

KİM 458

Biyoteknolojinin Temelleri

Mikrobiyal ođalma ve Biyoürün Oluşumu, Bitki ve Hayvan Hücre Kùltürleri

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

MİKROBİYAL ÇOĞALMA ve BİYOÜRÜN OLUŞUM KİNETİĞİ

Endüstriyel boyutta bir üretimin planlanması aşamasında üretilecek veya katalizör olarak olarak kullanılacak mikroorganizmaların;

- En uygun tür olduğunun belirlenmesi,
- Mikroorganizmaların fizyolojik özelliklerinin tespiti,
- Ortam faktörlerine bağımlı değişimi ve teknolojik açıdan en uygun reaktörün şekillendirilmesi gerekir.

Kültürler **Kesikli** ve **Kesiksiz** olmak üzere 2' ye ayrılırlar.

Kesikli Kültür

Mikroorganizmaların büyüme/çoğalması belirli kurallara uyar.Bu nedenle bazı koşullar altında inkübasyon sonunda beklenen hücre sayısı ve biyokütle miktarı hakkında önceden tahminde bulunulabilir.

Organizmaların büyümesinde değişik fazlar vardır:

A. İnkübasyon Fazı (**Lag-Faz**)

B.Uyum ve Hızlanma Fazı (**Akselerasyon Fazı**)

C.Eksponansiyel (Logaritmik) Faz (**Log-Faz**)

D.Geçiş Fazı

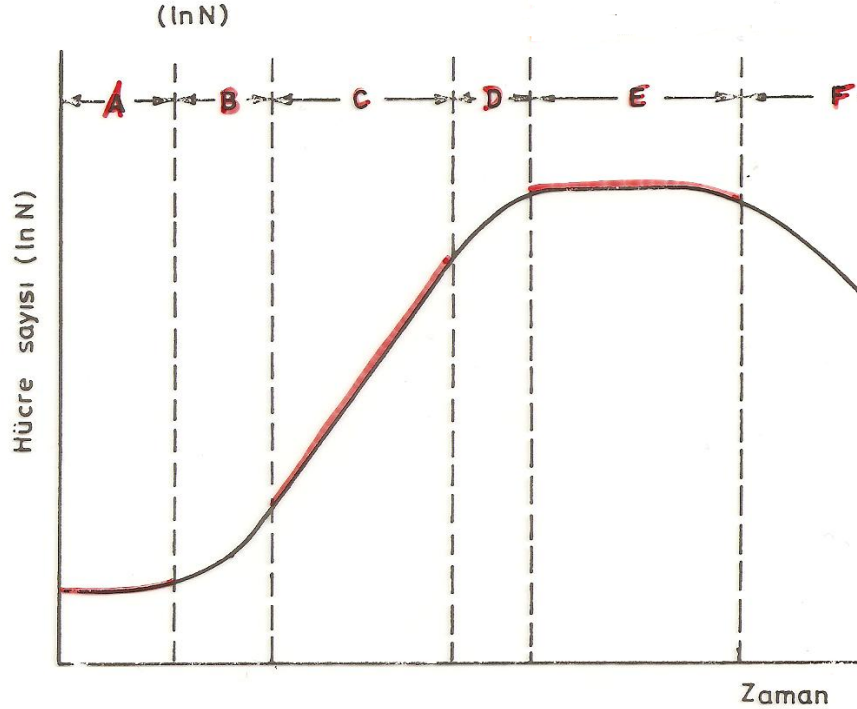
E.Stasyonel Faz

F.Letal Faz (**lm Fazı**)

Mikrobiyal Büyüme ve Biyoürün Oluşum Kinetiği

Kesikli Kültür

D (Geçiş Fazı)
E (Stasyoner Faz)
F (Letal Faz) : Ölüm Fazı



Mikroorganizmaların büyüme eğrisi

A (Lag Fazı)

B (Akselerasyon Fazı)

C (Eksponansiyal Faz)

:İnkübasyon Fazı

:Uyum ve Hızlanma Fazı

:Log-(Logaritmik) Faz (maksimum üreme fazı)

(A)İnkübasyon Fazı (Lag-Faz) :

Bu fazda hücre bölünmesi olmaz ve ilk hücre bölünmesine kadar devam eder. Aşılana hücre sayısında değişiklik olmaz.

