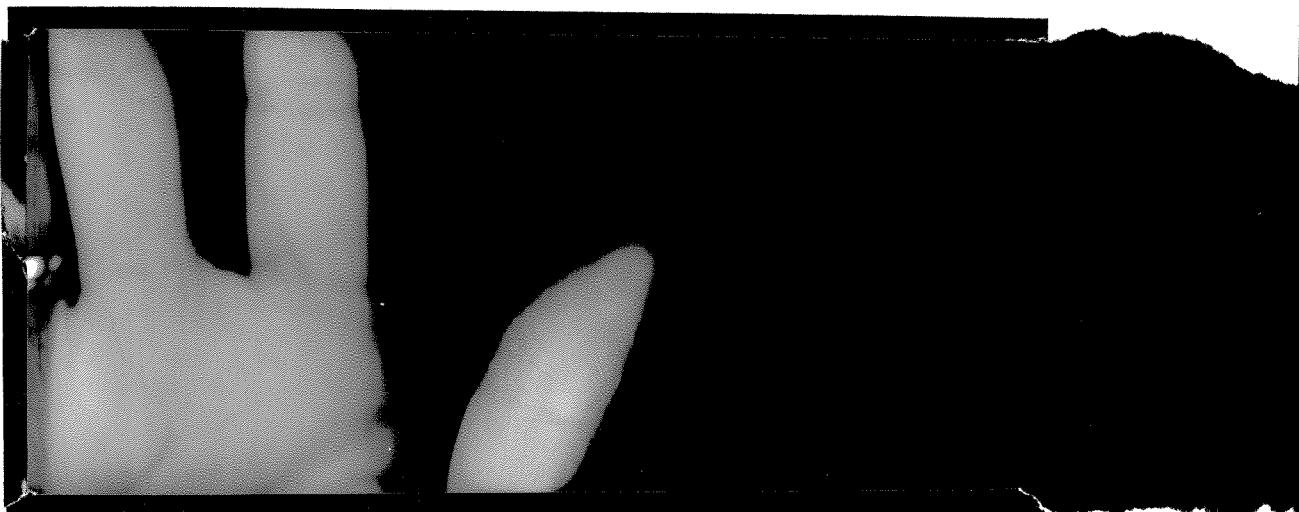


DUP
1997-229



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



**Makina, Kimyasal Teknolojiler, Malzeme ve İmalat Sistemleri
Araştırma Grubu**

**Mechanical Engineering, Chemical Technologies, Material
Sciences and Manufacturing Systems Research Grant
Committee**

GÜNEŞ ENERJİSİ İLE HİDROJEN GAZI ÜRETİMİNE YÖNELİK BİR
BİYOREAKTÖRÜN TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ

PROJE NO : KTÇAG- 115

PROF.DR. İNCİ EROĞLU
PROF.DR. MERAL YÜCEL
PROF.DR. UFUK GÜNDÜZ
PROF.DR. LEMİ TÜRKER
VEDAT SEDİROĞLU
BANU KAYA
ADNAN AYDEMİR

ŞUBAT 1996
ANKARA

ÖNSÖZ

Bu rapor, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan KTÇAG-115 sayılı projenin yürütülmesi sırasında elde edilen bilgi ve sonuçları içermektedir.

Raporla ilgili bütün deneyler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalının kapsamında O.D.T.Ü Biyoloji ve Kimya Mühendisliği laboratuvarlarında gerçekleştirılmıştır. Deney düzenekleri, biyoreaktörler, gaz ölçüm cihazları vb ekipman O.D.T.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü makina ve cam atelyeleri teknisyenleri Hayri Kuzucu ve Mehmet Koca'nın katkılarıyla, elektrik ve elektronik devrelerin tesisi, montajı ve bakımı elektrik ve elektronik teknisyeni Bünyamin Özyigit'in katkılarıyla gerçekleşmiştir. O.D.T.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü Aletli Analiz laboratuvarlarında Kimyager Gültén Orakçı ve Kerime Güney analizlerin yapılmasına yardımcı olmuşlardır.

Reaktörlerin sterilizasyonu ve biyolojik sistemlerin kurulmasında O.D.T.Ü Biyoloji Bölümü Kimya teknisyeni Suat Pastutmaz'ın değerli katkıları olmuştur.

Proje esnasında O.D.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans çalışmasını tamamlayan Tüzün Arık araştırmalarımıza çok önemli katkıda bulunmuştur.

Bu proje Orta Doğu Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından AFP 93-07-02-01 no lu proje ile de desteklenmiştir.

Bu projenin gerçekleşmesinde yardımları olan tüm çalışanlara teşekkür ederiz.

Gösterdikleri ilgi ve iyi niyetten dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumuna şükranlarımı sunarız.



Şubat 1996 / ANKARA

Prof.Dr. İNCİ EROĞLU

Proje Yöneticisi

GÜNEŞ ENERJİSİ İLE HİDROJEN GAZI ÜRETİMİNE YÖNELİK BİR BIYOREAKTÖRÜN TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ

ÖZ

Bu araştırmada güneş enerjisi ile hidrojen gazı üretilmesi amacı ile üç değişik biyosistem üzerinde çalışılmıştır. Bu biyosistemler ; *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* (DSM 6854) ile hidrojen üretimi, *Halobacterium halobium S9* ve *E.coli* (DSM 1576) ikili sistemleri ile hidrojen üretimi ve *Halobacterium halobium S9* ve indirgeyici elektrot ile elektrokimyasal yöntemle hidrojen üretimiştir. Her bir biyosistem için uygun biyoreaktörler tasarlanmış ve kurulmuştur.

Rhodobacter sphaeroides O.U.001 ile anaerobik koşullarda aydınlatıkta hidrojen gazı üretilebilmiştir. Geliştirilen fotobiyoreaktörde en uygun hidrojen üretim koşullarının pH'nın 7,3-7,8, sıcaklığın 31-36 °C, ışık şiddetinin 200 W/m² ve hücre derişiminin 1,6-1,8 mg kuru ağırlık / mL olduğu sonucuna varılmıştır. Fotobiyoreaktörde en uygun koşullarda 0,047 L gaz / saat / L kültür (veya 30 µmol hidrojen / dakika / L kültür) hızında, argonsuz bazda % 99 hidrojen % 1 karbon dioksit bileşiminde gaz elde edilmiştir.

Halobacterium halobium S9-E.coli ikili sistemi ile sadece anaerobik koşullarda hidrojen üretillebilmiştir. *E.coli* anaerobik koşullarda bilyülme esnasında ıshıksız ortamda da 250 µmol hidrojen / dakika / L kültür hızında gaz üretmiştir. Ancak ortama, çöktürülmüş *Halobacterium Halobium S9* hücreleri konulduğunda ve aydınlatıkta 330 µmol hidrojen / dakika / L kültür hızında argonsuz bazda % 98 hidrojen % 2 karbondioksit ihtiyaç eden gaz üretilmiştir.

Halobacterium halobium S9 suşunun değişik koşullarda üreme eğrisi elde edilmiştir. Aerobik ortam ve çalkalamalı koşullarda üremenin daha hızlı olduğu görülmüştür. Çöktürülmüş hücrelerin fotoaktivitesinin aerobik ve anaerobik koşullarda aynı olduğu ancak bakteriorhodopsin derişiminin artması ile fotoaktivitenin arttığı sonucuna varılmıştır. Geliştirilen fotoelektrokimyasal biyoreaktörde çöktürülmüş *Halobacterium halobium* 'un fotoreseptör proteinlerinden bakteriorhodopsinin hidrojen gazı üretiminde biyokatalitik etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada bakteriorhodopsinin Hyperchem programıyla mekanik hesapları yapılmış, enerji mülahazasıyla yeni bir proton alışveriş siklusu önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Hidrojen üretimi , *Halobacterium halobium* , *E.coli*, bakteriorhodopsin, *Rhodobacter sphaeroides*, biyoreaktör.

DESIGN AND DEVELOPMENT OF A SOLAR BIOREACTOR FOR HYDROGEN GAS PRODUCTION

ABSTRACT

During the present project three different biosystems have been developed for the solar production of hydrogen. Three biosystems were : photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides O.U.001*(DSM 5864), hydrogen gas production by using coupled enzyme systems of *E.coli* (DSM 1576) and *Halobacterium halobium S9* and photoelectrochemical hydrogen production by *Halobacterium halobium S9*. A suitable bioreactor have been designed and constructed for each biosystem.

Results indicated that *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* evolves hydrogen gas under anaerobic conditions and under illumination. The growth conditions such as pH, temperature, light intensity and cell concentration affected the hydrogen photoproduction.

The recommended ranges of these parameters were pH 7,3 to 7,8, temperature 31 to 36 °C, light intensity 200 W / m² and cell concentration between 1,6 to 1,8 mg dry weight / mL. The maximum photo production rate obtained was 0.047 L gas / hr / L culture (or 30 µmoles hydrogen / min / L culture) composed of 99 % hydrogen and 1 % carbon dioxide on argon free basis.

It was found that anaerobic conditions were strictly required for hydrogen evolution by *Halobacterium halobium S9 - E.coli* coupled system. During anaerobic growth of *E.coli* 250 µmoles hydrogen / min / L culture of gas evolution was observed. The gas production rate was increased to 330 µmoles hydrogen / min / L culture with *E.coli* coupled to bacteriorhodopsin or packed cells of *Halobacterium halobium*. The evolved gas was composed of 98 % hydrogen and 2 % carbon dioxide on argon free basis.

Growth curves of *Halobacterium halobium S9* were obtained at different conditions. It has been observed that growth was faster at aerobic conditions with shaking. The photoactivity of packed cells did not change significantly in aerobic or anaerobic conditions, however, it was increased with increasing bacteriorhodopsin content. The results have indicated the enhancement of hydrogen production in the presence of light and *Halobacterium halobium*, compared to cell free photoelectrochemical reactor. This may be due to the biocatalytic effect of bacteriorhodopsin which is the photoreceptor protein of *Halobacterium halobium*.

In this research molecular mechanics of bacteriorhodopsin were estimated by Hyperchem software and a new proton release and uptake mechanism has been proposed considering energy.

Key words : Hydrogen production, *Halobacterium halobium* , *E.coli*, bacteriorhodopsin, *Rhodobacter sphaeroides*, bioreactor.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZ	ii
ABSTRACT	iii
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
BÖLÜM 1. GİRİŞ	1
BÖLÜM 2. <i>RHODOBACTER SPHAEROIDES O.U.001</i> İLE HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ	3
2.1 ÖZET	3
2.2. GİRİŞ	3
2.2.1. Fotosentetik Bakteriler Tarafından Hidrojen Üretimi	4
2.2.2. Çeşitli Mikroorganizmalarla Hidrojen Üretimi	5
2.3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	6
2.3.1. Kültür Hazırlanması	7
2.3.1.1. Anaerob Sıvı Kültür Hazırlanması	7
2.3.1.2. Anaerob Katı Kültür Hazırlanması	7
2.3.2. <i>Rhodobacter sphaeroides O.U.001</i> in Üretimi	8
2.3.3. <i>Rhodobacter sphaeroides O.U.001</i> Üreme Eğrisi	9
2.3.4. Biyoreaktör	10
2.4. BULGULAR VE TARTIŞMA	11
2.4.1. Üreme Koşullarının Mikroorganizmaya Etkisi	11
2.4.2. Farklı Işık Kaynaklarının Üreme Uzerine Etkileri	12
2.4.3. Hidrojen Üretimi	12
2.5. SONUÇLAR	18
2.6. KAYNAKÇA	19
BÖLÜM 3. <i>HALOBACTERIUM HALOBIUM</i> VE <i>ESCHERICHIA COLI</i> İÇEREN FOTOBIYOREAKTÖRDE HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ	21
3.1 ÖZET	21
3.2 GİRİŞ	21
3.2.1. <i>Halobacterium halobium</i>	22
3.2.2. <i>Escherichia coli</i>	22
3.2.3 Eşli Sistem	23
3.2.4 Amaç	25
3.3. Gereç ve Yöntemler	26
3.3.1 <i>H.halobium</i> 'un Üretilmesi	26

3.3.2 <i>H.halobium</i> 'un çöktürülmesi.....	26
3.3.3 Mor Zarın Saflaştırılması.....	26
3.3.4 Mor Zarın Karekterizasyonu	26
3.3.5 BR'ın Fotoaktivite Ölçümleri	27
3.3.6 <i>E.coli</i> nin Üretilmesi	27
3.3.7 <i>E.coli</i> 'nin Çöktürülmesi.....	27
3.3.8 Biyoreaktör Dizaynı	27
3.3.9 <i>E.coli</i> Anaerobik Şartlarda Üretilirken H ₂ Gazı Çıkışı	28
3.3.10 BR ile Eşlenen <i>E.coli</i> 'nin Anaerobik Üretimi Sırasında H ₂ Çıkışı.....	28
3.3.11 <i>H.halobium</i> ile Eşlenen <i>E.coli</i> 'nin Anaerobik Üretimi Sırasında H ₂ Çıkışı	28
3.3.12 H ₂ Üretimini Etkileyen Faktörler	30
3.3.13 Anaerobik Üretilmiş <i>E.coli</i> Hücrelerinin ve <i>H.halobium</i> Hücreleri ile Besiyeri Olmayan Ortamda H ₂ Üretimi.....	30
3.3.14 Gaz Analizi	30
3.4 Bulgular ve Tartışma.....	31
3.4.1 <i>H.halobium</i> 'un Üretimi ve Fotoaktivitesi	31
3.4.2 <i>E.coli</i> 'in Aerobik ve Anaerobik Üretimi.....	31
3.4.3 Anaerobik Koşullarda Üretilen <i>E.coli</i> Hücreleri İle H ₂ Gazı Üretimi.....	31
3.4.4 Anaerobik Koşullarda Üretilen <i>E.coli</i> Ve BR Kullanarak H ₂ Gazı Üretimi.....	35
3.4.5 Hidrojen Gazı Çıkışına pH Etkisi.....	35
3.4.6 Formatın H ₂ Gaz Çıkışına Etkisi	38
3.4.7 Çöktürülmüş Hücrelerle H ₂ Gazı Üretimi	38
3.5 SONUÇLAR	42
3.6 KAYNAKÇA.....	46
BÖLÜM 4. HİDROJENİN ELEKTROKİMYASAL ÜRETİMİNDE	
<i>HALOBACTERIUM HALOBİUM</i> KULLANIMI	49
4.1.ÖZET	49
4.2.GİRİŞ	49
4.3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	53
4.3.1.Maddeler.....	53

4.3.2.Yöntemler.....	54
4.3.2.1. <i>Halobacterium halobium</i> 'un Üretilmesi.....	54
4.3.2.2.Foto-aktivite Ölçümleri	55
4.3.2.3.Bio-fotoelektrokimyasal Reaktör (Bio-Pec)	55
4.3.2.4. Bio-Pec'de Hidrojen Üretimi	55
4.4.BULGULAR VE TARTIŞMA	57
4.4.1. <i>Halobacterium halobium</i> 'un Üreme Eğrisi	57
4.4.2. <i>Halobacterium halobium</i> 'un Foto-aktivite Özelliği.....	66
4.4.3. Hidrojen Üretimi	66
4.5 SONUÇLAR	67
4.6 KAYNAKÇA.....	68
BÖLÜM 5. BAKTERIORHODOPSİN KROMOFORUNUN TEORİK İNCELENMESİ	70
5.1.METOD.....	72
5.2.BULGULAR VE TARTIŞMA	73
5.3.SONUÇLAR	75
5.4.KAYNAKÇA.....	76
BÖLÜM 6. SONUÇLARIN UYGULANABILIRLİK DURUMU	78
PROJE İLE İLGİLİ YAYIN/TEBLİĞLERLE İLGİLİ BİLGİLER.....	80

TABLO LİSTESİ

TABLO 2.1.Fototrofik Mikroorganizmaların Maksimum Hidrojen Üretim Hızı	4
TABLO 2.2.Değişik çözeltilerin hazırlanışı	6
TABLO 2.3.Bakteri Üreme Deneylerinde Kullanılan Değişik İşık Kaynakları	12
TABLO 2.4.Hidrojen Üretimi Sırasında Kullanılan Deney Koşulları.....	14
TABLO 3.1 Anaerobik karbon akışında kullanılan enzimler (sayılar Şekil 3.1 deki enzimleri belirtir)	24
TABLO 3.2 Anaerobik fotobioreaktörün çalışma şartları.....	29
TABLO 3.3. Hidrojen üreten sistemlerin özeti.....	45
TABLO 4.1.Literatür araştırması.....	52
TABLO 4.2. Halobacterium Halobium'un 1lt' lik Besiyerinin İçerdiği Kimyasal Maddeler	53

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. <i>Rhodospirillum rubrum</i> daki Hidrojen Mekanizması	4
Şekil 2.2. Anaerobik Üretim Düzeneği	8
Şekil 2.3. Hidrojen Üretilen Bio-reaktör ve Deney Düzeneği.....	10
Şekil 2.4. Üreme Esnasında pH'nın Zamanla Değişimi.....	13
Şekil 2.5. Üreme Eğrisi (Tungsten Lamba, 200W/m ²)	13
Şekil 2.6. Toplam Gaz Miktarının Zamana Göre Değişimi(I.Deney Seti)	14
Şekil 2.7. Hücre Değişiminin ve pH'nın Zamana Değişimi(II.Deney Seti)	16
Şekil 2. 8.Toplam Gaz Miktarının Zamana Göre Değişimi(II.Deney Seti)	16
Şekil 2.9. Toplam Gaz Miktarının Zamana Göre Değişimi(V.Deney Seti)	17
Şekil 2.10. Toplam Gaz Miktarının Zamana Göre Değişimi (VII.Deney Seti)	17
Şekil 3.1 Anaerobik Üretililen <i>E.coli</i> 'de Karbon.Akışı	24
Şekil 3.2 <i>H.halobium</i> ve <i>E.coli</i> Eşli Sistemi İle H ₂ Gazi Çıkış Mekanizması.....	25
Şekil 3.3 Anaerobik Fotobiyoreaktör	29
Şekil 3.4 (a) <i>E.coli</i> 'nin Anaerobik Üreme Eğrisi (b) <i>E.coli</i> 'nin Anaerobik Üreme Eğrisi (LB ortamında) (c) <i>E.coli</i> 'nin Anaerobik Üreme Eğrisi (LB ortamı + format + metal iyonları).....	32
Şekil 3.5 (a) <i>E.coli</i> 'nin Anaerobik Üremesi Sırasında H ₂ Gazi Çıkışı (b) Üreme Sırasında Ortamın pH Değişimi	34
Şekil 3.6 (a) Anaerobik Üreyen <i>E.coli</i> ve BR İkilisi ile H ₂ Gazi Çıkışı (b) Ortamın pH Değişimi	36
Şekil 3.7 (a) Anaerobik Üreyen <i>E.coli</i> ve <i>H.halobium</i> İkilisi ile H ₂ Gazi Çıkışı (b) Ortamın pH Değişimi	37
Şekil 3.8 (a) Anaerobik Koşullarda Ortamın pH' nın Ayarlanması H ₂ Gazi Çıkışına Etkisi (b) Ortamın pH Değişimi	39
Şekil 3.9 (a) Anaerobik Koşullarda Format Eklenmesinin H ₂ Gazi Çıkışına Etkisi(b) Ortamın pH Değişimi.....	40

Şekil 3.10 (a) Aerobik Koşullarda Bekletilen İkili Sistemle H ₂ Gazı Çıkışı (Anaerobik Deney Koşullarında) (b) Ortamın pH Değişimi.....	41
Şekil 3.11 (a) Çöktürülmüş <i>E.coli</i> ve <i>H.halobium</i> İkilisi ile Format Ortamında H ₂ Gazı Çıkışı (b) Ortamın pH Değişimi.....	43
Şekil 3.12 a) Çöktürülmüş <i>E.coli</i> ve <i>H.halobium</i> İkilisi ile Format ve Metal İyonları Ortamında H ₂ Gazı Çıkışı (b) Ortamın pH Değişimi	44
Şekil 4.1. Bio-fotoelektrokimyasal Reaktör	56
Şekil 4.2. Anaerobik Ortamda Bakterilerin Üreme Eğrisi(V=250ml)	58
Şekil 4.3. Anaerobik Ortamda Bakterilerin(Krona) Üreme Eğrisi	59
Şekil 4.4. Anaerobik Ortamda Babkterilerin(Oesterhelt) Üreme Eğrisi.....	60
Şekil 4.5. Bakterilerin Üreme Eğrisi (V=250ml Sallamalı	61
Şekil 4.6. Bakterilerin Üreme Eğrisi (V=50ml Sallamalı).....	62
Şekil 4.7. Bakterilerin Üreme Eğrisi (50ml'lik kültür 250ml'ye aktarıldı)	63
Şekil 4.8. pH'nın Zamana Göre Değişimi (T=25C ,20%NaCl,4,2μM BR).....	64
Şekil 4.9. Hidrojen Üretiminin Zamana Göre Değişimi (T=25C ,20%NaCl,0,68μM BR).....	65
Şekil 4.10. pH'nın Zamana Göre Değişimi (T=25C ,20%NaCl,0,68μM BR).....	65
Şekil 5.1. Shulten Modeline Göre Ortaya Atılan Çeşitli Proton Ve Serbest Retinal Schiff Bazlarına Ait Energy Değerleri(kmol/mol).....	74
Şekil 6.1. Gelecekte Hidrojen Enerjisi Üretim ve Kullanım Planı.....	79

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Hidrojen gazı geleceğin ideal temiz yakıtı olarak düşünülmektedir. Ayrıca Hidrojen gazı petrol rafinelerinde, amonyak sentezinde, hidrojenasyon tepkimelerinde ve kimya endüstrisinde daha birçok önemli alanda kullanılmaktadır. Hidrojen gazı suyun fotolizi, elektolizi, temolizi veya fotoelektrokimyasal metodlarla ayırtılmasının ile üretilmektedir. Hidrojen gazı üretiminde bugün mevcut teknolojilerde oldukça önemli oranda fosil yakıtlar ve elektrik enerjisi harcanmaktadır, bu da çevre kirliliğine neden olmaktadır. Diğer yandan son yıllarda biyoteknoloji alanındaki hızlı gelişmeler hidrojen gazının biyoteknolojik metodlar ile güneş enerjisi, organik atıklar ve mikroorganizmalarla üretilmesini gündeme getirmiştir.

Bu araştırmanın amacı güneş enerjisi ile hidrojen gazı üretimine yönelik bir biyoreaktörün tasarımı ve geliştirilmesidir. Bu amaca yönelik olarak öncelikle fotosentetik bir bakteri olan *Halobacterium halobium* un fotoaktivitesini yükselten üretilme koşullarının belirlenmiştir. *Halobacterium halobium* un fotoreseptör proteinlerinden bakteriorhodopsin in hidrojen gazı üretilmesinde biyokatalizör etkisinin olup olmadığı araştırılmaktadır.

Halobacterium halobium veya bakteriorhodopsin ile ışık enerjisi kullanarak hidrojen gazı elde edilmesine yönelik iki değişik biyosistem araştırılmıştır. Bu sistemler : *Halobacterium halobium* - indirgeyici elektrot sistemi ve *Halobacterium halobium* - *Eshariacha coli* ikili sistemdir. Her iki sistem için farklı biyoreaktörler tasarlanmıştır ve kurulmuştur.

Hidrojen gazı üretiminde araştırılan üçüncü biyosistem ise fotosentetik bir bakteri olan *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* ile yapılan çalışmalardır. Her ne kadar proje öneri formunda bu bakterinin adı geçmemekte ise de, proje ekibimiz bu bakteriyi bu proje kapsamında temin etmiş ve be bakteri ile hidrojen üreten bir fotobioreaktör ve hidrojen ölçüm aparatı geliştirmiştir. Bu biyosistem ile edinilen tecrübe diğer iki biyosistemin kurulmasına önemli katkı sağlamıştır.

Bu raporda her bir biyosistem ile ilgili araştırma - literatür, yöntem, bulgu, sonuç ve kaynaklar - ilgili bölümlerde sunulmaktadır. Raporun bu şekilde hazırlanmasının nedeni her bölüm kendi içinde bağımsız kılarak en kısa zaman da bu araştırmaların yayın haline dönüşmesine olanak sağlamaktır. Bölüm 2 de *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* ile hidrojen gazı üretimi konusunda yapılan araştırma sunulmaktadır. Bölüm 3 de *Halobacterium halobium* ile *E.coli* ikili biyosistemi ile hidrojen üretimi, sadece *E.coli* bulunan veya , *E.coli*-bakteriorhodopsin ikili sistemlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmaktadır. Bölüm 4 de hidrojenin elektrokimyasal yöntemle üretiminde *Halobacterium halobium* un katkısı incelenmektedir. Mevcut iki farklı kaynaklı suş aerobik ve anaerobik koşullarda üretilerek fotoaktiviteleri karşılaştırılmıştır. *Halobacterium halobium* un hidrojen üretiminde biyokatalitik etkisinin olup olmadığı araştırılmaktadır.

Bölüm 5 de bakteriorhodopsin kromoforunun teorik incelenmesi yer almaktadır. Önerilen molekül yapısı bu proje kapsamında yurt dışından getirilmiş bulunan Hyperchem programı ile moleküller mekanik hesapları yapılarak incelenmektedir. Bölüm 6 da bu projede elde edilen sonuçlar değerlendirilmekte ve gelecekte yapılması gerekenler ile ilgili öneriler yer almaktadır.

Bu proje kapsamında yapılan ve yapılmakta olan yayınların listesi raporun son bölümünde verilmektedir.

BÖLÜM 2

RHODOBACTER SPHAEROIDES O.U.001 İLE HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ

2.1. ÖZET

Bu çalışmada fotosentetik bir bakteri olan *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 malik asit ve sodyum glutamat içeren besiyerinde tungsten (150 W), cıva buharlı (160 W) ve ultraviyole (300 W) lambalarıyla aydınlatılarak 36 °C ta aerobik ve anaerobik olarak üretildi.

Hidrojen üretimi için bir biyoreaktör tasarlandı, imal edildi ve kuruldu. Hidrojen gazı üretimi pH=7de başladı. Hücre konsantrasyonunun artışı ile birlikte hidrojen üretimi de arttı. Hidrojen gazı üretimi için en uygun sıcaklığın 31 °C olduğu gözlendi. Yüksek saflıkta hidrojen gazı üretildi.

2.2. GİRİŞ

Hidrojen ideal ve çevreyi kirletmeyen bir yakıttır. Fosil enerji kaynaklarının limitli oluşu nedeniyle hidrojen üretimi için yeni teknolojilere gereksinim duyulmaktadır. Güneş enerjisi kullanılarak hidrojen üretimi en ümit verici enerji üretim süreçlerinden biridir. Hidrojen üretme yeteneğine sahip olan organizmalar arasında siyanobakteriler, mavi-yeşil algler ve fotosentetik bakteriler yer alır. Tablo 2.1. farklı fototrofik organizmaların hidrojen üretim hızlarını göstermektedir (Kondrateiva and Gogotov, 1982).

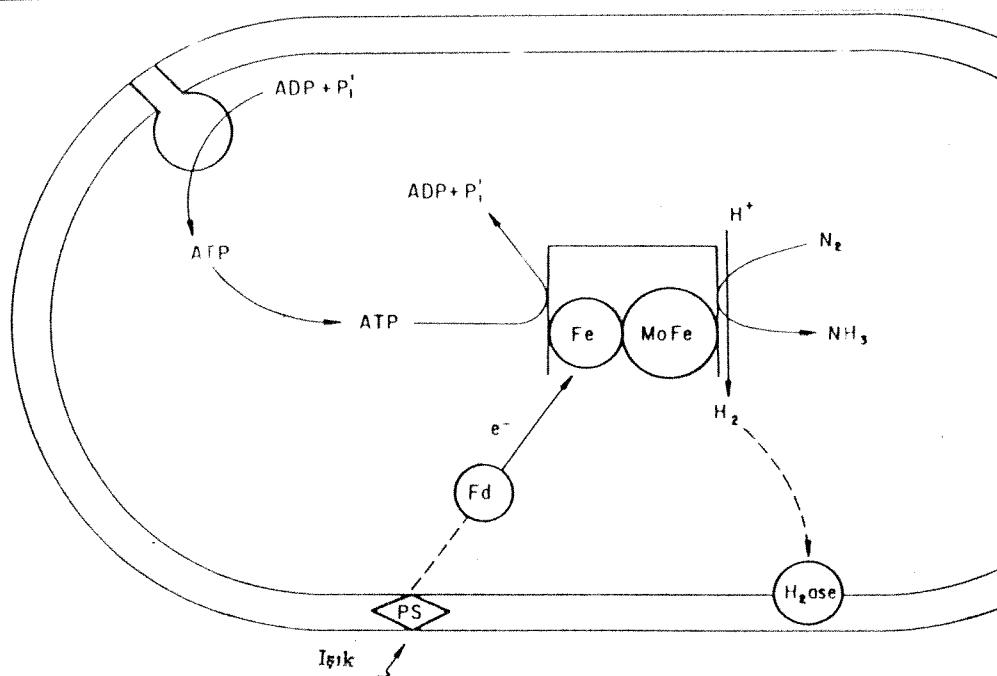
Hidrojen gazı üretilmek için fotosentetik bakterileri kullanmak daha avantajlıdır. Çünkü fotosentetik bakteriler geniş bir spektrada güneş enerjisini yakalayabilir ve yüksek ışık şiddetine dayanabilirler. Hidrojen üretim mekanizmaları daha iyi bilinmektedir. Farklı çevre koşullarında hayat fonksiyonlarını devam ettirebilirler. Anaerobik koşullarda yüksek miktarda hidrojen gazı üretebilirler. Bu sebeplerden dolayı fotosentetik bakteriler ile hidrojen üretimi çalışmaları hızla devam etmektedir.

2.2.1. Fotosentetik Bakteriler Tarafından Hidrojen Üretimi

Hidrojen metabolizmasında nitrojenaz enzimi işlev görür. Bu enzim kompleksi iki protein komponentinden meydana gelmiştir. Büyük yapılı protein dinitrojenaz, Mo-Fe protein veya komponent I adı verilir ve substrat molekülünün indirgenmesini katalizler. Küçük yapılı protein ise dinitrojenaz

Tablo 2.1. Fototrofik Mikroorganizmaların Maksimum Hidrojen Üretim Hızı

Mikroorganizma	ml/saat/g kuru ağırlık
SİYANOBAKTERİLER	
<i>Anabaena cylindrica B629</i>	4,9-40
<i>Spirulina platensis</i>	9,0
<i>Anabaena variabilis</i>	32,0
YEŞİL ALGLER	
<i>Chlorella vulgaris K</i>	4,0
<i>Chlamydomonas reinhardtii 137C</i>	45,7
<i>Scenedesmus obliquus D-3</i>	6,0
MOR BAKTERİLER	
<i>Rhodospirillum rubrum S1</i>	146
<i>Rhodobacter sphaeroides 2R</i>	29,8
<i>Rhodopseudomonas capsulata SL</i>	130-150



Şekil 2.1 *Rhodospirillum rubrum* daki hidrojen mekanizması

redniktaz, Fe-protein veya komponent II denir. Elektronların dinitrojenaz enzimine transferinden sorumludur. Her elektron transferinde 2 ATP harcanır. (Vignais et. al., 1985). Şekil 2.1 *Rhodospirillum rubrum* daki hidrojen mekanizmasını göstermektedir.

Mo-Fe proteini $\alpha_2\beta_2$ tetramar yapısında olup 200000 - 250000 Da ağırlığındadır. Yapısında 30 demir, 30 inorganik sülfür ve 2 molibden atomu yeralır (Burgess, 1984), Fe proteini ise dimer yapıda olup yaklaşık 60 000 Da ağırlığındadır.

2.2.2. Çeşitli Mikroorganizmalarla Hidrojen Üretimi

Hillmer ve Gest (1977) *R..capsulata Z-1* ile hidrojen üretimi üzerine bir çalışma yaptılar. Karbon kaynağı olarak laktat ve nitrojen kaynağı olarak glutamatın kullanıldığı kültürlerden 130 ml/saat/g kuru ağırlık hızında hidrojen üretebildiler.

Meyer ve arkadaşları (1978) *R. capsulata B10* dan 115 ml/saat/g kuru ağırlık hızında, Zürrer ve Bachofen (1979, 1982) yine bir fotosentetik bakteri olan *Rhodospirillum rubrum* dan 20 ml/saat/g kuru ağırlık hızında hidrojen üretebildiler.

Vincenzini ve arkadaşları(1982) ise *Rhodopseudomonas palustus* u agar üzerine tutturarak hidrojen üretmeye çalışılar ve karbon kaynağı olarak şeker rafinerisi atıklarını kullandılar. Bu deneyin sonucunda 43 ml/saat/g kuru ağırlık hızında hidrojen üretebildiler.

Son yıllarda *Rhodobacter sphaeroides* ile çalışılmaktadır. Özellikle Hindistanda Sasikala ve arkadaşları (1991, 1992,1995) *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ile başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Japonya'da Yeni Enerji ve Endüstriyel Teknoloji Geliştirme Organizasyonu (NEDO) desteğinde Miyake ve gurubu tarafından *Rhodobacter sphaeroides* RV suyu ile hidrojen üretebilecek bir proses geliştirilmektedir. Bu gurubun çalışmaları pilot tesis kurma aşamasına gelmiştir (Miyake ve Asada 1993). Bu gurup patent alma durumunda olduğunu belirterek çalışmaları suşun örneğini proje ekibimize göndermemiştir.

Bu araştırmada gelecekte teknolojik uygulamada ümit vaat eden *Rhodobacter sphaeroides O.U.001*(DSM 5864) ile hidrojen üretilmeye çalışılmıştır. Ayrıca sıcaklık, pH gibi değişik parametrelerin hidrojen üretimi üzerine olan etkisi denenmiştir.

2.3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Deutsch von Mikroorganizmen und Zelkulturen GmbH den temin edilen *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* (DSM 5684) kullanıldı. Bu mikroorganizmayı üretmek için kullanılan besiyerinin kimyasal yapısı Tablo 2.2 de verilmektedir.

Tablo 2.2. Değişik çözeltilerin hazırlanışı

Çözelti	Maddenin adı	Madde miktarı (g/L)	Hazırlanışı
Besiyeri	KH ₂ PO ₄	0,5	1000 ml saf suda çözülür. Hazırlanan besiyerinin pH 1 NaOH ile 6,8 e ayarlandıktan sonra birkaç dakika kaynatılır ve otoklavda sterilize edilir.
	MgSO ₂ 7H ₂ O	0,2	
	NaCl	0,4	
	Sodyum glutamat	1,8	
	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,05	
	Malik asit	1,0	
	Vitamin çözeltisi	1 ml	
	Eser element çöz.	5 ml	
Eser element Çözeltisi	Demir sitrat çöz.	5 ml	1000 mL saf suda çözüldükten sonra sterilize edilir.
	HCl (25 %)	1 ml	
	ZnCl ₂	0,070	
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0,100	
	H ₃ BO ₃	0,060	
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,200	
	CuCl ₂ 2H ₂ O	0,020	
	NiCl ₂ 6H ₂ O	0,020	
Vitamin çözeltisi	NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,040	1000 mL saf suda çözülür
	Tiamin	5x10 ⁻⁴	
	Niasin	5x10 ⁻⁴	
Demir sitrat çözeltisi	Biotin	1,5x10 ⁻⁵	100 mL saf suda çözülür
	Demir sitrat	0,1g	

2.3.1. Kültür Hazırlanması

2.3.1.1. Anaerob Sıvı Kültür Hazırlanması

Rhodobacter sphaeroides i üretmek için hazırlanan sıvı besiyeri birkaç dakika kaynatıldıktan sonra tüp ve penisilin şişelerine aktarıldı. Tüp ve şişelerden steril iğne uçları yardımıyla argon gazı geçirildi. 121 °C ta 15 dakika basınçlı buhar ile steril edildi. Tüp ve şişeler otoklavdan çıkarıldıkten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Argon gazı geçirme işlemi bir kez daha tekrar edildi. 10% luk ekim yapıldıktan sonra anaerob sıvı kültür 36 °C ta inkübe edildi.

2.3.1.2. Anaerob Katı Kültür Hazırlanması

Anaerob katı kültür hazırlamak için %10-20 oranında agar sıvı besiyerine ilave edildikten sonra 10 dakika süreyle kaynatıldı. Otoklavda steril edilen agarlı besiyeri yatık plak şeklinde tüp ve petri kaplarına konuldu ve soğumaya bırakıldı. Soğuyan agarlı besiyerine ekim yapıldıktan sonra üzeri tekrar agar ile kapatıldı. Böylece mikroorganizmalar iki agarlı besiyeri arasında bırakıldı. Aydınlıkta ve 36 °C ta etüvde inkube edildi.

Ayrıca beslenme şekillerine göre bakterinin üreme özelliklerine bakıldı. Fototrofik beslenme şekli için besiyerinden karbon kaynağı olarak kullanılan malik asit ve azot kaynağı olan amonyum klorür çıkarıldı. Hazırlanan sıvı besiyerinden CO₂ gazı geçirildi. %10 luk ekim yapıldıktan sonra 36 °C ta aydınlıkta inkübe edildi.

Kemoototrafik beslenme şekli için besiyerinden sadece malik asit çıkarıldı. Aerobik olarak hazırlanan bu besiyerine %10 luk ekim yapıldıktan sonra 36 °C ta karanlıkta inkube edildi.

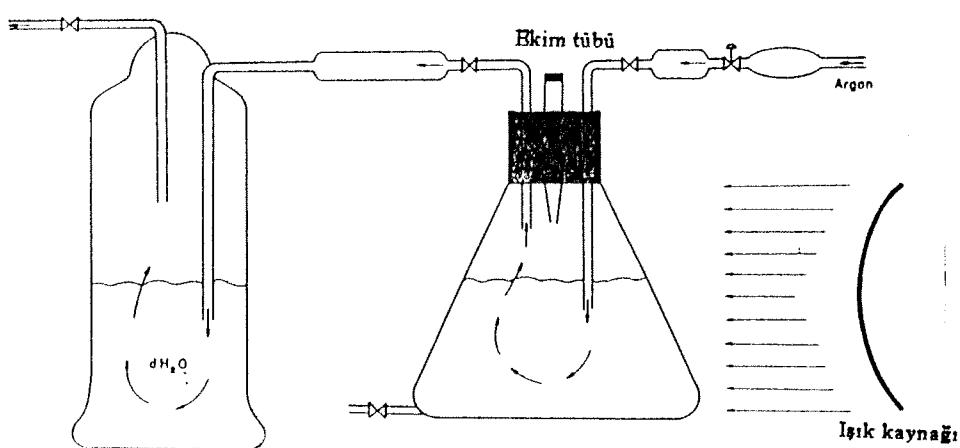
Anaerobik fermentasyon için 30 mM malik asit, 7,5 mM amonyum klorür besiyerine eklendi ve argon gazı geçirildi. %10 luk ekim yapıldıktan sonra 36 °C ta karanlıkta inkübe edildi.

Fotoheterotrofik beslenme şeklinde karbon, azot kaynakları besiyerinde kullanıldı ve anaerobik olarak hazırlandı. Bir kısım besiyerinden argon gazı geçirilmedi %10 liuk ekim yapıldıktan sonra aydınlıkta 36 °C ta inkübe edildi.

Kemoheterorofik beslenme şeklinde ise aynı besiyeri ortamı kullanıldı ve aerobik olarak hazırlandı. Karanlıkta 36 °C ta etüvde inkübe edildi.

2.3.2 *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* in Üretimi

Rhodobacter sphaeroides O.U.001 daha büyük laboratuvar gereçlerinde anaerob üretebilmek için erlenmayer kapları lastik tıpa ile sıkıca kapatıldı. Şekil 2.2 de görüldüğü gibi erlenmayerin alt tarafında bir çıkış bulunmaktadır. Bu çıkış mikroorganizmanın üreme dönemini saptayabilmek için örnek alımında kullanıldı. Tıpanın üzerinde 3 tane delik açıldı ve bu deliklere ince cam borular geçirildi. Cam borulardan biri argon hattına bağlandı ve diğeri atmosfere açık bırakıldı. Üçüncü borunun çıkışına septum konularak burdan ekim yapıldı.



Sekil 2.2 Anaerobik Üretim Düzeneği

2.3.3 Rhodobacter sphaeroides O.U.001 Üreme Eğrisi

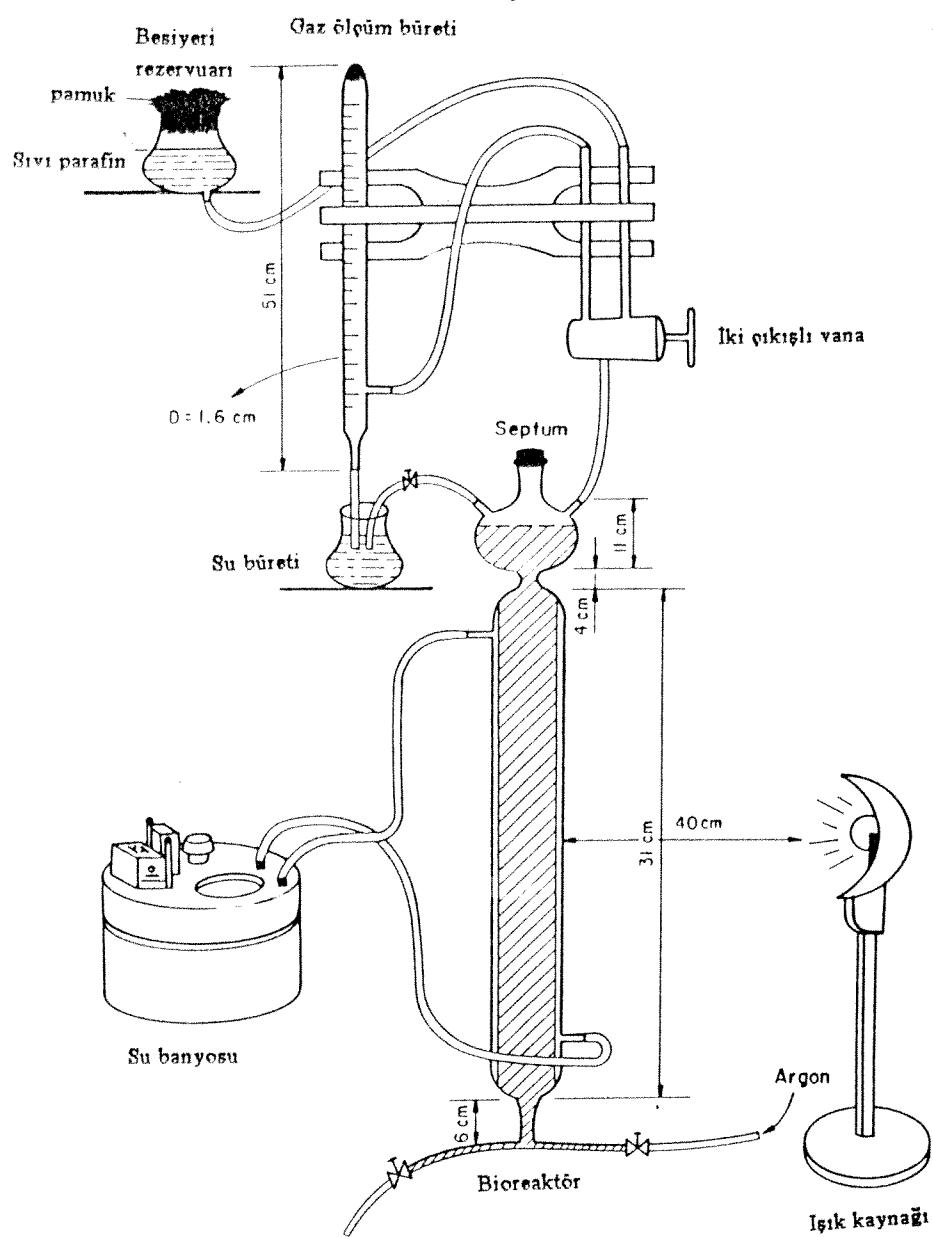
Stok kültürden steril şırınga ile 5 ml sıvı kültür çekildi ve 50 ml lik sıvı besiyerine transfer edildi. Aydınlıkta 36 °C ta 36 saat inkübe edildikten sonra bu kültürden 25 ml daha çekilerek 250 ml lik erlenmayer kabına ekim yapıldı. Yeniden aydınlıkta 36 °C ta etüvde inkübe edildi.

Işık kaynağı olarak çeşitli lambalar kullanıldı. 150 W lik Tungsten, 160 W lik civa buharlı ve 300 W lik UV lambaları deney esnasında sırayla aerob ve anaerob olarak hazırlanan kültürler üzerinde denendi ve mikroorganizmanın herbir ışık kaynağındaki üreme eğrileri çıkarıldı. Hazırlanan kültürden 2 saat arayla 3 ml örnek alındı. 2ml si pH ölçümü 1 ml si ise 660 nm deki optik yoğunluğunu bulmak için kullanıldı.

2.3.4. Biyoreaktör

Hidrojen üretim çalışmaları için etrafında su ceketi bulunan bir cam kolon reaktörü tasarlanıp imal edildi. 150 ml kapasitesinde olan silindir şeklindeki bu reaktörün yüksekliği 52 cm, dış çapı 5 cm iç çapı ise 2,5 cm dir. Şekil 2.3 de görüldüğü gibi reaktörün alt tarafında bir çıkış birde giriş hattı bulunmaktadır. çıkış hattı sıvı kültürden örnek almak için, giriş hattı ise reaktörden argon gazı geçirilmek için kullanıldı. Reaktörün üst kısmı besiyeri rezervuarı ile birleştirildi. Üretilen gaz 1,6 cm çap ve 51 cm yüksekliğindeki su dolu bürette toplanarak üretim hızı ölçüldü.

Hazırlanan besiyeri rezervuar olarak kullanılan erlenmayer içerisinde üzeri sıvı parafilm ile kaplanarak steril edildi. Daha sonra alttan argon gazı geçirilmek suretiyle üstten reaktör içine bu sıvı besiyeri aktarıldı. 15 dakika boyunca reaktörden argon gazı geçirildi. Amaç sistemi anaerobik yapmaktı. Logaritmik üreme döneminde (20 saat) bulunan kültürden steril koşullarda şırınga ile 15 ml çekilerek reaktörün üst kısmındaki septumdan ekim yapıldı. Reaktör tungsten lamba ile aydınlatıldı. Reaktör ve ışık kaynağı arasındaki uzaklık değiştirilerek hidrojen üretiminde farklı ışık şiddetinin etkisi incelendi.



Şekil 2.3. Hidrojen Üretilen Biyoreaktör ve Deney Düzeneği

Kuru ağırlık tayini yapmak için 660 nm de 0.1 optik yoğunlukta bulunan sıvı kültürden 3 ml örnek 15 ml lik santrifuj tüpüne aktarıldı. 5 dakika süreyle

7000 g de santrifüj edildikten sonra sıvı kısım atıldı. Dip kısımdaki pellet üzerine 3 ml saf su eklendi ve vortekslendi. 7000 g de 3 dakika boyunca tekrar santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldıktan sonra pellet 1 ml saf su içinde çözüldü ve daha önce ağırlığı bilinen küçük aluminyum kaba transfer edildi. Aluminyum kap 8 saat boyunca 100 °C taki fırında kaldıkten sonra tartıldı. Tartımdan sonra kabin ağırlıkları arasındaki farktan kuru ağırlık hesaplandı.

Gaz ölçüm büretinin üstündeki septumdan gaz şırıngası ile alınan numunedeki CO₂, H₂ ve Ar gaz karışımı Hewlett Packard 5890 Gaz Kromotografı ile Propak Q kolonunda analiz edildi. Taşıyıcı gaz olarak 11 ml/dak akış hızındaki azot gazı kullanıldı.

2.4. BULGULAR VE TARTIŞMA

2.4.1. Üreme Koşullarının Mikroorganizmaya Etkisi

Rhodobacter sphaeroides O.U.001 aerobik ve anaerobik koşullarda üretildi. Anaerob katı besiyerinde üretilen *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* in kolonileri sarı renkte, yuvarlak, düz kenarlı iken; aerob katı besiyerinde üretilen koloniler kırmızı renkleydi. Yapılan gram boyama testi sonucu bakterinin gram olumsuz olduğu saptandı. Mikroskop altında yapılan incelemelerde hücrenin oval yapıda ve hareketli olduğu gözlandı.

Beslenme şekline göre *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* in üreme özelliği incelendiğinde ototrofik ve kemootrotrofik beslenme tarzında üreyemediği anlaşıldı. Ayrıca anaerobik fermentasyon yapamadığı da gözlendi. Heterotrof olan bu mikroorganizma aerobik ortamda kırmızı renkte, anaerobik ortamda ise sarı renkte görülmekteydi. Mikroorganizmanın bu özelliğinden dolayı sistemin hava alıp olmadığı kolayca anlaşılmaktaydı.

2.4.2 Farklı Işık Kaynaklarının Üreme Uzerine Etkileri

Bakteri kuru ağırlığı 0,1 optik yoğunlukta 0,36 mg olarak saptandı. *Rhodobacter sphaeroides O.U.001* fotoheterotrofik olarak 36 °C ta farklı ışık kaynakları altında üretildi. Tablo 2.3 te deney esnasında kullanılan ışık kaynakları gösterilmektedir.

Tablo 2.3 Bakteri Üreme Deneylerinde Kullanılan Değişik Işık Kaynakları

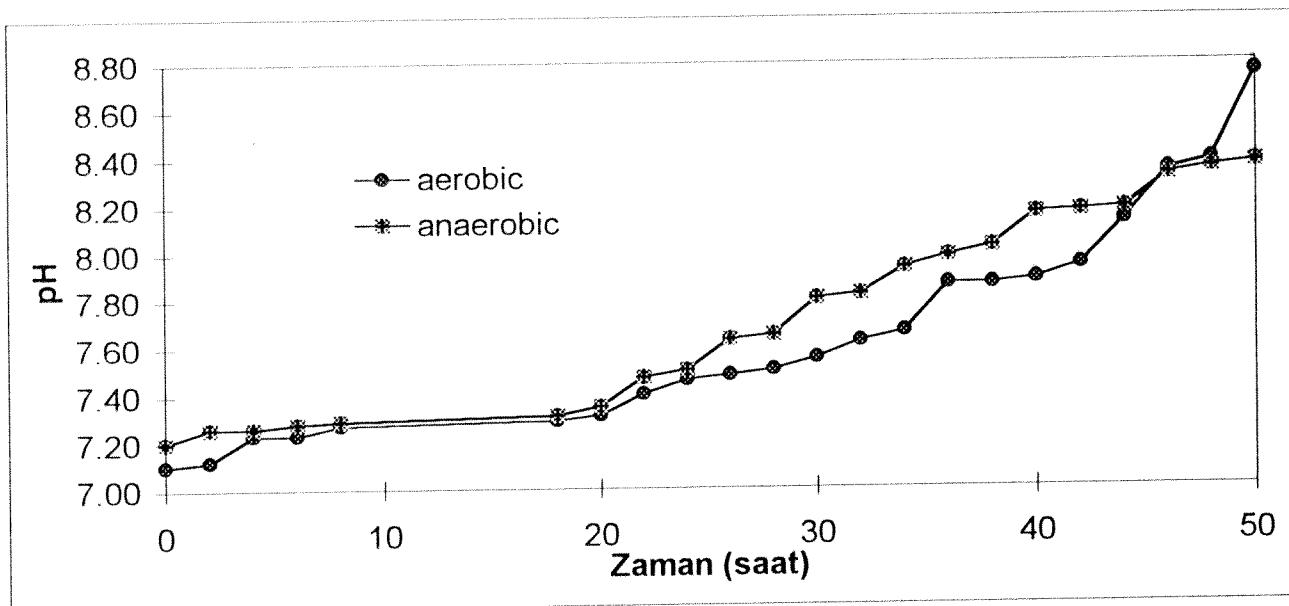
Işık kaynağı (lamba)	Uzaklık (cm)	Işık Şiddeti (W/m ²)
Tunsten (150 W)	40	200
Civa buharlı (160W)	40	300
UV (300 W)	40	400

Şekil 2.4'de tungsten lamba(200 W/m²) ile aydınlatma yapıldığında pH'nın zamana göre değişimi gösterilmektedir. Şekil 2.5'de ise aynı deneyden elde edilen üreme eğrisi gösterilmektedir. Üç tip ışık kaynağı ile aerobik koşullarda yapılan deneylerde elde edilen aerob üreme eğrileri karşılaştırıldığında UV lambası ile yapılan aydınlatmada üremenin diğer iki lamba ile yapılan aydınlatmadaki üremeden daha iyi olduğu gözlandı.

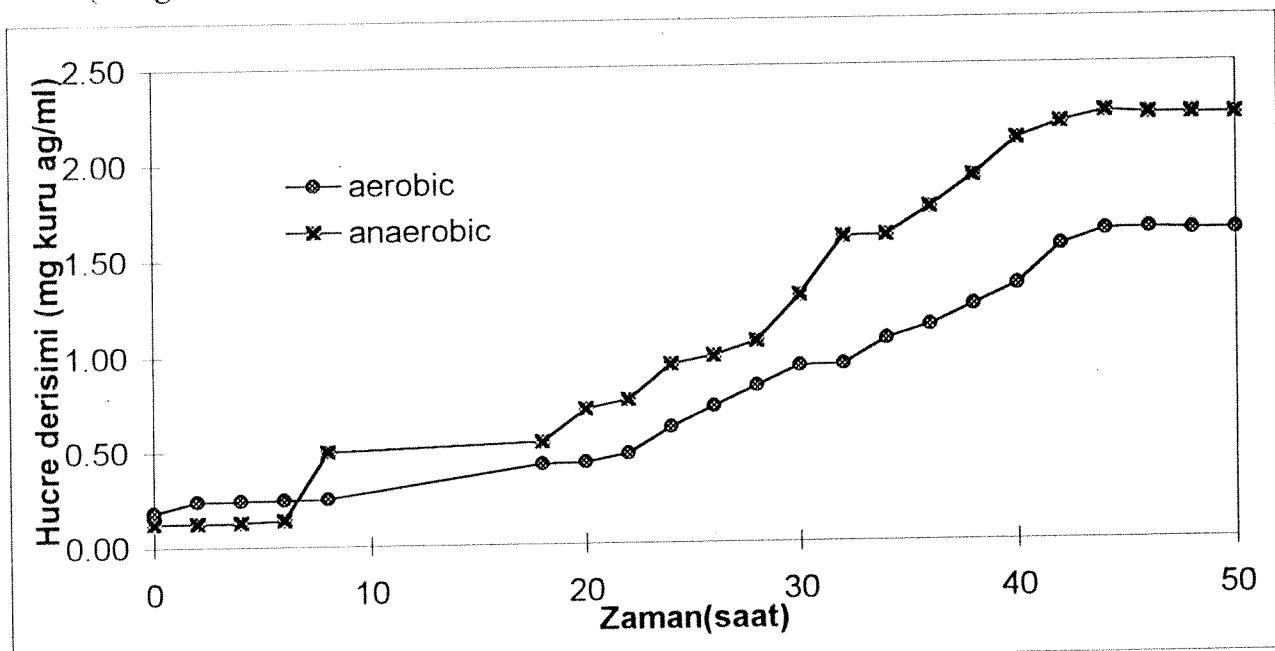
Anaerob üreme eğrileri karşılaştırıldığında ise Tungsten lambası ile aydınlatılan anaerob kültürdeki üremenin diğer iki lamba ile yapılan aydınlatmalardan daha iyi olduğu saptandı. Hidrojen üretimi anaerobik koşullarda gerçekleştiği için ışık kaynağı olarak Tungsten lambası kullanıldı.

2.4.3. Hirojen Üretimi

Hidrojen üretimi için 7 deney seti hazırlandı. Tablo 2.4 Hidrojen üretimi sırasında kullanılan deney koşullarını göstermektedir.



Şekil 2.4. Üreme esnasında pH'nın zamana göre değişimi
(Tungsten lamba, 200W/m^2)

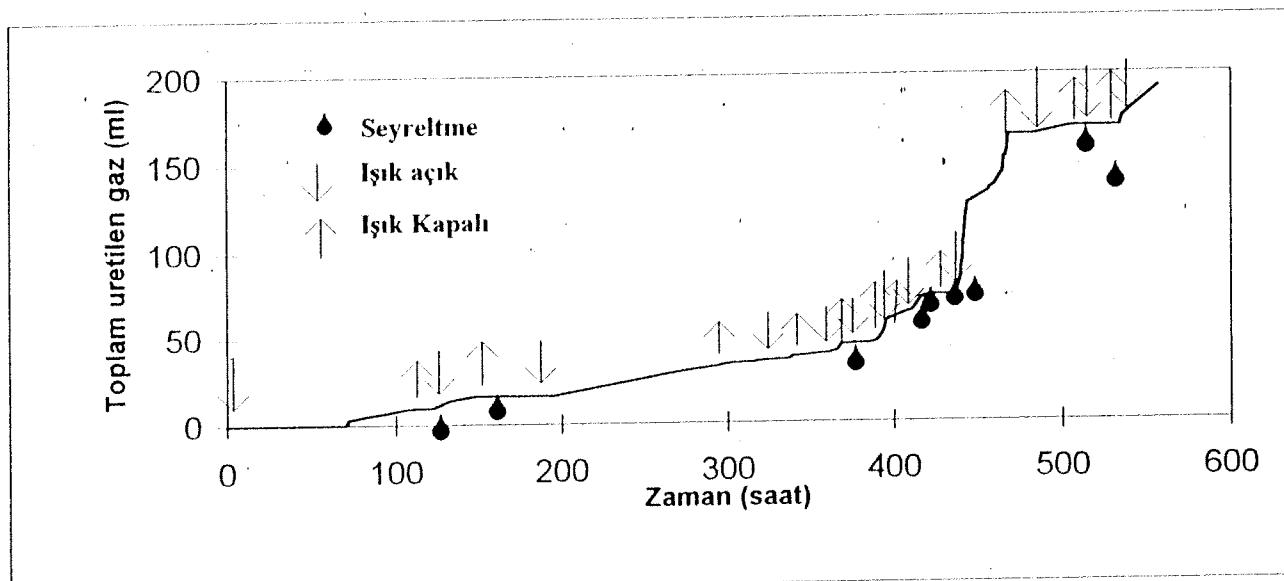


Şekil 2.5. Üreme eğrisi(Tungsten lamba, 200 W/m^2)

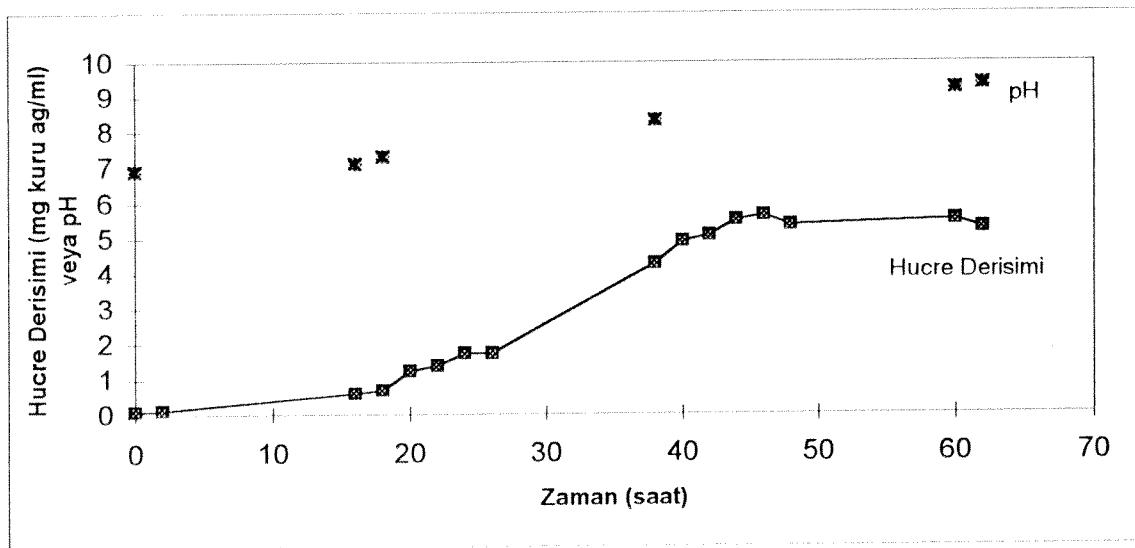
Tablo 2.4 Hidrojen üretimi sırasında kullanılan deney koşulları

Set no	İşik Şiddeti (W/m^2)	Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)	Kalma süresi (gün)	Gaz Analizi (% Ar'suz bazda)	En yüksek gaz üretim hızı(ml/saat)
1	200	36	25	H_2 bulundu	3,0
2	450	36	2,5	yapılmadı	1,3
3	200	36	2,2	yapılmadı	1,0
4	300	36	11	H_2 bulundu	4,2
5	100	31	4	% 99 H_2 % 1 CO_2	3,3
6	200	31	1	% 99 H_2 % 1 CO_2	6,9
7	200	31	3	% 99 H_2 % 1 CO_2	7,0

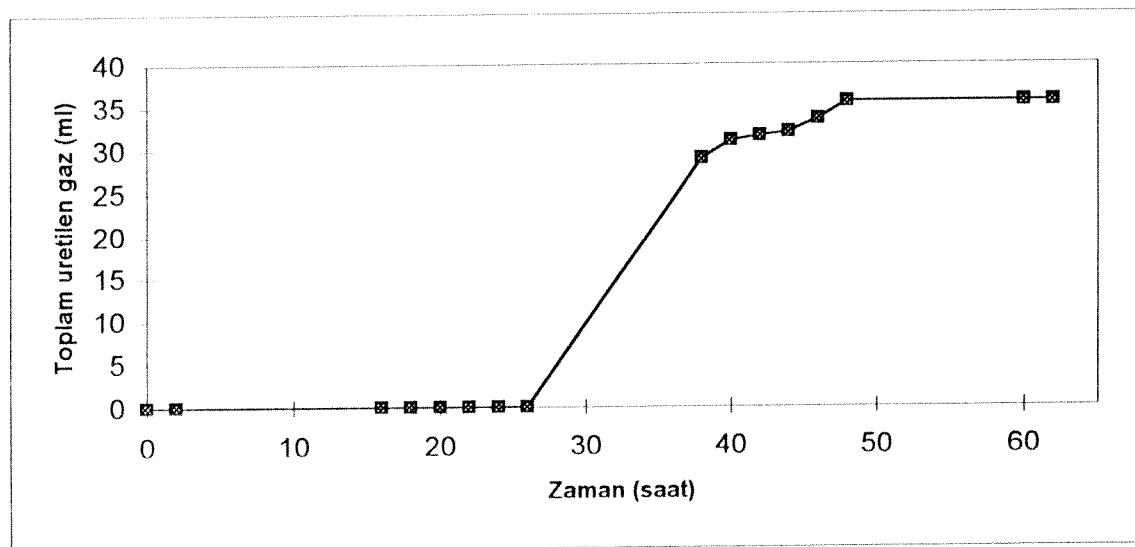
Şekil 2.6 I.Deney setinde üretilen toplam gaz miktarının zamana göre değişimini göstermektedir. İşık ve pH'nın etkisini araştırmak için yapılan bu deneyde, kültürün başlangıç pH'sı 7,2 olarak tespit edildi. pH'nın yükseldiği



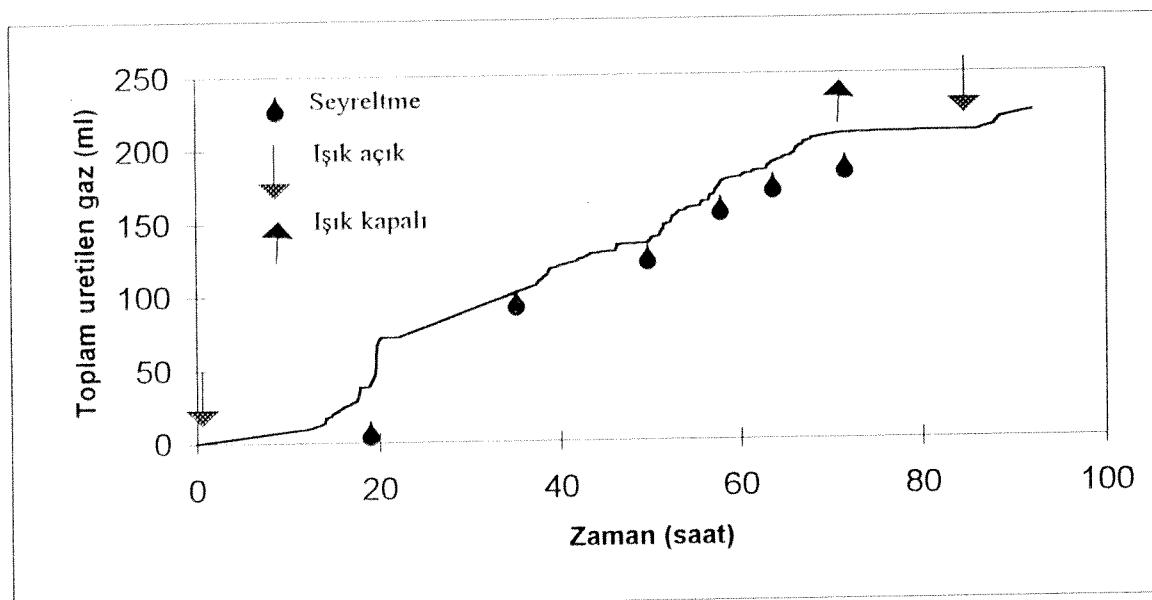
Şekil 2.6. Toplam gaz miktarının zamana göre değişimi(I.Deney Seti)



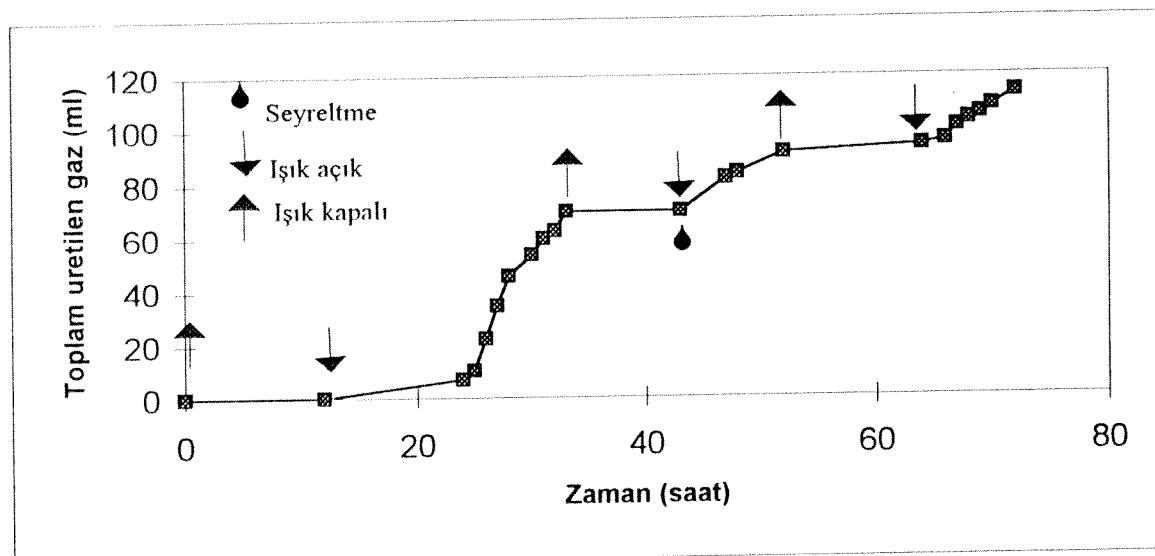
Şekil 2.7. Hücre derişiminin ve pH'nın zamana göre değişimi(II.Deney seti)



Şekil 2.8. Toplam gaz miktarının zamana göre değişimi(II.Deney seti)



Şekil 2.9. Toplam gaz miktarının zamana göre değişimi(V.Deney Seti)



Şekil 2.10. Toplam gaz miktarının zamana göre değişimi(VII.Deney Seti)

noktalarda gaz üretiminin düştüğü saptandı. pH 9'un üzerinde ise üretimin tamamen durduğu gözlandı. pH değeri reaktöre üstten taze besiyeri eklenip düşürüldüğünde gaz üretiminin tekrar arttığı görüldü. pH 7,3'de 440. saatte en yüksek gaz üretimi 3 ml/saat olduğu bulundu. Işık kapatıldığında gaz üretimi durdu, 14 saat sonra ışık tekrar açıldığında üretim tekrar başladı. Bu deney 25 gün boyunca takip edilebildi. Deney sonunda reaktörün kontamine olması nedeniyle deney durdu.

II.Deney setinde ışık şiddeti (450 W/m²) artırıldı. Başlangıç pH'sı 7 olarak ayarlandı. Deney sürekli ışık altında yapıldı. Şekil 2.7'de hücre derişiminin ve pH'nın, Şekil 2.8'de ise toplanan gaz miktarının deney süresince değişimi gösterilmektedir. pH 9,2'ye hücre derişimi ise 5,2 mg kuru ağırlık/ml geldiği zaman gaz üretimi durdu. Bu deney yüksek ışık şiddetine hücre yoğunluğunun arttığını ancak yüksek hücre derişiminin gaz üretim hızını düşürdüğünü göstermektedir.

III.Deney setinde başlangıç pH'sı 8,2 olarak ayarlandı. Bu deneyde gaz üretim hızının II.Deneye nazaran daha düşük olduğu gözlandı. Yüksek pH değerinin gaz üretim hızını düşürdüğü sonucuna varıldı.

Şekil 2.9'da gösterildiği gibi V. deney setinde sürekli hidrojen üretimi sağlandı. Bunun için aralıklarla reaktöre üstden besiyeri ilave edilirken aynı miktarda kültür alttan alınarak seyreltme yapıldı. Sürekli aydınlatmada hücre derişimi 1,5 ile 2,9 mg kuru ağırlık/ml'de ve pH 7,5 civarında tutularak 60 saat süresince hidrojen üretilenbildi. Işık kapatıldığı zaman hidrojen üretimi durdu. Son üç deney seti 31 °C 'da yapıldı.Deneylerde en yüksek hidrojen üretim hızı 7 ml/saat olarak bulunmuştur. Şekil 2.10'da VII. deney setinde birbirini takip eden aydınlık ve karanlık periyodlarda aydınlıkta gaz üretildiği karanlıkta ise gaz üretiminin durduğu izlenmiştir.

Değişik zamanlarda aynı veya değişik deneylerden alınan gaz numunelerinin kompozisyonu argonsuz bazda hesaplandığında üretilen gazın % 99 H₂, % 1 CO₂ içeriği analiz edilmiştir.

Bu araştırmada elde edilen en yüksek hız 0,047 litre gaz/saat/litre kültür olarak ifade edilerek, literatürdeki diğer araştırmacıların bulguları ile

karşılaştırılmıştır. Bu değer Kim ve arkadaşlarının (1987) *Rhodobacter sphaeroides* B6 suşu ile elde ettikleri gaz üretim hızından (0,027 litre gaz/saat/litre kültür) fazladır. Sasikal ve diğerleri (1992) şeker fabrikası atık suyunu kullanarak *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 suşunu kalsiyum aljinata tutturarak yaptıkları çalışmada 0.006 litre gaz/saat/litre kültür üretim hızı elde etmişlerdir. Gözenekli cama tutturulan *Rhodobacter sphaeroides* R.V suşu ile yapılan araştırmada ise 1,4 litre gaz/saat/litre gözenekli cam gaz üretim hızına ulaşıldığı Tsygankov ve diğerleri (1993) tarafından gösterilmiştir. Ancak son çalışmanın farklı bazda olduğu göz ardı edilmemelidir.

2.5. SONUÇLAR

Bu araştırmada *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ile anaerobik koşullarda aydınlıkta hidrojen gazı üretilenliği sonucuna varılmıştır. Üretim koşulları ; pH, sıcaklık, ışık şiddeti ve hücre derişiminin hidrojen üretim hızını etkilediği bulunmuştur. Çalışılması önerilen değerler pH'nın 7,3 ile 7,8 , sıcaklığın 31 ile 36 °C , ışık şiddetinin 200 W/m² ve hücre derişiminin 1,6 ile 1,8 mg kuru ağırlık/ml olduğu değerlerdir.

2.6 KAYNAKÇA

Burgess, B.K., *Advances in Nitrogen Fixation Research*, ed: C. Veeger and W.E. Newton,. Martinus Nijhoff, The Hague, (1984) pp: 103 - 114.

Hillmer, P. and Gest, H., Hydrogen Metabolism in the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: Production and Utilization of Hydrogen by Resting Cells, *J. Bacterial.*, 129, 732 - 9,(1977).

Kim, J.S., Ito, K. and Takahashi, H, Production of Molecular Hydrogen by a Semicontinuous outdoor culture of *Rhodopseudomonas sphearooides*, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1173 - 4,(1987).

Kondratieva, E.N. and Gogotov, I.N., Production of Molecular Hydrogen in Microorganisms, *Adv. Biochem. Bioeng. Biotech.*, 28, 139 - 191,(1982).

Meyer, J., Kelley, B.C. and Vignais, P.M., Nitrogen Fixation and Hydrogen Metabolism in Photosynthetic Bacteria, *Biochimie*,.60, 245 - 260,(1978).

Miyake, J. and Asada, Y., *Biological Production of Hydrogen by Environmentally Acceptable Technologies*, ed: New Energy Systems and Conversions by Universal Academy Press, Inc., (1993) pp 219 - 222,

Sasikala, K. and Ramana, C.H.V. and Rao, P.R., Environmental Regulation for Optimal Biomass Yield and Photoproduction of Hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* OU 001, *Int. J.Hydrogen Energy* , 16, 597-601,(1991).

Sasikala, K., Ramana, C.H.V. and Rao, P.R., Photoproduction of Hydrogen from the Wastewater of a Distillery by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001, *Int. J. Hydrogen Energy*, 17, 23 - 27,(1992).

Sasikala, K., Ramana, C.H.V. and Raghubeer, R., Regulation of Simultaneous Hydrogen Photoproduction During Growth by pH and Glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001, *Int. J. Hydrogen Energy*, 20, 123 - 126,(1995).

Tsygankov, A.A., Hirata, Y., Miyake, M., Asada, Y. and Miyake, J., *Hydrogen Evolution by Photosynthetic Bacterium Rhodobacter sphaeroides Immobilized on Porous Glass*, New Energy Systems and conversions by Universal Academy Press, Inc. (1993),pp 229 - 233.

Vignais, P.M., Colbeau, A., Willson J.C. and Jounneau, Y.,*Hydrogenase, Nitrogenase and Hydrogen Metabolism in the Photosynthetic Bacteria, Advances in Microbiol. Physiology*,36, 156 - 234,(1985).

Vincenzini, M. Materassi, R., Tredici, M.R. and Florenzano, G., Hydrogen Production from Immobilized Cells, Hydrogen Photoevolution and Wasterwater Treatment by Agar Entrapped Cells of *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodospirillum molicanum*, *Int J. Hydrogen Energy*,7, 725 - 728,(1982).

Zurre, H. and Bachofen, R., Hydrogen Production by Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *App. Envir. Microbiol.*,37, 789 - 793,(1979).

Zurre, H. and Bachofen, R., Hydrogen Production by Photosynthetic Bacterium, *Experientia*,38, 64 - 66,(1982).

BÖLÜM 3

HALOBACTERIUM HALOBIUM VE ESCHERICHIA COLI İÇEREN FOTOBİYOREAKTÖRDE HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ

3.1 ÖZET

Işık vasıtası ile H_2 gazı üretmek için, *H.halobium*'un mor zarında bulunan bakteriyorodopsin ve tuza dayanıklı *E.coli* içeren bir fotobioreaktör kuruldu. Hidrojen gazının çıkış hızı, anaerobik koşullarda büyütülmüş *E.coli*'nin üssel Üreme evresinde 247 $\mu\text{mol H}_2/\text{dak.L}$ olarak bulundu. H_2 gazının üretiminin eşli sistemlerde (*E.coli* hücreleri ile BR, veya *E.coli* hücreleri ile *H.halobium* hücreleri) sadece *E.coli*'nin varlığında gerçekleşen H_2 üretimi hızından yaklaşık %30 daha yüksek olduğu gözlandı. Bu tip sistemlerde gaz çıkıştı 24 saat sonra ortam pH'sı asidik değerlere ulaştığında tamamen durdu. Buna karşılık, ortama format ve KOH eklenmesi ile yaklaşık aynı hızda H_2 üretimi tekrar başladı. Aerobik koşullarda 4°C'de, 1 ay boyunca saklanan kültürün hala aktif olduğu gözlandı. Ayrıca, H_2 üretimi çöktürülmüş *H.halobium* ve *E.coli* hücreleri kullanılarak, sadece format, potasyum fosfat tamponu içeren ortamda da gözlandı. Bu gaz çıkıştı ortalama 36 $\mu\text{mol/dak.g}$ hücre hızı ile 14 saat sürdü.

3.2 GİRİŞ

Günümüzde kullanılan fosil kaynaklı yakıtlar sınırlı miktarlardadır. Ayrıca bu yakıtların kullanımı bir takım çevre sorunları yaratmaktadır. Bu nedenle, yenilenebilir ve temiz enerji kaynakları bulmak gerekmektedir.

Bir çözüm yolu güneş enerjisini kullanılabılır bir enerji kaynağı haline getirmektir. Bazı biyolojik sistemler güneş enerjisinden hidrojen gazı elde etmek amacıyla kullanılabilir. Hidrojen temiz ve güçlü bir enerji kaynağıdır ve aynı zamanda kimya endüstrisinin vazgeçilmez ana maddelerindendir. Gelecek vadeden araştırma alanlarından biri de biyolojik yolla hidrojen üretmektir.

3.2.1. *Halobacterium halobium*

H.halobium, *archaeabacteria* ailesinden, fotosentetik bir bakteridir. Yüksek tuz derişiminde (4 M NaCl) yaşar ve hücre zarının mor kısmında bakteriorhodopsin (BR) denilen retinal bir protein içerir. Mor zar % 25 lipid ve % 75 proteinden oluşur. BR ışıkla uyarıldığında zarın bir tarafından diğer tarafına proton pompalayarak zarın iki tarafı arasında hidrojen iyonu derişimi farklılığı yaratır. Böylelikle hücre ışık enerjisini kimyasal enerjiye çevirmiş olur. Proton derişimi farklılığı hücre tarafından ATP yapımında kullanılır (Oesterhelt et. al., 1974, 1991)

H.halobium kullanarak H₂ gazı üretimindeki ana nokta, sözü geçen bu proton farkının ATP'ye çevrilmeden moleküller H₂'ye çevrilmesidir. Ancak bakterinin kendisinde hidrojenaz enzim sistemi olmadığından H⁺ iyonlarını indirgeyememektedir. Proteinin indirgenerek H₂ gazı üretilmesi için hidrojenaz enzim sisteminin sağlanması gerekmektedir.

3.2.2. *Escherichia coli*

E.coli, *Enterobacter* ailesine mensup, gram negatif fakültatifli anaerobik bir mikroorganizmadır. Bu mikroorganizma farklı karbon bileşiklerinde yaşayabilir. Bulunduğu ortamın koşullarına ve ortamda bulunan alternatif substrat tipine göre en uygun metabolizmasını seçerek kendi üremesi ve yaşamı için optimum koşulu sağlayan biyokimyasal mekanizmalarını kullanır, gerekmeyen enzimleri sentezlemiyerek enerji tasarrufu sağlar.

Aerobik koşullarda rahatlıkla üreyebilen organizma besin olarak kullandığı glukozu veya ona dönüşebilen diğer karbohidratları EMP mekanizması ile pyruvata dönüştürür ve daha sonra da triklorasetikasit devri vasıtasi ile enerji elde eder.

Ortamdaki oksijen miktarı sınırlı olduğunda veya hiç olmadığından bakteri oksijen yerine alternatif elektron tutucuları kullanarak enerji elde etme mekanizmasını çalıştırır.

Eğer ortamda oksijen veya alternatif elektron tutucu yok ise, *E.coli* H₂ üretimi yaptığı mekanizmasını kullanır (Şekil 3.1, Tablo 3.1) Bu mekanizma sonunda H₂ ile birlikte etanol, laktat, süksünet gibi başka ürünler de oluşturur. Aslında, *E.coli* hidrojeni iki ayrı şekilde metabolize eder; H₂ kullanımı ve H₂ üretimi. Her iki metabolizma da anaerobik koşullarda çalışır ve hidrojenaz enzim aktivitesi gerektirir. Eğer ortamda alternatif elektron tutucusu varsa hücre H₂'ni elektron kaynağı olarak kullanır ve H₂'den enerji elde eder.

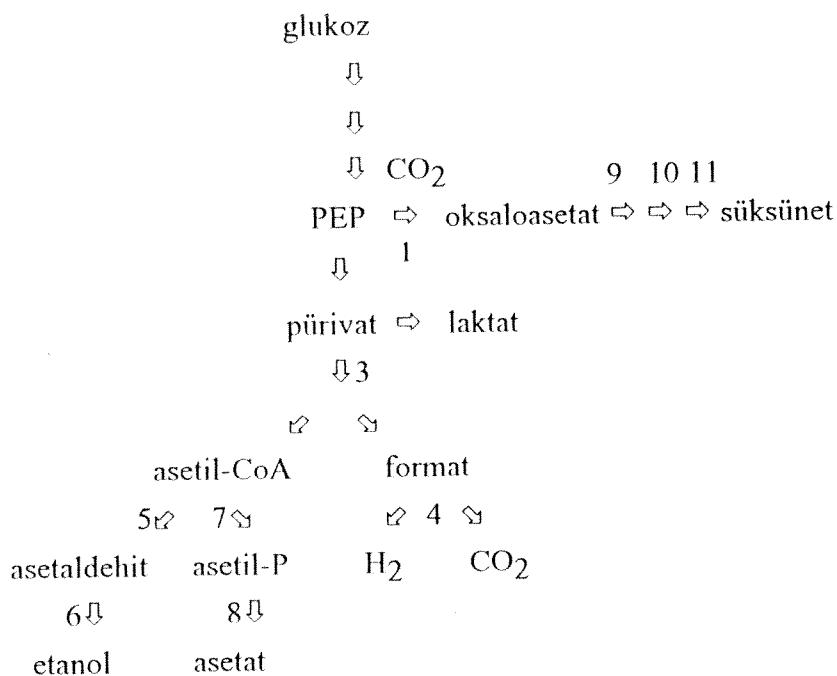
H₂ üretilen metabolizmada ise, gene anaerobik koşullarda, ortamda alternatif elektron tutucu (fumarat, nitrat, ...) yokken çalışır. Bakteri pyruvattan ürettiği formati kullanarak H₂ ve CO₂ üretir. Bu metabolizma ortamda formate varken derişimi artar ve aerobik koşullarda veya anaerobik koşullarda fumarat veya nitrat ortamında bastırılır.

E.coli de en az 3 hidrojenaz izoenzimi olduğu saptanmıştır. Bütün hidrojenazlar hücre zarına bağlı, metal içeren enzimlerdir. Bu nedenle Ni, Se, Mo gibi metallere kofaktör olarak ihtiyaç duyarlar (Gunsalus ve Park, 1994).

Hidrojenaz 2 izoenziminin H₂ kullanımında görev aldığı gözlenmiştir (Sawers et. al., 1985). Hidrojenaz 1 ise H₂ kullanımının sadece % 8 lik kısmını gerçekleştirmektedir. Diğer yandan hidrojenaz 1 sentezinin H₂ üreten enzimlerin sentezinden bağımsız olarak, format derişiminin artışıyla artan oranda olduğu bulunmuştur (Sawers ve Boxer, 1986). Hidrojenaz 3 izoenzimi ise H₂ üreten enzim olarak düşünülmektedir (Sawers et. al., 1985). Hidrojenaz 1 ve 2'nin Mr'ları bilinmemektedir, ayrıca aktif oldukları pH değerleri ve sıcaklıklar üzerinde çalışmalar vardır. Her ikiside düşük Km değerlerine sahiptirler. Hidrojenaz 3 ile ilgili henüz fazla bilgi mevcut değildir.

3.2.3 Eşli Sistem

H.halobium'un mor zarında bulunan BR proteini ışık altında hücre dışına hidrojen iyonu pompalar. Böylelikle ışık enerjisini kimyasal enerjiye çevirir. Ama H₂ üretmek için gereken hidrojenaz sisteminden yoksundur. Bu nedenle *E.coli* hidrojenaz sistemi *H.halobium*'un fotoaktivitesi ile eşleştirilebilir. Böylelikle H₂ üretiminin



Şekil 3.1 Anaerobik Üretililen *E.coli*'de Karbon Akışı

Tablo 3.1 Anaerobik karbon akışında kullanılan enzimler (sayılar Şekil 3.1'deki enzimleri belirtir)

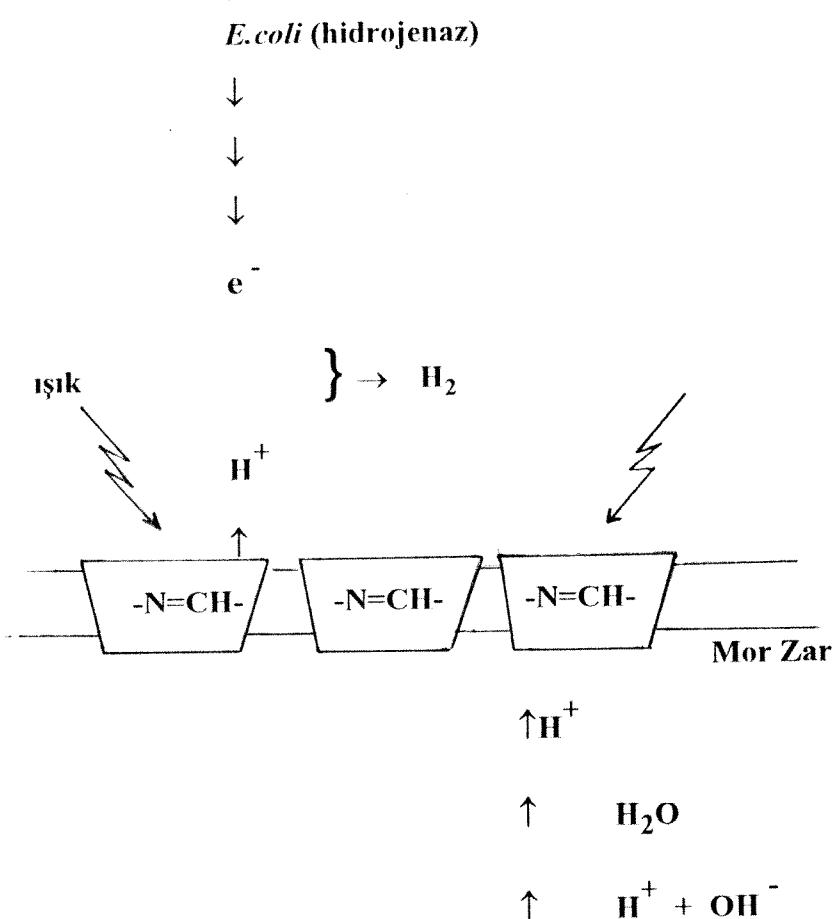
Sayı	Enzim
1	PEP karboksilaz
2	Laktat dehidrojenaz (anaerobik)
3	Pürvat format liaz
4	Format hidrojen liaz
5	Asetaldehit dehidrojenaz
6	Alkol dehidrojenaz
7	Fosfotransasetilaz
8	Asetat kinaz
9	Malat dehidrojenaz
10	Fumaraz B (anaerobik)
11	Fumarat redüktaz

sağlandığını gösteren şema Şekil 3.2'de verilmiştir. Hindistan da bir grubun bu tip çalışmalar ile H_2 üretimi gözlemiştir (Taqui Khan ve Bhatt, 1989).

3.2.4 Amaç

Bu çalışmanın amacı *E.coli* ve *H.halobium* eşli sistemi ile H_2 gazı üretmektir. Bu amaca ulaşmak için aşağıda belirtilen kriterler göz önünde bulundurulmuştur.

- H.halobium* veya BR ile maksimum fotoaktivite elde edilmesi için koşulların optimize edilmesi.
- E.coli* hidrojenaz sisteminin sentezi için gerekli anaerobik şartların optimize edilmesi.
- H_2 gazı üretmek için *E.coli* ve *H.halobium* içeren bir fotobioreaktör kurulması



Şekil 3.2 *H.halobium* ve *E.coli* Eşli Sistemi İle H_2 Gazı Çıkış Mekanizması

3.3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.3.1 *H.halobium*'un Üretilmesi

H.halobium S-9 suşunun üretimi Oesterhelt ve Stoeckenius (1974) yöntemine göre yapılmıştır. Besi ortamı litrede 250 g NaCl, 20 g MgSO₄.7H₂O, 3,64 g Trisodyum Sitrat.5,5H₂O, 2g KCl, 10 g pepton içerir. pH aralığı 6,7-7,8 olan besi ortamının sterilzasyonu otoklavda yapılmıştır.

3.3.2 *H.halobium*'un çöktürülmesi

Yedi gün süre ile üretilmiş olan hücreler Sorval sentrifüjde çöktürülmüştür (6620g, 60 dakika). Çöktürülen hücreler bazal tuz çözeltisi (peptonsuz besi ortamı) ile yıkanarak, yeniden aynı koşullarda sentrifijlenmiştir. Çöken hücreler -20 °C'de saklanmıştır.

3.3.3 Mor Zarın Saflaştırılması

Saflaştırma işlemi Zabut (1987)'un belirttiği değişiklikler doğrultusunda Oesterhelt ve Stoeckenius (1974)'a göre yapılmıştır.

3.3.4 Mor Zarın Karekterizasyonu

Saflaştırılan zardaki tek protein olan bakteriorhodopsin (BR)'in derişimi, BSA protein standarı kullanılarak, Lowry (1951) yöntemi ile yapılmıştır. Protein derişimi ayrıca spektrofotometrik yöntem ile 570nm'de ($\epsilon_{\text{max}}:63000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) belirlenmiştir. BR'ın molekül ağırlığı 1-D SDS PAGE ve 2-D IEF SDS PAGE jel elektroforez kullanılarak Naqvi (1993)'ye göre belirlenmiştir.

3.3.5 BR'ın Fotoaktivite Ölçümleri

BR' fotoaktivitesi su ceketli bir fotobiyoreaktörde , periodik olarak uygulanan ışık altında (1575 W/m^2) zamana karşı pH değişimi olarak ölçüldü. Ölçümler farklı sıcaklıklarda (5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 37°C), farklı başlangıç pH'larında, farklı iyon derişimlerinde (0,1 , 1 M KCl) ve ışık şiddetlerinde (866 , 1575 W/m^2) tekrarlandı.

3.3.6 *E.coli* nin Üretilmesi

Tuza dayanıklı *E.coli* DS1576 suyu aerobik olarak % 2,5 Luria Broth (LB) besi ortamında, 37 derecede, 12 saat süre ile, 100 rpm de sallanarak üretildi. LB besi ortamı % 0,5 maya özütü, % 1 triptone, % 1 NaCl içerir.

Bakteri anaerobik şartlar altında (argon atmosferinde), başlangıç pH'sı yaklaşık 7'ye ayarlanarak aşağıdaki besi ortamlarında, 37 derecede üretildi.

- i) LB besi ortamı (% 2,5)
- ii) LB besi ortamı (% 2,5)' na ek olarak, glukoz (%1,5) sodyum format (%0,2) ve metal tuzları (NiCl_2 (500 μM), $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (10 μM), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 μM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%0,02), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%0,1), KH_2PO_4 (%0,08), Na_2HPO_4 (%0,05), NaCl (%0,2), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (%0,01)) Aerobik ve anaerobik hücre üremesi spektrofotometrik yöntemlerle 660 nm de gözlemlendi.

3.3.7 *E.coli* 'nin Çöktürülmesi

12 saat üremiş olan *E.coli* kültürü 4000 g de 15 dakika sentrifüj edildi. Çöken hücreler ağırlıkları tayin edilerek hemen kullanıldı (anaerobik deneyler için 7-8 saat üremiş olan kültür kullanıldı.).

3.3.8 Biyoreaktör Tasarımı

Çalışmaların ilk aşamalarında, aerobik şartlar altında, kesikli tipde, 2 farklı biyoreaktör kuruldu. Fakat gaz üretimi gözlenemediği için burada verilmemektedir.

Daha sonraki aşamalarda, anaerobik şartlar altında çalıştırılan su ceketli bir fotobioreaktör kurldu. Tablo 3.2' de fotobioreaktörün özellikleri verilmiştir. Şekil 3.3'de görüldüğü gibi biyoreaktörün kapağına 4 adet giriş yapıldı. Birincisi deney ortamının anaerobik şartlarını sağlamak için argon gazı girişi olarak kullanıldı. İkinci girişe pH metre elektrodu yerleştirildi. Böylelikle deney süresince pH değişimleri ölçüldü. Gerektiğinde reaktöre anaerobik şartlar bozulmadan enjektör ile herhangi bir ekleme yapılabilmesi için 3. girişe septumlu bir tüp yerleştirildi. En son delik ise çikan gazı toplama ünitesine bağlandı. Bu ünitenin altındaki T vanası sayesinde bu çıkış aynı zamanda argon çıkışı olarak kullanılabilir. Deney süreci başında yeterli miktarda argon gazı sistemden geçirildikten sonra T vanası H₂ gazı toplama ünitesine çevrilerek çikan gaz üst kısımdan septum ile sıkıca kapatılmış, atmosfere açık ve su dolu bir kaba batırılmış olan tüpte toplandı.

3.3.9 *E.coli* Anaerobik şartlarda üretilirken H₂ Gazı Çıkışı

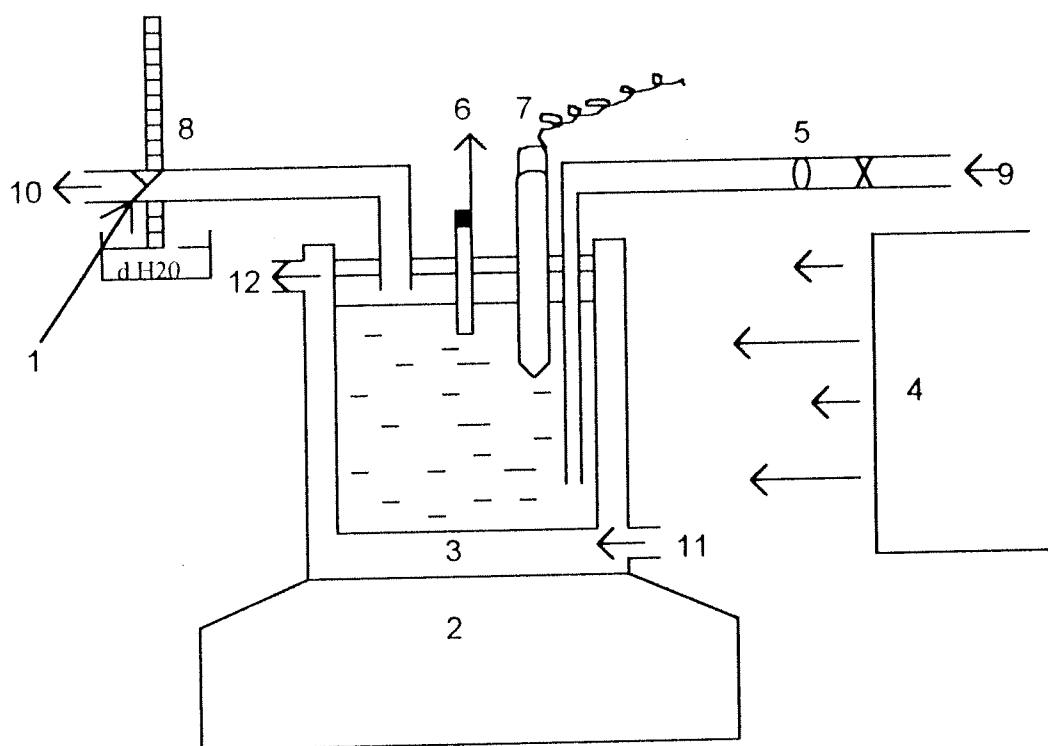
E.coli'nin anaerobik besi yeri (LB + glukoz + format + metal tuzları)'ne önceden 5-8 kez aerobik olarak üretilmiş *E.coli* kültürü ile ekim yapıldı. Başlangıç pH's nötr olan (6,7-7,0) 130ml'lik besi ortamı 37 derecede sabit tutuldu. Üretim sırasında oluşan gaz hacimsel olarak gaz akışölçer ile; ve ayrıca gaz kromatografi vasıtsı ile kantitatif olarak ölçüldü. Aynı zamanda deney süresince ortamın pH'ı kaydedildi.

3.3.10 BR ile Eşlenen *E.coli*'nin Anaerobik Üretimi Sırasında H₂ Çıkışı

H.halobium'dan saflaştırılan mor zar parçacıkları, BR derişimi 5 μM olacak şekilde deney ortamına eklendi. 1575 W/m² ışıklandırma periyodik olarak uygulandı.

3.3.11 *H.halobium* ile Eşlenen *E.coli*'nin Anaerobik Üretimi Sırasında H₂ Çıkışı

Çöktürülmüş 0,05 g *H.halobium* hücreleri deney ortamına eklendi. 1575 W/m² ışıklandırma periyodik olarak uygulandı.



Şekil 3.3 Anaerobik fotobioreaktör (1. T vanası, 2. Manyetik karıştırıcı, 3. Su ceketi, 4. Işık kaynağı, 5. Steril filtre, 6. Enjeksiyon tüpü, 7. pH elektrodu, 8. Gaz toplama ünitesi, 9. Argon girişi, 10. Argon çıkışı, 11. Su girişi, 12. Su çıkışı)

Tablo 3.2 Anaerobik fotobioreaktörün çalışma şartları

Toplam hacmi :150 ml

Kullanım hacmi : 130 ml

Yükseklik : 17 cm

Dış çap : 5,5 cm

İç çap : 2,5 cm

Çalışma ısısı : 37°C

Işıklandırma :1575 W/m²

Argon akış hızı : 4 ml/dak

Başlangıç pH'sı : 6,5-7,0

3.3.12 H₂ Üretimini Etkileyen Faktörler

i) Ortam pH'sının H₂ Üretimine Etkisi :

H₂ üretimi sırasında ortamın pH'sı 4,6- 4,9 değerlerine düşügü gözlandı. Ortamın pH'sını nötr düzeye çıkartmak amacıyla 1 M KOH enjeksiyon tüpünden, ortamdan argon geçirilirken, eklendi. Daha sonra gaz ve pH ölçümleri tekrarlandı.

ii) Format Eklenmesinin H₂ Üretimine Etkisi :

Format H₂ üretimi reaksiyonunun substrati olduğu için ortamda bulunması önemli bir faktördür. Son derişimi 0,2 % olacak şekilde sodyum format eklendi ve ölçümler tekrarlandı.

3.3.13 Anaerobik Üretilmiş *E.coli* Hücrelerinin ve *H.halobium* Hücreleri ile Besiyeri Olmayan Ortamda H₂ Üretimi

Deneysel sodyum format (1 M), potasyum fosfat tamponu (0,1 M), KCl (1 M) içeren 130 ml'lik ortamda 0,05 g *H.halobium* ve 0,15 g *E.coli* (anaerobik üretilmiş) kullanılarak 37 derecede ve argon atmosferinde yapıldı. Periodik olarak ışıklandırma (1575 W/m²) uygulandı.

Ayrıca; deneysel yukarıda belirtilen ortama metal tuzları eklenerek tekrarlandı.

3.3.14 Gaz Analizi

2 ml'lik gaz örnekleri gaz toplama ünitesinin tepesindeki septum kullanılarak, gaz geçirmeyen bir enjektör ile alındı ve analizi gaz kromatografi (Helwert 5890 Packard Seri II) cihazı ile yapıldı. Gaz kromatografi çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Enjeksiyon sıcaklığı : 35 °C

Fırın sıcaklığı : 30 °C

Dedektör sıcaklığı : 40 °C

Dedektör cinsi : İstı iletme dedektörü

Kolon : Propak Q (2 m, 80/100 mesh paket kolon)

Taşıyıcı gaz : N₂ (11 ml/ dak)

3.4 BULGULAR VE TARTIŞMA

3.4.1 *H. halobium*'un üretimi ve Fotoaktivitesi

H. halobium üreme eğrileri ve fotoaktivitesi ile ilgili sonuçlara Bölüm 4'de ve proje ara raporlarında yer verildiği için burada tekrar edilmemektedir. Saflaşırılan BR'ın derişimi Lowry (1951) yöntemi ile 5.4mg/ml bulundu, ayrıca BR'ın molekül ağırlığı Naqvi(1993)'ye göre 1-D SDS PAGE ve 2-D IEF SDS PAGE jel elektforez kullanılarak 26 000 Dalton, İzoelektrik noktası ise 6.68 olarak bulundu.

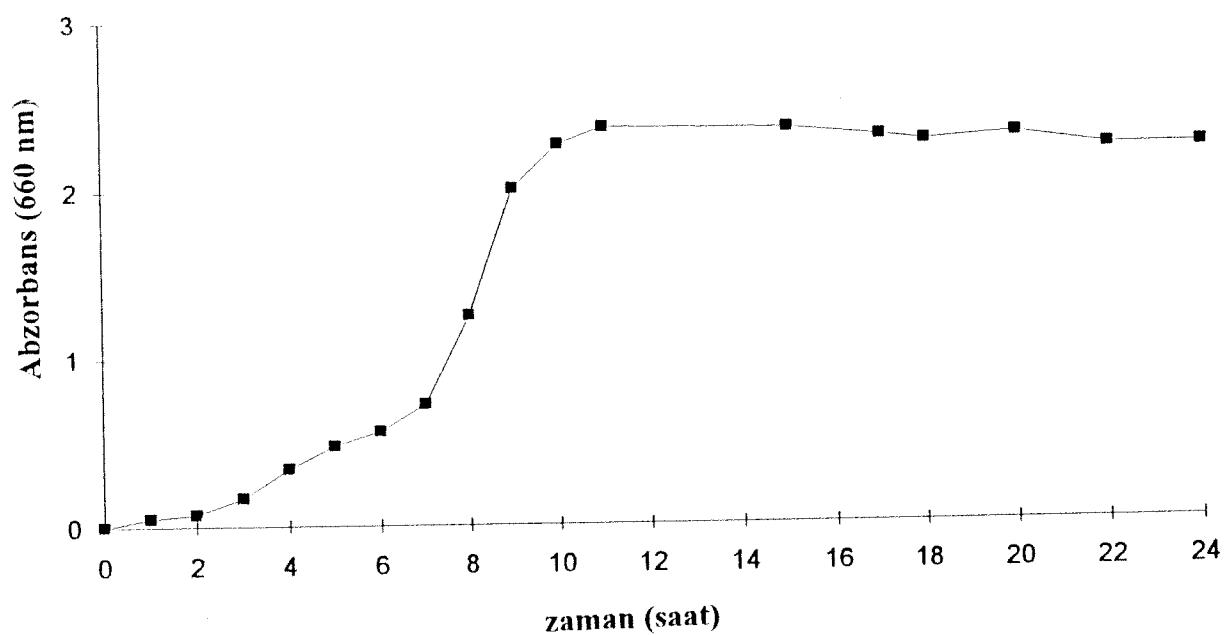
3.4.2 *E.coli* 'in aerobik ve anaerobik üretimi

Şekil 3.4(a)'da görüldüğü üzere *E.coli*'nin üremesi aerobik koşullarda gayet yüksek değerlere ulaştı. Şekil 3.4(b) ve (c)'de ise anaerobik üretimi görülmektedir. Bu şartlar altında sadece LB ortamı üreme için yeterli olmadı. Ama LB ortamı glukoz, format ve metal tuzları ile zenginleştirildiğinde Üreme verimli düzeye ulaştı.

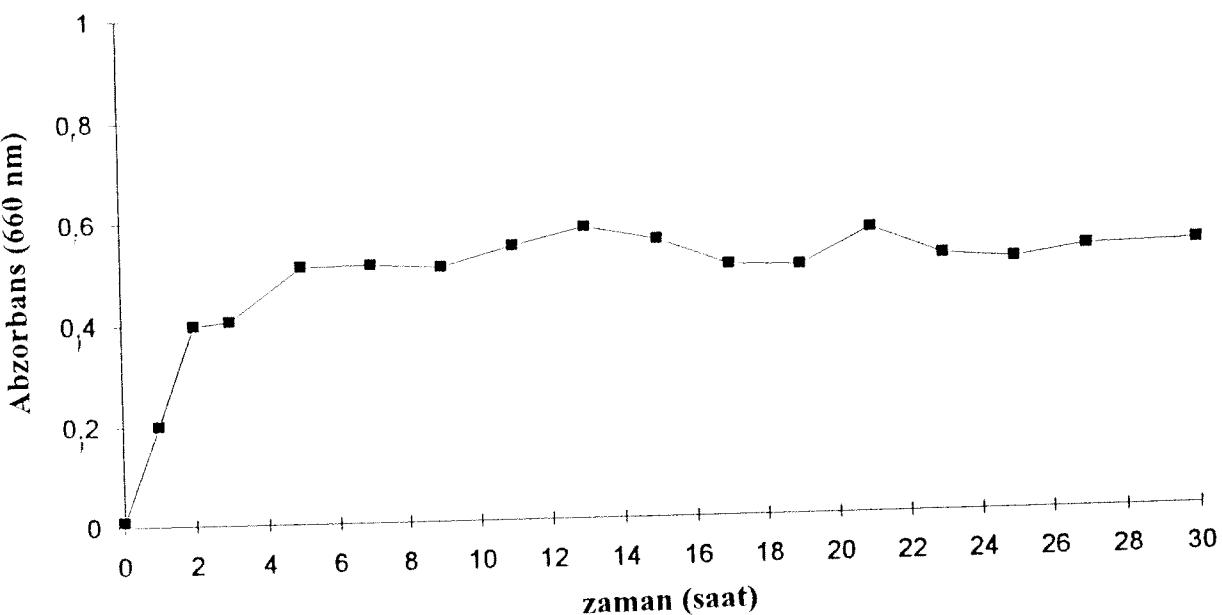
3.4.3 Anaerobik Koşullarda Üretilen *E.coli* Hücreleri İle H₂ Gazi Üretimi

Anaerobik koşullarda üretilen *E.coli*'nin karışık asit fermentasyonu sırasında meydana gelen gazın hacmi zamana karşı kaydedildi (Şekil 3.5.(a)) ve gaz kromotografisi kullanılarak, gaz kompozisyonu analiz edildi. Aynı zamanda biyoreaktördeki pH elektrodu vasıtası ile ortamin pH'sında meydana gelen değişikler ölçüldü (Şekil 3.5.(b)).

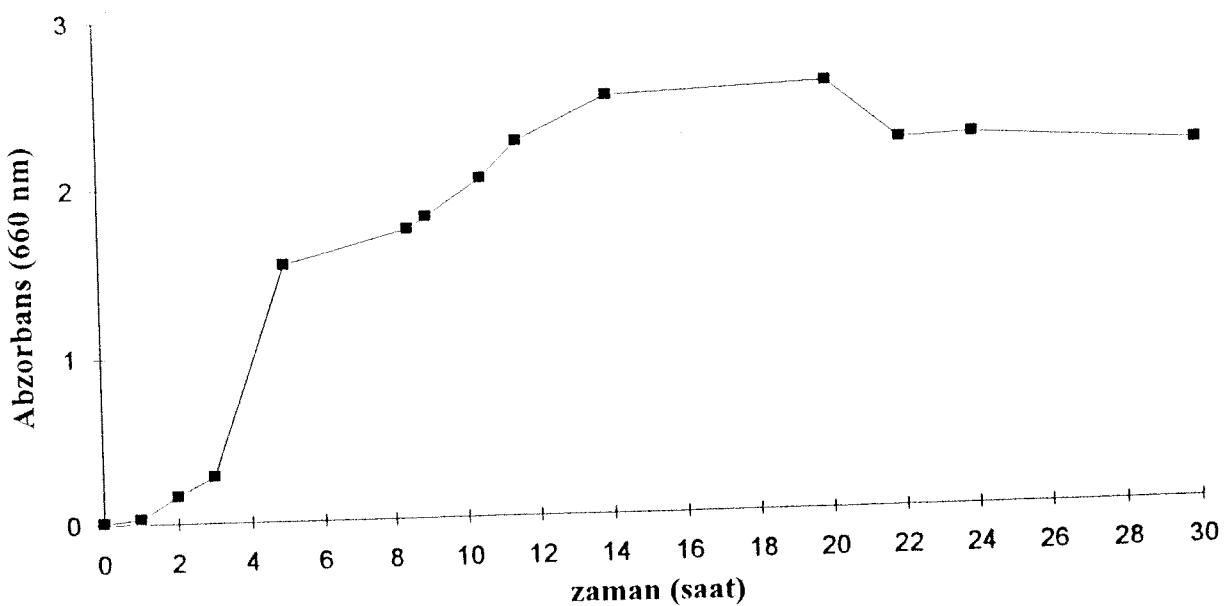
Anaerobik koşullar H₂ gazı üreten hidrojenaz enzim sistemlerinin sentezi ve aktivitesi için gereklidir (Zinnani *et al* 1985, Lutz *et al* 1991, Sankar *et al* 1988). Nitekim aerobik koşullar altında üretilen *E.coli* ile H₂ gazı çıkışı gözlemlenmemiştir. Anaerobik koşullarda glukozun katabolik yıkımı sırasında eğer ortamda elektron tutucu



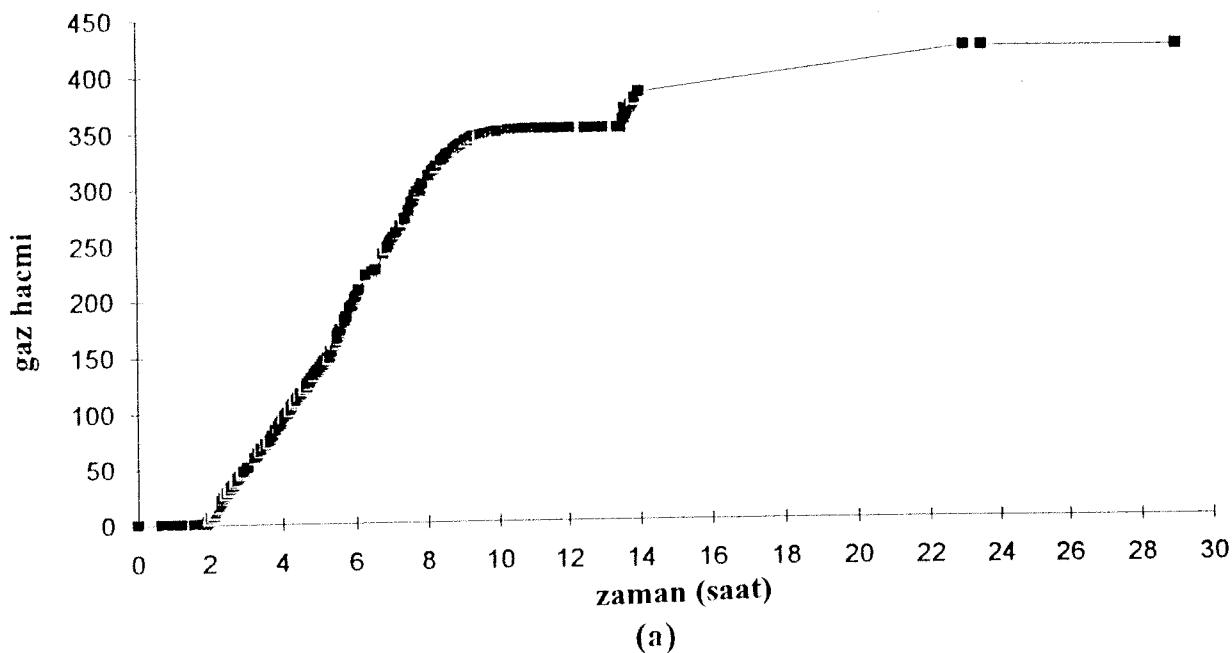
Şekil 3.4 (a) *E.coli*'nin Aerobik Üreme Eğrisi



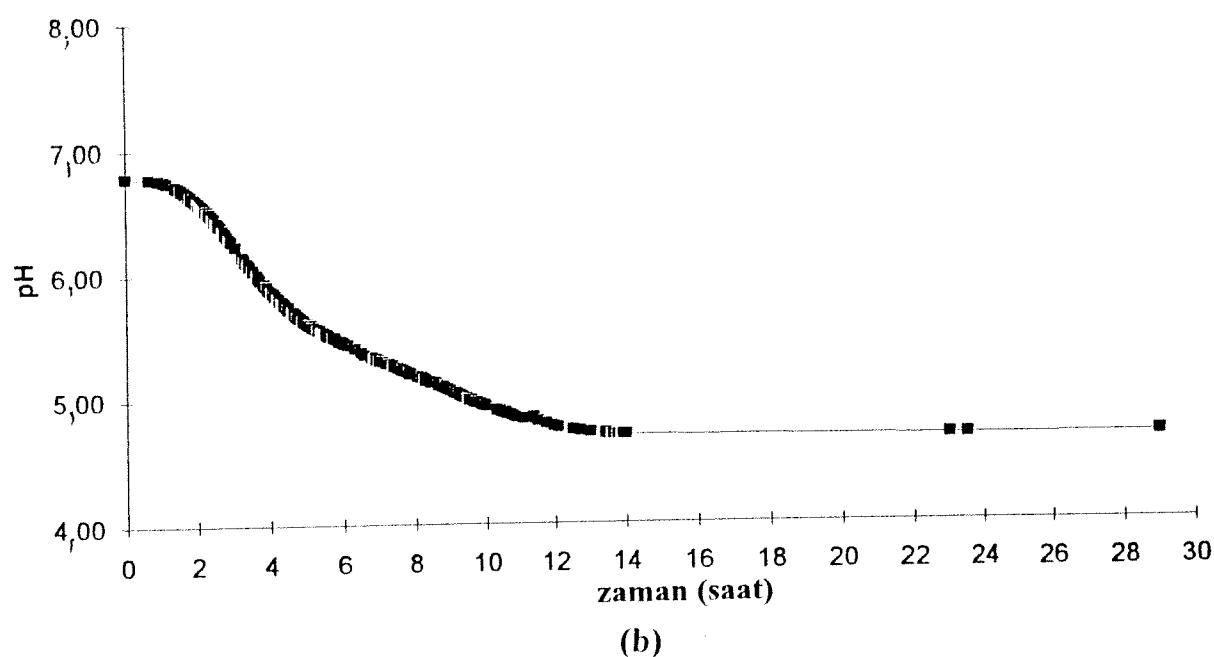
Şekil 3.4 (b) *E.coli*'nin Anaerobik Üreme Eğrisi
(LB ortamında)



Şekil 3.4 (c) *E.coli*'nin Anaerobik Üreme Eğrisi
(LB ortamı + format + metal iyonları)



(a)



(b)

Şekil 3.5 (a) *E.coli*'nin Anaerobik Üremesi Sırasında Toplam H₂ Gazi Çıkışı
 (b) Üreme Sırasında Ortamın pH Değişimi

yoksa bakteri pyruvattan formata geçmekte ve formatı kullanmaktadır. Dolayısı ile meydana gelen H₂ gazı miktarı daha azdır. Kondratieva ve Gogotov (1982) yaptıkları çalışmada anaerobik koşullarda büyüyen *E.coli* ile 100 µmol glukoz kullanarak 75 µ mol H₂ gazı üretmişlerdir. Bu çalışmada anaerobik koşullarda dışarıdan format ekleyerek sadece *E.coli* sistemi ile 16,7 mmol H₂/10,8 mmol glukoz elde edilmiştir. Bu değer yaklaşık yukarıdaki değerin iki katıdır.

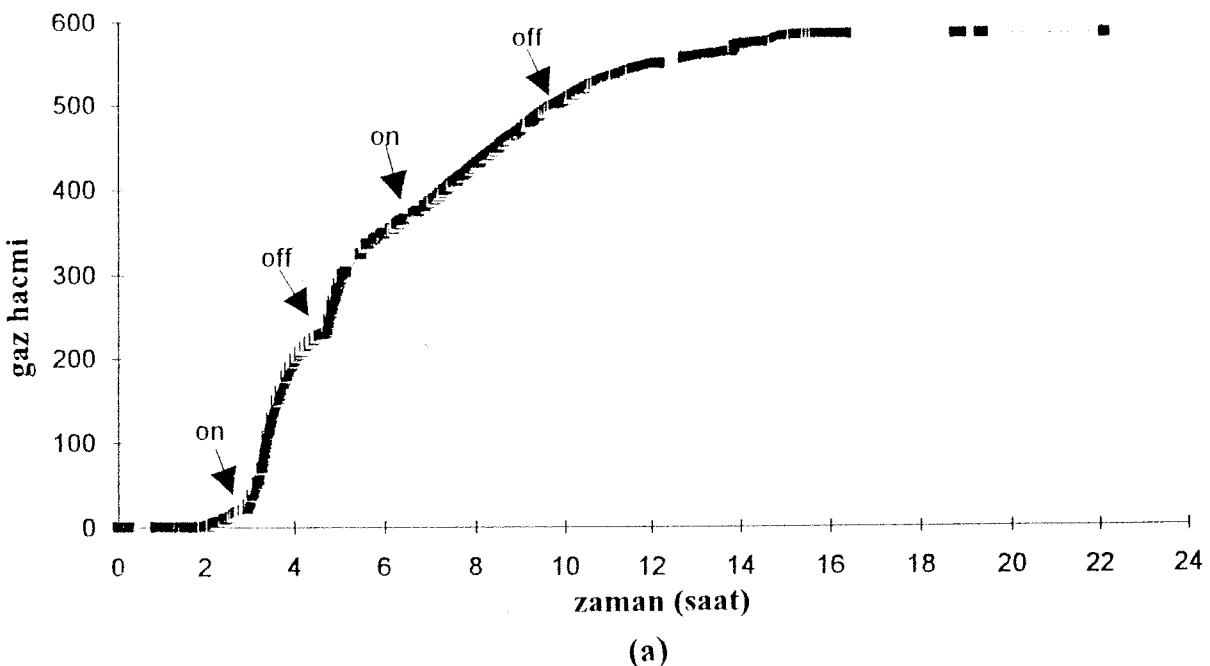
Formata ek olarak ortama Mg, Se, Ni gibi iyonların eklenmesi hidrojenaz enziminin sentezini ve aktivesini pozitif yönde etkileyen faktörlerdir. Toplam gazın %80'ni bakteri üremesinin 2. ve 9. saatlerinde gözlenmiştir. Gaz çıkıştı sırasında pH değerleri 6,6-5,04 olarak ölçülmüş, 14. saatin sonunda gaz çıkıştı tamamen durmuş olup pH değeri 4,7 (asidik) değerlere ulaşmıştır.

3.4.4 Anaerobik Koşullarda Üretilen *E.coli* ve BR Kullanarak H₂ Gazı Üretimi

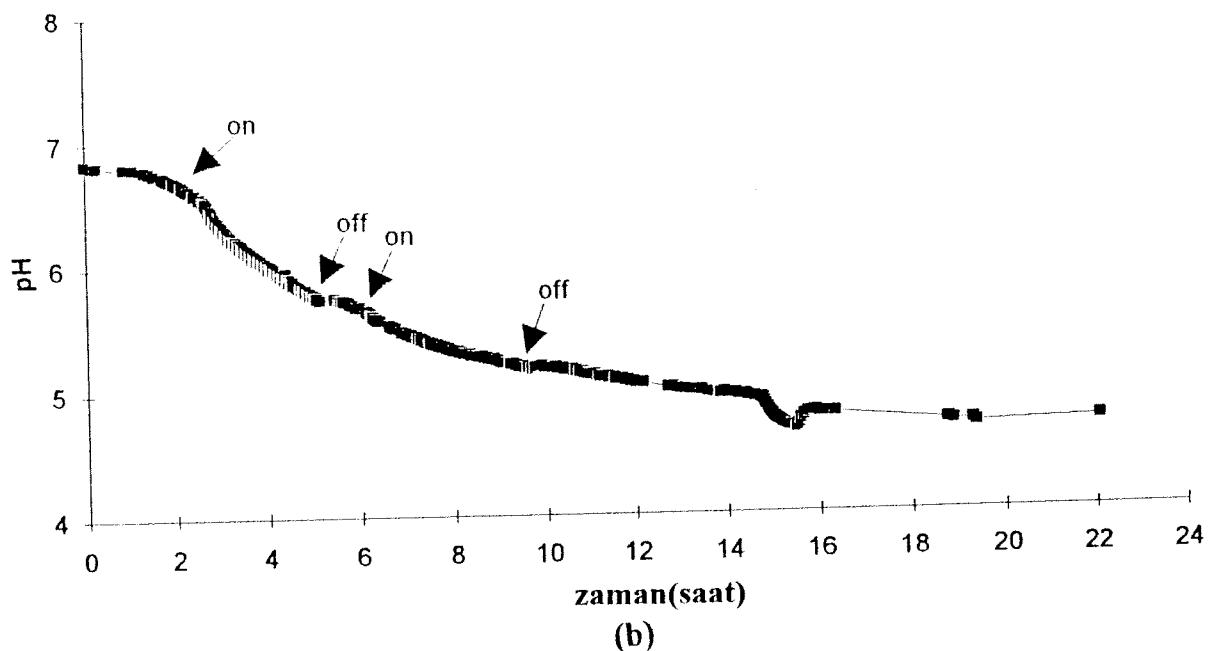
Anaerobik koşullarda üretilen *E.coli* hücrelerine 5 µM BR ilave edilmesi ile oluşturulan bileşik sistemde H₂ gazı üretimi Şekil 3.6.(a)'da verilmiştir. Ortamın pH'sında meydana gelen değişiklikler zamana karşı kaydedilmiş ve sonuç 3.6.(b)'de gösterilmiştir. H₂ gazı üretimi *H.halobium* çöktürülmüş hücreleri (0,05 g) kullanarak aynı koşullarda tekrarlanmış sonuçlar Şekil 3.7.(a) ve (b)'de verilmiştir. Her iki deneyde de toplam H₂ gazının %80'ni bakteri ekiminden sonraki ilk 2. ve 9. saatler arasında gözlenmiş, *E.coli* ve *H.halobium* sisteminde toplam 572 ml ve *E.coli* ve BR sisteminde 557 ml gaz toplanmıştır. Gaz çıkıştı 12 saat süre ile devam etmiştir. *H.halobium* veya BR kullanarak elde edilen H₂ gazının miktarının ve saflık derecesinin birbirine çok yakın olduğu gözlenmiştir. Saflaştırma basamağı atlandığı için *H.halobium* çöktürülmüş hücrelerinin kullanımı daha uygun görülmüştür .

3.4.5 Hidrojen Gazı Çıkışına pH Etkisi

Anaerobik koşullarda üreyen *E.coli* sistemlerinde, biyoreaktörün pH'sının 4,9-4,6 değerlerine düşmesi ile gaz çıkışının durduğu gözlemlenmiştir. pH değeri H₂ gaz eldesi için kısıtlayıcı bir faktör olarak görülmektedir. Balentina ve Boxer (1985) ve



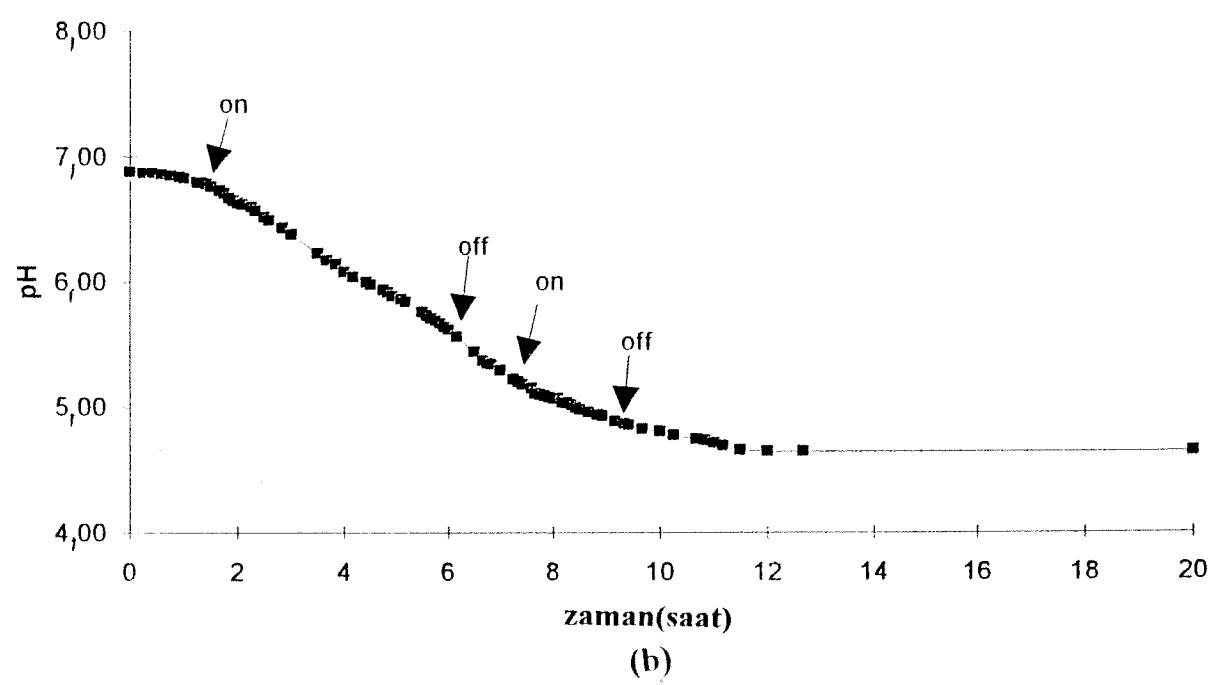
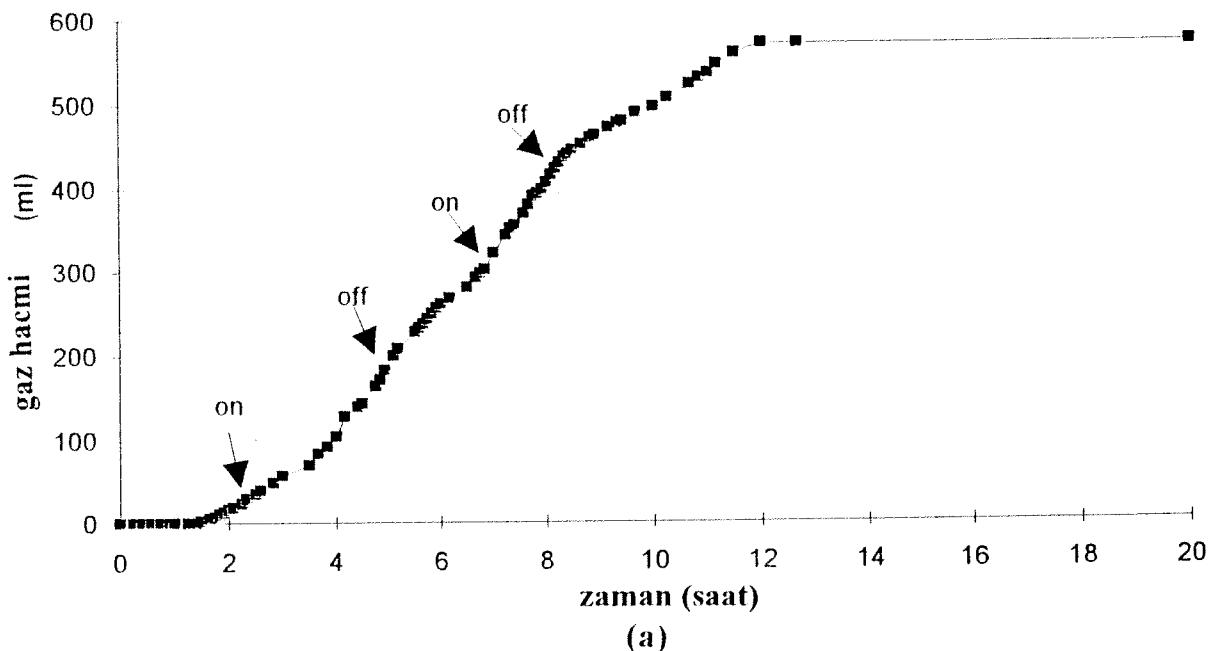
(a)



(b)

Sekil 3.6 (a) Anaerobik Üreyen *E.coli* ve BR İkilisi ile H₂ Gazi Çıkışı

(b) Ortamın pH Değişimi (on: aydınlık , off: karanlık)



Şekil 3.7 (a) Anaerobik Üreyen *E.coli* ve *H.halobium* İkilisi ile H_2 Gazı Çıkışı
 (b) Ortamın pH Değişimi (on: aydınlık , off: karanlık)

Sawer ve Boxer (1986) hidrojenaz 1 enziminin, geniş bir aralık olan, pH:4-10 sınırları arasında aktif olduğunu ve hidrojenaz 2 enziminin ise pH:6-7 değerleri arasında maksimum aktivitede olduğunu göstermiştir. Ancak hidrojenaz 3 enzimi ile ilgili bilgi mevcut değildir. Bu çalışmada biyoreaktördeki pH değeri 1 M KOH ilavesi ile 6,3-7,0 değerlerine çıkarılınca tekrar gaz çıkışı gözlenmiştir. Bu koşullarda gaz çıkışının 6 saat süre ile devam ettiği görülmüştür. Sonuçlar Şekil 3.8.(a) ve (b)'de verilmiştir. Ancak gaz çıkış hızının düşük olması, pH'nın yanı sıra gaz çıkışını etkileyen diğer faktörlerin de araştırılmasını gerektirmiştir.

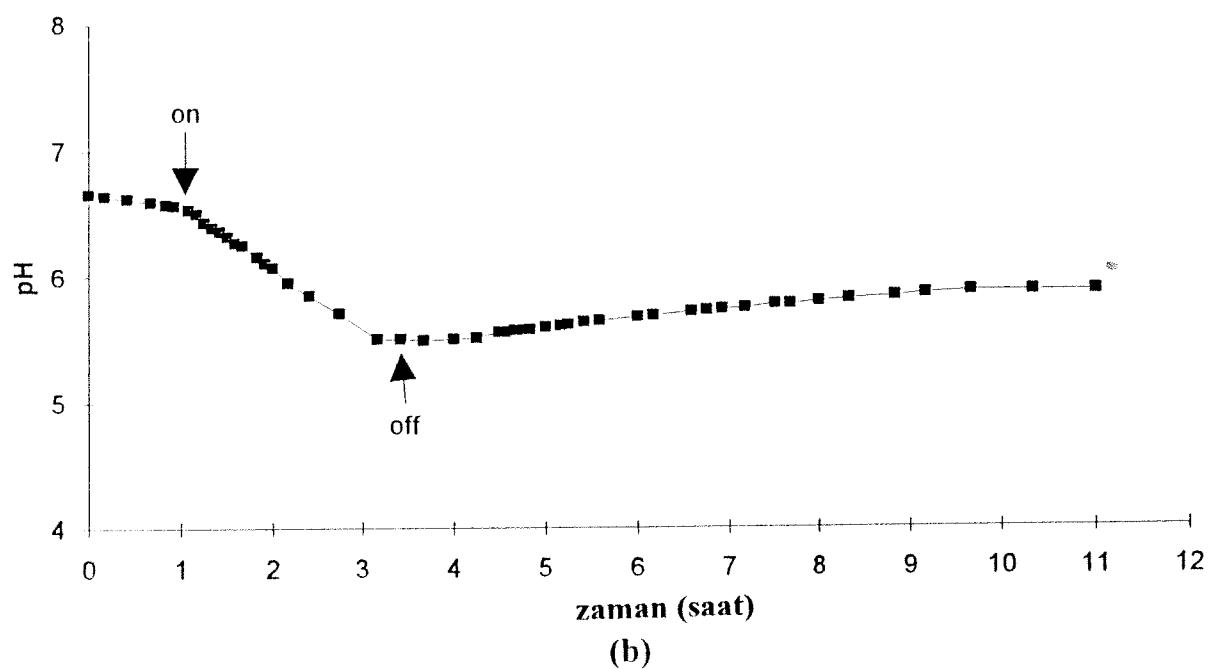
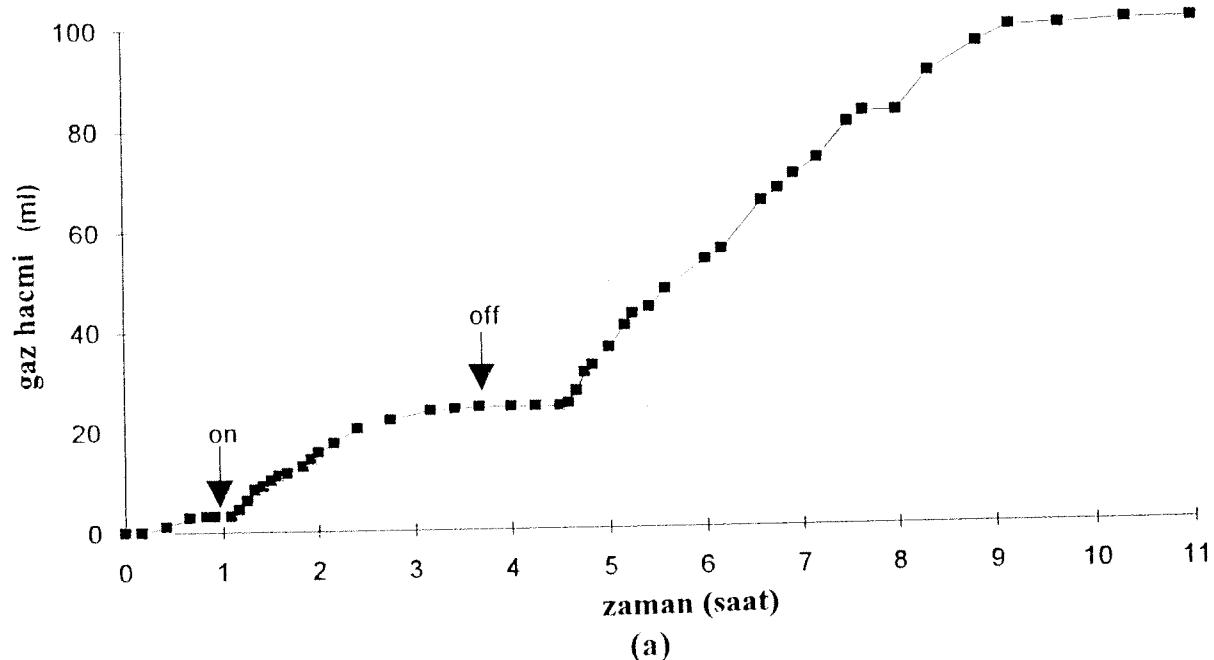
3.4.6 Formatın H₂ Gaz Çıkışına Etkisi

Kondratieva ve Gogotov (1982) anaerobik koşullarda üreyen *E.coli* hücreleri ile H₂ gazi çıkışının format ilavesi ile arttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada gaz çıkışı tamamen duruktan sonra ortama son derisimi 0,2 % olacak şekilde sodium format ve KOH (1 M) ilavesiyle gaz çıkışının tekrar başladığı görülmüştür (Şekil 3.9.(a) ve (b)). Toplam 718 ml gaz çıkışı olmuş ve 26 saat süre ile devam etmiştir. Yaklaşık gaz çıkış hızı 0,21 mmol/dak.L olarak hesaplanmıştır. 50 saat sonunda gaz çıkışı durmuş ve ortamın pH değeri 5,11 olarak kaydedilmiştir. Ortama ikinci kez format ve KOH ilavesi ile gaz çıkışı tekrar başlamış ve daha sonraki 8 saat süre ile toplanan veriye göre gaz çıkış hızı 0,18 mmol/dak.L olarak hesaplanmıştır. Bu deneylerden formatın H₂ gaz çıkışı için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

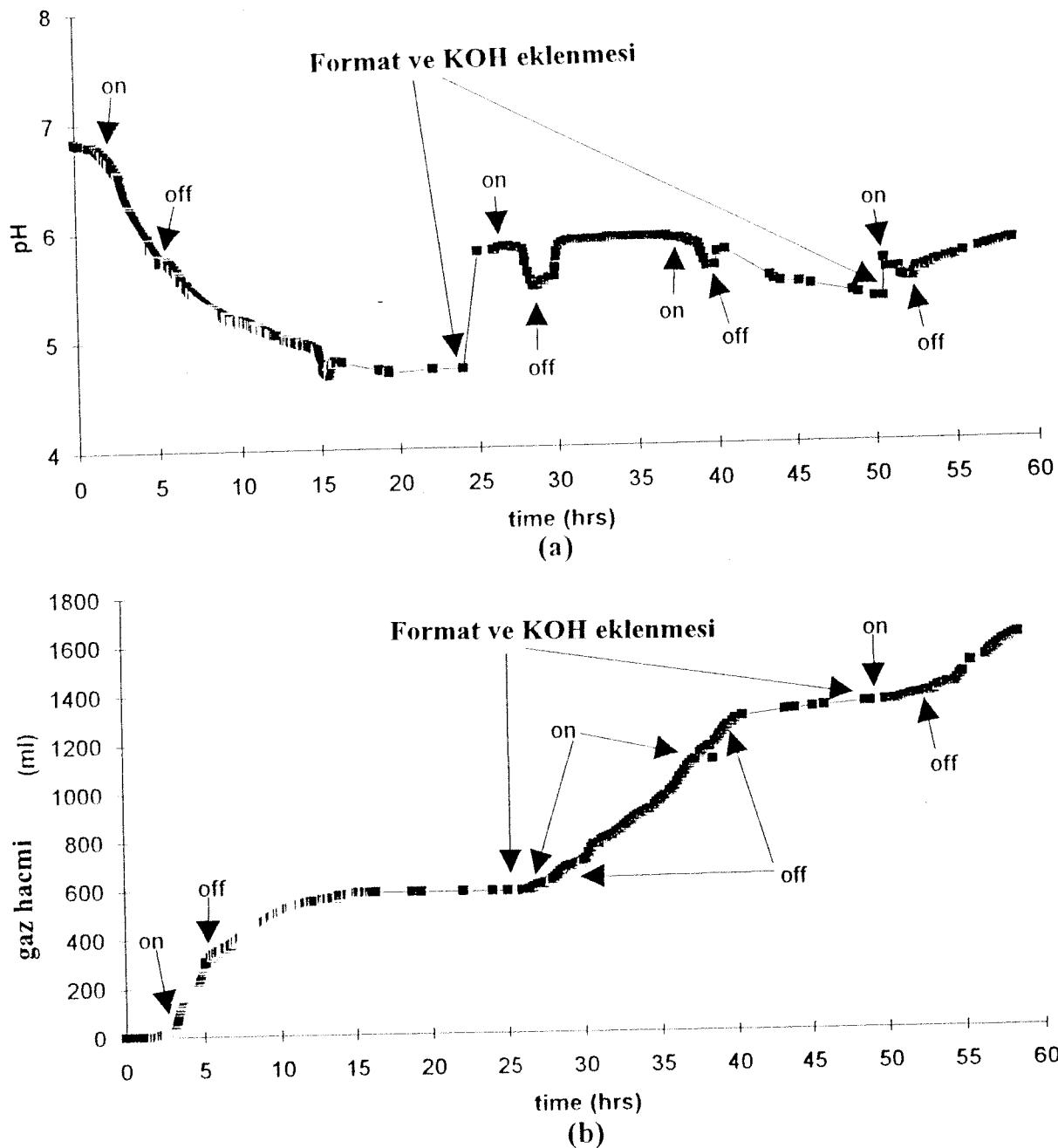
Anaerobik koşullarda üreyen *E.coli*-BR eşli sistemi 4 derecede buz dolabında bir ay süre ile muhafaza edilmiş ve format ilavesinden sonra gaz çıkışı 0,102 mmol/dak.L hız değerinde 16 saat süre ile devam etmiştir. Hızda düşüş olmasına rağmen numuneler yaklaşık % 30 aktif kalmıştır (Şekil 3.10.(a) ve (b)).

3.4.7 Çöktürülmüş Hücrelerle H₂ Gazı Üretimi

E.coli ve *H.halobium* hücreleri sırası ile anaerobik ve aerobik koşullarda üretildikten sonra hücreler sentrifüjlenerek çöktürüldü ve 0,15 g *E.coli* ve 0,05 g *H.halobium* çöktürülmüş hücreleri biyoreaktörde 1 M sodium format, 100 mM potasyum

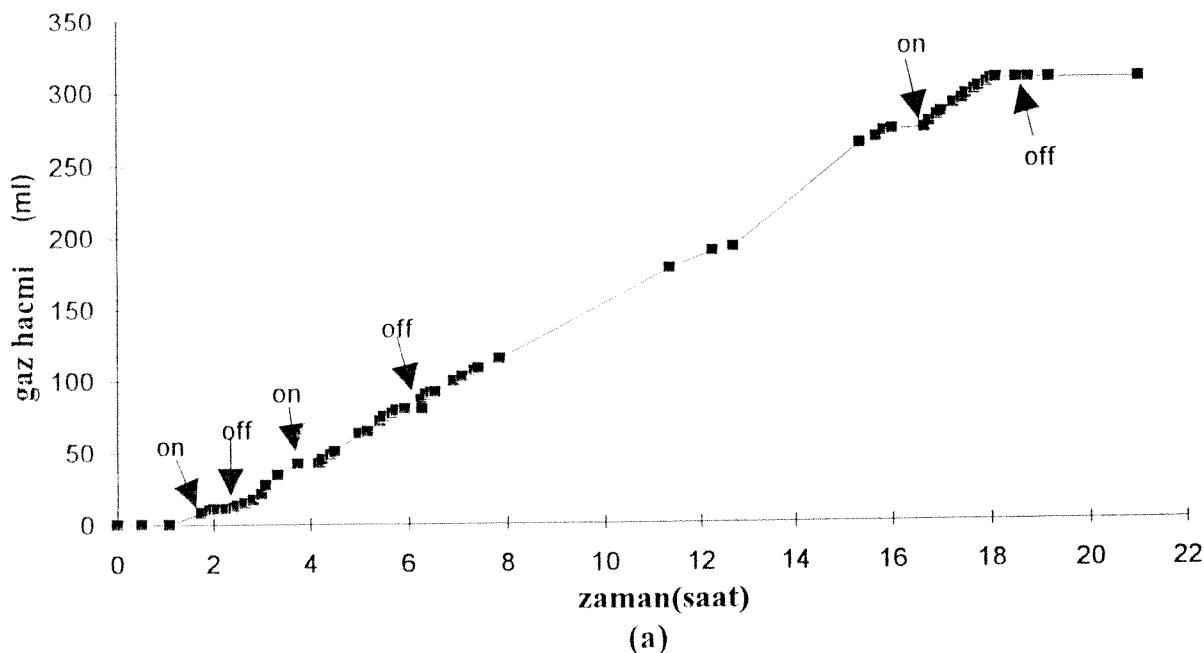


Şekil 3.8 (a) Anaerobik Koşullarda Ortamın pH'ının Ayarlanmasıın H_2 Gazi
Çıkışına Etkisi (b) Ortamın pH Değişimi (on: aydınlık , off: karanlık)

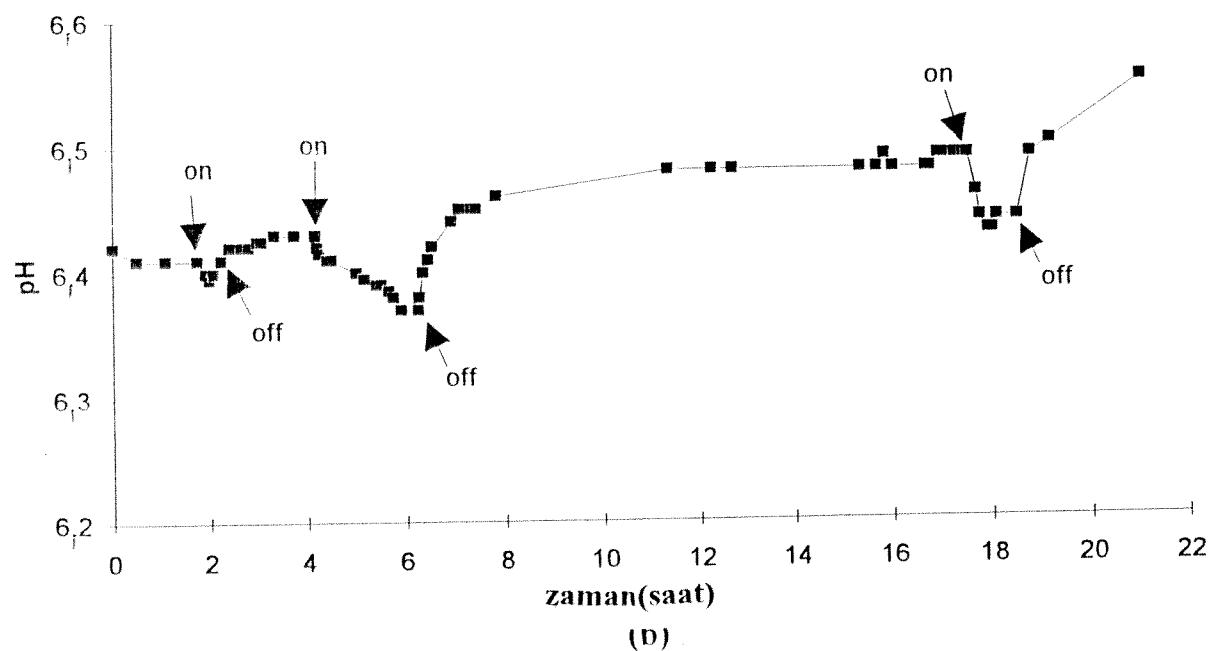


Şekil 3.9 (a) Anaerobik Koşullarda Format Eklenmesinin H_2 Gazı Çıkışına Etkisi

(b) Ortamın pH Değişimi (on: aydınlık , off: karanlık)



(a)



(b)

Şekil 3.10 (a) Aerobik Koşullarda Bekletilen İkili Sistemle H_2 Gazı Çıkışı (Anaerobik Deney Koşullarında) (b) Ortamın pH Değişimi (on: aydınlık , off: karanlık)

fosfat ve 0,1 M KCl ile karıştırıldı. Sistemden argon gazı geçirildikten sonra gaz çıkışı takip edildi (Şekil 3.11.(a) ve (b)). Sistemden gaz çıkış hızı $36 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{dak.mghücre}$ olarak ölçüldü.

Taqui Khan ve Bhatt (1989) *H.halobium* MMT22 ve *E.coli* NCL2065ATCC suşlarının çöktürülmüş hücrelerini kullanarak aynı deneyi % 25 NaCl'de ve 40 derecede yaptıklarında gaz çıkış hızını $40 \mu\text{mol}/\text{dak.mghücre}$ olarak buldular. Ancak gaz çıkışı sadece 30 dakika devam etti.

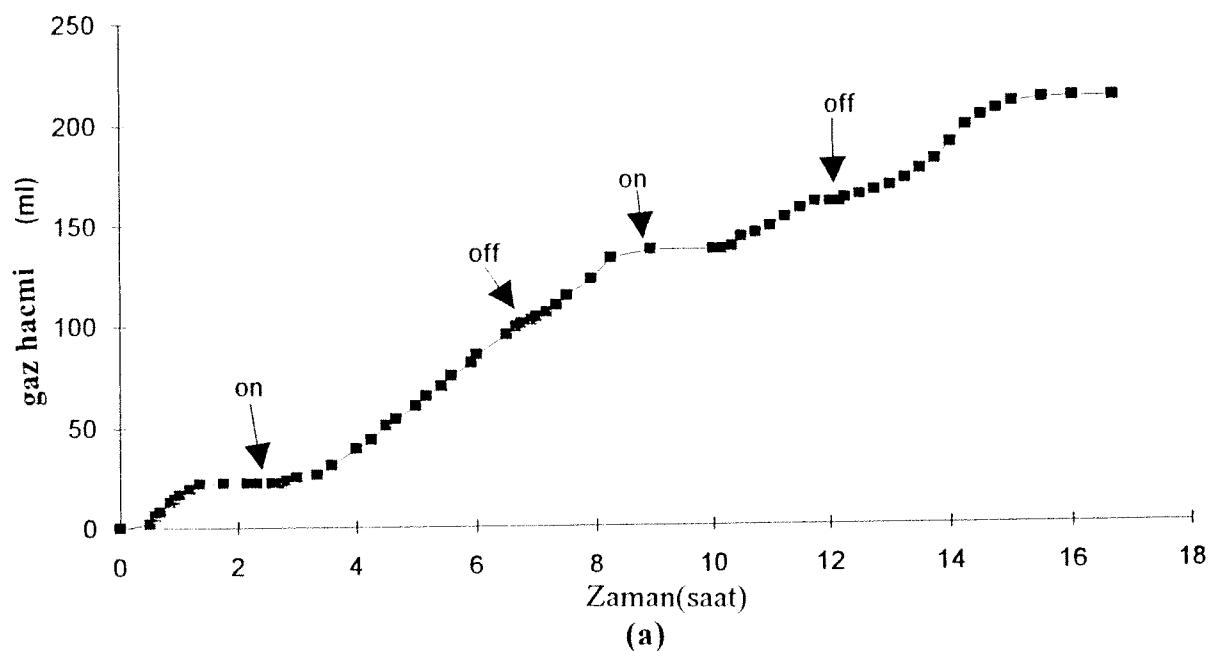
Bizim çalışmalarımızda ortama metal iyonları ilave edildiğinde, gaz çıkışı 12 saat süre ile devam etmiştir. Sonuçlar Şekil 3.12 (a) ve (b)'de verilmiştir. Gaz çıkış hızı $10,3 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{dak.mg hücre}$ olarak bulunmuş olup Taqui Khan ve Bhatt (1989a)'ın hesapladığı gaz çıkış hızından 10^3 daha azdır. Ancak bizim sistemimizde, hızın düşük olmasına rağmen daha uzun süre gaz çıkışı gözlemlenmiştir. Ayrıca kullanılan *H.halobium* suşları farklıdır.

Farklı anaerobik koşullarda, farklı *E.coli* ve *H.halobium* eşli sistemlerindeki H₂ gaz çıkışları Tablo 3.3'de toplanmıştır.

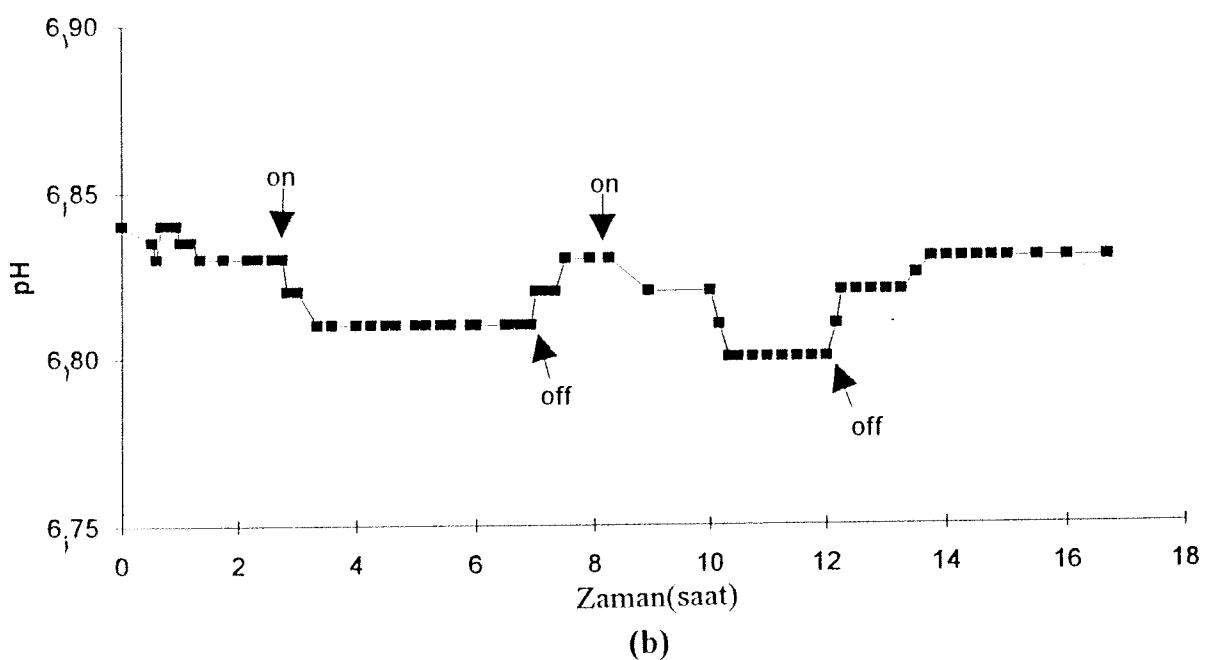
3.5 SONUÇLAR

H₂ gazı üretimi için anaerobik koşullarda çalışan, *E.coli* ve *H.halobium* içeren bir fotobioreaktör kurulmuştur. Hidrojenaz enziminin sentezi ve aktivitesi için anaerobik koşullar gerekmektedir. H₂ gaz çıkışı anaerobik koşullarda üreyen *E.coli* suspansiyon hücreleri veya çöktürülmüş *E.coli* hücreleri ve *H.halobium* hücreleri, veya *E.coli* hücreleri ve BR içeren mor zar parçacıkları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

H₂ gaz çıkışında diğer önemli parametreler ortamın pH'sının nötr olması ve dışarıdan format ve metal iyonlarının gereksinimidir. Ortam pH'sının ve substrat derişiminin kontrol altında tutulması ile bu eşli sistemdeki H₂ çıkışının daha uzun süreBILEceği sonucuna varılmıştır. Gelecekteki uygulamalar için H₂ gazı üretiminin immobilize hidrojenaz enzimi ve *H.halobium* çöktürülmüş hücreleri kullanılarak hazırlanacak olan anaerobik fotobioreaktörle sürekli hale getirilmesi planlanmaktadır.

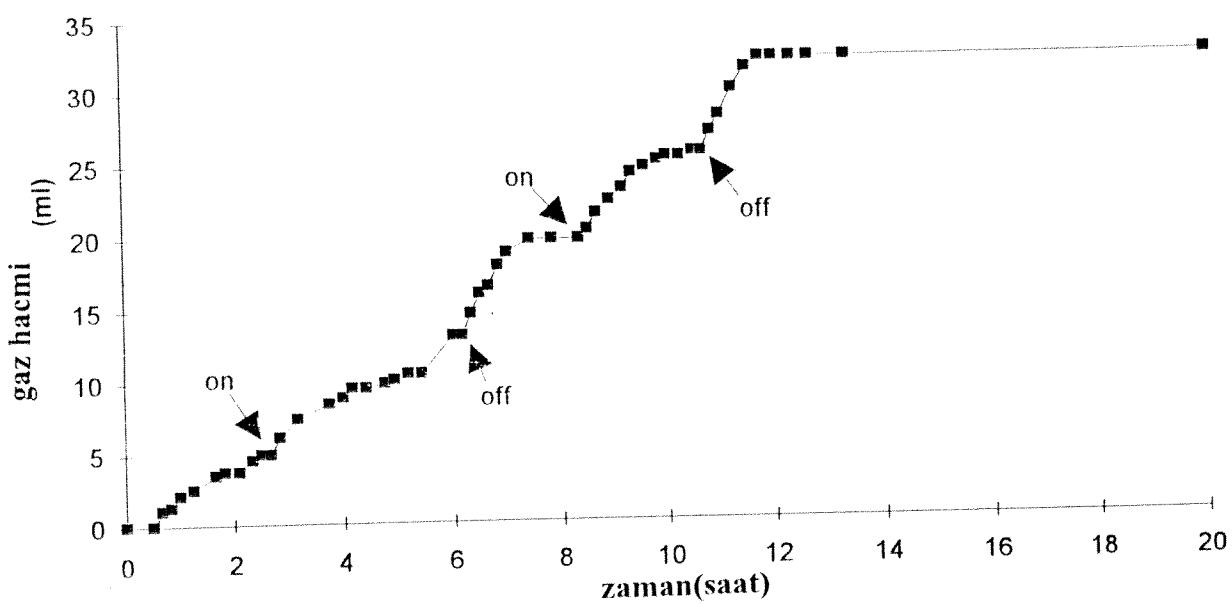


(a)

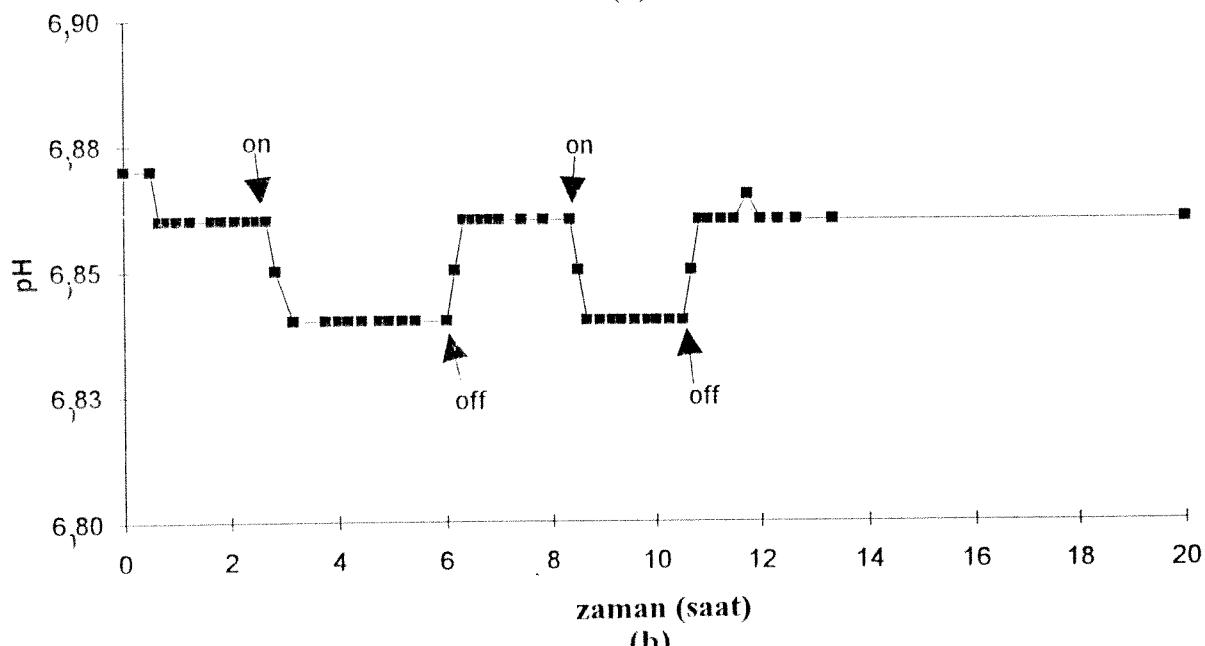


(b)

Şekil 3.11 (a) Çöktürülmüş *E.coli* ve *H.halobium* İkilisi ile Format Ortamında H_2 Gazı
Çıkışı (b) Ortamın pH Değişimi (on: aydınlık , off: karanlık)



(a)



(b)

Şekil 3.12 a) Çöktürülmüş *E.coli* ve *H.halobium* İkilisi ile Format ve Metal İyonları
Ortamında H₂ Gazi Çıkışı (b) Ortamın pH Değişimi (on: aydınlatma , off: karanlık)

Tablo 3.3. Hidrojen Üreten Sistemlerin Özeti

Sistem	Toplam Çıkan H ₂		pH aralığı	Hız (μmol/dak.L)
	Hacim* (ml)	Mol (mmol)		
Anaerobik üretilen <i>E.coli</i>	430	16,7	6,60-5,04	245
Anaerobik üretilen <i>E.coli</i> ve BR	546	21,4	6,68-5,22	320
Anaerobik üretilen <i>E.coli</i> ve <i>H. halobium</i>	560	22,0	6,63-4,89	330
Format eklenmesinin etkisi	704	27,6	5,90-5,35	210
pH etkisi	86	3,4	6,60-5,70	74
Aerobik Koşullarda Bekletmenin Etkisi	298	11,7	6,40-6,55	102
Çöktürülmüş <i>E.coli</i> ve <i>H.halobium</i> (format ortamına)	117	4,5	6,81-6,80	42 36 μ mol/min.g.cell
Çöktürülmüş <i>E.coli</i> ve <i>H.halobium</i> (format ve metal iyonları varken)	28	1,1	6,87-6,86	12 10 μ mol/min.g.cell

* Toplam hidrojen hacmi: (Toplam çıkan gaz) x (hidrojen gazının yüzdesi)

3.6 KAYNAKÇA

Ballantine, S. P., Boxer, D., Nickel containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *E.coli*, *J. Bacteriology*, 163(2),454-459, (1985).

Ballantine, S. P., Boxer, D., Isolation and characterization of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzymes 2 from the membranes of anaerobically grown *E.coli*, *Eur. J. Biochemistry*, 156, 277-284,(1986).

Barlar, F., Plass, H.J., Veziroglu, T.N., Modeling of H₂ penetration in the energy market, *Int. J. H₂ Energy*, 18(3),187-195, (1993)

Birge, R.R., Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin , *Biochimica et Biophysica Acta*, 1016, 293-327,(1990).

Coremans, J.M.C.C., van Garderen, C.J., Albracht, S.P.J. , On the redox equilibrium between hydrogen and hydrogenase, *Biochimica et Biophysica ACTA*,1119, 148-156,(1992).

Gaffron, H., Rubin, J., Fermentative and photochemical production of hydrogen in algea, *J. Gen. Physiol.*, 219,(1942).

Gunsalus, R.P., Park, S.J., Aerobic-anaerobic gene regulation in *E.coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons, *Research in Microbiology*, 145(5-6), 437-450,(1994).

Hong, F.T. , Intelligent materials and intelligent microstructure in photobiology, *Nanobiology*, 1, 39-40,(1992).

Hörnsten, E.G., Danielsson, B., Elving, H., Lundström, I., Sensorized on line determinations of molecular hydrogen in *E.coli* fermentations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 117-121,(1986).

Ingledeew, W.J., Poole, R.K., The respiratory chains of *E.coli*, *Microbiological Reviews*, 48(3), 222-271, (1984).

Krebs, M.P., Khorana, H.G,Mechanism of light dependent proton translocation by bacteriorhodopsin, *J. Bacteriology*, 175, 155-1560, (1993).

Kondratieva, E.N., Gogotov, I.N., Production of molecular hydrogen in microorganisms, *Adv. Biochem. Bioeng. Biotech.*, 28, 139-191,(1982).

Lonyi, J.K., Proton translocation mechanism and energetics in the light driven pump BR , *Biochimica et Biophysica Acta*, 1183, 241-261,(1993).

Lutz, S., Jacobi, A., Schlensong, V., Bähm, R., Sawers, G., Bäck, A., Molecular characterization of an operon (hyp) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *E.coli*, *Molecular Microbiology*, 5(1), 123-135,(1991).

Miyake, J., Asada, Y. , Biological production of hydrogen by environmentally acceptable technologies, *New Energy Systems and Conversion*, 219-223,(1993).

Nakada, E., Kaji, Y., Aoyama, K., Asada, Y., Miyake, J., Nishikata, S., Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with a fuel cell for light energy conversion to electricity, *New En. Syst. and Conversion*, 225-228,(1993).

Naqvi, S.M.S.,Identification characterization and subcellular localization of salt induced proteins in rice, Ph. D. Thesis, METU, Ankara (1993) .

Oesterhelt, D., Stoeckenius, W., Isolation of the cell membrane of *H.halobium* and fractionation into red and purple membrane, *Methods in Enzymology*, 31, 316-326,(1974).

Oesterhelt, D., Bräuchle, C., Hampp, N. , Bacteriorhodopsin: a biological material for information processing , *Quarterly Rev. of Biophysics*, 24(4), 425-478,(1991).

Rodrigues, F., Valera, J. , Biotechnological potential of halobacteria, *Biochem. Soc. Symp.*, 58, (1992).

Sankar, P., Shanmugam, K.T. , Biochemical and genetic analysis of hydrogen metabolism in *E.coli*: the hyd B gene , *J. Bacteriology*, (12),5433-5439,(1988).

Sankar, P., Lee, J.H., Shanmugam, K.T., Cloning of hydrogenase genes and fine structure analysis of an operon essential for hydrogen metabolism in *E.coli*, *J. Bacteriology*, 162(1), 353-360, (1985).

Sawers, R.G., Boxer, D.H. (1986), Purification and properties of membrane bound hydrogenase isoenzyme 1 from anaerobically grown *E.coli*, *Eur. J. Biochem.*, 156, 265-275.

Sawers, R.G., Ballantine, S.P., Boxer, D.H., Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *E.coli* K12: Evidence for a third isoenzyme, *J. Bacteriology*, 164(3), 1324-1331,(1985).

Taqui Khan, M.M., Bhatt, J.P.,Light dependent H₂ production by *H.halobium* coupled to *E.coli*, *Int. J. H₂. Energy*, . 14(9), 663-645,(1989).

Taqui Khan, M.M., Bhatt, J.P. ,Photosynthesized production of H₂ by *H.halobium* MMT₂₂ coupled to *E.coli* use of immobilization for enhancement of H₂ production, *Int. J. H₂. Energy*, 15(7), 473-476,(1990).

Taqui Khan, M.M., Bhatt, J.P., Photosensitized continious production of H₂ by *H.halobium* (MMT₂₂) coupled to *E.coli*, *Int. J. H₂. Energy*, 16(2), 83-85,(1991).

Yücel, M., Zabut, B., Eroglu, I., Türker, L. ,Kinetic analysis of light induced proton dissociation and association of bacteriorhodopsin in purple membrane fragments under continuous illumination, *J. Membrane Science*, 104, 65-72,(1995).

Zabut, M.B. ,Purification of BR from *H.halobium* and reconstitution studies in liposomes, M.S. Thesis, METU, Ankara,(1987).

Zinnani, F., Beier, A., Pecher, A., Wirth, R., Bäck, A. (1984) , Regulation of the synthesis of hydrogenase of *E.coli* , *Arch. Microbiology*, 139, 299-304.

BÖLÜM 4

HİDROJEN'İN ELEKTROKİMYASAL ÜRETİMİNDE *HALOBACTERIUM HALOBIUM* KULLANIMI

4.1. ÖZET

Bu çalışmada electrokîmyasal yöntemle hidrojen üretiminde *Halobacterium halobium* 'un biyokatalitik etkisini incelemek için bir biyo-fotoelektrokîmyasal reaktör tasarlanmıştır. Çalışma üç kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda mevcut iki farklı *Halobacterium halobium* suşun değişik şartlarda üreme eğrisi çıkarılmıştır. İkinci kısımda, üretilen bakterilerin fotoaktivitesi ölçülmüştür. Üçüncü kısımda ise tasarlanan biyo-elektrokîmyasal reaktörde hidrojen ölçümleri yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda *Halobacterium halobium*(H.H) 'un hidrojen üretimine biyokatalitik etkisi olduğu görülmüştür.

4.2. GİRİŞ

Fosil yakıtları (Kömür ,petrol ve doğal gaz) günümüzde kullanılan en önemli enerji kaynaklarıdır. Bunun yanı sıra bazı ülkelerde nükleer enerji fosil yakıtlarına alternatif olarak kullanılmaktadır. Fosil enerji kaynaklarının sınırlı olması ve bu enerji kaynaklarıyla nükleer enerjinin çevresel etkilerinden dolayı alternatif enerji kaynaklarının araştırmasına gidilmiştir. Alternatif enerji kaynaklarından biri olan hidrojen en ümit verici enerji kaynağı olarak görülmektedir (Getoff,1990, Dostrovsky,1991). Günümüzde mevcut hidrojen üretimi başlıca ; buharla beraber metanın reformasyonuyla, kömürle ve elektrolizle yapılmaktadır. Güneş enerjisi kullanarak hidrojen üretimi ise gelecek için ümit eden bir yöntemdir. Bu yöntemle hidrojen üretimi başlıca foto-elektroliziz ve fotovoltaik olarak yapılmaktadır (Bicelli,1986). Son yıllarda biyoteknolojideki hızlı gelişmenin bir sonucu olarak , hidrojen üretimi güneş enerjisi ile beraber çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak

yapılmaktadır. Foto-biyolojik olarak hidrojen üretiminin mevcut hidrojen üretim yöntemlerine göre bir çok avantajı vardır. Bu avantajlar; düşük sıcaklıklarda üretebilmek ($10-40^{\circ}\text{C}$), üretimde güneş enerjisi ve hidrojen kaynağı olarak su veya organik madde kullanmak, üretim esnasında çevre kirliliği oluşturmamaktır. Bilindiği gibi hidrojen yakıt olarak kullanıldığında ürün olarak sadece su vermektedir. Bu nedenle çevre ile uyumlu bir enerji kaynağıdır.

Foto-biyolojik olarak ilk hidrojen üretimi 1942 yılında Gaffron ve Rubin tarafından algler kullanılarak yapılmıştır (Gaffron ve Rubin, 1942). 1949 yılında Gest ve Kamen fotosentetik bakterileri kullanmışlardır (Gest ve Kamen, 1949). Yapılan çalışmalar sonucunda mavi-yeşil alglerin ve bitkilerin kloroplastındaki fotosentetik quantum sisteminin uzun süre güneş enerjisine maruz kalınca bozulduğu ve ayrıca hidrojen üretimi esnasında oluşan oksijenin hidrojenaz enziminin aktivitesini bozduğu görülmüştür.

Bu araştırmalardan günümüze kadar güneş enerjisi kullanarak biyolojik olarak hidrojen üretimi konusunda birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalarda hidrojen üretebilen çeşitli mikroorganizmalar kullanılmıştır. Bunlar ; fotosentetik bakteriler, yeşil alkler, cyanobacteriler ve hücresiz sistemlerdir. Yapılan çalışmalar , hidrojen üreten sistemlerin geliştirilmesinin gerekli olduğunu göstermiştir.

Prokaryotik ve eukaryotik davranış gösteren ve fotosentetik bir bakteri olan *Halobacterium halobium* (H.H) yüksek tuz derişiminde (4 M NaCl) yaşamaktadır. Bakteriorhodopsin, H.H' un hücre zarında bulunan retinal bir proteindir ve ilk olarak 1971 yılında Oesterhelt ve Stoeckenius (Oesterhelt ve Stoeckenius, 1971, 1974) tarafından bulunmuştur. Aynı kişiler bu proteinin ışık etkisi ile proton pompalama özelliğini farketmişlerdir. Stoeckenius ve diğerleri H.H'un zarının sarı, kırmızı, ve mor kısımlardan meydana geldiğini göstermişlerdir. Sarı kısım gaz kesecikleri ihtiva etmekte olup bakterinin sudaki derinliğini ayarlamasına yardım eder. Kırmızı kısım oksidadif fosforilasyon enzimlerini içermekte olup, mavi ışığın öldürücü etkisinden bakteriyi korur. Mor kısım genelde mor zar olarak adlandırılmaktadır ve yaklaşık 40 kadar lipid molekülleri ile Bakteriorhodopsinden meydana gelmiştir. Bakteriorhodopsin ihtiva eden

mor zar, ışıkla uyarıldığında dışarı proton pompalayarak proton gradiyenti meydana getiren bir pompa vazifesi görür. H.H ışık etkisi ile sisteme proton vermesine rağmen, yapısında bu protonu hidrojen gazına dönüştürecek hidrojenaz enziminin bulunmaması nedeniyle indirgeyici başka bir sistemin kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada Bio-PEC sistemi tasarlanmıştır.

Son yıllarda Hindistanda bir gurup , Khan ve Bhatt, H.H ve indirgeyici bir sistemle hidrojen üretiminin mümkün olduğunu göstermişlerdir. Tablo 4.1.'de yapılan çalışmaların özeti verilmiştir. Bu gurubun ilk çalışmasında protonun indirgenmesinde kullanılmak üzere bünyesinde protonu hidrojen gazına çevirecek hidrojenaz enzimi ihtiyaç eden *Escherichia Coli* (E.Coli) kullanılmışlardır (Khan ve Bhatt,1989). Tablo 4.1. den de görüldüğü gibi 1989'da yapılan bu çalışmada 22 değişik H.H suşu ile farklı hidrojen üretim hızları bulunmuştur. Bu suşlardan MMT₂₂ en yüksek hidrojen üretim hızını vermektedir. Bunu takip eden çalışmalarında MMT₂₂ ve E.Coli değişik malzemelere tutturarak daha dayanıklı bir sistem geliştirmeye çalışmışlardır. Bu araştırmalarında en yüksek verimi Agozoza tutturulan H.H ve E.Coli sisteminden almışlardır (Khan ve Bhatt,1990). Ayrıca indirgeyici olarak Foto-elektrikimyasal sistemle yaptıkları çalışmada daha ümit verici sonuçlar almışlardır. Bu çalışmada süreklilik açısından pH 'nın kontrolünde probleme karşılaşılmışlardır (Khan ve Bhatt,1990). Bir sonraki çalışmalarında Kesiksiz (Chemostat) bir sistemde H.H ve E.Coli ikilisini kullanmışlardır (Khan ve Bhatt,1991). Bu çalışmada sürekli bir hidrojen üretimi elde etmelerine rağmen mikroorganizma kontamine olmuştur. Bu gurup ayrıca indirgeyici başka bir sistemle (Silikon pilleri) yaptıkları çalışmada yaklaşık fotovoltaik sistemlere göre iki kat daha fazla hidrojen elde etmişlerdir (Khan ve Bhatt,1992). Patel ve Madamwar H.H ve E.Coli ikisiyle fotosentetik bir bakteri olan *Phormidium Valderianum* (P.V) birleştirerek hidrojen gazı üretmişlerdir. Bu çalışmada H.H-E.Coli-P.V sisteminin P.V nin tek başına olan hidrojen üretiminden yaklaşık üç katından fazla hidrojen verdiğini saptamışlardır (Patel ve Madamwar, 1994). Son olarak Kaya,B ve diğerleri H.H ve E.coli ikilisiyle hidrojen üretimi yapmıştır(Kaya et. al,1996). Bu çalışmada üretim süresinin Khan ve

Tablo 4.1. Literatür Araştırması

Araştırmacı	Yıl	Sistem	Reaktör Tipi	T(°C)	İşik Sıddeti	H.H susları	Üretim Süresi(hr)	H ₂ Üretimi µmol/mg birec hr
Khan ve Bhatt	1989	H.H-E.Coli (22 suj) 0,05 mg H.H 0,05 mg E.C	Kesikli 25 ml	40	0,3 mW/cm ²	MMT ₁₉ MMT ₂₂	0,5 0,5	3 2406
Khan ve Bhatt	1990	H.H-E.Coli 10 maddeye tutturuldu 0,05 mg H.H 0,05 mg E.C	Kesikli 25 ml	40	0,3 mW/cm ²	MMT ₂₂	8 25 16	12 Agarda Agarozda Sefülüz Asetatda 128
Khan ve Bhatt	1990	H.H-PVC (H.H dializ torbasında)	Kesikli (Recine ile pH kontrolü)	26	0,3 mW/cm ²	Bakterisiz MMT ₂₂ (Karantik) MMT ₂₂ (Işıktı) MMT ₂₂ (Reçinelle)	1,5 1,5 1,5 1,5	2,64 10,86 22,8 266
Khan ve Bhatt	1991	H.H-E.Coli 1 mg H.H 1 mg E.C dializ torbasında	Kesiksiz (Kemostat) pH kontrolü 50 ml	40	0,3 mW/cm ²	MMT ₂₂	2016	86
Khan ve Bhatt	1992	H.H-Gunes pili 1g H.H	Kesikli iki bölmeli	70	70 mW/cm ²	MMT ₂₂	0,75	464
Patal ve Madanwar	1994	H.H-E.Coli ve P.V	Kesikli 100ml	30	4 lux	H.H S9	144	P.V P.V+E.Coli P.V+H.H P.V+H.H+E.Coli 13,6
Kaya,B.	1995	H.H-E.Coli 0,05 g H.H 0,15 g E.C0H	Kesikli 130ml	25	1576 W/m ²	H.H S9	14	11

Bhatt'ın ilk çalışmasına göre daha fazla olduğu bulunmasına rağmen çalışan suşun farklı olmasından dolayı hidrojen üretim hızının düşük olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmanın amacı , fotosentetik bir bakteri olan H.H kullanarak hidrojen gazı üretimi için bir bio-fotoelektrokimyasal (bio-PEC) sistemin tasarılanması ve geliştirilmesidir.

4.3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.3.1. Maddeler

Bu çalışmada H.H S9 suşu kullanılmıştır. Bu suşlardan biri 1981 yılında Prof.Dr.Mehmet Şimşek tarafından M.I.T'den Prof. Khrona'nın laboratuvarından getirilerek gurubumuza hediye edilmiştir. Gurubumuz o tarihden bu yana bu suşu transfer ederek yaşatmış ve bu suşla birçok araştırma yapmıştır. Bu suş bu araştırmada Khrona diye adlandırılmaktadır. Diğer suş ise 1993 yılında Max Plant Enstitüsünden Prof. Oesterhelt tarafından hediye edilmiştir. Bu suş ise Oesterhelt olarak adlandırılmaktadır. H.H'u üretmek için kullanılan 1 litrelilik besiyerinin içeriği kimyasal maddeler Tablo 4.2 de verilmiştir.

Tablo 4.2 *Halobacterium halobium* 'un 1 lt 'lik besiyerinin içeriği kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Miktar(g)
NaCl	250
MgSO ₄ .7H ₂ O	20
Trisodyum sitrat 5.5 H ₂ O	3,64
KCl	2
Bakterial Peptone	10

4.3.2. Yöntemler

4.3.2.1. *Halobacterium Halobium*'un Üretilmesi

H.H Oesterhelt ve Stoeckenius yöntemine göre (Oesterhelt ve Stoeckenius, 1974) 39 °C'da yaklaşık yedi günde üretildi. Bir litrelilik besiyerinin içerdiği kimyasal maddeler Tablo 4.2'de gösterilen miktarlarda hazırlandı. Besiyeri 120 °C'da 1 saat sterilize edildikten sonra kullanıldı. Üretme aerobik, anaerobik, çalkalamalı ve çalkalamasız ortamlarda her iki farklı suş için yapıldı ve bunların üreme eğrisi elde edildi. Sterilize edilen besiyeri 250 şer ml'lik iki erlene alındıktan sonra iki farklı suşdan ekim yapıldı ve argon gazı geçirilerek anaerobik ortam elde edildi. Ekim yapıldıktan sonra 39 °C'da ışıklı ortamda üremeye bırakıldı. Aerobik ortamdaki üretme ise çalkalamalı veya çalkalamasız koşullarda yapıldı. Bakteriler 5 ml'lik sterilize edilmiş besi yerine ekilerek bir gece 39 °C'da büyütüllüp ertesi gün kültürden 4 tane 50 ml'lik besiyerlere aktarıldı. İki farklı suşdan hazırlanan kültürlerin bir tanesi çalkalamalı (120 r.p.m) diğeri ise çalkalamasız ortamda üremeye bırakıldı. Yaklaşık üç günde üreyen bakteriler 250 ml'lik besiyerine aktarılıp tekrar aynı şartlarda üretmeye devam edildi.

Ayrıca farklı hacimlerin üreme üzerine etkisini görmek için deneyler yapıldı. Bu deneyler aerobik ve çalkalamalı ortamda yapılmıştır. İlk olarak 1 lt de hazırlanan besiyerini sterilize ettikten sonra yine iki suj kullanılarak 50 ve 250 ml 'lik besiyerinde üremeye bırakıldı. Ortamdan belli zaman aralıklarında alınan numunelerin absorbansları U.V. Spektrofotometre ile ölçüldü. Bakterinin büyümesi 660 nm 'deki ölçümle, bacteriorhodopsin ihtiva eden mor zarın çoğalması ise 570 nm'deki ölçümle takip edildi. Üretilen hücreler 6000 rpm'de 1 saat santrifüjlenerek sıvı besi ortamından ayırdı ve hücreler kullanılincaya kadar -20 °C'da muhafaza edildi.

4.3.2.2. Foto-aktivite öiocümleri

Çöktürülmüş hücrelerin foto-aktivitesi hidrojen ölçümü için tasarlanan bioreaktörde yapıldı. Deneyler 25 °C'da 1000 W'lik projector lambası ile 50 cm uzaktan yapıldı. Reaktörde % 20 'lik 1 litre NaCl tuz çözeltisi kullanıldı. Işıkta ve karanlıkta pH'nın zamana göre değişimi kaydedildi.

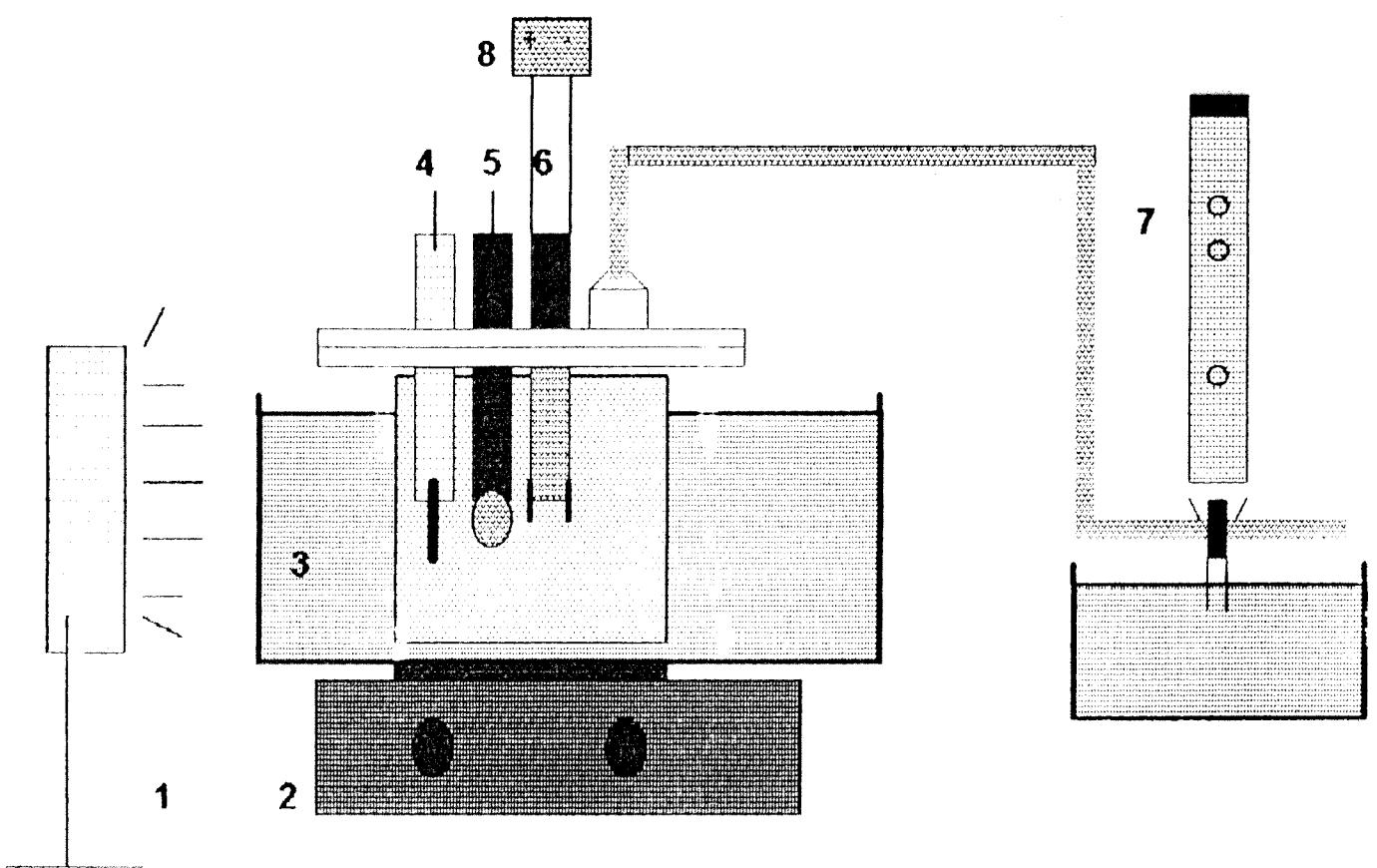
4.3.2.3. Bio-Fotoelektrokimyasal Reaktör(Bio-PEC)

Hidrojen gazı üretimine yönelik tasarımı yapılan bio-PEC reaktör Şekil 4.1 de görüldüğü gibi başlıca 4 kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar; reaktör, gaz toplama ünitesi, su banyosu, ve ışık kaynağıdır.

Reaktör silindir şeklinde pyrex bir camdan yapılmıştır. Reaktörün üst kısmında üç tane giriş yeri ve bir tane çıkış yeri mevcuttur. Bunlardan bir tanesi katod için kullanılan platin ve anod için kullanılan gümüş elektrodları içindir. Diğer bir giriş ise pH elektroduna aittir. Üçüncü giriş ise sıcaklık ölçen uç içindir. Çıkış ise gaz toplama ünitesine bağlanmıştır.

4.3.2.4. Bio-PEC'de Hidrojen Üretimi

Deneyler bakterili ve bakterisiz olarak iki katagoride yapılmıştır. Bakterisiz deneyler kontrol amacıyla yapılmıştır. Bu deneylerde % 20 NaCl tuz çözeltisi kullanılmıştır. Bakterili deneylerde ise aynı çözelti , 7 gün süreyle büyütülmüş *Halobacterium halobium* hücreleri ile karıştırılmış ve kontrol deneyleri ile aynı şartlarda yapılmıştır. Deneyler 25 °C de ve *Halobacterium halobium* konsantrasyonu 7,2 mg hücre/ml olan karışımıla yapılmıştır. Her iki deneyde de reaktörden argon gazı geçirilmiş ve ölçümler anaerobik ortamda yapılmıştır. Deney süresince doğru akım kaynağından 0.88 volt verilmiş ve 1000 vatlık ışık kaynağı ile 50 cm uzaklıktan aydınlatılmıştır. Solusyonun pH'sı ve toplanan gazın hacminin zamana bağlı değişimi kaydedilmiştir.



- 1-Işık Kaynağı
- 2-Manyetik karıştırıcı
- 3-Su banyosu
- 4-Sıcaklık Probu
- 5-pH elektrodu
- 6-Anod and Katod
- 7-Gazometre
- 8-Güç Kaynağı

Şekil 4.1. Bio-Fotoelektrokimyasal Reaktör

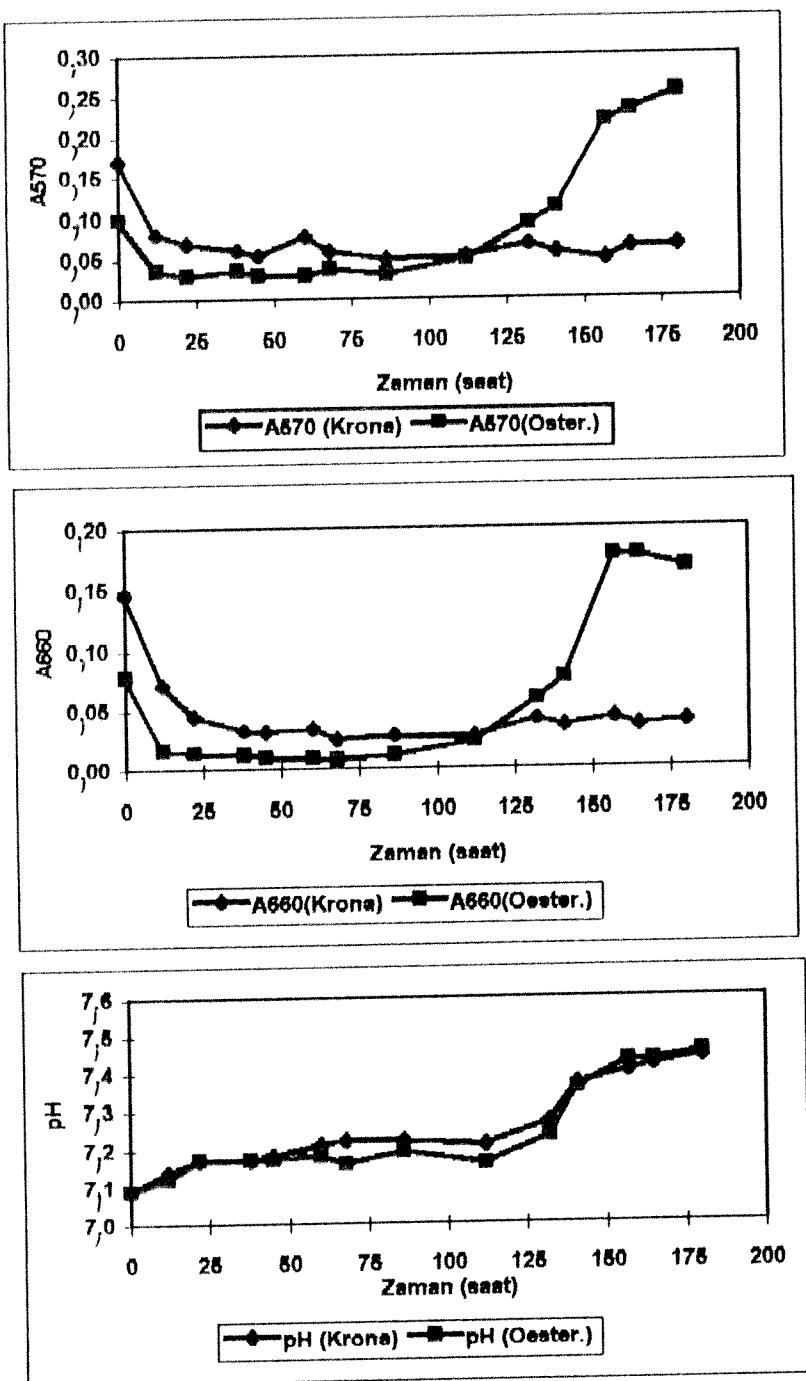
Gaz analizi için mikroşırıngı ile alınan numunedeki H₂ ve Ar gaz karışımı Hewlett 5890 gaz kromotografisi ile analiz edildi. 11 ml/dak akış hızındaki nitrojen gazı taşıyıcı gaz olarak kullanıldı.

4.4. BULGULAR VE TARTIŞMA

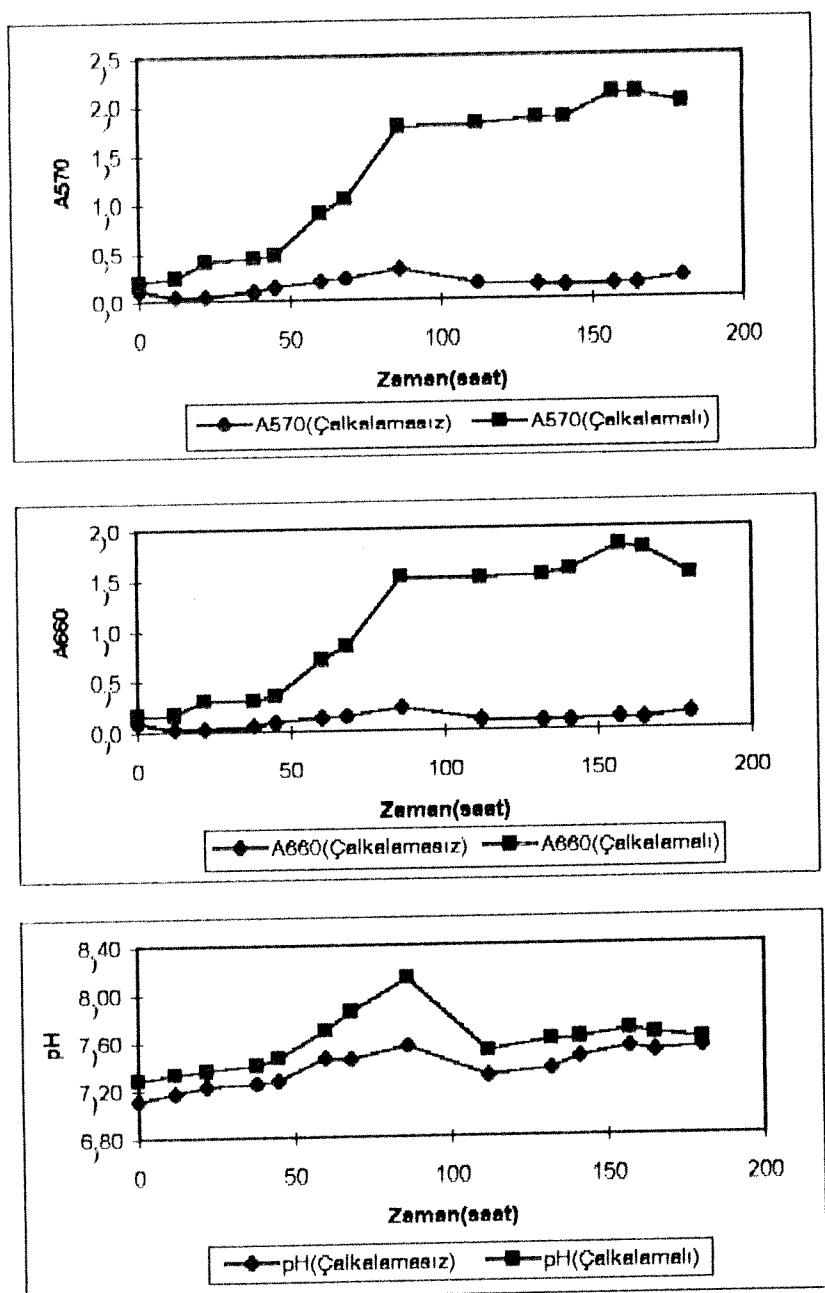
4.4.1. *Halobacterium halobium* 'un üreme eğrisi

Krona ve Oesterhelt suşlarından ekim yapılarak anaerobik ,aerobik, çalkalamalı ve çalkalamasız ortamlarda üremesi yapılan H.H.'un üreme eğrileri Bölüm 4.3.2.1'de anlatıldığı gibi elde edildi. Şekil 4.2'de anaerobik ortamda üreyen bakterilerin üreme eğrisi gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi gerek bakterinin üremesinin gerekse mor zarda bulunan bakteriorhodopsin'ın çoğalmasının normal üreme süresi içinde çok yavaş olduğu görülmüştür. Şekil 4.3 ve 4.4'de ise aerobik ortamda çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda üreyen bakterilerin üreme eğrileri verilmektedir. Bu deneylerde 50 ml'de yaklaşık üç günde üreyen bakteriler 250 ml'lik besiyerine aktarılıp tekrar aynı şartlarda üremeye bırakıldı. Çalkalamasız koşullarda her iki suşdan ekim yapılarak elde edilen kültürlerin üremediği görüldü.

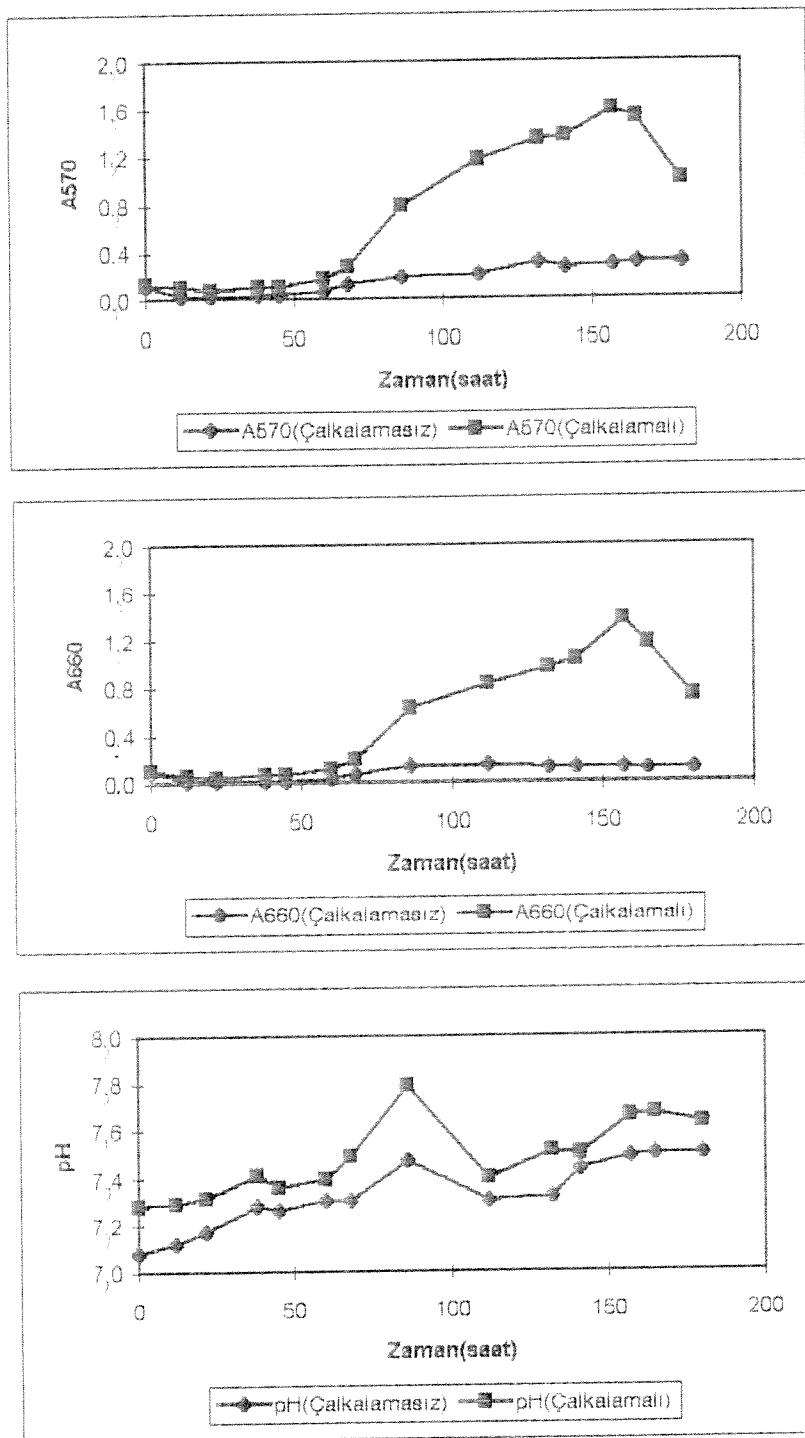
Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7' de ise farklı hacimlere ekim yapılan sujların üreme eğrileri verilmektedir. Deneyler aerobik ortamda sallamalı koşullarda yapılmıştır. Şekil 4.5'de 250 ml hacimli besiyerine yapılan ekim sonucunda elde edilen üreme eğrileri verilmiştir. Şekil 4.6 'da 2 ml 'ye yapılan ekimin 1 gün sonra 50 ml hacimli besiyerine aktarıldıkta sonra elde edilen üreme eğrisi verilmektedir. Şekil 4.7'de ise Şekil 4.6'da üreme eğrisi verilen 50 ml'lik kültürden 250 ml hacimli besiyerine aktarıldıkta sonra elde edilen üreme eğrileri verilmektedir. Sonuç olarak ekim yapılan besiyeri hacminin artmasıyla üreme hızının önemli oranda değişmediği , Oesterhelt ve Stoeckenius yöntemine göre [8] kademeli olarak yapılan üretmenin yerine tek kademeli olarak yüksek hacimli besiyerinde üretimin mümkün olduğu görülmüştür.Ayrıca bu deneylerde Oesterhelt suşu ile yapılan üretmenin daha hızlı olduğu bulunmuştur.



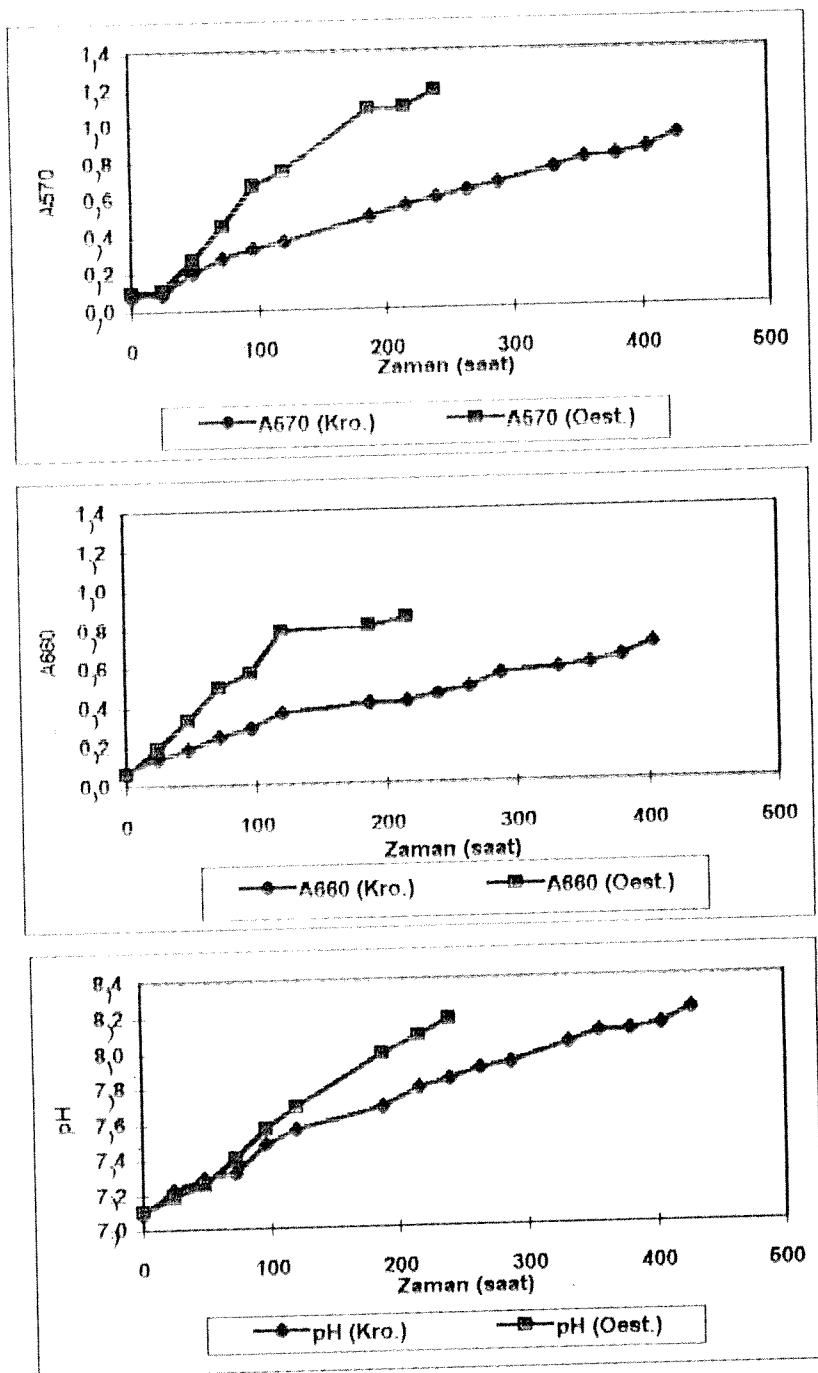
Şekil 4.2.Anaerobik ortamda bakterilerin üreme eğrisi($V=250$ ml)



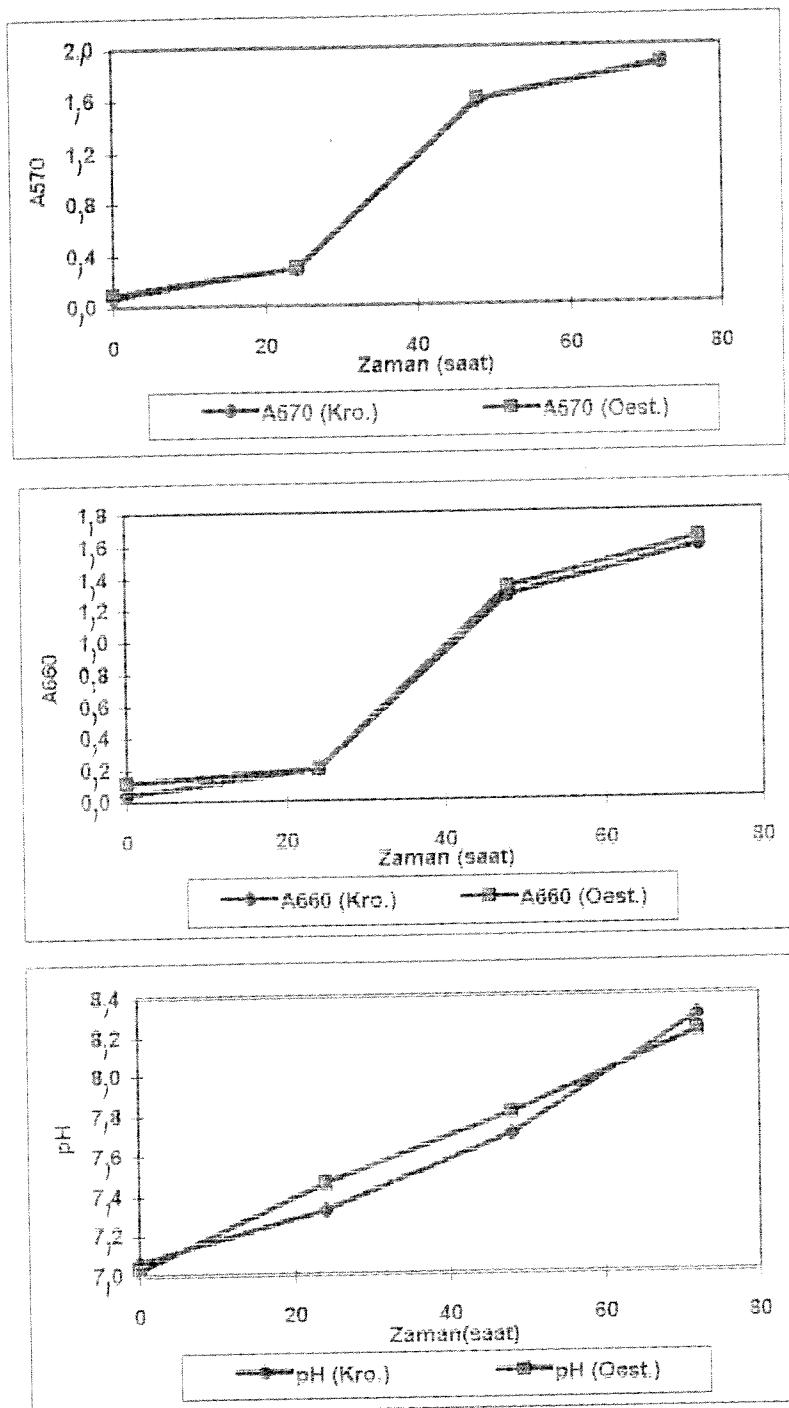
Şekil 4.3 Aerobik ortamda bakterinin (Krona) üreme eğrisi



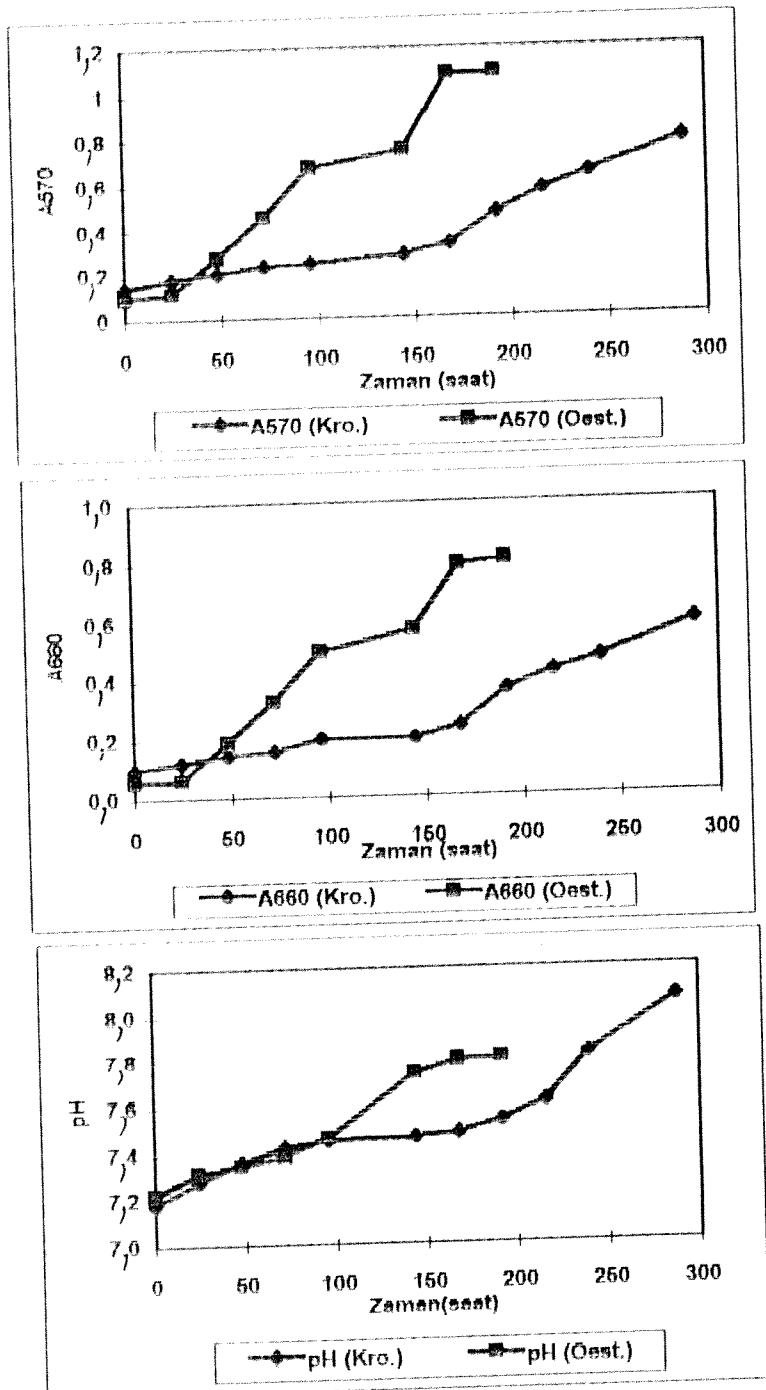
Şekil 4.4 Aerobik ortamda bakterinin(Oesterhelt) üreme eğrisi



Şekil 4.5 Bakterilerin üreme eğrisi($V=250$ ml, Sallamalı)

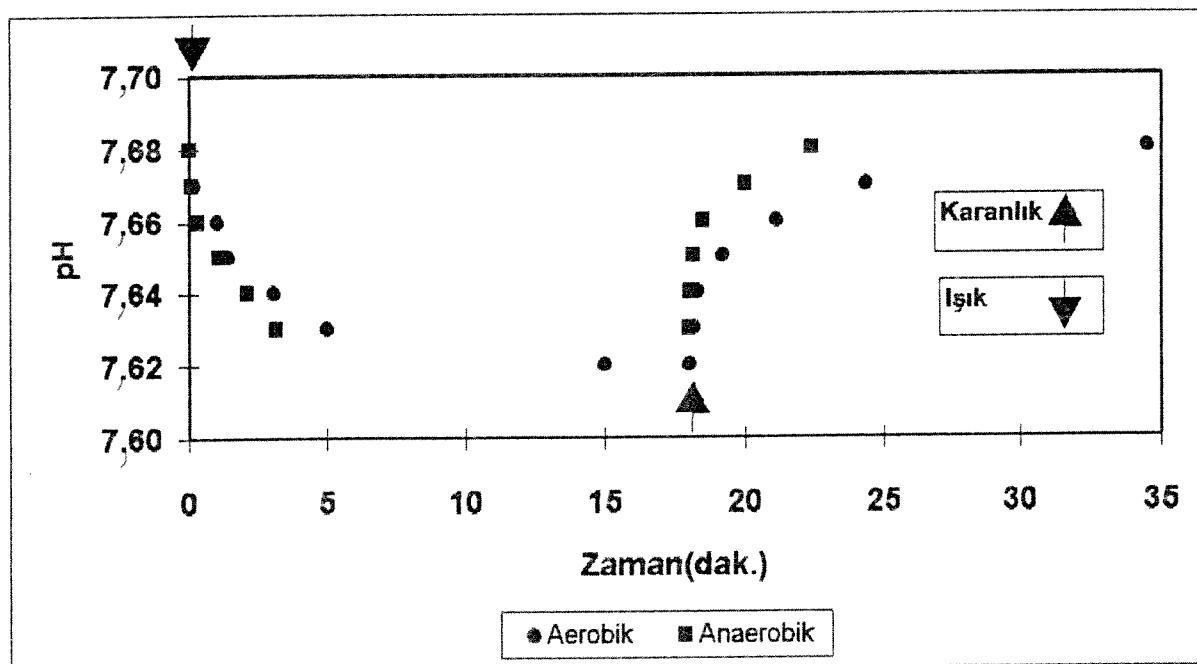


Şekil 4.6 Bakterilerin üreme eğrisi
(V=50 ml, sallamalı, 2 ml 'ye yapılan ekim 1 gün sonra 50 ml'ye aktarıldı)

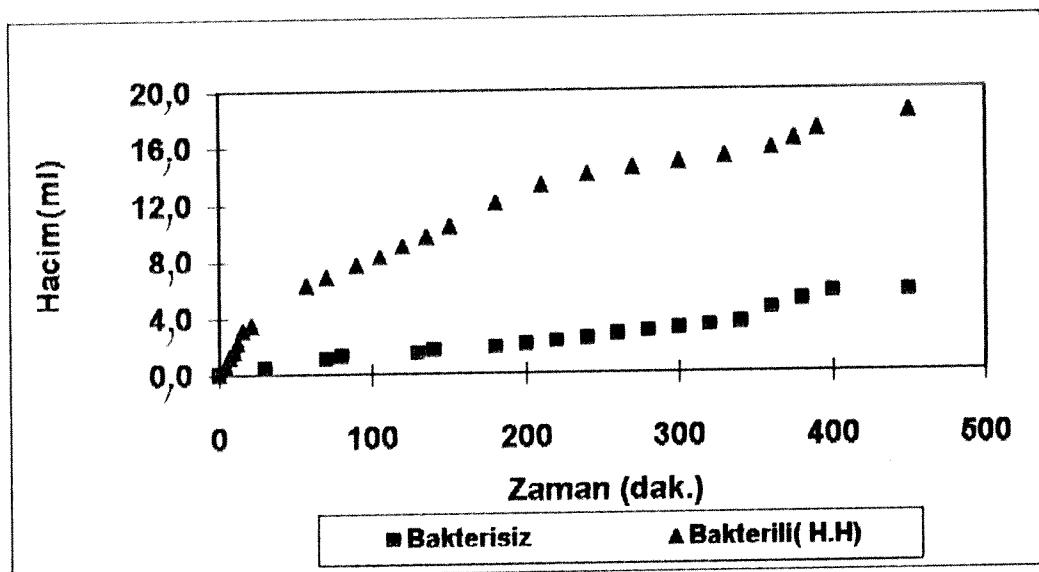


Şekil 4.7 Bakterilerin üreme eğrisi

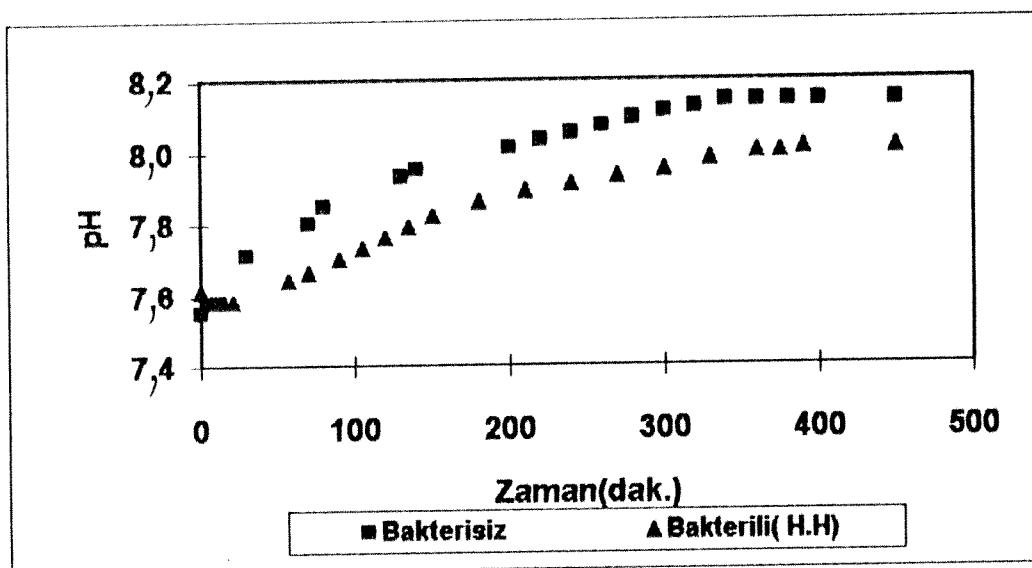
(Şekil 4.6'da üreme eğrisi verilen 50 ml'lik kültür 250 ml'ye aktarıldı)



Şekil 4.8 pH'nın zamana göre değişimi ($T=25^{\circ}\text{C}$, 20 % NaCl, 4,2 μM BR)



Şekil 4.9 Hidrojen üretiminin zamana göre değişimi
(T=25 °C, 20 % NaCl, 0,68 µM BR)



Şekil 4.10 pH'nın zamana göre değişimi
(T=25 °C, 20 % NaCl, 0,68 µM BR)

4.4.2. *Halobacterium halobium* 'un foto-aktivite özelliği

H.H'un foto-aktivitesi Bölüm 4.3.2.2'de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Şekil 4.8'de foto-aktivite sonucu verilmiştir. Bu deneyde Oesterhelt suşu ile elde edilen kültürden çöktürülmüş hücrelerden H.H'un derişimi $4,2 \mu\text{M}$ olan karışımıla anaerobik ve aerobik ortamda yapılmıştır. Şekildende görüldüğü gibi H.H Işıkta sisteme proton vermekte karanlıkta ise protonu geri almaktadır. Bu sonuç büyütülen bakterilerin aktif olduğunu göstermektedir. Ayrıca anaerobik ve aerobik ortamındaki fotoaktivitenin önemli derecede farklı olmadığı ve bacteriorhodopsin derişiminin artmasıyla fotoaktivitenin arttığı gözlenmiştir.

4.4.3 Hidrojen üretimi

Halobacterium halobium-indirgeyici elektrod sistemi ile yapılan deneylerde hidrojen üretimini etkileyen faktörler araştırılmıştır. Kontrol amacı ile yapılan deneylerde % 20 NaCl çözeltisinde bakteri katmadan 0,88 volt indirgeme potensiyeli verilerek gaz üretimi takip edilmiş ve üretilen gazdan alınan numuneler gaz kromatografla analiz edilmiştir. Üretilen gazın sadece hidrojen olduğu gözlenmiştir. Aynı deney H.H ihtiyaçlı % 20 'lik tuz solusyonunda tekrarlanmıştır. Bu deneyde 0,88 volt indirgeme potensiyeli verilerek 100 dakikada 15 ml gaz üretilmiştir. Gaz analizi üretilen gazın sadece hidrojen içerdigini göstermiştir. Bu deneyler esnasında biyoreaktör içindeki pH elektrodu ile pH'nın zamana göre değişimi kaydedilmiştir. Kontrol deneyinde pH sürekli yükselmekte ve bir süre sonra sabit değere ulaşmaktadır. Başlangıçta gaz üreme hızının da yüksek olduğu ancak zamana bağlı olarak azaldığı ve durduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni protonun indirgenerek hidrojen gazına dönüşmesi ve dolayısı ile çözeltinin pH'sının yükselmesidir. Bakteri ile yapılan deneyde ise başlangıçta ışık ile uyarılan bakteri sisteme proton verdiği için çözeltinin pH'sında azalma görülmüştür. Ancak

elektroliz ile hidrojen gazının oluşturulması ile pH bir süre sonra yükselmiştir ve pH 8,16'ya ulaşınca gaz üretimi durmuştur.

Büyütme ortamında hücre % 20 'lik NaCl çözeltisi ile karıştırıldığında başlangıç pH'sı artmaktadır (8-8.2). Halbuki % 20'lik NaCl çözeltisinin pH'sı 7,60 civarındadır. Bu nedenle üretilmiş hücre'yi besiyerinden ayırmak için santrifuj yapılmıştır. Çöktürülen hücre % 20'lik NaCl çözeltisi ile belli bir derişimde karıştırılmıştır. Şekil 4.9 'da görülen deney başlangıç pH'sı 7.60 olan % 20'lik NaCl karışımında H.H'la ve H.H olmadan argon ortamında yapılmıştır. Kontrol amacıyla yapılan deneyde yaklaşık olarak 5 ml hidrojen gazı üretilmiş ve solusyonun pH'sı yaklaşık olarak 8,15 iken gaz üretiminin durmuştur. Çöktürülmüş hücre ile yapılan deneyde ise 18 ml hidrojen gazı elde edilmiştir.Şekil 4.10'da görüldüğü gibi başlangıçta solusyonun pH'sında daha önceki deneyde olduğu gibi H.H tarafından sisteme proton verildiği için azalma görülmüş ve bir süre sonra tekrar yüksелerek yaklaşık 8,03 civarında gaz üretimi durmuştur. Bu çalışmada hidrojen üretimi için en düşük indirgeme potensiyeli olarak 0,88 volt bulunmuştur.

Yapılan deneyler sonucunda *Halobacterium halobium* 'un hidrojen üretimine biyokatalitik etkisi olduğu görülmüştür. Ancak hidrojen üretimi solusyonun alkalinitesinin artmasından dolayı durmaktadır.

4.5. SONUÇLAR

İki farklı suşun değişik koşullarda üreme eğrisi elde edildi. Buradan elde edilen sonuçlara göre aerobik ortam ve çalkalamalı koşulda üremenin daha hızlı olduğu görüldü. Üretilen bakterilerin fotoaktivitesi aerobik, anaerobik ortamda ve farklı BR konsantrasyonlarında ölçüldü. BR'ın fotoaktivitesi aerobik ve anaerobik şartlarda fazla değişmemesine rağmen, BR miktarının artmasıyla fotoaktivitenin arttığı gözlandı. Fotoelektrokimyasal çalışmada ise H.H'un elektrokimyasal yolla hidrojen üretimine etkisi incelendi. H.H ile hidrojen üretiminin H.H'suz ortama göre daha fazla olduğu görüldü.Burda H.H'un hidrojen üretimine biyokatalitik etkisi olduğu görülmüştür.

4.6. KAYNAKÇA

- Bicelli, L.P., Hydrogen: a clean energy source , *Int. J. Hydrogen Energy*, 11, 555-62, (1986).
- Dostrovsky, I., Chemical fuels from the sun , *Scientific American*, 50-4, (1991).
- Gaffran, H., and Rubin, J., Fermentation and photochemical production of Hydrogen in algae , *J. Gen. Physiol.* 26 , 219-24, (1942).
- Gest, H., and Kamen, M.D., Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria, IV. Photochemical production of molecular hydrogen by growing cultures of photosynthetic bacteria , *J. Bacterial.*, 58, 239-42, (1949).
- Gest, H., and Kamen, M.D., Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum cubrum* , *Science*, 109, 558-61, (1949).
- Getoff, N., Photoelectrochemical and photocatalytic methods of hydrogen production; A short review , *Int. J. Hydrogen Energy*, 15, 407-17, (1990).
- Kaya,B.,Gündüz,U.,Eroğlu,I.,Türker,L. and Yücel,M., Hydrogen gas production using coupled system from *E.coli* and *Halobacterium.halobium* 11th World Hydrogen Energy Conference, Stuttgart-Germany, (1996).
- Khan, M.M.T.,and Bhatt, J.P., Light dependent hydrogen production by *H.halobium* MMT₂₂ coupled to E.coli , *Int. J.Hydrogen Energy*, 14,643-5, (1989).

Khan, M.M.T.,and Bhatt, J.P., Photosynthesized production of hydrogen by *H.halobium* MMT₂₂ coupled to E.coli: use of immobilization for enhancement of hydrogen production, *Int. J.Hydrogen Energy*, 15, 473-6,(1990).

~ Khan, M.M.T.,and Bhatt, J.P., Photoelectrochemical studies on H.halobium or continuous production of hydrogen , *Int. J.Hydrogen Energy*, 15, 477-80,(1990).

Khan, M.M.T.,and Bhatt, J.P., Photosynthesized continuous production of hydrogen by *H.halobium* MMT₂₂ coupled to E.coli , *Int. J.Hydrogen Energy*, 16, 83-5,(1991).

Khan, M.M.T.,and Bhatt, J.P., Large scale photobiological solar hydrogen generation using *H.halobium* MMT₂₂ and silicon cell , *Int. J.Hydrogen Energy*, 17, 93-5,(1992).

Patel,S. and Madamwar,D., Photohydrogen production from a coupled system of H.halobium and P.Valderianum , *Int. J.Hydrogen Energy*, 19, 733-8,(1994).

~ Oesterhelt, D., and Stoeckenius, J.W., Rhodopsin like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* , *Nature New Biol.*, 233, 148-52,(1971).

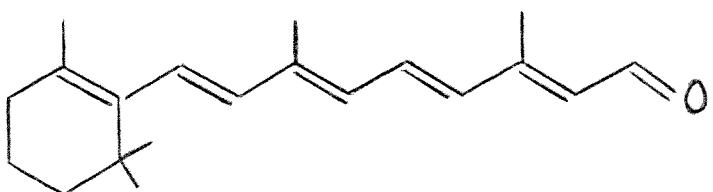
~ Oesterhelt, D., and Stoeckenius, J.W., Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fraction into red and purple membrane, *Methods in Enzymology*, 31, 667-71,(1974).

BÖLÜM 5

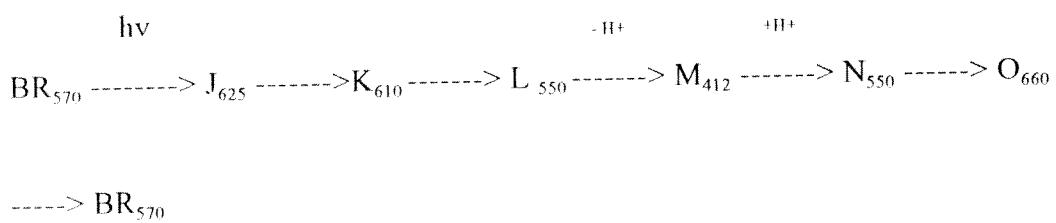
BACTERİORHODOPSİN KROMOFORUNUN TEORİK İNCELENMESİ

Yaşayan organizmaların çoğunda herhangi bir metabolik prosesin bir parçası olarak proton transferi vardır. Proton pompaları denilen bu sistemlerin mekanizması hala pek çok aydınlanmamış nokta ihtiva eder. *Halobacterium halobium*'un mor zarında mevcut proton pompalanması bilinen en basit biyolojik enerji ünitesidir. Mor zar, bacteriorhodopsin (BR) denilen retinal bir protein içermektedir ki retinal kısmı bir Schiff bazi üzerinden protein kısmının 216-lysin bölgesine bağlanmıştır (Henderson, 1977). *Halobacterium halobium*'un BR'ı ile gözde bulunan rhodopsinin bazı müsterek özellikleri (mesela : müstereken retinal ihtiva ederler) olmasına rağmen, bağımsız iki fotosiklusun mevcudiyeti ve çeşitli ara ürünlerin bulunması sebebiyle BR'ın mekanistik olarak rhodopsinden daha kompleks olduğu aşikardır (Liu et al., 1985).

All-trans-retinal molekülünün yapısı aşağıdaki gibidir.



Işıkta yavaş bir şekilde 13-cis hali, all-trans haline dönüşür. Sıcaklığın 0 °C nin altında olduğu durumlarda karanlık uyumlu şekil bastırıldığından , BR¹ dönüşümü tamdır. Bir foton yutulması ile BR' in aşağıdaki değişimlere uğradığı önerilmiştir (El-Sayed, 1972).



Bu fotosiklus, protonun, hücre zarının iç tarafından dışarıya doğru proton pompalanmasına yol açar ki ortaya çıkan proton gradyeni organizmanın çeşitli metabolik faaliyetlerinde mesela ATP sentezinde kullanılır (Dencher *et al.*, 1975; Honig, 1977; Belliveau *et al.*, 1975). Hücreden proton atılması M_{412} oluşusu ile mukayase edilebilir olduğu iddia edilmiştir (Lozier *et al.*, 1976; Ort ve Parson, 1978). Bu ara ürün, BR yapısındaki Schiff bazının protone vaziyette olmayan tek halidir (Lewis *et al.*, 1975; Aton *et al.*, 1977; Marcus ve Lewis, 1977; Braiman ve Mathies, 1980; Bagley *et al.*, 1982).

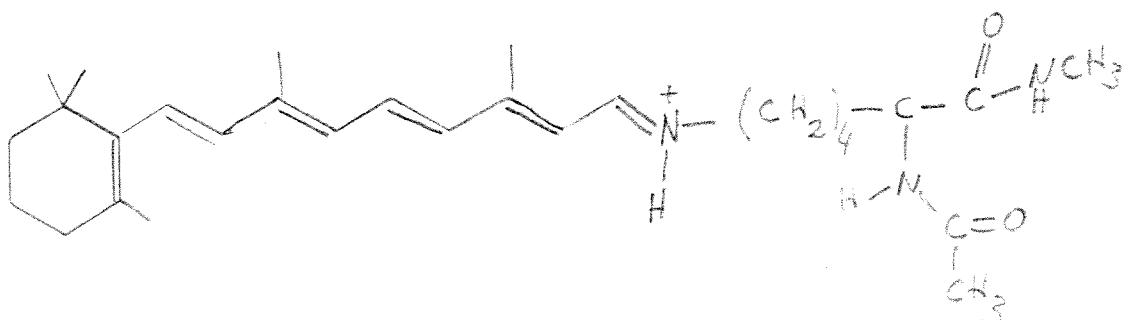
BR'in proton pompalama mekanizması üzerinde çeşitli modeller ortaya atılmıştır (Fodor *et. al.*, 1988; Honig *et.al*, 1976; Kalinsky *et. al*, 1981; Nagle ve Tristram-Nagble, 1983; Schulten (1978) ; Warshel, 1978; Mathies *et al.*, 1991 ; Birge ve Pierce, 1983). Schulten (1978) ile Birge ve Pierce (1983) modelleri özellikle moleküler yapılar ve mekanistik detaylar ihtiyaç ederler, fakat proton transferi olayında proteinin rolünü ihmal ederler. Mekanistik olarak iddia edilen all-trans \longrightarrow 13-cis,14-s-cis dönüşümünün primer fotokimyasal proses olduğu MINDO/3 ve MNDO hesapları vasıtıyla teorik desteklerde bulunmuştur (Orlandi ve Schulten, 1979). Birge ve Pierce (1983) modeli ise α -karbon ile siklohekzenil halkasının proteine tutulmuş olduğunu kabul eder. Primer proses için bu model "Extended bicycle-pedal" modelini (Warshel, 1976) geçerli sayar. Fakat, modelin işlerliği için retinal molekülünün 15,16 karbonlarının bulunduğu kısmın geometrisini gelişti güzel bir şekilde syn olarak kabul eder ki deneysel bir dayanağı yoktur (Liu *et al*, 1985).

Diğer taraftan, gerek Birge ve Pierce, gerekse Towner ve arkadaşlarının (1981) çalışmalarından anlaşılmıştır ki, BR'ın hızlı erken prosesleri, sadece α -karbon ile siklohekzenil kısmı arasındaki mesafenin fazla değişikliğe uğramadığı yapılar üzerinden yürütür.

5.1. METOD

Literatürde mevcut, BR ile ilgili teorik çalışmaların esasını retinal kromoforunun modellendirilmesi teşkil eder. Protein kısmı ihmali edilir ve hatta çoğu kez hesapları kolaylaştırmak için retinal Schiff bazının da sadece bir kısmı hesaba dahil edilir. Mesela Orlandi ve Schulten' in (1979) çalışmasında siklohekzenil kısmı da, lysine kısmı da göz önüne alınmadan MNDO hesapları yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda ise retinal Schiff bazının tamamı ile BR molekülünde bağlı olduğu 216-lysin kısmını ihtiva eden aşağıdaki model kullanılmıştır.



Göründüğü gibi model, lysin molekülünü peptit yapısında ihtiva etmektedir. Bu çalışmada bu ve diğer BR ara ürünleri üzerinde "Hyperchem" programı vasıtasiyla moleküler mekanik hesapları, MM+ metodu seviyesinde yapılmıştır. Bu amaçla, moleküller "MM+ force-field" altında geometri optimizasyonuna tabi tutulmuşlar ve

toplam enerjileri konjuge bir gradyen yöntemi olan Polak-Ribiere metodu ile minimize edilmiştir.

5.2. BULGULAR ve TARTIŞMA

Şekil 5.1 de Schulten modeline göre ortaya atılan çeşitli proton ve serbest retinal Schiff bazlarına ait toplam enerji değerlerine kcal/mol cinsinden verilmiştir. Parantez içindeki değerler ise nokta işaretli pozisyonların Angström cinsinden birbirinden uzaklığıdır.

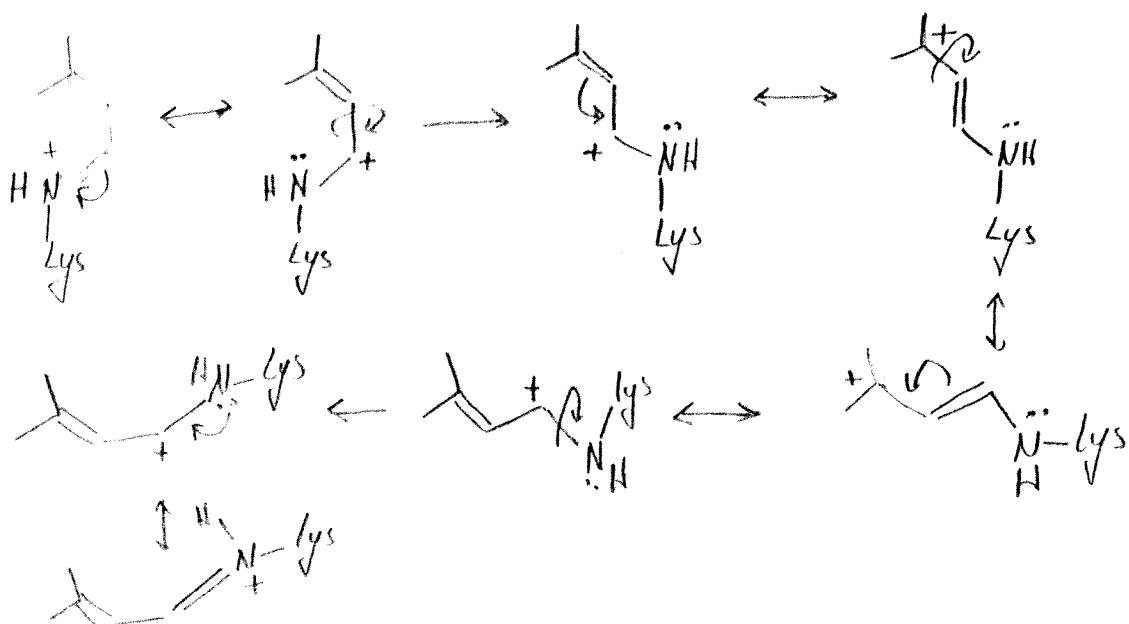
Enerji hesaplarından da görüneceği üzere, BR^t ile BR^c arasında BR^t lehine termal bir denge söz konusudur. Schulten modelinde söz konusu edilmemiş bile olsa

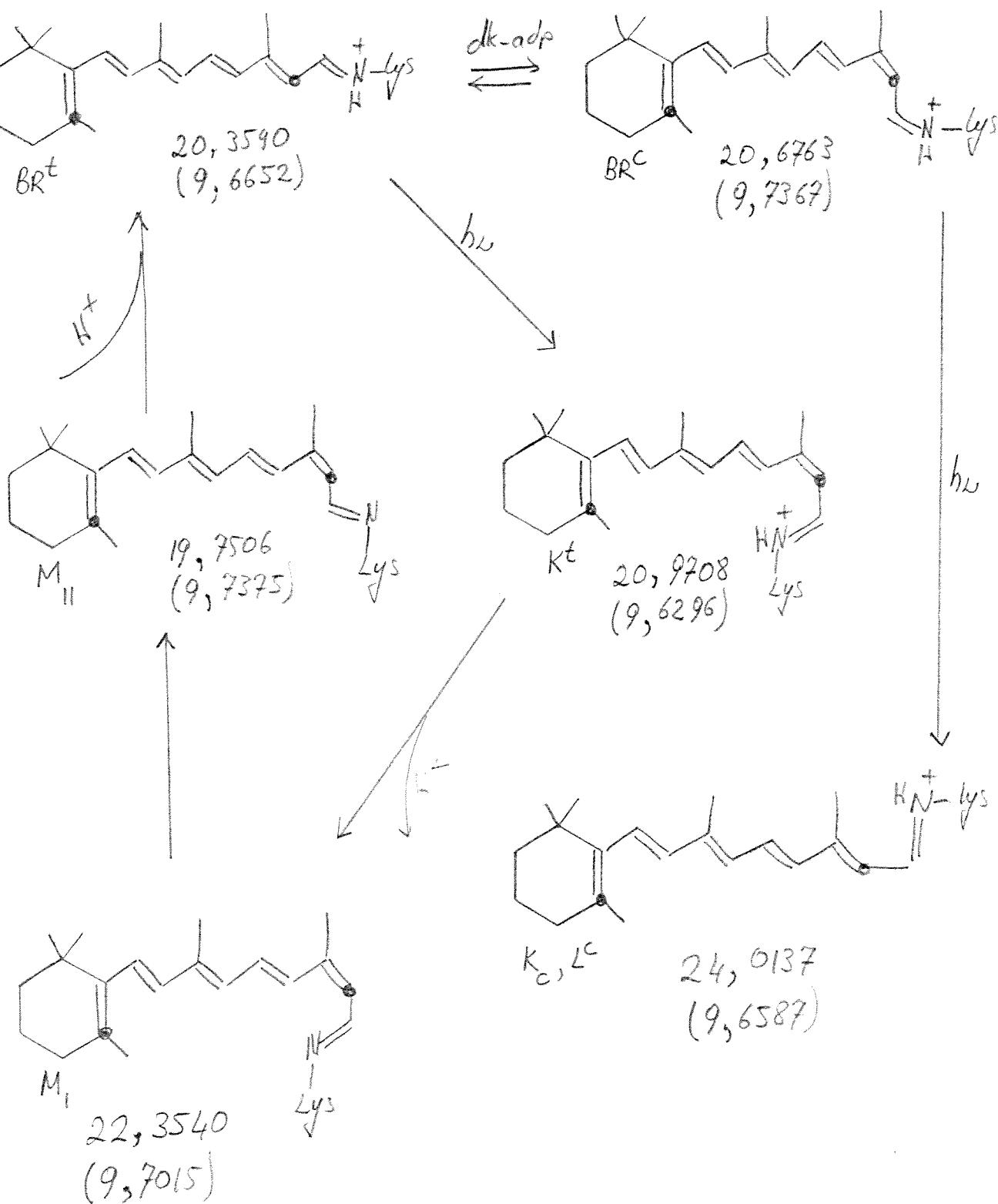


dengesi M_{II} lehine ($E = -0,9257$ kcal) gözükmemektedir. Zaten proton transferi ile, işaretli noktalar arasındaki uzaklık da hemen hemen aynı kalmaktadır. Benzer şekilde



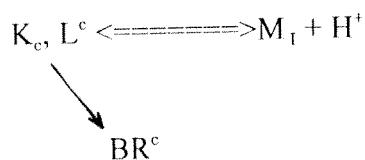
termal dengesi de bir miktar K_c, L^c lehine görülmektedir. Bu muhtemelen aşağıdaki basamaklar üzerinden olabilir.





Şekil 5.1 Schulten modeline göre ortaya atılan çeşitli proton ve serbest retinal Schiff bazlarına ait enerji değerleri(kcal/mol)
 (Hyperchem programı ile hesaplanan)

Görüldüğü gibi bir sürü elektron kayması ve σ -bağları etrafında dönüşüm gerektiren bu denge termal olarak mümkün gözükse bile, yüksek aktivasyon enerjileri gerektirebilir. Benzer mülahazalar



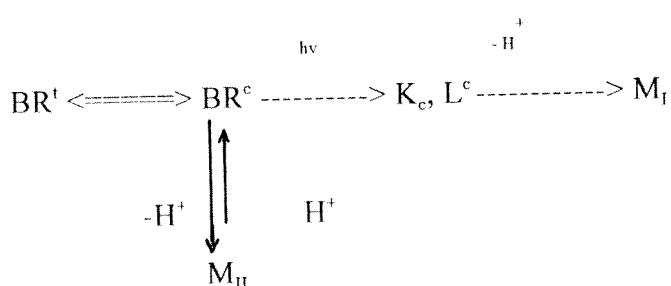
dönüşümü için de söylenebilir. Keza enerji açısından da incelendiğinde



dönüşümü ile mümkün gözükmektedir.

5.3. SONUÇLAR

Bu çalışmada yapılan moleküler mekanik hesapları sonucunda, sırf enerji mülahazasıyla aşağıdaki proton alışverişi siklusu da mümkün görülmektedir.



Bununla beraber, $H^+ + M_{II} \longrightarrow$ dönüşümü enerjistik olarak $M_{II} + H^+ \longrightarrow BR^c$ dönüşümünden daha tercihli olmasına rağmen konformasyon açısından ikincisi, retinalin bulunduğu bölgede daha az perturbasyona neden olmaktadır. Bu bakımdan ikinci dönüşüm, proton kanallarının çapının değişerek proton gradiyeni oluşmasında daha az etkili olmalıdır.

5.4. KAYNAKÇA

Aton B., Doukas A.G., Callender R.H., Becker B., Ebrey T.G, *Biochem.*, 16, 2995, (1977)

Bagley K., Dollinger G., Einstein L., Singh K., Zimanyi L, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A., 79, 4972, (1982)

Belliveau J.W., Lanyi J.K, *Arch. Biochem.Biophys. J.*, 15,215,(1975)

Birge R.R, Pierce B.M., "Photochem. Photobiol." (Ed.A.H.Zewail) Harwood Acad. New York 1983, pp 841-855

Braiman M, Mathies R., *Biochem.*, 19, 5421, (1980)

Dencher N., Wilms M, *Biophys. Structure Mech.*, 1,259,(1975)

El-Sayed M.A, *Acc. Chem Res.*,25,279 (1972)

Fodor S.A.A., Pollard W.T., Gerhard R, van der Berg E.M.M., Lungtenburg J, *Biochem.*, 27, 7097, (1988)

Henderson R, *Ann. Rev. Biophysics. Bioeng.* 6, 87, (1977)

Honig B., Ebrey T, Callender R.M., Dinur U., Ottolenghi M, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A., 76, 2503, (1976)

Honig B, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6,87, (1977)

Kalinski O, Ottolenghi M., Honig B, Korenstein R, *Biochem.*, 20, 649, (1981)

Lewis A., Spoonhower J., Bogomolni R.A., Lozier R.H., Stoeckenius W, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 71, 4462, (1975)

Liu R.S.H., Mead D., Asoto A.E, *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6609, (1985)

Lozier R.H., Niederberger V., Bogomolni R.A., Hwang S.B., Stoeckenius W, *Biochem. Biophys. Acta*, 440, 545, (1976)

Marcus M., Lewis A, *Science*, 195, 1328, (1977)

Mathies R., Lin S.W., Ames J.B., Pollard W.T, *Annu. Rev. Biophys. Biophysical Chem.*, 20, 491, (1991)

Nagle J.F., Tristram S -Nagble, *J. Membr. Biol.*, 74, 1, (1983)

Orlandi G, Schulten K., *Chem. Phys. Lett.*, 64, 370, (1979)

Ort D.R., Parson, W.W *J. Biol. Chem.*, 253, 6158, (1978)

Schulten K., Tavan P, *Nature*, 272, 85, (1978)

Towner P, W. Geartner, B. Walckhoff, D. Oestherhalt, H. Hopf, *Eur. J. Biochem.* 117, 353, (1981)

Warshel A, *Nature*, (London) 260 , 679, (1976)

Warshel A, *Photochem. Photobiol.*, 30, 285, (1978)

BÖLÜM 6

SONUÇLARIN UYGULANABILIRLIK DURUMU

Artan atmosfer kirliliği ve nükleer enerji kullanımındaki sakıncalar 21. yüzyılda fosil ve nükleer yakıtların kullanımını en aza indirecek başka üretim şekilleri geliştirilmektedir. Yenilenebilir enerji kaynakları, su gücü, nükleer fizyon, güneş enerjisi, rüzgar gücü ve hidrojen enerjisini kullanmak imkan dahilinde görülmektedir. Bu konulardaki araştırmalar devam ederken hidrojen enerjisini gelecek yüzyılın enerjisi olarak görenler oldukça etkili araştırmalar yapmaktadır.

Hidrojen gazı gerek önemli bir kimyasal gerekse gelecekte kullanılabilecek çok önemli bir yenilenebilir ve temiz enerji kaynağıdır. Ancak hidrojen gazı üretiminde mevcut teknolojiler henüz bu maddenin yakıt olarak kullanılabilmesine ekonomik açıdan elverişli değildir. Biyolojik yöntemle hidrojen gazı üretimine yönelik bir teknolojinin geliştirilebilmesi gerek ülkemiz gerekse dünyamız için önemli bir gelişme olacaktır.

Hidrojen gazının yakıt olarak kullanılabilmesine olanak sağlayan önemli bir konu bu gazın en verimli şekilde yakılmasıdır. Apollo astronotları uzaya gittikleri zaman, uzay gemileri için gerekli olan elektrik, hidrojen ve oksijen kullanan elektrokimyasal pillerle sağlanmıştır. Bu pillere "yakit pili (fuel cell)" adı verilmektedir. Bu gazlar yakıt pilinde birleşerek su ve doğru akım üretmektedir ve hiçbir kirli ürün çıkmamaktadır. Yakıt pili bir izotermal galvanik elemandır ve içinde kimyasal enerjiyi doğrudan ve sürekli olarak elektrik enerjisine çevirmektedir. Bu dönüşüm, termal güç birimleri için olan Carnot verim limitlerine uymaz ve teorik olarak %80 kimyasal enerji direkt olarak elektrik enerjisine dönüştürülebilir. Pratikte yaklaşık olarak %60 verim elde edilebilir oysa bir Otto motoru yalnızca %35 verimle çalışabilmektedir.

Literatürde birçok yakıt pili çeşidi ve çeşitli sınıflandırmalar bulunmaktadır. En pratik sınıflandırma yakıt çeşidine göre olmalıdır. Ancak hidrojen, üzerinde en çok çalışılan yakıttır. Mühendislik yönünden yapılması en kolay tipler alkalin yakıt pilleridir.

Yakit pili sistemlerindeki en önemli problem fiyattır. Katalizör fiyatları son on yılda 100 kat azaltılmıştır. Katalitik karbon elektrotlar, tek düşük fiyatlı seçenekdir. Yerleşik güç üniteleri için fiyat KW başına 500-1000 dolar arasındadır. Araçlar için ise bu fiyat 30-50 dolar arasındadır.

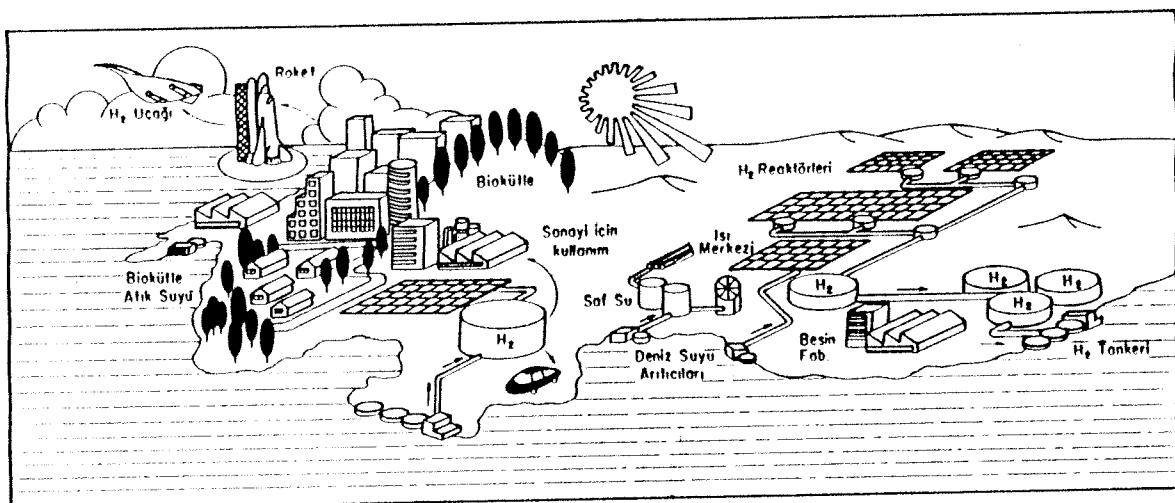
Hidrojen, doğal gazdan reforming sistemiyle CO₂'ı absorpsiyonla ayırarak elde edilebilir ancak böyle bir sistemin küçük uygulamalarda kullanılması zordur ve pratikte alkalin sistemler elektroliz ünitesinden alınan temiz hidrojeni kullanırlar.

Bu projede fotosentetik bakteriler ile yaptığımız çalışmalar bize çok yüksek saflikta hidrojen gazı üretilebildiğini göstermiştir. Bu tür biyoreaktörler değişik kapasitelerde kurulabilir. Bu biyoreaktörler yine uygun koşullar için geliştirilen yakıt pilleri ile elektrik enerjisine dönüştürülebilirse gelecekte temiz ve yenilenebilir, çevre ile uyumlu önemli bir enerji teknolojisine ülkemiz kavuşabilir. Bunun ise ülkemiz kalkınmasına yapacağı katkı çok büyük olacaktır.

Aşağıdaki şekilde gelecek yüzyılda hidrojen enerjisine dayalı bir dünya tasarlanmıştır. Hidrojen, fotosentetik bakteriler tarafından fotobiyoreaktörlerde üretilmekte, bu hidrojen endüstride, taşılarda (araç, tanker, uçak, roket v.b.), ısıtmada ve

elektrik üretiminde kullanılmaktadır. Fotobiyoreaktörlerde üretilen hidrojenin yanında, protein, karbonhidrat, yağ ve benzeri biyokütle yan ürün olarak üretilmektedir. Bu yan ürünlerde gıda sanayiinde veya hayvan yemi olarak kullanılabilir. Bu projede elde edilen sonuçlar gelecekte böyle bir uygulamaya temel teşkil edebilir.

Dünyada bu konuda çok önemli araştırmalar yapılmaktadır. Hidrojen teknolojisinin ülkemizde de geliştirilmesi, bu konuda bilgi ve altyapı oluşturulması önemlidir. Bu projeye laboratuvar boyutlu biyoreaktörler kurulmuş ve geliştirilmiştir. Gelecekte bu biyosistemlerin sürekli hidrojen üretme koşullarının araştırılması ve bu amaçla sürekli çalışacak biyoreaktörlerin tasarılanması gerekmektedir. Ekibimiz bu konuda bir proje hazırlayarak TÜBİTAK 'a sunacaktır.



Şekil 6.1. Gelecekte Hidrojen Enerjisi Üretim ve Kullanım Planı

Proje ile ilgili Yayın / Tebliğlerle İlgili Bilgiler

TÜBİTAK KTÇAG 115 Projesi esnasında proje ekibi tarafından yapılan konu ile ilgili yayınlar aşağıda verilmiştir.

Tezler

Banu Kaya, "Hydrogen Gas Production by *Halobacterium halobium* coupled to *Escherichia coli* in a Photobioreactor" M.S. Tezi O.D.T.Ü. ANKARA 1995.

Tüzün Arık, "Production of Hydrogen By *Rhodobacter sphaeroides*, OU001" M.S. Tezi O.D.T.Ü., Ankara, 1995.

Mustafa Tanzer Ergül "Design and Manufacture of a Low Temperature Hydrogen-Oxygen Alkaline Fuel Cell" M.S. Tezi O.D.T.Ü. Ankara, 1995.

Vedat Sediroğlu, "Photoelectrochemical Hydrogen Production by *Halobacterium halobium*", doktora tezi, O.D.T.Ü., Ankara (devam ediyor).

Makaleler/Tebliğler

Yücel, M., B.M.Zabut, İ.Eroğlu and L.Türker, "Kinetic Analysis of Light Induced Proton Dissociation and Association of Bacteriorhodopsin in Purple Membrane Fragments Under Continuous Illumination", Journal of Membrane Science, 104, 65-72, 1995.

Sediroğlu, V., A.Aydemir, U. Gündüz, M. Yücel, L.Türker and İ.Eroğlu, "Modelling of Long-Term Photoresponse of Bacteriorhodopsin Immobilized on Cellulose Acetate Membranes" Journal of Membrane Science, baskıda.

Sediroğlu, V., U.Gündüz, M.Yücel, L.Türker and İ.Eroğlu, "The Stability of Bacteriorhodopsin Immobilized on Cellulose Acetate Membranes", Journal of Membrane Science, (gönderildi).

Kaya, B., U.Gündüz, İ.Eroğlu, L.Türker and M.Yücel, "Hydrogen Gas Production by Coupled Enzyme Systems of Halobacterium Halobium and E.Coli" Lecture Notes of Design and Operation of Bioreactors, (Sükan,S.,Editor). Med., Campus Prog., Kuşadası, Turkey June 27-July 1, Ege University Biotechnology Center, 239-248, 1994.

Sediroğlu, V., A.Aydemir, U.Gündüz, M.Yücel, L.Türker, İ.Eroğlu, "Modelling of Long-term photoresponse of bacteriorhodopsin immobilized on cellulose acetate membranes" presented in 7 th In. Sym. on Synthetic Membranes in Science and Industry, Tubingen, GERMANY, Aug 29-Sept 1 Extended abstract published in the proceedings, pp 85-88, 1994.

Sediroğlu V., L.Türker, M.Yücel, U.Gündüz and İ.Eroğlu, "Photoresponse of Bacteriorhodopsin Immobilized on Cellulose Acetate Membranes" Biyomed 2, 21-23 Eylül 1995, Ankara Proceedings of the Second International Symposium on Biomedical Science and Technology, ODTÜ Basım İşliği, 35-36, 1995.

Kaya, B., U.Gündüz, İ.Eroğlu, L.Türker and M.Yücel, "Hydrogen Gas Production Using Coupled Enzyme Systems from E.coli and *Halobacterium halobium*" 11 th World Hydrogen Energy Conference, Stutgard Germany 1996 (baskıda).

Sediroğlu, V., M.Yücel, U.Gündüz, L.Türker, A.Aydemir and İ.Eroğlu "Photoelectrochemical Hydrogen Production by *Halobacterium halobium*" 11 th World Hydrogen Energy Conference, Stutgard Germany 1996 (baskıda).

Arık, T., U.Gündüz, M.Yücel, L.Türker, V.Sediroğlu and İ.Eroğlu "Photoproduction of Hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides*, OU001, 11 th World Hydrogen Energy Conference, Stutgard Germany 1996 (baskıda).

Ergül, M.T., L.Türker and İ.Eroğlu "Electricity Generation by an Alkaline Fuel Cell" 11 th World Hydrogen Energy Conference, Stutgard Germany 1996 (baskıda).

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
- Proje No: KTÇAG 115	2- Rapor Tarihi: 2 Şubat 1996
- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.9.1993; 1.9.1995	
- Projenin Adı: Güneş Enerjisi ile Hidrojen Gazı Üretimine Yönelik Bir Biyoreaktörün Tasarımı ve Geliştirilmesi	
- Proje Yürüttücsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof.Dr.Inci Eroğlu, Prof.Dr.Meral Yücel, Prof.Dr.Ufuk Gündüz, Prof.Dr.Lemi Türker, Vedat Sediroğlu, Banu Kaya, Adnan Aydemir	
- Projenin Yürüttüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı	
- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: ODTÜ, Araştırma Fonu TÜBİTAK	
- Öz (Abstract): Bu araştırmada güneş enerjisi ile hidrojen gazı üretilmesi amacı ile üç değişik biyosistem üzerinde çalışılmıştır. Bu biyosistemler; <u>Rhodobacter sphaeroides</u> OU 001 (DSM 5864) ile hidrojen üretimi, <u>Halobacterium halobium</u> S.6- <u>E.coli</u> (DSM 1576) nin ikili enzim sistemi ile hidrojen üretimi ve <u>Halobacterium halobium</u> S9-indirgeyisi elektrot ile elektrokimyasal yöntemle hidrojen üretimidir. Her bir biyosistem için uygun biyoreaktörler tasarlanmış ve kurulmuştur.	
Anahtar Kelimeler: Hidrojen, <u>Halobacterium halobium</u> , <u>Rhodobacter sphaeroides</u> , <u>E.Coli</u> , biyoreaktör, bacteriorhodopsin, <u>Hidrojen Üretimi</u>	
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler 3 Makale basılmış ve 4 Tebliğ basılmak üzere 11. Dünya Hidrojen Enerjisi Konferansına kabul edilmiştir. (listesi raporda verilmektedir) 2 tebliğ Konferanslarda sunulmuştur.	
10- Bilim Dalı: Biyoteknoloji 614.02.07 Doçentlik B. Dalı Kodu: 603.02.01 ISIC Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu:	
11- Dağıtım (*): <input type="checkbox"/> Sınırlı <input checked="" type="checkbox"/> Sınırsız	
12- Raporun Gizlilik Durumu : <input type="checkbox"/> Gizli <input checked="" type="checkbox"/> Gizli Değil	

) Projenizin Sonuç Raporunun ulaşırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz