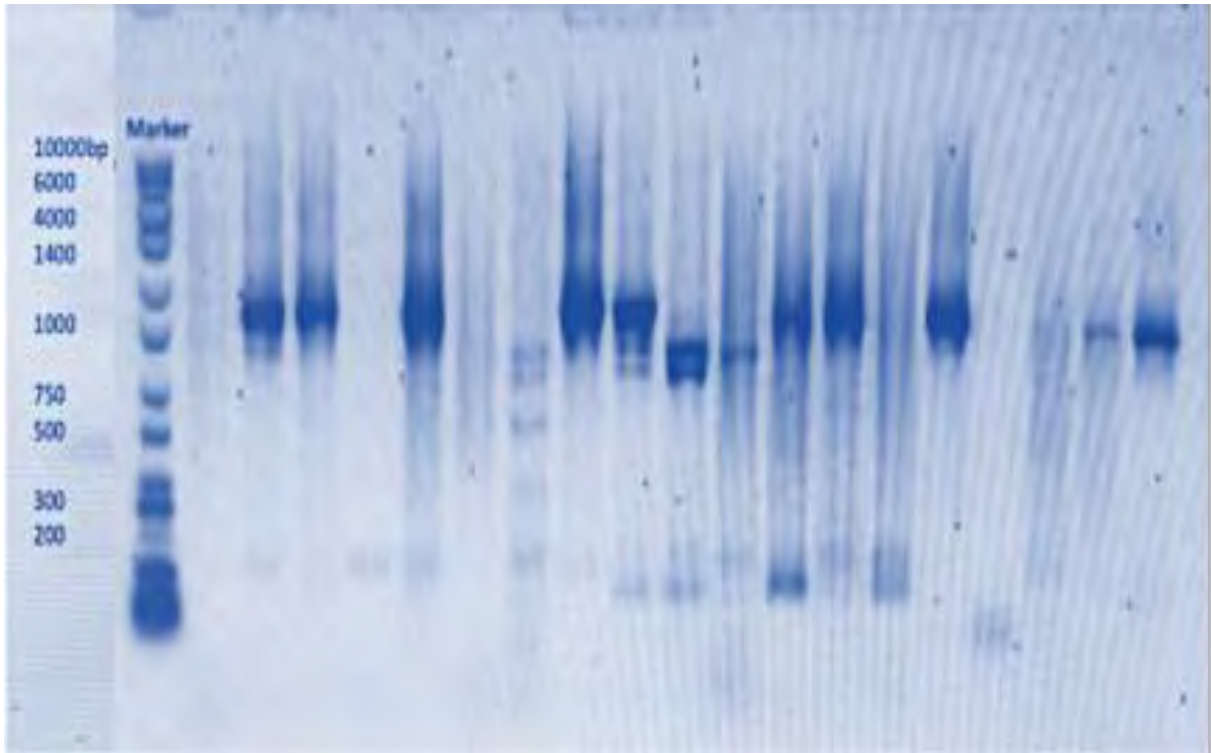


Şekil 30. Saf izolatların elde edildiği petri görüntüsü

Moleküler Tanılama

İzolatların 16S rRNA bölgelerinin PCR amplifikasyonu

bR sentezleyebilen saf halofilik arke genomik DNA'larının 16S rRNA bölgesi, evrensel primerler (P1f ve P1r) kullanılarak *in vitro* koşullar altında PCR yardımı ile çoğaltılmıştır. Jel elektroforez işlemi ile yürütülerek elde edilen arke izolatlarının PCR görüntüsü Şekil 31.'de gösterilmiştir. Amplifikasyon sonuçlarına bakıldığında genomik DNA'sı elde edilen 19 örnek içinde 11 tane örneğin PCR görüntüsü elde edilmiştir. Bu örneklerin 800 ile 1400 baz çifti arasında tek bant verdikleri belirlenmiştir.



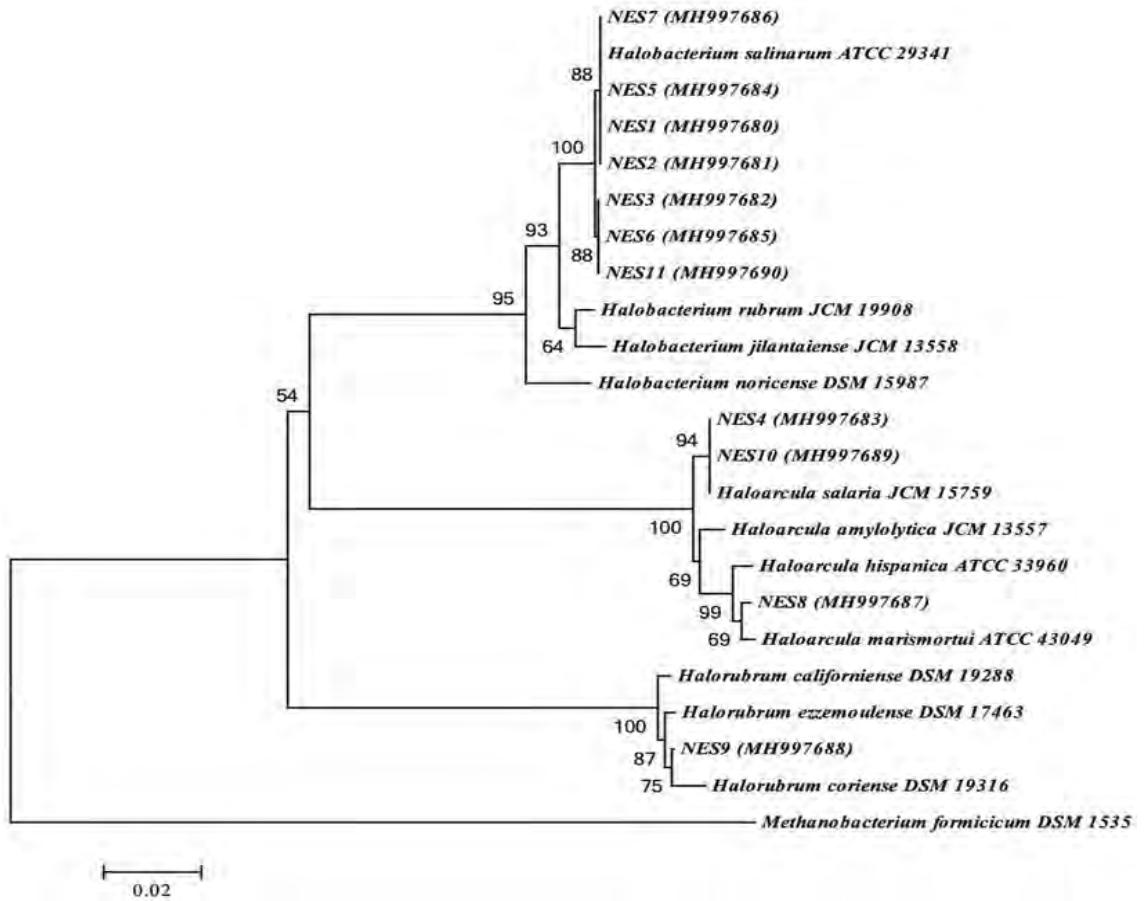
Şekil 31. 16S rRNA PCR sonuçlarına göre tek bant sonuç veren 11 izolatın SDS-Page görüntüsü

16S rRNA sekans analiz sonucu

Yapılan GenBank dizi analizi sonuçlarına göre izolatlardan 4'ünün; *Halobacterium salinarum*, 3'ünün *Halobacterium sp.*, 2'sinin *Haloarcula salaria*, 1'inin *Haloarcula sp.* ve 1'inin *Halorubrum sp.* olduğu tespit edilmiştir. Türleri belirlenen ve NES... olarak kodlanan halofilik arke izolatlarının tanılama bilgileri, benzerlik oranları ve erişim kodları Tablo 14.'te gösterilmiştir. 16S rRNA baz sırası verileri Ek-1'de tamamiyla verilmiştir. NES kodlu izolatların taksonomik pozisyonları; yapılan gen sekans analizi verileri doğrultusunda, neighbor-joining metodu ile oluşturulan filogenetik çizelge ile belirlenmiştir (Şekil 32.).

Tablo 14. GenBank Dizi Analizi Sonuçlarına Göre 11 Adet İzolata Ait Veriler

Örnek Kodu	Yakın Tür	Benzerlik	Erişim Kodu
NES1	<i>Halobacterium salinarum</i>	99%	MH997680
NES2	<i>Halobacterium salinarum</i>	100%	MH997681
NES3	<i>Halobacterium sp.</i>	100%	MH997682
NES4	<i>Haloarcula salaria</i>	100%	MH997683
NES5	<i>Halobacterium salinarum</i>	100%	MH997684
NES6	<i>Halobacterium sp.</i>	100%	MH997685
NES7	<i>Halobacterium salinarum</i>	100%	MH997686
NES8	<i>Haloarcula sp.</i>	100%	MH997687
NES9	<i>Halorubrum sp.</i>	100%	MH997688
NES10	<i>Haloarcula salaria</i>	100%	MH997689
NES11	<i>Halobacterium sp.</i>	100%	MH997690

**Şekil 32.** NES izolatlarının taksonomik yakınlıklarının belirtildiği filogenetik ağaç. *Methanobacterium formicicum* out-group olarak kullanılmıştır.

Başlangıç suşu seçimi

Halobacterium salinarum oldukları tespit edilen NES1, NES2, NES5, NES7 izolatlarının optimizasyon işlemlerinde kullanılacak başlangıç suşu ve selektif medyanın tayin edilmesi için OD₅₆₈, OD₆₆₀ ölçümleri ve hidroksilamin metodu ile bR miktarı ölçümü gerçekleştirilmiştir. Hidroksilamin metodu sonucunda, 67,2 mg/L bR ürünü alınan S-2 besiyerindeki NES5 izolatı başlangıç suşu olarak tayin edilmiştir (Şekil 33.). Sonuçlar Tablo 15.'te verilmiştir.

Tablo 15. Başlangıç Suşu Seçiminde Yapılan Kombine Ekime Ait Absorbans Verileri

		OD ₅₆₈	OD ₆₆₀	bR miktarı
S-1	NES1	0,693	0,597	61,4 mg/L
	NES2	0,661	0,564	55,7 mg/L
	NES5	0,714	0,614	64,3 mg/L
	NES7	0,698	0,602	63,5 mg/L
S-2	NES1	0,721	0,613	66,8 mg/L
	NES2	0,716	0,609	62,3 mg/L
	NES5	0,756	0,642	67,2 mg/L
	NES7	0,742	0,637	64,7 mg/L
S-3	NES1	0,687	0,580	58,6 mg/L
	NES2	0,672	0,559	56,9 mg/L
	NES5	0,702	0,603	61,4 mg/L
	NES7	0,699	0,607	60,6 mg/L



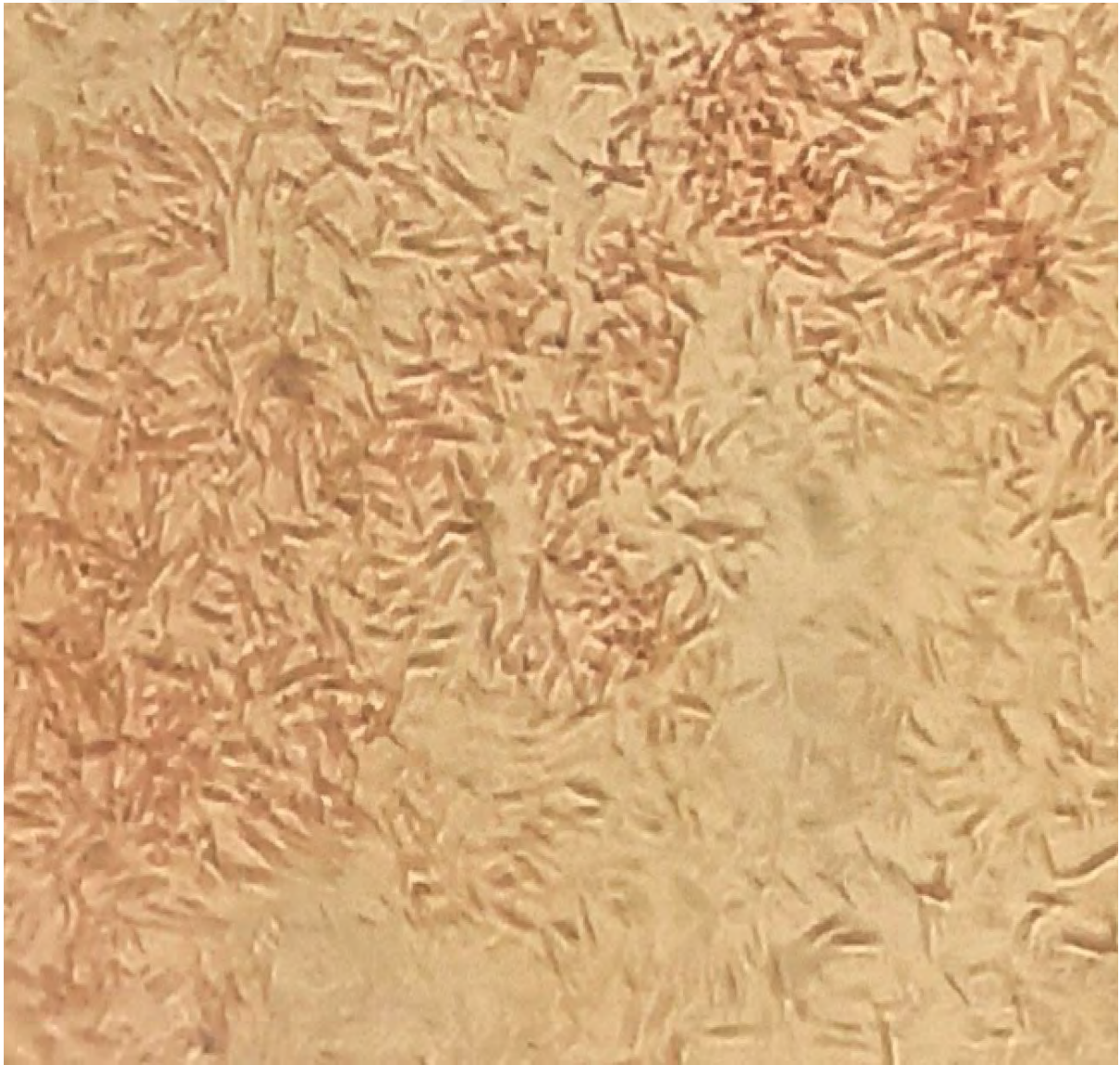
Şekil 33. S-2 besiyerinde gelişim gösteren NES5 izolatı

NES5 İzolatının Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Gram Boyama Sonucu

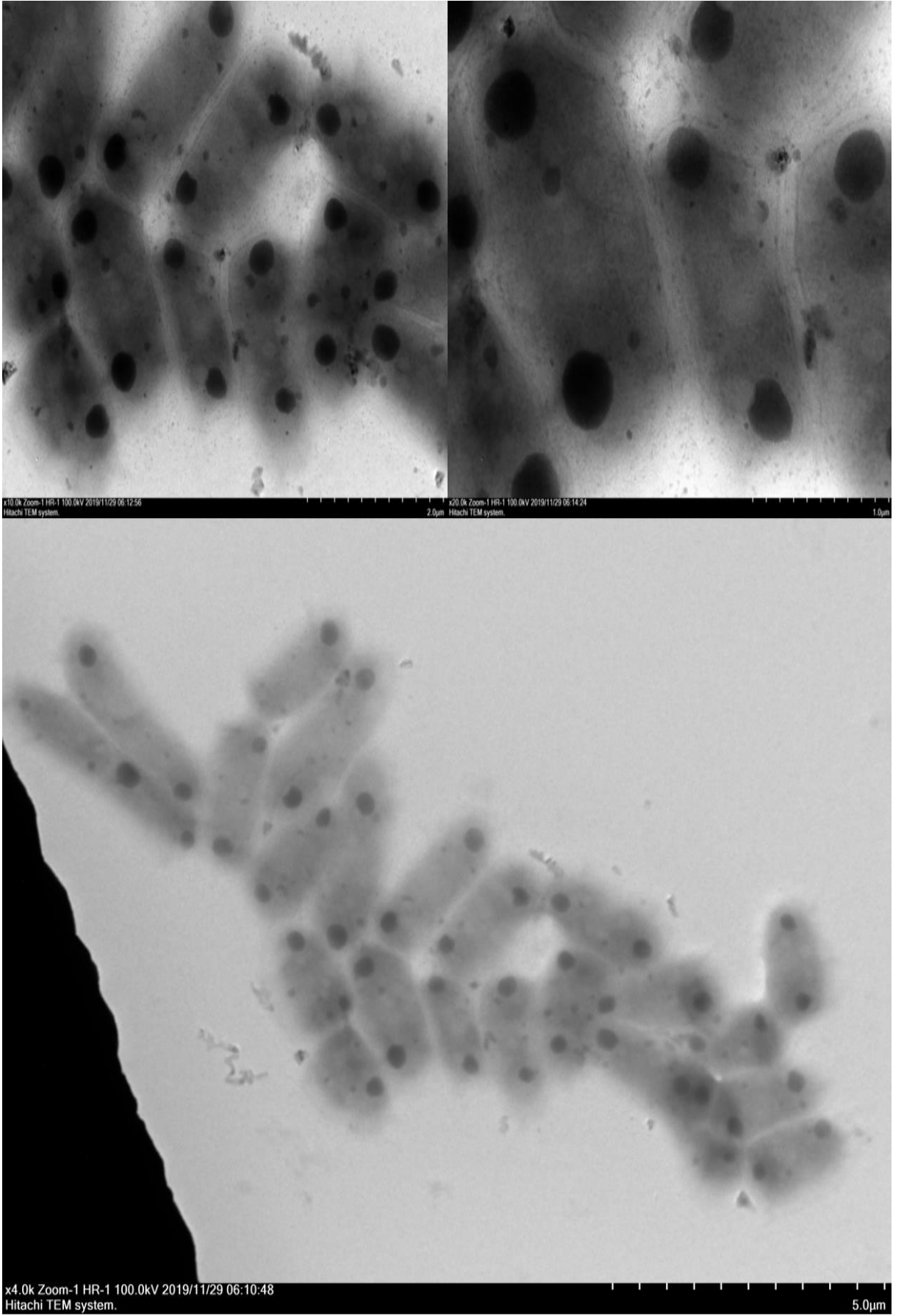
H. salinarum olduğu tespit edilen NES5 suşunun karakterizasyonunda gerçekleştirilen geçirmeli elektron mikroskobu ve gram boyama işlemi sonucunda hücre morfolojisinin rod (çubuk) şeklinde olduğu gözlemlenmiştir. Safranin ile kırmızı renge boyanan izolatın gram reaksiyonunun negatif olduğu saptanmıştır. Bunun yanında immersiyon merceği ile alınan görüntülerde kültür ortamının saflaştırılmış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 34.). NES5 izolatına ait bilgiler Tablo 16.'da gösterilmiştir. TEM görüntüsü Şekil 35.'te görüldüğü gibidir.

Tablo 16. NES5 Suşu Morfolojik Özellikleri

	Hücre Morfolojisi	Renk	Gram
NES5	Rod	Kırmızı-Pembe	Negatif (-)



Şekil 34. NES5 suşunun gram boyama sonucunda immersiyon merceği ile alınan görüntüsü



Şekil 35. *H. salinarum* NES5 suşunun TEM görüntüsü

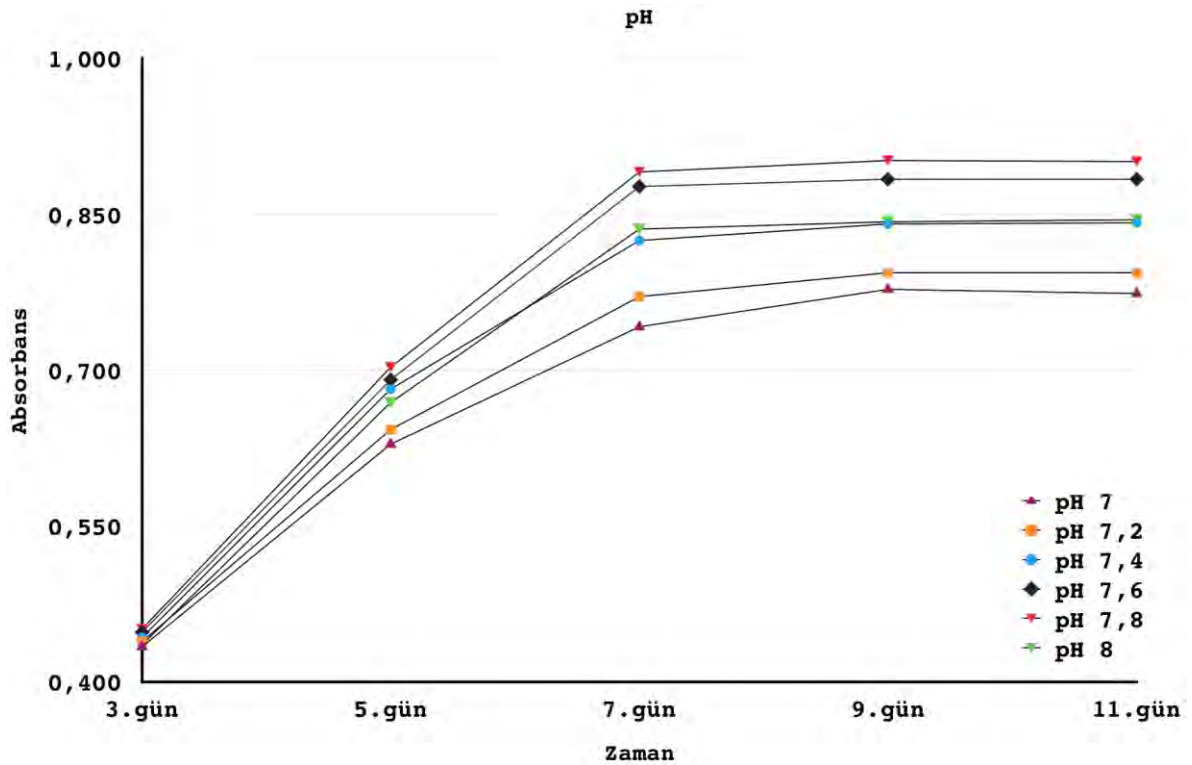
NES5 İzolatının Kültür Optimizasyonu

pH optimizasyonu

H. salinarum, NES5 suşunun kültürasyonunda optimum pH değerinin saptanması amacıyla 48 saatlik aralıklarla alınan absorbans verileri sonucunda en verimli üretimin 79,6 mg/l ile pH 7,8'de gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Veriler Tablo 17. ve Şekil 36.'da gösterilmiştir.

Tablo 17. pH Optimizasyonu Absorbans Verileri

pH	OD	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün
7,0	A ₅₆₈	0,434	0,629	0,742	0,778	0,774
	A ₆₆₀	0,368	0,534	0,661	0,674	0,668
7,2	A ₅₆₈	0,439	0,643	0,771	0,794	0,794
	A ₆₆₀	0,376	0,548	0,683	0,690	0,679
7,4	A ₅₆₈	0,443	0,682	0,825	0,841	0,842
	A ₆₆₀	0,384	0,559	0,694	0,728	0,726
7,6	A ₅₆₈	0,448	0,691	0,877	0,884	0,884
	A ₆₆₀	0,386	0,575	0,724	0,746	0,739
7,8	A ₅₆₈	0,451	0,703	0,891	0,902	0,901
	A ₆₆₀	0,395	0,596	0,768	0,790	0,781
8,0	A ₅₆₈	0,436	0,669	0,836	0,843	0,845
	A ₆₆₀	0,377	0,552	0,701	0,729	0,721



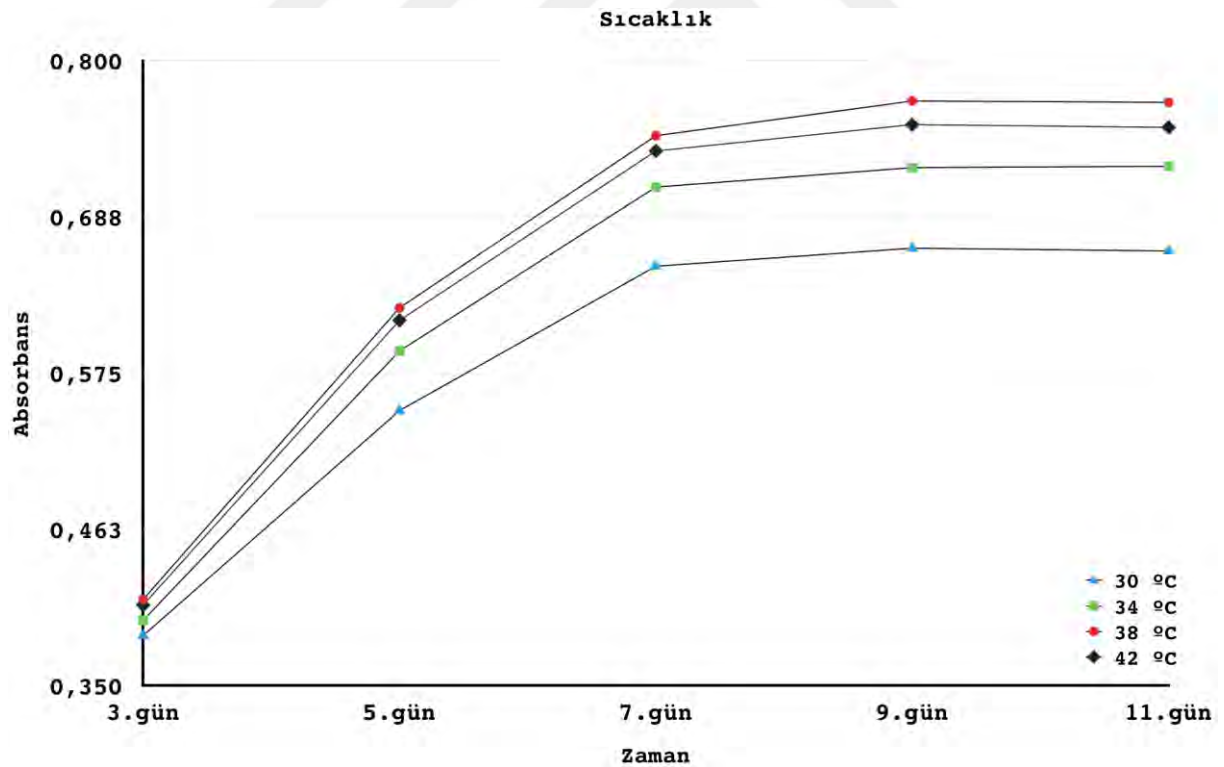
Şekil 36. pH optimizasyonunda bR sentezine ait gelişim grafiği

Sıcaklık optimizasyonu

4 farklı sıcaklık ortamında kùltive edilen *H.salinarum*, NES5 suşunun optimum sıcaklık değeri, 48 saatlik aralıklarla alınan absorbans değeriğine göre belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre sıcaklığın 38 °C kùltivasyon ortamında 69,3 mg/l olarak hesaplanan bR miktarı ile en yüksek verim alındığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar Tablo 18. ve Şekil 37.'de verilmiştir.

Tablo 18. Sıcaklık Optimizasyonu Absorbans Verileri

Sıcaklık	OD	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün
30 °C	A ₅₆₈	0,386	0,548	0,652	0,665	0,663
	A ₆₆₀	0,321	0,481	0,577	0,600	0,589
34 °C	A ₅₆₈	0,397	0,591	0,709	0,723	0,724
	A ₆₆₀	0,342	0,509	0,611	0,629	0,620
38 °C	A ₅₆₈	0,412	0,622	0,746	0,771	0,770
	A ₆₆₀	0,356	0,539	0,646	0,672	0,659
42 °C	A ₅₆₈	0,408	0,613	0,735	0,754	0,752
	A ₆₆₀	0,357	0,531	0,637	0,656	0,644



Şekil 37. Sıcaklık optimizasyonunda bR sentezine ait gelişim grafiği

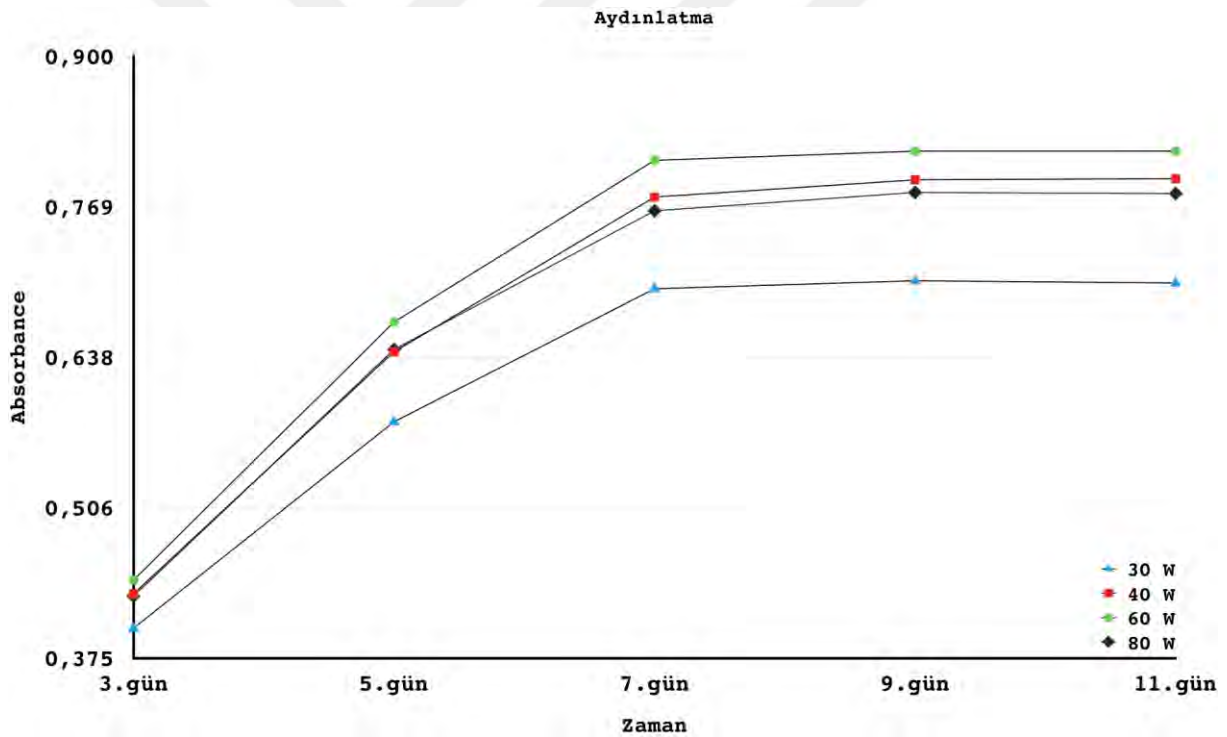
Aydınlatma optimizasyonu

NES5 suşunun kùltivasyonunda optimum aydınlatma ortamının belirlenmesi amacıyla 4 farklı ışık kaynağı (30, 40, 60, 80 W) kullanılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda en verimli

üretimin 72,6 mg/l ile 60 W aydınlatma altında olduğu saptanmıştır. Gözlemlenen veriler Tablo 19. ve Şekil 38.'de gösterilmiştir.

Tablo 19. Aydınlatma Optimizasyonu Absorbans Verileri

Aydınlatma	OD	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün
30 W	A ₅₆₈	0,401	0,581	0,697	0,704	0,702
	A ₆₆₀	0,358	0,526	0,629	0,638	0,631
40 W	A ₅₆₈	0,431	0,642	0,777	0,792	0,793
	A ₆₆₀	0,379	0,576	0,698	0,697	0,688
60 W	A ₅₆₈	0,443	0,668	0,809	0,817	0,817
	A ₆₆₀	0,383	0,601	0,714	0,728	0,719
80 W	A ₅₆₈	0,429	0,644	0,765	0,781	0,780
	A ₆₆₀	0,371	0,588	0,696	0,702	0,691



Şekil 38. Aydınlatma optimizasyonunda bR sentezine ait gelişim grafiği

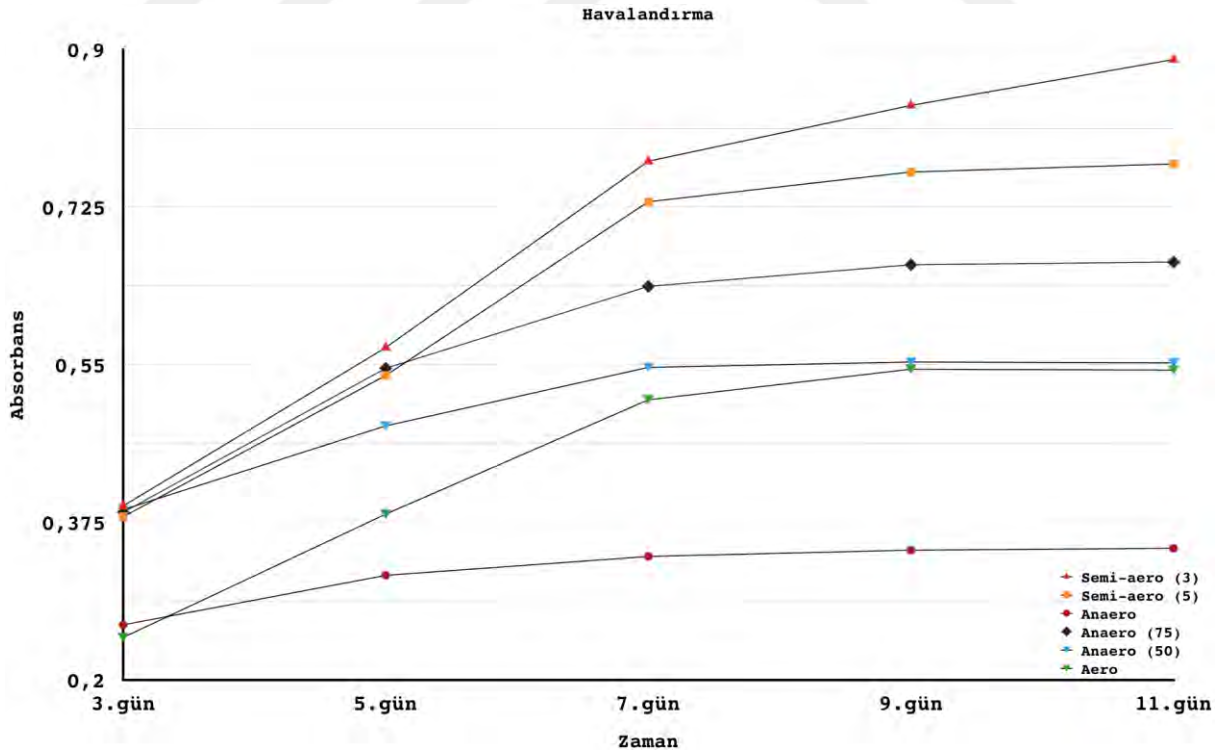
Havalandırma optimizasyonu

Ortamdaki oksijenliliğin NES5 suşunun bR üretimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla havalandırmalı ve havalandırmasız yapılan deneyin sonucunda elde edilen bilgilere göre havalandırmalı şartlarda hücre gelişiminin daha verimli olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın yarı havalandırmalı ortamda (3.günden itibaren kapak kapalı) bR üretim miktarının 78,8

mg/l ile diğer ortamlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kaydedilen OD₅₆₈ ve OD₆₆₀ verileri Tablo 20. ve Şekil 39.'da gösterilmiştir.

Tablo 20. Havalandırma Optimizasyonu Absorbans Verileri

Havalandırma	OD	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün
Havalandırma (Aero)	A ₅₆₈	0,247	0,384	0,511	0,545	0,544
	A ₆₆₀	0,367	0,621	0,803	0,837	0,843
Yarı havalandırma (3.günden sonra kapak kapalı) (Semi-Aero 3)	A ₅₆₈	0,393	0,569	0,776	0,838	0,889
	A ₆₆₀	0,349	0,516	0,734	0,847	0,841
Yarı havalandırma (5.günden sonra kapak kapalı) (Semi-Aero 5)	A ₅₆₈	0,381	0,538	0,731	0,764	0,773
	A ₆₆₀	0,354	0,514	0,716	0,813	0,810
Havalandırmaz (Anaero)	A ₅₆₈	0,261	0,316	0,337	0,344	0,346
	A ₆₆₀	0,349	0,527	0,743	0,799	0,787
Havalandırmaz (100 ml şişede 75 ml kültür) (Anaero 75)	A ₅₆₈	0,386	0,546	0,637	0,661	0,664
	A ₆₆₀	0,342	0,523	0,651	0,708	0,713
Havalandırmaz (100 ml şişede 50 ml kültür) (Anaero 50)	A ₅₆₈	0,389	0,482	0,547	0,553	0,552
	A ₆₆₀	0,358	0,507	0,638	0,644	0,641



Şekil 39. Havalandırma optimizasyonunda bR sentezine ait gelişim grafiği

Optimizasyon sonucu

Optimum kültivasyon Şartlarının belirlenmesinin ardından yapılan inkübasyon işlemlerinde gözlemlenen bR sentezi ve gelişim sonuçları Tablo 21.'de gösterildiği gibidir.

Tablo 21. Optimum Faktörlerin Belirlenmesinin Ardından Yapılan Ekimlere Ait Absorbans Verileri

Optimizasyon sonrası yapılan inkübasyonlar		3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	bR miktarı
1.Ekim	OD ₅₆₈	0,583	0,944	1,154	1,255	1,258	112,6
	OD ₆₆₀	0,499	0,797	0,988	1,034	1,021	mg/L
2.Ekim	OD ₅₆₈	0,575	0,918	1,122	1,202	1,199	106,8
	OD ₆₆₀	0,479	0,771	0,976	1,011	0,998	mg /L
3.Ekim	OD ₅₆₈	0,571	0,909	1,12	1,201	1,202	108,5
	OD ₆₆₀	0,486	0,774	0,989	1,027	1,009	mg/L

Aydınlatma ve havalandırma Şartlarının bR üretimi üzerindeki etkisi

Aydınlatma-havalandırma Şartlarının bR sentezi üzerindeki korelatif etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen deneyde, hücre gelişimi A₆₆₀, bR sentezi A₅₆₈'de alınan ölçümlerle gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 22.'de sergilenmiŐtir.

Tablo 22. Aydınlatma-Havalandırma Şartlarının Korelatif Etkisinin Araştırılmasında Elde Edilen Absorbans Verileri

Aydınlatma-Havalandırma Korelatif	Absorbans	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün
Aydınlatmalı Aerobik	A ₅₆₈	0,247	0,384	0,511	0,545	0,544
	A ₆₆₀	0,367	0,621	0,803	0,837	0,843
Aydınlatmasız Aerobik	A ₅₆₈	0,246	0,357	0,464	0,463	0,460
	A ₆₆₀	0,333	0,442	0,647	0,745	0,739
Aydınlatmalı Anaerobik	A ₅₆₈	0,261	0,316	0,337	0,344	0,346
	A ₆₆₀	0,349	0,527	0,743	0,799	0,787
Aydınlatmasız Anaerobik	568	0,228	0,331	0,431	0,432	0,433
	660	0,316	0,421	0,521	0,520	0,522

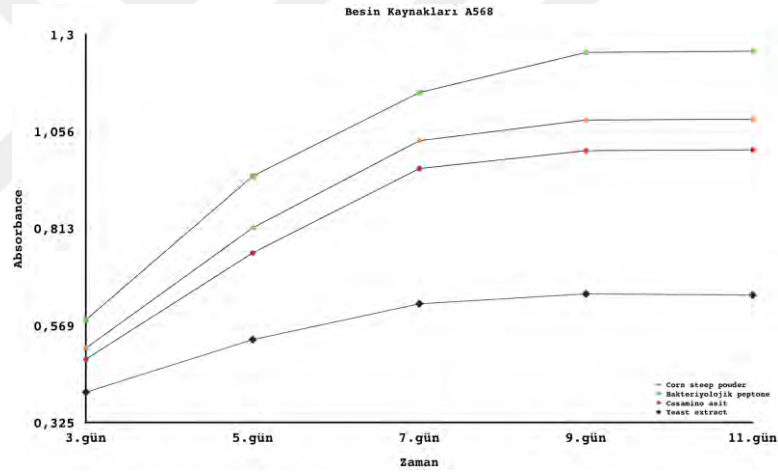
Farklı besin kaynaklarının bR üretimi üzerindeki etkisi

bR sentezi üzerinde farklı besiyeri kaynaklarının etkisinin araştırılmasında; önceden belirlenmiş olan optimum Şartların uygulanarak corn steep powder, casamino asit, bakteriyolojik peptone, yeast extract kullanılan besiyerlerinin absorbans değerleri Tablo 23.,

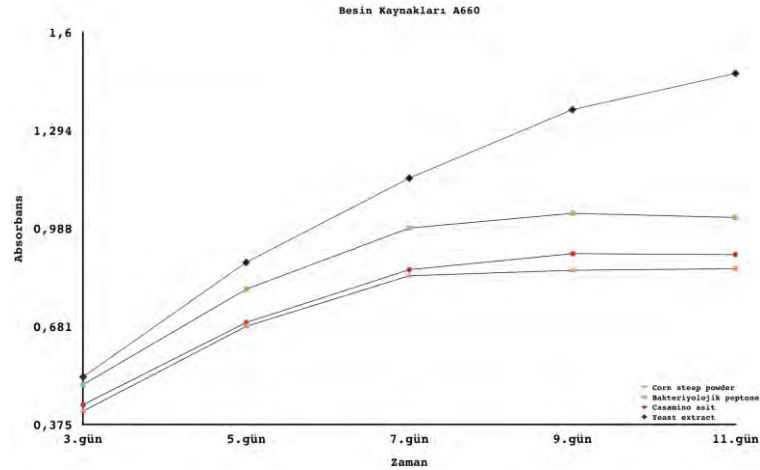
Şekil 40. ve Şekil 41.'de verilmiştir. 112,6 mg/L ile bR üretiminde en verimli besin kaynağının S-2 besiyerinde standart olarak kullanılan bakteriyolojik pepton olduğu belirlenmiştir.

Tablo 23. Optimizasyon Sonrası S-2 Besiyerine Ek Olarak Besin Kaynaklarının bR Sentezi Üzerindeki Etkisinin Araştırılmasında Elde Edilen Absorbans Verileri

Besin Kaynakları Etkisi		3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	bR miktarı
Corn steep powder	OD ₅₆₈	0,512	0,814	1,033	1,085	1,087	98,6 mg/l
	OD ₆₆₀	0,416	0,681	0,839	0,856	0,861	
Bakteriyolojik Peptone	OD ₅₆₈	0,583	0,944	1,154	1,255	1,258	112,6 mg/l
	OD ₆₆₀	0,499	0,797	0,988	1,034	1,021	
Casamino asit	OD ₅₆₈	0,484	0,751	0,963	1,008	1,010	92,8 mg/l
	OD ₆₆₀	0,436	0,693	0,858	0,908	0,905	
Yeast extract	OD ₅₆₈	0,401	0,533	0,623	0,648	0,645	48,6 mg/l
	OD ₆₆₀	0,523	0,881	1,144	1,358	1,471	



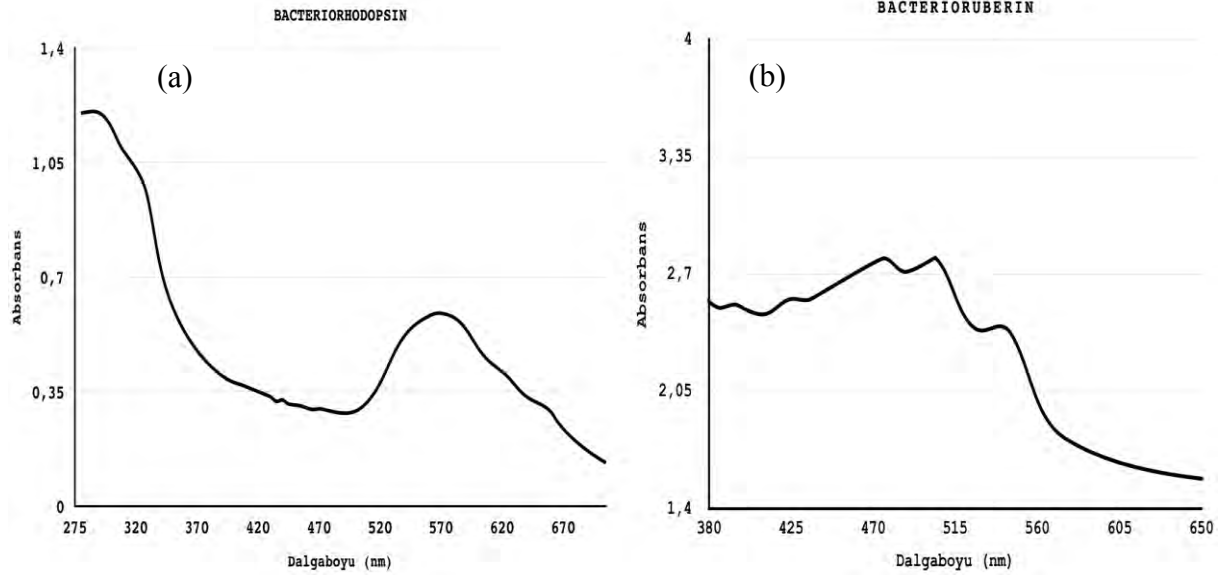
Şekil 40. Besin kaynaklarının bR sentezi üzerindeki etkisi



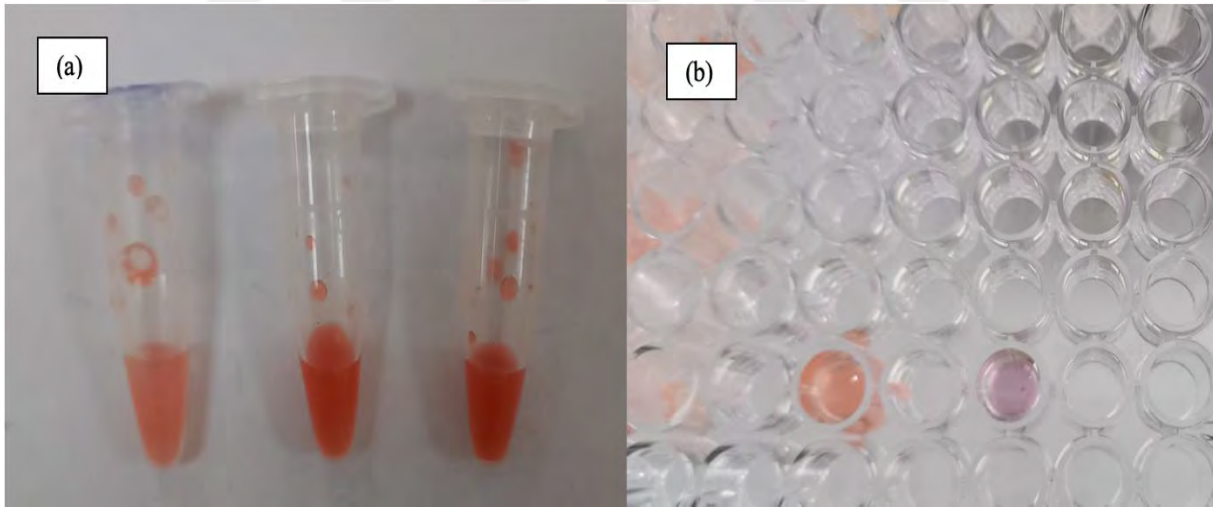
Şekil 41. Besin kaynaklarının hücre gelişim üzerindeki etkisi

bR sentezi sürecinde bacterioruberin sentezlenmesi

bR sentezlenmesinin aydınlatma optimizasyonu çalışması aşamasında bacterioruberin sentezi gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Elde edilen bacterioruberin ürünlerine ve saflaştırılmış bR'ye ait absorbans grafiği Şekil 42.'de, bacterioruberin görüntüleri Şekil 43.'te gösterilmiştir.



Şekil 42. (a) NES5 izolatından saflaştırılan bR absorbans grafiği, (b) NES5 izolatı tarafından aydınlatma optimizasyonu aşamasında sentezlenen bacterioruberin grafiği



Şekil 43. (a) Bacteriorhodopsin saflaştırma aşamasında elde edilen bacterioruberin görüntüsü, (b) Nanodrop UV ölçüm plakasında bacterioruberin (solda) ve bR (sağda) görüntüsü.

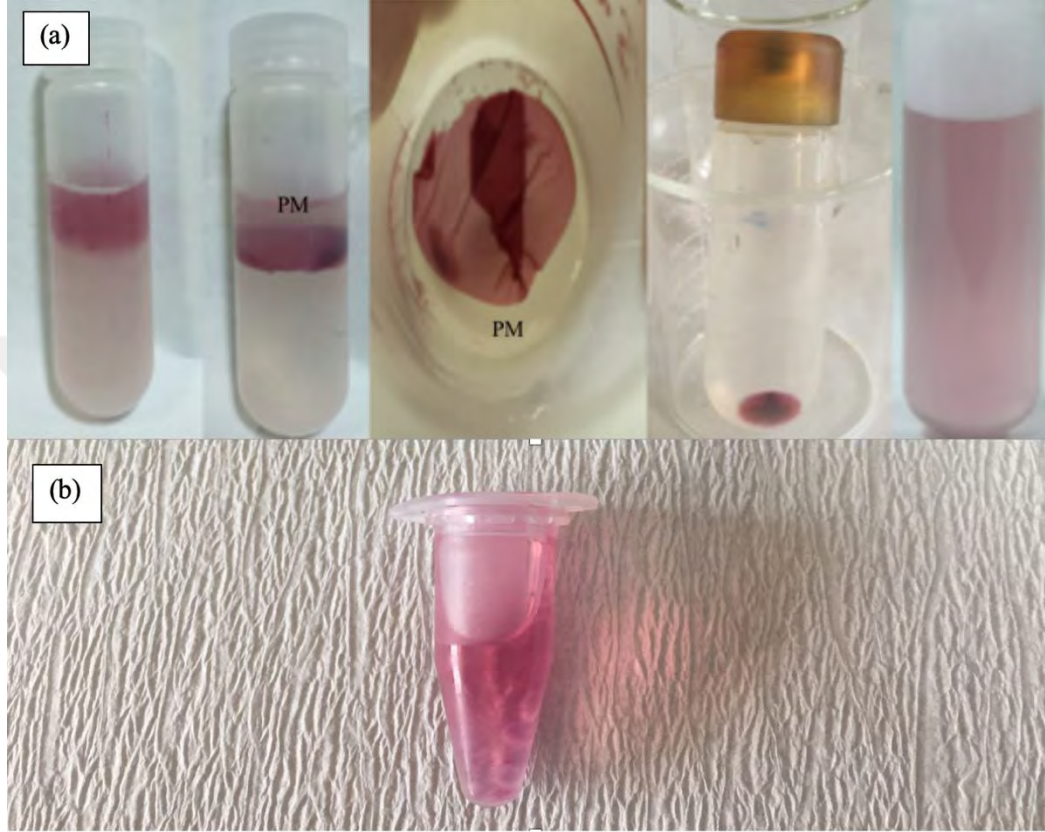
bR Saflaştırma Tekniklerinin Verim Analizi

Sıvı iki fazlı sistem (ATPS)

Optimize edilmiş şartlarda üretilen bR'nin ATPS metodu ile saflaştırılmasının ardından, %94,05 saflık oranına sahip 112,6 mg/L ürün elde edilmiştir. Elde edilen bR'ye ait görüntüler Şekil 44.'teki gibidir. Sonuçlar Tablo 24.'te verilmiştir.

Tablo 24. Sıvı İki Fazlı Sistem ile İzole Edilen bR'ye Ait Veriler

Sıvı iki fazlı sistem		OD280	OD568
		2,409	1,133
Saflık oranı	%94,06		
Elde edilen bR miktarı	112,6 mg/L		

**Şekil 44.** (a) Sıvı iki fazlı sistem tekniğinde fazlar arasında toparlanan mor membran görüntüsü, (b) Arafazdan toplanan PM-deiyonize su süspansiyonu.**Tek adımda sıvı üç fazlı sistem (A3PS)**

Tek adımda sıvı üç fazlı sistem metodu uygulanarak gerçekleştirilen bR saflaştırma işlemlerinde, %93,47 saflık oranına sahip 123,8 mg/L bR elde edilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 25.'te verilmiştir.

Tablo 25. A3PS Tekniği ile Elde Edilen bR'ye Ait Veriler

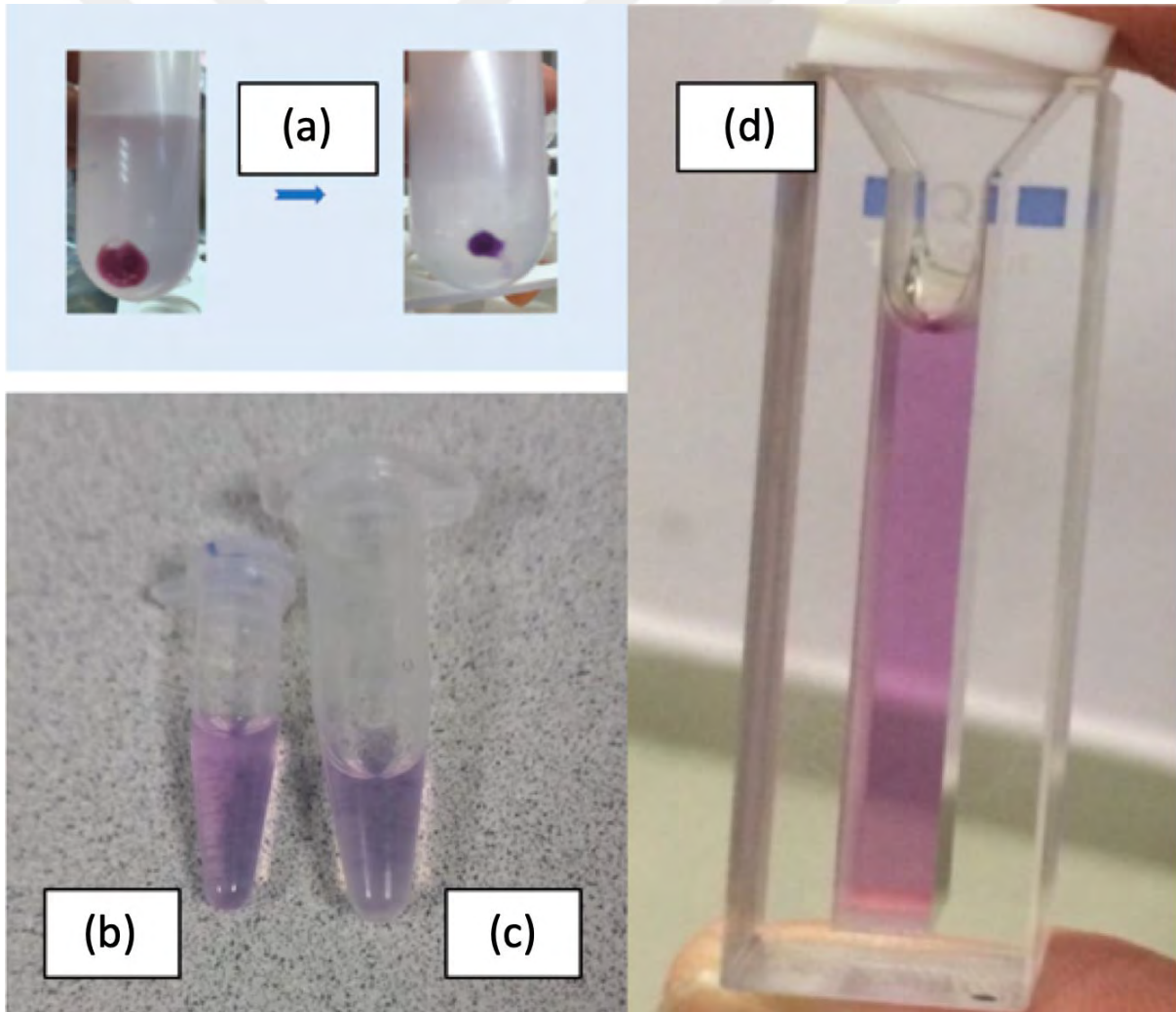
A3PS		OD280	OD568
		2,529	1,182
Saflık oranı	%93,47		
Elde edilen bR miktarı	123,8 mg/L		

bR delipidasyonu

ATPS ile saflaştırılmış bR'nin lipidlerinden arındırılması maksadıyla CHAPS deterjan ile yıkama işlemine tabi tutulması sonucunda elde edilen delipide bR'nin (debR) miktar analizi hidroksilamin metodu vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; 88,7 mg/L bR üretildiği tespit edilmiştir. Delipide edilmiş bR'ye ait veriler Tablo 26.'te, görüntüler Şekil 45.'te gösterildiği gibidir.

Tablo 26. Delipide Edilen bR'ye Ait Veriler

DebR	OD280	OD568
	1,827	0,889
Saflik oranı	%97,31	
Elde edilen bR miktarı	88,7 mg/l	

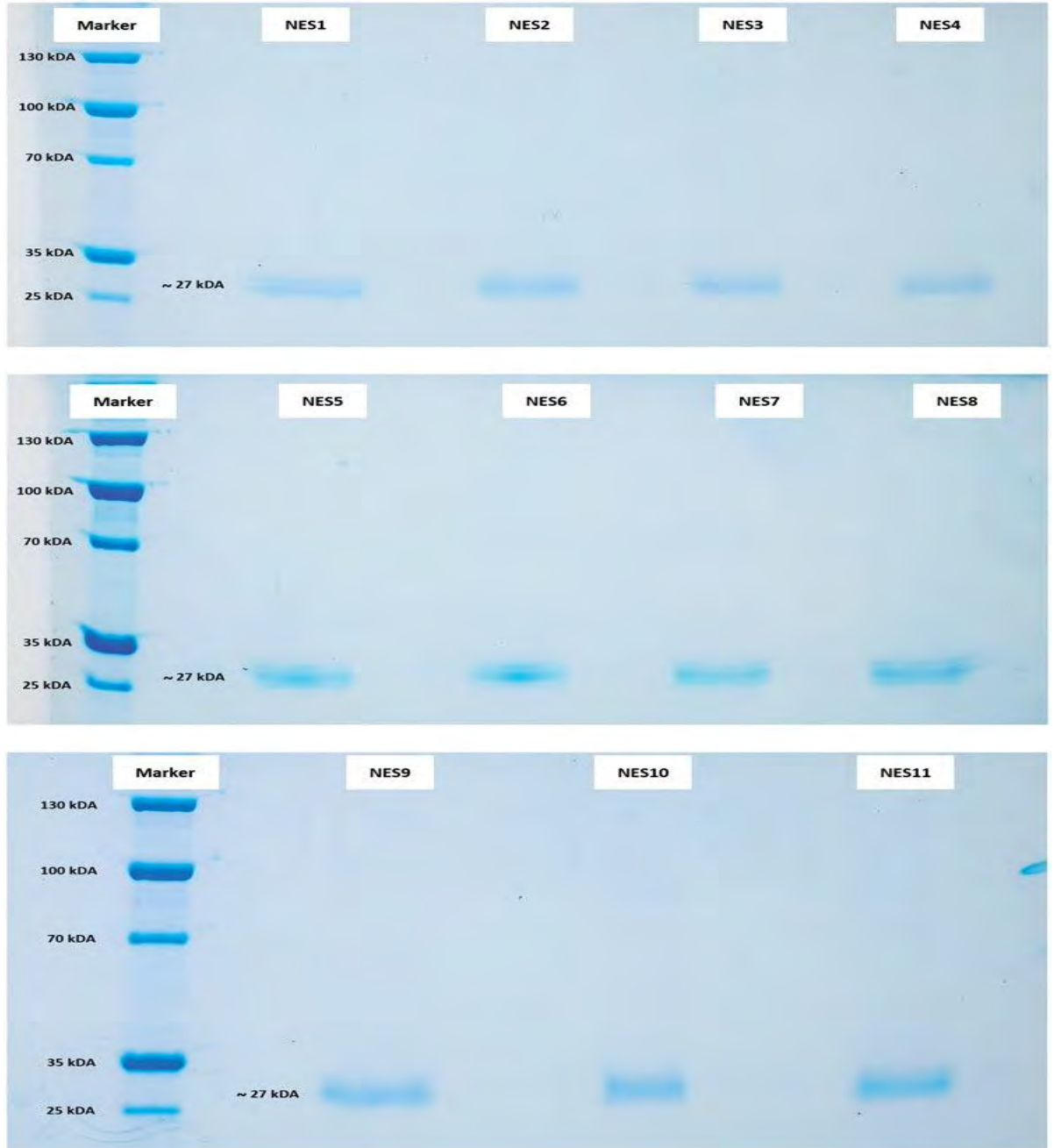


Şekil 45. (a) Ultrasontrifüj ile yıkama sonrası mor membran peleti, (b) Saflaştırılmış mor membran bR solüsyonu, (c) Delipide bR solüsyonu, (d) Saflaştırılmış bR'nin quartz spektrofotometre küvetindeki görüntüsü

bR karakterizasyon işlemleri

SDS-Page analizi

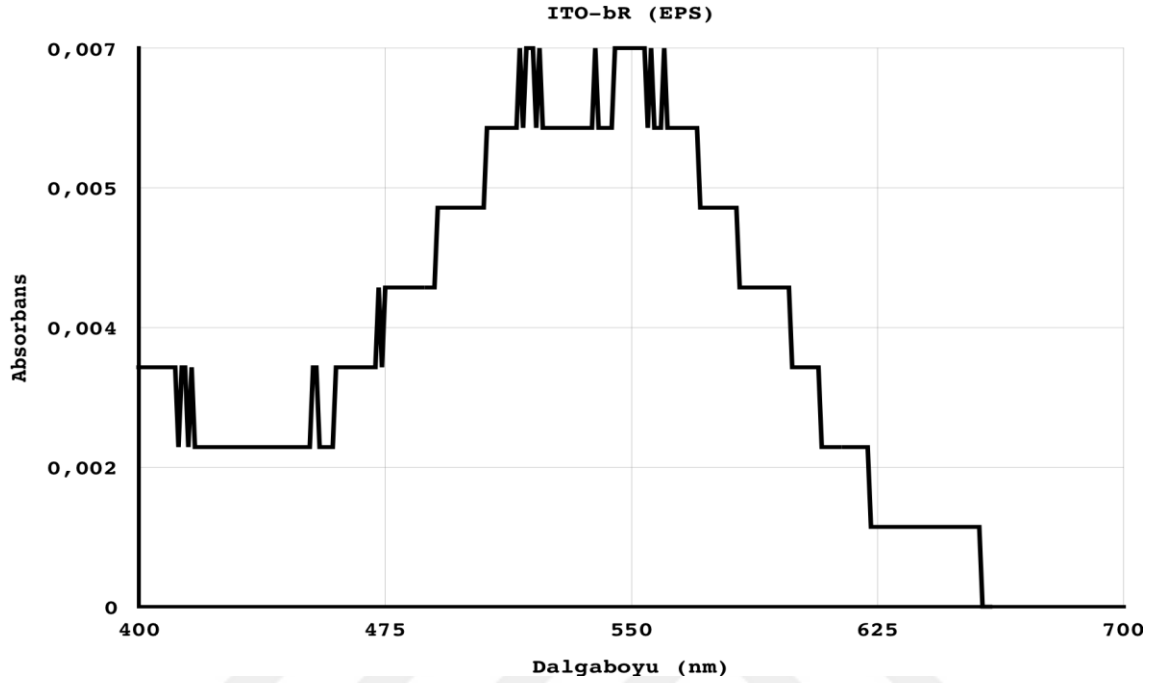
NES kodlu izolatlar arasında pembe-kırmızı renkte olan kültürlerin bR ürettiği, ATPS yöntemiyle saflaştırılan bR'nin moleküler ağırlığının, sodyum dodesil sülfat jel elektroforez (SDS-Page) yöntemi ile saptanması sonucunda belirlenmiştir. Buna göre NES1, NES2, NES3,....., NES11 izolatlarının bR sentezlediği tespit edilmiştir. SDS-Page elektroforez metodu sonuçlarına göre; saflaştırılan bR ürünleri ~27 kDa'da tek bant sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar Şekil 46.'da gösterilmiştir.



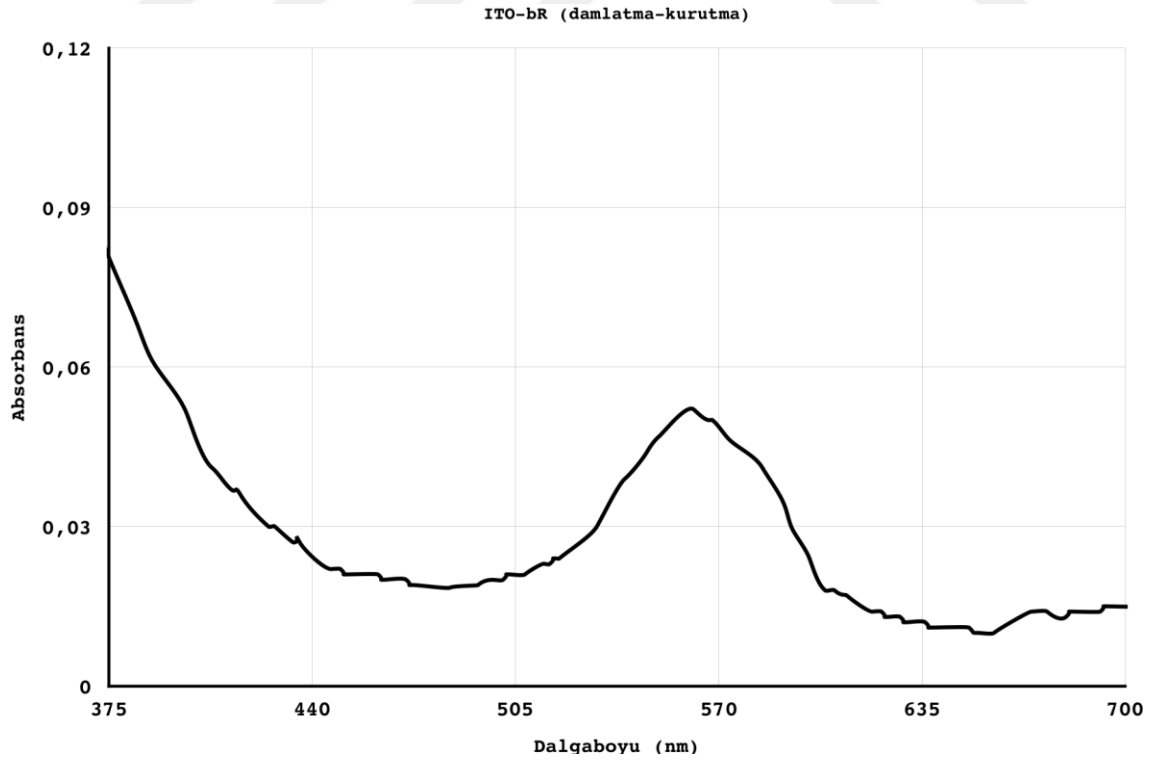
Şekil 46. NES kodlu izolatlardan saflaştırılan bR proteinlerinin SDS-Page görüntüsü

bR UV-VIS NIR analizi

EPS ve damlatma-kurutma teknikleri ile ITO üzerine immobilize edilen bR ince filmleri UV-VIS NIR vasıtasıyla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 47. ve Şekil 48.'de görüldüğü gibidir.



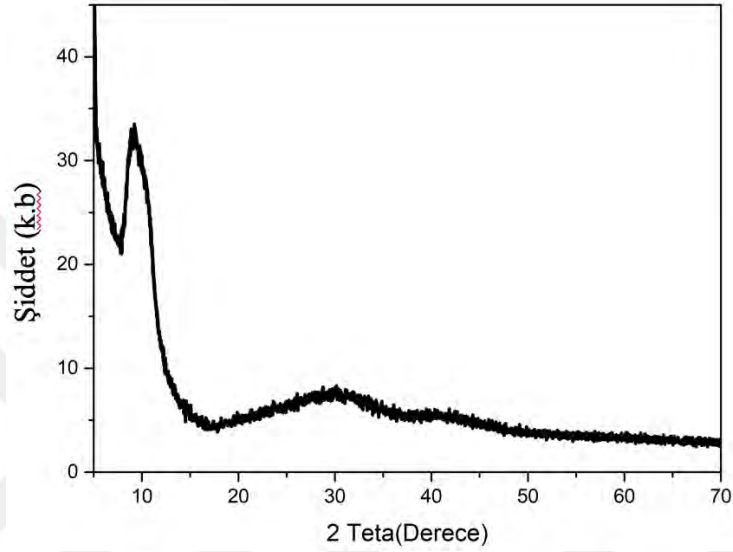
Şekil 47. EPS ile ITO altaşa immobilize edilen bR ince filme ait absorban grafik



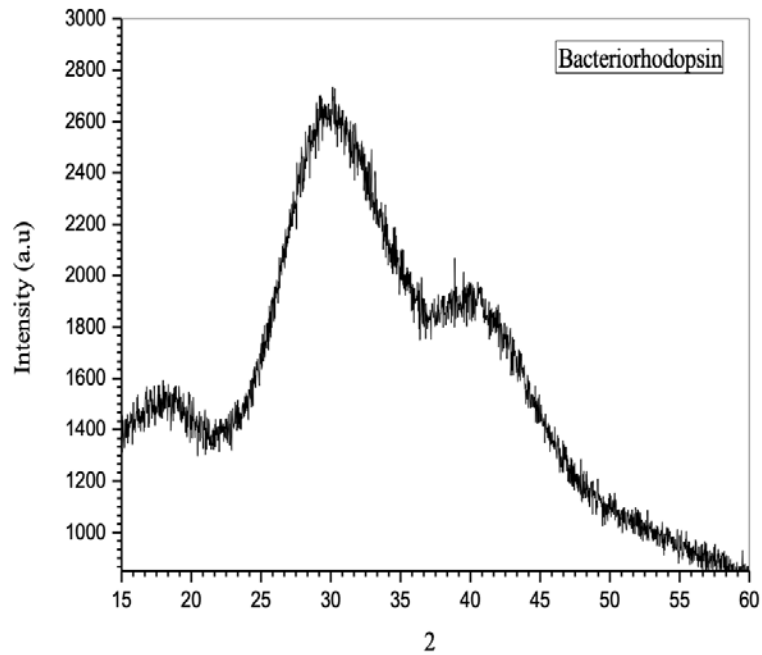
Şekil 48. Damlatma-kurutma tekniği ile ITO altaşa immobilize edilen bR ince filme ait absorban grafik

XRD analizi

bR'nin alttaşlar üzerine immobilize edilmesinin ardından immobilizasyonun karakterizasyonu maksadıyla X-ışını kırınım analizi (XRD) gerçekleştirilmiştir. Buna göre; $\sim 9,1^\circ$ de Miller indisleri (hkl); (100) ve $12,61^\circ$ de Miller indisleri (hkl) (-101) olan şiddetli pikler gözlemlenmiştir. $a= 9,59$, $b= 5,08$, $c= 8,72$ örgü sabitleri alınan bR'nin kristalin yapısının monoklinik türde olduğu saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada bR'e ait kırınım desenleri Şekil 49. ve Şekil 50.'de gösterilmiştir. (PDF kodu: 00-002-0312)



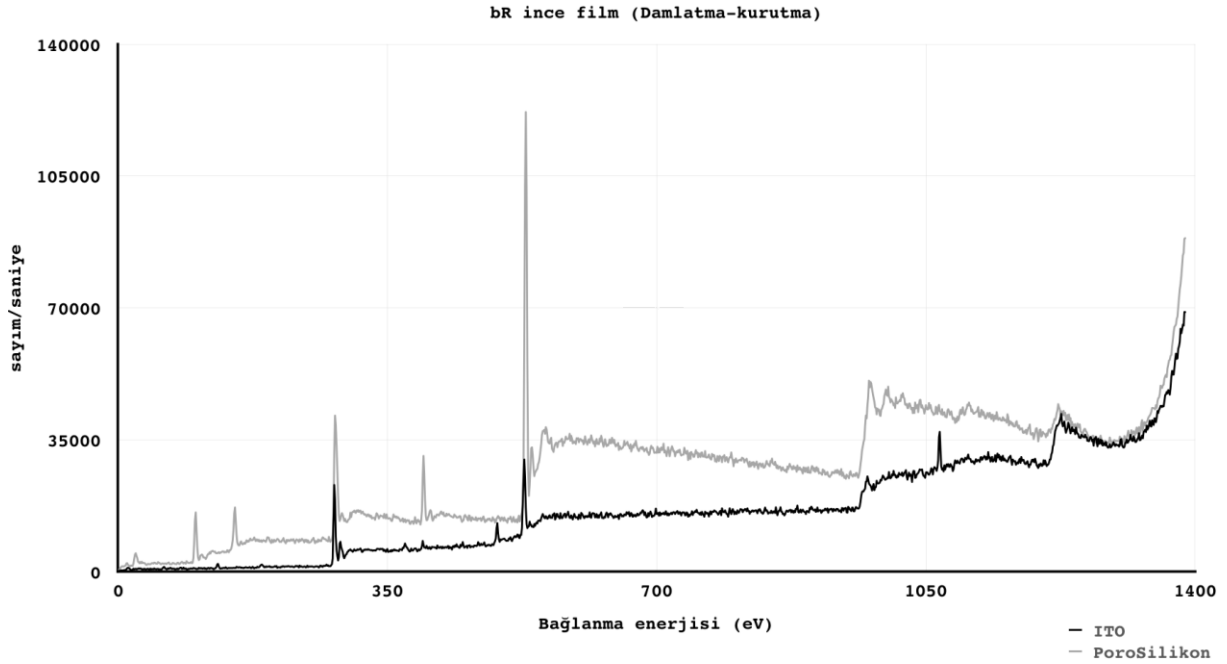
Şekil 49. EPS tekniği ile ITO üzerine immobilize edilen saflaştırılmış bR filmi XRD kırınım deseni



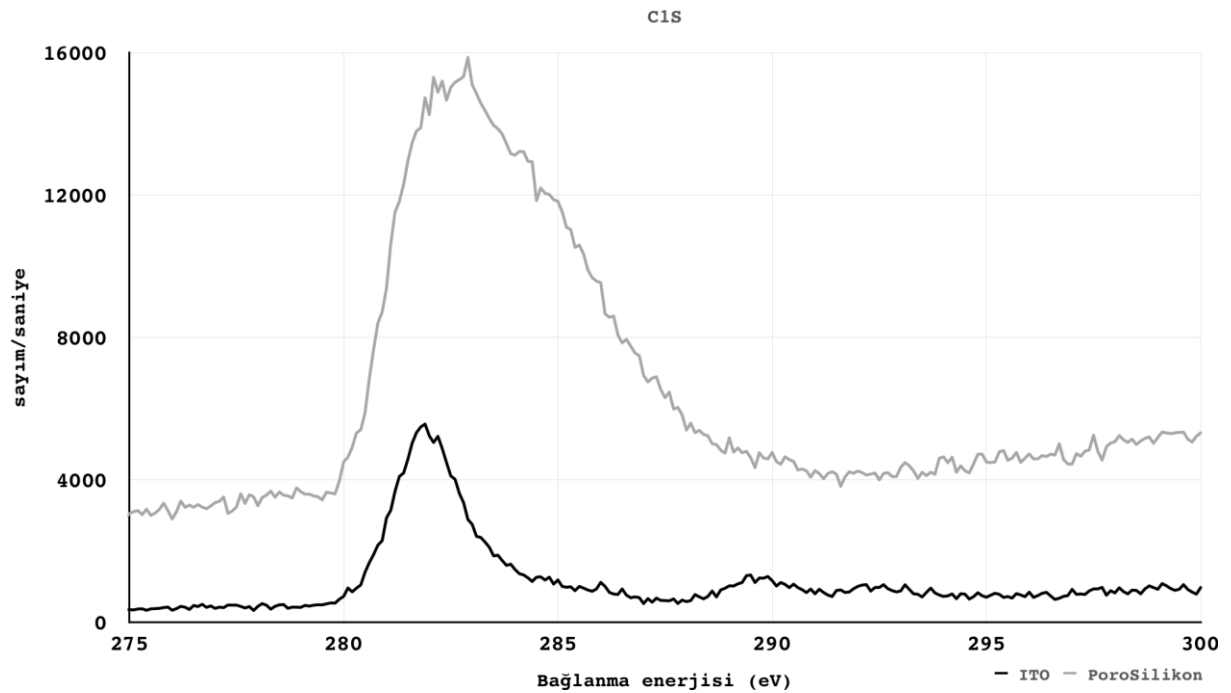
Şekil 50. Damlatma-kurutma tekniği ile lamel üzerine immobilize edilen saflaştırılmış bR filmi XRD kırınım deseni

XPS

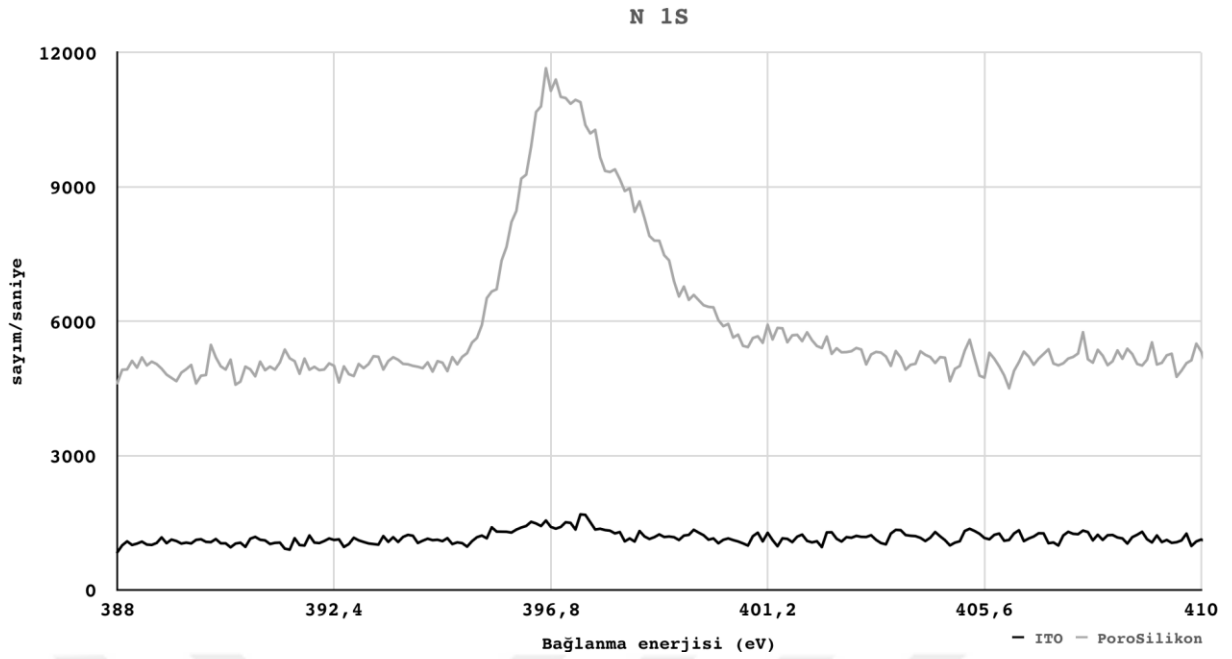
Damlatma-kurutma yöntemi ile üretilen ITO-bR ve ITO-porosilikon ince film yüzeylerinin elementel karakterizasyonu X-ışını fotoelektron spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre ITO üzerindeki bR ince filminin C, N, O elementlerinin 1s bağlanma enerjileri sırasıyla; 281,9; 397,4; 528,9 ve porosilikon üzerindeki bR ince filminin sırasıyla; 282,9; 396,7; 530,2 olarak ölçülmüştür. bR ince filmlerine ait veriler Şekil 51., Şekil 52., Şekil 53., Şekil 54.'te gösterilmiştir.



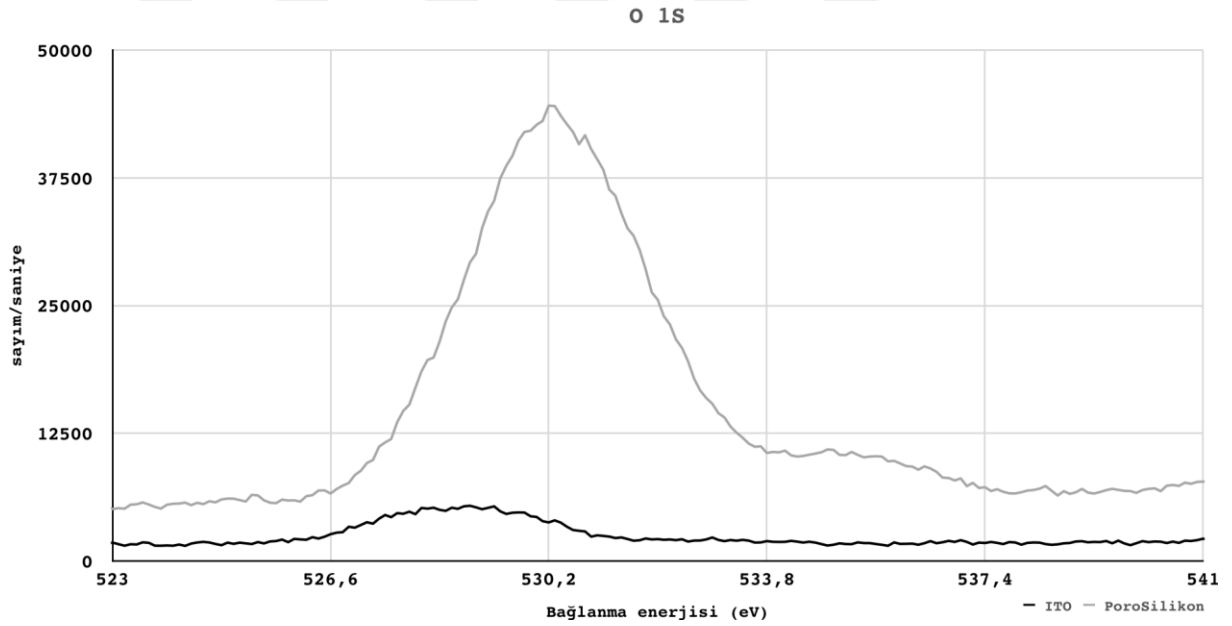
Şekil 51. ITO ve porosilikon üzerine immobilize edilen bR ince filmlerinin XPS grafiği



Şekil 52. bR filmlerinin C 1s bağlanma enerjisi grafiği



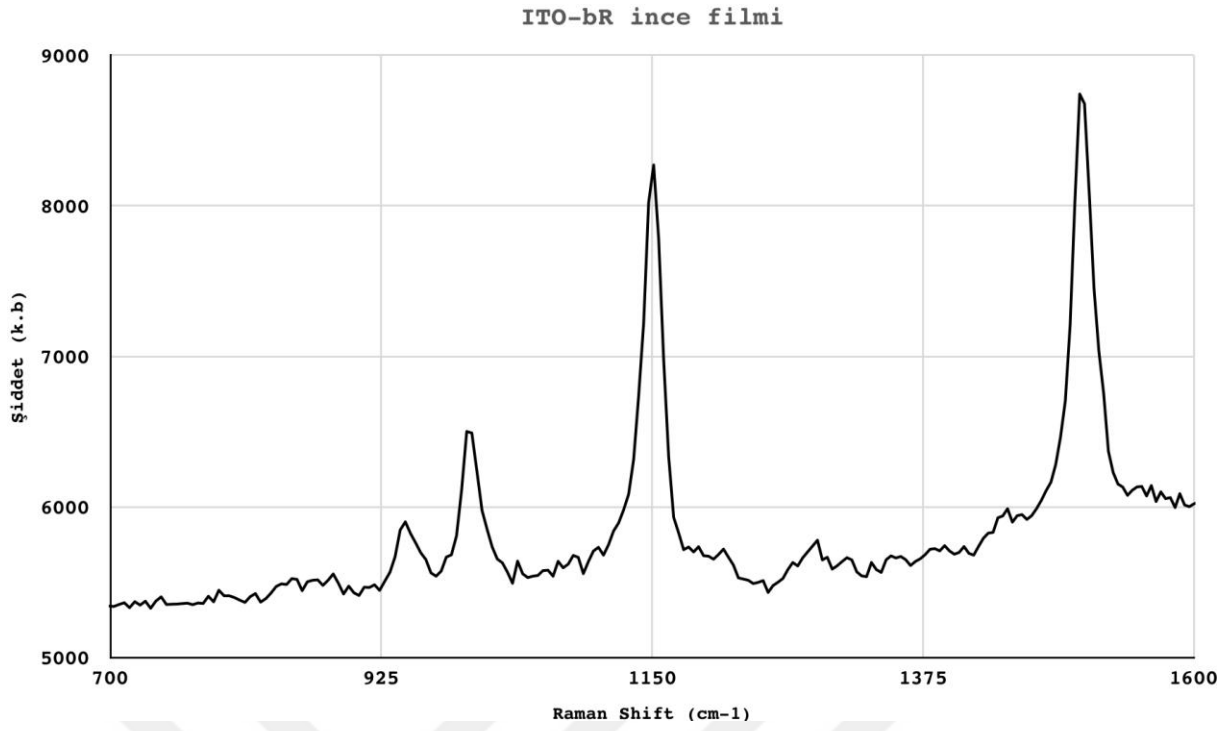
Şekil 53. bR filmlerine ait N 1s bağlanma enerjisi grafiği



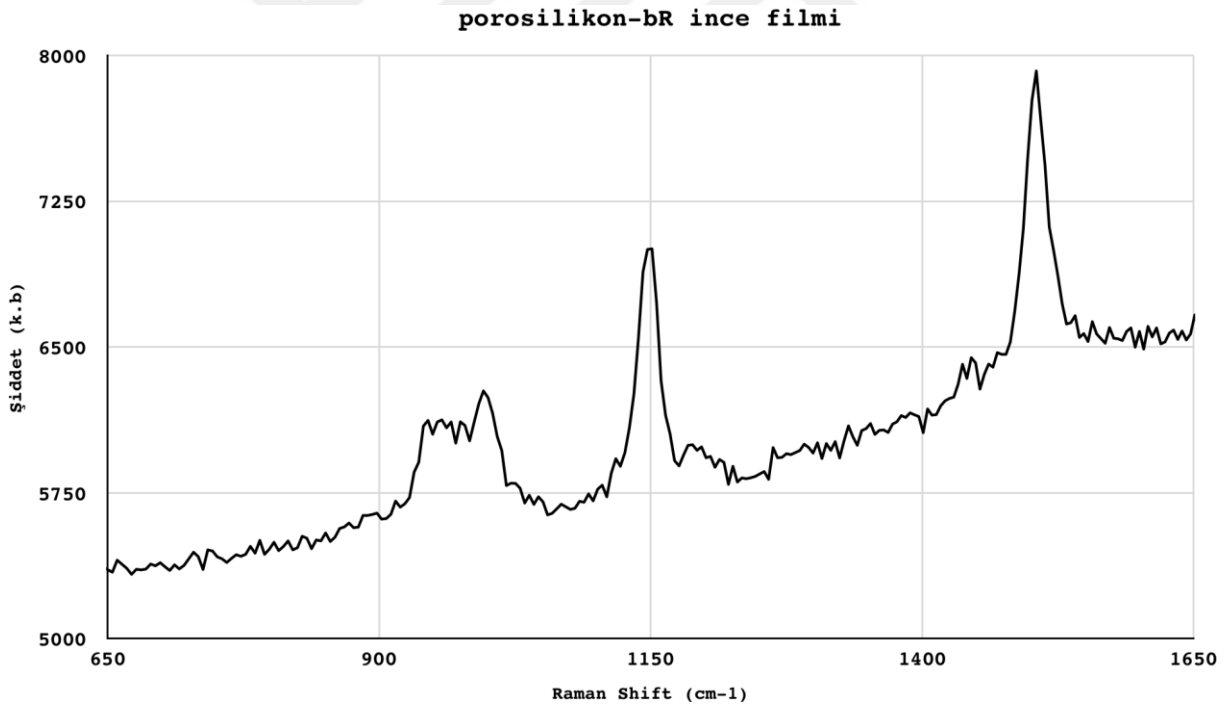
Şekil 54. bR filmlerine ait O 1s bağlanma enerjisi grafiği

Raman

bR ince filmlerinin Raman spektroskopisi ile yapılan analizi sonucunda; ITO-bR için Hidrojen out-of-plane (HOOP), C-C, etilenik bölge (polyene zinciri) ve *Schiff* bazının pikleri sırasıyla; 995, 1151, 1505, 1639 cm^{-1} olarak ölçülmüştür. Porosilikon-bR için ölçülen değerler sırasıyla; 995, 1155, 1505, 1651 cm^{-1} şeklindedir. Elde edilen verilere ait grafikler aşağıda gösterildiği gibidir (Şekil 55. ve Şekil 56.).



Şekil 55. ITO-bR ince filmlerinin Raman analizi

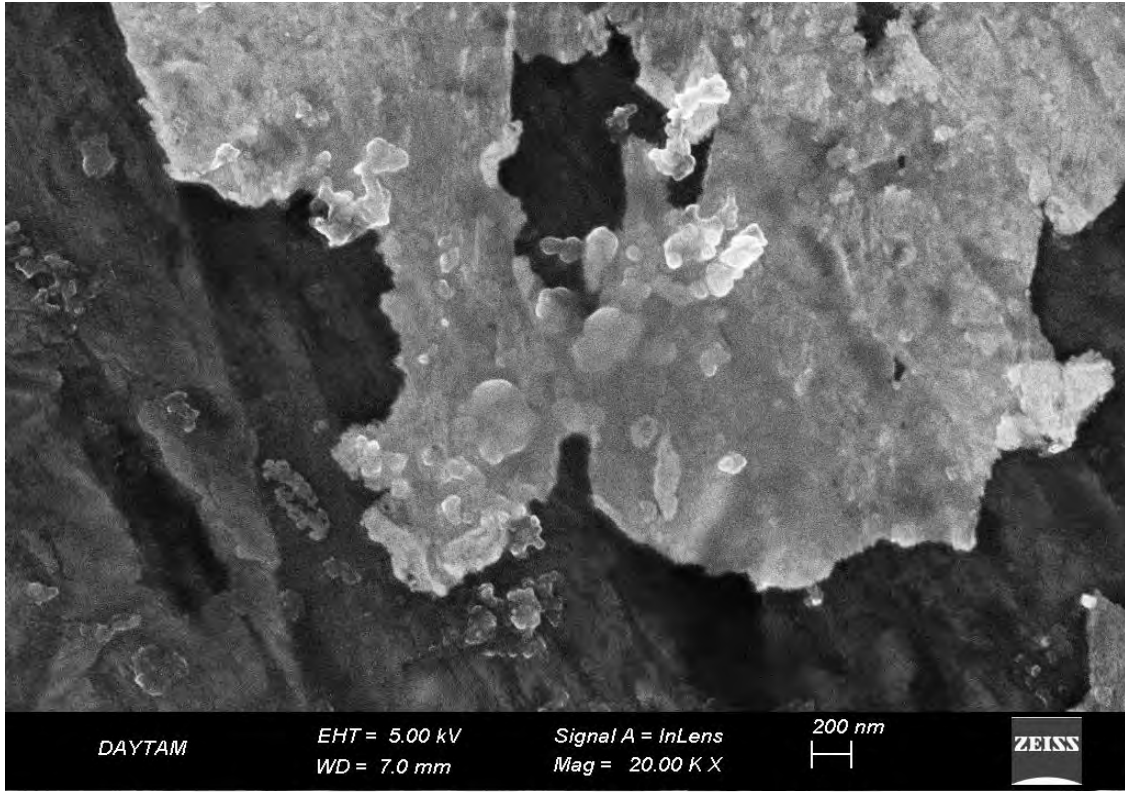


Şekil 56. Porosilikon-bR ince filmlerinin Raman analizi

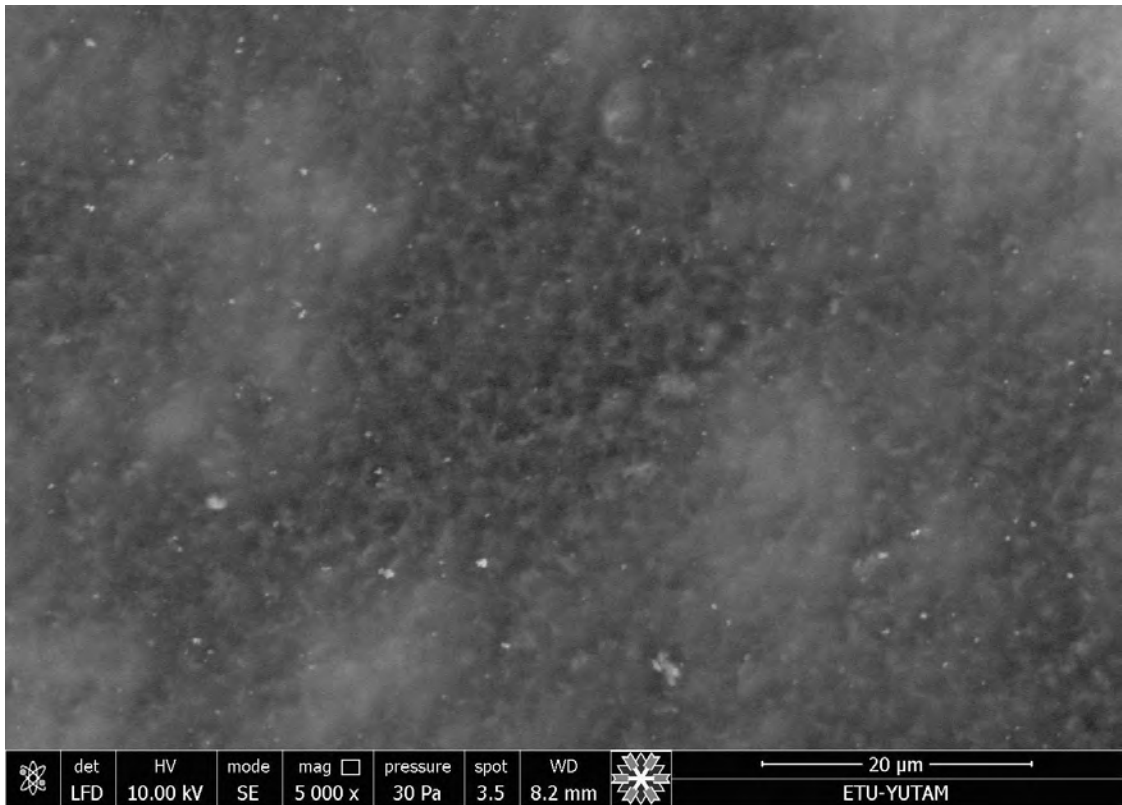
SEM ve TEM Sonuçları

ITO üzerine elektroforetik sedimantasyon işlemi ile immobilize edilen bR ince filminin yüzey analizi taramalı elektron mikroskopu (SEM) vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca saflaştırılmış bR solüsyon halinde geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenmiştir.

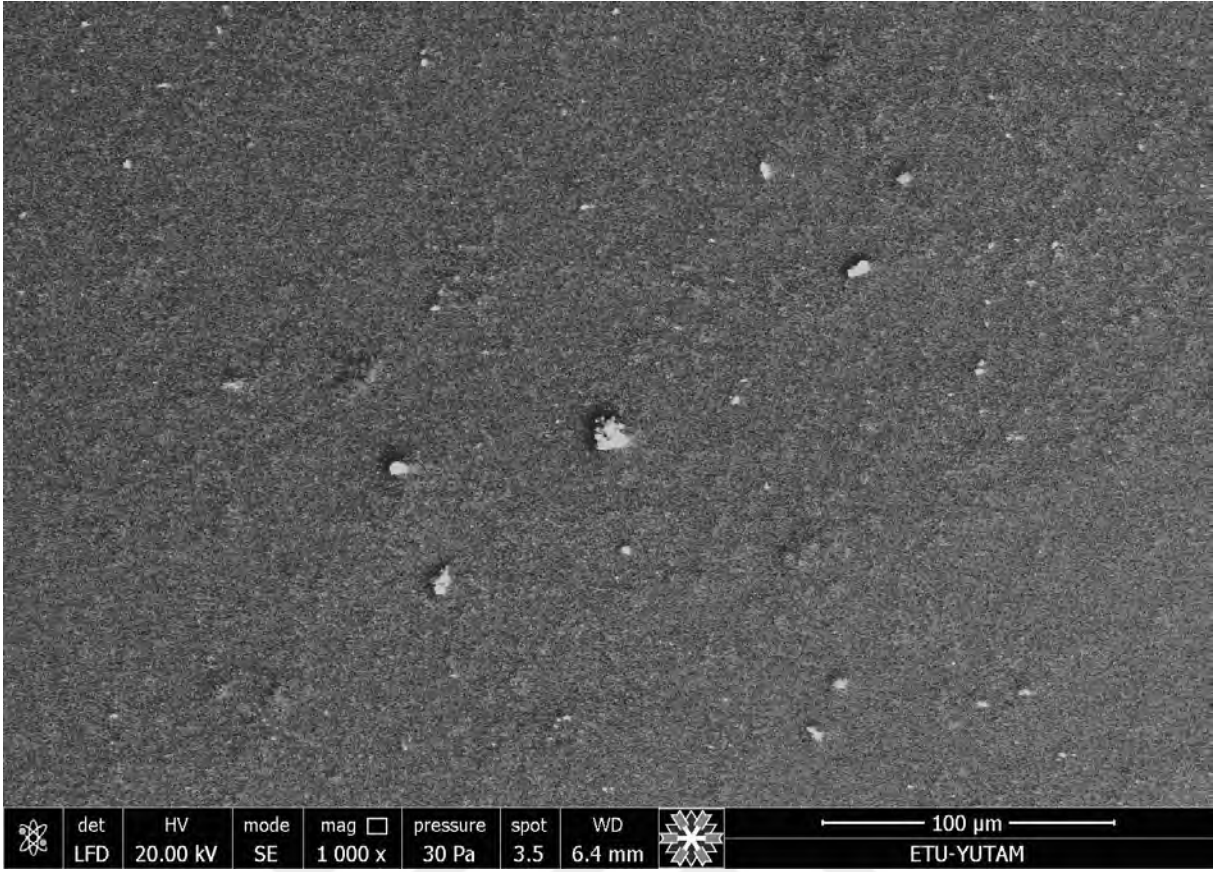
Elde edilen SEM görüntüsü Şekil 57., Şekil 58., Şekil 59., Şekil 60., Şekil 61., Şekil 62., Şekil 63.'te görüldüğü gibidir.



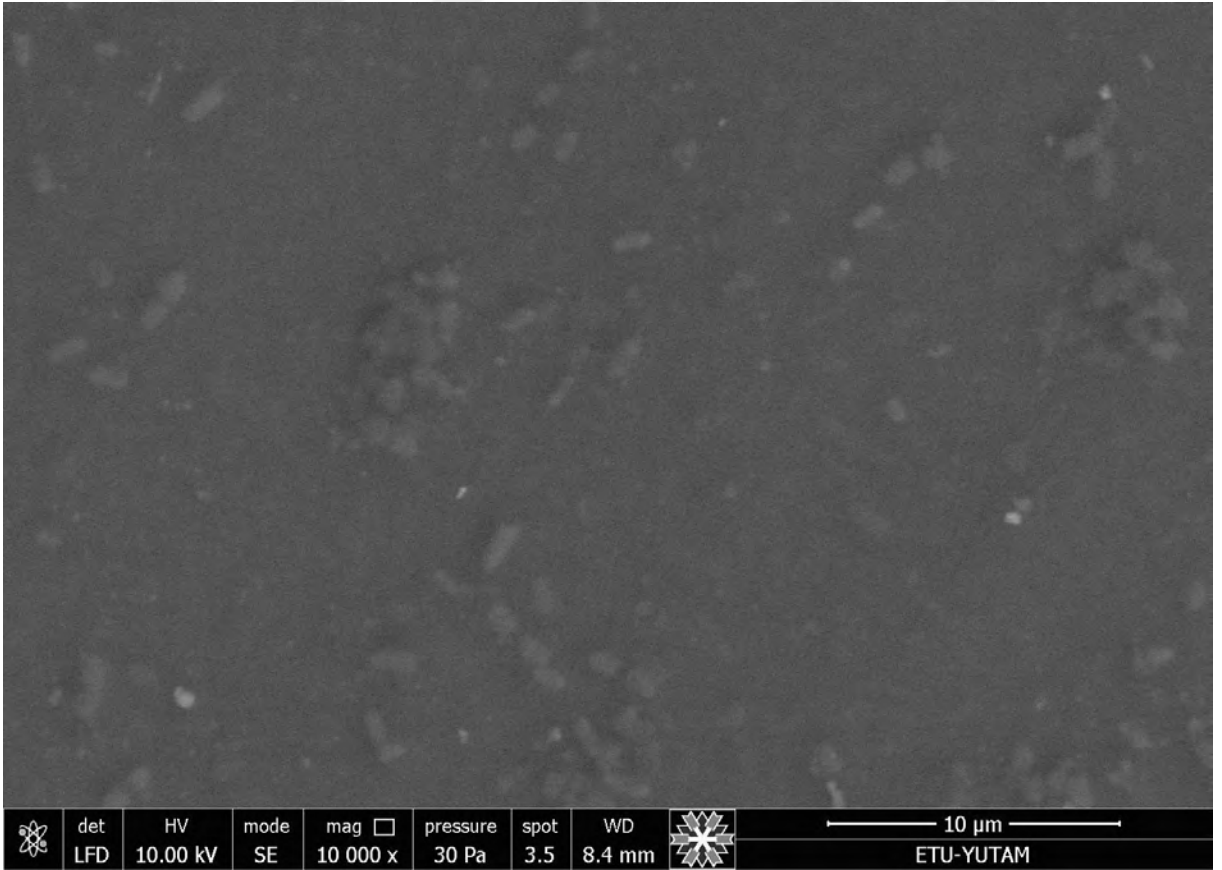
Şekil 57. Bakır elektrotu ile beher içerisinde EPS tekniği ile ITO üzerine immobilize edilen bR ince filminin görüntüsü



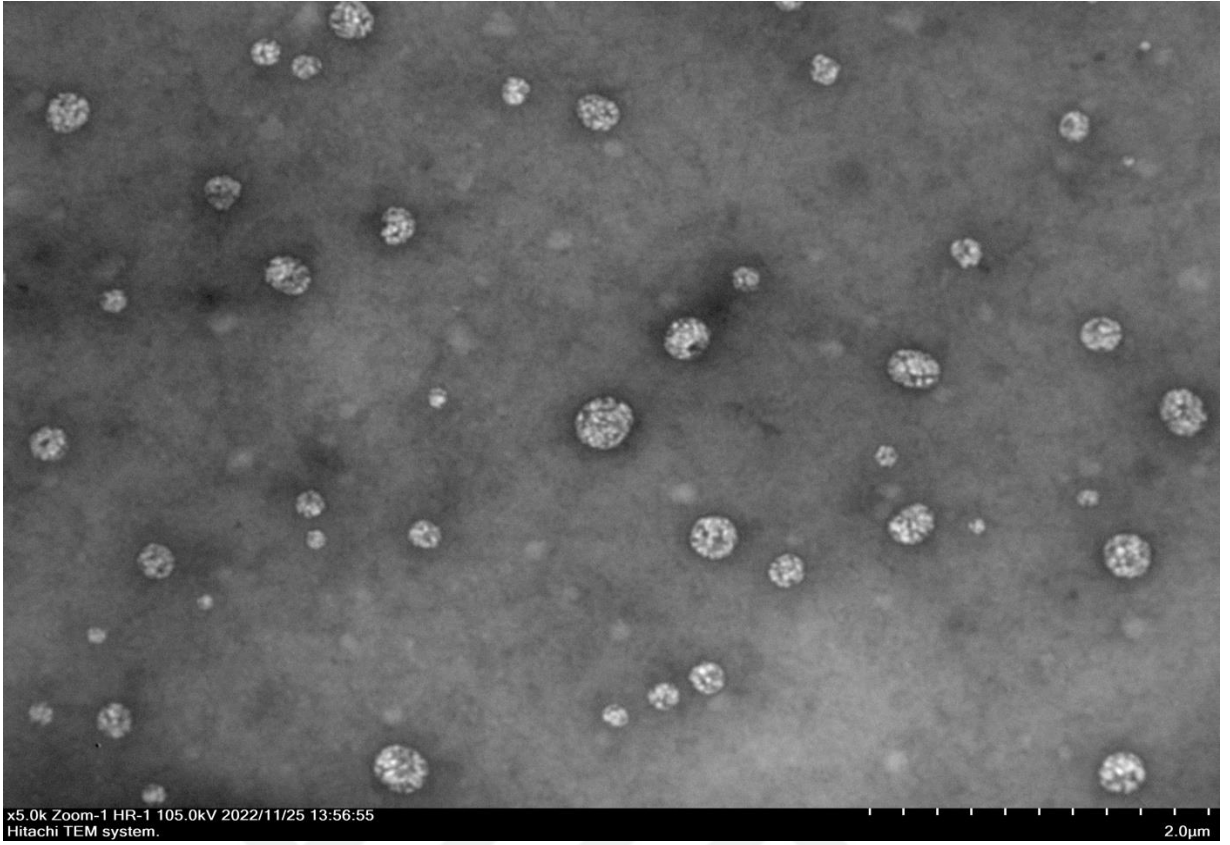
Şekil 58. Platin elektrot ile el yapımı eletroforez kuvet içerisinde EPS tekniği ile ITO üzerine immobilize edilen bR ince filminin görüntüsü



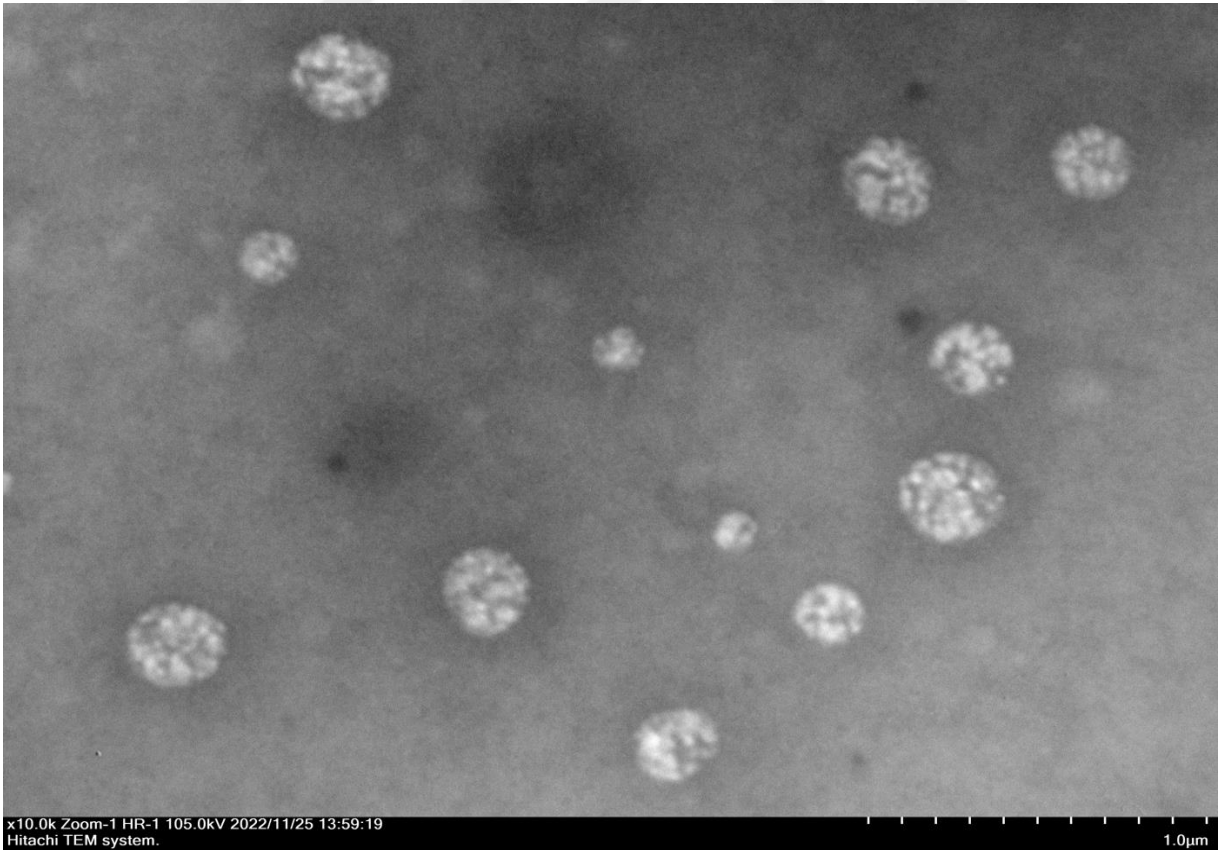
Şekil 59. Platin elektrot ile el yapımı elektroforez küvet içerisinde EPS tekniği ile porosilikon üzerine immobilize edilen bR ince filminin görüntüsü



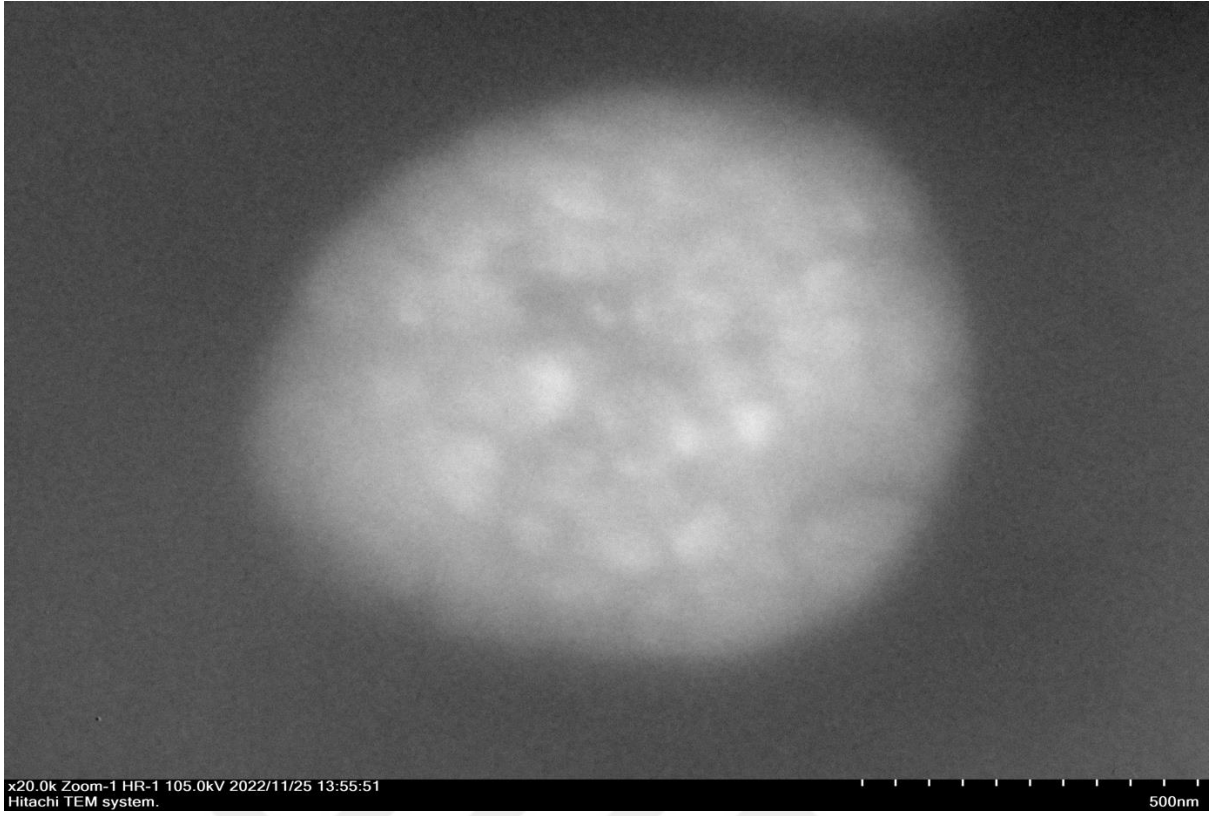
Şekil 60. Porosilikon üzerindeki bR filmi yakınlaştırılmış görüntüsü



Şekil 61. Saflaştırılmış bR'ye (mor membran yamaları) ait geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü



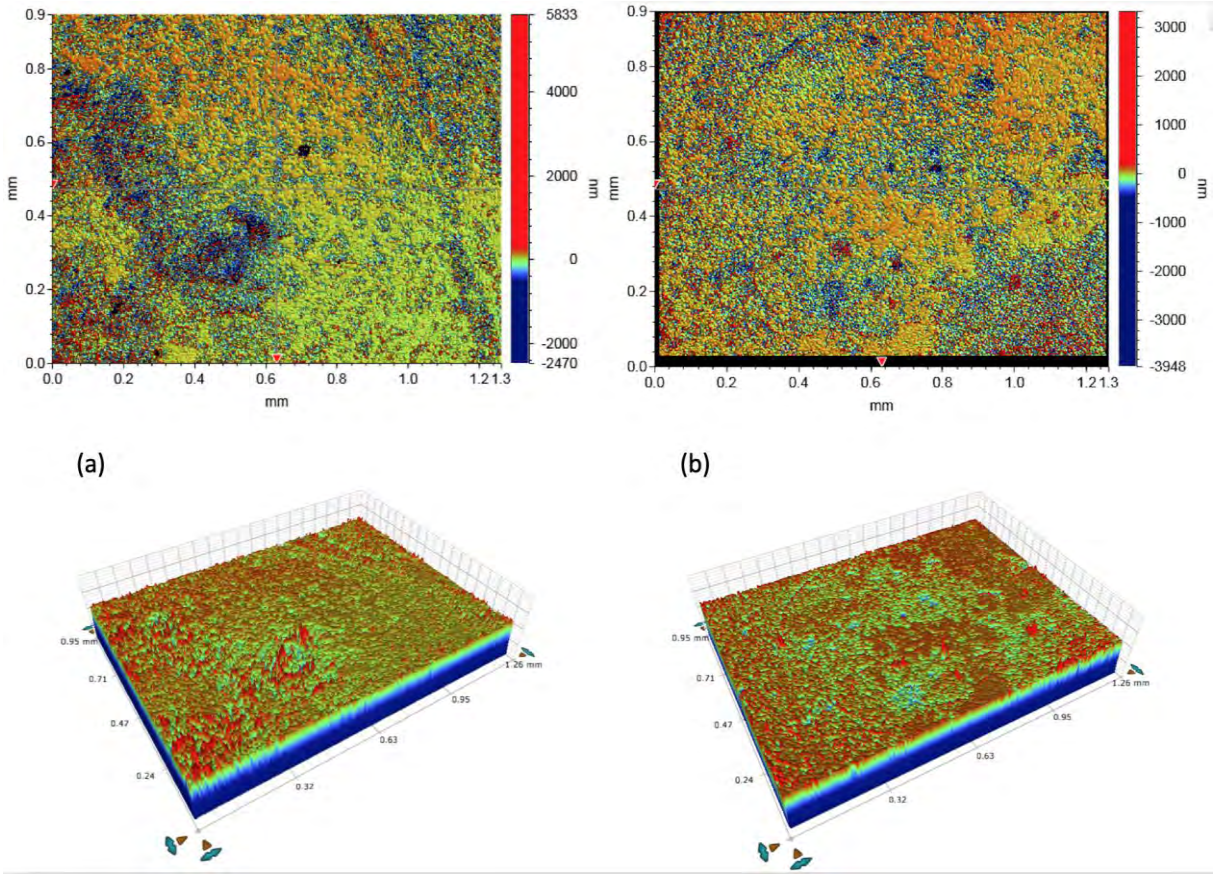
Şekil 62. Saflaştırılmış bR'nin 10.0k X yakınlaştırılmış TEM görüntüsü



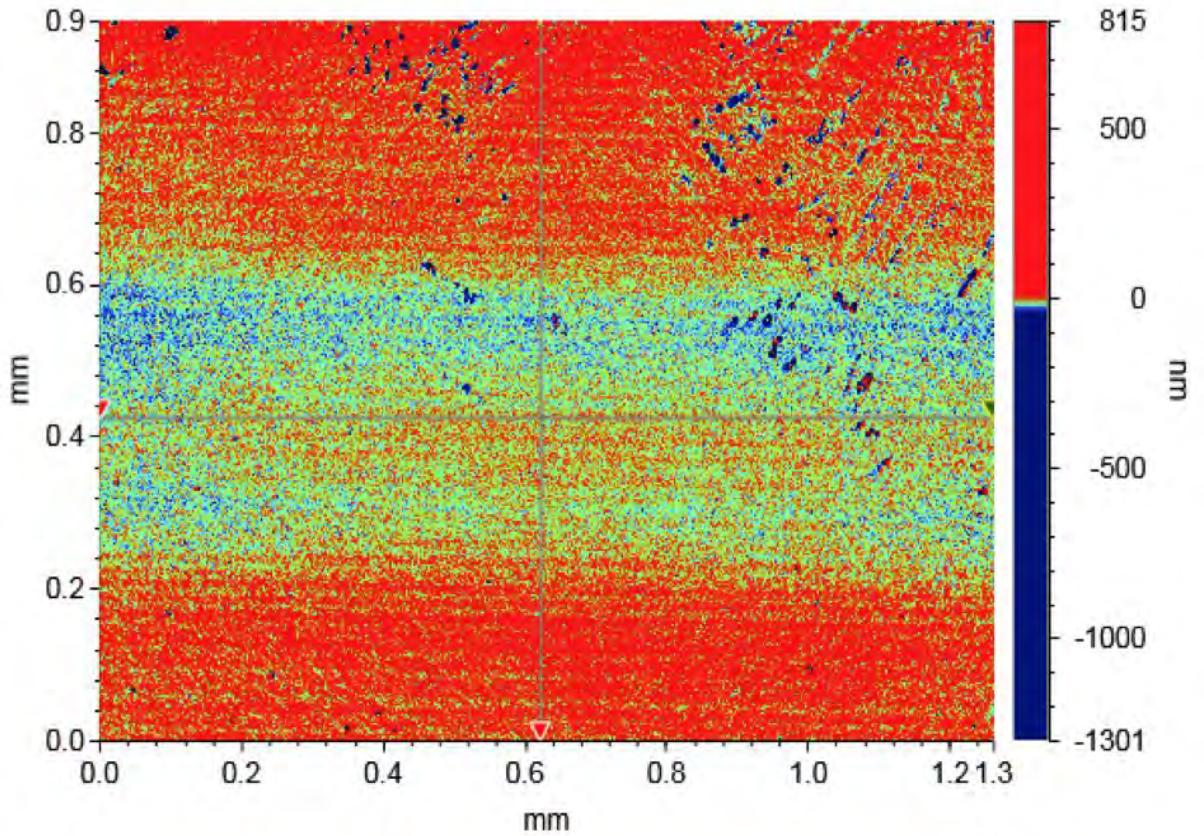
Şekil 63. Saflaştırılmış bR'nin 20.0k X yakınlaştırılmış TEM görüntüsü

Profilometri

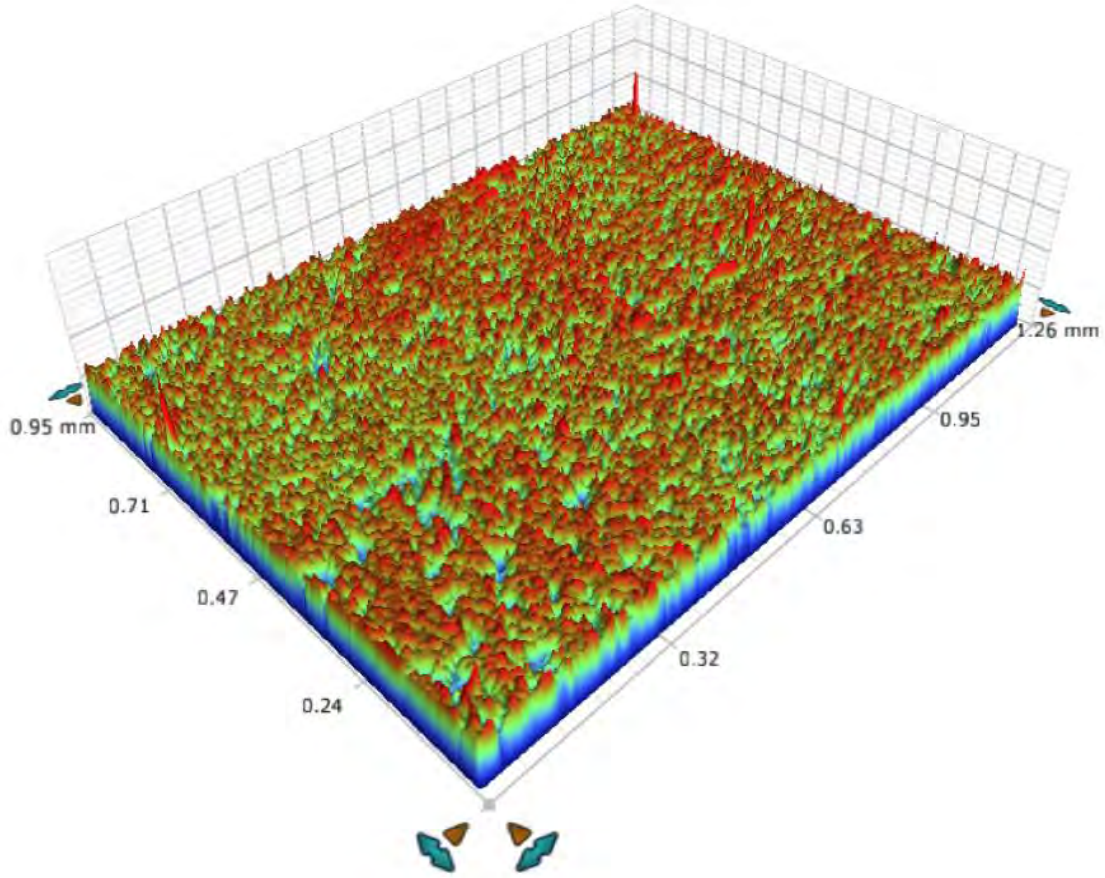
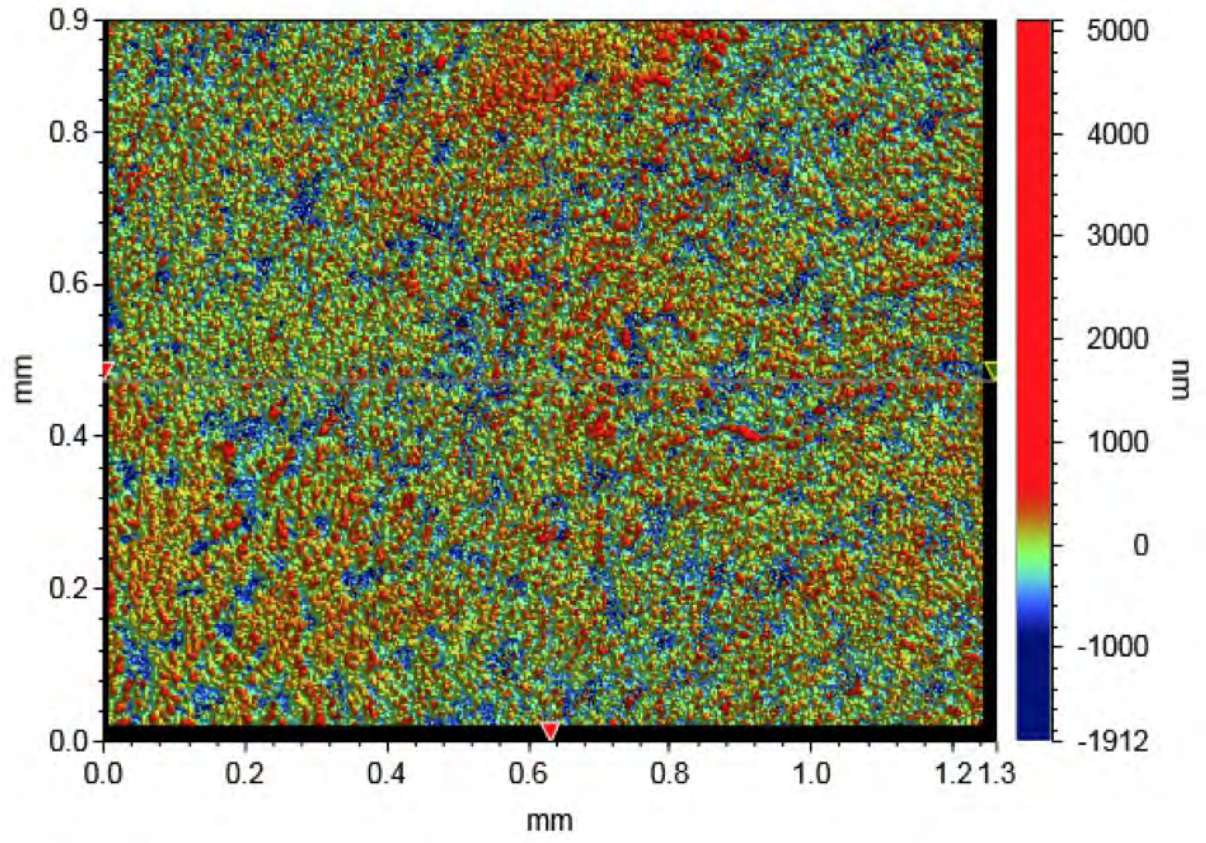
ITO ve porosilikon üzerine elektroforetik sedimantasyon yöntemiyle immobilize edilen bR ince filmlerinin profilometri analizi sonucunda, ITO üzerine bR-damlatma-kurutma ince filmine ait yüzey pürüzlülüğü (Ra, Rq), maksimum profil pik yüksekliği (Rp), maksimum profil yüksekliği (Rt) ve maksimum profil derinliği (Rv) değerleri sırasıyla; 143,4; 205,8; 5833,3; 8303,6; -2470,3 nm olarak ve bR-EPS ince filmine ait veriler sırasıyla; 122,9; 176,5; 3331,5; 7280,0; -3948,4 nm şeklinde ve son olarak porosilikon üzerine EPS ile immobilize edilen bR ince filmine ait veriler sırasıyla; 241,8; 307,9; 5104,2; 7016,1; -1911,9 nm olarak ölçülmüştür. İnce filmlerin yüzey analiz grafikleri aşağıda gösterilmiştir. (Şekil 64., Şekil 65., Şekil 66., Şekil 67.)



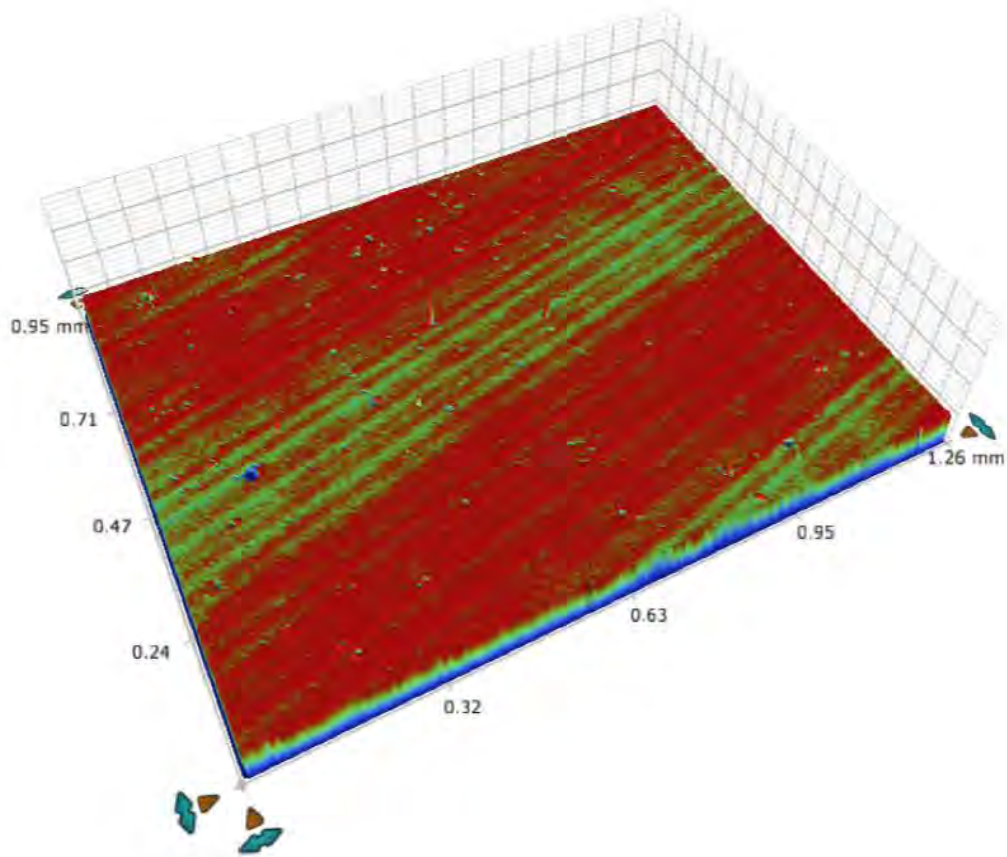
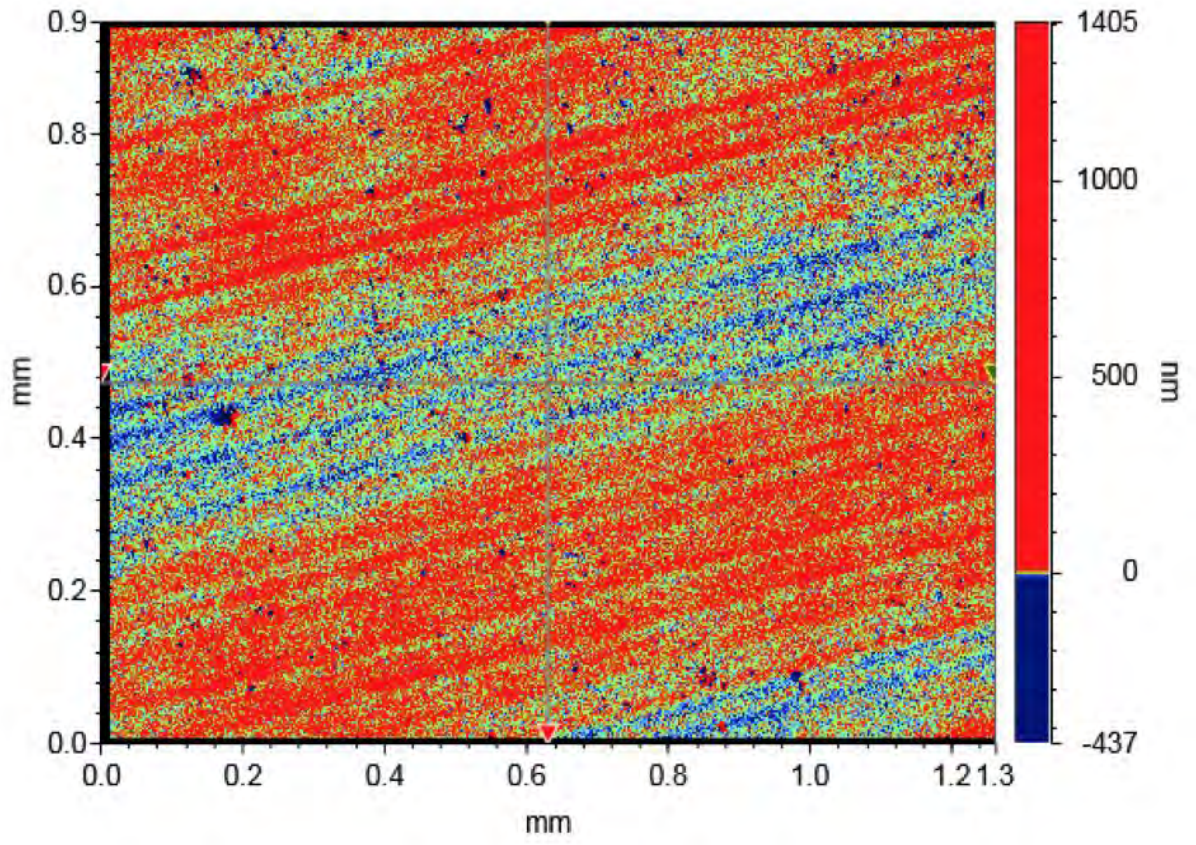
Şekil 64. (a) ITO üzerine damlatma-kurutma tekniği ile immobilize edilen bR ince filmine ait profilometri görüntüsü, (b) ITO üzerine EPS tekniği ile immobilize edilen bR ince filmine ait profilometre görüntüsü



Şekil 65. Boş ITO yüzey profilometri görüntüsü



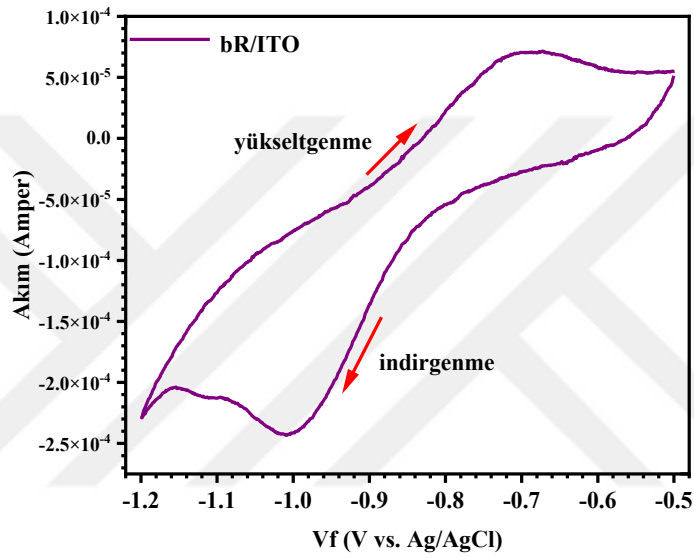
Şekil 66. Porosilikon üzerine EPS tekniği ile immobilize edilen bR ince filmine ait profilometri görüntüsü



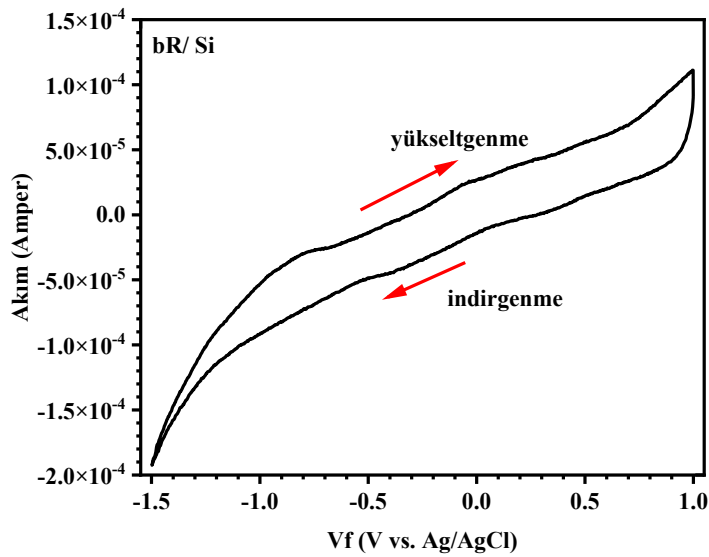
Şekil 67. Boş porosilikon profilometri görüntüsü

Elektrokimyasal ölçümleri

ITO ve porosilikon üzerine elektroforetik sedimantasyon ile immobilize edilen saflaştırılmış bR'nin fotoaktivitesini gözlemek amacıyla ITO için 1,2 V ile -0,5 V arasında, porosilikon için -1,5 ile 1 V arasında pH 7,1 KH_2PO_4 elektrolit çözelti içerisinde 25 °C oda sıcaklığında 50 mV/sn tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınmıştır. ITO-bR ince filminde -1 V dolayında katodik pik, -0,7 V dolayında ise anodik pik gözlemlenmiştir. Porosilikon-bR ince filminde ise belirgin bir pik gözlemlenememiştir. Elde edilen CV voltamogramları Şekil 68. ve Şekil 69.'da gösterilmiştir.



Şekil 68. ITO-bR ince film CV grafiği



Şekil 69. Porosilikon-bR ince film CV grafiği

TARTIŞMA VE SONUÇ

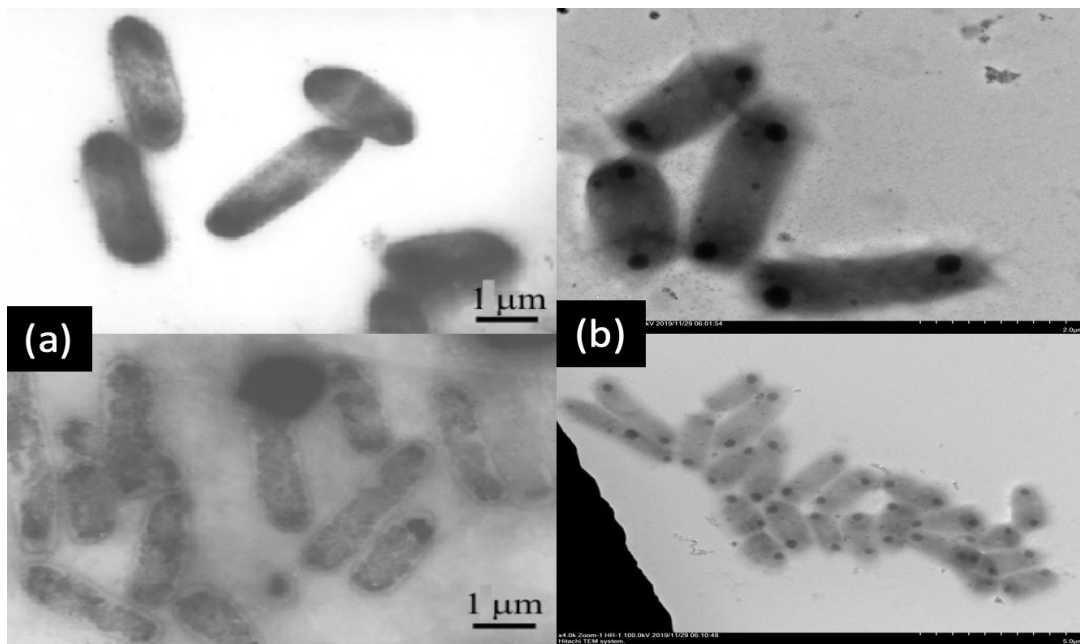
Tuz Gölü'nden alınan örneklerin yayma, çizme ve seyrelterek yayma ekim teknikleri ile izole edilmesi sonucunda 11 adet bR sentezleyebilen saf halofilik arke izolatu elde edilmiştir. Genomik DNA izolasyonu ve 16S rRNA analizi sonucunda elde edilen veriler ışığında GenBank tarafından taksonomik ilişkisi belirlenen izolatlardan; 4 adetinin *Halobacterium salinarum*, 3 adetinin *Halobacterium sp.*, 2 adetinin *Haloarcula salaria*, 1 adetinin *Haloarcula sp.*, 1 adetinin *Halorubrum sp.* olduğu saptanmıştır. İzolatların 16S rRNA verileri kullanılarak, Neighbor-joining metodu vasıtasıyla belirlenen filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Çalışmamızda da genomik sekansı yapılan *H. salinarum*, ilk kez Ng *et al.* (2000) tarafından yılında yapılan çalışmada tamamen sekanslanan ilk halofilik arke olma özelliği taşımaktadır (Ng *et al.* 2000; Fendrihan *et al.* 2006; İspirli *et al.* 2019).

Optimizasyon işlemlerinde belirli bir standardın belirlenmesi maksadıyla başlangıç suşu ve selektif medya seçimi amacıyla bir dizi kültürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Başlangıç suş seçiminde göz önünde bulundurulacak kriter; çalışmamızın da temel amacı olan bR üretimi olduğundan dolayı, her bir kültür ortamında ATPS tekniği ile bR saflaştırma işlemi yürütülerek, bR üretim miktarları hidroksilamin metodu vasıtasıyla araştırılmıştır. bR üretimi açısından en verimli olan izolat ve besiyerinin seçilmesi işleminde tüm izolatlar (NES1,...NES11), farklı içeriklere sahip; S-1, S-2, S-3 sıvı besiyerlerinde kombine bir şekilde inoküle edilmiştir (Çakıcı 2004; Ghasemi *et al.* 2008; Atlas 2010; Shiu *et al.* 2014). Yapılan bu işlemin sonucunda daha verimli olduğu saptanan S-2 besiyeri ortamı ve NES5 suşu, yapılan tüm optimizasyon işlemlerinde standart olarak belirlenmiştir. 67,2 mg/L bR sentezi ile daha verimli olduğu saptanan S-2 besiyerinde, literatürde benzer bir besiyeri formülünün kullanıldığı çalışmada elde edilen 38,7 mg/l olan bR miktarından daha fazla sentez gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Shiu *et al.* 2014). Aradaki farkın, çalışmamızda kullanılan iz metal solüsyonu olabileceği tahmin edilmektedir. S-1 besiyerinde, S-2 besiyerine kıyasla besin kaynağı olarak daha düşük miktarda pepton kullanımı mevcuttur. S-3 besiyeri formülünde ise pepton yerine yeast ve casamino asit, kompleks C ve N kaynağı olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında besiyerleri arasında oluşan bR sentez farkının, bu gibi farklı faktörlerden dolayı oluşabileceği düşünülmektedir (Ghasemi *et al.* 2008; Seyedkarimi *et al.* 2015; Kalenov *et al.* 2016; Jeganathan *et al.* 2019).

H.salinarum olduğu saptanan NES5 izolatının morfolojik yapısının incelenmesi maksadıyla geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, *H. salinarum*'un çubuk şeklinde yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, gram boyama sonucunda; *H. salinarum*'un hücre duvarı olmamasına rağmen hücreyi kafes gibi saran ether zincirli lipid tek katmandan oluşan S-tabakasından dolayı gram negatif olduğu gözlemlenmiştir. *Halobacteriaceae* familyasına üye olan organizmalarda glikoprotein yapıtaşlarından oluşmaktadır. Yapısındaki glikan zincirlerde bulunan sülfat kalıntılarının negatif yükü sayesinde aşırı tuzlu ortamlarda halofilik arkeye dayanıklılık sağladığı bilinmektedir. Alınan görüntüler literatürdeki diğer çalışmalarla da benzerliklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. TEM analizi görüntülerinin yapılan başka bir çalışma ile karşılaştırması Şekil 70.'te görüldüğü gibidir (Zeng *et al.* 2006; Kahraman 2008). NES5 suşuna ait morfolojik özellikler Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. NES5 Suşunun Özellikleri

	NES5	<i>H.salinarum</i> TG13 (Çakıcı 2004)	<i>H.salinarum</i> S9 (Çakıcı 2004)
Gelişim	7 gün	5 gün	5 gün
Hücre renklenmesi	Kırmızı-pembe	Kırmızı-pembe	Pembe
Morfoloji	Rod	Rod	Rod
Gram Boyama	Negatif	Negatif	Negatif
bR λ_{max}	570 nm	563 nm	567 nm
bR moleküler ağırlık	27 kDa	22 kDa	22 kDa



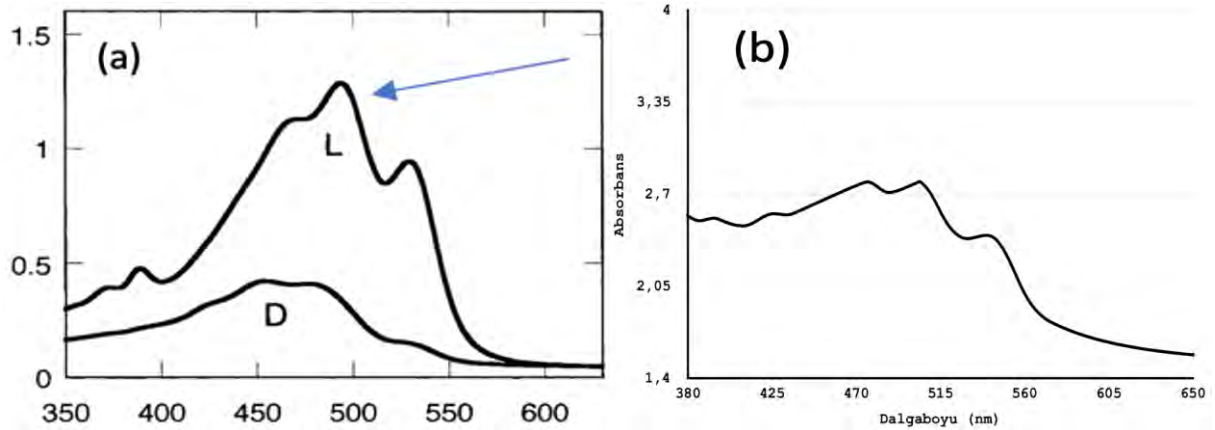
Şekil 70. (a) Zeng *et al.* (2006) tarafından TEM ile alınan *H. salinarum* görüntüsü, (b) Çalışmamızda TEM ile alınan *H. salinarum* görüntüsü

S-2 besiyeri formülü kullanılarak, en verimli pH değerinin araştırılması maksadıyla 6 farklı (7, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8) pH değerine sahip besiyeri ortamı hazırlanmıştır. NES5 suşunun bu besiyerlerine inoküle edilmesinin ardından belirli aralıklarla alınan absorbans verileri ile *H.salinarum* ve bR üretim miktarları takip edilmiştir. 11 günlük süre zarfında 48'er saatlik periyodlarla gerçekleştirilen ölçümlerin sonucunda; 79,6 mg/L bR verimi elde edilen 7,8 pH değerine sahip besiyeri ortamının diğer kültür ortamlarından daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Ghasemi *et al.* (2008) tarafından yapılan *H. salinarum* üretim optimizasyonu çalışmasında en verimli pH değerinin 7,5 olduğu kaydedilmiştir. Bir başka çalışmada ise halofilik arkeler için, 7,2 pH değerinin optimum olduğu rapor edilmiştir (Manikandan *et al.* 2019).

NES5 suşunun bR sentezleme verimi üzerinde sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen araştırmada; 30, 34, 38, 42 °C sıcaklıklarda inkübasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. pH optimizasyon denemesinde olduğu gibi, *H. salinarum* ve bR üretim miktarları belirli aralıklarla alınan absorbans değerleri üzerinden takip edilmiştir. 11. günü müteakiben ATPS tekniği ile gerçekleştirilen saflaştırma işlemi sonucunda; 38 °C'de inkübe edilen besiyeri ortamında diğer sıcaklık ortamlarından daha fazla olduğu saptanan, bR üretimi miktarının 69,3 mg/l olduğu belirlenmiştir. Seyedkarimi *et al.* (2015) tarafından yapılan optimizasyon çalışmasında da optimum sıcaklık değerinin 37-39 °C arasında olduğu belirtilmiştir. Literatürde yapılan başka bir çalışmada da optimum sıcaklık değerinin 38 °C olduğu kaydedilmiştir (Ghasemi *et al.* 2008). Hem pH hem de sıcaklık optimizasyon çalışmalarında elde edilen veriler arasındaki farklılıkların, diğer kültürasyon faktörleri veya eksternal etkenler nedeniyle oluşabileceği düşünülmektedir.

30 W, 40 W, 60 W ve 80 W olmak üzere 4 farklı aydınlatma ortamında inkübasyonu yürütülen NES5 suşunun, 11 günün sonunda uygulanan hidroksilamin metodu sonuçlarına göre; optimum bR sentezlenen ortamın, 72,6 mg/L ile 60 W ışık kaynağı kullanılan ortam olması ile birlikte diğer aydınlatma şiddetlerinin de yakın sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Literatürde bulunan bir diğer çalışmada ise 6300 lx (70 W) ışık kaynağından en iyi verim alındığı gözlemlenmiştir (Seyedkarimi *et al.* 2015). Aydınlatma optimizasyon sürecinde halojen ampül ve led ampül kullanılmıştır. Halojen ampül kullanılan deneylerde alınan absorbans sonuçlarına göre bacterioruberin üretiminde önemli ölçüde artış ve buna bağlı olarak bR üretiminde düşüş meydana gelmiştir. Bacterioruberin, bR sentez yolağında sırasıyla likopen ve likopen elongaz enziminden gelişen bir karotenoid pigmentidir. *H.salinarum*'un yüksek ultraviyole, reaktif oksijenler, radyasyon gibi ölümcül şartlara karşı bacterioruberin sentezi

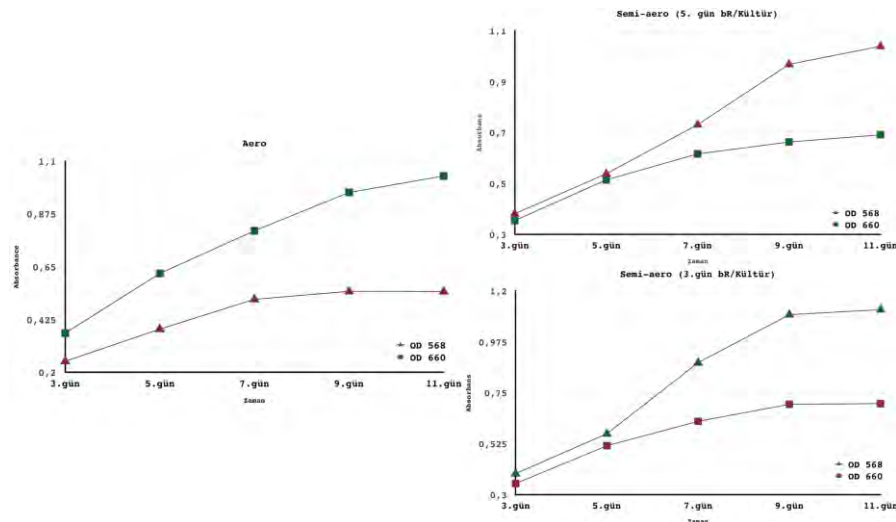
geliştirdiği bilinmektedir (Shahmohammadi *et al.* 1998; El-Sayed *et al.* 2002; Fard *et al.* 2018). Bacterioruberine ait karakteristik UV absorbans grafiği aşağıda gösterilmiştir (Şekil 71.).



Şekil 71. Halojen ampul kullanılan örneklerden alınan absorbans grafiğinde bacterioruberinin karakteristik pik görüntüsü

(a) El-Sayed *et al.* (2002) tarafından yapılan çalışmada alınan absorbans grafiği L; light, D; dark ifade etmektedir, (b) Çalışmamızda halojen ampul kullanılan inkübasyon sonrası bR saflaştırılması sırasında alınan absorbans grafiğinde bacterioruberin sentezinin yükseldiği anlaşılmaktadır.

Ortamdaki oksijen miktarının bR üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla, 6 ayrı havalandırma şartında yürütülen inkübasyon işleminin sonucunda yarı-havalandırmalı kültür ortamında bR sentezinin daha verimli olduğu gözlemlenmiştir. 11. gün sonunda hücre kültürlerinden saflaştırılan bR miktarının; 78,8 mg/l olduğu tespit edilmiştir. Düşük oksijen varlığının bR sentezini maksimize ettiği, literatürde bulunan diğer çalışmalarda da belirtilmiştir (Şekil 72.) (Sumper *et al.* 1976; El-Sayed *et al.* 2002). Bu açıdan halofilik arkeye fotosentetik özellik sağlayan bR'nin nispeten havalandırmasız ortamda daha yüksek oranda sentezlenmiş olması beklenen bir durumdur.

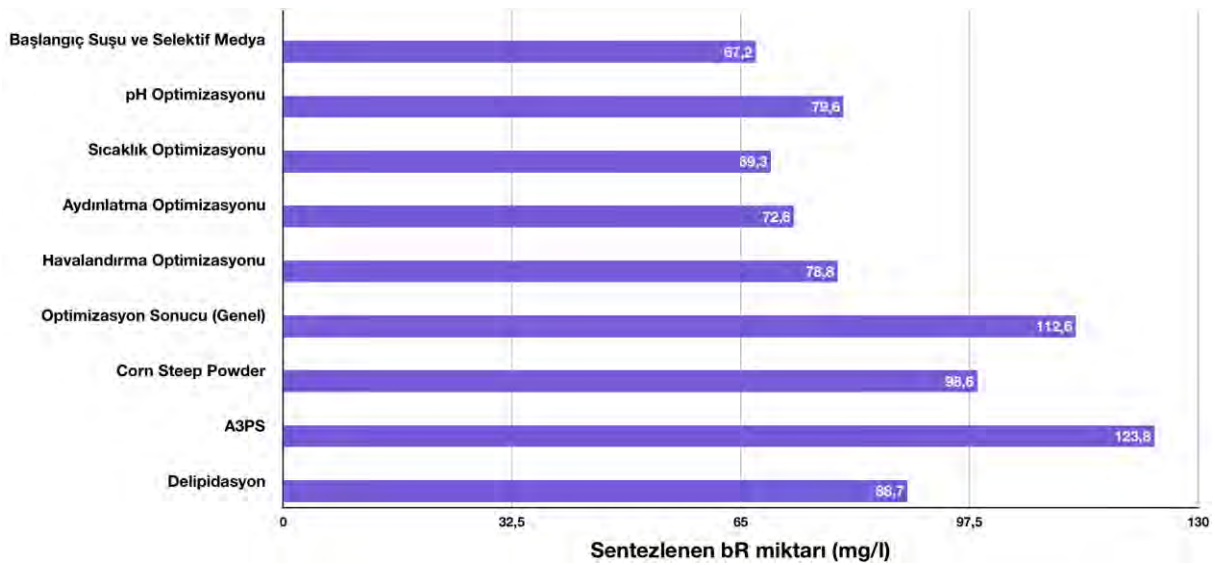


Şekil 72. Optimum havalandırma şartlarının araştırıldığı çalışmada bR sentezlerinin hücre gelişimlerine oranları. bR sentezinin halofilik arke oksijen stresine girdiğinde iyileştiği görülmektedir.

Tüm kùltivasyon faktörlerinin ayrı ayrı belirlenmesiyle gerçekleştirilen optimizasyon işlemlerinin sonucunda; bR sentezinin optimum şartlarının 38 °C, 60 W, pH 7,8 olduğu belirlenmiştir. Sukroz, glukoz, fruktoz gibi C kaynaklarından ziyade, meat ekstrakt, pepton, casamino asit, tripton gibi kompleks C-N kaynakları kullandığı belirtilen *H.salinarum*'un gelişiminde en verimli besin kaynağının yeast ekstrakt ve bR sentezinde en verimli besin kaynağının ise bakteriolojik pepton olduğu gözlemlenmiştir. Yeast extract kullanılan besiyeri ortamının bR üretimi açısından oldukça düşük olduğu kaydedilmiştir. Buna sebep olan durumun yeast ekstraktın yüksek besin değerlerinden dolayı *H. salinarum*'da bR üretimini tetikleyecek stresi oluşturmaması olduğu tahmin edilmektedir. Buna karşın; Ghasemi *et al.* (2008) tarafından *H. salinarum* ve bR sentezinin optimizasyonu çalışmasında en verimli kaynağın yeast olduğu, yine başka bir çalışmada ise meat pepton kullanılan besiyeri ortamından en iyi bR üretim veriminin alındığı belirtilmiştir (Ghasemi *et al.* 2008; Seyedkarimi *et al.* 2015). *H. salinarum* 'un farklı çalışmalarda farklı gelişim sonuçları göstermesi, daha önce bahsedildiği üzere kararsız bir yapıya sahip olduğunu, kùltivasyon süreçlerinin zorluğunu ve bu sebeple optimizasyon işlemlerinin önemini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca havalandırma ve aydınlatma şartlarının korelatif etkisinin araştırıldığı deneyde; en verimli ortamın aydınlatmalı/havalandırılmalı ortam olduğu gözlemlenmesine rağmen, bR sentezinin kùltür gelişimine kıyasla daha yüksek olduğu ortamın aydınlatmalı/havalandırmasız ortam olduğu sonucuna varılmıştır. Bu durumun ortamda yaşanan oksijen stresinin bR üretiminin artışına sebep olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. bR'nin halofilik arkeler tarafından oksidatif şartlar tükendiğinde sentezlendiği yukarıda da bahsedildiği üzere literatürde diğer araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (El-Sayed *et al.* 2002; Kalenov *et al.* 2016). Optimum olarak belirlenen faktörler (38 °C, 60 W, pH 7,8) ile yapılan inkübasyon sonucunda; 112,6 mg/L bR üretimi gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon öncesinde gerçekleştirilen ilk inkübasyonda; 67,2 mg/L bR elde edildiği göz önüne alındığında üretimin %67,6 oranda arttığı belirlenmiştir.

Çalışmanın tüm aşamalarında bR izolasyon işlemleri ATPS metodu ile gerçekleştirilmiştir. bR saflaştırılmasında sukroz gradyant tekniği (SGU), yaygın kullanılan bir metod olmasına rağmen uzun işlem süresi, uygulama zorluğu ve yüksek maliyeti caydırıcı bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Öte yandan batmazlık yoğunlukları arasındaki farka dayalı olması sebebiyle sukroz gradyant tekniği ile temelde aynı mantığa sahip sıvı iki fazlı sistem (ATPS) tekniği, nispeten daha kolay aşamaları ve düşük maliyetinden dolayı çalışmamızda standart izolasyon prosedürü olarak kullanılmıştır. ATPS'ye ek olarak, bR saflaştırılmasında kullanılan başka bir metod olan tek adımda sıvı üç fazlı sistem (A3PS) tekniği de araştırmamızda uygulanmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen bR miktarı; 123,8 mg/L olarak

ölçülmüştür. Sonuç olarak; en iyi verimin A3PS metodu ile alındığı gözlemlenmiştir. Literatürde A3PS kullanılan bir başka çalışmada da benzer bir şekilde A3PS ile izole edilen bR miktarının ATPS ile elde edilen miktardan daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bunun sebebinin ATPS tekniğinde kullanılan tekrarlı yıkama işlemlerinde bR ürün veriminde bir miktar zayıflık meydana getirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Shiu *et al.* 2014). Her iki metotta da santifüj işleminden sonra, fazlar arasında zar halinde bir araya gelen bR'nin toplanması işlemin en zorlayıcı kısmını teşkil etmektedir. Bu açıdan daha dar test tüplerinde veya Eppendorf tüplerinde işlemin yürütülmesi daha avantajlı olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma süresince hidroksilamin metodu vasıtasıyla hesaplanan elde edilen bR miktarları Şekil 73.'te gösterilmiştir.



Şekil 73. Optimizasyon işlemleri süresince elde edilen bR miktarları

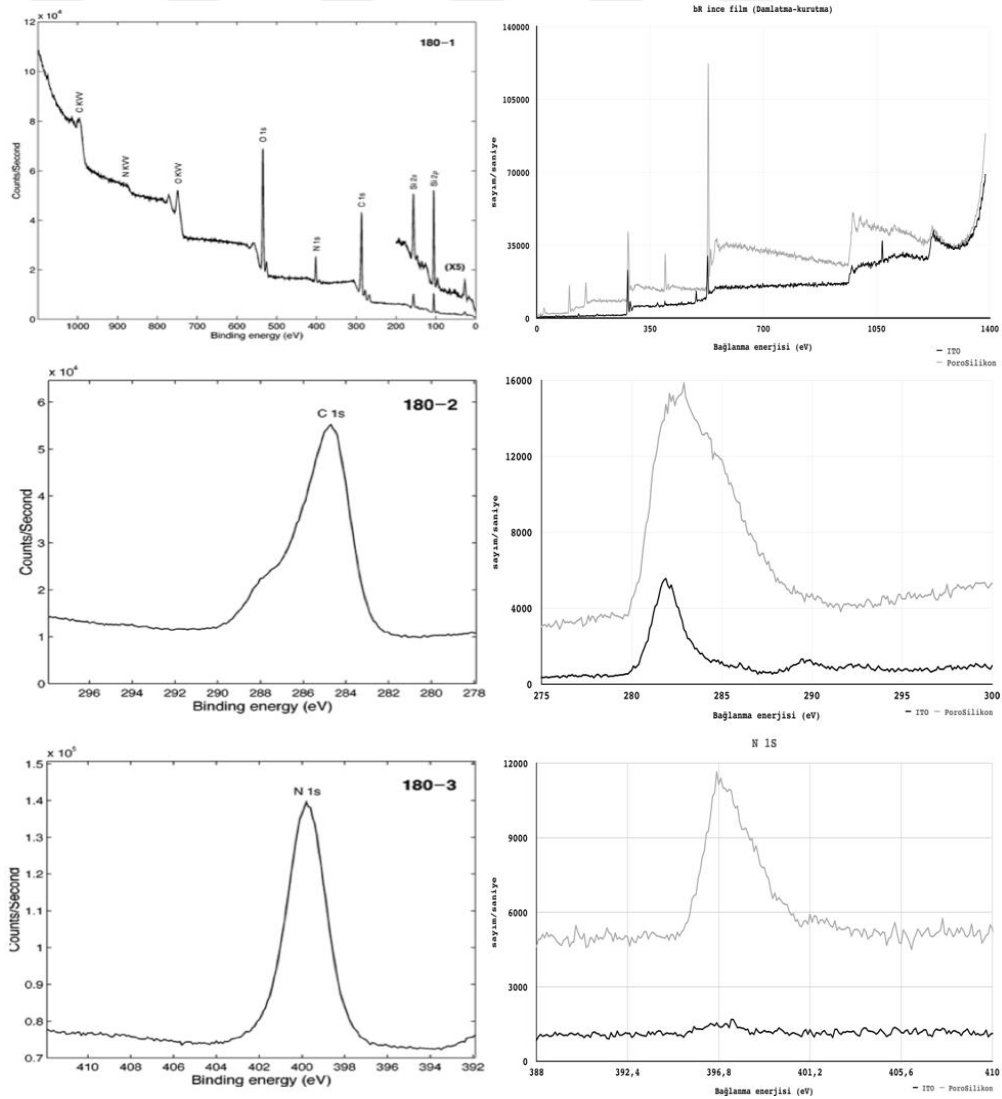
Saflaştırılan bR'nin lipidlerinden arındırılması, CHAPS deterjan solüsyonu ile delipidasyon işlemine tabi tutulması vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. İşlemden önce 112,6 mg/L olarak miktarı bilinen bR'nin delipidasyondan sonra 88,7 mg/L olduğu gözlemlenmiştir. Burada yaşanan %21,23'lük düşüşün yıkama işlemi ve elimine edilen lipidlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Delipidasyon işleminin sonucunda elde edilen bR'nin, delipide edilmeyen bR'lerle birlikte saflığı, absorbans verileri üzerinden; $bR \text{ saflık (\%)} = \frac{A_{560}/A_{280}}{0.5}$ denklemi vasıtasıyla ölçülmüştür (Shiu *et al.* 2013). Bunun sonucunda; ATPS; %94,05, A3PS; %93,47 ve delipide bR; %98,4 saflığa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Diğer araştırmacılar tarafından elde edilen saflık sonuçları; ATPS tekniği ve mikroakışkan araç (ILTPS) kullanılan çalışmada %94,76 (Huh *et al.* 2010), ATPS-SGU teknikleri kullanılan çalışmada sırasıyla 94,1 ve 96,7 (Shiu *et al.* 2013), A3PS ve ATPS kullanılan çalışmada %92 (Shiu *et al.* 2014) olarak rapor edilmiştir. Bunların yanısıra literatürde; $\frac{A_{280}}{A_{568}} \leq 1.5$, $\frac{A_{568}}{A_{280}} \geq 0.45$ şeklinde saflık formülasyonları da

bulunmaktadır (Becher and Cassim 1975; Miercke *et al.* 1989; Huh *et al.* 2010). $\frac{A_{280}}{A_{568}} \leq 1.5$ formülü doğrultusunda çalışmamızda ulaşılan saflık sonuçları; ATPS; 2,12, A3PS; 2,14, delipide bR; 2,05 olarak hesaplanmıştır. Bahsedilen formülün kullanıldığı Becher and Cassim (1975) tarafından yapılan çalışmada; 1,5, Miercke *et al.* (1989) tarafından yapılan çalışmada; 1,56 olarak belirtilmiştir. Son olarak; $\frac{A_{568}}{A_{280}} \geq 0.45$ formülüne göre elde edilen sonuçlar; ATPS; 0,470, A3PS; 0,467, delipide bR; 0,486 olarak belirlenmiştir. Huh *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada kullanılan formül ışığında rapor edilen bR saflığı; 0,435-0,485'tir. Saflaştırılan bR'nin moleküler ağırlık analizi, SDS-Page jel elektroforez işlemi vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; ~27 kDa'da tek bant oluşturan bR'nin literatürde bulunan birçok çalışma ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Stockenius *et al.* 1979; Hampp 2000; Shiu *et al.* 2014).

Çalışmamızda ITO üzerine damlatma-kurutma ve elektroforetik sedimantasyon yöntemleri ile yapılan immobilizasyon işlemlerinin X-ışını kırınım (XRD) analizi sonucunda elde edilen verilere göre; 9,1 ve 12,61'de şiddetli pikler gözlemlenmiştir. 9,1 için Miller indisleri (hkl) (100), 12,61 için ise (-101) yöneliminde veriler elde edilmiştir. Kristal yapısı monoklinik olup örgü sabitleri, a= 9,59, b=5,080, c=8,72 olduğu saptanmıştır (Şekil 49). Literatürde bR'nin yapısal olarak incelendiği bir çalışmada; proteinin kristalin yapısının ortorombik olduğu belirtilmiştir (Michel *et al.* 1980). Solüsyon halinde alınan başka bir ölçümde; 63 Å boyutunda iki boyutlu kristalin yapıya sahip heksagonal kafeslerden oluşan yapısı kaydedilmiştir (Henderson 1977). Bir başka çalışmada ise bR'nin 2-D kristalin yapısının başka kimyasal içeriklerle bir araya gelmesi sonucunda monoklinik bir 3-D kristalin yapıya dönüştüğü rapor edilmiştir (Essen *et al.* 1998). Ayrıca monoklinik ve ortorombik kristalin yapıların birbirleri ile olan yakın benzerliği ya da bir başka deyişle aralarındaki kabul edilir düzeyde olan farkın izolasyon tekniği, deterjan kullanımı (monomerizasyon), immobilizasyon gibi dış etkenlerden dolayı olabileceği düşünülmektedir (Takeda *et al.* 1998).

İzolasyon işlemlerinin ardından bR'nin ITO ve porosilikon alttaşları üzerine immobilizasyonunun araştırılması amacıyla X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile alttaşların yüzey element analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre; bR'nin yüzey üzerindeki varlığı gözlemlenmiştir. ITO üzerine immobilize edilen bR ince filmi C, N, O elementlerine ait 1s bağlanma enerjileri sırasıyla; 281,9; 397,4; 528,9 porosilikon üzerine immobilize edilen bR ince filminde ise sırasıyla; 282,9; 396,7; 530,2 olarak ölçülmüştür. Brizzolara *et al.* (1995) tarafından yapılan çalışmada bR, SiO₂ üzerine immobilize edilmiş ve yüzey analizi XPS vasıtasıyla gerçekleştirilerek, C 1s için; 284,6 N 1s için 399,7 olarak rapor edilmiştir. Şekil 74.'te karşılaştırmalı olarak gösterilen spektrum grafiğine bakıldığında elde

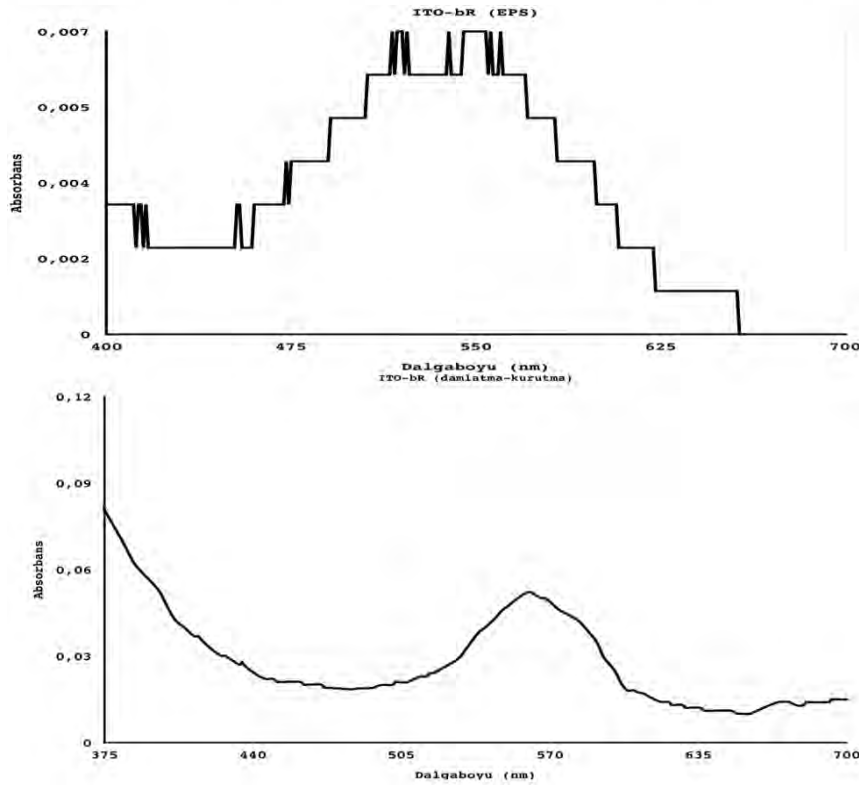
edilen sonuçlar önemli oranda benzer nitelikte olup bR veya mor membrana ait spesifik bir XPS grafiği elde edilmiştir. Brizzolara *et al.* (1995)'un raporuna göre; C 1s'de oluşan pik mor membrandan, N 1s'de oluşan pik ise bacteriorhodopsinden dolayı oluşmaktadır. Yakın sonuçlar Li *et al.* (2020) ve Akhavan (2014) tarafından yapılan çalışmada da kaydedilmiştir. Çalışmamızda gerçekleştirilen XPS ölçümlerinde ayrıca, ITO ve porosilikon dolayısıyla oluşan pikler de gözlemlenmiştir. ITO'da indiyum 3d'ye ait bağlanma enerjisinin 448, kalay 3d'ye ait bağlanma enerjisinin 493 olduğu gözlemlenmekle birlikte, Georgieva *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada 444 ve 488 noktalarında pikler olduğu belirtilmiştir. Porosilikonda ise silisyum 2p'nin bağlanma enerjisine ait pik (101) elde edilen grafiklerde görülmektedir. Jensen *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada Si 2p bağlanma enerjisinin 99,5 olduğu kaydedilmiştir. Elde edilen grafikler ışığında; damlatma-kurutma tekniği ile porosilikona immobilize edilen bR ince filminin ITO üzerine edilenden miktar olarak daha fazla olduğu düşünülmektedir.



Şekil 74. (a) Brizzolara *et al.* (1995) tarafından yapılan çalışmada elde edilen XPS sonuçları. (b) Çalışmamızda elde edilen XPS sonuçları.

Ayrıca EPS tekniği ile üretilen ITO-bR ve porosilikon-bR ince filmlerinin Raman spektroskopisi ile de yapısı incelenmiştir. Buna göre 1400-1600 cm^{-1} arasında C=C; polyene zincirine, 1100-1200 cm^{-1} arasında C-C; parmak izine ve özellikle 1639 cm^{-1} 'de C=N; *Schiff* bazına ait pikler literatürdeki diğer çalışmalarla da uygunluk göstermekte olup oluşturulan ince filmlerdeki bR'nin varlığını ortaya koymaktadır (Hsieh 1981; Brown *et al.* 1997; Alsafadi *et al.* 2018; Mei *et al.* 2018). Elde edilen veriler arasındaki yoksanabilir farklılıklar saflaştırma aşamasında bR ile büyük benzerlikler gösteren karotenoidlerin ortamdaki elimine edilememesi veya halofilik arke türünün farklılığından kaynaklanabilmektedir (Marshall *et al.* 2007).

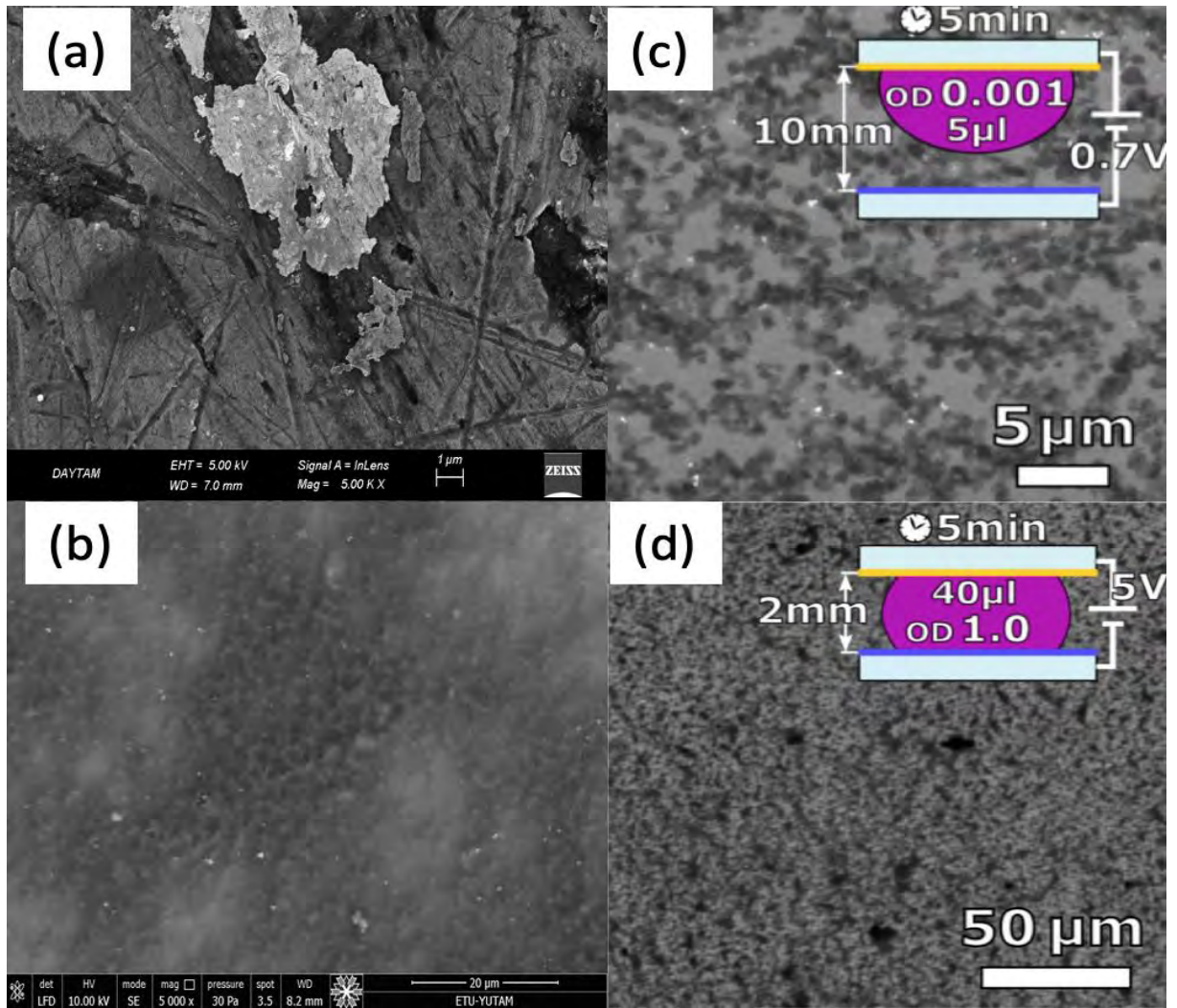
ITO alttaşı üzerindeki bR varlığı ayrıca ultraviyole soğurma (UV-VIS NIR) ölçümleri ile de analiz edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda ITO alttaşı üzerine damlatma-kurutma ve elektroforetik sedimantasyon teknikleri ile immobilize edilen bR'ye ait retinalin 560-570 nm arası gerçekleşen karakteristik absorbans doruğu literatürde bR'nin en çok bahsedilen özelliklerinden birisidir (Frydrych *et al.* 2000; Hampp 2000; Ghasemi *et al.* 2008; Ma *et al.* 2010; Knoblauch *et al.* 2014; Jeganathan *et al.* 2019). Elde edilen verilere göre; ITO üzerinde EPS tekniği ile üretilen bR ince filmine ait absorbans sonuçlarının, damlatma-kurutma tekniği ile elde edilen bR ince filmine ait sonuçlarla kıyaslandığında, EPS ile oluşturulan katman sayısının daha az ve daha düzenli organize olduğu düşünülmektedir (Şekil 75.). Bu durum EPS tekniğinin bR moleküllerinin yönlendirilmesini sağladığının bir göstergesidir.



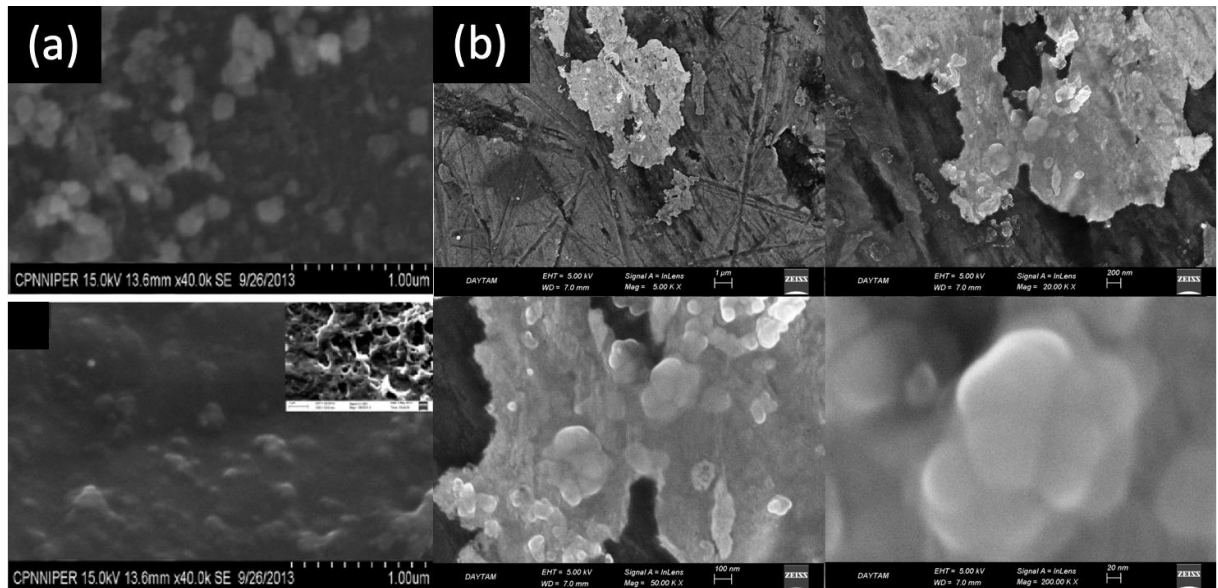
Şekil 75. (a) EPS ve (b) damlatma-kurutma teknikleri ile üretilen bR ince filmlerine ait UV-VIS NIR grafikleri

Profilometri vasıtasıyla gerçekleştirilen yüzey analizinde, boş ITO ve porosilikon yüzeyleri ve depozisyon gerçekleştirilmiş ITO ve porosilikon yüzeyleri incelenmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında, yüzeydeki en yüksek ve en düşük noktaların arasındaki mesafeyi belirten (R_t) değeri boş ITO'da 2115,9 nm iken, EPS ile bR immobilize edilen ITO'da 7280 nm ve damlatma kurutma tekniği ile bR immobilize edilen ITO'da 8303,6 nm olduğu gözlemlenmiştir. Buna göre; ITO ve porosilikon yüzeyinde bR'nin immobilizasyonunun başarıyla sonuçlandığı görülmektedir. Buna ek olarak, bR-EPS ince filmine ait yüzey pürüzlülüğü (R_a) değeri, 122,9 nm iken bR-damlatma-kurutma ince filmine ait R_a değeri 143,4 nm olarak ölçülmüştür. Veriler EPS ile oluşturulan bR ince filminin daha düzenli organize olduğunu göstermektedir.

Elektroforetik sedimantasyon ile ITO alttaş üzerine immobilize edilen bR ince filmlerinin yüzey görüntüsü taramalı elektron mikroskobu (SEM) vasıtasıyla alınmıştır. Bakır elektrotu ile beher içerisinde gerçekleştirilen immobilizasyon işlemine ait görüntülerde PM'nin ITO yüzeyinde yama şeklinde bir film oluşturduğu görülmektedir (9V, elektrotlar arası mesafe ≈ 15 mm). Platin elektrotu ile el yapımı elektroforez küveti içinde gerçekleştirilen ince filmlere ait görüntülerde ise yüzeyin daha iyi bir şekilde kaplandığı düşünülmektedir (9V, elektrotlar arası mesafe ≈ 2 mm). Riedel *et al.* (2021) tarafından yapılan, PM'nin EPS tekniği ile karbon nano membran (CNM) üzerine immobilize edildiği çalışmada da farklı depozisyon parametreleri kullanılarak farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Buna göre; elektrotlar (CNM, ITO) arasındaki mesafenin 10 mm olduğu ve voltajın 0,7 V olduğu immobilizasyon işleminde bR'nin yüzeyi tamamen kaplamadığı, aradaki mesafenin 2 mm'ye düşürülüp voltajın 5 V'a çıkarıldığı immobilizasyon işleminde daha iyi bir kaplama gerçekleştiği ve yönlendirmenin daha iyi olduğu belirtilmiştir (Şekil 76.). Ayrıca çalışmamızda alınan SEM görüntülerinin, literatürde bulunan başka bir çalışmada ZnO üzerine immobilize edilen bR ile kıyaslaması Şekil 77.'da gösterilmiştir (Kumar *et al.* 2016). Buna ek olarak saflaştırılan bR solüsyonu ile alınan geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri incelendiğinde, bR'nin bazı noktalarda agregat veya misel halinde olduğu tahmin edilmektedir. Bu durumun sebebinin saflaştırma aşamasında kullanılan tampon ve deterjanlar olabileceği düşünülmektedir (Ma *et al.* 2010; Chon and Chu 2013).

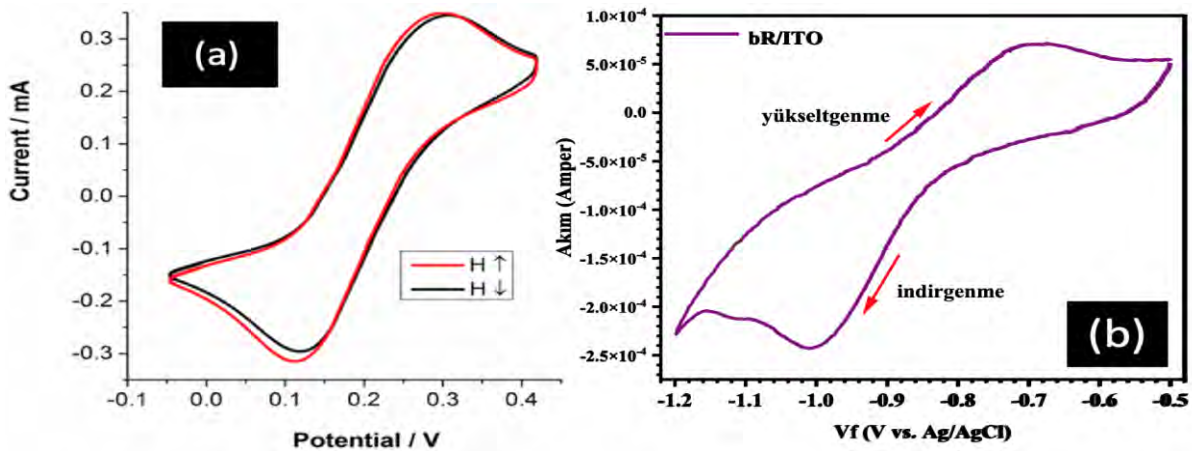


Şekil 76. (a) Bakır elektrot ile beherde immobilize edilen bR ince filmine ait SEM görüntüsü, (b) Platin elektrot ile el yapımı elektroforez tankında immobilize edilen bR ince filmine ait SEM görüntüsü, (c,d) Riedel *et al.* (2021) tarafından yapılan ITO'nun elektrot olarak kullanıldığı çalışmada CNM üzerine farklı parametrelerde immobilize edilen PM ince filmlerine ait SEM görüntüleri.



Şekil 77. (a) ZnO üzerine immobilize edilen bR'nin SEM görüntüsü (Kumar *et al.* 2016), (b) çalışmamızda ITO üzerine immobilize edilen bR'nin SEM görüntüsü.

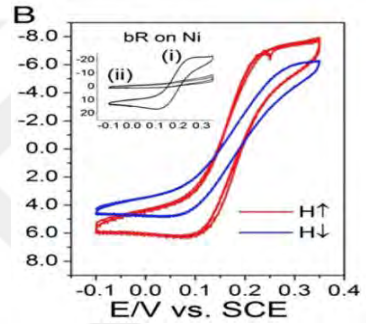
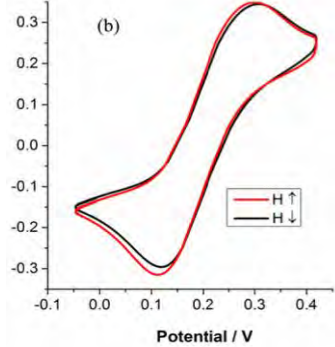
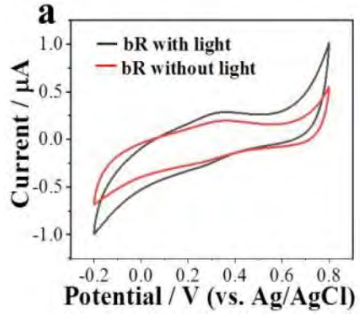
Son olarak çalışmamızda 0,75 mM fosfat tamponu KH_2PO_4 pH 6,9 ile süspansiyon edilen bR ile ITO ve porosilikon üzerinde elektroforetik sedimantasyon ve damlatma-kurutma yöntemi ile immobilize edilen ince filmlerin, elektrot yüzeyinde adsorbsiyonun varlığını ölçmek için başvurulan yöntemlerden biri olan dönüşümlü voltametre (CV) ölçümleri ile elektroaktivitesi incelenmiştir (Aydar 2019). Retinalin görünür ışıktaki 570 nm dalgaboyunu absorbe ederek uyarılması ile birlikte proton pompalama işleminin gerçekleşmesini sağlayan yapısal değişim sonucunda bir voltaj potansiyeli oluşturulmaktadır. bR'nin iletken materyaller ile bir araya getirilmesi sonucunda doğada bulunduğu halden daha verimli bir elektrik potansiyeli geliştirmesine imkan tanımaktadır (Winder *et al.* 2008). El yapımı elektrokimyasal kuvvetler içerisinde, 50 mV/sn tarama hızı ile 25 °C oda sıcaklığında aydınlatma altında gerçekleştirilen taramada elde edilen voltamogram verilerine göre; bR ile alttaş arasında elektron transferi gerçekleştiği ve yüzeyde bir katman oluşturduğu anlaşılmaktadır. bR'nin fotodöngüsünde ilk meydana gelen olayın polyene zincirindeki elektron taşınımı olduğu bilinmektedir (Birge *et al.* 1999). Li *et al.* (2020) tarafından yapılan bR bazlı süperkondansatör cihaz üzerinde yapılan çalışmada, bR ince filmi Au elektrot üzerine immobilize edilmiş ve ince filmin proton pompalama kapasitesi, biyolojik iletkenliği ve film-elektrot arasındaki elektron taşınımının incelenmesi için CV ölçümleri alınmıştır (Li *et al.* 2020). Bir başka çalışmada ise; bR Ni üzerine immobilize edilerek elektrokimyasal özellikleri araştırılmıştır. bR çift katmanıyla yüzeyi tamamen kaplı Ni elektrotu üzerinde elektronların yüzeydeki redoks çifti ile arasındaki geçişinde kısıtlanma meydana geldiği, buna karşın yüzeyin tamamen kaplanmadığı filmde ise elektronların redoks çiftleri ile arasında daha kısa mesafe olduğu ve bundan dolayı daha iyi elektron taşınımı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ve çalışmamızda alınan CV voltamogramları karşılaştırmalı olarak Şekil 77.'de gösterilmiştir (Einati *et al.* 2015). Tablo 28.'de literatürde bulunan diğer CV çalışmaları gösterilmiştir.



Şekil 78. (a) Einati *et al.* (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada alınan CV voltamogramı, (b) 10 mM fosfat tamponu KH_2PO_4 pH 7,1 eklenmiş 100 mM Na_2SO_4 elektrolit içerisinde yürütülen çalışmamızda gerçekleştirilen ölçüm sonucunda alınan CV voltamogramı.

Çalışmamızda çalışan elektrot (alttaş) olarak ITO ve porosilikon, elektrolit çözelti olarak KH_2PO_4 kullanılırken, Einati *et al.* (2015) tarafından çalışmada; Ni alttaş ve 50 mM NaCl içeren 10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane) (TRIS) pH 9 çözeltisi elektrolit olarak kullanılmıştır. Li *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmada ise Au alttaş üzerine immobilize edilen bR'nin CV ölçümü 5 mV/s tarama hızında 1.0 M $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ pH 5 elektrolit çözelti içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar arasında gözlemlenen potansiyel farkının alttaşlar arasındaki iletkenlik farkları, farklı elektrolit çözelti kullanımı, CV parametreleri gibi faktörlerden kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir.

Tablo 28. CV Ölçümü Gerçekleştirilen Literatürdeki Diğer Çalışmalara Ait Bilgiler

Literatürde CV ölçümü yapılan diğer çalışmalar	Alttaş	Kullanılan elektrolit	Ölçüm parametreleri	CV Voltamogramı
Mishra <i>et al.</i> (2013) Spin-dependent electron transmission through bacteriorhodopsin embedded in purple membrane	Nikel	TRIS içeren, 50 mM NaCl, 50 mM MgCl_2 pH 7,0	-0.05 V ile +0.35 V arasında 50 mV/s tarama hızı	
Einati <i>et al.</i> (2015) Light-Controlled Spin Filtering in Bacteriorhodopsin	Nikel	50 mM NaCl içeren 10 mM TRIS pH 9	-0,05 V ile +0,4 V arasında tarama hızı belirtilmemiş	
Li <i>et al.</i> (2020) Oriented Bacteriorhodopsin/Polyaniline Hybrid Bio-Nanofilms as Photo-Assisted Electrodes for High Performance Supercapacitor	Altın	1.0 M $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ pH 5	-0,2 V ile 0,8 V arasında 5 mV/s tarama hızı	

Çalışmamızda teknolojik ve ekonomik açıdan oldukça önemli bir biyomateryal olan bacteriorhodopsinin üretim şartlarının optimizasyonu ve saf bR'nin farklı altaşlara immobilizasyonu hedeflenmiştir. Kültivasyon-optimizasyon ve immobilizasyon-karakterizasyon olarak sınıflandırabileceğimiz, iki ana aşamada gerçekleştirilen araştırma sürecinde ilk olarak, Tuz Gölü'nden alınan kültürler saflaştırılarak genomik identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen saf izolatlar arasında bR sentezi açısından en verimli *H. salinarum* suşu olduğu saptanan NES5 izolatı optimizasyon işlemlerinde başlangıç suşu olarak tayin edilmiş ve tüm optimizasyon deneyleri bu izolat üzerinden gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın başlangıcında 67,2 mg/l olarak kaydedilen bR sentezi, optimizasyon işlemlerinin ardından 112,6 mg/l'ye yükselmiştir. Yarı-havalandırma (kültür şişe kapakları 3. günden itibaren kapalı), 38 °C, 60 W, pH 7,8 olarak saptanan optimum şartlara ek olarak, bR sentezi açısından en verimli besin kaynağının pepton olduğu gözlemlenmiştir. Sıvı iki fazlı sistem (ATPS) ve sıvı üç fazlı sistem (A3PS) olmak üzere iki farklı bR izolasyon tekniği ürün verimi açısından değerlendirilmiştir. 123,8 mg/l bR elde edilen A3PS tekniğinde daha yüksek biyomateryal üretimi gerçekleştirilmiş olmasına karşın, ATPS tekniği daha pratik deney aşamalarına sahip olmasından dolayı çalışma boyunca tüm saflaştırma işlemlerinde kullanılmıştır. Buna ek olarak çalışmanın tüm aşamalarında bR üretim miktarları hidroksilamin metodu aracılığıyla belirlenmiştir. Saflaştırılmış olan bR, teknik araştırma ve araçlarda kullanılabilirliğinin artırılması maksadıyla ITO ve porosilikon altaşlara, elektroforetik sedimantasyon ve damlatma-kurutma teknikleri ile immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon işlemlerinin başarısının tespit edilmesi amacıyla; X-ışını kırınımı, X-ışını fotoelektro spektroskopisi, Raman spektroskopisi, Ultraviyole-görünür-yakın kızılötesi spektroskopisi, profilometri, dönüşümlü voltametri teknikleri vasıtasıyla karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan tüm karakterizasyon ölçümleri ve görüntülemelerin sonucunda; Tuz Gölü'nden alınan halofilik arke suşlarının izolasyonu, bu izolatlardan bR sentezi ve sentezlenen bu proteinin teknolojik çalışmalarda kullanıma uygun ürün haline getirilmesinin mümkün olduğu, yapılacak yeni araştırma ve projeler sayesinde aktif üretime geçilebilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Bu açıdan, ülkemizde doğal bir kaynak olarak hali hazırda bulunan ve biyoteknolojik açıdan büyük öneme sahip olan bir nanobiyomateryalin kullanılabilir ve sürdürülebilir hale getirilmesi ve bu sayede ekonomik bir potansiyel oluşturulmasını hedefleyen çalışmamız amacına ulaşmış olmakla birlikte, bR'nin ticari üretimi hususunda bir uygulanabilirlik araştırması özelliği taşımaktadır. Bunun yanı sıra; mikrobiyoloji, fizik, kimya ve mühendislik alanları ile multidisipliner bir şekilde yürütülen bu çalışma, bu konuda yapılacak diğer çalışmaların da öncülü niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- Aboughanem, F., 1993. Bacteriorhodopsin production from growth optimized *Halobacterium halobium* using percoll. MS Thesis. University of Massachusetts Lowell
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı termal tesislerden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. Doctoral Dissertation, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Ahmadi, M., Yeow, J. T. W., 2011. Fabrication and characterization of a radiation sensor based on bacteriorhodopsin. *Biosens. Bioelectron.* 26, 2171-2176
- Akbari, M., Moleirad, A., Khavari-Nejad, R. A., 2017. Monolayer immobilization of bacteriorhodopsin on modified polycarbonate surface by using of Langmuir-Blodgett technique. *Macromol. Res.* 25 (10), 976-980
- Akçan, R., 2021. Tükürükte eroin ve metabolitlerinin toksikolojik analizinde yeni bir analitik gereç olarak yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi. Doctoral Dissertation. Biyomühendislik Anabilim Dalı. Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- Akdağ, A., 2020. Boya duyarlı güneş gözelerinde karşıt elektrot olarak kullanılan tek tabaka grafen üzerinde büyütülmüş CuInSe₂ ince filmlerinin karakteristiklerinin incelenmesi. Doctoral Dissertation. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Al-Arife, K. M., Knopf, G. K., Bassi, A. S., 2011. Photoelectric monolayers based on self-assembled and oriented purple membrane patches. *J. Microelectromech. Syst.* 20 (4), 800-810
- Al-Arife, K. M., Knopf, G. K., Bassi, A. S., 2013. Organic photovoltaic cells based on photoactive bacteriorhodopsin proteins. *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XI. Proc. Of SPIE.* 8615, 8615Q-1
- Alaylar, B., 2017. Toprak bakterilerinin PGPR özelliklerinin araştırılmasında PCR temelli moleküler tekniklerin uygulanması. Doctoral Dissertation. Atatürk Üniversitesi. Erzurum
- Allam, N. K., Yen, C. W., Near, R. D., El-Sayed, M. A., 2011. Bacteriorhodopsin/TiO₂ nanotube arrays hybrid system for enhanced photoelectrochemical water splitting. *Energy Environ. Sci.* 4, 2909-2914
- Alsafadi, D., Khalili, F. I., Juwhari, H., Lahlouh, B., 2018. Purification and biochemical characterization of photo-active membrane protein bacteriorhodopsin from *Haloarcula marismortui*, an extreme halophile from the Dead Sea. *Int. J. Biol. Macromol.* doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.045
- Anton, C. M., 2008. Photolithography based patterning of bacteriorhodopsin films. Doctoral Dissertation. Michigan Technological University
- Atlas, R.M., 2010. Handbook of Microbiological Media, ASM Press, CRC Press Taylor & Francis Group, 786
- Aydar, S., 2019. Modifiye karbon pasta elektrotlar kullanılarak bazı kozmetik ürünlerde kullanılan maddelerin voltametrik tayini. Doctoral Dissertation. İstanbul Üniversitesi. İstanbul

- Becher, B. M., Cassim, J. Y., 1975. Improved isolation procedures for the purple membrane of halobacterium halobium. *Prep. Biochem.* 5(2), 161-178
- Birge, R. R., Gillespie, N. B., Izaguirre, E. W., Kusnetsow, A., Lawrence, A. F., Singh, D., Song, Q. W., Schmidt, E., Stuart, J. A., Seetharaman, S., Wise, K. J., 1999. Biomolecular electronics; Protein-based associative processors and volumetric memories. *J. Phys. Chem. B.* 103, 10746-10766
- Bohari, N. A., Siddique, S., Saallah, S., Misson, M., Arshad, S. E., 2020. Optimizastion and analytical behavior of electrochemical sensors based on the modification of indium tin oxide (ITO) using PANI/MWCNTs/AuNPs for mercury detection. *Sensors.* 20 (6502) 1-17
- Brizzolara, R. A., Boyd, J. L., Thorne, R. E., Tate, A. E., 1995. Purple membrane by x-ray photoelectron spectroscopy. *Surf. Sci. Spectra.* 3(2), 169-174
- Brown, L. S., Kamikubo, H., Zimanyi, L., Kataoka, M., Tokunaga, F., Verdegem, P., Lugtenburg, J., Lanyi, J. K., 1997. A local electrostatic change is the cause of the large-scale protein conformation shift in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5040-5044
- Brown, T. A., 2006. Gen Klonlama ve DNA analizi: Giriş. 5. Basımdan Çeviri. Nobel Akademik Yayınları. Ankara. 396 s
- Chen, D., Lu, Y., Sui, S., Xu, B., Hu, K., 2003. Oriented assembly of purple membrane on solid support, mediated by molecular recognition. *J. Phys. Chem. B.* 107, 3598-3605
- Chen, H. M., Jheng, K. R., Yu, A. D., 2017. Direct, label-free, selective, and sensitive microbial detection using a bacteriorhodopsin-based photoelectric immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* 91, 24-31
- Choi, H. G., Min, J., Choi, J. W., Lee, W. H., 1998. Molecular photoreceptor consisting of bacteriorhodopsin/flavin complex Langmuir-Blodgett films. *Biosens. Bioelectron.* 13, 1069-1075
- Choi, H. G., Jung, W. C., Min, J., Lee, W. H., Choi, J. W., 2001. Color image detection by biomolecular photoreceptor using bacteriorhodopsin-based complex LB films. *Biosens. Bioelectron.* 16, 925-935
- Chon Ng, K., Chu, L. K. 2013. Effects of surfactants on the purple membrane and bacteriorhodopsin: solubilization or aggregation? *J Phys Chem.* 117, 6241-6249
- Chu, J., Li, X., Tang, J., 2005. Studies on poly(ethylenimine)/purple membrane multilayer films fabricated by layer-by-layer self-assembly. *Colloids and Surfaces A: Physiochem. Eng. Aspects.* 257-258, 41-45
- Chu, J., Li, X., Zhang, J., Tang, J., 2003. Fabrication and photoelectric response of poly(allylamine hydrochloride)/PM thin films by layer-by-layer deposition technique. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 305, 116-121
- Curnow, P., 2009. Membrane proteins in nanotechnology. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 643-652.
- Çakıcı, Ö., 2004. Tuz Gölünden İzole edilmiş Halobacterium salinarum Suşunun Biyokimyasal ve Genetik Karakterizasyonu. Master Thesis, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Danks, P. H., 2001. Electrochemical modulation of the optical properties of bacteriorhodopsin. MS Thesis. Department of Chemistry. Carleton University. Ottawa, Ontario

- Dêr, A., Fabiân, L., Valkai, S., Wolff, E., Ramsden, J., Ormos, P., 2006. Integrated optical devices using bacteriorhodopsin as active nonlinear optical material. *Proc of SPIE*. 6331, 19
- Dyall-Smith, M., 2008. The Halohandbook, Protocols for haloarchaeal genetics, Ver. 7.0. <http://www.haloarchaea.com> (Mar 2008)
- Einati, H., Mishra, D., Friedman, N., Sheves, M., Naaman, R., 2015. Light-controlled spin filtering in bacteriorhodopsin. *Nano lett.* 15, 1052-1056
- El-Sayed, W. S. M., Takaichi, S., Saida, H., Kamekura, M., Abu-Shady, M., Seki, H., Kuwabara, T., 2002. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids. *Plant Cell Physiol.* 43 (4), 379-383
- Essen, L. O., Siebert, R., Lehmann, W. D., Oesterhelt, D., 1998. Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 11673-11678
- Fard, A. K., Deldar, A. A., Sedaghat, S., 2018. The effect of bacterioruberin deletion on production of bacteriorhodopsin in *Halobacterium salinarum* R1. *J. Pure App. Chem. Res.* 7(1), 39-44
- Fendrihan, S., Legat, A., Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., Weidler, G., Gerbl, F., Stan-Lotter, H., 2006. Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 203-218
- Fischer, T., Neebe, M., Juchem, T., Hampp, N. A., 2003. Biomolecular optical data storage and data encryption. *IEEE T. Nanobiosci.* 2 (1), 1-5
- Frydrych, M., Silfsten, P., Parkkinen, S., Parkkinen, J., Jaaskelainen, T., 2000. Color sensitive retina based on bacteriorhodopsin. *BioSystems.* 54, 131-140
- Galan, J. F. P., 2006. Theoretical studies on structure, function and dynamics of retinal-binding proteins. Doctoral Dissertation. University of Connecticut
- Gao, P. M., 2004. Reversibility of anesthetic-induced conformational and functional changes in the purple membrane. Doctoral Dissertation. L'Universite Du Quebec A Trois-Rivieres
- Gazit, E., Mitraki, A., 2007. Plenty of room for biology at the bottom: An introduction to Bionanotechnology. Imperial College Press Publishings. London. 198 s.
- Georgieva, V., Aleksandrova, M., Stefanov, P., Grechnikov, A., Gadjanova, V., Dilova, T., Angelov, T., 2014. Study of quartz crystal microbalance NO₂ sensor coated with sputtered indium tin oxide film. *J. Phys. Conf. Ser.* 558, 012037
- Ghasemi, M. F., Shodjai-Arani, A., Moazami, N., 2008. Optimization of bacteriorhodopsin production by *Halobacterium salinarum* PTCC 1685. *Proc. Biochem.* 43, 1077-1082
- Grzesiek, S., Dencher, N. A., 1988. Monomeric and aggregated bacteriorhodopsin; single-turnover proton transport stoichiometry and photochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 9509-9513
- Guo, Z., Liang, D., Rao, S., Xiang, Y., 2014. Heterogeneous bacteriorhodopsin/gold nanoparticle stacks as a photovoltaic system. *Nano Energy.* 1-9
- Güllüce, M., Karadayı, M., Barış, Ö., 2013. Bacteriocins: Promising natural antimicrobials. doi:10.13140/2.1.5014.5606

- Güngör, I. D., 2022. Pamuklu kumaş üzerinde yıkanmış kan lekesinin Raman spektroskopisi ve kemometri ile tespiti. Master Thesis. Biyomühendislik Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- Hampp, N., 2000. Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories. *Chem. Rev.* 100, 1755-1776
- Happe, M., Overath, P., 1976. Bacteriorhodopsin depleted of purple membrane lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72 (4), 1504-1511
- He, J. A., Samuelson, L., Li, L., Kumar, J., Tripathy, S. K., 1998. Oriented bacteriorhodopsin/polycation multilayers by electrostatic layer-by-layer assembly. *Langmuir.* 14, 1674-1679
- Heberle, J., 2000. Proton transfer reactions across bacteriorhodopsin and along the membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1458, 135-147
- Henderson, R., 1977. The purple membrane from *Halobacterium halobium*. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 6, 87-109
- Hıdıroğlu, N., 2015. Bakteriyorodopsin üretme potansiyeline sahip halofilik arke *Halobacterium salinarum*'un izolasyonu ve nanobiyomolekül olarak kullanılabilirlik bakteriyorodopsin'in saflaştırılması ve karakterizasyonu. Master Thesis. Atatürk Üniversitesi. Erzurum
- Hillebrecht, J. R., Kosciuleki, J. F., Wise, K. J., Marcy, D. L., Tetley, W., Rangarajan, R., Sullivan, J., Brideau, M., Krebs, M. P., Stuart, J. A., Birge, R. R., 2005. Optimization of protein-based volumetric optical memories and associative processors by using directed evolution. *J. Nanobiotechnology.* 1, 141-151
- Hirai, T., Subramaniam, S., 2009. Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle: Comparison of findings from electron and X-ray crystallographic analyses. *PLOS One.* 4(6), e5769
- Hsieh, C. L., 1981. Resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin: Photoisomerization of retinal in picosecond and nanosecond time scales and hydration effects of purple membrane on film. Doctoral Dissertation. University of California. Los Angeles
- Huang, K. S., Bayley, H., Khorana, H. G., 1980. Delipidation of bacteriorhodopsin and reconstitution with exogenous phospholipid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 323-327
- Hudgins, M. L., 2011. Protein-based disk recording for aerial densities beyond 10 Tbit/in.². Doctoral Dissertation. University of California. Riverside
- Huh, Y. S., Jeong, C. M., Chang, H. N., Lee, S. Y., Hong, W. H., Park, T. J., 2010. Rapid separation of bacteriorhodopsin using a laminar-flow extraction system in a microfluidic device. *Biomicfluidics.* 4, 014103
- Imhof, M., Rhinow, D., Hampp, N., 2014. Two-photon polarization data storage in bacteriorhodopsin films and its potential use in security applications. *Appl. Phys. Lett.* 104, 081921
- İspirli, N. H., Güllüce, M., Karadayı, M., Demir, A. Y., 2019. Culturable bacteriorhodopsin-producing haloarchae of Tuz Lake (Turkey). *Geomicrobiol J.* 36(9), 831-836
- Jeganathan, C., Thamaraiselvi, K., Girisun, T. C. S., 2019. Improved production of bacteriorhodopsin from *Halobacterium salinarum* through direct amino acid supplement in the basal medium. *Extremophiles.* 23, 133-139
- Jensen, D. S., Kanyal, S. S., Madaan, N., Vail, M. A., Dadson, A. E., Engelhard, M. H., Linford, M. R., 2013. Silicon (100)/SiO₂ by XPS. *Surf. Sci. Spectra.* 20, 36-42

- Jussila, T., Li, M., Tkachenko, N. V., Parkkinen, S., Li, B., Jiang, L., Lemmetyinen, H., 2002. Transient absorption and photovoltage study of self-assembled bacteriorhodopsin/polycation multilayer films. *Biosens. Bioelectron.* 17, 509-515
- Kahraman, Ö., 2008. Halofilik mikroorganizmaların izolasyonu, identifikasyonu ve biyoteknolojik öneme sahip ekstraselüler enzimlerin araştırılması. MS Thesis. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir
- Kalenov, S. V., Baurina, M. M., Skladnev, D. A., Kuznetsov, A. Y., 2016. High-effective cultivation of *Halobacterium salinarum* providing with bacteriorhodopsin production under controlled stress. *J. Biotechnol.* 233, 211-218
- Kamwa, J. D., 2014. Photoelectric characterization of bacteriorhodopsin reconstituted in lipid bilayer membrane. MS Thesis. University of Arkansas. Fayetteville
- Kamwa, J. D., 2018. Characterization of bacteriorhodopsin and halorhodopsin reconstituted in lipid bilayer membranes. Doctoral Dissertation. University of Arkansas. Fayetteville
- Kanthimathi, M., Dhathathreyan, A., Nair, B. U., 2000. Langmuir-Blodgett film properties of a donor-acceptor *Schiff* base. *Chem. Phys. Lett.* 324, 43-47
- Karadayı, M., Alaylar, B., Gürkök, S., Karadayı, G., Egamberdieva, D., Güllüce, M., 2021. Extreme thermophilic microorganisms as an unique source of inspiration for next generation biotechnical products. *Microbial Communities and their Interactions in the Extreme Environment.* 207-224
- Khizroev, S., Ikkawi, R., Amos, N., Chomko, R., Renugopalakrishnan, V., Haddon, R., Litvinov, D., 2008. Protein-based disk recording at areal densities beyond 10 Terabits/in.². *MRS Bulletin.* 33, 864-870
- Kirtel, O., 2021. Functional significance of fructan biosynthesis in halophilic archaea and eubacteria. MS Thesis. Marmara University. İstanbul
- Knoblauch, C., Griep, M., Friedrich, C., 2014. Recent advances in the field of bionanotechnology: An insight into optoelectric bacteriorhodopsin, quantum dots, and noble metal nanoclusters. *Sensors.* 14, 19731-19766
- Krishnamani, V., 2010. Structure of partially denatured bacteriorhodopsin in detergent micelles and structural changes during its refolding. Doctoral Dissertation. University of California. Irvine
- Kumar, A. S., Mody, K., Jha, B., 2007. Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J. Basic Microbiol.* 47, 103-117
- Kumar, S., Baghci, S., Prasad, S., Sharma, A., Kumar, R., Kaur, R., Singh, J., Bhondekar, A. P., 2016. Bacteriorhodopsin-ZnO hybrid as a potential sensing element for low-temperature detection of ethanol vapour. *Beilstein J. Nanotechnol.* 7, 501-510
- Lanyi, J. K., 2004. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 665-688
- Lee, S. Y., Chang, H. N., Um, Y. S., Hong, S. H., 1998. Bacteriorhodopsin production by cell recycle culture of *Halobacterium halobium*. *Biotech. Lett.* 20, 763-765
- Li, B., Li, J., Song, Y., Jiang, L., 1995. A study of the improvement of photoelectric responses on a Langmuir-Blodgett film containing bacteriorhodopsin. *Mater. Sci. Eng. C* 3, 219-222
- Li, H., Wang, M., Qi, G., Xia, Y., Li, C., Wang, P., Sheves, M., Jin, Y., 2020. Oriented bacteriorhodopsin/polyaniline hybrid bio-nanofilms as photo-assisted electrodes for high performance supercapacitor. *J. Mater. Chem. A.* Accepted Manuscript

- Li, R., Cui, X., Hu, W., Lu, Z., Li, C. M., 2010. Fabrication of oriented poly-L-lysine/bacteriorhodopsin-embedded purple membrane multilayer structure for enhanced photoelectric response. *J. Colloid Interf. Sci.* 344, 150-157
- Li, Y. T., Tian, Y., Tian, H., Tu, T., Gou, G. Y., Wang, Q., Qiao, Y. C., Yang, Y., Ren, T. L., 2018. A review on bacteriorhodopsin-based bioelectronic devices. *Sensors*. 18, 1368
- Lobasso, S., Lopalco, P., Lattanzio, V. M. T., Corcelli, A., 2003. Osmotic shock induces the presence of glycardiolipin in the purple membrane of *Halobacterium salinarum*. *J. Lipid Res.* 44, 2120-2126
- Lu, S., Guo, Z., Xiang, Y., Jiang, L., 2016. Photoelectric frequency response in a bioinspired bacteriorhodopsin/alumina nanochannel hybrid nanosystem. *Adv. Mater.* 2016, 1-6
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H. T., Cartailler, J. P., Lanyi, J. K., 1999. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 291, 899-911
- Ma, D., Wang, Y., Wu, J., Zhao, Y., Ming, M., Ding J., 2010. Amphiphilic block copolymers significantly influence functions of bacteriorhodopsin in water. *RSC, Soft Matter*. 6, 4920, 4930
- Maccioni, E., Radicchi, G., Erokhin, V., Paddeu, S., Facci, P., Nicolini, C., 1996. Bacteriorhodopsin thin film as a sensitive layer for an anaesthetic sensor. *Thin Solid Films*. 284-285, 898-900
- Mahler, N., Tschirren, S., Pflügl, S., Herwig, C., 2018. Optimized bioreactor setup for scale-up studies of extreme halophilic cultures. *Biochem. Eng. J.* 130, 39-46
- Manikandan, M., Pasic, L., Kannan, V., 2009. Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family halobacteriaceae) by response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 100, 3107-3112
- Marin, A. P., 2005. Dynamic factors of bacteriorhodopsin: Regulation key points in helices B, C and F. Doctoral Dissertation. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona
- Marshall, C. P., Leuko, S., Coyle, C. M., Walter, M. R., Burns, B. P., Neilan, B. A., 2007. Carotenoid analysis of halophilic archaea by resonance Raman spectroscopy. *Astrobiology*. 7, 631-643
- Maximych, A., Kholmansky, A., Levin, E., Rambidi, N., Chamorovsky, A., Kononenko, V., Erokhin, V., Checulaeva, L., 1992. Oriented purple membrane multilayers of halobacteria fabricated by langmuir-blodgett and electrophoretic sedimentation techniques. *Adv. Mater. Opt. Electron.* 1, 105-115
- Mei, G., Mamaeva, N., Ganapathy, S., Wang, P., DeGrip, W. J., Rothschild, K. J., 2018. Raman spectroscopy of a near infrared absorbing proteorhodopsin: Similarities to the bacteriorhodopsin O photointermediate. *PLOS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209506>
- Michel, H., Oesterhelt, D., Henderson, R., 1980. Orthorhombic two-dimensional crystal form of purple membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77 (1) 338-342
- Miercke, L. J. W., Ross, P. E., Stroud, R. M., Dratz, E. A., 1989. Purification of bacteriorhodopsin and characterization of mature and partially processed forms. *J Biol Chem.* 264(13), 7531-7535
- Min, J., Choi, H. G., Choi, J. W., Lee, W. H., Kim, U. R., 1998. Optimal fabrication condition of bacteriorhodopsin films by electrophoretic sedimentation technique. *Supramol. Sci.* 5, 687-690

- Min, J., Choi, H. G., Choi, J. W., Lee, W. H., Kim, U. R., 1998. Photocurrent of bacteriorhodopsin films deposited by electrophoretic method. *Thin Solid Films*. 327-329, 698-702
- Min, J., Choi, H. G., Oh, B. K., Lee, W. H., Paek, S. H., Choi, J. W., 2001. Visual information processing using bacteriorhodopsin-based complex LB films. *Biosens. Bioelectron.* 16, 917-923
- Mishra, D., Markus, T. Z., Naaman, R., Kettner, M., Göhler, B., Zacharias, H., Friedman, N., Sheves, M., Fontanesi, C., 2013. Spin-dependent electron transmission through bacteriorhodopsin embedded in purple membrane. *PNAS*. 110 (37) 14872-14876
- Moleirad, A., Rezaeian, N., 2014. Oriented assembly of bacteriorhodopsin on ZnO nanostructured electrode for enhanced photocurrent generation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 62 (4), 489-493
- Moore, G. E., 1965. Cramming more components onto integrated circuits. *Electronics*. 38 (8), 1-4
- Mutlu, M. B., Martínez-García, M., Santos, F., Pena, A., Guven, K., Antón, J., 2008. Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in inland Turkey. *Fems. Microbiol. Ecol.* 65(3), 474-483.
- Neutze, R., Peyroula, E. P., Edman, K., Royant, A., Navarro, J., Landau, E. M., 2002. Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport. *Biochim. Biophys. Acta*. 1565, 144-167
- Ng, V.W., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K. H., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L., DasSarma, S., 2000. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *PNAS*. 97(22), 12176-12181
- Nicolini, C., Erokhin, V., Paddeu, S., Paternolli, C., Ram, M. K., 1999. Toward bacteriorhodopsin based photocells. *Biosens. Bioelectron.* 14, 427-433
- Oesterhelt, D., Stoekenius, W., 1973. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 667-678
- Okada-Shudo, Y., Tanabe, T., Mukai, T., Kasai, K., Zhang, Y., Watanabe, M., 2016. Directionally selective motion detection with bacteriorhodopsin patterned sensor. *Synth. Met.* 1-6
- Oren, A., Ventosa, A., Grant, W. D., 1997. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(1), 233-238
- Özcan, B., 2004. Türkiye’den halofilik arkebakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu. Doctoral Dissertation. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara
- Pandey, P. C., 2006. Bacteriorhodopsin – novel biomolecule for nano devices. *Anal. Chim. Acta*. 568, 47-56
- Pfeifer, K., Ergal, İ., Koller, M., Basen, M., Schuster, B., Simon, K., Rittmann, M. R., 2019. Archaea biotechnology. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107668>

- Popp, A., Wolperdinger, M., Hampp, N., Brauchle, C., Oesterhelt, D., 1993. Photochemical conversion of the O- intermediate to 9-cis retinal-containing products in bacteriorhodopsin films. *Biophys. J.* 65, 1449-1459
- Rajab, S., Babaeipour, V., Khanchezar, S., Amoabediny, G., Yazdian, F., Mofid, M. R., 2019. Investigation of factors influencing oxygen content in *Halobacterium salinarum* growth medium for improved bacteriorhodopsin production. *Int. J. Ind. Chem.* 10, 261-268
- Rajamani, R., 2003. Integral membrane proteins: Structure and function. Doctoral Dissertation. University of Minnesota. Minneapolis, Minnesota
- Ram-Mohan, N., Oren, A., Papke, R. T., 2016. Analysis of the bacteriorhodopsin-producing haloarchaea reveals a core community that is stable over time in the salt crystallizers of Eilat, Israel. *Extremophiles.* 20(5), 747–757.
- Renugopalakrishnan, V., Lewis, R. V., 2006. Bionanotechnology. Springer Publishing. Netherlands. 296 s.
- Rhinow, D. C., 2008. Purple membranes from *Halobacterium salinarum* as building blocks for nanobiotechnology: The importance of mechanical and thermal properties for matrix and surface applications. Doctoral Dissertation. Phillips-Universität Marburg. Frankfurt am Main
- Riedel, R., Frese, N., Yang, F., Wortmann, M., Dalpke, R., Rhinow, D., Hampp, N., Götzhauser, A., 2021. Fusion of purple membranes triggered by immobilization on carbon nanomembranes. *Beilstein J. Nanotechnol.* 12, 93-101
- Robertson, B., Lukashev, E. P., 1995. Rapid pH change due to bacteriorhodopsin measured with a tin-oxide electrode. *Biophys. J.* 68, 1507-1517
- Ron, I., Friedman, N., Cahen, D., Sheves, M., 2008. Selective electroless deposition of metal clusters on solid-supported bacteriorhodopsin: Applications to orientation labeling and electrical contacts. *Small.* 4 (12) 2271-2278
- Rousso, I., 1997. The role of water and light induced conformational alterations in the function of bacteriorhodopsin. Doctoral Dissertation. Weizmann Institute of Science. Rehovot
- Saga, Y., Watanabe, T., Koyama, K., Miyasaka, T., 1999. Mechanism of photocurrent generation from bacteriorhodopsin on gold electrodes. *J. Phys. Chem. B.* 103, 234-238
- Seigneuret, M., Neumann, J. M., Rigaud, J. C., 1991. Detergent delipidation and solubilization strategies for high-resolution NMR of the membrane protein bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 266, 10066-10069
- Seyedkarimi, M. S. Aramvash, A., Ramezani, R., 2015. High production of bacteriorhodopsin from wild type *Halobacterium salinarum*. *Extremophiles.* 19, 1021-1028
- Sezen, H., 2011. Photo-dynamic XPS for investigating photoinduced voltage change in semiconducting materials. Doctoral Dissertation. Department of Chemistry. Bilkent University. Ankara
- Shahmohammadi, H. R., Asgarani, E., Terato, H., Saito, T., Ohyama, Y., Gekko, K., Yamamoto, O., Ide, H., 1998. Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarum* against DNA-damaging agents. *J. Radiat. Res.* 39, 251-262
- Shand, R. F., Betlach, M. C., 1991. Expression of the bop gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light. *J. Bacteriol.* 173 (15), 4692-4699

- Shiu, P. J., Chen, H. M., Lee, C. K., 2014. One-step purification of delipidated bacteriorhodopsin by aqueous-three-phase system from purple membrane of halobacterium. *Food Bioprod. Process.* 92, 113-119
- Shiu, P. J., Ju, Y. H., Chen, H. M., Lee, C. K., 2013. Facile isolation of purple membrane from *Halobacterium salinarum* via aqueous-two-phase system. *Protein Expr. Purif.* 89, 219-224
- Shiu, P. J., Ju, Y. H., Chen, H. M., Lee, C. K., 2015. Effect of complex nutrients and repeated-batch cultivation of *Halobacterium salinarum* on enhancing bacteriorhodopsin production. *J. Microb. Biochem. Technol.* 7 (5), 288-293
- Silveira, G. Q., Chen, Z., Barry, E. F., Diroll, B. T., Lee, B., Rajh, T., Rozhkova, E. A., Laible, P. D., Fry, C., 2019. Energy transfer induced by dye encapsulation in a hybrid nanoparticle-purple membrane reversible assembly. *Adv. Funct. Matter.* 1904899, 1-10
- Singh, A., Singh, A. K., 2018. Isolation, characterization and exploring biotechnological potential of halophilic archaea from salterns of Western India. *3 Biotech.* 8 (45), 1-15
- Singh, D., 2001. Computational studies of wavelength selection in cone pigments and cation binding in bacteriorhodopsin. Doctoral Dissertation. Syracuse University
- Stoeckenius, W., Lozier, R. H., Bogomolni, R. A., 1979. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 505, 215-278
- Stuart, J. A., 1998. Part I: Bacteriorhodopsin-related materials work for molecular electronics, Part II: Volumetric optical memory based on the branched photocycle of bacteriorhodopsin, Part III: The role of calcium in the bacteriorhodopsin binding site. Doctoral Dissertation. Syracuse University
- Sumper, M., Reitmeier, H., Oesterhelt, D., 1976. Biosynthesis of the purple membrane of halobacteria. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15 (4), 187-194
- Syed, F. F. B., 2011. Citrate binding to the membrane protein proteorhodopsin. Doctoral Dissertation. Syracuse University
- Takeda, K., Sato, H., Hino, T., Kono, M., Fukuda, K., Sakurai, I., Okada, T., Kouyama, T., 1998. A novel three-dimensional crystal of bacteriorhodopsin obtained by successive diffusion of the vesicular assemblies. *J. Mol. Biol.* 283, 463-474
- Tan, E. H. L., 1996. Correlation between surfactant/micelle structure and the stability of bacteriorhodopsin in solution, and manipulation of the photocycle of bacteriorhodopsin via systematic structural modification of site-specific protein-bound organic cations. Doctoral Dissertation. Syracuse University
- Tsujuchi, Y., Makino, Y., 2011. An observation of diamond-shaped particle structure in a soya phosphatidylcholine and bacteriorhodopsin composite Langmuir-Blodgett film fabricated by multilayer molecular thin film method. *Phys. Procedia.* 14, 115-118
- Tunail, N., 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Offset, Ankara, 448 s
- Ueno, S., Shibata, A., 2002. Redox potential of bacteriorhodopsin in oriented purple membrane films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23, 383-390
- Vsevolodov, N., 1998. Bioengineering of materials: an introduction via photosensitive proteins. Birkhauser Press. 1st Edition. Boston. 275 s.
- Walczak, K. A., 2009. Immobilizing bacteriorhodopsin on a single electron transistor. Doctoral Dissertation. Michigan Technological University

- Wang, J., Song, L., Yoo, S., El-Sayed, M., 1997. A comparison of the photoelectric current responses resulting from the proton pumping process of bacteriorhodopsin under pulsed and CW laser excitations. *J. Phys. Chem. B.* 101, 10599-10604
- Weetall, H. H., Druzsko, A. B., Samuelson, L. A., de Lera, A. R., Alvarez, R., 1997. Optical and electrical properties of bacteriorhodopsin Langmuir-Blodgett films: II. D96N mutant and its 4-keto and 9-demethyl retinal analogs. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 44, 37-43
- Wickstand, C., Dods, R., Royant, A., Neutze, R., 2015. Bacteriorhodopsin: Would the real structural intermediates please stand up? *Biochim. Biophys. Acta.* 1850, 536-553
- Winder, E., Lueking, D., Friedrich, C., 2008. Chemical and biological sensing utilizing fused bacteriorhodopsin protein hybrids. In Proceedings of the 26th Army Science Conference, Orlando, FL, USA
- Winder, E. M., 2010. Bacteriorhodopsin protein hybrids for chemical and biological sensing. Doctoral Dissertation. Michigan Technological University
- Wise, K. J., Gillespie, N. B., Stuart, J. A., Krebs, M. P., Birge, R. R., 2002. Optimization of bacteriorhodopsin for bioelectronic devices. *TRENDS Biotechnol.* 20 (9), 387-394
- Xu, J., 2003. Bio-photosensors based on monolithic integration of light sensitive proteins with semiconductor devices and integrated circuits. Doctoral Dissertation. The University of Michigan
- Yang, Y., Cui, H. L., Zhou, P. J., Liu, S. J., 2006. *Halobacterium jilantaiense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2353-2355
- Yen, C. W., Chu, L. K., El-Sayed, M., 2010. Plasmonic field enhancement of the bacteriorhodopsin photocurrent during its proton pump photocycle. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 7250-7251
- Yu, X., Yao, B., Lei, M., Gao, P., Ma, B., 2013. Femtosecond laser-induced permanent anisotropy in bacteriorhodopsin films and applications in optical data storage. *J. Mod. Opt.* 1-6
- Yuan, L., Li, B., Jiang, L., 1999. Photoelectric responses of Langmuir-Blodgett film containing bacteriorhodopsin on ITO modified with polypyrrole film. *Thin Solid Films.* 340, 262-264
- Zaitsev, S. Y., Solovyeva, D. O., Nabiev, I., 2012. Thin films and assemblies of photosensitive membrane proteins and colloidal nanocrystals for engineering of hybrid materials with advanced properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* 183-184, 14-29
- Zeng, C., Zhu, J. C., Liu, Y., Yang, Y., Zhu, J. Y., Huang, Y. P., Shen, P., 2006. Investigation of time influence of NaCl concentration on *Halobacterium salinarum* growth. *J. Therm. Anal. Calorim.* 3, 625-630
- Zhang, F., Vierock, J., Yizhar, O., Fenno, L. E., Tsunoda, S., Kianianmomeni, A., Prigge, M., Berndt, A., Cushman, J., Polle, J., Magnuson, J., Hegemann, P., Deisseroth, K., 2011. The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell.* 147, 1446-1457

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Neslihan HİDİROĞLU İSPİRLİ
Doğum tarihi	:
Doğum Yeri	:
Uyruğu	:
Adres	:
Tel	:
E-mail	:
Eğitim	
Lise	: Nenehatun Süper Kız Lisesi
Lisans	: Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Yüksek lisans	: Atatürk Üniversitesi Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilimdalı, Nanobiyoteknoloji Bilimdalı
Doktora	: Atatürk Üniversitesi Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilimdalı, Nanobiyoteknoloji Bilimdalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	: Evet
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
İspirli, N. H., Güllüce, M., Karadayı, M., Demir, A. Y., 2019. Culturable bacteriorhodopsin-producing haloarchaeae of Tuz Lake (Turkey). <i>Geomicrobiol J.</i> 36(9), 831-836	