Besi ortamından su ve substratlar alınıp RNA, ribozom ve protein biyosentezinde (*özellikle enzim sentezinde*) değerlendirilir (**bu nedenle hücre çoğalması olmadığı halde biyokütle artar**).

Bu fazın süresi;

- 1) Aşı kültürü miktarına
- 2) Aşı materyalinin yaşına
- 3) Substratın uygunluğuna bağlıdır.

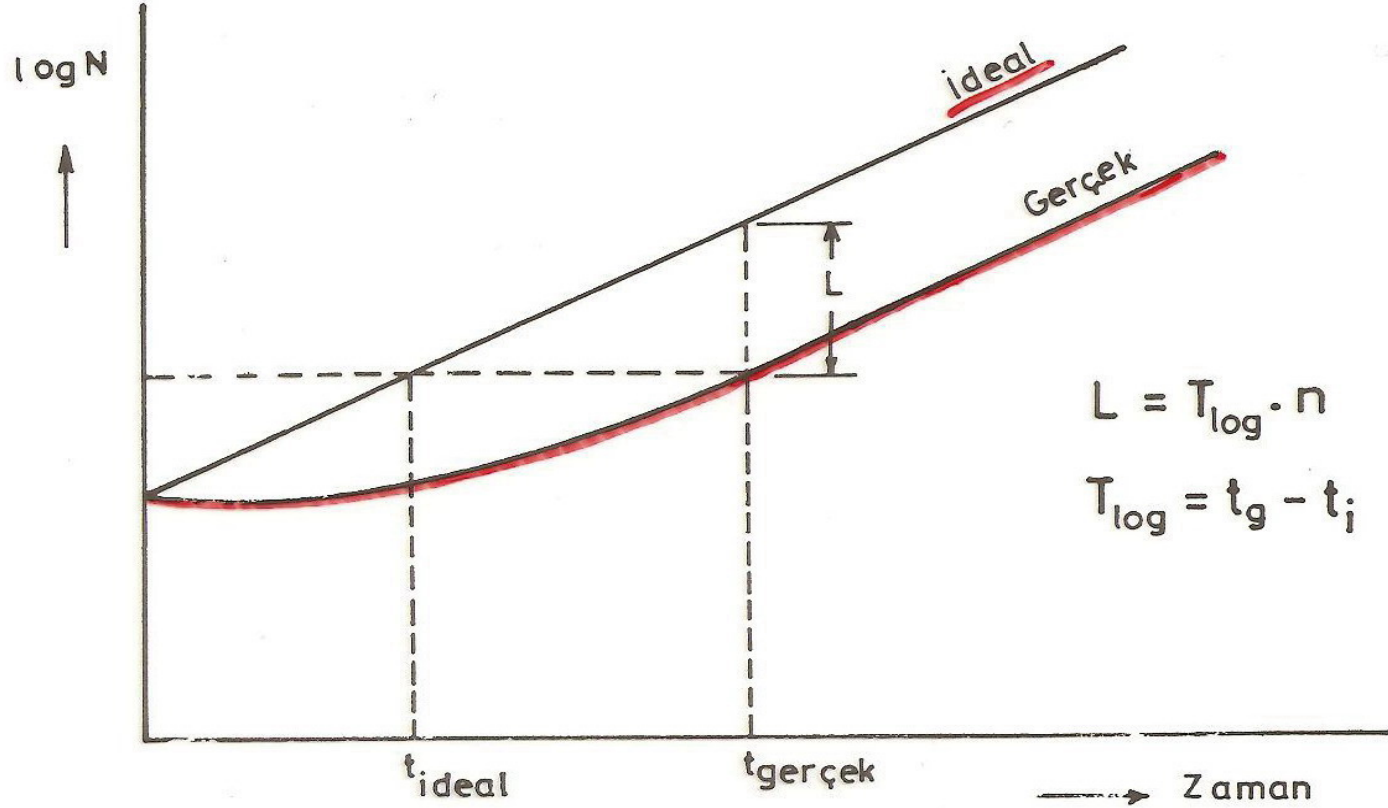
B) Uyum ve Hızlanma Fazı (Akselerasyon Fazı)

Bu fazda hücre çoğalması başlar ama yavaş yürür, artış eksponansiyel değildir. DNA miktarı artar, enzim sentezi devam eder, regülasyon etkileri gözlenir.

Bazı bakımlardan benzerlik gösterdiklerinden, çoğu kez A ve B fazları birlikte değerlendirilirler. Bu iki fazın süresi (T_{lag}), aşılamadan itibaren kültürün C-Fazına (**Log-Faz**) geçmesine kadarki süredir.

Hızlanma zamanı (T_{lag}), bilinen bir kültür ile hızlanma zamanı bilinmeyen bir kültürün kıyaslanmasıyla (**L-Değeri**) tayin edilir.

Bir Bakteri Kültürünün Hızlanma Zamanı



L-Değeri, ideal eksponansiyel büyüyen bir kültüre kıyasla gerçek bir kültürde hücre bölünmesinin ne denli geri kaldığını gösterir.

(g = ortalama jenerasyon süresi, n= jenerasyon sayısı)

C) Eksponansiyel (Logaritmik) Faz (Lag-Faz)

Büyüme hızı pratik olarak sabittir ve maksimuma ulaşmıştır. RNA'ya kıyasla DNA sentezi daha fazladır.

Hücreler diğer fazlara göre daha küçük olup kuru kütlenin hücre sayısına oranı diğer fazlara göre daha düşüktür.

DNA/RNA miktarının oranı açısından kıyaslandığında protein miktarı diğer fazlardan daha azdır. Bu fazdaki hücre çoğalması kolayca hesaplanabilir.

D) Geçiş Fazi

Bu fazda hücre çoğalma hızı sürekli azalır. Fakat genel olarak düşünöldüğünde hücre sayısı ve biyokütle artışı devam eder. Logaritmik fazdan üreme hızının düşük olduğu geçiş fazına geçmenin başlıca sebepleri şunlardır:

- Toksik metabolik ürünlerin oluşması
- Substratın tükenmesi
- Vizkozite artışı nedeniyle O₂ temininin zorlaşması

Bu fazda çok değişik yaşlarda hücreler bulunabilir. Logaritmik olarak çoğalan küçük hücreler yanında, çok yavaş veya hiç üremeyen düşük DNA ve yüksek protein içerikli büyük hücreler ve ölü hücreler bulunur.

E) Stasyoner Faz

Bu fazda yeni oluşan hücre sayısı ve ölen hücre sayısı dengelenmiştir. Toplam hücre sayısı sabit kalır.

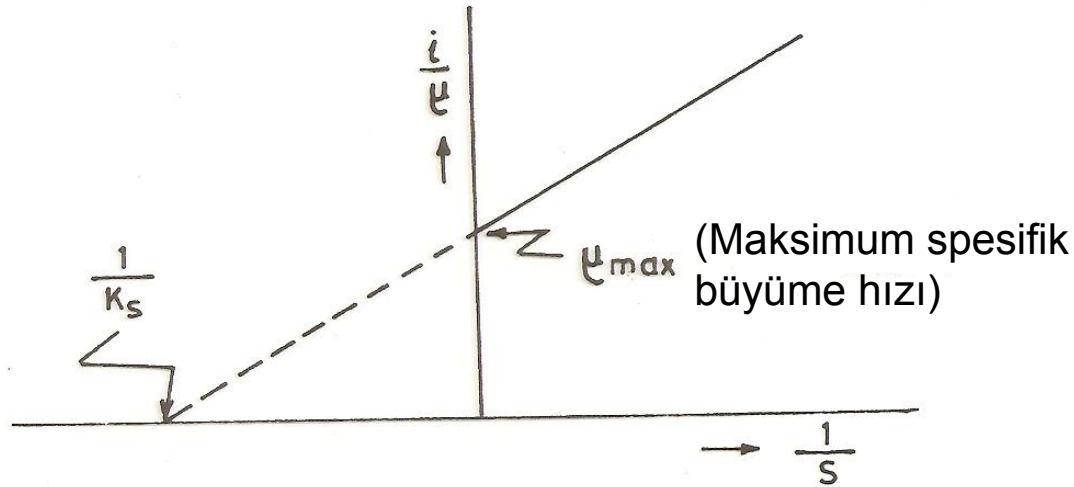
Metabolizma katabolizmadan anabolizmaya dönüşmüştür.

Biyosentezler de daha çok sekonder metabolit üretimine yöneliktir.

Hücrelerin durumu geçiş fazına benzer. Sekonder metabolit üretimi amaçlanıyorsa, bu fazın mümkün olduğu kadar uzun sürmesinde yarar vardır.

F) Fetal Faz: Ölen hücrelerin sayısı yeni oluşanlardan daha fazladır. Otoliz sebebiyle ortamın yoğunluğu ve vizkozitesi azalır.

Hücre Büyümesi için Lineweaver-Burk Diyagramı



K_s , büyüme hızının maksimum değerine ulaştığı andaki substrat konsantrasyonudur ve birimi g/l ' dir.

μ ; hücrelerin spesifik büyüme hızı olup hücre kütlesinin toplam biyokütleyle göre birim zamandaki artışıdır.

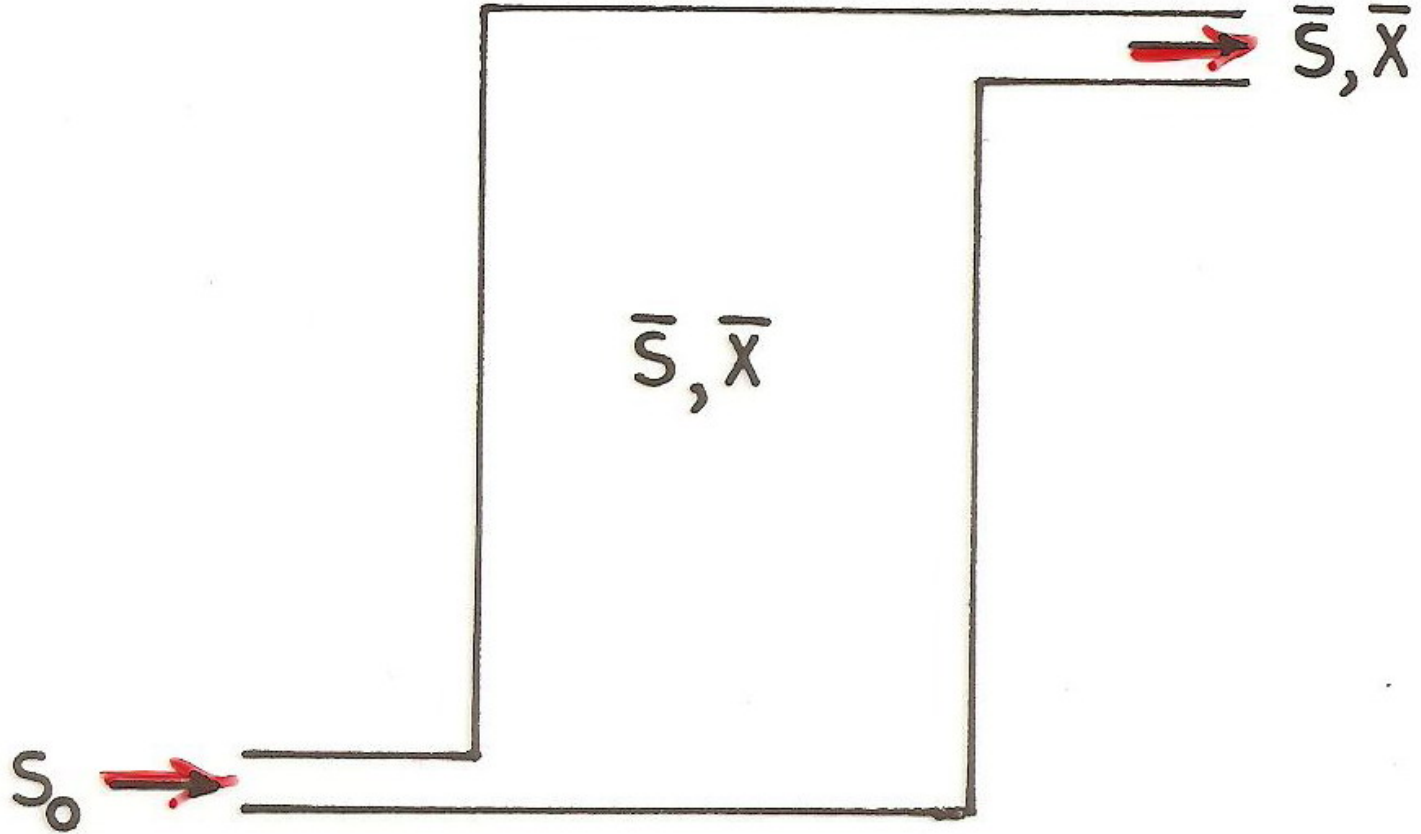
Kesikli Proseslerde Ürün Oluşumu

- Kesikli kültürlerde ürün oluşumu logaritmik ve stasyoner fazlar ile bunların arasında yer alan geçiş fazında gerçekleşir.
- Ürün oluşumu büyümeye bağımlıdır veya değildir. İlk durumda ürün yalnız logaritmik fazda oluşur.
- İkinci durumda ise diğer fazlarda da ürün oluşumu söz konusudur.

Kesiksiz Kültür

- Mikroorganizmaların kesikli kültür ortamında büyümeleri için biyolojik sabitler tespit edilebilir ve bunlar kesiksiz kültürün logaritmik fazındaki mikroorganizmalar için yapılacak hesaplamalarda çok önemlidir.
- Kesiksiz kültürde substrat çözeltisi sabit bir debi ile reaktöre verilir ve reaktördeki sıvı hacminin değişmemesi için reaktör sıvısı aynı debi ile dışarı alınır.
- Böyle bir sistemde denge yerleştiğinde “**Kemostat**” koşullarına ulaşılmış olunur.

Kesiksiz Bir Reaktörün Basitleştirilmiş Şeması



X/D - Diyagramı

- Substratın biyokütle veya ürüne dönüşüm oranı reaktör içinde alıkonma süresi ile orantılıdır. Başka bir deyişle seyrelme hızı (D) ne kadar küçükse dönüşüm oranı o ölçüde yüksektir.
- Ancak verimlilikte önemli olan dönüşüm oranından çok birim zamanda oluşan biyokütle veya ürün miktarıdır.

Kesiksiz bir Biyoreaktörün Verimliliği = $X \cdot D$ (g/l.h) ile verilir.

- Bu duruma göre seyrelme hızı için bir optimum değer söz konusu olmalıdır. X ile D arasında çizilen diagram D_{opt} değerinin tespitine olanak sağlar.

Mikrobiyal Büyüme Verimi

Mikrobiyal büyümenin göstergesi üreme ve toplam biyokütle artışıdır. Büyümenin boyutu ise bir gram karbon kaynağı tüketimi sonucu oluşan kuru biyokütle miktarıdır.

Büyüme için yanı zamanda enerjiye gereksinim olduğundan ve bu enerji de C-kaynağından sağlanacağından biyokütle verimi C-kaynağının oksidasyon derecesi ile ters orantılıdır.

Aerobik metabolizmada $Y_{x/s}$:

$$Y_{x/s} = dX/dS$$

Karbonhidratlar için : 0,5

Hidrokarbonlar için : 1,0' dir.

Verim Sabiti ($Y_{x/ATP}$)

Karbon ve enerji kaynağı olarak bir şekerin, N-kaynağı olarak amonyum iyonunun bulunduğu bir ortamdaki kesikli kültürde değişik mikroorganizmalar için **yaklaşık aynı verim katsayısına** ulaşılır.

Verim katsayısı başlangıçta ortamda mevcut substrat konsantrasyona bağımlı değildir.

Temel Gereksinim Enerjisi

Mikrobiyal üretim proseslerinde ürün oluşmayıp yalnız biyokütle oluşsa bile C-kaynağının bir kısmı organizmanın temel enerji gereksinimi için harcanır.

Kesikli kültürlerde fermantasyon ortamının birçok parametresi sürekli olarak değişirken kemostat durumundaki kesiksiz kültürde bu parametreler sabittir.

Sonuç olarak verim katsayısı ($Y_{x/s}$), kesikli kültürlerde fazlara bağımlı olarak sürekli değişim gösterirken kesiksiz kültürde kemostat durumunda matematiksel olarak sabit kalır.

Verim Katsayısının Önceden Tahmini

- Değişik mikroorganizmalar ve substratlar ile gerçekleştirilen çok sayıda fermantasyon $Y_{x/s}$ verimi için ortalama bir değer bulunmuştur.

$$Y_{x/s} = 3,14 + 0,11 \text{ g Biyokütle /av.e}^-$$

- Ancak özellikle küçük moleküllü alkol ve alkanlarda bu değerden önemli sapmalarla karşılaşılmaktadır.

Kullanılabilir elektronlar yardımıyla verim katsayısının ($Y_{X/S}$)
önceden tahmini (Abott, 1973).

Substrat	Mol. Kütlesi	av.e ⁻ Sayısı	$Y_{X/S}$ (Verim Katsayısı)	Kullanı- lamaz e ⁻ sayısı	$Y_{X/S}$ (düzelt.)	$Y_{X/S}$ (deneysel)
Metan	16	8	1,57			0,62
				2	1,17	0,90
				4	0,79	1,02
Metanol	32	6	0,59			0,39
				2	0,39	0,40
Etanol	46	12	0,82			0,84
				2	0,68	0,68
Etanol	46	12	0,82			0,84
				2	0,68	0,68
Glukoz	180	24	0,42			
(Nişasta)	(162)	24	0,47			0,54
Hexadekan	226	98	1,36	24	1,03	1,03

Oksijen Gereksinimi ve Sağlanması

- Mikroorganizmalar sulu ortamda faaliyet gösterdikleri için substratların suda yeterince çözünmesi çok önemli bir konudur.
- Ancak organizmanın bir substratı yeterince sağlayabilmesinde substratın suda çözünür olması yanında organizma tarafından ortamdan alınma hızı da etkilidir.
- Hatırlatılması gereken önemli bir nokta mikroorganizmaların birim kütle başına diğer canlılardan çok daha fazla oksijene ihtiyaç duymalarıdır.

**Çeşitli canlıların oksijen alım hızları (ml/g.h)
(Einsele et al. 1985)**

İnsan	Hareketsiz	0,2
	Çalışırken	4,0
Kelebek	Hareketsiz	0,6
	Uçarken	100,0
Fare		2,5
Maya		60,0
Azobakter		~3000

Oksijenin Saf Suda Çözünürlüğü

- Oksijenin saf suda çözünürlüğü Henry Kanununa göre kısmi basıncı ile orantılıdır. Hava içinde oksijene düşen basınç payı 0,21 bar veya yaklaşık 160 mm Hg dir. Saf ve havadaki oksijenin değişik sıcaklıklarda sudaki çözünürlüğü aşağıda verilmiştir.

Sıcaklık (°C)	1 bar O ₂ -basıncı		1 bar Hava basıncı	
	mmol/l	mg/l	mmol/l	mg/l
0	2,18	69,8	0,455	14,6
10	1,70	54,4	0,355	11,4
20	1,38	44,2	0,288	9,2
30	1,16	37,1	0,242	7,7
35	1,09	34,9	0,228	7,3
40	1,03	33,0	0,215	6,9

Bazı Mikroorganizmaların max. oksijen alım hızları

[Brown, D.E, in Methods in Microbiology, (J.R.Norris and D.W.Ribbons, eds) Vol.2, 1970, Academic Press, New York, pp.127-274]

Mikroorganizma	q_m , kg O ₂ /kg Biyokütle.h
<i>Aspergillus niger</i>	0,096
<i>Streptomyces griseus</i>	0,096
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,125
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0,128
<i>Saccharomyces cerevistae</i>	0,256

BİTKİ ve HAYVAN HÜCRE KÜLTÜRLERİ

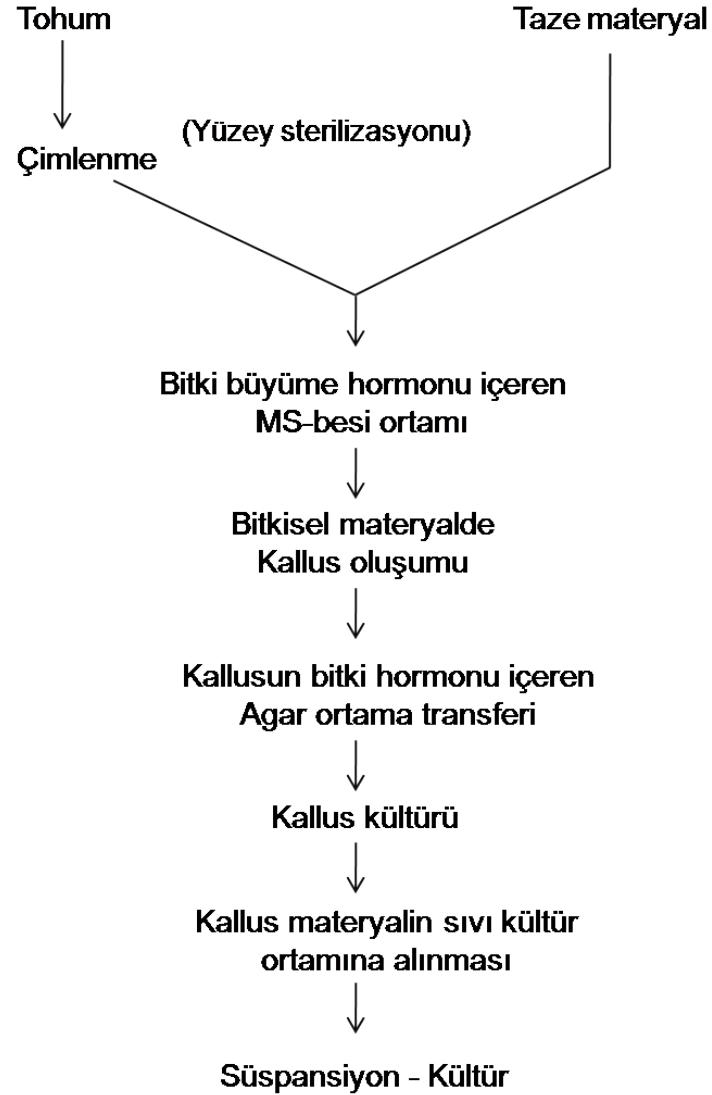
- Son yıllarda tüm dünyada hücre kültürlerine ilgi büyük ölçüde artmıştır.
- Bitki ve hayvan hücre kültürlerinin biyoteknolojik üretimlerde kullanılması bu alanda yeni ufuklar açmıştır.

Bitki Hücre Kùltürleri

- Bitki kùltürleri ile yapılan araştırmaların sayısı süreklı artış göstermektedir. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu bitki hücre kùltürlerini endüstri ve tarımda kullanmayı amaçlamaktadır.
- En önemli uygulamalar değerli doğal bileşiklerin eldesi ve faydalı bitkilerin geliştirilmesidir.
- Biyoteknoloji açısından üretime yönelik olan şüphesiz ilkidir. Ancak konuya ekonomik açıdan bakıldığında ise ikinci yani faydalı bitkilerin geliştirilmesi daha verimlidir.

- Bitki hücre kültürleri mikroorganizmalara göre hem daha yavaş gelişir hem de ekstrem steril koşullarda çalışmayı gerektirirler.
- Ayrıca bu kültürlerin bulunduğu ortamın koşulları (sıcaklık, nem vb.) değişmemelidir. Kültivasyon inkübatörde veya daha iyisi klimatize odalarda yapılmalıdır.
- Üreme, agar jelde veya sıvı besi ortamında gerçekleştirilir. Kültürün biyosentez performansı bazı durumlarda ışık tarafından etkilenir.

Bitki hücre kültürü hazırlama işlemleri



	MS* (mg/l)	B5 (mg/l)
Makroelementler		
NH ₄ NO ₃	1650	-
KNO ₃	1900	2500
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250
KH ₂ PO ₄	170	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150
Mikroelementler		
KI	0,83	0,75
H ₃ BO ₃	6,2	3,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	2,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8
Vitaminler		
İnosit	100	100
Nikotinik asit	0,5	1,0
Pirodoksin.HCl	0,5	1,0
Tiamin.HCl	0,1	10,0
Glisin	2,0	-
Sakkaroz	30	20
pH	5,7	5,5
Fitohormonlar: İndol asetik asit, Naftil asetik asit, 2,4-Diklorofenoksi asetik asit, Kinetin vs.		

Bitki hücre kültürü üretiminde en çok kullanılan iki besi ortamının bileşimi

- Bitki hücre kültürü tekniğinden tarımda da yararlanma imkanı vardır. Bu teknik yardımı ile bitkisel kütle artışı sağlanabileceği gibi bitki materyalinin iyileştirilmesi de mümkündür.
- Bitki genlerinde yeni genetik bilgi katarak veya hibrit bitkiler oluşturarak bitki türü zenginleştirilebilir.
- Ayrıca hücre kültürü tekniği sayesinde hastalık yapıcıları taşımayan bitkiler geliştirilebilir.

Hayvan Hücre Kültürleri

- Hayvan hücre kültürleri üzerindeki çalışmalar bitki hücre kültürlerinden önce başlamış olmasına rağmen asıl gelişimi ve sistematik çalışmalar son 25 yıl içerisindedir.
- Özellikle virolojik diagnostik, hücre farklılaşma olaylarının incelenmesi, onkojen maddelerin analizi, gen bankası çalışmaları ve hücre çevrimindeki olayların incelenmesinde hayvan hücre kültürlerinin önemi çok büyüktür.

- Hayvan hücre kültürlerinin endüstriyel üretimdeki potansiyelleri çok iyi bilinmesine rağmen henüz biyoteknolojik uygulamalar başlangıç safhasındadır.
- Teknik boyutta uygulama yalnız 1962 yılında süspansiyonda çoğalmaya adapte edilmiş ve 1967 yılından beri çeşitli aşuların üretiminde kullanılan BHK (**Baby Hamster Kidney**) hücreleri ile gerçekleştirilmiştir.

- Hayvan hücre kültürlerinin hazırlanmasında gerekli laboratuvar donanımı bitki hücre kültürü için gerekenden pek farklı değildir.
- Interferon, monoklonal antikolar, virüs pestisidler, büyüme hormonları üretimi ve ayrıca tromboz ve embolilerin tedavisinde büyük bir potansiyele sahip ürokinaz enziminin üretiminde hayvan hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır.