

A bioreactor

Besiyerinin tasarım ve optimizasyonu

C N O H

özel gereksinimler

üretim faktörleri

ENERJİ

tanımlı

vs

karmaşık

Yüksek maliyet
Belirli amaçlar için şart
-oksitroflar!

Bazı ürünlerde kullanılamaz!
(Farma)

Karbon

Cerelose	Molasses
Maltose	Oils
Fructose	Corn starch
Glycerol	Dextrins
Methanol	Whey

* Ozmolekülerite !!

Inorganik iyonlar

P S K Ca
Mg Mn Zn Fe
Mo

Nitrojen

Organik - soybean
corn gluten
Maya özütü
Pepton
Amonyum tuzları
Amonyak
Sodyum nitrat
Üre

Üreme Faktörleri

Vitaminler
Oksitreflar için aminositler
purin, pirimidin, ...

Oksijen

Birçok molekülde
Moleküler oksijen
Besi yeri oksijenasyonu !
35°C'de sorun olabilir

İndükleyiciler

IPTG
Galaktoz
Arabinoz
Metanol

Besleyici olmayan bileşenler

Seçiciler → Antibiyotikler
Çeşitli boyalar (Metilen mavisi, ezrin, kristal viyole)
Toksik bileşikler

Katılaştırıcılar → Agar
Jelatin
Silika jel

[H⁺]

Küçük ölçekte Tris, MOPS gibi

bir tampon uygun

Büyük fermentörlerde otomatik
asit/baz eklenmesi (otomasyon)

Sıcaklık

Optimal sıcaklık

Suboptimal sıcaklık →

Üreme hızının kontrolü için
avantajlı olabilir!

Köpük oluşumu

Silikonlar

Polietylenglikoller

Polipropilenglikoller

} önleyici

Sterilizasyon

ISI + BASINÇ #1

γ-ışınları

Süzme/Filtrasyon

Kuru sıcak

Düşük sıcaklıkta tekrarlayan döngüler

...

Sterilizasyon - 2

* Endüstriyel ölçekte ISI + BASINÇ



* Bazı bileşenler yüksek sıcaklığa dayanıksız!
Arg, Gln, Trp, Gogun antibiyotik, vitaminler

* Kompleks oluşumu - Presipitasyon

2-3 değerlikli metal iyonları - Fosfatlar

* Maillard reaksiyonu: Glukoz + 1° aminler
Stok Glukoz ayrı olarak steril edilmeli

Besiyeri optimizasyonu: Peptonları küp küp doğramak...

- * Bir seferde tek bir değişkeni optimize etmek/diğerlerini sabit tutma yöntemi
- Bileşenler arası etkileşim gözden kaçır
- Çoooooook zaman alır!

"FULL FACTORIAL" Tasarım

Ör: 6 bileşenin etkisini analiz etmek için: (herbiri için 3 farklı konsantrasyon deniyor dalım...)

$$3^6 = 729 \text{ deneme (replikalar hariç!!!)}$$



Fazla sayıda değişken ile çikilecek çile değil...

Bilim adamı çilekeştir, "Univariate" tasarımı sever

"Multivariate" tasarım

- daha verimli
- etkileşimlerin gözlenmesi mümkün
- bazı ana etkiler perdelenebilir!

Seçeneklerimiz:

① Komperatif

② Yanıt yüzeyi modellenmesi

③ Regresyon modellenmesi

④ Tarama testleri

hangi faktörler önemli/önemsiz

İstatistiksel yöntemler: Peptonlar büyük olasılıkla küp küp
doğruymuştur.

Plackett - Burman Tasarımı (Fraksiyonel faktöryel tarama tasarımı)

Sistem hakkında "TAM"/"EKSİKSİZ" bilgi bulunmadığında (ya da) Bu bilgiyi edinecek kadar çok sayıda deneme yapmak istemediğimizde...

** "D" düzeylerinde değer alabilen N sayıda bağımsız değişkenin (faktörün) ölçüm sonuçlarındaki ~~etkisini~~ etkisini araştırmak

Bunu yaparken,

- en az sayıda deneme yapmak
- bağımlılıkların tahmininde varyansı minimize etmek
- faktörler (değişkenler) arası etkileşim göz ardı edilebilir düzeyde

P-B tasarımı

- 2 düzeyli
- Deney sayısı dördün katları = 8, 12, 20, 32, ...
- Faktör (değişken) sayısı $k \leq \text{deney sayısı} - 1$

TRAFİK KAZALARINDA FAKTÖRLER:



Faktörleri bağımsız kabul et

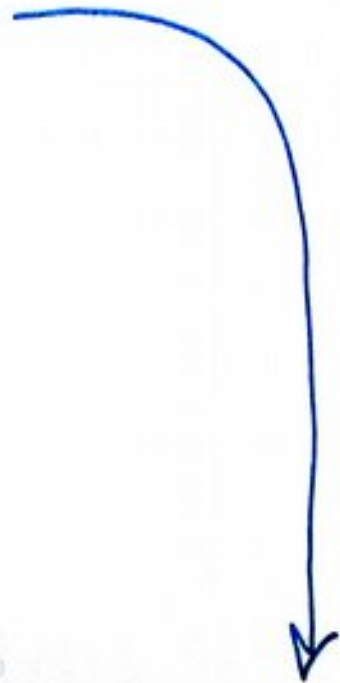
Her bir denemede (kazada) faktörlerin düzeyini saptayın

Ör: İşiklendirme → iyi / kötü, yolda hasar → var / yok, ...

Kaza şiddeti → Yanıt

P - B tasarımı için

- Besiyeri bileşenlerini (değişkenler) belirle
- Ölçülecek yanıt = biyokütle oluşumu / enzim akt. / ürün kons.
- (+) : Yüksek düzey (-) : Düşük düzey
- Matrisi oluştur



- Denemeleri gerçekleştir !

- $x_1 \dots x_7$ için

$$\text{Etki} = \frac{\sum \text{Yüksek düzey için yanıtlar}}{6} - \frac{\sum \text{Düşük düzey için yanıtlar}}{6}$$

- Dummy 1 \dots Dummy 4 için

$$\text{Etki} = \frac{\sum \text{Yüksek düzey için yanıtlar}}{6} - \frac{\sum \text{Düşük düzey için yanıtlar}}{6}$$

Herhangi bir "dummy" değişken için
sıfıra yakın çıkmıyor ise \rightarrow



- "Dummy" değişkenlerin etkisini kullanarak varyans etkisi (V_{eff}) hesaplanır:

$$V_{eff} = (E_1^2 + E_2^2 + E_3^2 + E_4^2) / 4$$

- Standart hata: $SE = \sqrt{V_{eff}}$

- Student t testi: $t_{x_1} \dots t_{x_7}$

$$t_{x_1} = E_{x_1} / SE$$

p değeri hesaplamak/beklemek

her bir değişkenin (besi yeri bileşeninin)

biyokütle/enzim aktivitesi/ürün konsantrasyonu
üzerinde etkili olup olmadığına ilişkin öngörü...

TEBRİKLER!

Tarama yöntemini kullanarak çok sayıda değişken arasında önemli olanları keşfettik.

Şimdi daha detaylı analiz zamanı :

Yanıt yüzeyini keşfetmek (!) istiyorsunuz

3 değişken için full quadratic polinomiyal model :

$$Y = b_0 + b_1(x_1) + b_2(x_2) + b_3(x_3) \leftarrow \text{linear}$$
$$+ b_{12}(x_1 x_2) + b_{13}(x_1 x_3) + b_{23}(x_2 x_3)$$
$$+ b_{11}(x_1)^2 + b_{22}(x_2)^2 + b_{33}(x_3)^2$$

Yanıt

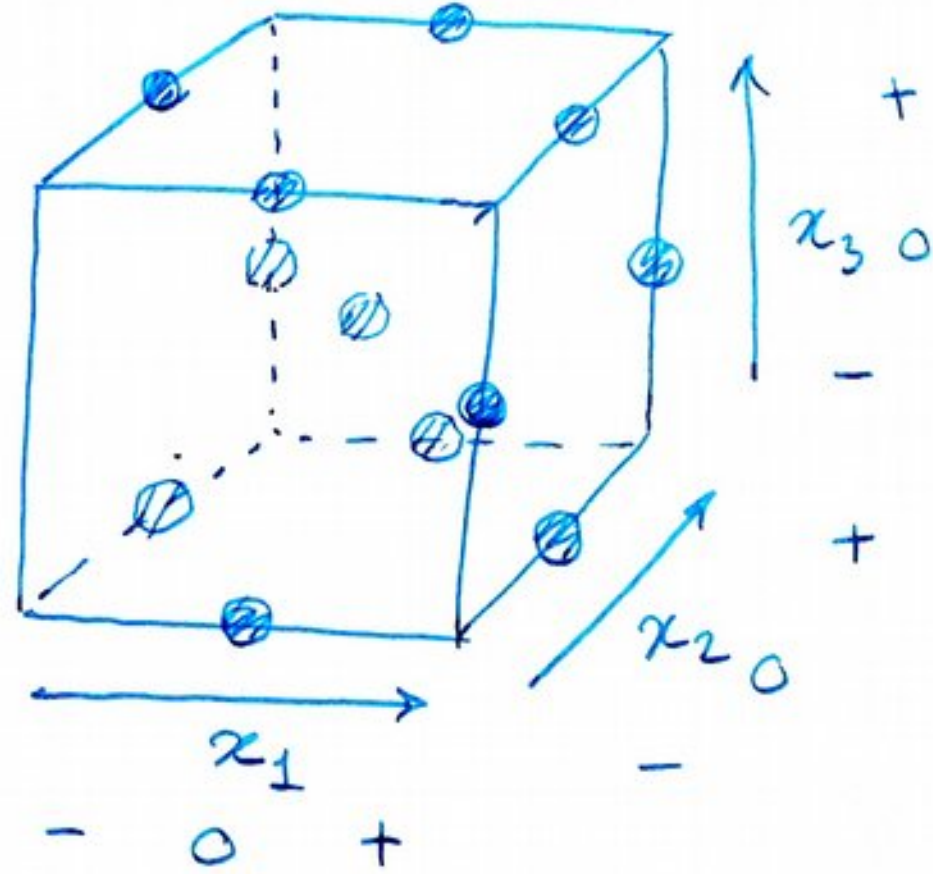
quadratic

ikinci derece

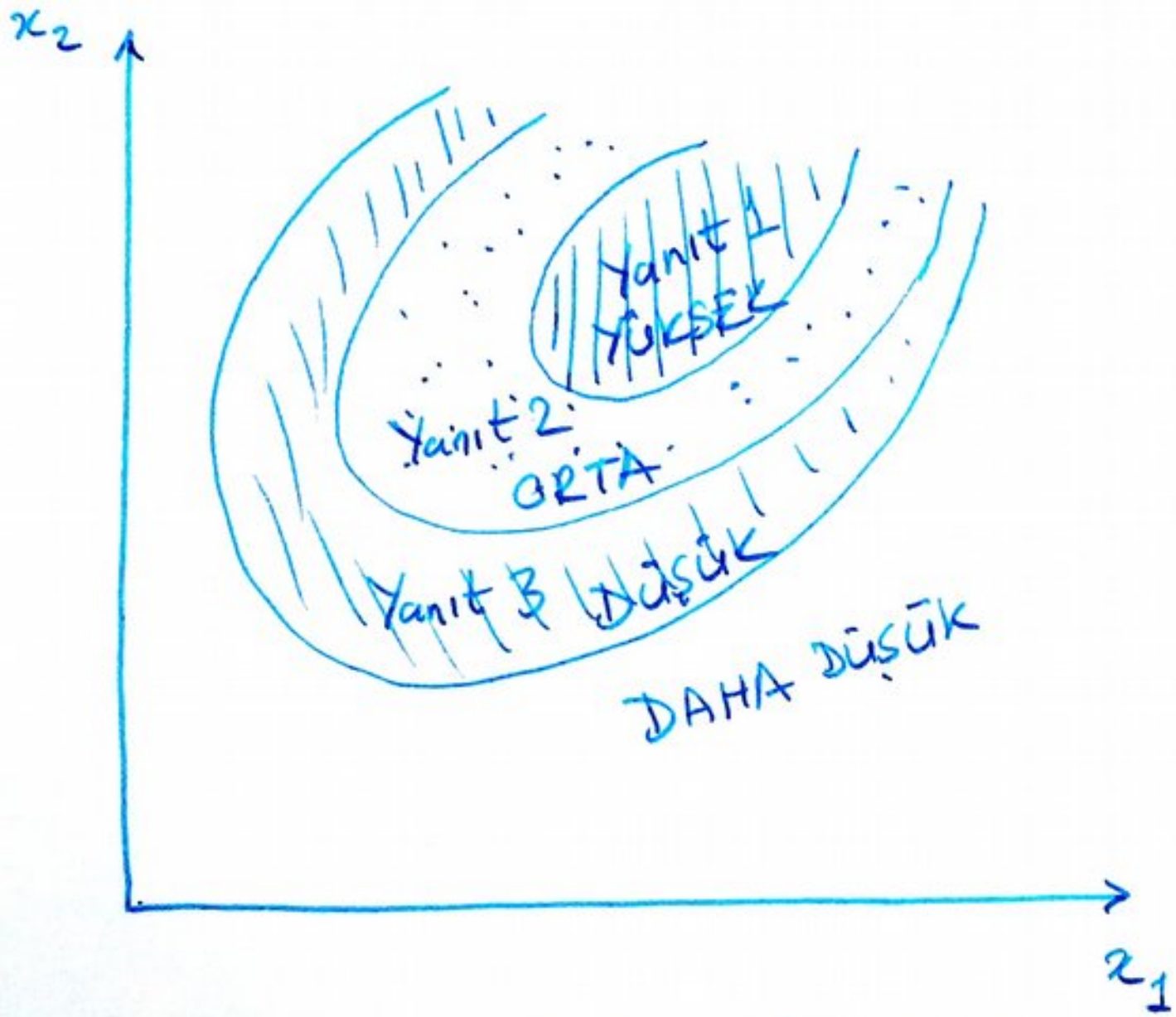
Zor geldi ise hala parsiyel faktöriyel
seçenek var

Box - Behnken tasarımı

Deneme	Bağımsız değişkenler		
	x_1	x_2	x_3
1	+	+	0
2	+	-	0
3	-	+	0
4	-	-	0
5	+	-	0
6	+	0	+
7	-	0	+
8	-	0	-
9	0	+	+
10	0	+	-
11	0	-	+
12	0	-	-
13	0	0	0

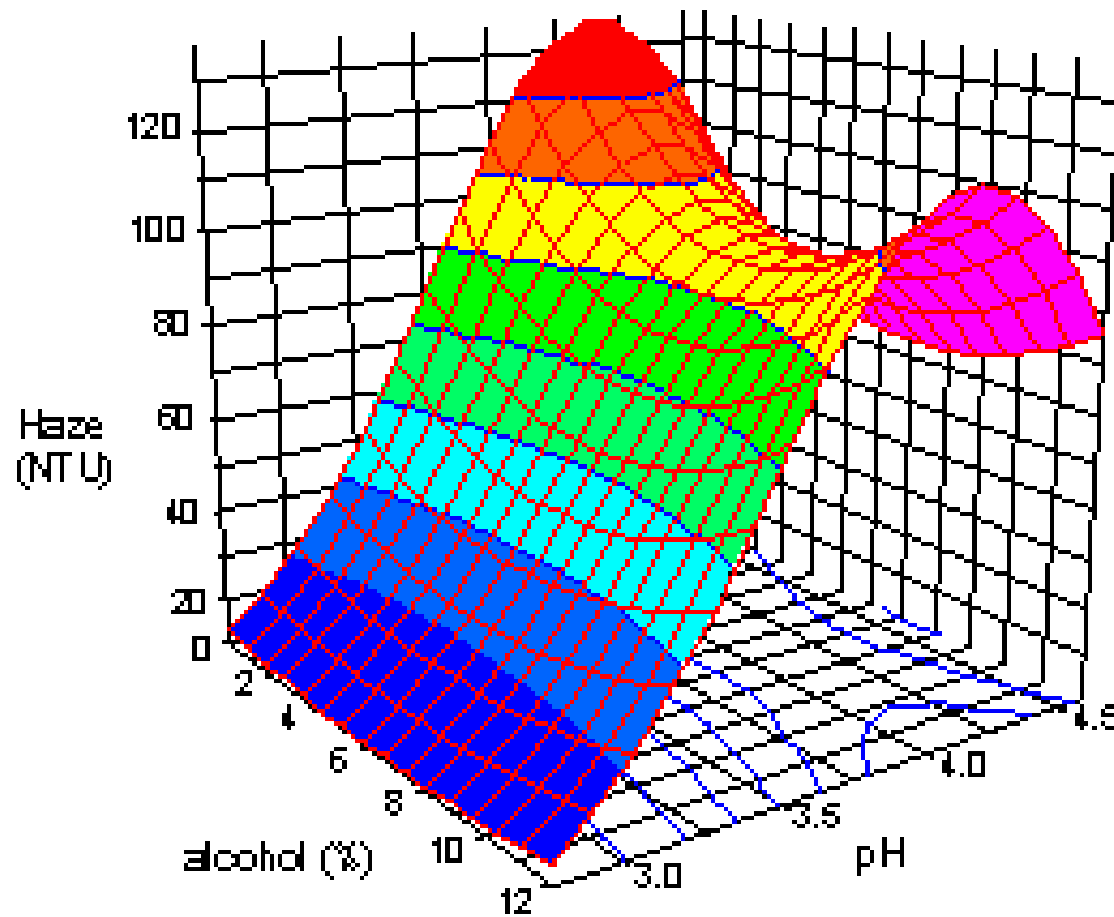


Denemelerden elde edilecek sonuçlar kullanılarak regresyon analizi
→ Quadratic polynomial model oluşturulur!



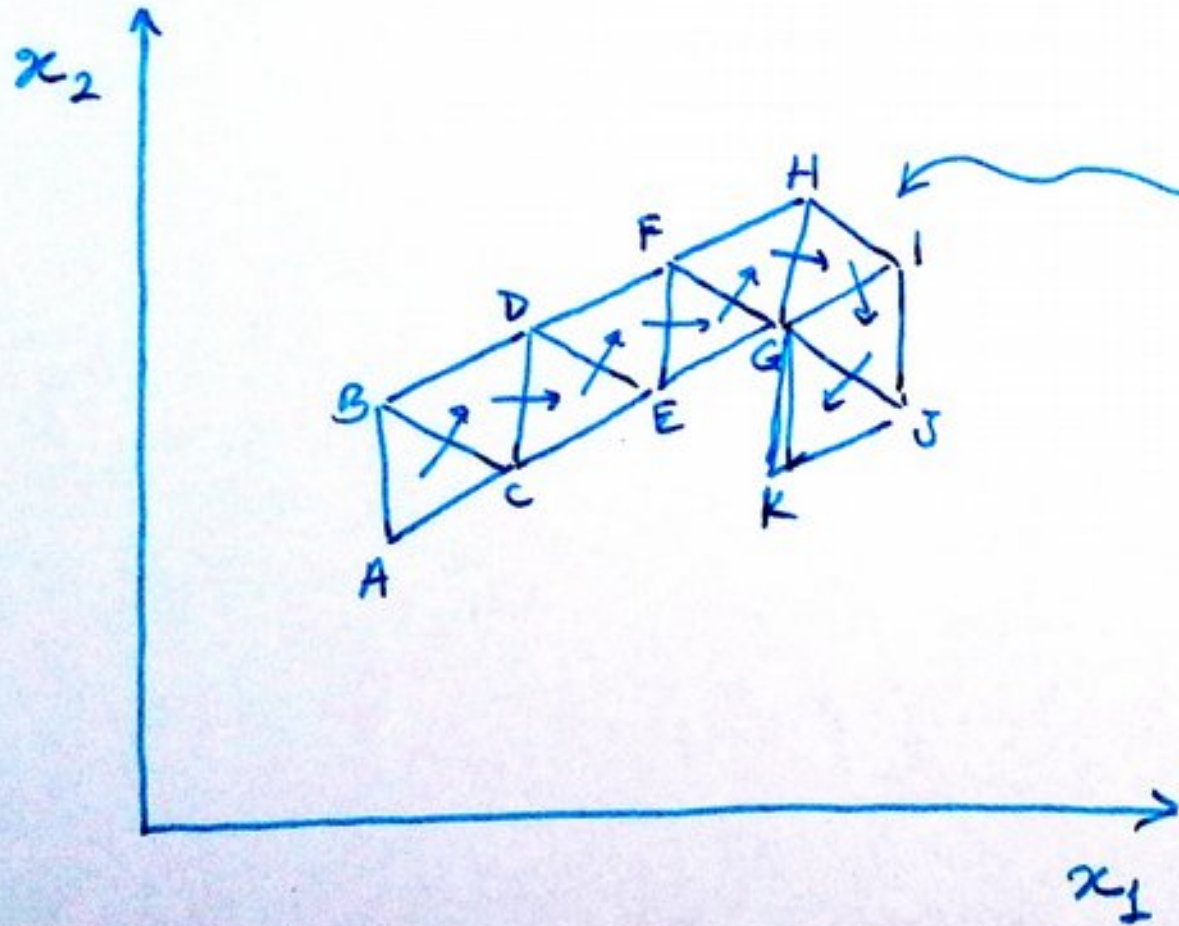
Bağımsız değişken çiftleri için
kontür eğrileri oluşturulur

Response Surface for Haze (NTU)



"Sequential Simplex Method"

Tarama sonrası yönlenilen değişkenler için:



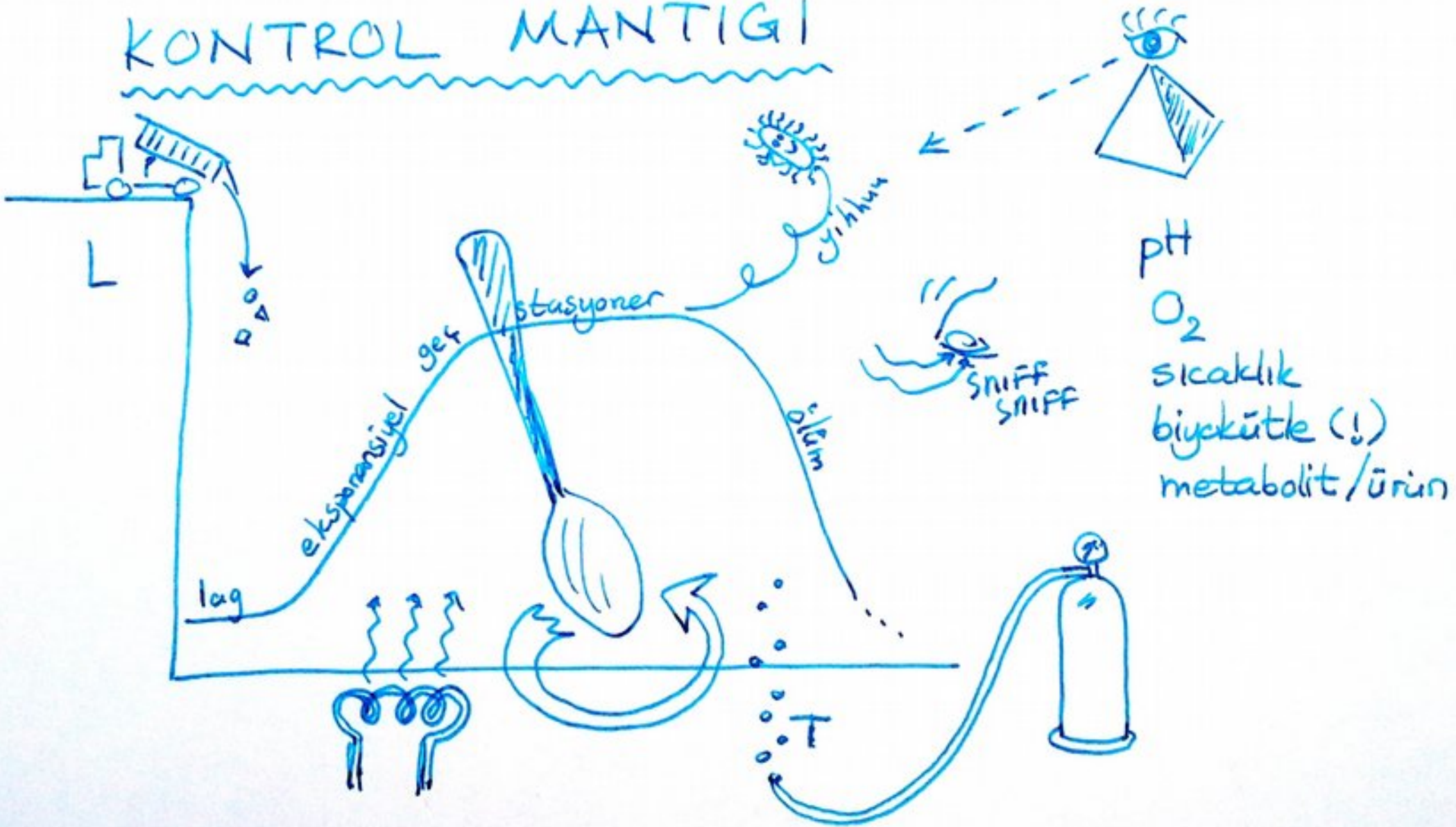
$n = 2$; 2 değişken

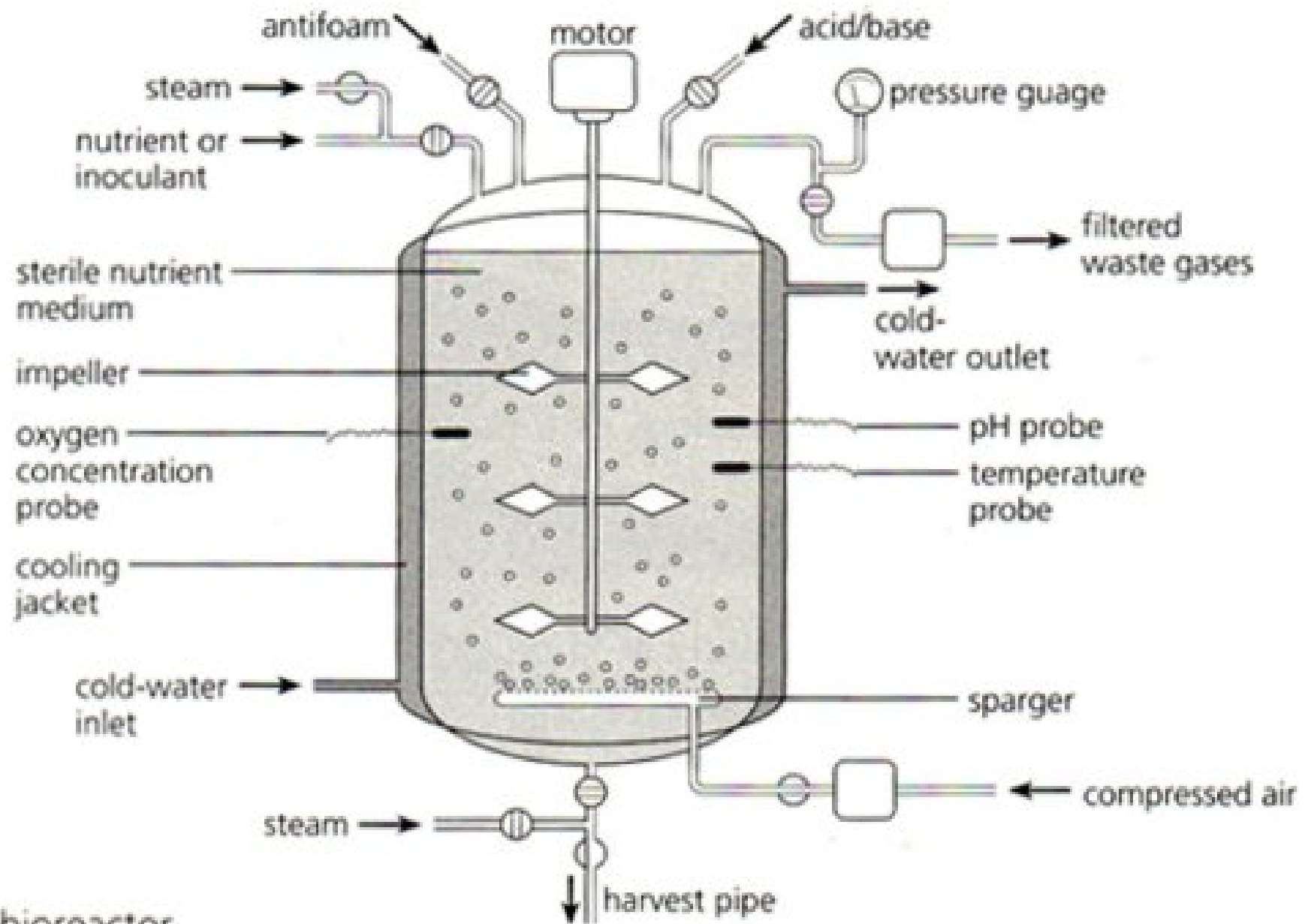
$$n + 1 = 3$$

ÜÇGEEN

3 değişken için ?

KONTROL MANTIĞI





A bioreactor

Isıtma - Soğutma

Basınçlı hava

Buhar kaynağı - in situ sterilizasyon / otoklav

besiyeri sterilizasyonu
ayrı bir dert
(büyük hacimde)

Elektrik kaynağı - ⚡ Sanayi tipi - trifaze!

Boyut

Ajitasyon - Alt / Üst

Aerasyon

Materyal - Cam / Çelik

Aseptik bağlantılar - Septum kapılar, boru bağlantıları
inokülasyon, örnek alma
geriye doğru üreme sorunsalı!

Neden kontrol?



türbidostat

- * yukarıdan aşağı regülasyon
- populasyon genişledikçe yeni/taze besiyeri eklenir sayı azaltılır

Kritik parametre:
organizmanın maksimum üreme hızı

Kinetik olarak

av sayısının
avcı sayısı ile
kontrolü

populasyonun
enfeksiyon ajanı
ile kontrolü

benzerlik

vs

kemostat

- * aşağıdan yukarı regülasyon
- besin maddesinin konsantrasyonunu sabit tutulur
- populasyon boyutu buna göre kendisini ayarlar

Kritik parametre:
organizmanın kısıtlı bir kaynağı kullanabilme yeteneği

EVİRİMİN
ÇARKLARI

saklanma yerlerinin sayısı
avcıdan kaçma için belirleyici

Neyi kontrol ?

[H⁺]

Çözünmüş O₂

Sıcaklık

Köpük

Çözünmüş CO₂

Redoks

Vert-gazı analizi

Biyokütle

Nasıl kontrol ? (ölçüm)

İyon geçirgen cam elektrod, referans V, hücre

Galvanik problemler, Polarografik problemler

Solid-state sıcaklık sensörleri (aka transistör)

Basit, kontakt tip problemler - seviye

Bikarbonat tamponu içinde pH elektrodu
CO₂ geçirgen membran ile çevrelenmiş.

Platin elektrod vs referans elektrodu

Koku ve linimetrimizdir

Kolay olmamakla birlikte, faydeli :)

Beziyeri sterilizasyonu
ve depolanması

Geriye doğru üremenin
önlenmesi

SÜREKLI
KÜLTÜR

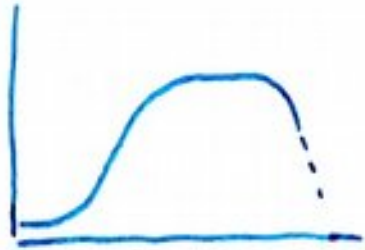
Akemin kontrolü

Toplam hacmin
kontrolü

"Batch" kültür

Besleme bir kez başta yapılır.

Biyoreaktör sürecin sonuna kadar çalıştırılır.



Gerekşimin duyulan besin maddelerinin kontrollü eklenmesi

"Fed-Batch" kültür

Besin maddeleri süreç boyunca eklenir
Ürün en sonunda hasat edilir.

- Substrat inhibisyonu önlenir

- Yüksek hücre yoğunluğu

- Crabtree etkisi -
yüksek konsantrasyonlarda glukoz aerobik etanol oluşumuna neden olur

- Katabolit represyonu

- Oksotrofik mutantlar

- Korepressor + Apo repressor → holo repressor

- Sürecin daha uzun ömürlü olması

Sürekli kültür

Besin maddeleri süreç boyunca eklenir

Bollukta hücreler substratı ürüne (ör: ATP) çevirir.
(-) regülasyonu

Biyokütle ölçümü



Performans ölçümü {
Speşifik hız \rightarrow ünite /g biyokütle /saat
Volumetrik hız \rightarrow ünite /ml /saat

Offline vs online ölçüm

Kimyasal yöntemler

- Biyoluminesans / kemilüminesans
Üreme \propto ATP üretimi \rightarrow
- DNA analizi
- Floresans
NADH floresansı
- Near-IR spektroskopisi
organik kimyasalların
700-2500 nm'deki
absorbansları

Mikroskopik yöntemler

- Doğrudan sayım
- Canlı hücre sayımı - boyalar
- Epifloresans - akridin turuncusu

Fiziksel Yöntemler

Kuru ağırlık ölçümü

Paketlenmiş hücre hacmi

Türbidometri

Nefelometri

Elektriksel sayım / boyutlandırma

Akım sitometrisi

Dielektrik permitivite
0 - 0,5 MHz kapasitans

Matematiksel modellemeye dayalı yöntemler

Tüm sistemin bilinmesi gerekir!

Kütle spektrometrisi

Vent-gazı analizi

CER → CO₂ evolution rate

OUR → O₂ uptake rate

RQ → Respiratory quotient

$$RQ = CER / OUR$$