

**ŞAP VİRÜSÜ ÜRETİMİNDE KULLANILAN BHK 21 An₃₀
HÜCRELERİNİN KESİKLİ ÜRETİM PROSESİNDE
KARIŞTIRICILI BİYOREAKTÖR İŞLETME
PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU**

**OPTIMIZATION OF STIRRED-TANK BIOREACTOR
OPERATIONAL PARAMETERS FOR BATCH PRODUCTION
PROCESSES OF BHK 21 An₃₀ CELLS
IN FMD VIRUS PRODUCTION**

TAŞKIN DENİZ

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2011

Danışman Hocam,

Prof. Dr. Abdurrahman TANYOLAÇ'a...

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI 'nda**
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Üye :

Prof. Dr. Zümriye AKSU

Üye :

Prof. Dr. Yeşim Sağ AÇIKEL

Üye :

Yrd. Doç. Dr. Cengiz KOÇUM

Üye :

Yrd. Doç. Dr. Aykut ERDAMAR

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından.../.../2011 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca .../.../2011 tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ŞAP VİRÜSÜ ÜRETİMİNDE KULLANILAN BHK-21 An₃₀ HÜCRELERİNİN KESİKLİ ÜRETİM PROSESİNDE KARIŞTIRICILI BİYOREAKTÖR İŞLETME PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU

Taşkın Deniz

ÖZ

Sunulan tez çalışmasının amacı; şap virüsü üretiminde kullanılan ve karıştırıcılı biyoreaktörlerde kesikli üretim yöntemiyle süspanse olarak üretilen BHK-21 An₃₀ hücrelerinin anahtar işletme parametrelerinin saptanması, etki derecelerinin belirlenmesi ve optimizasyonudur. Çalışma kapsamında kritik işletme parametreleri olarak; karıştırma hızı (N), çözünmüş oksijen (ÇO), pH ve başlangıç hücre sayısı (X₀) ele alınmıştır.

Bu çalışmada anahtar işletme parametrelerinin birbirleriyle olan ilişkilerinin, maksimum hücre sayısına (X), 146S partikül miktarına, hücre özgül üreme hızına (μ), antijenik titreye (AT), enfektif titreye (IT), laktat/glikoz oranına ($Y_{lak/gli}$), amonyak oluşum hızına (NH₃) ve toplam protein (TP) miktarına etkilerinin tespiti ve değerlendirilmesi amacıyla Design Expert 7.0 (deneme sürümü) programı ile istatistiksel deney tasarımı gerçekleştirilmiş ve matematiksel modeller geliştirilmiştir.

Çalışmanın birinci aşamasında ön deneyler yapılarak biyoreaktör sistemi hazırlanmış ve çalışma yöntemi belirlenmiştir. İkinci aşamada Design Expert 7.0 yardımıyla istatistiksel deney tasarımı gerçekleştirilmiştir. Deneylerde tekrarlı-kesikli (repeated batch) üretim yöntemi uygulanmıştır. Deneyler sırasında alınan numunelerin glikoz, laktat, amonyak analizleri ve pOsm ölçümleri yapılmış, canlı hücre derişimleri yardımıyla hücre üreme eğrileri oluşturularak özgül üreme hızları (μ) ve ikilenme zamanları (t_d) hesaplanmıştır. Her deney sonunda alınan hücreler 1 L biyoreaktörlerde virüs ekimi ve kültürü yapılmak üzere Şap Enstitüsü Virüs Kültürü Laboratuvarına gönderilmiştir. Üretilen virüslerden alınan numunelerin; 146S, AT, IT ve TP tayinleri yapılmıştır.

Çalışmalar sonunda hücre derişimini (X) maksimum yapan optimum işletme koşulları ile 146S partikül miktarını maksimum yapan optimum işletme koşullarının farklı olduğu anlaşılmış ve maksimum verim için her iki amaç fonksiyonun birlikte

değerlendirilmeleri gerektiği görülmüştür. İstatistik programının optimizasyon özelliği ile X ve 146S ortak çözüm yapılmış ve maksimum verimin elde edileceği parametre değerleri tespit edilmiştir. Bu değerler kullanılarak yapılan deneylerle X ve 146S partikülü miktarı için oluşturulan istatistiksel modeller valide edilmiştir.

Modelin öngördüğü optimum nokta işletme parametreleri; çözünmüş oksijen $\text{ÇO}=\%25\pm5$ ($T=37^\circ\text{C}$ sıcaklıkta, saf sudaki hava doygunluğuna göre), $\text{pH}=7.00\pm0.05$, karıştırma hızı $N=180\pm20$ d/dk, ve başlangıç hücre derişimi $X_0=0.65\pm0.05\cdot10^6$ hücre.mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Modelin önerdiği son hücre sayıları (X) yapılan doğrulama (validation) deneylerinde ulaşılan hücre sayıları $\sim\%95$ uyum göstermiştir. BHK-21 hücresi için optimum nokta deney sonuçları; $X_{6M1}=3.36\pm0.16\cdot10^6$ hücre.mL⁻¹, $X_{6M2}=5.75\pm0.25\cdot10^6$ hücre.mL⁻¹, $146S=0.94\pm0.30$ µg.mL⁻¹, $\mu=0.0614\pm0.0036$ sa⁻¹, $t_d=11.30\pm0.66$ sa (ikilenme süresi), $Y_{\text{lak/gli}}=1.37\pm0.10$ mol lak/mol gli, $q_{O_2}=0.15\pm0.04\cdot10^{-6}$ µmol O₂.hücre⁻¹.h⁻¹ (özgül oksijen tüketim hızı), $q_{\text{gli}}=2.47\pm0.47\cdot10^{-10}$ mmol.hücre⁻¹.sa⁻¹ (özgül glikoz tüketim hızı), $q_{\text{lak}}=3.85\pm1.05\cdot10^{-10}$ mmol.hücre⁻¹.sa⁻¹ (özgül laktat oluşum hızı), $q_{\text{NH}_3}=4.42\pm0.40\cdot10^{-11}$ mmol.hücre⁻¹.sa⁻¹ (görünen özgül amonyak oluşum hızı) olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın sonucunda, biyoreaktör işletme parametrelerinin hücre metabolizmasını etkileyerek X, 146S, μ , AT, IT, $Y_{\text{lak/gli}}$, NH_3 oluşum hızı ve TP'yi değiştirdiği ve bu ilişkilerin modellenenebildiği görülmüştür. Bu veriler ışığında hücre ve virüs üretiminde önemli miktarda artışın sağlanabileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: BHK-21, 146S partikülü, pH, ÇO, FMDV, optimizasyon

Danışman: Prof. Dr. Abdurrahman TANYOLAÇ, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyomühendislik Anabilim Dalı

OPTIMIZATION OF STIRRED-TANK BIOREACTOR OPERATIONAL PARAMETERS FOR BATCH PRODUCTION PROCESSES OF BHK-21 An₃₀ CELLS IN FMD VIRUS PRODUCTION

Taşkın Deniz

ABSTRACT

The purpose of this study is to optimize the stirred tank bioreactor operational parameters for batch production processes of BHK-21 An₃₀ cells in FMD virus production. Determining the effects of bioreactor operational parameters on the BHK-21 suspension culture was aimed. Stirring speed (N), dissolved oxygen (DO), pH and initial cell density (X_0) were focused on as parameters in this study.

To understand and evaluate the interaction of the parameters and its relation of final cell concentration (X), amount of 146S particle, net specific growth rate (μ), antigenic titer (AT), infective titer (IT), lactate/glucose rate ($Y_{lac/glu}$), ammonia production rate (NH_3) and total protein (TP) math models were developed by Design Expert 7.0 (demo version) statistical program.

First step of the study was the preparation of the bioreactor system and study methods. Second step was the design of the experiments by the aid of Design Expert 7.0 statistical program. 30 experiments were established for four key operational parameters. Experiments were done by repeated-batch process. Samples were taken during experiments and glucose-lactate analyses were done and pOsm was measured. The cell growth curves were plotted for cell counts and μ , t_d (doubling time) values were calculated. After finishing each batch culture, the cells were sent to the FMD Institute Virus Laboratory for virus inoculation and cultivation. When the virus propagation process finished the samples were taken for the tests. The samples were tested for the determination of 146S particle, IT, AT and TP.

The study revealed that the operational parameters of a bioreactor are very important and not same for X and amount of 146S particle. The values of the operational parameters for maximizing both X and 146S particle were determined by the statistical model. The model validated by the executed experiments held optimum operational values of the parameters for X and 146S particle.

Optimum operational values of parameters are 25 ± 5 , 7.00 ± 0.05 , 180 ± 20 rpm and $0.65 \pm 0.05 \times 10^6$ cell.mL⁻¹ due to the DO (air saturated in DEI water at 37 °C), pH, N, X_o respectively. The model worked quite well for the maximum cell yield and validation experiments for X showed approximately 95% confidence limits. These are the calculated results; $X_{6M1} = 3.36 \pm 0.16 \times 10^6$ hücre/ml, $X_{6M2} = 5.75 \pm 0.25 \times 10^6$ hücre/ml, $146S = 0.94 \pm 0.30$ µg.ml⁻¹, $\mu = 0.0614 \pm 0.0036$ sa⁻¹, $t_d = 11.30 \pm 0.66$ sa (doubling time), $Y_{lak/gli} = 1.37 \pm 0.10$ mol lak/mol gli, $q_{O_2} = 0.15 \pm 0.04 \times 10^{-6}$ µmol O₂.hücre⁻¹.h⁻¹ (specific oxygen consumption rate), $q_{glu} = 2.47 \pm 0.47 \times 10^{-10}$ mmol glucose.hücre⁻¹.sa⁻¹ (specific glucose consumption rate), $q_{lac} = 3.85 \pm 1.05 \times 10^{-10}$ mmol lactate.hücre⁻¹.sa⁻¹ (specific glucose production rate), $q_{NH_3} = 4.42 \pm 0.40 \times 10^{-11}$ mmol ammonia.hücre⁻¹.sa⁻¹ (apparent specific ammonia production rate).

Resulting from the study, bioreactor operational parameters are much affect on cells and they affects X, 146S, μ , AT, IT, $Y_{lak/gli}$, NH₃ production rate and TP by changing cell metabolism and and establishing models for these parameters is realistic. As a result it is possible to increase about BHK-21 cell and FMDV production capacity.

Keywords: BHK-21 cell culture, 146S particle, pH, ÇO, FMDV, optimization

Advisor: Prof. Dr. Abdurrahman TANYOLAÇ, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering, Bioengineering Sciences, Ankara / Turkey

TEŞEKKÜR

Özel ders ve makale çalışmalarıyla projeye özel önem ve emek veren, planlayan, her aşamasında takibini yapan, bizleri cesaretlendirip teşvik eden, değerli bilgi ve tecrübesi ile ışık tutan Danışman Hocam Prof. Dr. Abdurrahman TANYOLAÇ'a en derin şükranlarımı sunarım. Yaktığınız ilim meşaleleri huzurunuzda vesile olsun.

Şap Enstitüsü yöneticileri adına, projeyi destekleyerek Enstitü imkânlarını sunan önceki müdürümüz Sayın Dr. Recep ERGÜL'e

Laboratuar çalışmalarının gerçekleştirilmesi, test ve analizler sırasında yardımlarını ve önerilerini esirgemeyen Enstitümüz personelleri adına;

Su Hazırlama Ünitesinden Kimyager Mustafa Özyiğit'e,

Vasat Hazırlama Laboratuarından Y. Kimyager Nilgün Özdural'a,

Hücre Laboratuarından Y. Biyolog Şükran Yılmaz ve Vet. Adeviye Özgüngör'e,

Hücre Kültürü Laboratuarından Biyolog Şenol Dinler'e,

Virüs Kültürü Laboratuarından Vet. Hek. Gencay Ergin'e

Uz. Vet. Hek. Fuat Özyörük'e

Teşhis Laboratuarından Uz. Vet. Hek. Dr. A. Naci Bulut'a

Kontrol Laboratuarından Vet. Hek. Hidayet Bozoğlu'na

Analizler sırasındaki yardımlarından dolayı Sayın Özlem ÖZMEN'e,

Çalışmalarım süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili eşim ve aileme,

Teşekkür Ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. TEMEL BİLGİLER	4
2.1 Şap Hastalığı Etkeni ve Klinik Tablo	4
2.2 Hayvan Hücre Kültürleri (Üretim Süreçleri)	5
2.2.1 Hayvan hücre kültürleri ve kullanıldığı alanlar	5
2.2.2 Hayvan hücre kültürlerinin avantajları ve dezavantajları	6
2.2.3 Hayvan hücre kültürlerinin tarihçesi ve BHK-21 C13 hücresi	8
2.2.4 Endüstriyel şap aşısı üretim yöntemi	9
2.2.5 Hücre üremesinin değerlendirilmesi	10
2.2.6 Hücrelerin üremesine serum ve metabolitlerin etkileri	11
2.3 Hücre Kültürlerinde Kullanılan Üretim Yöntemleri	14
2.4 Biyoreaktörler	19
2.5 Biyoreaktörlerde Havalandırma Sistemi	23
2.5.1 Temel kütle transfer Kavramı	23
2.5.2 Sıvılarda oksijenin çözünürlüğü	25
2.5.3 Biyoreaktörlerin havalandırılmasında güncel sistemler	27
2.5.4 Havalandırma sisteminden kaynaklanan hücre hasarları	29
2.5.5 Katkı maddeleri kullanılarak hücre hasarlarının önlenmesi	33

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.6	Çözünmüş Oksijen (ÇO) ve Hayvan Hücre Kültürleri 35
2.7	Biyoreaktörlerde Karıştırma Sistemi 39
2.7.1	Karıştırma veriminin ölçümü..... 41
2.7.2	Biyoreaktörlerde karıştırma sistemi ve güç gereksinimi 42
2.7.3	Biyoreaktör iç akış rejimlerinin özellikleri ve güç ihtiyaçları 42
2.7.4	Havalandırılan biyoreaktörlerde karıştırma ve güç ihtiyacı 43
2.7.5	Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan karıştırıcı tipleri 44
2.7.6	Karıştırma sisteminden kaynaklanan hücre hasarları 45
2.8	Hayvan Hücre Kültürleri ve pH 49
2.8.1	pH'nın hücre solunumuna ve enerji metabolizmasına etkisi..... 51
2.8.2	pH'nın hücrenin özgül üreme hızına (μ) etkisi 51
2.9	Hayvan Hücre Kültürleri ve Ozmolalite (pOsm) 52
2.10	Karbondioksitin Kısmi Basıncı ve Hücre Üremesi..... 55
2.11	Hayvan Hücre Kültürlerinde Havalandırma Stratejileri..... 57
2.12	Redoks Potansiyeli 60
2.13	Başlangıç Hücre Sayısı 60
2.14	Deney Sistemlerinin Tasarlanması ve Optimizasyonu..... 61
2.14.1	Yüzey-Cevap metodu..... 61
2.14.2	Deneyisel verilerden matematiksel model geliştirilmesi 61
2.14.3	Deneyisel tasarım 62
2.14.4	Sayısal optimizasyon 62
2.14.5	Ağırlık oranı..... 63
2.14.6	Yüzey-Cevap yönteminde modelin belirlenmesi..... 63

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

3. DENEYSEL ÇALIŞMA	64
3.1 Deneylerin Planlanması	67
3.2 BHK-21 An ₃₀ Süspanse Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	72
3.3 Numune Alınması ve Hücre Sayım Yöntemi	73
3.4 BHK-21 An ₃₀ Hücre Kültürüne Şap Virüsü Ekimi ve Toplanması	74
3.5 Hücre ve Virüs Kültürlerinde Kullanılan Besiyerleri (6M)	74
3.6 Test ve Analizler	76
3.6.1 Plak Test Yöntemi ile şap virüsü enfektif titresinin belirlenmesi	76
3.6.2 Komplement Fiksasyon Testi ile antijenik titre belirlenmesi	77
3.6.3 Sükroz yoğunluk gradiyenti ile 146S partikülünün belirlenmesi	78
3.6.4 Ozmolalite ölçümleri	78
3.6.5 BCA yöntemi ile toplam protein (TP) miktarının tespiti	79
3.6.6 Glikoz ve laktat analizleri	80
3.6.7 Amonyak (NH ₃) analizleri	83
3.6.8 Dinamik metotla özgül oksijen tüketim hızı (qO ₂) ve k _L a hesabı	85
3.7 Deney Yöntemi	90
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	93
4.1 Son Hücre Sayısı (X) Anova Testi Sonuçları	93
4.2 146S Partikül Miktarı Anova Testi Sonuçları	103
4.3 Özgül Üreme Hızı (μ) Anova Testi Sonuçları	106
4.4 Antijenik Titre (AT) Anova Testi Sonuçları	110
4.5 Enfektif Titre (IT) Anova Testi Sonuçları	112
4.6 Glikoz/Laktat Oranı (Y _{lak/gli}) Anova Testi Sonuçları	114
4.7 Amonyak (NH ₃) Oluşum Hızı Anova Testi Sonuçları	125
4.8 Toplam Protein Miktarı (TP) Anova Testi Sonuçları	133

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
4.9 Deney Sonuçlarının Optimizasyonu	139
4.10 Doğrulama Deneyleri	142
4.11 Başlangıç hücre sayısı (X_0) ve biyoproses süresi ilişkisi	145
4.12 Hacimsel Kütle Transfer Katsayısı (k_La) – X ilişkisi	146
4.13 Besiyeri – Son Hücre Sayısı (X) ilişkisi	146
4.14 Çalışma Koşullarının Hücre Üremesine Etkileri	148
4.15 BHK-21 Hücresinin Üretiminde Makro-Kabarcıkların Kullanımı.....	151
4.16 Hücre Üretim Sürecinin Standardizasyonu ve Tekrarlanabilirliği	152
4.17 Sonuçlar ve Öneriler.....	154
KAYNAKLAR	161
EKLER DİZİNİ	176

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Şap virüsü	4
Şekil 2.2.	Şap hastalığı lezyonları	5
Şekil 2.3.	Kesikli kültürde hücre üreme eğrisi.....	10
Şekil 2.4.	Murine hibridoma hücresi (167.4G5.3) için serum oranı ve X_0 'ın özgül üreme hızına (μ) etkisi	13
Şekil 2.5.	(a) Hücre üretim yöntemleri, (b) Hücre sayısı, besin maddeleri ve ürün derişimlerinin kesikli, yarı-kesikli ve sürekli üretim yöntemlerinde zamanla değişimi	15
Şekil 2.6.	Örnek bir biyoreaktörün genel görünümü ve elemanları.....	20
Şekil 2.7	Gaz-sıvı ve sıvı-hücre membranı arasındaki kütle transfer mekanizması	23
Şekil 2.8.	Havalandırma oranının, kesikli üretim metodunda serumsuz besiğinde <i>S.frugiperda Sf9</i> hücresinin özgül üreme hızına etkisi	30
Şekil 2.9.	Kabarcık çapının, (kabarcık kolonu 10 mL.dk ⁻¹ akış hızında havalandırılırken <i>S. frugiperda</i> hücresinin özgül ölüm hızına etkisi	31
Şekil 2.10.	Besiğinde kabarcık patlamasının ana basamakları	33
Şekil 2.11.	a) Sıvı-gaz ara yüzeyinde yüzey aktif polimer kullanılmadığında görülen hücreler	34
Şekil 2.12.	Karışma zamanı ve ortam derişim grafiği	41
Şekil 2.13.	Hücre kültürlerinde kullanılan karıştırıcı tipleri	44
Şekil 2.14.	Farklı boyutlardaki kabarcıkların sıvı yüzeyinde patlaması ile açığa çıkan maksimum enerji dağılım oranları	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 2.15. Tübin (Rusthon) tip karıştırıcı hızının <i>S. Frugiperda Sf9</i> hücresinin serumsuz besiyeri ve kesikli üretimde özgül üreme hızına (μ) etkisi ..48	
Şekil 2.16. Ozmolalitenin (pOsm) hücre üremesine ve metabolizmasına etkisi ...54	
Şekil 2.17. a) Kesikli üretim yönteminde ozmolariteye (pOsm) göre hücrenin hacimsel değişimi, b) Farklı pOsm değerlerinde hücre büyüklüğünün zamana göre değişimi 55	
Şekil 2.18. pCO ₂ 'nin süpürülmesi, a) Mikro-kabarcık, b) Makro-kabarcık kullanıldığında 59	
Şekil 2.19. 10.000 L Biyoreaktörde gaz karışımlarının kabarcık çaplarının yüksekliğe bağlı değişimleri.....59	
Şekil 3.1. 3000 L hücre Biyoreaktöre ait ÇO, pH ve T grafikleri 65	
Şekil 3.2. Design Expert 7.0 (deneme sürümü) bağımsız değişkenler ve değişim aralıkları 70	
Şekil 3.3. Biyoreaktör Sistemi, a) BIOSTAT® B plus Biyoreaktör, b) 3 Segmentli Karıştırıcı 70	
Şekil 3.4. Örnek BHK-21 Hücre üreme eğrisi (B85) 73	
Şekil 3.5. Örnek ozmolalite (pOsm) grafiği (B21) 79	
Şekil 3.6. pH'ın fonksiyonu olarak % amonyak-amonyum oranları 85	
Şekil 3.7. <i>BHK 21</i> hücresinin özgül oksijen tüketim hızının (qO_2) sıcaklığa (T) bağlı değişimi.....86	
Şekil 3.8. Dinamik yöntemle oksijen tüketim hızı (OTH) ve k_La 'nın belirlenmesi. 88	

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 3.9.	Deneylerde kullanılan havlandırma sistemine ait havalandırma debisi ve karıştırma hızına (N) bağlı $k_L a$ grafikleri	89
Şekil 4.1.	Son hücre sayısı (X)-pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi	94
Şekil 4.2.	Yüksek besiyeri pH'sında çözünmüş oksijen (ÇO) - son hücre sayısı (X) ilişkisi	95
Şekil 4.3.	Düşük besiyeri pH'sında çözünmüş oksijen - son (ÇO)hücre sayısı (X) ilişkisi	95
Şekil 4.4.	B34'e ait hücre üreme eğrisi.....	96
Şekil 4.5.	B35'e ait hücre üreme eğrisi.....	97
Şekil 4.6.	Son hücre sayısı (X)-pH ilişkisi.....	97
Şekil 4.7.	Çözünmüş oksijen (ÇO) – son hücre sayısı (X) ilişkisi.....	98
Şekil 4.8.	Karıştırma hızı (N) ve son hücre sayısı (X) ilişkisi	100
Şekil 4.9.	Son hücre sayısı (X) – karıştırma hızı (N) – başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi.....	101
Şekil 4.10.	B74 (besiyeri-2) ve B81 (besiyeri-1) hücre üreme eğrileri	102
Şekil 4.11.	B74 maksimum özgül üreme hızı grafiği	102
Şekil 4.12.	B81 maksimum özgül üreme hızı grafiği	103
Şekil 4.13.	146S partikül miktarı-pH-çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi	104
Şekil 4.14.	146S partikül miktarı – karıştırma hızı (N) – başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi.....	105
Şekil 4.15.	Özgül üreme hızı (μ)-pH-çözünmüş oksijen (ÇO)-ilişkisi	107

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 4.16. Özgül üreme hızı (μ), karıştırma hızı (N) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi.....	108
Şekil 4.17. Özgül üreme hızı (μ) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisinde X_0 'ın düşük olduğu duruma ait grafik.....	109
Şekil 4.18. Özgül üreme hızı (μ) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisinde X_0 'ın yüksek olduğu duruma ait grafik	109
Şekil 4.19. Antijenik titre (AT) - pH - çözülmüş oksijen (ÇO) ilişkisi	111
Şekil 4.20. Antijenik titre (AT) - karıştırma hızı (N) - başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi.....	111
Şekil 4.21. Enfektif titre (IT)-pH-çözülmüş oksijen (ÇO) ilişkisi	113
Şekil 4.22. Enfektif titre (IT)-karıştırma hızı (N)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi.....	114
Şekil 4.23. Laktat/glikoz oranı ($Y_{lak/gli}$) - pH ve çözülmüş oksijen (ÇO) ilişkisi ...	115
Şekil 4.24. B35 glikoz-laktat derişimlerinin zamana göre değışimleri	116
Şekil 4.25. B34 glikoz-laktat derişimlerinin zamana göre değışimleri	117
Şekil 4.26. $Y_{lak/gli}$ - karıştırma hızı (N) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi.....	118
Şekil 4.27. B85 için glikoz tüketim hızının zamana karşı değışim grafiğı.....	118
Şekil 4.28. B85 laktat oluşum hızının zamana karşı değışim grafiğı (0-52.saat)	119
Şekil 4.29. B85 laktat oluşum hızının zamana karşı değışim grafiğı(0-28.saat) .	119
Şekil 4.30. B85 laktat oluşum hızının zamana karşı değışim grafiğı(28-52saat)	120
Şekil 4.31. $Y_{lak/gli}$ - pH-başlangıç hücre sayısı (X_0) ve ilişkisi	121

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 4.32. $Y_{lak/gli}$ – çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi.....	122
Şekil 4.33. Çözünmüş oksijen (ÇO)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi	122
Şekil 4.34. Amonyak (NH_3) oluşum hızı -pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi	126
Şekil 4.35. pH – karıştırma hızı (N) – amonyak (NH_3) oluşum hızı ilişkisi	127
Şekil 4.36. B85'e ait amonyak (NH_3) oluşum hızı grafiği	128
Şekil 4.37. Toplam protein (TP)-pH-çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi	129
Şekil 4.38. Amonyak (NH_3) oluşum hızı -pH- çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi	129
Şekil 4.39. Toplam protein (TP)-pH-karıştırma hızı (N) ilişkisi.....	130
Şekil 4.40. Amonyak (NH_3) oluşum hızı -pH-karıştırma hızı (N) ilişkisi	130
Şekil 4.41. Toplam protein (TP)-çözünmüş oksijen (ÇO)- karıştırma hızı (N) ilişkisi	131
Şekil 4.42. Amonyak (NH_3) oluşum hızı-çözünmüş oksijen (ÇO)-karıştırma hızı (N) ilişkisi	131
Şekil 4.43. Toplam protein (TP)-çözünmüş oksijen (ÇO)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi	132
Şekil 4.44. Amonyak (NH_3) oluşum hızı-çözünmüş oksijen (ÇO)- X_0 ilişkisi	132
Şekil 4.45. Toplam protein (TP)-çözünmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızı (N) ilişkisi	134
Şekil 4.46. Son hücre sayısı (X)-çözünmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızı (N) ilişkisi	135
Şekil 4.47. Toplam protein (TP)-pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi	137

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 4.48. Toplam protein (TP)-pH ve karıştırma hızı (N) ilişkisi	139
Şekil 4.49. Son hücre sayısını (X) maksimum yapan çalışma parametreleri.....	140
Şekil 4.50. Maksimum 146S partikül miktarının elde edileceği çalışma parametreleri	141
Şekil 4.51. Son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarının birlikte maksimum olarak elde edileceği çalışma koşulları	142
Şekil 4.52. Doğrulama deneyleri için önerilen çalışma koşullarında (pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL) çalışılması durumunda (son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarını birlikte maksimum yapan) model tarafından öngörülen son hücre sayısı (X) grafiği.....	143
Şekil 4.53. Doğrulama deneylerine ait hücre üreme grafikleri	143
Şekil 4.54. Model Doğrulama için yapılacak deneylerde (son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarı kombinasyonunu maksimum yapan) önerilen çalışma koşullarında (pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL) öngörülen 146S partikül miktarı	144
Şekil 4.55. Düşük ve yüksek başlangıç hücre sayılarının (X_0) biyoproses süresine etkisi.....	145
Şekil 4.56. B81, B85 (besiyeri-1), B74, B89 (besiyeri-2) deneylerine ait hücre üreme grafikleri.....	147
Şekil 4.57. B77 (besiyeri-1) ve B79 (besiyeri-2) için hücre üreme grafikleri	148
Şekil 4.58. Son hücre sayısı (X)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi.....	149
Şekil 4.59. Son hücre sayısı (X)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi.....	149

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 4.60.	Besiyeri-1 (B79, B85) ve besiyeri-2 (B77, B89) kullanıldığında aynı çalışma koşullarında üretilen B85-B89 ve B77-B79'a ait hücre üreme grafiklerinde gözlenen değişim.....	150
Şekil 4.61.	Son hücre sayısı (X)-pH-karıştırma hızı (N) ilişkisi	150
Şekil Ek-9.1.	Son hücre sayısının (X), pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi	203
Şekil Ek-9.2.	Son hücre sayısının (X), çözülmüş oksijen (ÇO) ve başlangıç hücre sayısına (X_0) göre değişimi.....	203
Şekil Ek-9.3.	146S partikül miktarının, pH ve karıştırma hızına göre değişimi....	204
Şekil Ek-9.4.	146S partikül miktarının, pH ve başlangıç hücre sayısına (X_0) göre değişimi.....	204
Şekil Ek-9.5.	Özgül üreme hızının (μ), pH ve karıştırma hızına göre değişimi....	205
Şekil Ek-9.6.	Antijenik titrenin (AT), pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi ..	205
Şekil Ek-9.7.	Antijenik titrenin (AT), çözülmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (N) göre değişimi	206
Şekil Ek-9.8.	Enfektif titrenin (IT), pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi	206
Şekil Ek-9.9.	Enfektif titrenin (IT), çözülmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (N) göre değişimi	207
Şekil Ek-9.10.	$Y_{lak/gli}$ oranının pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi.....	207
Şekil Ek-9.11.	$Y_{lak/gli}$ oranının çözülmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (N) göre değişimi.....	208
Şekil Ek-9.12.	Amonyak oluşum hızının (görünen hız) pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi	208

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil Ek-9.13. Amonyak oluşum hızının çözünmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (N) göre değişimi	209
Şekil Ek-9.14. Toplam protein (TP) miktarına pH başlangıç hücre sayısının (X_0) göre değişimi.....	209
Şekil Ek-9.15. Toplam protein (TP) miktarının çözünmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (X_0) göre değişimi	210
Şekil Ek-10.1. Glikoz kalibrasyon grafiği	211
Şekil Ek-10.2. Laktat kalibrasyon grafiği.....	211
Şekil Ek-11.1. Amonyak kalibrasyon grafiği.....	212
Şekil Ek-12.1. 6M Besiyeri; 0.03 l/dk havalandırma ve $N=230$ d/dk OAH Grafiği	213
Şekil Ek-12.2. 6M Besiyeri; 0.03 l/dk havalandırma ve $N=230$ d/dk $\ln(C^*-CL)$ Grafiği	213
Şekil Ek-13.1. Zamana bağlı olarak çözünmüş oksijen (ÇO, mg/L) derişim grafiği	214

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Sistemin homojen olup olmamasına göre biyoreaktörlerin sınıflandırılması	20
Çizelge 3.1. Bağımsız değişkenler (pH, çözünmüş oksijen (ÇO), karıştırma hızı (N), başlangıç hücre sayısı (X_0)) ve değişim aralıkları	70
Çizelge 3.2. Design Expert 7.0 (deneme sürümü) programı ile saptanan deney listesi	71
Çizelge 3.3. 6M Besiyeri İçeriği	75
Çizelge 3.4. Kalibrasyon standartlarının hazırlanması	81
Çizelge 4.1. Son hücre sayısına (X) ait modelin istatistik değerleri	93
Çizelge 4.2. 146S partikül miktarına ait modelin istatistik değerleri	103
Çizelge 4.3. Özgül üreme hızına (μ) modeline ait istatistik veriler	106
Çizelge 4.4. Antijenik titreye (AT) ait modelin istatistik değerleri	110
Çizelge 4.5. Enfektif titre (IT) için oluşturulan modelin ait istatistiki değerleri	112
Çizelge 4.6. Laktat/Glikoz oranına ($Y_{lak/gli}$) ait istatistik veriler	114
Çizelge 4.7. Başlangıç ve son laktat derişimleri ve $Y_{lak/gli}$ oranları	124
Çizelge 4.8. Kesikli-üretim yöntemiyle yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen ve normalden düşük olarak tespit edilen son laktat derişimleri ve $Y_{lak/gli}$ oranları	125
Çizelge 4.9. Amonyak (NH_3) oluşum hızına ait modele ait istatistik değerleri ...	125
Çizelge 4.10. Toplam protein (TP) miktarına it modele ait istatistik değerler.	133
Çizelge 4.11. Son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarlarını tek ve birlikte maksimum yapan çalışma koşulları	140

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Çizelge 4.12.Çalışma sonuçlarının diğer yayınlarla karşılaştırılması 153

Çizelge.4.13.Son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarlarını birlikte
maksimum yapan çalışma koşulları..... 158

Çizelge 4.14. Son hücre sayısı (X) ve 146S için doğrulama deney sonuçları 159

Çizelge Ek-12.1. 6M Besiyeri ile yapılan k_La çalışmaları örneği 212

Çizelge Ek-13.1. Çözünmüş oksijen-zaman çizelgesi 214

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ :

Simgeler

a	: Biyoreaktörün birim hacimdeki gaz-sıvı ara yüzey alanını (m^2/m^3)
C	: Karbon
C*	: Gaz faz oksijen derişimi ($mmol\ O_2/m^3$)
C_L	: Sıvı faz oksijen derişimi ($mmol\ O_2/m^3$)
cm²	: Santimetre kare
CO₂	: Karbondioksit
D	: Seyrelme hızı (dilution rate, sa^{-1})
D_R	: Biyoreaktör çapı
D_i	: Karıştırıcı çapı (m),
g	: G-kuvveti (santrifüj kuvveti)
G	: Glutamin derişimi ($mmol/L$)
H	: Biyoreaktör yüksekliği
K_H	: Oksijen için henry sabiti ($atm.mol\ A/mol\ H_2O$; suda çözünenler için)
K	: Michealis-Menten doygunluk sabiti
k	: Glutamin degradasyon sabiti (sa^{-1})
k_d	: Özgöl ölüm hızı (sa^{-1})
k_L	: Sıvı-gaz faz kütle transfer direnç katsayısı ($m.sa^{-1}$)
k_{La}	: Hacimsel kütle transfer katsayısı (sa^{-1})
K_s	: Doygunluk ya da Michealis sabiti (g/l)
K_s	: Monod sabiti
L	: Seviye
M	: Tek tabaka pasaj sayısı (monolayer pasajı)
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

mmol	: Milimol
mRNA	: Mesajcı RNA
N	: Karıştırma hızı (d/dk)
N₂	: Azot gazı
nm	: Nanometre
N_p	: Güç sayısı (power number) (kW/m ³)
NS0	: Fare Miyeloma hücre hattı (Mouse Mylema Cell Line)
O₁ Manisa	: O tipi şap virüsü
O₂	: Oksijen
OD	: Optik dansite
P	: Güç (W)
p	: Ürün (veya metabolitin) derişimi
P_A	: A'nın kısmi basıncı (atm)
pCO₂	: Karbondioksitin kısmi basıncı
pfu	: Plaque forming unite
pH_i	: Hücre sitoplazma pH değeri
pOsm	: Ozmotik basınç (mOsm.kg ⁻¹)
Pt-100	: Sıcaklık sensörü
q_{Gli}	: Özgöl glikoz tüketim hızı (mmol.hücre ⁻¹ .sa ⁻¹)
q_{lak}	: Laktat üretim hızı (mmol.hücre ⁻¹ .sa ⁻¹)
qO₂	: Özgöl oksijen tüketim hızı (μmol.sa ⁻¹ .10 ⁻⁶ hücre ⁻¹)
q_p	: Ürün (veya metabolitin) özgöl üretim hızı
q_s	: Besin maddesinin özgöl tüketim hızı
R_a	: Yüzey pürüzlülük değeri (roughness average)(μm)

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

Re_i	: Karıştırıcı Reynolds Sayısı
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (revolution per minute)
S	: Besin maddesi derişimi (mg/L)
STR	: Karıştırmalı Tank Biyoreaktör
T	: Sıcaklık (°C)
t	: Zaman (sa)
t_c	: Sirkülasyon zamanı (circulation time) (sn)
t_d	: İkilenme zamanı (sa)
t_m	: Karışım zamanı (mixing time)
v	: Karıştırıcı uç hızı (m.s ⁻¹)
V_{gaz}	: Biyoreaktöre verilen gaz hacmi
VP1	: Viral kapsit protein 1
V_{reaktör}	: Biyoreaktör çalışma hacmi
vvm	: Dakikada verilen gaz hacmi / reaktör hacmi
X	: Son hücre sayısı (hücre/mL)
X'	: Hipotetik ölüm hacmi (2x10 ⁻³ -2x10 ⁻²)
X₀	: Başlangıç hücre sayısı (hücre/mL)
x_A	: mol çözünen A / mol çözücü
Y_{ala/glu}	: Alanin/glutamin oranı (mol/mol)
Y_{NH3/glu}	: Amonyum/glutamin oranı (mol/mol)
Y_{lak/gli}	: Laktat/glikoz oranı (mol/mol)
Y_{X/Sglu}	: Birim hücre başına tüketilen glutamin
ε	: Lokal enerji dağılımı
η	: Kolmogorov mikro-ölçek, türbülans miktarı
μ	: Hücre özgül üreme hızı (sa ⁻¹)

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

$\mu_{\max}$	: Maksimum özgül üreme hızı (sa^{-1})
μ_d	: Dinamik viskozite (Pa.s)
ρ	: Sıvı yoğunluğu (kg/m^3)
ρ_L	: Besiyeri (sıvı) yoğunluğu (kg/m^3),
ν	: Kinematik vizkozite (Pa.s)
μm	: mikron
6M	: BHK-21 süspansiyon hücre kültürleri için besiyeri

146S Partikülü : Sedimentasyon hızı ve özelliklerine göre tespit edilmiş 4 adet antijenik komponentten immunojen olan partikül, ($\mu\text{g/mL}$).

Kısaltmalar

An	: Ankara
ASME BPE	: Amerikan Makine Mühendisleri Birliği Biyoproses Mühendisliği Standardı (American Society of Mechanical Engineers Biyo Process Engineering)
AT	: Antijenik titre
ATP	: Adenozin trifosfat
BEI	: Binary etyhlene imine
BHK-21 C13	: Yavru hamster böbrek 21 hücresi klon 13
CCD	: Merkezi bileşke tasarımı (Central composite design)
CHO	: Çin hamster ovary hücresi (Chinese Hamster Ovary)
CIP	: Yerde temizlik (Clean In Place)
CPE	: Sitopatolojik etki
ÇO	: Çözünmüş oksijen (%)
DEI	: Deiyonize su

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

DNA	: Deoksiribonükleik asit
DX 7.0	: Design Expert© 7.0 istatistik programı
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (U.S. Food and Drug Administration)
FMDV	: Şap virüsü (Foot and Mouth Disease Virüs)
GMEM	: Glasgow minimum essential medium
GMP	: İyi imalat uygulamaları (Good Manufacturing Practise)
HÜKÜK	: Hücre Kültürü Koleksiyonu
ISA	: İyonik şiddet ayarlayıcı (Ionic strength Adjuster)
IT	: İnfektif titre (pfu/mL)(plaque forming unit/mililitre)
KFT	: Komplement fiksasyon testi
OIE	: Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi
OAİ	: Oksijen aktarma hızı (mM.sa ⁻¹)
OTH	: Oksijen tüketim hızı (mM.sa ⁻¹)
PID	: Proportional-Integral-Derivative
PSI	: Pound per square inch (14.5 psi=1 kg/cm ²)
RNA	: Ribonükleik asit
RSM	: Yüzey Cevap Metodu (Response Surface Methodology)
SİP	: Yerde sterilizasyon (Steam In Place)
TCA	: Trikarboksilik Asit Çevrimi (Krebs Çevrimi)
TOK	: Toplam organik karbon (ppb)
TP	: Toplam protein miktarı (µg/mL)
UPW	: Ultra saf su (Ultra Pure Water)
WFI	: Enjekte edilebilir su (Water for Injection)

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Şap hastalığı, sığır, koyun, keçi gibi hayvanlarda görülen bulaşıcılığı yüksek viral bir hastalıktır. Şap hastalığının hayvan ticaretindeki sınırlamalar yanında hayvan besleme, veterinerlik ve ilaç sanayi alanlarında önemli ekonomik etkileri bulunmaktadır (Perry et al., 2003). Hastalıkla mücadele için aşılama yapılması Türkiye’de uygulanan etkili kontrol programlarından biridir (Sütçü vd., 1985). Şap aşıları, süspanse BHK-21 hücrelerinden üretilen virüslerin inaktive edildikten sonra formüle edilmeleri ile üretilmektedir (Doel, 2003; Spier, 1985). Süspanse hücre kültürleri, şap virüsünün üretimini kolaylaştırmış, üretim kapasitesini artırmış, aşının hastalıkla mücadelede etkin kullanımını sağlamıştır (Barteling et al., 1991).

Endüstriyel şap aşılarının üretiminde BHK 21 hücreleri kullanılmaktadır. Biyolojik tıbbi ürünlerin üretiminde kullanılan hayvan hücrelerin metabolik yolları karmaşık olup, in-vitro ortamlarda üretilen bu hücrelerin değişen çevre koşullarına verecekleri cevapların öngörülmesi oldukça güçtür. Biyoproses çalışma parametreleri hücre metabolizmasına yani hücre içi reaksiyonlara etki ederek hücrelerin özgül üreme hızını (μ) olumlu veya olumsuz yönde değiştirirler. Endüstriyel üretimlerde biyoprosesin tekrarlanabilirliği ve üretim sürecinin standardize edilebilmesi için kritik parametrelerin tespiti ve kontrolü çok önemlidir.

Hayvan hücre kültürlerinde farklı üretim yöntemleri mevcuttur. Göreceli olarak basit kontrol sistemlerine sahip olan kesikli üretim yöntemleri diğer üretim yöntemlerine göre yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kesikli üretim sistemlerinin doğası gereği sınırlayıcı koşullar kolayca ortaya çıkmaktadır. Besinlerin tükenmesi, metabolit birikimi ile toksik etki ortaya çıkmakta ve hücre üremesini sınırlamaktadır. Çözünmüş oksijen (ÇO), pH, kesme gerilmeleri, ozmolalite (pOsm), çözünmüş karbondioksit (CO_2) sınırlayıcı koşullardan bazılarıdır. Biyomühendislik yaklaşımları ile biyoreaktör çalışma parametreleri optimize edilerek optimum hücre üretim süreci kontrol mantığı geliştirilebilir. Metabolik olarak sağlıklı, virüs üretimi açısından verimli BHK-21 hücrelerinin üretilmesi daha fazla şap antijeni üretimini mümkün kılacaktır.

Şap Enstitüsünde üretimi yapılan şap aşısı üretim sürecinde en önemli faaliyetlerden birisi BHK-21 hücrelerinin süspanse ortamda üretimidir. Bu üretimler

endüstriyel ölçekteki biyoreaktörler kullanılarak yapılmaktadır. Günümüzde kullanılan modern sistemler ile kıyaslandığında kullanılan biyoreaktörlerin mekanik sistem ve kontrol altyapılarının modernize edilmeleri gerektiği görülmüştür.

Günümüzde hücre üretim koşullarının optimizasyonu canlı hücre derişiminin maksimize edilmesi, hücrelerin üstel üreme evresinde geçirdiği sürenin uzatılması ve en yüksek oranda ürün eldesi endüstriyel ölçekte üretimi yapılan hücreler için en önemli amaç haline gelmiştir. Bununla birlikte karmaşık olan biyolojik üretim proseslerinde bu amaçların gerçekleştirilmesi oldukça güçtür. Çünkü kesikli üretim yöntemiyle üretim yapılırken biyoreaktör içinde her an değişken bir ortam vardır. Belirli şartlar altında geçerli olan ilişkiler değişen şartlarla değişmekte ve zamanla bu etkilerin kombinasyonları bireysel etkilerin toplamından çok daha önemli sonuçlar doğurmaktadır. Tüm bu çıktılar başlangıç şartlarının bir fonksiyonu olduğu gibi çalışma koşullarına göre de değişmektedir. Çalışma koşullarından kontrol edilemeyen bir parametrenin değişimi ile ortaya çıkan yeni koşullar farklı sonuçlar ortaya çıkarmakta ve biyoprosesin standardize edilmesi zorlaşmaktadır. Biyoprosesin optimizasyonu için başlangıç ve çalışma koşullarının belirli sınırlar içinde tutulması gerekir. Biyoprosesin kontrolü için çalışma koşullarının her birinin optimum değerleri, ağırlık oranları ve birbirleri ile olan etkileşimlerinin saptanması gerekmektedir. Bu amaçla tüm parametreleri kapsayan çözümler için çok sayıda kontrollü deney yapılması gerekir. Çalışma koşullarından bazılarını sabit tutmak suretiyle yapılacak optimizasyonla belirli koşullardaki ilişkiler kısmen açığa çıkarılabilir. Bu sayede bilinmeyenlerin azalması ile diğer parametre etkileri daha kolay araştırılabilir. Optimizasyon çalışmaları en az maliyetle en fazla ürün elde etmek için yapılır ve bugün endüstriyel amaçlı üretimler için kaçınılmazdır.

Bu çalışma kapsamında BHK-21 hücre üretim prosesinin tekrarlanabilirliğinin sağlanması ve daha standart çalışma koşullarında yapılabilmesi için üretilen hücre derişimlerinin ve hücrelerin virüse olan duyarlılıklarının biyoreaktör anahtar çalışma koşullarından nasıl etkilendiğinin tespit edilmesi değerlendirilecektir. Bu amaçla, bu çalışmada ilk olarak anahtar parametrelere ve parametre etkileşimlerine bakılarak çalışma koşullarının aralıklarının tespitlerinin yapılması ve söz konusu parametrelerin hücre üreme hızına (μ), son hücre sayısına (X) ve 146S partikül miktarına, antijenik titreye (AT), enfektif titreye (IT), toplam proteine (TP),

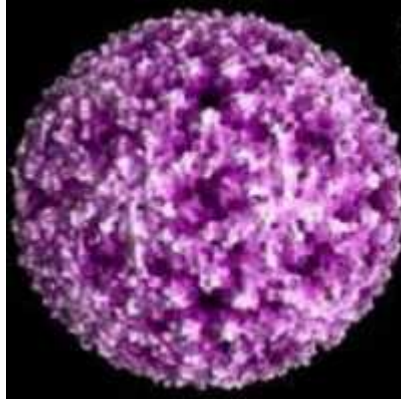
ozmolaliteye (pOsm) ve metabolit miktarlarına (laktat, amonyak) etkileri, bu etkilerin ağırlıklarının ve dolayısıyla şap virüsü üretimine etkilerinin araştırılması düşünülmüştür.

Sunulan çalışma ile üretim artışının sağlanacağı biyoproses çalışma koşullarının elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu sonuçlar kullanılarak biyoreaktör sistemlerinin mekanik ve kontrol altyapılarının modernizasyon çalışmalarının kapsam ve gerekçelerinin oluşturulması amaçlanmıştır.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Şap Hastalığı Etkeni ve Klinik Tablo

Şap hastalığının etkeni *picornaviridae* familyasının *aftovirüs* cinsinde yer alan şap virüsüdür. Şap virüsü partikül sedimantasyon hızı ve özelliklerine göre tespit edilmiş 4 adet antijenik komponente sahip olup (146S, 75S, 12S ve 4S), bunlardan 146S partikülü immunojen partiküldür (Brown et al., 1985). Şekil 2.1'de şap virüsüne ait fotoğraf görülmektedir.



Şekil 2.1. Şap Virüsü (Şap Enstitüsü Web Sitesi)

Şap virüsünün antijenik yapıları birbirlerinden farklı olan ve birbirlerine karşı çapraz koruma göstermeyen 7 serotipi mevcuttur. Bu serotipler O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 ve ASIA-1'dir. Her bir serotip kendi içerisinde antijenik varyasyon gösteren alt tiplerden oluşmaktadır (Bachrach et al., 1968; OIE T. Manual, 2009). Sıcaklık (T), pH, iyon cinsi ve derişimi, viskozite, hücre-virüs derişimi, karıştırma hızı (N) gibi çalışma parametrelerinin virüsün hücreye tutunma oranını etkilediği bildirilmiştir (Crowell et al., 1994).

Klinik tablo

Hastalık yüksek ateş, depresyon, solunum güçlüğü, ağız ve ayakta veziküllerin görülmesiyle karakterize edilir. Tipik vakalarda sığırlar 3-6 gün inkübasyon devresi gösterir fakat bu süre 1-11 gün arasında da değişebilir. Sağımdaki hayvanlarda belirgin olarak süt veriminde düşme görülür. Şekil 2.2'de Şap hastalığı lezyonları görülmektedir. Dil üstünde, damakta ve dudaklarda içi saman rengi sıvı ile dolu veziküller ve salya akması görülür. Veziküller birkaç saat sonra açılır ve açık kırmızı renkli ülserler meydana gelir. Genellikle ayaktaki rupturlar sekonder reaksiyonlara yol açar.



a)



b)

Şekil 2.2. Şap hastalığı lezyonları a) Dilde, b) Ayak çatal arasında (Şap Enstitüsü Web Sitesi)

Şap hastalığı, Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE)'in A grubu listesinde yer almaktadır. Bu nedenle canlı hayvan ve hayvansal ürünler ile ilgili uluslararası ticarete önemli kısıtlayıcı hastalık sınıfını oluşturmaktadır (Leforban et al., 1999).

2.2. Hayvan Hücre Kültürleri (Üretim Süreçleri)

"Hücre kültürü" (hücre üretim prosesi) doku ve organlardan mekanik ve/veya enzimatik yöntemler kullanılarak izole edilen hücrelerin *in vitro* koşullarda yapay besiyeri ortamlarında üretilmesine verilen isimdir. Özellikle 1950 ve 1960'lı yıllarda virüslerin hayvan hücrelerinde üretilmesi konusunda yapılan çalışmalar ile gelişme göstermiştir (Freshney et al., 1987). Gelecek yıllarda hayvan hücre üretim biyoproseslerinin tedavi amaçlı ürünlerin üretiminde kullanımı yaygınlaşarak devam edecektir. Hayvan hücreleri işlevlerine bağlı olarak değişik morfolojilerde ve büyüklük olarak değişken boyutlarda olabilmelerine karşın ortalama olarak 15-20 µm çapa sahiptirler.

Son yıllarda hayvan hücrelerinin endüstriyel amaçlı üretimi ve optimum üreme koşullarını sağlanması amacıyla biyoproses stratejilerinde önemli ilerlemeler gerçekleştirilmesine rağmen, çalışma koşullarının optimizasyonu hala çözülmesi zor bir problem olarak durmaktadır.

2.2.1. Hayvan hücre kültürleri ve kullanıldığı alanlar

Günümüzde hemen her alanda hücre üretim çalışmalarına rastlamak mümkündür. Kullanım alanı olarak ilk sırayı viral aşılar almaktadır. Veteriner hekimlikte

kullanılan aşilar içinde şap aşısı üretimi önemli bir yer tutmaktadır. Aşı üretimi dışında hücrelerin kullanıldığı birçok alan mevcuttur (Spier et al., 1985).

2.2.2. Hayvan hücre kültürlerinin avantajları ve dezavantajları

Hayvan hücre üretim prosesleri dokulardan izole edilen hücre popülasyonlarının fiziko-kimyasal ve fizyolojik değişkenlerden uzak olarak incelenebildiği ortamlardır. Hücrelerin kullanıldığı biyoproseslerin belirli avantaj ve dezavantajları söz konusudur.

a. Hayvan hücre üretim süreçlerinin avantajları

Canlı vücudunda sabit koşulları oluşturarak çeşitli testleri yapmak çok daha zor olmakla birlikte biyoreaktörler yardımıyla biyoproses koşulları etkin olarak kontrol edilebilir. Hücre üretim proseslerinde; pH, ozmolalite (pOsm), çözünmüş oksijen (ÇO), sıcaklık (T) ve çözünmüş karbondioksit gibi çalışma koşullarının kontrolü ile fizikokimyasal çevre homojen bir şekilde ve bağımsız olarak sağlanabilmektedir. Hücre üretim prosesleri ekonomiktir. Canlı organizmada, kullanılan hammaddenin %90'ı dışarı atılım ve hedef dışındaki dokulara dağılım ile kaybolur. Bu koşullar altında ancak verilen hammaddenin %10'una cevap alınırken, hücre üretim proseslerinde bu oran %90'lara kadar çıkmaktadır. Elde edilen ürünün saflığı son derece önemli bir avantajdır. Teknolojik gelişmeler, maliyetlerin düşürülmesine imkân sağlamaktadır (Freshney, 1987).

b. Hayvan hücre üretim proseslerinin dezavantajları

Hücre üretim proseslerinde her zaman istenen saflıkta ve kararlılıkta ürün elde edilmeyebilir. Hücre üretim proseslerinde steril ve standart kalitede üretim için deneyim, çalışma koşullarının optimizasyonu ve aseptik koşullar çok önemlidir. Mikrobiyolojik kontaminasyonlar, kompleks besiyerleri ve kullanılan üretim cihazlarının teknolojik yetersizlikleri önemli sorunlar arasındadır. Hayvan hücreleri yavaş ürer, ikilenme süreleri ($t_d=12-100$ sa) uzun olduğu için üretim prosesinin kontaminasyon riski de doğal olarak fazladır. Mikrobiyal ve özellikle tespiti zor ve çok bulaşıcı olan mikoplazma kontaminasyonları üretim süreci için çok önemlidir. Hücre üretim proseslerinde kontaminasyonlara yol açan temel nedenler; hücresel kökenli, hammaddeler ve besiyerleri kaynaklı olabileceği gibi laboratuvar personeli, laboratuvar cihazları, laboratuvar teknik altyapısı veya uygun olmayan çalışma

yöntemleri ile de ilgili olabilir. Endüstriyel üretimlerde özellikle besiyerlerinde kullanılan serum önemli kontaminasyon kaynaklarından birisidir (Kadoi, 1984).

Virüsler ise diğer bir kontaminasyon kaynağıdır. Özellikle parvo virüslerin etkileri hemen tespit edilemez ve etkiler ortaya çıkıncaya kadar çok miktarda ürün kayıpları gerçekleşir. Hücre besiyerleri genelde elli farklı kimyasaldan oluştuğundan bu kadar girdinin sterilite açısından kontrolü oldukça güçtür. Bugünkü eğilim daha düşük oranda hayvansal kaynaklı serum kullanılması ve az sayıda komponent içeren daha iyi tanımlanmış besiyerlerinin formüllendirilmesi yönündedir. Hücrelerin toksik etkiye maruz kalmalarının nedenleri arasında çeşitli safsızlıklardan gelen iz metaller ve besiyeri hazırlamada kullanılan su veya kimyasallar içerisindeki organik ve inorganik kontaminantlar sayılabilir. Hayvan hücre üretiminde kullanılan suyun toplam organik karbon (TOK) değeri son derece önemlidir. Su sistemi yıllık su kalitesi değişimlerini regüle edebilmeli böylece sürekli aynı kalitede su sağlayacak şekilde tasarlanmış olmalıdır. Ultra saf su (UPW) veya enjekte edilebilir su (WFI) üretim süreçlerinin doğrulanması (validation) çok önemlidir. Bu amaçla üretimin değişik aşamalarında kullanılan saf suyun iletkenlik, TOK, endotoksin ve mikrobiyolojik açılardan düzenli takibi gerekir.

Kontaminasyonları minimize etmek için iyi imalat uygulamalarına (cGMP) uyulması gerekir. Biyoreaktörlerin ASME BPE veya muadili standartlara göre imal edilmiş olması, paslanmaz çelik tesisatların aseptik ihtiyaçları karşılayacak şekilde tasarlanmış olması gerekir. Kullanılan medikal gazların ve besiyerlerinin sterilizasyonu için filtrasyon sistemleri kullanılmalıdır. Besiyeri sterilizasyonunda 0.10 µm filtreler kullanılmasıyla mikoplazma dahi tutulabilmektedir (Ararhoon et al., 1986). Depolanma koşullarından başlayarak üretimin tüm aşamalarında cGMP kurallarına uyulması ile bu problemler büyük ölçüde aşılabilmektedir. Standart üretim talimatlarının oluşturulması ve takibi, özellikle asepsi-antisepsi kuralları, sterilizasyon, hücre üretim sürecinin doğrulanması ve personel kalifikasyonlarının yapılması ile kontaminasyonlar konusunda %95 üzerinde başarı sağlanmıştır. Amerika'da bir üretim tesisinde belirtilen kurallara uyularak antibiyotik kullanılmadan aynı seviyede başarı elde edilmiştir (Ararhoon et al., 1986).

2.2.3. Hayvan hücre kültürlerinin tarihçesi ve BHK-21 C13 hücresi

Hücre üretim prosesleri genel olarak “tek tabaka hücre kültürleri” (monolayer, anchorage dependent) ve “süspanse hücre kültürleri” olarak ikiye ayrılabilir. Her iki kültürünün de avantaj ve dezavantajları mevcuttur (Ma et al., 2005). BHK-21 hücresi, 1962 yılında Mc Pherson ve Stocker tarafından Suriye hamsteri yavru böbrek hücrelerinden izole edilmiştir. Bu hücrenin klonlanması ile BHK-21 C13 hücresi elde edilmiştir. BHK-21 hücresi, fibroblast hücredir (Gürhan vd., 1987). Mowat ve Chapman’ın 1962’de BHK-21 C13 hücresinin şap virüsüne duyarlı olduğunu bildirmesinin ardından bu hücrenin aynı yıl süspanse üretim prosesi geliştirilmiştir (Capstick, 1963; Berinstein et al., 1995; Mowat et al., 1962; Barteling et al., 2002). Bu üretimde çalışma parametreleri; sıcaklık, $T=36.5\pm0.5$ °C, pH=7.4 ve karıştırma hızı, $N=400$ d/dk olup, 4 L cam biyoreaktör ve 30 L paslanmaz çelik biyoreaktörde son hücre sayısı, $X=2.5\cdot10^6$ hücre/mL sayıya ulaşıldığı bildirilmiştir (Capstick et al., 1965). Böylece tek tabakalı üretimde $1.0\cdot10^6$ hücre/mL olan son hücre sayısı (X) 2.5 kat artmıştır. BHK-21 hücresinin adaptasyon süresi 14-16 sa ve ikilenme süresi 14 saat olarak bildirilmiş ve 72 saat biyoproses süresi sonunda $1.2\text{-}1.7\cdot10^6$ hücre/mL sayılarına ulaşılmış, hücre canlılık oranı $>\%95$ olarak tespit edilmiştir. Hücre üreme parametreleri ise Monod’un 1950’de tanımlandığı eşitliklerde olduğu gibi değerlendirilmiştir (Capstick et al., 1965).

Son yıllarda çalışma stratejilerinin gelişimine paralel olarak yeni üretim teknikleri (yarı-kesikli, sürekli ve perfüzyon üretim yöntemleri) ve çalışma koşullarının kontrolleri ile üretimde miktar artışları ve maliyetlerde düşüşler sağlanmıştır. Üretim sürecinde besiyeri ve fizikokimyasal faktörlerin optimize edilmesi ile oluşturulan homojen bir çevrede üretim kayıpları büyük ölçüde azaltılabilmektedir (Spier et al., 1985; Freshney et al., 1987).

Hücre üretim proseslerinin verimliliği farklı parametrelerin karşılıklı etkileşimlerine bağlıdır. Biyoreaktörün karıştırma ve havalandırma sistemlerinden kaynaklanan yüksek kayma gerilmeleri, homojen olmayan çözünmüş oksijen (ÇO), pH değişimleri ve köpük oluşumu gibi biyoreaktör ortamının getirdiği faktörler çok önemlidir. Besiyeri; pH, ÇO , CO_2 ve pOsm değişimleri hücre metabolizmasında değişimlere neden olmakta ve sonuç olarak hücre özgül üreme hızında (μ) ve son hücre sayılarında (X) düşüşler görülmektedir (Öztürk et al., 1990). Bu faktörlerin

etkili oldukları bilinse de hücrelerin değişik çalışma parametrelerine gösterdikleri hassasiyetin aynı hücre hattının klonlarında dahi farklılık göstermesi, bu etkilerin çalışma şartları ile değişimleri ve toplam etki içindeki oranlarının bilinmesi zordur. Aynı parametrenin farklı başlangıç çalışma değerlerine veya diğer parametre değerinin değişimine verdiği cevabın farklı olması, biyolojik sistemler için beklenmeyen bir durum değildir. Diğer tüm koşulların sabit tutulup tek koşulun değiştirildiği çalışmalarla değişen çalışma koşulunun diğer parametrelerin etkilerini arttırma veya azaltma yönündeki etkilerinin tespit edilmesi, iki boyutlu araştırmalarla mümkün olmadığı için çok boyutlu olarak sistemin incelenmesi ve modelleme yapılması gerekir.

2.2.4. Endüstriyel şap aşısı üretim prosesi

Günümüzde tüm şap aşıları uygun biyogüvenlik şartlarını taşıyan laboratuarlarda monolayer veya süspanse olarak üretilen BHK-21 hücreleri kullanılarak üretilmektedir (Kitching et al., 2007). Aşılamanın şap hastalığı ile mücadelede önemli bir yeri vardır ve halen dünyada milyonlarca doz şap aşısı üretilmektedir (Gürhan, 1993). Endüstriyel aşı üretiminde antijenik bileşenlerin; en ekonomik, pratik ve en yüksek düzeyde elde edilmesi ana hedeftir.

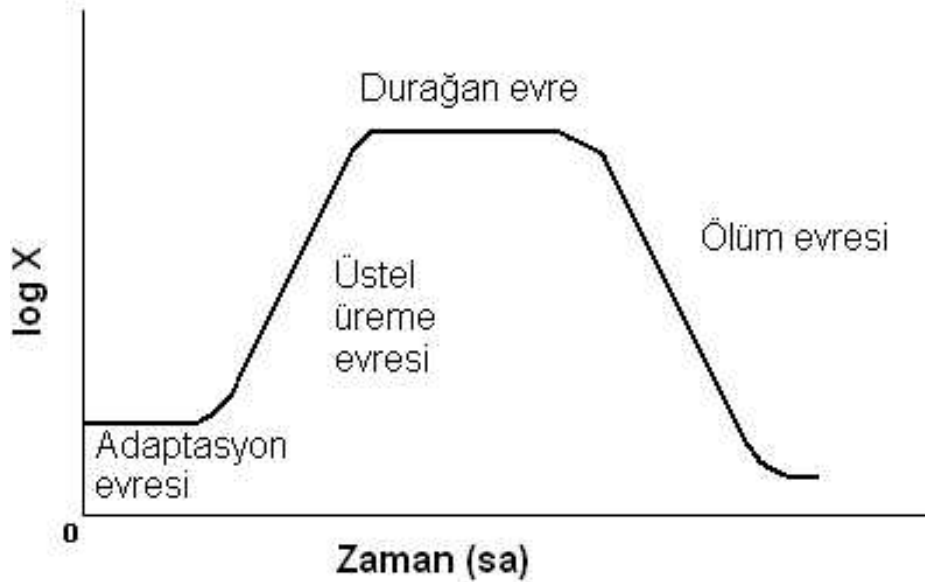
Şap aşılarının üretimi oldukça uzun, masraflı ve uzmanlık gerektiren yöntemler içerir. Endüstriyel amaçla şap aşısı üretimi için kullanılan tohum hücreler birkaç pasaj tektabaka (monolayer) olarak çoğaltılarak süspanse üretime adaptasyonları sağlanır. Şap aşısı üretiminde kullanılan süspanse BHK-21 hücreleri ölçek büyütme teknikleri kullanılarak 3000 L ve üzeri hacimlerde üretilmektedir.

Üretilen süspanse hücreler tohum virüs ile enfekte edilir ve elde edilen şap virüslerinin BEI (binary ethylene-imine) ile inaktivasyon işlemi yapılır. İnaktif hale gelmiş virüsler “antijen” olarak isimlendirilir. Bu antijenler ultrafiltrasyon metodu ile konsantre edildikten sonra saflaştırma işlemlerine tabi tutulurlar. Antijenler daha sonra alüminyum hidroksit, saponin veya yağ adjuvantı ilave edilerek formüle edilir. Şap aşısı hazırlanarak kontrol ve testlerden sonra şişelenir ve piyasaya sürülür (Barteling et al., 1991, 2002). Günümüzde Şap virüsünün antijenik özellik gösteren (özellikle VP1) proteinlerine karşı geliştirilmiş peptit, rekombinant ve DNA aşıları da küçük ölçeklerde üretilmektedir (Mason et al., 1999).

2.2.5. Hücre üremesinin değerlendirilmesi

Kesikli üretim yöntemi ile yapılan hücre üretimlerinde, çevresel faktörler ve besin maddelerinin derişimlerine göre farklılık gösteren, ama temelde aynı aşamalardan oluşan üreme grafikleri kullanılır. Biyoreaktör birim hacmindeki hücre sayısının zamana karşı izlenmesi ile sigmoid üreme eğrileri elde edilir ve hücre üreme evreleri izlenebilir. Şekil 2.3'te kesikli üretim yöntemi için genel bir hücre üreme eğrisi ve üreme evreleri görölmektedir. Genel olarak bu evreler; adaptasyon evresi (lag phase), üstel üreme evresi (exponential phase), durağan evre (plateau phase) ve ölüm (death phase) evreleridir. Bu evreler arasında geçiş evreleri de bulunmaktadır.

Adaptasyon evresi hücrelerin yeni bir biyoproses için besiyeri ortamına alınmalarından hemen sonra başlayan evredir. Üstel üreme evresinde kültüre alınan hücrelerde adaptasyon süresi görece olarak kısadır. Adaptasyon evresindeki hücreler neredeyse hiç üreme faaliyeti göstermez, sadece çevre koşullarına göre metabolizmalarını düzenlerler. Üstel üreme evresinde hücreler logaritmik üreme gösterir ve mitozdaki hücre oranı toplam hücrelerin %90-100'üne ulaşır. Bu evrenin süresini etkileyen faktörler; başlangıç hücre sayısı (X_0), besin maddesi derişimleri ve inhibitör metabolitler olarak sıralanabilir.



Şekil 2.3. Kesikli kültürde hücre üreme eğrisi (adaptasyon evresi, üstel üreme evresi, durağan evre ve ölüm evresi)

Bu evrede hücre sayısının zamana göre değişimi eşitlik 2.1.'de gösterildiği gibidir.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2.1.)$$

Bu eşitlikte;

μ : Özgül üreme hızı (sa^{-1})

X : Hücre sayısı (hücre/mL)

t : Zamanı (sa) göstermektedir.

Eşitlik 2.1.'de $t=0$ 'da ($X=X_0$) sınır değeri kullanılarak integral alınırsa;

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (2.2.)$$

eşitliği elde edilir. Anlaşılacağı üzere hücreler üstel üreme evresinde birinci dereceden bir kinetikle çoğalırlar. Eşitlik 2.3'te görüldüğü gibi yukarıdaki eşitlik kullanılarak ikilenme süresi (t_d) bulunabilir.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (2.3)$$

Üstel üreme evresi sonunda besin maddelerinin azalması ve inhibisyon yapan metabolitlerin artması sonucunda hücreler durağan evreye girmiş olur. Durağan evre süresince özgül ölüm hızı (k_d), özgül üreme hızına (μ) eşit olur. Biyoprosesdeki hücrelerin ancak %5-10 kadarı mitozdadır ve hücre sayısındaki artış ile ölen hücre sayıları birbirine eşitlenir, hücrelerde morfolojik bozukluklar da meydana gelebilir. Ölüm evresinde $k_d > \mu$ olur ve ortamda canlı hücre derişimi düşmeye başlar.

2.2.6. Hücrelerin üremesine serum ve metabolitlerin etkileri

a) Hücre üremesine serumun etkisi

Serum hayvan hücrelerinin üretildiği biyoprosesler için önemli bir parametredir. Ancak serum bileşimindeki değişimler metabolizmaya ve sonuç olarak Monod denkleminde kinetik parametrelere etki edebilir. Besiyeri serum oranı %1.25'ten %10'a (v/v) çıkarıldığında maksimum canlı hücre sayısı (X) 2 katına çıkmaktadır, özgül üreme hızı (μ) artan serum oranları ile artmaktadır. Besiyerinde artan serum oranı μ 'yü iki farklı mekanizma ile arttırmaktadır. İlk olarak serumun μ ve X 'i arttırmasına rağmen metabolik oranlarda değişiklik gözlenmemesi artan serum

oranının hücrelerin kesme gerilmelerine (shear stres) dayanımını arttırması ile metabolik bir değişim olmadan k_d 'yi düşürerek μ 'yü arttırdığını ortaya çıkarmaktadır. Burada μ 'de meydana gelen artış miktarının k_d 'deki düşüşten fazla olması ise ikinci mekanizmanın büyüme faktörleri olduğunu göstermektedir (Öztürk et al., 1990). Eşitlik 2.4'te sınırlayıcı besin (S), özgül üreme hızı (μ), ilişkisini tanımlayan Monod eşitliği görülmektedir. Eşitlik 2.5 ve 2.6'da hücre sayısının (X) zamana karşı değişimi ve özgül üreme hızıyla (μ) olan ilişkisi görülmektedir.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2.4)$$

K_s : Monod sabiti (g/L)

S : Sınırlayıcı besin derişimi (g/L)

$\mu_{\max}$: Maksimum özgül üreme hızı (sa^{-1})

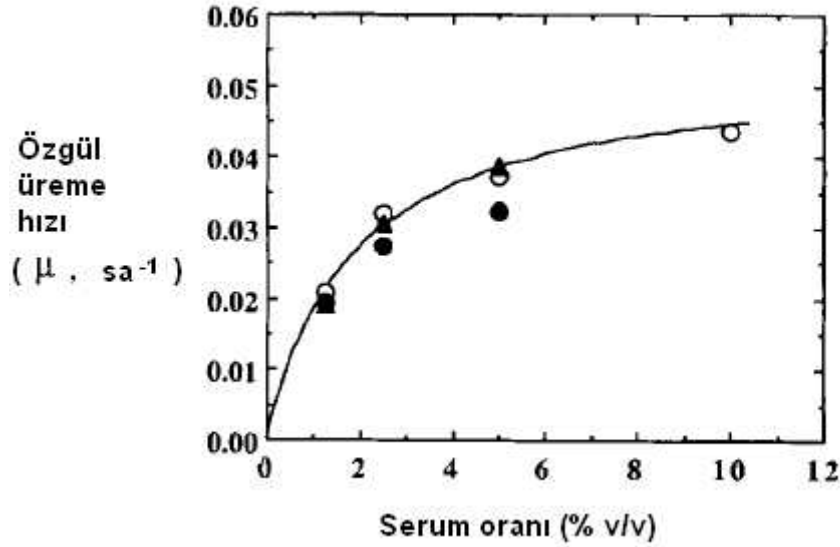
$$\frac{dX}{dt} = \mu * X \quad (2.5)$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_{\max} - k_d) * X \quad (2.6)$$

k_d : Özgül ölüm hızı (sa^{-1})

X : Hücre derişimi (hücre/mL)

Düşük serum oranları ölüm evresindeki hücrelerin daha hızlı ölümü sonucunu ortaya koymuştur. Literatürde serum derişiminin Monod kinetiğine uygun şekilde sınırlayıcı bir parametre olarak μ 'ye etki ettiği tespit edilmiştir. Amonyak/glutamin veriminin ($Y_{\text{NH}_3/\text{glu}}$) serum derişiminden bağımsız olduğu ve ölüm evresinde dahi aynı metabolik oranların korunduğu da bildirilmiştir (Öztürk et al., 1991). Şekil 2.4'te *Murine hibridoma hücresi* (167.4G5.3) için serum oranının farklı başlangıç hücre sayılarında (X_0), özgül üreme hızına (μ) etkisi gösterilmektedir (Öztürk et al., 1990).



Şekil 2.4. Murine hibridoma hücrelerine (167.4G5.3) serum oranı ve X_0 'ın özgül üreme hızına (μ) etkisi, (o) $X_0=10^3$ hücre/mL, (•) $X_0=10^4$ hücre/mL ve (Δ) $X_0=10^5$ hücre/mL. Eğri Monod denklemine göre $X_0=10^4$ hücre/mL için çizilmiştir (Öztürk et al., 1990).

b) Hücre üremesine laktat ve amonyumun etkileri

Hibridoma hücreleri ile yapılan çalışmada laktat derişiminin 40 mM üzerindeki değerlerinin özgül üreme hızına (μ) olumsuz etkileri olduğu ve 78 mM'da μ 'nün yarıya düştüğü bildirilmiştir (Glacken et al., 1989). Süspanse olarak üretimi yapılan BHK hücrelerinde besiyeri laktat derişimi 38 mM ulaştığında ölü hücreler gözlenmeye başlamıştır (Cruz et al., 2000). Literatürdeki bu çalışma aynı zamanda amonyak kaynaklı ölümlerin genellikle apoptozla, laktat kaynaklı olanların ise nekrozla gerçekleştiğini göstermiştir. Chinese Hamster Ovary (CHO) gibi bazı hücreler biyoprosesin ilerleyen aşamalarında metabolizmalarını değiştirerek laktat tüketme yeteneğine sahip olabilmektedir (Pörtner R., 2009). Laktat derişiminin 30 mM üzerine çıkması ile özgül laktat oluşum hızı (q_{lak}) negatif olmuş yani hücreler ortamı toksinlerden arındırmak için laktatı tüketmeye başlamıştır. Laktatın bir etkisi de besiyeri ozmolalite (pOsm) değerini arttırmasıdır. Özgül oksijen tüketim hızı (q_{O_2}) besiyeri amonyak ve laktat derişiminden önemli oranda etkilenmektedir ancak amonyağın etkisi laktata göre düşük derişimlerde dahi çok fazladır. Amonyak sadece glutamin metabolizmasının metabolik atığı olarak değil, aynı zamanda glutaminin, pirolidon karboksilik asit ve amonyağa kimyasal dekompozisyonu ile de ortaya çıkmaktadır (Glacken et al., 1986). Besiyeri çözünmüş oksijen derişiminin $\text{CO}_2=1\%$ değeri dışındaki çalışmalarda

glutamin sınırlayıcı besin olarak gözlenmiştir. Hücre açısından amonyağın 10 kat daha toksik olduğu söylenebilir. Örneğin besiyeri laktat derişimi 60 mM olduğunda hücre sitoplazma pH'ı $pH_i=7.6$ 'dan 7.0'ye düşerken (sitoplazmik asidifikasyon), 10 mM amonyak derişiminde $pH_i=6.6$ 'ya kadar azalmaktadır (Cruz et al., 2000).

Hayvan hücre üretim proseslerinde amonyum toksisitesi için birçok mekanizma tanımlanmıştır. Elektrokimyasal gradyentlerin karışması, enzim reaksiyonlarının engellenmesi ile hücre iç pH'sının değişimi (Glacken et al., 1988) ve hücre onarım enerjisi ihtiyacının artması bunlardan bazılarıdır (Mirabet et al., 1997).

Besiyerindeki glutamin 1. dereceden bir kinetik ile bozunmakta ve bozunma sabiti (k); pH, sıcaklık (T) ve serum fonksiyonu olarak ifade edilmektedir. Besiyerindeki toplam glutamin miktarının %45'i bozunarak hücre tarafından kullanılamamaktadır. Glutaminin zamana karşı bozunması aşağıdaki 2.7'deki eşitlikte verildiği gibi ifade edilebilir (Öztürk et al., 1990a).

$$\frac{dX}{dt} = -k \cdot G \quad (2.7)$$

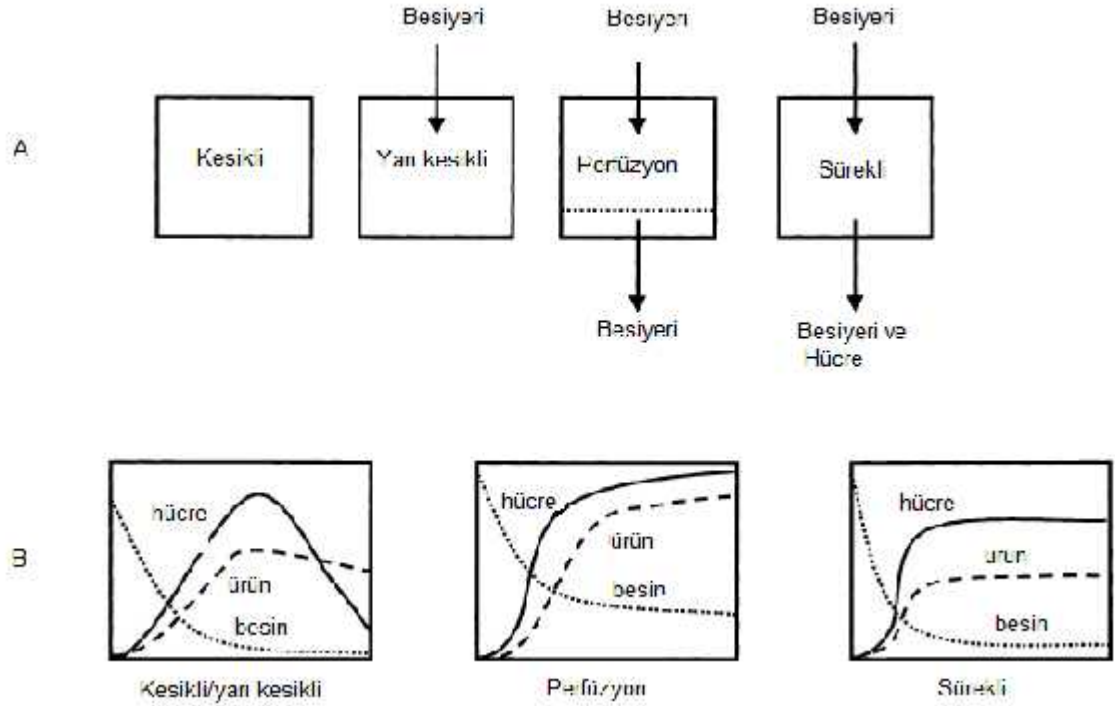
Burada;

k : Bozunma sabiti (sa^{-1})

G : Glutamin derişimi (mM)

2.3. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Üretim Yöntemleri

Hayvan hücre kültürlerinde (üretiminin yapıldığı biyoproseslerde) genel olarak; kesikli, yarı-kesikli, sürekli ve perfüzyon üretim yöntemleri kullanılmaktadır (Castilho et al., 2002). Şekil 2.5'te hücre üretim yöntemlerinin kinetik eğrileri görülmekte olup, hücre, besin ve ürünün zamana karşı değişimleri sembolize edilmektedir. Bu yöntemlerden kesikli üretim yöntemi işletmesi kolay, esnek ve güvenli olması nedeni ile büyük oranda endüstriyel üretimlerde tercih edilmektedir.



Şekil 2.5. (a) Hücre üretim yöntemleri, (b) Hücre sayısı, besin maddeleri ve ürün derişimlerinin kesikli, yarı-kesikli ve sürekli üretim yöntemlerinde zamanla değişimi

Hücre üretim proseslerinde; özgül üreme hızı (μ), hücre sayısı (X), besin maddesi ve ürün derişimleri kütle denklıkları ve Monod denklemi ile matematiksel olarak ifade edilebilir.

a) Kesikli üretim yöntemi (Batch culture mode)

Kesikli üretim yönteminde hücre aşılama işleminden sonra besiyerine herhangi bir besin ilavesi yapılmaz. Biyoreaktörün çalışma hacmi biyoproses süresince sabittir. Hücreler çoğalırken, ortamda bulunan besin maddelerini kullanarak, ürün ve metabolik atıklara dönüştürürler.

Bu üretim yönteminde; hücre sayısı, besin maddeleri ve oluşan ürüne ait genelleştirilmiş kütle denklıkları eşitlik 2.8, 2.9, 2.10'da ifade edilmektedir.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2.8)$$

$$\frac{dS}{dt} = q_s \cdot X \quad (2.9)$$

$$\frac{dP}{dt} = q_p * X \quad (2.10)$$

Bu eşitliklerde;

- X : Canlı hücre sayısını (hücre/mL)
t : Biyoproses zamanı (sa)
 μ : Özgül üreme hızı (sa^{-1})
S : Besin maddesi derişimi (mM)
 q_s : Besin maddesinin özgül tüketim hızı ($mM.hücre^{-1}.sa^{-1}$)
p : Ürün (veya metabolitin) derişimi (mM)
 q_p : Ürün (veya metabolitin) özgül üretim hızı ($mM.hücre^{-1}.sa^{-1}$)'dır.

Kesikli üretim yönteminde; bütün besin maddeleri biyoprosesin başlangıcında verilir ve belirli bir işlem süresi sonunda biyoproses sonlandırılır. Hücrelerin ihtiyaç duyduğu çözünmüş oksijenin (ÇO) sağlanması için spargerden (hava dağıtıcı) veya yüzeyden havalandırma yapılır. pH kontrolü için ilave edilen baz (sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit vb.) veya asidik olan CO₂ gazı, köpük önlemek için kullanılan köpük kırıcı (antifoam) ihtiyaca göre sisteme ilave edilir. Ancak köpük kırıcı özellikle kromatografik saflaştırma işlemlerini zorlaştırmaktadır.

Biyoproses sonlandırıldığında hücreler yeni kültüre hazırlık için biyoreaktör dışına alınır veya ürün saflaştırma proseslerine gönderilir. Üretim reaktörü belirli talimatlar dahilinde yerinde yıkama (CIP: clean in place) ve yerinde sterilizasyon (SIP: sterilization in place) işlemlerine tabi tutulur ve yeniden kullanıma hazır hale getirilir.

İşletme açısından kolay kontrol edilebilir bir proses olması ve üretime özgün olmamasından dolayı kesikli üretim yöntemi endüstriyel üretimlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tekrarlı-kesikli üretim (repeated batch) yönteminin uygulandığı proseslerde sonraki biyoproseste aşılama için kullanılacak hücreler durağan evreye geçmeden üstel üreme evresindeyken biyoproses sonlandırılır. Biyoreaktör tamamen boşaltılmaz ve yeni proses başlangıç hücre sayısına göre biyokütlenin bir kısmı biyoreaktör içinde bırakılır. Bırakılan hacim üzerine taze besiyeri alınır ve çalışma hacmine tamamlanarak yeni biyoproses başlatılır. Tekrarlı kesikli üretim yöntemi ile biyoreaktörün kültüre hazırlık işlemleri; yıkama, temizlik ve sterilizasyon

gibi normalde her kesikli üretimden sonra yapılması gereken ön işlemler için harcanan zamandan büyük oranda tasarruf sağlar.

Kesikli üretim yönteminde son hücre sayısı (X) veya toplam ürün miktarı (P) diğer üretim yöntemlerine göre genel olarak daha düşüktür. Bunun ana nedeni başlangıçta belirli derişim değerlerinin üzerinde besin maddesi (S) ilavesi yapılamaması ve besiyeri ortamının sürekli olarak değişim göstermesidir.

Besiyerinde besin derişimlerinin azalması, metabolitlerin artışı ile toksik etkilerin ortaya çıkması ve ozmolalite (pOsm) artışı gibi etkilerle özgül üreme hızında (μ) düşüşlerin ortaya çıkması kesikli üretim yönteminin en önemli dezavantajlarıdır (Chetan et al., 2006).

b) Yarı-kesikli üretim yöntemi (fed-batch culture mode)

Bu üretim yönteminde kültür sırasında hücre tarafından tüketilen besin maddeleri besiyerine dışarıdan ilave edilmektedir. Başlangıçta belirli ve düşük bir çalışma hacminden başlanarak sisteme belirli debide sürekli/kesikli konsantre besin maddeleri ilavesi yapılarak son biyoproses hacmine ulaşılır. Biyoproses süresince besin maddesi ilavesi yapılması hücrelerin besin maddesi eksikliğinden dolayı metabolizmalarını yavaşlatmalarına engel olur, böylece daha yüksek hücre ve ürün derişimlerine ulaşılır.

Yarı-kesikli üretim proseslerinde toksik metabolitlerin birikmesi özgül üreme hızını (μ), canlılık oranını ve ürün oluşumunu olumsuz etkilediği için verimlilik azalmaktadır. Laktat ve amonyu özgül üreme hızına (μ) en fazla etkili metabolitlerdir (Hassell, 1991). Hücre metabolizmasının besin maddelerinin farklı besleme stratejileri oluşturularak değiştirilmesi (metabolic shift) böylece metabolit oluşum oranlarının azaltılması mümkündür. Yarı-kesikli üretim yönteminde oluşan ürünün besiyeri ortamında çok uzun süre kalması diğer bir dezavantajdır. Özellikle prosesin ilk aşamalarında üretilen ve genellikle protein yapısında olan ürünler, proteazlar ve glikolidazlar gibi enzimlerle biyoproses sonuna kadar temas halinde bulunduklarından üründe bozulma olması kaçınılmazdır. Bu nedenle, biyoproses kontrol sıcaklığında stabil olmayan ve enzimatik yıkıma yatkın ürünler yarı-kesikli sistemlerde üretilemezler.

Yarı-kesikli üretimin en önemli karakteristik özelliği, kesikli üretim yöntemine göre daha karmaşık bir işletim sistemi olmasına rağmen hücre ve ürün veriminin önemli ölçüde artmasıdır. Ayrıca perfüzyon sistemleri ile karşılaştırıldığında, oldukça kısa çalışma süresi nedeni ile üretim doğrulama çalışmaları (validation) daha kolaydır. Birçok biyoteknoloji firması bu üretim yöntemini kullanmaktadır (Chu et al., 2001).

c) Sürekli üretim yöntemi (continuous culture mode)

Sürekli üretim yöntemi, taze besiyerinin sabit bir akış hızında sürekli olarak biyoreaktör içine verilmesi, diğer taraftan biyoreaktör içindeki homojen hücre süspansiyonunun besleme hızına denk bir hızla sürekli olarak biyoreaktörden alınmasıyla biyoreaktör hacminin sabit tutulması esasına dayanır.

Eşitlik 2.11'de seyrelme hızı, besleme hacmi ve çalışma hacmi arasındaki ilişki görülmektedir. Sistem yatışkın duruma (steady state) ulaştığında hücre sayısı, ürün derişimi ve besin madde derişimi sabit kalır. Bu durumda özgül üreme hızı (μ , sa^{-1}), biyoreaktör seyrelme hızına (D , sa^{-1}) eşittir.

$$D = \mu = \frac{F}{V} \quad (2.11)$$

Burada;

F : Besleme hacmi (L/sa)

V : Çalışma hacmi (L)

Sürekli üretim prosesi, biyoreaktör içindeki besin derişimleri ile değişik biyolojik reaksiyon oranları arasında yatışkın durumun iyi tanımlanmasına imkan verir. Bu nedenle bu üretim yöntemi hücre karakterizasyonu için güçlü bir araçtır (Altamirano, 2001).

d) Perfüzyon üretim yöntemi (perfusion culture mode)

Sürekli üretim yöntemine benzer bir üretim yöntemidir. Hücrelerin biyoreaktör içinde alıkonulması ve besiyerinin ortamdan uzaklaştırılması esasına göre çalışır. Bu üretim yönteminin kontrolü nispeten karışık olmasına rağmen en verimli üretim yöntemidir. 1969'da spin filtrenin bulunmasından sonra bu yöntemin laboratuvar ve endüstriyel üretimlerde kullanımı yaygınlaşmıştır (Chu et al., 2001).

Sürekli üretim yönteminin en büyük kısıtlayıcısı olan hücre kaybı nedeniyle ortaya çıkan verim düşüşleri perfüzyon sistemlerde kullanılan spin filtreler ile ortadan kaldırılmıştır. Biyoproses süresi günlerce hatta aylarca devam ettirilebilir (Bödeker, 1994). Yarı-kesikli üretim yönteminden perfüzyon üretim yöntemine geçilerek hacimsel üretim miktarı 10 kattan fazla artırılabilir (Dowd, 2003).

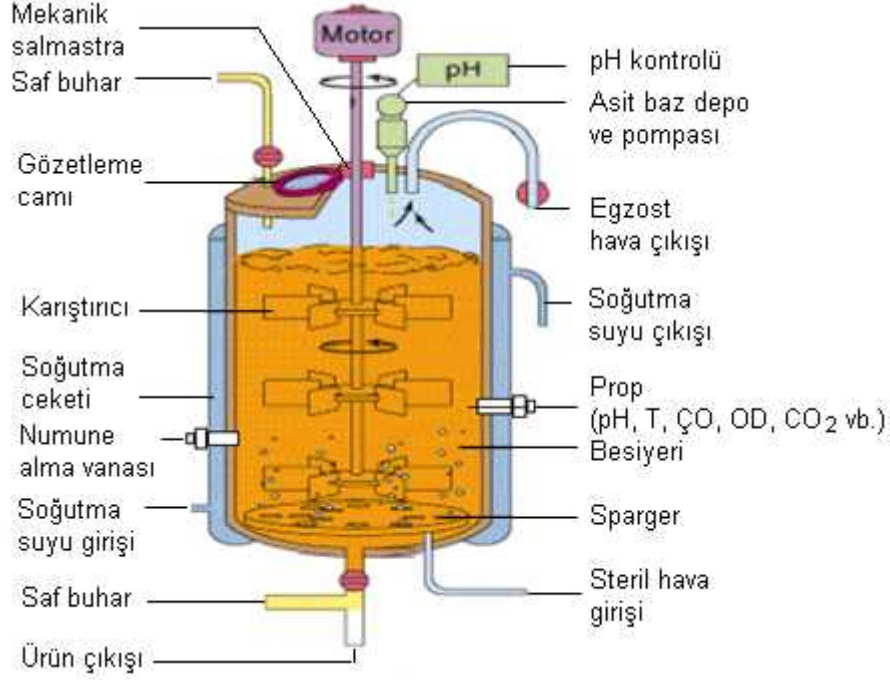
Perfüzyon üretim yöntemi ekonomik avantaj sunmasına rağmen halen birçok endüstriyel uygulamada kesikli ve yarı-kesikli üretim yöntemleri kullanılmaktadır. Bunun sebebi işletme ve teknolojik zorluklarla ilgili eksik bilgiler, işletim masraflarının yüksekliği ve bu işletme şeklinin getirilerinin yeterince bilinmemesidir (Kadouri et al., 1997).

2.4. Biyoreaktörler (hayvan hücresi üretim sistemleri)

Biyoreaktörler hücre çevresindeki mikro ortamın optimum şartlarda tutulmasını sağlayan, biyokütle üretimi, ürün sentezi, biyo-dönüşüm ve biyo-parçalanma gibi amaçlar için kullanılan, tüm elemanları amaca göre tasarlanmış kapalı sistemlerdir. Biyoreaktörlerin kullanımı, hücre üremesini desteklemek için çalışma parametrelerinin kontrol edilmesini ve homojen bir fizikokimyasal çevrenin oluşturulmasını amaçlamaktadır. Biyoreaktörler bu görevlerini yerine getirebilmeleri için pH, T, CO_2 , optik dansite (OD), seviye (L) ve basınç (P) kontrolünü sağlayan çeşitli sensör ve kontrol sistemleri ile donatılmıştır. Hücre üretiminin yapıldığı biyoreaktör sistemleri için tasarım, işletme, ölçek büyütme, havalandırma vs. için birçok metodoloji geliştirilmiş ve uygulanmaktadır. Güncel çalışmalar hücre üretim proseslerinde verim artışı ve maliyetlerin düşürülmesi için uygun çalışma parametrelerinin tanımlanması ve geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır.

Biyoreaktörler uygun bir üreme ortamı sağlamalarının yanında, steril çalışmalar için aseptik koşulları da sağlayabilmesi gerekir. Bu nedenle cGMP'nin öngördüğü imalat detaylarına göre imal edilmiş olmalıdır. Biyoreaktörün temizliği yerinde (CIP) bu işlemin başarısı, paslanmaz çelikten imal edilmiş biyoreaktörlerde yüzey pürüzlülüğü (R_a : roughness average) ve biyoreaktörün tasarımı ile ilgilidir. Biyoreaktörün tasarımında ve ara bağlantı tesisatlarında ölü noktalar (dead leg) bulunmaması ve cGMP'nin öngördüğü 3D ve 6D kurallarına uyulması

kontaminasyonları minimize edecektir. Genel olarak yüzey pürüzlülük $R_a \leq 0.8 \mu m$ kabul görmesine rağmen daha düşük R_a değerleri yıkama süresini ve yıkamada kullanılan kimyasal miktarını azaltır. Biyoreaktörler yıkama sonrası yerinde sterilizasyon (SIP) işlemine tabi tutulurlar. Şekil 2.6'da örnek bir biyoreaktörün genel görünümü ve elemanları gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Örnek bir biyoreaktörün genel görünümü ve elemanları

Biyoreaktörleri homojen ve heterojen biyoreaktörler olarak sınıflandırmak mümkündür. Çizelge 2.1'de sistemin homojen olup olmamasına göre biyoreaktörlerin genel olarak sınıflandırılması gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Sistemin homojen olup olmamasına göre biyoreaktörlerin sınıflandırılması

Homojen Biyoreaktörler	Karıştırılmalı Biyoreaktörler (Stirred-tank bioreactors)
	Hava Kaldıraçlı Biyoreaktörler (Air lift loop reactors)
	Dalgalı Biyoreaktörler (Wave bioreactors)
	Vibro Karıştırılmalı Biyoreaktörler (vibromixing reactors)
Heterojen Biyoreaktörler	Dolgulu Yataklı Biyoreaktörler (Packed –bed reactors)
	Akışkan Yataklı Biyoreaktörler (Fluidized bed reactors)
	Hollow-fiber Biyoreaktörler (Hollow-fiber reactors)
	Yüzey bağımlı hücreler için diğer biyoreaktörler (Döner şişeler (rolling bottles), CellCube®, Cell Factory vs.)

Homojen biyoreaktörler

Bu biyoreaktörlerde hücreler besiyerinde süspanse olarak bulunur ve fizikokimyasal çevre rahatlıkla izlenerek kontrol edilebilir. Vibro-karıştırma sistemine sahip olan biyoreaktörler günümüzde endüstriyel hayvan hücre üretimi proseslerinde tercih edilmemektedir. Homojen biyoreaktörler içinde yaygın olarak kullanılan biyoreaktör tipi karıştırmalı biyoreaktörleridir (stirred tank reactors).

Karıştırmalı biyoreaktörler (STR : stirred tank reactors)

Hayvan hücre üretim proseslerine en uygun reaktör tipi olup günümüz modern endüstrisinde yaygın (yaklaşık %98) olarak kullanılmaktadır (Krahe, 2000). Karıştırmalı biyoreaktörlerde dönen bir şaft ve karıştırıcı bulunur. Genel olarak reaktör; karışımı sağlayan karıştırıcı (impeller), havalandırma sistemi (gas mix station, gaz karışım istasyonu), pH ve ÇO gibi kontrol sistemlerine sahiptir. Endüstride 20.000 L ve üzerinde hacme sahip karıştırmalı biyoreaktörler bulunmaktadır (Birch et al., 2006).

Biyoreaktörler üzerinde steril edilebilir sensörler bulunur ve on-line ölçüm, kontrol ve kayıt yapılabilir. PID kontrolörler veya diğer kontrol sistemleri kullanılarak ısıtma, soğutma, SIP, CIP, besiyeri, köpük kırıcı, baz ilaveleri otomatik kontrol vanaları yardımı ile yapılır. Sıcaklık takip ve kontrolünde genel olarak PT-100 sıcaklık sensörleri kullanılır. Isıtma ve soğutma eşanjörleri vasıtası ile yapılan sıcaklık kontrolünde hayvan hücre üretim prosesleri için $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ hassasiyetle kontrol yeterli kabul edilmektedir. Masaüstü biyoreaktörler camdan imal edilir ve alternatif ısıtma sistemlerine sahiptir. 10-3.000 L ve üzeri reaktörler AISI 316L çelikten imal edilirler ve ısıtma-soğutma ceketleri bulunur. Düşük karbonlu ($C \leq 0.03\%$) ostenitik paslanmaz çelikler biyoteknoloji uygulamalarında yaygın olarak kullanılır, ısı direnci ve korozyon direnci, kolay işlenebilirlik, mükemmel elektro-polisaj ve kaynak karakteristikleri tercih edilmelerinde başlıca etkenlerdir.

Biyoreaktörlerde kullanılan conta ve polimerler; sitotoksisite, hemoliz, pirojen ve dayanıklılık olarak USP klas VI, 3A veya güncel muadili standartlara uygun imal edilmiş olmalıdır. Biyoteknoloji uygulamalarında; temizlikte kullanılan asit ve alkali solüsyonlara dayanıklı, sterilizasyona uygun ($T=125-135^{\circ}\text{C}$), 65-75 shore sertliğinde, EPDM, PTFE, viton, silikon esaslı polimerler yaygın olarak

kullanılmaktadır. Biyoreaktörlerde aseptik vana olarak çeşitli alternatifler olmakla birlikte diyafram vanalar sıklıkla tercih edilmekte ve çok çeşitli tasarım imkanları ile ölü bölgeler minimize edilebilmektedir.

Biyoreaktörlerde gaz transferleri havalandırma sistemi ile yapılmaktadır. Bu sistemde biyoreaktöre beslenecek gaz karışımlarını kontrol eden gaz karışım istasyonu (gas mix station), biyoreaktöre giren-çıkan gazların steril edildiği 0.22 µm filtrasyon üniteleri ve gaz karışımının besiyerine ulaştırıldığı, genellikle karıştırıcı altına yerleştirilen “sparger” (hava dağıtıcı) adı verilen dairesel veya düz boru şeklindeki elemanlar kullanılır. Ortam homojenizasyonu; motor, mil ve karıştırıcıdan oluşan karıştırma sistemi ile yapılmaktadır. Günümüzde karıştırmalı biyoreaktörler BHK-21, CHO ve NS0 gibi hücre üretim proseslerinde kullanılmaktadır (Castilho et al., 2002).

Biyoreaktörlerde ölçek büyütme

Pilot ölçekte geliştirilen bir model için en önemli konu endüstriyel ölçeğe bu çalışmanın aktarılmasıdır. Ölçek büyütme; besiyeri hidrodinamiği ile homojeniteyi, oksijen aktarım hızı (OAH) ile havalandırmayı ve çözünmüş oksijeni (ÇO), pH, sıcaklık, kesme gerilmeleri ve köpük oluşumu gibi parametrelerle üreme ortamını değiştirdiği için hücre üremesi ile ilişkilidir. Bu nedenle ölçek büyütme metodolojisinde pilot ölçekten endüstriyel ölçeğe geçilirken sabit tutulacak parametrelerin tanımlanması, benzer mikro çevrenin sağlanması açısından en önemli konudur. Mükemmel bir ölçek büyütme işlemi imkansız olduğu için çeşitli ölçek büyütme stratejileri önerilmiştir. Ölçek büyütme için gerekli basamaklar; proses karakterizasyonu, model geliştirme ve proses optimizasyonudur. Geometrik boyutları sabit tutarak ve karıştırma gücü, yüzey hava hızı, sıcaklık, hidrostatik basınç ile hacimsel kütle transfer direnci (k_La), bulk çözeltide maksimum çözünmüş oksijen derişimi (C^*) ve maksimum oksijen aktarım hızı (OAH_{max}) kontrol edilebilir (Gonzalez-Saiz et al., 2009).

Optimum seviyede karıştırılan hücre üretim ortamında yeterli kütle transfer hızları sağlanırken, hücreye fiziksel olarak daha az zarar verilir. Ölçek büyütme çalışmalarında optimum karıştırma hızının (N) tespiti için genellikle yeterli veri bulmak mümkün olmadığı için kabullerden hareket edilir (Chalmers, 2000; Tremper

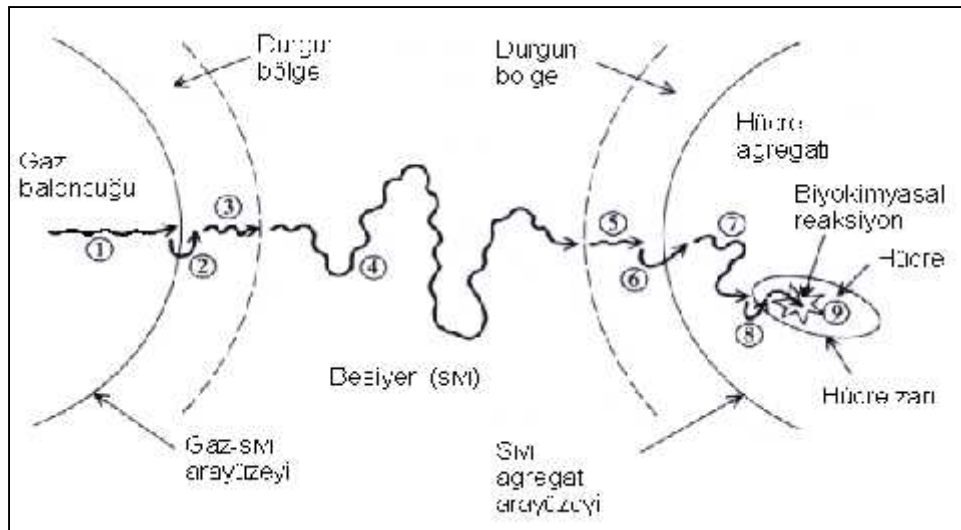
et al., 1996). Biyoreaktörlerinin ölçek büyütme işlemleri için karıştırıcı uç hızı (v), ortalama güç ihtiyacı, karıştırıcı Reynolds sayısı (Re_i) gibi birçok korelasyon temelli parametre önerilmiştir (Oh, 1989; Dodge, 1986; Lee, 1988). Ancak sadece bir parametreyi sabit tutarak ölçek büyütme mümkün değildir (Kossen, 1994). Karıştırıcının uç hızı kesme gerilmesi (shear stres) açısından önemlidir ve karıştırıcı uç hızının $v=1,5 \text{ m.s}^{-1}$ üzerindeki durumlarda hücre hasarlarının başladığı bildirilmiştir (Varley, 1999). Hoeks,(2004) büyük ölçeklerde bu karıştırıcı ucu hızının aşıldığını bildirmiştir. Amanullah (2003)'ün yaptığı çalışmada karıştırıcı ucu hızı artışına rağmen hücre üreme hızında artışlar tespit etmiştir. Bu nedenle karıştırıcı uç hızının anlamlı olup olmadığı tartışmalı bir konudur (Nienow, 2006).

Ölçek büyütme işleminde; biyoreaktör yüksekliği/biyoreaktör tank çapı (H/D_R), $k_L a$, maksimum kesme gerilmesi, karıştırma özgül gücü (güç/hacim; P/V), karıştırıcı uç hızı (v), yüzey gaz akış hızı, karışım zamanı (t_m), karıştırma hızı (N), karıştırıcı Reynolds sayısı (Re_i) parametreleri sabit tutulabilir (Ju et al.,1992).

2.5. Biyoreaktörlerde Havalandırma Sistemi

2.5.1. Temel kütle transfer kavramı

Besiyerine oksijenin yeterli transferi biyoreaktörler için en önemli tasarım ve çalışma parametresidir. Bu işlemin tanım ve analizi $k_L a$ ile yapılır. Biyoreaktör geometrisi, işletme karakteristiği, besiyeri bileşimi, son hücre sayısı (X), hücre morfolojisi hacimsel kütle transfer katsayısını ($k_L a$) etkileyen önemli faktörlerdir.



Şekil 2.7. Gaz-sıvı ve sıvı-hücre membranı arasındaki kütle transfer mekanizması

Şekil 2.7’de gaz-sıvı ve sıvı-hücre membranı arasındaki kütle transfer mekanizması gösterilmiştir. Bu mekanizma özetle; 1) Oksijenin baloncuğun içinden gaz-sıvı ara yüzeyine transferi, 2) Gaz-sıvı ara yüzeyini geçiş, 3) Hava baloncuğunu saran durgun film tabakasına difüzyon, 4) Yığına transfer, 5) Sıvı agregat yüzeyindeki durgun sıvı tabakasına difüzyon, 6) Sıvı-katı ara yüzeyini geçiş, 7) Katı-hücre membranına difüzyon, 8) Hücre membranından sitoplazmaya transfer, 9) Hücre sitoplazmasında transfer olarak gösterilebilir. Gazların besiyerinde çözünürlüğü Henry yasasına göre tanımlanır.

Oksijen aktarım hızı (OAH) eşitlik 2.12’de verilen formüle göre hesaplanabilir.

$$OAH = k_L a (C^* - C_L) \quad (2.12)$$

$k_L a$: Oksijen için toplam (hacimsel) kütle transfer katsayısı (sa^{-1})

k_L : Oksijenin gaz fazdan sıvı faza transfer katsayısı (m/sa)

a : Biyoreaktörün birim hacmindeki gaz-sıvı ara yüzey alanı (m^2/m^3)

C^* : Bulk çözeltide maksimum çözünmüş oksijen derişimi ($mol\ O_2.m^{-3}$)

C_L : Bulk çözeltideki çözünmüş oksijen derişimini ($mol\ O_2.m^{-3}$) göstermektedir.

Eşitlikten görüleceği üzere oksijen aktarım hızını (OAH) arttırmak için yüzey alanını, kütle transfer katsayısını veya sürücü kuvveti (derişim farkı) arttırmak gerekir. Biyoreaktör iç basıncını arttırmak çözünürlüğü arttıracğından iyi bir metot olarak düşünülebilir. Endüstriyel biyoreaktörler SIP işlemi yapıldığından dolayı 40 psi basınca dayanıklı olarak imal edilirler. Egzost filtre çıkışına konulacak oransal bir vana kontrolü ile basınç altında çalışma ile sürücü kuvvet 2-2.5 kat artırılabilir. Ancak bu sırada çözünmüş CO_2 derişiminin artacağı düşünülerek önlem alınmalıdır. Kullanılan havanın gaz karıştırma istasyonları yardımı ile saf oksijenle zenginleştirilmesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Burada derin havalandırma ile ÇO kontrolü ile çözünmüş CO_2 ’nin süpürülmesi arasındaki denge korunmalı ve pH kontrolü dikkate alınmalıdır.

$$x_A = \frac{P_A}{K_H} \quad (2.13)$$

x_A : mol çözünen A/mol çözücü

P_A : A’nın kısmi basıncı (atm)

K_H : Henry sabiti (atm/mol A/mol H_2O)

Eşitliğe göre K_H arttıkça çözünen miktar azalacak veya kısmi basınç arttıkça çözünen miktar artacaktır. Henry yasasına göre 25 °C'de karbondioksit için $K_H=29.7 \text{ atm.L.mol}^{-1}$ iken oksijen için $K_H=790.6 \text{ atm.L.mol}^{-1}$ olarak verilmektedir. Anlaşılabacağı üzere CO_2 'in besiyerindeki çözünürlüğü O_2 'ne göre yaklaşık olarak 26 kat daha fazladır.

Oksijen vektörlerinin kullanımı da (hidrokarbon ve florokarbon) karıştırma ve havalandırma için gerekli enerji tüketimini arttırmadan oksijen transfer verimliliğini arttırmak diğer bir yol olarak düşünülebilir (Galaction, 2004).

2.5.2. Sıvılarda oksijenin çözünürlüğü

Hücrelerin besiyeri içinde bulunan ÇO'ı tüketmeleri ve O_2 'nin besiyeri içinde düşük çözünürlüğü nedeni ile sürekli olarak gaz fazdan sıvı faza oksijen transfer edilmesi gerekir. Sabit basınçta oksijenin sıvıya aktarım hızı; karıştırma hızı (N), sıvı-gaz ara yüzey alanı (a), oksijen transfer katsayısı (k_L), gaz akış debisi, karışım gazlarının % oranları, sıcaklık ve tuzluluk gibi parametrelere bağlıdır.

Besiyeri içinde ÇO miktarı (mg/L veya mM), genellikle hava ile doymunluğa getirilmiş besiyeri ortamındaki ÇO miktarına oranı ile eşitlik 2.14'teki gibi gösterilir.

$$\% \text{ÇO} = \left(\frac{C_L}{C^*} \right) * 100 \quad (2.14)$$

Yukarıdaki eşitlikte C_L : ÇO derişimini, C^* : hava ile doymunluğa (%21 O_2) getirilen besiyerindeki ÇO miktarını göstermektedir. Oksijenin sıvılardaki çözünürlüğü basınç ve sıcaklıkla değişmektedir. Enjeksiyonluk su; 1 atm basınç ve 37 °C'de yaklaşık 6.9 mg O_2/L 'da doymunluğa (C^*) ulaşır. Besiyerlerinde O_2 'nin çözünürlüğü diğer çözünen maddelerden (tuz, glikoz vs.) dolayı suya göre daha düşüktür. Lavary ve Nienow (1987), 35 L biyoreaktörde oksijenin çözünürlüğünü 37°C'de 0.18 mM $\text{O}_2.\text{L}^{-1}$ (5.76 mg $\text{O}_2.\text{L}^{-1}$) olarak hesaplamıştır. Literatürdeki bir çalışmada besiyerinde oksijen çözünürlüğünün suya göre %10 daha düşük olduğu diğer bir çalışmada ise tipik besiyerlerinde O_2 'nin çözünürlüğünün suya göre %5-25 düşük olduğu bildirilmiştir (Doran, 1995, 2006). Yapılan çalışmada 6M besiyerinde, çözünen oksijen miktarının DEI suya göre %5 daha az olduğu tespit edilmiştir.

Oksijen tüketim hızı (OTH) ve özgül oksijen tüketim hızı (q_{O_2}); hücre hattı, hücrenin üreme evresi ve besiyeri ortamının glikoz ve glutamin derişimlerine bağlı

olarak değişim gösterir. Hayvan hücrelerinin ortalama özgül oksijen tüketim hızı $q_{O_2}=2*10^{-10}$ mmolO₂ hücre⁻¹.sa⁻¹ (Ruffieux, 1998; Henzler et al., 1993; Varley, 1999; Doyle et al., 1998), BHK-21 hücreleri için $q_{O_2}=2*10^{-10}$ mmol O₂ hücre⁻¹.sa⁻¹ Radlett (1972) olarak bildirilmiştir (Doyle et al., 1998). Biyoproseste belirli bir evrede oksijen tüketim hızı (OTH) ile son hücre sayısı (X) arasında proses kontrolü amacıyla doğrudan ilişki kurulabilmektedir. Özgül oksijen tüketim hızı (q_{O_2}), hücre sayısının, $X=1-20*10^6$ hücre/mL olduğu aralıkta hücre derişiminden etkilenmemektedir. Özgül oksijen tüketim hızı (q_{O_2}), ile sıcaklık (T) ilişkisini eşitlik 2.15'teki Arrhenius formülü ile ifade edilebilir;

$$q_{O_2} = q_{oO_2} * e^{-E/RT} \quad (2.15)$$

Burada;

q_{oO_2} : 0.61 pmol/hücre/sa (BHK hücresi için)

E : 79 kJ/mol Aktivasyon enerjisi (BHK hücresi için)

R : 8.3145 J/(mol K) (İdeal gaz sabiti)

T : Sıcaklık (°C)

Yapılan bir çalışmada, besiyeri sıcaklığının (T) 1°C düşürülmesinin, q_{O_2} 'de %10 düşüşe neden olduğu gözlenmiştir (Jordani et al., 1999).

Eşitlik 2.16 ve 2.17 oksijen tüketim hızı (OTH) ve oksijen aktarım hızının (OAH) hesaplanması için kesikli olarak çalışan biyoreaktör içinde oksijen için anlık kütle denkliklerini göstermektedir.

$$\frac{dC}{dt} = OAH - OTH \quad (2.16)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_L a^* (C^* - C_L) - q_{O_2} * X \quad (2.17)$$

Bu eşitliklerde;

OTH : Oksijen tüketim hızı (mM.sa⁻¹),

OAH : Oksijen aktarım hızı (mM.sa⁻¹),

q_{O_2} : Özgül oksijen tüketim hızı (mmol O₂.hücre⁻¹.sa⁻¹),

X : Hücre sayısı (hücre/mL),

t : Zamanı (sa) göstermektedir.

2.5.3. Biyoreaktörlerin havalandırılmasında güncel sistemler

a) Sparger (hava dağıtıcı) ile havalandırma

Günümüzde biyoreaktörlerde en çok çalışılan konulardan birisi de, hücreleri strese maruz bırakmadan yeterli çözünmüş oksijenin (ÇO) sağlanmasıdır. Özellikle yüksek hücre derişimlerinde ÇO kontrolü daha kritik bir konu olmaktadır. Ortamda ÇO kontrolü havalandırma sistemi ile gerçekleştirilir. Besiyerinin havalandırmasında genellikle uygun çaplarda delikleri bulunan spargerlar kullanılmaktadır. Hava ve saf oksijen ihtiyaca göre belirli oranlarda karıştırılır, gaz karışımı filtrelerden geçirilip sterilize edilerek spargera gönderilir. Sparger ile havalandırma biyoreaktör sistemlerinde en basit, güvenilir, yaygın olarak kullanılan boru veya halka şeklideki sistemlerdir. Havalandırma simidinin alt kısmında belirli aralıklarla delikler bulunmaktadır. Deliklerin alt kısımda olmasının nedeni, kabarcıkların daha geç yüzeye çıkması ve böylece alıkonma süresinin (residence time) arttırılarak gaz-sıvı temasının arttırılmasıdır.

OAH; sparger ölçüsü, tipi, çalışma parametreleri, yüzey gaz akış hızı, karıştırma hızı (N), besiyerinin viskozitesi, yüzey gerilimi ve yoğunluğundan etkilenmektedir. Kabarcık çapı küçüldükçe toplam yüzey alanı artmakta ve OAH artmaktadır. Kabarcıkların birleşmesi yüzey alanını azalttığı için istenen bir durum değildir. Hibridoma hücrelerinin üretiminde kullanılan 300 L hacimli bir biyoreaktörde yapılan çalışmada mikro-sparger ($\varnothing$ 180-200 μ m) ve makrospargerin etkileri ($\varnothing$ =1 mm) denenmiş ve özellikle köpürme problemlerinin engellenmesinden dolayı makrosparger kullanımının faydalı olduğu bildirilmiştir (Chisti, 1993).

Biyoreaktörün içine verilen gaz miktarı rotametre veya termal kütle akış kontrol cihazları (termal mass flow controller) ile ölçülür. Rotametrelerde silindirik bir tüpün içersinde konik bir yapı ve askıda kalan bir şamandıra vardır. Koniklik derecesi kapasiteye göre değişir. Düşük akış hızlarında şamandıra olarak plastik gibi düşük yoğunlukta malzeme kullanılır. Rotametre akış değerleri sıcaklık ve basınçtan etkilenir ve genelde elle kontrol için kullanılır. Termal kütle akış kontrol cihazları sıcaklık farkı esasına göre çalışır, gaz debisi otomatik olarak ölçülerek kontrol edilir. Bu cihazlarda akışkan ısıtılır, ısıtıcı öncesi ve sonrası sıcaklık farkından toplam akış hızı hesaplanır; akış değerleri sıcaklık ve basınçtan etkilenmez.

b) Yüzey havalandırması

Biyoreaktörün üst kısmındaki boşluktan gaz geçirilmesi olarak tanımlanan yüzey havalandırması, 100 L hacme kadar olan küçük ölçekli biyoreaktörlerde ve düşük yoğunluktaki hücre üretimlerinde ÇO ve pH'ın kontrolü için kullanılabilir. Ölçek büyütme ile değişen yüzey alanı/hacim oranı yüzey havalandırması ile elde edilen OAH'yi azaltmaktadır. Bu nedenle büyük ölçekli biyoreaktörlerde mutlaka derin havalandırma yapılması gereklidir. Sabit karıştırma hızı (N) ile yapılan çalışmalarda toplam OAH içindeki yüzey havalandırma katkısı da ($OAH_{yüzey}$) sabit olacaktır. Eşitlik 2.18'den $OAH_{yüzey}$ aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

$$OAH_{yüzey} = k_L a_{(yüzey)} (C^* - C_L) \quad (2.18)$$

$$k_L a_{(yüzey)} = k_L \cdot (yüzey \text{ alanı}) / (hacim) \quad (2.19)$$

Bu eşitliklerde;

$$C^* = pO_2 / K_H$$

$OAH_{yüzey}$: Yüzey oksijen transfer hızı ($mM \cdot sa^{-1}$)

$k_L a_{(yüzey)}$: Yüzey hacimsel kütle transfer katsayısı (sa^{-1})

a : Özgül kütle transfer yüzey alanı (m^2/m^3)

pO_2 : Oksijenin kısmi basıncı (mmHg)

K_H : Oksijen için Henry sabiti (37°C'de saf su, $K_H = 952.27 \text{ atm} \cdot L/mol$)'dır.

Literatürde yüzeye yakın karıştırıcı kullanılarak OAH'de 4 kat artış sağlanabildiği bildirilmiştir (Hu et al., 1986). Yüzeye verilen hava karışımında oksijen derişiminin artırılması ile de $OAH_{yüzey}$ artırılabilir. Hayvan hücre kültür başlangıcında yüzey havalandırmasında CO_2 kullanılarak pH'ın düşürülmesi sağlanabilmekte böylece derin havalandırmanın olası zararları önlenmektedir.

c) Membran havalandırma

Son yıllarda membran havalandırma sistemleri de kullanılmaya başlanmıştır. Membranlar genel olarak mikro-delikli veya difüzyon esaslı olarak iki tipte sınıflandırılmaktadır. Mikro-delikli membranlarda besiyeri mikro-kabarcıklar ile doğrudan temasta olup sıvı ve gaz yüzeyi hidrofobik kuvvetler ve basınç ile dengelenmektedir. Difüzyon esasına göre çalışan membranlarda oksijen difüzyon hızı yüksek olup gaz fazdaki oksijen membrana difüze olarak besiyerine geçer.

Kullanılan membran genelde silikon esaslı olup hollow fiber membranlar uygulamada öne çıkmaktadır (Aunins et al., 1993). Laboratuvar ölçeğindeki biyoreaktörlerde yeterli debi ve gaz basıncında membran sistemler kullanılarak spargerlerden elde edilen miktarda OAH'a ulaşılabilir. Membran havalandırma sistemlerinin 10-500 L hacimlerde ve hassas hücreler ile çalışmaya uygun olduğu literatürde bildirilmiştir (Aunins et al., 1993). İşletme prosesinin karmaşık olması, temizlik ve sterilizasyon sorunları nedeniyle endüstriyel üretimde bu yöntemin kullanımı azdır.

2.5.4. Havalandırma sisteminden kaynaklanan hücre hasarları

Havalandırma ile oluşan kabarcıklar besiyerinde yukarı hareket ederken hücreler membranlarındaki zayıf hidrofobik özellik nedeniyle yükselen kabarcıklara tutunur ve sıvı yüzeyinde baloncunun patlaması ile hasar görürler. Havalandırma sistemlerinin amacı uygun bir sparger tasarımı ile en az hücre hasarıyla en fazla OAH elde etmektir. Havalandırma sistemlerinde kabarcık çapı ve havalandırma oranı ($V_{\text{gaz}}/V_{\text{reaktör}}$) bu nedenle çok önemlidir. Derin havalandırma sistemlerinin süspanse hücre üretim proseslerinde hücre hasarlarına önemli oranda etkisi vardır. Biyoreaktörlerde kullanılan gaz debisinin artmasına paralel olarak hasar gören hücre sayısı da artmaktadır. $V_{\text{gaz}}/V_{\text{reaktör}} \geq 0.1$ vvm olduğunda köpük oluşumu ve hücre hasarları gibi sorunlar önemli oranda artış göstermektedir (Öztürk et al., 1996). Şekil 2.8'de havalandırma oranının, kesikli üretim yönteminde *S.frugiperda* Sf9 hücrelerinin özgül üreme hızına etkisi gösterilmektedir. $V_{\text{gaz}}/V_{\text{reaktör}} > 0.04$ olduğunda özgül üreme hızında (μ) ani düşüş olmaktadır. Havalandırma kaynaklı hücre hasarları birinci dereceden kinetik ile ifade edilebilir (Tramper et al., 1988).

$$\frac{dX}{dt} = -k_d \cdot X \quad (2.20)$$

$$k_d = 4 F \cdot X' / (\pi D_R^2 H) \quad (2.21)$$

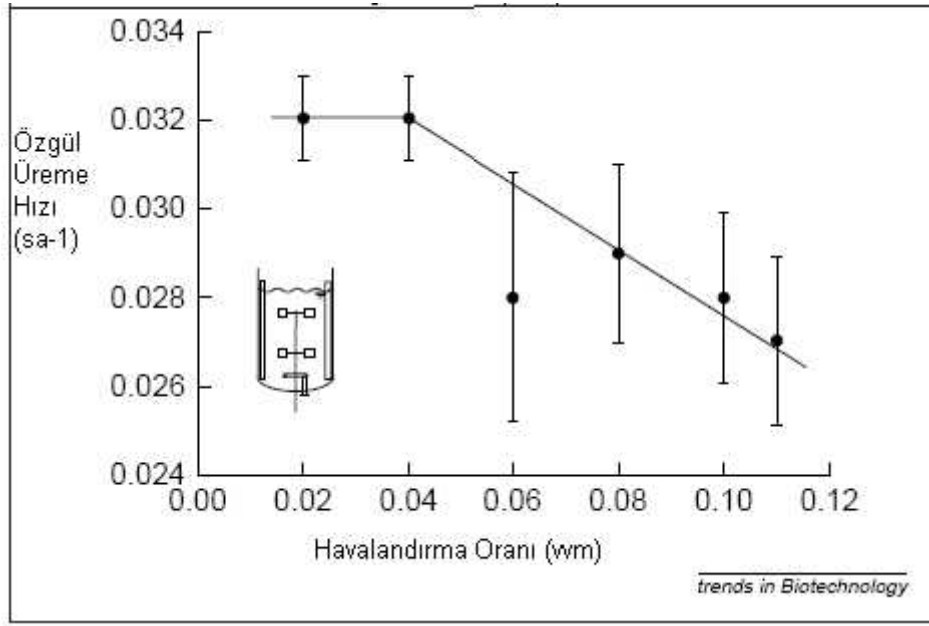
Burada;

F : Hava akış hızı ($\text{m}^3 \cdot \text{sa}^{-1}$)

X' : Hipotetik ölüm hacmi ($2 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-2}$ arasındadır)

D_R : Biyoreaktör çapı (m)

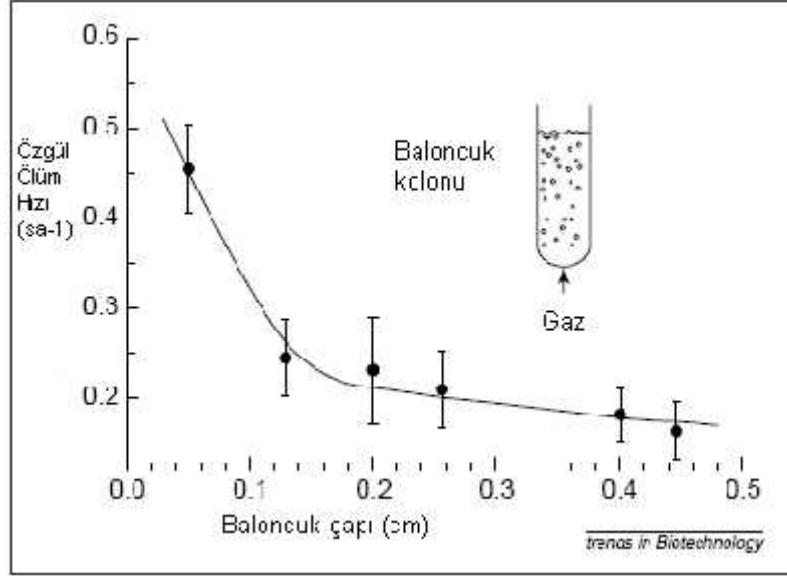
H : Biyoreaktör yüksekliği (m)



Şekil 2.8. Havalandırma oranının, kesikli üretim metodunda serumsuz besiyerinde *S.frugiperda Sf9* hücresinin özgül üreme hızına etkisi (Yusuf Chisti, 2000).

Söz konusu eşitlik farklı hücre hatları ve kabarcık çapları için doğrulanmıştır. Yüksek $V_{\text{gaz}}/V_{\text{reaktör}}$ oranlarında hücrelerin patlaması sonucu tespit edilememeleri nedeniyle ölü hücre sayısının düşük değerlerde gözlemlendiği bildirilmiştir. Literatürde hayvan hücre üretim proseslerinde mikro-kabarcıklar yerine makro-kabarcık kullanımının daha uygun olduğu bildirilmiştir (Christi, 1993). 3 μm , 20 μm ve 100 μm gözenek çaplı mikro-spargerlar kullanılarak yapılan çalışmalarda yalnızca 100 μm 'lik spargerların hayvan hücrelerinde kullanımının uygun olduğu gösterilmiştir. Mikro-sparger kullanımı ile OAH artarak havalandırma oranı ve yüzeysel gaz hızı düşmekte; fakat köpük oluşumu, hücre hasarları ve çözünmüş CO_2 derişimi artışı ortaya çıkmaktadır. 0.5 mm çaplı delikleri bulunan makrospargerlerde yapılan çalışmalar ise başarılı olmuştur (Fenge et al., 1993). Makrosparging ile 6-8 mm çapında kabarcıklar kullanılması ile köpük oluşumu minimize edilirken, havalandırma kaynaklı hücre ölümleri de azaltılmıştır (Orton et al., 1991). Bu nedenle hücre hasarlarını azaltmak, iyi bir OAH sağlamak ve ortamda biriken CO_2 'nin süpürülmesi için kabarcık çapı optimize edilmelidir (Gray et al., 1996).

Şekil 2.9'da kabarcık kolonunda 10 mL.dk^{-1} havalandırma yapıldığında, kabarcık çapı ile *S. frugiperda Sf9* hücrelerinin özgül ölüm hızına (k_d) ait eğri görülmektedir.



Şekil 2.9. Kabarcık çapının, (kabarcık kolonu 10 mL.dk^{-1} akış hızında havalandırılırken *S. frugiperda* hücrelerinin özgül ölüm hızına etkisi, Yusuf Chisti, 2000).

Burada havalandırma sisteminde üretilen kabarcık çaplarının $\varnothing < 2 \text{ mm}$ olması durumunda hücrelerin daha fazla zarar gördüğü ve k_d 'nin ani artışı açıkça gösterilmiştir. Sabit havalandırma oranında küçük kabarcıkların patlarken yaydığı enerji ve hücreye verdiği zarar, büyük kabarcıkların yaydığı enerjiden fazladır. 0.77 mm, 1.70 mm ve 6.32 mm çaplarındaki kabarcıkların ortaya çıkardığı enerji miktarları $9.52 \times 10^7 \text{ W.m}^{-3}$, $1.66 \times 10^6 \text{ W.m}^{-3}$ ve $9.40 \times 10^4 \text{ W.m}^{-3}$ olarak hesaplanmıştır. Bu hücrelerin zarar görmesi için açığa çıkan enerjinin $5.81 \times 10^2 \text{ W.m}^{-3}$ olmasının yeterli olduğu bildirilmiştir (Chisti, 2000).

Literatürde maksimum OAH elde edilmesi, CO_2 'in uzaklaştırılması ve en az hücre hasarı amacıyla kabarcık çapı optimize edildiğinde 2-3 mm çaplı kabarcıkların en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir (Gray et al., 1996). Ancak ihtiyaca göre farklı tercihlerde yapılmaktadır. Örneğin endüstriyel hibridoma üretim proseslerinde 10-20 mm kabarcık çaplarının tercih edildiği bildirilmiştir (Chisti, 1993; Handa et al., 1987). Deneysel bir çalışmada 3.5 mm çaplı bir baloncuğun patlaması ile ortalama 1.050 hücrenin hasar gördüğü gösterilmiştir (Trinh et al., 1994). Küçük kabarcıkların neden olduğu hasarlar normal bir karıştırmadan kaynaklı hasarlara göre 3-4 kat hücre hasarına neden olmaktadır (Molle, 2004; Garcia, 1994; Boulton et al., 1993).

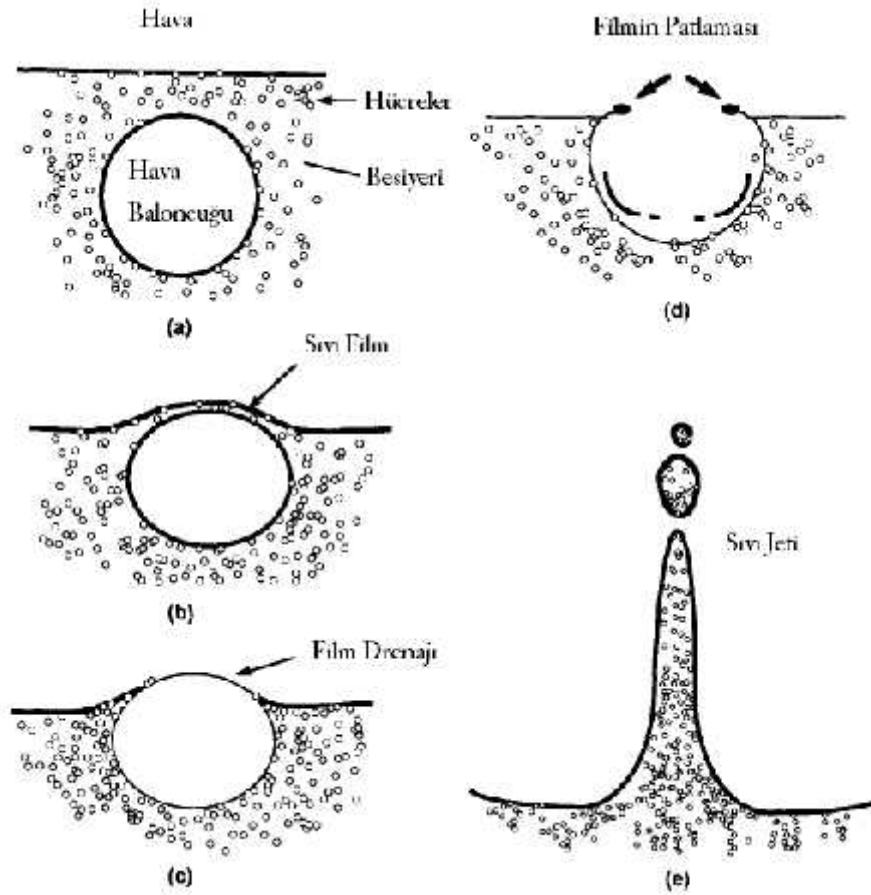
Biyoreaktör yüksekliğinin artırılması ile kabarcıkların alıkonma süresi, hidrostatik basınç ve kütle transferlerinde artış olmakta böylece kullanılan toplam gaz miktarlarında ve hücre ölüm hızlarında düşüşler gözlenmektedir.

Biyoreaktör içine hava verildikten sonra hava kabarcıklarının birleşmesi veya bölünmesinin hücre üzerine önemli bir zararı tespit edilememiştir. Gaz debisi (sparger kesit alanı hesabı ile) ve gazın çıkış hızı arasındaki ilişki incelenmiş, 0.6 m/s ile 2.5 m/s hızlar arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir.

Besiyeri bileşiminde bulunan yüzey aktif maddeler ve proteinler sıvının reolojik özelliklerini ve yüzey gerilimini etkileyerek daha stabil köpük tabakası oluşturduğundan dolayı hücre drenajı için yeterli süre sağlanmış olur (Papoutsakis, 1991; Michaels, 1995). Kabarcık büyüklüğü ve üretilme frekansı, baloncuğun yüzeye çıkış hızı, film kalınlığı, besiyeri kompozisyonu ve viskozitesi, koruyucu kimyasallar, havalandırma rejimi gibi etkenler ortaya çıkacak kesme gerilmelerinin şiddetini etkilemektedir.

Havalandırma sırasında muhtemel hücre hasar noktaları; spargerda kabarcık oluşumu, karıştırıcının oluşturduğu girdaplar, baloncuğun yukarı hareketi, kabarcığın besiyeri-hava yüzeyinde patlama yerleri olarak sayılabilir. Hücrenin besiyeri-hava yüzeyinde patlama anı, hücre hasarlarından büyük oranda sorumludur. Literatürde video mikroskop sistemi ile hücrelerin besiyeri yüzeyinde drenajı ve yüzey deformasyonları tespit edilmiştir (Handa et al., 1989).

Kabarcıkların sebep olduğu hasarlar basit olarak Şekil 2.10'da gösterildiği şekilde açıklanabilir. Kabarcık yüzeye doğru hareket eder ve sıvı yüzeyine ulaştığında yarım küre şeklini alırken aynı anda kabarcık filmi yerçekimi ile direne olmaktadır. Film kalınlığı $<0.1 \mu\text{m}$ olduğunda kabarcık üzerinde bir delik oluşur ve kabarcık iç basıncı hızlı şekilde düşer ve oluşan kraterde ortalama hızı 1-50 m/s gibi oldukça yüksek hızlarda bir akış ortaya çıkar. Eğer patlayan kabarcık küçükse açığa çıkacak enerji daha yüksektir ve krater ucundan bir damla kopar. Damlacığın kraterden ayrılması sırasında oluşan ve baloncuğun patlaması sırasında damlacık kenarında oluşan kesme gerilmeleri hücrelere hasar verir. Kesme gerilmelerinin büyüklüğü viskozite ve kabarcık çapı ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle hücre



Şekil 2.10. Besiyerinde kabarcık patlamasının ana basamakları a) Baloncukun yüzeye hareketi, b) Gaz sıvı ara yüzeyinde film tabakasının oluşumu, c) Film tabakasının drenajı, d) Filmin patlaması ve yüzey genişleme ve daralması, e) Yüksek hızlı sıvı jeti oluşumu (Michaels, et al., 1995).

üretim çalışmalarının, sıvı-gaz kütle transferinin iyi olduğu ve hücrelerin en az zarar gördüğü kabarcık çapları kullanılarak yapılması gerekir. Tüm bu bilgilere rağmen biyoreaktörde hücrelerin maruz kaldığı havalandırma, karıştırma kaynaklı etkiler literatürde yeterince açıklanmış değildir (Ma et al., 2005).

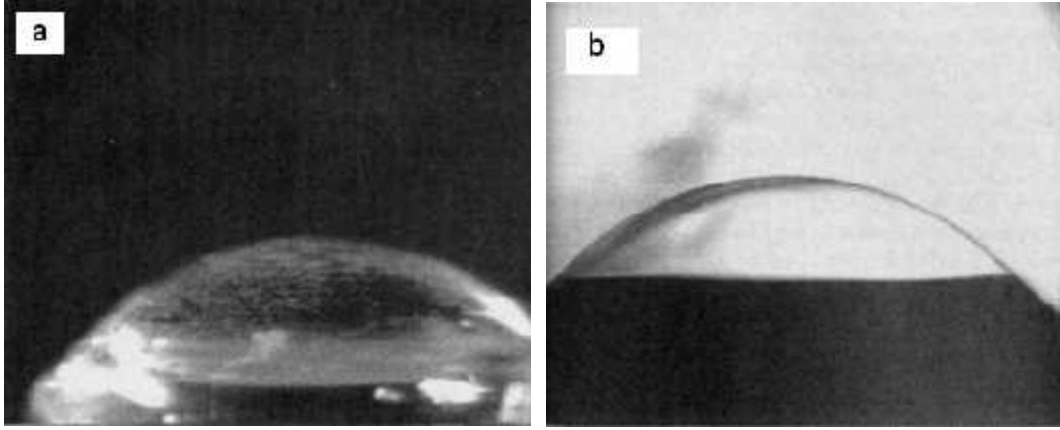
2.5.5. Katkı maddeleri kullanılarak hücre hasarlarının önlenmesi

Besiyeri ortamı ile kabarcık mikro tabakası kimyasal kompozisyon açısından farklılık göstermektedir. Hücresel bileşenler dahil hidrofobik maddeler bu kabarcık mikro tabakasında toplanmaktadırlar. Endüstriyel uygulamalarda hücre hasarlarını önlemek için Pluronik® F68 gibi katkı maddeleri kullanılmaktadır.

Katkı maddelerinin hücre hasarını önleme mekanizmaları ile ilgili olarak; hücrelerin baloncuka tutunmalarını önleyici etkileri, yüzey aktif özelliklerinden dolayı yüzey

gerilimini azaltmaları böylece patlama enerjisini düşürmeleri ve fiziksel olarak hücre membranlarını kuvvetlendirici etkileri olduğu düşünülmektedir (Jordan et al., 1994). Garcia-Briones ve arkadaşları, 1991’de yaptıkları çalışma ile Şekil 2.11’de görülen fotoğraflarda da görüldüğü gibi Pluronik® F68 kullanılmadığında kabarcık üzerinde çok sayıda hücre bulunmasına rağmen Pluronik® F68 kullanıldığında kabarcık üzerinde neredeyse hücre bulunmadığını göstermişlerdir (Ma et al., 2005).

Karıştırma hızı (N) ve girdaplardan kaynaklanan hidrodinamik etkiler hibridoma hücreleri membranında bulunan antijen reseptör sayılarında değişiklikler ortaya çıkarmaktadır. Pluronik® F68 kullanımı ile karıştırma hızı kaynaklı olumsuz reseptör etkileri de azaltılmaktadır.



Şekil 2.11. a) Sıvı-gaz ara yüzeyinde yüzey aktif polimer kullanılmadığında görülen hücreler (beyaz noktacıklar; $X > 1000$ hücre/ mL), b) Pluronik® F68 kullanımında kabarcık üzerinde hücre görülmemektedir (Ma et al., 2005).

Katkı maddelerinin hücre membranının akışkanlığını azaltarak daha rijit membran oluşumunu sağladığı böylece kesme gerilmelerine dayanımını artırdığı bildirilmiştir (Ramirez et al., 1990). Hibridoma hücreleri ile yapılan çalışmalarda Pluronik® F68 ve serum varlığında hücre membranlarının patlama gerilmelerinin arttığı görülmüştür (Zhang et al., 1992). Katkı maddelerinin kullanılmasının faydaları yanında sıvı-gaz transfer direncinde artışa neden olarak OAH’yi düşürmeleri gibi sakıncaları da söz konusudur. 1000 L biyoreaktör ile yapılan bir çalışmada köpük kırıcı kullanımı ve yüksek çözünmüş CO_2 derişimi nedeni ile k_La ’da %25 düşüş tespit edilmiştir. Benzer şekilde Pluronik® F68’in de k_La ’yı önemli miktarda düşürdüğü bildirilmiştir. Pluronik® F68’in tripan mavisinin hücre zarından geçişini ve hücrenin boyanmasını engellemesi ile gerçek canlılık değerine göre %12

yüksek canlılık hesaplanmıştır (Murhammer et al., 1988). Katkı maddeleri belirli oranlardan sonra toksik etki gösterdikleri için uygulanacak derişimler çok önemlidir (Pol et al., 1998). Hücreleri kabarcıkların olumsuz etkilerinden korumak için viskoziteyi arttırıcı ajanlar da kullanılmaktadır. Bu katkılar kabarcıkların alıkonma süresini arttırarak hücre hasarlarını azaltır böylece düşen özgül ölüm hızı (k_d) ile son hücre sayısı (X) artar, ancak artan viskozite ile oksijen aktarım hızı (OAH) düşebilir.

Biyoproses sırasında oluşan stabil köpük tabakası hücrelerin kabarcık üzerinden drenajı için yeterli süre sağlayarak hücre hasarlarını azaltır ve canlılık köpüksüz çalışmalara göre daha yüksek oranda gözlenir. Böylece baloncuğun patlaması ile ortaya çıkan kesme gerilmelerinden daha az sayıda hücre etkilenir. Katkı maddeleri kullanılmadığında baloncuğun patlaması sırasında yüzeye yakın noktadaki hücre derişimi besiyeri hücre derişiminin iki katına yakındır. Halbuki Pluronik® F68 kullanıldığında bu durum gözlenmemektedir (Michaels et al., 1995).

2.6. Çözünmüş Oksijen (ÇO) ve Hayvan Hücre Kültürleri

Glikoz birçok organizma için ana karbon ve enerji kaynağıdır. Glikoz metabolizması organizmadan organizmaya farklılık gösterebilmektedir. Ancak birçok organizma için geçerli olan yol glikozun glikoliz ile parçalanmasıdır. Glikoz gibi organik bileşiklerin aerobik katabolizma ile parçalanması için glikoliz, Krebs Çevrimi (TCA veya sitrik asit çevrimi) ve oksidatif fosforilasyon olmak üzere 3 aşama geçirmesi gerekir. Son evre solunum olarak adlandırılır ve biyolojik olarak faydalı enerji olan ATP'nin elde edildiği fazdır. Solunum son elektronun nereden alındığına bağlı olarak aerobik veya anaerobik olabilir. Eğer son elektron alıcısı oksijen ise solunum aerobik, değilse anaerobik solunum olarak isimlendirilir. Aerobik solunum ile 1 mol glikozdan net 38 mol ATP elde edilirken, anaerobik solunumdan net 2 mol ATP elde edilir.

a) Çözünmüş oksijenin özgül üreme hızına etkisi

Hücre üremesi ve ikincil metabolit üretimleri açısından optimum çözünmüş oksijen (ÇO) derişimleri hücre hatlarına göre farklılıklar göstermektedir. Hayvan hücrelerinin optimum özgül üreme hızları (μ) için farklı ve çelişkili ÇO derişimleri bildirilmiş, hayvan hücrelerinin anaerobik ortamda bile ürediği ileri sürülmüştür

(Brosemer et al., 1961). Hayvan hücre üretimi biyoproseslerinde, 37°C'de, sitoplazmadaki kritik ÇO değeri ÇO=%1-2 olarak saptanmış ve *Lymphoblastoid* hücreleri ile yapılan çalışmalarda %100 ÇO 'de en yüksek özgül üreme hızı (μ) değeri elde edildiği bildirilmiştir (Mizrahi, 1984). Boraston (1984), maksimum hücre derişimi elde ettikleri ÇO değeri olarak %8 ve Miller (1987), %0.5 olarak belirtmişlerdir (Öztürk et al., 1990). Kesikli üretim prosesleri ile yapılan çalışmalarda optimum ÇO=40-100 mmHg (%5-13) olarak saptanmış ve ÇO=320 mmHg'nin (%43) μ 'yü son derece olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Kilburn et al., 1968). Hücrelerin zamanla %150 ÇO değerinde adapte oldukları bildirilmişse de gözlenen μ değerleri düşüktür. CHO hücrelerinin ÇO %380 gibi yüksek değerlere adapte olabildiğini bildirilmiştir (Valk et al., 1985). Yüksek ÇO seviyeleri hücrede metabolizmanın anaerobik yola kaymasına neden olmaktadır. Bunun nedeni glikoliz ile arttırılan ve TCA çevrimi ile azaltılan glikoz akışıdır (Jan et al., 1997).

ÇO'nin %10'un altındaki ve %80'in üzerindeki derişimlerinde özgül ölüm hızında (k_d) ani artışlar ve özgül üreme hızında (μ)'de ani düşüşler gözlenmiş, anaerobik çalışma koşullarının hücre üremesini olumsuz etkilediği ve μ 'yü düşürdüğü tespit edilmiştir (MacMicheal et al., 1989). Hücreler düşük ÇO derişimlerinde canlılıklarını sürdürmüşler, hatta canlılık oranı daha yüksek gözlenmiştir. Bu durum düşük ÇO derişimlerinde hücrelerin toksik etkilere ve hücre membranlarının oksidasyona maruz kalmaması ile açıklanmıştır (Glacken et al., 1989). Yüksek ÇO derişimlerinin süper-oksit radikalleri oluşturarak besiyeri bileşenlerini okside ettiği düşünülmektedir. Yüksek ÇO derişimlerinde μ 'de artış olmamasına karşılık glikoz tüketimindeki artış hücrelerin oksidatif hasarları gidermek için daha çok enerji harcaması ile açıklanabilir. Alkali ortamlarda yüksek ÇO derişimleri hücrelerde toksik etkiler oluşturmaktadır (Hu, 2007). %100 ÇO derişimlerinde hücrenin antioksidan enzimler, glutathione peroxidase (x18), glutathione S-transferaz (x11) ve superoxide dismutase (x6) oranlarında artış gözlenmiştir (Jan et al., 1997).

b) Çözünmüş oksijenin hücre solunumu ve enerji metabolizmasına etkisi

Çözünmüş oksijen (ÇO) derişimindeki değişim ile hücre metabolik faaliyetlerinde de değişimler gözlenmektedir. Hibridoma hücresi (167.4G5.3) için metabolik faaliyetler ÇO=%5-%78 arasında oldukça kararlı iken bu aralıklar dışında (ÇO<%5

ve >100) metabolik oranlarında (glikoz, laktat, amonyum, glutamin ve amino asit) değişimler ve μ 'de düşüşler gözlenmiştir (Öztürk et al., 1990).

Kesikli üretim yöntemi kullanılarak hibridoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada μ açısından optimum $\dot{V}O_2$ derişim aralığı $\%30-60$ olarak bildirilmiştir. Mitokondriyel aktivitelerin düşük $<\%10$ $\dot{V}O_2$ değerlerinden olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. Bu değerler dışındaki aralıklarda glikoz ve glutaminin özgül tüketim miktarlarında değişimler gözlenmiştir. ATP üretim miktarını, serum ve $\dot{V}O_2$ miktarı değiştirmemekte ancak artan pH ile ATP üretimi artmaktadır (Öztürk et al., 1990).

Benzer şekilde anaerobik koşullarda ($\dot{V}O_2 \approx 0$) aminoasit metabolizmalarının birkaç kat arttığı bildirilmiştir (Öztürk et al., 1990). Yüksek $\dot{V}O_2$ değerlerinde besiyeri içindeki aminoasitlerin zarar görüp görmediği ile ilgili yapılan çalışmada saf O_2 ($\dot{V}O_2$ $\%496$, saf O_2) ile yapılan havalandırma öncesi ve sonrasında gerçekleştirilen analizlerde fark tespit edilememiştir. Sürekli üretim yönteminde yüksek ($\%250$) $\dot{V}O_2$ 'nin hücre üremesini inhibe ettiği görülmüş, $\dot{V}O_2$ seviyesi normal değere indirildiğinde hücreler tekrar üremeye başlamış kalıcı bir etki izlenmemiştir (Jan et al., 1997).

$\dot{V}O_2$ 'nin değişmesi ile $Y_{lak/gli}$ oranı değişiklikler göstermektedir. Özgül glikoz tüketim hızı (q_{gli}) ve özgül laktat oluşum hızı (q_{lak}) $\dot{V}O_2$ $\%10$ seviyesi altında artmaktadır. Glikoz tüketiminin düşük $\dot{V}O_2$ derişimlerinde artması mikrobiyal ve hayvan hücre üretimi yapılan biyoproseslerde Pastör etkisi olarak bilinmektedir. Mouse LS hücrelerinin anaerobik şartlara maruz bırakılması ile besiyeri laktat derişiminde ani artışlar tespit edilmiştir (Kilburn et al., 1968). Düşük $\dot{V}O_2$ derişimlerinde oksidatif fosforilasyon sınırlanır ve hücreler glikoliz yoluyla enerji üretimi için daha çok glikoz tüketir ve tüketilen glikozun neredeyse tamamı laktata dönüştürülerek $Y_{lak/gli}$ oranı teorik limit olan 2'ye, yaklaşır. Glutamin metabolizması ile oluşan az miktardaki laktatın katkısıyla teorik limit değerinin aşılması da mümkündür (Zielke et al., 1980).

Özgül oksijen tüketim hızı (q_{O_2}), besiyeri $\dot{V}O_2$ derişimi ve pH seviyesinden etkilenmemektedir. $\dot{V}O_2 > \%1.2$ ise enerji metabolizmasında $\%25$ glikoliz ve $\%76$ oksidatif fosforilasyon görev alır; $\dot{V}O_2 \approx 0$ iken yani anaerobik koşullarda glikolizin enerji metabolizmasındaki yeri $\%100$ 'e çıkar ve oksidatif fosforilasyon devre dışı

kalarak glikoliz önem kazanır. ÇO'nin glutamin metabolizmasına etkisi glikoz metabolizmasına benzerlik göstermektedir, ÇO'nin %10 alt ve üstündeki değerlerde amonyak/glutamin oranı ($Y_{NH_3/glu}$) oranı artmaktadır (Öztürk et al., 1990a). BHK hücreleri ile yapılan bir çalışmada glikoliz ile glutaminoliz metabolizmalarının birbirlerini karşılıklı olarak regüle ettiği görülmüştür. Çok düşük glutamin derişimleri dışında glikoz tüketimi değişmemekte, ancak glikoz derişimi düşürüldüğünde glutamin tüketimi önemli ölçüde artmaktadır. Bu durum glutaminin hücre kütleli artışında çok önemli olduğunu ve bunun glikoz tarafından karşılanamadığını, ancak kullanılan glikozun yerine glutaminin enerji kaynağı olarak kullanıldığını göstermektedir (Cruz et al., 1999). Glutamin anaerobik koşullarda enerji metabolizmasına katkıda bulunmadığına ve tüketilen glutamin miktarı arttığına göre glutamin hücre biyokütle üretiminde görev almaktadır (Öztürk et al., 1990).

Literatürde glutamin metabolizmasının nasıl işlediği, glikoz metabolizması kadar iyi açıklanamamıştır. Oksijen kısıtlamasının olmadığı durumda glutamin azot ve karbon kaynağı olarak ayrıca TCA döngüsünde enerji üretiminde rol almaktadır. Glikoz ise ana karbon kaynağıdır. Ancak oksijen sınırlaması olduğu durumlarda glikozun son ürünü laktat olmakta ve karbon kaynağı olarak görev yapamamaktadır. Düşük ÇO derişimlerinde glutamin tüketimindeki artışın nedeni olarak hücrelerin glutamini karbon kaynağı olarak kullandığı düşünülmektedir. Glutaminden amonyak oluşumu yaklaşık %60'tır ve ÇO değeri ile fazla değişmemektedir. Normal şartlarda glikoz tüketimi ile glutamin tüketim oranı %25 - %100 ÇO derişimlerinde sabit olup 3.6'dır. Bu değer düşük ÇO derişimlerinde 8.5'e çıkmakta, kesikli ve sürekli üretim proseslerinde benzer şekilde gerçekleşmektedir. Özgül oksijen tüketim hızı (q_{O_2}), $ÇO > \%1.2$ olduğu koşullarda sabittir. Bu durum elektron transfer zincirinin bu ÇO değerinde doymuş olduğuna işaret etmekte olup benzer veriler değişik çalışmalarda da bildirilmiştir (Öztürk et al., 1990b).

Aminoasit üretimi veya tüketimi besiyeri redoks potansiyeli değişimine eşlik etmektedir. Aminoasit metabolizması anaerobik koşullarda çok daha fazla artmaktadır. Aminoasitlerin ÇO ile ilişkisi genel olarak glutaminin profilini izlemektedir. ÇO %1 iken alanin/glutamin oranı $Y_{ala/glu}=0.58$ mol/mol ancak diğer ÇO derişimlerinde bu değer $Y_{ala/glu}=0.72$ mol/mol'dür. Bunun nedeni transaminaz

reaksiyonu için gerekli pirüvatın ortamdaki derişiminin az olmasıdır. Düşük ÇO derişimlerinde glikoz daha fazla laktata dönüşmekte ve ortamda pirüvat azalmaktadır (Öztürk et al., 1991).

2.7. Biyoreaktörlerde Karıştırma Sistemi

Biyoreaktörlerde karıştırma performansı birçok çalışma parametresini etkileyerek ürün kalitesini değiştiren önemli bir değişkendir. Üretim faaliyetlerinin yapılacağı biyoreaktörün seçilmesi, ölçek büyütme işlemlerinin sağlıklı yapılması, seçilen biyoreaktörün optimum şartlarda işletilmesi için üretimi yapılacak hücrenin özellikleri belirleyicidir. Biyoreaktörler; kullanılacak akışkanın mekaniği, besin ortamı, fizikokimyasal çevre, bu çevrenin homojenitesi ve üretimi yapılacak hücrenin karakteristiğine göre projelendirilir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde, hücreler sadece basit kesme gerilmelerine maruz kalmamakta, aynı zamanda türbülans tarafından oluşturulan kompleks hidrodinamik atmosferden de etkilenmektedir. Bu nedenle karıştırmanın anlaşılması verimli bir biyoreaktör tasarımı ve sağlıklı üretim için önemlidir.

Büyük hacimdeki biyoreaktörlerde kesme gerilmesi ve havalandırma kaynaklı hücre hasarları ikinci plana düşmektedir. Makro ve mikro ölçeklerde biyoreaktör iç homojenitesinin (pH, ÇO, T, besiyeri vb) oluşturulması ve etkin kütle ve ısı transferlerinin sağlanması en önemli konu olmaktadır. Homojen karışımın sağlanamadığı durumlarda besin maddeleri, ÇO ve pH açısından besiyerinde farklı derişimlerde bölgeler oluşacaktır. Besiyerinin ısıtılması veya metabolik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan fazla ısının atılması yine karıştırma ile sağlanmaktadır. Yüksek devirlerde çalışmak iyi bir homojenite sağlamakla birlikte artan karıştırma hızı (N) ile kesme gerilmelerinin neden olduğu hücre hasarlarının da artması söz konusudur (Nienow, 2006). Kesme gerilmelerinden kaynaklı hücre ölümleri; kesme gerilmesinin şiddeti, süresi, enerji dağılımı ve hücrenin hangi üreme evresinde olduğu ile yakından ilişkilidir. Genel olarak ölüm öncesi kesme gerilme aralığı 0.5-200 N.m⁻² olarak verilebilir, ancak bu aralığın kesme gerilmesi etki süresine, hücre hattına, besiyerine ve çalışma şartlarına bağlı olduğu unutulmamalıdır (Pol, 1998). Son zamanlarda birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda önceleri kabul edilen görüşün aksine hücrelerin kesme gerilmelerine daha dayanıklı oldukları savı kabul görmektedir.

Karıştırıcılar; kütle transfer performansı, karıştırıcı yakınında sıvı-gaz akışları, yığın sıvı ve hava karışımı, hava dağıtma kapasitesi, güç gereksinimi, lokal enerji dağılımları, ısı transferi gibi parametrelere bakılarak değerlendirilir ve tasarlanır.

Hayvan hücreleri tarafından birim zamanda üretilen metabolik ısı düşük olduğundan soğutma için ceket sistemi yeterlidir. Metabolizma sonucu üretilen ısı miktarı (Q , $W.m^{-3}$), qO_2 ile orantılıdır. Literatürde $Q=4.6 \cdot 10^5 \cdot OTH$ olarak verilmiştir (OTH , $m^{-3}.s^{-1}$) (Riet et al., 1991). Biyoreaktör iç akış rejimlerinin belirlenmesi için eşitlik 2.22’de verilen ve boyutsuz bir terim olan “Karıştırıcı Reynolds Sayısı” (Re_i : Impeller Reynolds Number) terimi kullanılır.

$$Re_i = (\rho_L \times N_i \times D_i^2) / \mu_d \quad (2.22)$$

Bu eşitlikte;

ρ_L : Besiyeri yoğunluğu ($kg.m^{-3}$)

N_i : Karıştırıcı devri (sn^{-1})

D_i : Karıştırıcı çapı (m)

μ_d : Dinamik viskozite (Pa.s)’dir.

Besiyeri çözeltisi genellikle suya yakın viskoziteye sahiptir, biyoprosesin başlangıcından sonuna kadar Newton yasalarına uyan özellik gösterir ve genelde biyoreaktör iç akış rejimi türbülanslıdır.

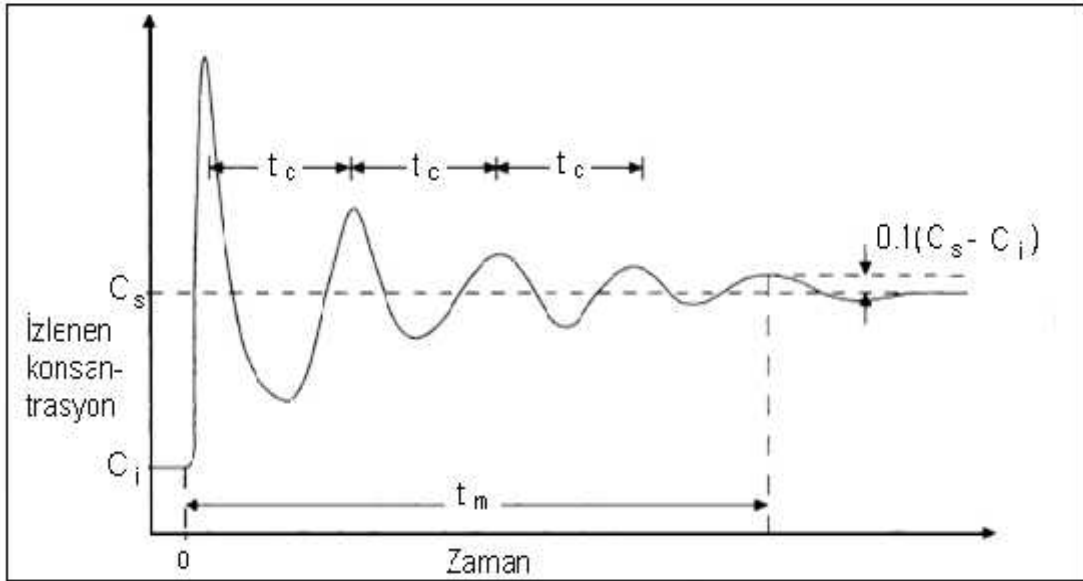
Biyoreaktör iç akış rejimi üç grupta değerlendirilmektedir.

- $Re_i < 10$ $\longrightarrow$ Laminer Akış
- $10 < Re_i < 10^4$ $\longrightarrow$ Laminer - Türbülans Akış
- $Re_i > 10^4$ $\longrightarrow$ Türbülanslı Akış

Biyoreaktör içinde oluşan akış rejimi türbülanslı ise ortaya çıkan hücre hasarlarının laminer akışa göre daha fazla olması beklenir. Karıştırıcı ile homojenitenin sağlandığı biyoreaktörlerde shaft ile reaktöre verilen güç biyoreaktörde eşit olarak dağılmamaktadır. Muhtelif çalışmalar toplam uygulanan gücün %30-70’inin karıştırıcı etrafındaki ve biyoreaktör hacminin %10’unu temsil eden küçük bir bölgeye aktarıldığını göstermiştir. Biyoreaktör içindeki yüksek ve düşük enerji aktarılan bölgeler arasında nicelik açısından 2-3 kat fark olduğundan biyoreaktör tasarımında maksimum ve ortalama enerji dağılımı esas alınır. (Zhou et al.,1996).

2.7.1. Karıştırma veriminin ölçümü

Biyoreaktör içinde aslında sınırları net olmamakla birlikte makro ve mikro karışmalardan bahsetmek mümkündür. Makro ölçek karışma, biyoreaktör bütününe ilgilendirirken mikro ölçekteki karışmalar lokal olarak karışmanın daha iyi anlaşılmasına yarar. Makro ölçekte karışım biyoreaktörde genel karışmanın değerlendirilmesi için faydalı bir parametredir. Karışmanın mikro-ölçekte incelenmesi lokal enerji dağılımı ve Kolmogorov mikro ölçek yöntemleri ile yapılmaktadır. Şekil 2.12’de sembolize edilen makro ölçekte değerlendirmeler için yaygın olarak kullanılan “karışma zamanı” (t_m : mixing time) metodolojisi Nagata tarafından oluşturulmuş olup karıştırma verimi t_m parametresinin tespiti ile ölçülür. Belirli bir değerden başlanarak istenen homojenitenin son değerinin %90’ı olmasına kadar geçen süre t_m olarak tanımlanır.



Şekil 2.12. Karıştırma zamanı ve ortam derişim grafiği

pH, T veya konsantre tuz çözeltilerinin zamana karşı izlenmesi karıştırma zamanının (t_m) saptanması için kullanılabilir. Karıştırma zamanı, (t_m) “sirkülasyon zamanı”nın (t_c : circulation time), katları olarak da ifade edilebilir. Karışım sırasında basamak şeklinde artışın görüldüğü, bir devridaim için geçen süre t_c olarak tanımlanabilir. Yapılan çalışmalar t_m ile t_c arasında $t_m = 4 \cdot t_c$ gibi bir ilişkinin kurulabildiğini göstermiştir. Endüstriyel ölçekteki biyoreaktörlerde (1 ve 100 m³) karışım zamanı, tasarım parametrelerine göre genellikle 30-120 sn arasındadır.

2.7.2. Biyoreaktörlerde karıştırma sistemi ve güç gereksinimi

Biyoreaktör karıştırma sistemlerinde genel olarak elektrik motorları kullanılır. Biyoreaktörün boyutu büyüdükçe birim hacim başına düşen elektriksel güç azalmaktadır. Tüketilen güç büyük biyoreaktörlerde 1-2 kW.m⁻³ iken bu değer küçük biyoreaktörlerde 10 kW.m⁻³'e kadar çıkabilmektedir. Karıştırma işleminde temelde akışkanın akış özellikleri (reolojisi) göz önüne alınır.

2.7.3. Biyoreaktör iç akış rejimlerinin özellikleri ve güç ihtiyaçları

Güç ihtiyacı için tank içinde oluşan akış rejimleri aşağıda özetlenmiştir.

a) Laminer akış bölgesi

Karışım için gerekli güç; akışkanın yoğunluğundan bağımsız ancak doğrudan viskozite ile orantılıdır. Laminer akış bölgesinde tüm karıştırıcı tipleri için güç, P;

$$P \propto \mu_d N_i^2 D_i^3 \quad (2.23)$$

Olarak verilebilir.

Burada;

μ_d : Dinamik viskozite (Pa.s)

N_i : Karıştırma hızı (d/dk)

D_i : Karıştırıcı çapı (m)'dir.

b) Türbülanslı akış bölgesi

Türbülanslı akış bölgesinde güç sayısı (N_p : power number), karıştırıcı Reynolds sayısından (Re_i) bağımsızdır yani viskozitenin etkisi yok kabul edilebilir. Bu durumda ilişki aşağıdaki gibi ifade edilebilir;

$$P \propto \mu_d N_i^3 D_i^5 \quad (2.24)$$

c) Laminer - türbülans akış geçiş bölgesi

Laminer - türbülans akış geçiş bölgesinde hem yoğunluk hem de viskozite güç üzerinde etkili olup her tasarım için farklıdır. Karıştırma gücü Newton yasalarına uyan ve havalandırılmayan akışkanlarda; karıştırıcı hızı, çapı, geometrisi ve karıştırılacak akışkanın yoğunluğu ve viskozitesi gibi parametrelere bağlıdır. Bu değişkenler arasındaki ilişki Re_i ve güç sayısı (N_p) ile ifade edilir.

Güç sayısı (N_p);

N_p (kW/m^3) aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir;

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N_i^3 \cdot D_i^5} \quad (2.25)$$

Bu eşitlikte;

P : Güç (W)

ρ : Sıvı yoğunluğu ($kg.m^{-3}$)

N_i : Karıştırma hızı (sn^{-1})

D_i : Karıştırıcı çapı (m) 'dır.

Re_i ve N_p arasındaki ilişki karıştırıcı ve biyoreaktör konfigürasyonuna göre deneysel olarak saptanır. Newton yasalarına uyan ve gaz verilmeyen akışkanlar için hesaplanan güç miktarı birden çok karıştırıcı kullanılması halinde; standart dizilime göre yerleştirilmişlerse toplam güç bir karıştırıcı için hesaplanan güç miktarının karıştırıcı sayısı ile çarpılması ile bulunur.

2.7.4. Havalandırılan biyoreaktörlerde karıştırma ve güç ihtiyacı

Gaz verilen akışkanların karıştırma güç gereksinimi daima gaz verilmeyen akışkanlara göre daha düşüktür. Havalandırma oranına göre gereken güç %40'a kadar düşürülebilir. Biyoreaktördeki akışkana gaz verilmesi durumunda karışım için gerekli güç miktarı P_g aşağıdaki ifadeden ampirik olarak hesaplanabilir.

$$Q = \frac{F_g}{N_i \cdot D_i^3} \quad (2.26)$$

Bu ifade de;

Q : Akış debi katsayısı (boyutsuz) (aeration or flow rate number)

F_g : Hacimsel havalandırma oranı (m^3/s)

N_i : Karışma hızı (d/s)'dir.

Q ile P_g arasında deneysel verilere dayanan yaklaşık bir ampirik ifade verilebilir. ($Q > 0.05$ ise $P_g = 0.5 \cdot P$ gibi)

2.7.5. Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan karıştırıcı tipleri

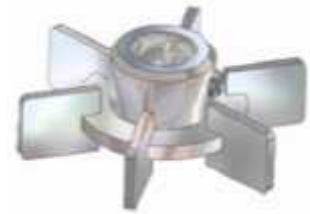
Hayvan hücre üretim proseslerinde, hücrelerin kesme gerilimine olan hassasiyetleri nedeniyle marine tip (propeller), 3-segment kanatlı tip (3-blade segment impeller), disk türbin tip (Rusthon turbine) karıştırıcılar yaygın olarak kullanılır. Karıştırma sistemleri özellikle aseptik çalışma açısından biyoreaktördeki en kritik sistemlerdir. Karıştırıcı yataklarının kontaminasyon kaynağı olmaması için özel tasarımlar geliştirilmiştir. Değişik karıştırıcılar ile yapılan çalışmalarda karıştırıcı verimi kavramı ortaya atılmış ve güç sayısı (N_p) ile akış faktörü (N_q : discharging flow number) ilişkisi ortaya konulmuştur. Buna göre, düşük N_p/N_q oranı karıştırma ve düşük kesme gerilmeleri açısından iyi sonuçlar vermektedir (Nagata, 1975). Tek karıştırıcı ile tahrik edilen sistemlerde, biyoreaktör yüksekliği/biyoreaktör çapı, $H/D_R = 1$ olduğunda karışma zamanının (t_m) karıştırıcı tipinden bağımsız; ortalama enerji dağılımı, karıştırıcı ve tank çaplarına bağımlı olduğu gösterilmiştir (Nienow, 1996).



a)



b)



c)

Şekil 2.13. Hücre kültürlerinde kullanılan karıştırıcı tipleri a) Marine tip (propeller), b) 3-Segment kanatlı tip (3-blade segment impeller), c) Disk türbin tip (Rusthon turbine)

Genel olarak kullanılacak karıştırıcı çapı biyoreaktör çapının 1/4'ü ile 1/2'si arasındadır. Marine tip karıştırıcı en iyi karıştırma verimini sağlarken hücrelere en az hasarı verdiği için hayvan hücre üretim proseslerinde tercih edilmektedir. İkinci olarak 3-Segment kanatlı tip ve biyoreaktör çapına göre düşük çaplı karıştırıcıların verimli olduğu bildirilmiştir. Sıralamada son olarak disk türbin tip (Rusthon turbine) karıştırıcı gelmektedir. Biyoreaktörlerde yüksek H/D_R oranlarında çoklu karıştırıcılar kullanılmaktadır. Aynı güç tüketiminde, çoklu karıştırıcı ile daha düşük karıştırıcı hızları ile aynı karışma düzeyi sağlanmakta ve biyoreaktörde daha düşük lokal enerji dağılımı ortaya çıkmaktadır. Karıştırıcıların biyoreaktör iç homojenitesini bozan bölümler oluşturmayacak şekilde tasarlanması önemlidir. Karıştırmanın radyal ve eksenel olarak iki yönlü yapılması gerekir. Radyal karıştırma hava kabarcıklarının besiyerinde kalma süresini artırırken, aksiyal karıştırma ile farklı homojenitede bölümlerin oluşması engellenerek iyi bir homojenite elde edilir. Bu durumda, devrin artırılması ve karıştırıcı ara mesafelerinin kısaltılması ile daha iyi karışım ve düşük karışım zamanı elde edilebilmektedir (Bremner et al., 1996; Mishra et al., 1994). Çeşitli karıştırıcıların üstün taraflarından faydalanmak için farklı tipte karıştırıcı kombinasyonları kullanılabilir.

2.7.6. Karıştırma sisteminden kaynaklanan hücre hasarları

Hidrodinamik etkiler ve hücre hasarları

Biyoreaktörlerde süspanse hücre üretim çalışmaları için karıştırma ile homojen bir ortam oluşturulurken, kütle ve ısı transfer hızları da artırılır. Mikro karıştırma lokal bölgelerde ortaya çıkan moleküllerin ve burgaçların (eddy) karışım yoğunluğunu inceler. Mikro karıştırmanın karakterize edilmesi Kolmogorov mikro-ölçek ve lokal enerji dağılım yöntemleri ile incelenmektedir. Biyoreaktörlerde karıştırma ile verilen mekanik enerji; hareket ile karıştırıcı ucundan itibaren oluşan girdaplar (vorteks) ve değişik boyutlardaki burgaçlar ile sıvıya taşınır ve mikro-burgaçlar ile mekanik enerji, ısı enerjisine dönüşür. En küçük burgaç genellikle mikro-ölçekli Kolmogorov olarak tanımlanır. Hücre hasarı ile Kolmogorov burgaç büyüklükleri hücre büyüklüğüne yakın veya daha düşük olduğu durumlarla korelasyon göstermektedir. Eşitlik 2.27 incelendiğinde, sistem geometrisi ile η arasında doğrudan bir ilişki bulunmadığı görülmektedir.

$$\eta = (\nu^3/\varepsilon)^{1/4} \quad (2.27)$$

Bu eşitlikte;

η : Kolmogorov mikro-ölçek eddy boyutu

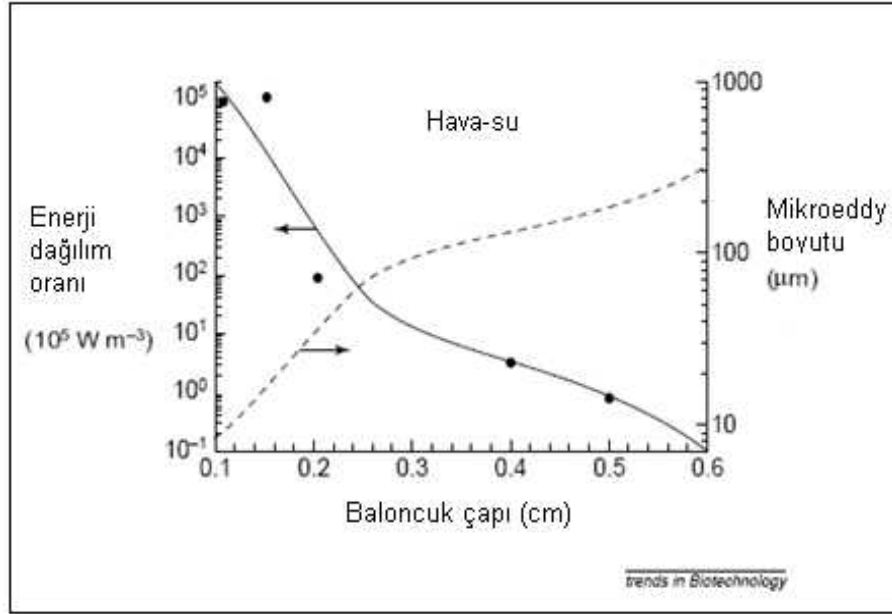
ε : Türbülanstaki birim sıvı başına lokal viskoz enerji dağılımı (m^2/s^3)

ν : kinematik viskozite (m^2/s) ile temsil edilir.

Kolmogorov burgaç-boyut modeline göre; η , hücre boyutuna ulaştığında hücre hasarı ortaya çıkmaktadır. Modelin sınırlamaları ölçek büyüdükçe artmakta ve türbülanslı karıştırma rejimlerinde lokal enerji dağılımı yeterince saptanamamaktadır (Venkat, 1996; Thomas, 1998; Papoutsakis, 1991).

Karıştırma sistemleri üzerinde yapılan çalışmalarda düşük devirlerde karıştırma ile yeterli homojen ortam oluşturulamadığı, pH 7.2'de kontrol edilen sistemin bazı lokal bölgelerinde pH'nın 9'a çıktığı bilgisayar simülasyonu ile tespit edilmiştir (Reuss, 1994). Diğer bir çalışmada ise özellikle endüstriyel ölçekte üretimlerde pH kontrolü için kullanılan baz çözeltisinin verilme noktasının çok önemli olduğu, biyoreaktör içinde üst, orta ve alt noktalara konan 3 adet pH probu ile yapılan ölçümlerde 0.8 birimlik pH farklarının ortaya çıktığı görülmüştür. Bu durumda baz ilave edilen noktada lokal pH artışı hücrelere ölümcül zararlar vermektedir. Bu durumun engellenmesi için baz ilavesinin düşük karışma hızına sahip ara yüzey yerine yüksek hızların olduğu karıştırıcı yakınından yapılması ile pH farkı 0.05 birime ve farklı pH değerine maruz kalma süresi de 60 s'den 6 s'ye düşürülebilmektedir (Langheinrich, 1999). Benzer şekilde biyoreaktör hacmi arttıkça ÇO, besin maddeleri, ürün ve atık metabolit derişimlerinde konuma bağlı farklılıklar artmaktadır. Yüksek t_m , biyoreaktör içinde ÇO ve CO₂ gradyenlerine neden olmaktadır. Hücrenin biyoreaktör içinde hareketi sırasında farklı derişimlere geçiş süresi biyolojik tepki süresinden daha kısa olmalıdır. Aksi halde hücre metabolik yollarını değiştirmeye zorlanır ve verim kayıpları ortaya çıkar (Ma et al., 2005).

Hayvan hücrelerinin hücre duvarları olmadığı ve göreceli olarak büyük hacimleri nedeni ile hidrodinamik kuvvetlerden etkilenirler. Hücrelerin kesme gerilmeleri ve karıştırma için uygulanan güç ile orantılı olarak zarar gördükleri *HeLa S3* ve fare *L929* hücrelerini farklı çaplarda kapiler tüplerden geçirerek yapılan bir çalışma ile

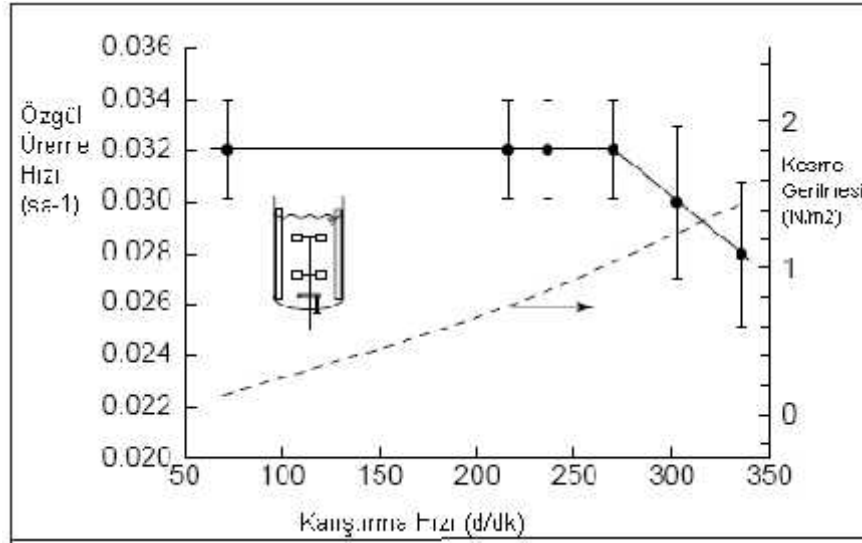


Şekil 2.14. Farklı boyutlardaki kabarcıkların sıvı yüzeyinde patlaması ile açığa çıkan maksimum enerji dağılım oranları (kesikli çizgiler baloncukun patlaması ile oluşan mikroeddy boyutları (Chisti, 2000)).

ortaya konulmuştur (Augenstein et al., 1971). Bu durumda biyoreaktör karıştırma sisteminin en az güç ihtiyacı ile çalışacak şekilde tasarımı hem işletme ekonomisi yönünden hem de hücre hasarları açısından önemli olmaktadır. Çalışmalar hücre hasarlarının, uygulanan kesme gerilmesi şiddeti ve uygulama süresi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Peterson et al., 1988). Şekil 2.14. farklı boyutlardaki kabarcıkların sıvı yüzeyinde patlaması ile açığa çıkan maksimum enerji dağılım oranlarını göstermektedir. Hücrelerin kesme gerilmelerine durağan evredeyken üstel üreme evresine göre daha duyarlı oldukları görülmüştür.

Tüm hücreler hücre membranları üzerinde çevre ile bilgi akışını sağlayan reseptörlere sahiptir. Bu reseptörler hücre dışı kimyasalların bağlanmasına imkan verir ve hayvan hücrelerinde hücre haberleşmelerinde önemli rol oynar. Yüzey reseptörlerinden gelen bilgilere göre hücre üremeye veya hücrel farklılaşmaya karar verir yani metabolizmasını yönlendirir. Hücre reseptör kalitesi aşı üretim verimini ve kalitesini doğrudan etkiler. Birçok virüs hücreye girmek için hücrenin kullandığı kimyasalları (örneğin; büyüme faktörleri) taklit ederek yüzey reseptörlerini kullanır. Karıştırma hızı (N) hücrelerde yüzey reseptör içeriklerine etki etmektedir (Kargı, 2006).

İnsan *promyelocytic leukemia* hücreleri ile yapılan bir çalışmada karıştırıcı hızının 80, 300 ve 400 d/dk'ya yükseltilmesi ile mRNA seviyesinde ve yüzey reseptör içeriklerinde değişim ortaya çıktığı bildirilmiştir (McDowell et al.,1998). Hidrodinamik kuvvetlerin hücre metabolizmasını değiştirmesine ve gen sentezine etkisi olduğu düşünülmektedir. Literatürde yoğun karıştırma ile glikoz tüketiminde ve mitokondri aktivitesinde artış gözlenmiştir (Frangos, 1985; Al-Rubeai, 1990).



Şekil 2.15. Tübin tip (Rusthon) karıştırıcı hızının (N), *S. Frugiperda Sf9* hücresinin serumsuz besiyeri ve kesikli üretimde özgül üreme hızına (μ) etkisi (iki karıştırıcılı, havalandırma oranı : 0,03 vvm, Chisti, 2000).

Süspanse ortamda üretilen hibridoma hücrelerinin karıştırmalı biyoreaktörlerde iki mekanizma ile zarar gördüğü tespit edilmiştir. Karıştırma hızından kaynaklanan girdap oluşumu ve kabarcık tutuklanması (bubble entrainment) nedeniyle ortaya çıkan kesme gerilmeleri hücrelere zarar vermektedir. Özellikle hayvan hücreleri hidrodinamik kuvvetlerin oluşturduğu kesme gerilmelerine dayanıklı değildir. Koruyucu önlemler alınmazsa tüm hücreler kaybedilebilir. Castilho (2003), hayvan hücreleri için kritik kesme gerilmesini 0.60 N.m^{-2} olarak vermiştir. Karıştırma hızına bağlı hücre hasarları sıvının hareketinden değil yüzey etkilerinden (biyoreaktör cidarı, ara yüz etkileri) kaynaklanmaktadır (Pol et al., 1998). Şekil 2.15'te *S. Frugiperda Sf9* hücresinin serumsuz besiyeri ve kesikli üretim yönteminde tübin tip (Rusthon) iki karıştırıcılı biyoreaktörde üretiminde karıştırıcı hızının, havalandırma oranının 0,03 vvm, özgül üreme hızına (μ) etkisi görülmektedir (Chisti, 2000).

Hücre hasarı biyoreaktörlerin tasarım özelliklerine göre değişmekte ancak karıştırmalı biyoreaktörlerde genel olarak karıştırma hızı $N=150-350$ d/dk arasında başlamaktadır. Bu durumda Kolmogorov-eddy boyutu tipik hayvan hücre büyüklüğünün ($9-15 \mu m$) 6-10 katı kadardır (Papoutsakis, 1991; Kunas, 1990; Backer, 1988). Hibridoma hücresi ile 1 L ve 1.2 L biyoreaktörlerle yapılan denemelerde karıştırma hızı, $N=210$ d/dk değerinde özgül üreme hızında (μ) çok ani düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (Kunas, 1990).

Tampon plakası (baffle plate) kullanılmayan durumlarda yüksek hızlarda mil çevresinde girdap oluşumu izlenmektedir. Daha az güç harcanmasına karşın girdap oluşumu ve kabarcıkların tutuklanması nedeni ile maruz kalınan kesme gerilmeleri hücre hasarını arttırmaktadır (Handa et al., 1987). Karıştırma sisteminin neden olduğu hücre hasarlarının, havalandırma sistemi kaynaklı hücre hasarlarına göre daha iyi tolere edildiği literatürde gösterilmiştir (Chisti, 2000).

Karıştırma hızı arttıkça ulaşılan son hücre sayısında (X) düşüş ortaya çıkmaktadır. Havalandırma etkisi ortadan kaldırılarak yapılan çalışmalarda $N=450-700$ d/dk'ya kadar hücre hasarı tespit edilmediği bildirilmiştir (Oh, 1989; Kunas, 1990).

2.8. Hayvan Hücre Kültürleri ve pH

pH kontrolü *in vitro* hücre üretim proseslerinde temel çalışma koşullarından birisidir. pH'ın hücre yapışması, üreme ve metabolik faaliyetlere doğrudan etkisi vardır. Besiyeri pH'sında hücre üremesi ile ortaya çıkan düşüş genellikle glikoz metabolizması sonucu açığa çıkan laktik asit derişiminin artmasından kaynaklanmaktadır. Hücre üretim çalışmalarında her hücre hattı için farklı bir optimum üreme pH değeri bulunmaktadır. Transforme hücreler için $pH=7.0-7.4$ aralığı genelde optimum değer olarak kabul edilir.

pH ölçümü ve kontrolü için yerinde steril edilebilir pH sensörleri kullanılır. Sensör kullanımdan önce standart solüsyonlar ile kalibre edilir. Çalışma aralığının kalibrasyon aralığı içinde olması hassas ölçümler için önemlidir. Biyoproses sırasında pH değişimi, besiyeri bileşimine katılan indikatör boyalarla rahatlıkla takip edilebilmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan indikatör fenol kırmızısı olup pH 7.8'de gül pembesi, 7.4'de kırmızı 7.0'da portakal rengi ve pH 6.5'in altında sarı renk oluşumuna neden olur.

Biyoproses sırasında artan CO₂ derişimi ve glikoliz metabolizması ile oluşan laktik asitin pH üzerine etkisini durdurabilmek için besiyerlerinde tampon sistemleri kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan tampon sistemi zayıf bir tampon olarak kabul edilen bikarbonat/CO₂ tampon sistemidir. Bikarbonat ortalama olarak 24 mM final derişimde besiyerine katılırken CO₂ gazı havalandırma sistemi ile steril olarak besiyerine verilerek çözünmesi sağlanır. Sisteme destek olarak 10–20 mM derişimde organik bir tampon olan HEPES pratikte kullanılmaktadır.



CO₂ derişimindeki artış eşitlik 2.28.'de görüldüğü gibi H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarının artışına yol açmakta ve sonuç olarak besiyeri ortamı asidik olmaktadır. HCO₃⁻ artışı ise eşitlik 2.29.'de görülen NaHCO₃ oluşumu ile dengelenmektedir. Bu reaksiyon pH 7.4 denge noktasına kadar devam etmektedir. Özetle besiyerindeki CO₂ birikimine bağlı pH düşmesi NaHCO₃ ile nötralize edilir. Düşük başlangıç hücre sayısı (X₀) ile çalışılan hücre üretim proseslerinde adaptasyon aşamasında hücre metabolizması ile üretilen CO₂, pH'ı dengeleyemez bu durumda besiyerinin CO₂ ile desteklenmesi gerekir (Castilha et al., 2008).

Bikarbonat tampon sistemi özellikle hücre kültürünün son aşamalarında laktik asit birikiminden dolayı pH kontrolünde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle sisteme dışarıdan NaHCO₃, NaOH gibi ek baz çözeltilerinin verilmesi zorunlu hale gelmektedir. Bu tip kontrollerde besiyeri ozmolalite (pOsm) değeriindeki artış göz önünde bulundurulmalıdır.

Biyoproseste pH kontrolü için hücre metabolizmasının en az laktik asit oluşturuğu çalışma koşullarında çalışılması diğeri bir alternatiftir. Biyoproses sırasında glikoliz metabolizması sonucu CO₂ ve laktik asit oluşumu gözlenir. Glikozun yüksek derişimde kullanıldığı besiyerlerinde doğal olarak laktik asit oluşumu da artacaktır. Biyoreaktör çalışma parametrelerinin optimize edildiği durumlarda başlangıç glikoz miktarının düşük tutulması hücrelerin glikoz yerine enerji kaynağı olarak glutamine yöneltilmesi laktik asit oluşumunu minimize edebilmektedir (Zielke, 1980). Imamura (1980) glikoz dışında fruktoz ve galaktoz gibi değişik karbonhidratlar kullanılarak laktik asit oluşumunun azaltılabileceğini öne sürmüştür (Reitzer, et al., 1979).

2.8.1. pH'in hücre solunumuna ve enerji metabolizmasına etkisi

pH hücre metabolizmasına etki eden en önemli faktörlerden birisidir. Öztürk ve arkadaşları tarafından (1990) tüketilen glikoz miktarı pH'in 6.9'dan 7.65'e çıkarılması ile yaklaşık 10 kat arttığı ve artan pH ile laktat oluşum miktarının da arttığı bildirilmiştir. Yüksek pH değerlerinde $Y_{lak/gli}$ oranı az miktarda artış göstermiştir. Glikoz metabolizması ile karşılaştırıldığında glikoza göre daha az olmakla birlikte asidik pH, glutamin metabolizmasında da bazik pH'a göre artış göstermektedir. Amonyak oluşumu da glutamine benzer profil izlemiştir. $Y_{NH3/glu}$ oranı pH ile az miktarda düşüş göstermiştir. Tüketilen glikoz / tüketilen glutamin oranı yüksek pH değerlerinde 6 iken bu değer asidik pH'larda 1'e kadar düşmektedir. Düşük pH değerlerinde glikoz tüketim miktarı düşerken, glutamin tüketimi artmaktadır (Öztürk et al., 1990).

pH'in değişimi özgül oksijen tüketim hızını (qO_2) etkilememektedir. pH 6.9'da hücre enerjisinin %76'sını oksidatif fosforilasyondan üretirken, pH 7.65'te bu değer %25'e düşmektedir. Birçok hayvan hücresi ve hibridomalar için oksidatif fosforilasyon glutamin tarafından yürütülür çok az miktarda glikoz TCA çevrimine girer (Öztürk et al., 1990).

Optimum pH değeri hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle 7.2-7.6 arasında yer almaktadır. Yüksek pH değerleri glikoz tüketimini arttırmakta ve $Y_{lak/gli}$ oranı artmaktadır (Birch et al., 1980).

2.8.2. pH'in hücre özgül üreme hızına (μ) etkisi

Besiyeri pH'sı ölüm kinetiğine etki ederek özgül üreme hızını (μ) değiştirebilen çok önemli bir parametredir. Öztürk'ün bir çalışmasında hücreler için maksimum özgül üreme hızı (μ) pH 7.20'de elde edilmiştir. pH>7.20 değerlerinde glikoz ve glutamin tüketimi ve laktat ve amonyak oluşum oranları artmaktadır. pH'in artması $Y_{lak/gli}$ 'yi düşürürken $Y_{NH4/glu}$ 'yu arttırmaktadır. pH<7.20 değerlerinde ise glutamin tüketimi ve amonyak oluşum oranları artmaktadır (Öztürk et al., 1990).

Yüksek pH değerlerinde glikolitik enzim aktivitelerinin artması ile metabolik hızların artması muhtemeldir. Örneğin heksokinaz enzimi için optimum pH=8.00 olarak bilinmektedir (Eigenbrodt et al., 1985). Diğer bir açıklama ise yüksek pH'in

membran potansiyelini değiştirerek, membrandan glikoz transferini değiştirmesidir (Wilhelm et al., 1971). Laktat oluşumu yüksek pH'da glikolik aktivite nedeni ile artmaktadır. Hibridoma hücreleri pirüvatın çoğunu laktata dönüştürmekle birlikte bunun nedeni henüz tam olarak anlaşılamamıştır (ztrk et al., 1991d). Daha fazla laktat oluşumu ile hücre alkali koşullarda hücrenin i pH'sını (pH_i) sabit tutarak canlılığını sürdürmeye çalışması bir açıklama olarak öngörülebilir. Benzer şekilde düşük pH değerlerinde daha az laktat oluşumu bildirilmiştir (Birch et al., 1980).

Glutamin tüketimi yüksek pH değerlerinde artmaktadır. Bunun muhtemel nedeni glutaminaz aktivitesinin yüksek pH değerlerinde artmasıdır. Tümör hücreleri için glutaminaz aktivitesi optimum pH 8.00 olarak bildirilmiştir (McKeehan, 1986). Ancak glutaminin yüksek pH değerlerinde daha hızlı bozunması hesaplarda göz önünde bulundurulmalıdır, çünkü pH değeri glutaminin bozunma sabitine önemli ölçüde etki etmektedir. Glutamin zaman, sıcaklık ve pH'a bağlı birinci dereceden bir kinetik ile bozunmaktadır. $pH=7.40$ ile $pH=6.80$ arasında 3 kata yakın degradasyon hız farkı vardır. Seaver (1984), DMEM ile yapılan çalışmada glutaminin yarılanma ömrünü 6.7 gün olarak bulmuştur. Diğer bir literatürde Trisch ve Moore (1992) glutamin degradasyon hızını 0.0044 sa^{-1} olarak bildirmiştir (Zhou et al., 1996). Bu durumda glutaminin bozunması (μ), canlılık oranı ve ürün oluşumu olumsuz etkilediği görülmektedir. Birçok çalışmada glutaminin sınırlayıcı besin olarak grlmesi bu nedenle önemli bir sorundur (Glacken et al., 1988; ztrk et al., 1990).

2.9. Hayvan Hücre Kültürleri ve Ozmolalite (pOsm)

Besiyeri ozmolalitesi (pOsm), hayvan hücresi üretim proseslerinde en önemli çevresel faktörlerden birisidir. Hücre metabolizmasının optimum düzeyde sürdürülmesi için besiyeri ortamının uygun bir ozmolaritede tutulması gereklidir. Biyoprosesin optimizasyon çalışmalarında pOsm'in etkilerinin göz önüne alınması çok önemlidir. Yüksek pOsm değerlerinde hücre içi su dışarı çıkar ve hücre içi inorganik iyon derişimi artar. Bu yüksek inorganik iyon derişimi (Na^+ , ve K^+ vs) birçok enzim aktivitesini inhibe eder (ztrk, 1989). Bazı hücre hatları pOsm'a oldukça hassastırlar ve bu nedenle yüksek verim ancak ozmolalite değişimlerinin dar bir aralıkta tutulmasıyla sağlanabilir. Aksine bir durum bildirilmemişse serumun pOsm değeri olan 290 mOsm.kg^{-1} optimum olarak referans alınmakta ve genel

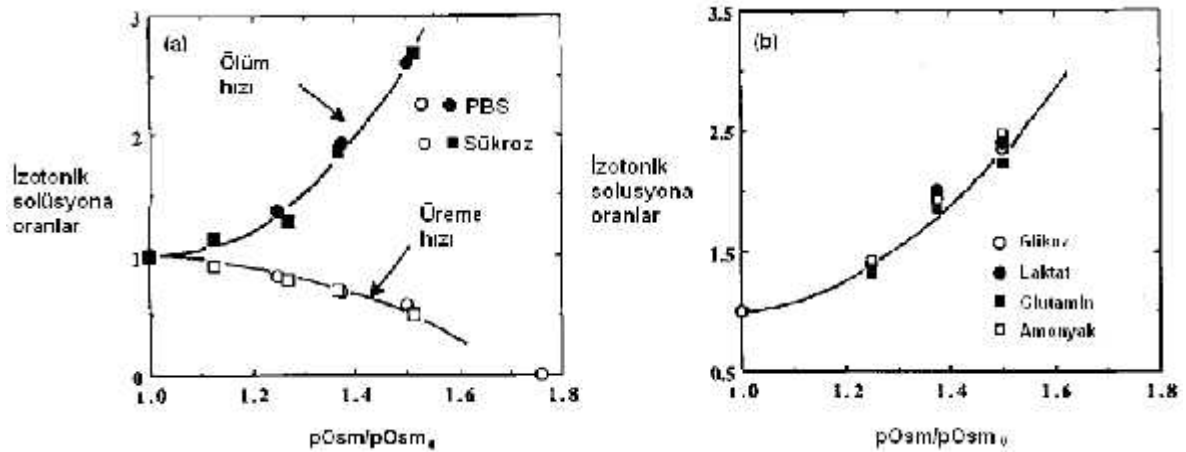
olarak hayvan hücreleri için $pOsm=260-320 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ aralığı normal kabul edilmektedir. Yüksek $pOsm$ değerleri μ 'ye olumsuz etki etmekte $pOsm$ 'un kontrolü ile hücre verimi arttırılabilmektedir (Öztürk, 1990). Üretici firmaların ticari besiyerlerinde $pOsm$ açısından farklılıklar olabileceği göz önüne alınmalı, besiyeri bileşiminde değişikliğe gidilmesi durumunda besiyeri ozmolalitesi mutlaka kontrol edilmelidir.

$pOsm$ 'un hesaplanmasında ve kontrolünde özellikle besiyeri bileşimine giren tuz derişimi etkindir. Biyoproses sırasında çalışma parametreleri ve μ 'ye bağlı olarak besiyerindeki laktat artışı ve pH kontrolünde kullanılan baz ilavelerine bağlı olarak $pOsm$ genel olarak artış gösterir. Kesikli üretim proseslerinde biyoproses sırasında ortamda biriken laktik asit gibi metabolitler ile pH düşer. Besiyeri pH'sını sabit tutmak için $NaHCO_3$ vb. gibi baz ilaveleri zorunlu olur. Besiyeri ortamındaki iyon derişimin artması ile besiyeri $pOsm$ değeri artar. $pOsm$ artışının hücrelerin tolerans değerlerinin üzerine çıkması ile özgül üreme hızı (μ) düşmeye başlar. Ozmolalitenin enzim reaksiyonlarının kinetiğine ve hücre membran protein sentezine etki ederek hücre membranındaki kütle transfer hızlarını değiştirdiği düşünülmektedir.

Rekombinant BHK hücreleri ile yapılan çalışmalarda 6 saatlik adaptasyon süresince $pOsm$ artışına paralel olarak hücre içi bazı amino asitlerde (aspartik asit, glisin, arginin, alanin, valin ve serin) önemli miktarda artışlar gözlenmiştir. $pOsm$ değerinin 330 mOsm.kg^{-1} 'dan 350 mOsm.kg^{-1} 'a yükselmesi ile μ 'de değişiklik olmazken bu değerin 370 mOsm.kg^{-1} 'a yükselmesi ile μ 'de önemli oranlarda düşüş saptanmıştır. Ani ozmolalite değişimleri μ 'yü daha olumsuz etkilemektedir; ozmolalitenin 370 mOsm.kg^{-1} 'dan 470 mOsm.kg^{-1} 'a hızlı yükseltilmesi ile yavaş yükseltilmesi arasında μ açısından %40 fark ortaya çıkmıştır. $pOsm$ 'ın hücre döngüsüne etki ettiği ve G_0/G_1 evresindeki hücreleri etkilemezken, S evresindeki hücre popülasyonunun arttığı bildirilmiştir (Yi et al., 2004).

Hibridoma hücreleri ile yapılan Öztürk'ün bir çalışmasında ozmolalitenin $pOsm$ 290 mOsm.kg^{-1} 'dan 435 mOsm.kg^{-1} 'a yükselmesi ile özgül üreme hızı (μ) yarıya düşmüş, ölü hücre sayısında ise 3 kat artış gözlenmiştir. Glikoz ve glutamin tüketim hızlarında ise 2 kattan daha fazla artışlar gözlenmiştir. Yüksek $pOsm$ değerlerinin hücrelerin hacimsel artışına neden olduğu saptanmış ancak

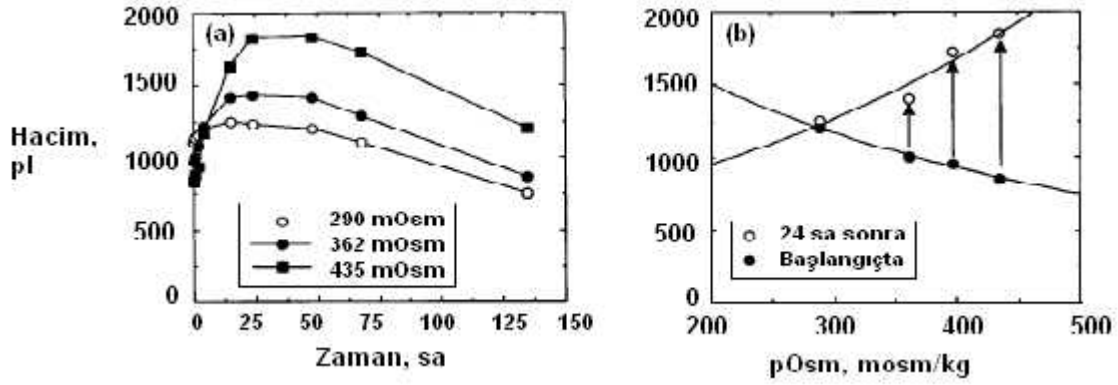
mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Bununla beraber bu hacimsel artışın metabolik oran artışlarının nedeni olduğu açıklaması yapılabilir. (Öztürk, 1990). Şekil 2.16'da ozmolalitenin (pOsm) hücre özgül üreme, ölüm hızına ve metabolizmasına etkisi gösterilmiştir (Öztürk, 1991).



Şekil 2.16. Ozmolalitenin (pOsm) hücre üreme hızına ve metabolizmasına etkisi, (oranlar normalize edilmiştir), $pOsm = 290$ mOsm/kg, a) Üreme ve ölüm oranları, PBS (o, ●) ve sukroz (■, □) eklenmiş, b) Metabolik oranlar (Öztürk, 1991).

$pOsm$ artışı ile laktat ve amonyak oluşumunda önemli oranda artış ortaya çıktığı bildirilmiştir. $pOsm$ artışı canlı hücre oranını düşürürken, ölü hücre oranını arttırmaktadır. $pOsm$ ve çözünmüş CO_2 'in μ 'ye kombine etkisi ise çok daha olumsuzdur. Karbondioksitin kısmi basıncı (pCO_2), 50 mmHg'den 150 mmHg'ye çıkarıldığında ($pOsm = 350$ mOsm.kg⁻¹) hücre üreme hızı %9 düşerken $pOsm = 316$ 'dan 450 mmHg'ye çıkarıldığında μ %60 azalmıştır (Chetan, 2006). pCO_2 140-160 mmHg ve $pOsm$ 400-450 mOsm.kg⁻¹ olduğu durumda canlı hücre derişimi %20 oranında düşmüştür. Bu sonuç yalnız $pOsm$ 'ın artışından kaynaklanan düşüşten çok daha fazladır (Zhu et al., 2005).

$pOsm$ hücre büyüklüğüne de etkilidir. Şekil 2.17'de görüldüğü gibi yüksek $pOsm$ değerlerinde hücreler normal büyüklüklerinden daha küçük gözlenmiş olmalarına rağmen 24 saatlik bir inkübasyon sonrası hücre hacimlerinde iki kata yakın önemli artışlar gözlenmiştir.



Şekil 2.17 a) Kesikli üretim yönteminde ozmolariteye (pOsm) göre hücrenin hacimsel değişimi, b) pOsm değişimine bağlı olarak hücre hacminin zamanla değişimi, (Öztürk, 1991).

Sonuç olarak hiper ozmotik ortamın BHK hücrelerine etkileri çok önemlidir. Adaptasyon süresi içinde hücre içi pOsm artışına karşı hücre koruyucu amino asit sentezi ile cevap vererek üremeyi sınırlayıcı etkisini azaltmaya çalışmaktadır (Yi et al., 2004). Yüksek ozmolalite glutamin metabolizmasını etkileyerek hücre apoptozunu tetiklemektedir (deZengotita et al., 1998). Literatürde ozmolalitenin (pOsm) apoptoza neden olup olmadığı ile ilgili farklı görüşler mevcuttur.

Biyoproses sırasında üretilen laktatın neden olduğu pOsm değişimini azaltmak için hücre metabolizma mühendisliği yardımı ile hücre metabolizmasının düşük laktat üretim hızına sahip olduğu çalışma parametrelerinin saptanmasıyla çalışmalar daha etkin yürütülebilir.

2.10. Karbondioksit Kısmi Basıncı (pCO₂) ve Hücre Üremesi

Karbondioksitin hücre üretimi yapılan biyo-proseslerdeki rolü komplekstir ve önemli işletme parametrelerinden birisidir. Hücrede CO₂ trikarboksilik asit (TCA, krebs çevrimi) çevriminde ve lipid sentezinde üretilmektedir. CHO hücreleri için optimum pCO₂'nin %4-10 olduğu (30-75 mmHg) ve pCO₂ %14'e (100 mmHg) ulaşması durumunda μ'ye olumsuz etkileri bulunduğu gözlenmiştir (Hu et al., 1997).

Karbondioksitin besiyeri içerisinde bulunan formları, HCO₃⁻, H₂CO₃ veya CO₃²⁻'dir. Biyoreaktörde pH kontrolü için genelde NaHCO₃ kullanılmaktadır. Besiyeri içerisindeki CO₂ derişimindeki değişim eşitlik 2.30 ve 2.31'de gösterilen mekanizma ile besiyeri pH'sına etki etmektedir:

$$(\text{CO}_2)_T = (\text{CO}_2) + (\text{H}_2\text{CO}_3) + (\text{HCO}_3^-) + (\text{CO}_3^{2-}) \quad (2.30)$$

$$= [\text{CO}_2] \cdot (1 + K_1/[\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2/[\text{H}^+]^2) \quad (2.31)$$

Burada;

$(\text{CO}_2)_T$: toplam karbondioksit

K_1, K_2 : denge sabitleridir.

CO_2 hücre tarafından besin olarak kullanıldığı gibi besiyerinde belirli değerin üzerinde hücre üremesini kısıtlayıcı bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır (Aunins et al., 1993; Kimura et al., 1996). Bu nedenle besiyeri ortamı içindeki pCO_2 'nin belirli aralıklarda tutulması gereklidir.

Kesikli üretim prosesinde; CO , pH ve diğer parametreler sabit tutulurken, pCO_2 artışı besiyeri pH'sını düşürerek hücre metabolizmasını değiştirmesi nedeniyle μ 'yü olumsuz olarak etkilemektedir (Gray et al., 1996). Özellikle endüstriyel üretimlerde ve yüksek hücre sayılarında pCO_2 çok daha önemli bir parametre olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda pCO_2 'nin yaklaşık olarak %25'inin hücre solunumundan, %40'ının pH kontrolü için eklenen bazdan ve %35'inin ise besiyeri içeriğinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Chetan et al., 2006).

Yüksek pCO_2 'nin hücre içi pH'sını (pH_i) düşürdüğü bildirilmiştir (Gillies et al., 1992). Hücre içi pH değişimi aktif olarak regüle edilen peptit ve proteinlerin iyonlaşma durumlarını etkilemektedir (Boron et al., 2004). Yüksek pCO_2 derişimlerinde CO_2 hücre içine difüze olmakta, karbonik anhidraz vasıtası ile H_2CO_3 'e dönüşmekte ve pH_i 'yi düşürmektedir (Thomas, 1995). Bu durumda hücre iç pH'sını dengelemek için homeostazis ile proton (H^+) pompalarını kullanır. H^+ 'nin hücreden çıkarılması ve HCO_3^- 'nin içeri alınması için enerji harcanır ve sonuç olarak enerji tüketimi artar (Boron, 2004). Bu açıklama pCO_2 'nin yüksek olduğu ortamlarda μ 'de meydana gelen düşmenin nedenini kısmen açıklamaktadır.

pCO_2 'nin 40 mmHg'dan 250 mmHg'ya çıkmasının pH_i 'yi 0.2 birim düşürdüğü bildirilmiştir (Taticek et al., 1998; Busa, 1986). Sonuçta fosfofruktokinaz aktivitesinin pH'a olan bağımlılığı nedeni ile glikoliz yoluyla karbon kullanım mekanizmasında düşme gözlenmiştir. Yapılan deneylerde düşük pCO_2 değerlerinde glikoz kullanımında artış olması bu çalışmayı doğrulamıştır (Chetan et al., 2006). BHK hücre üretiminde pCO_2 40 mmHg'dan, 280 mmHg'ya

çıkartıldığında X %30 azalmıştır (Matanguihan et al., 2001). Benzer sonuçlar CHO ile yapılan hücre çalışmalarında da gözlenmiş, pCO_2 'nin 50 mmHg'den 150 mmHg'ye çıkarılması ile X'de %9 düşüş gözlenmiştir (Zou et al., 2005).

Endüstriyel amaçlı üretimlerde biyotik ve abiyotik CO_2 kaynaklarından genel olarak abiyotik olanların elimine edilmesine çalışılmaktadır (Barngrover et al., 1985). Sadece besiyeri bileşimine giren $NaHCO_3$ 'ün elimine edilmesi ile pCO_2 birikimi yaklaşık %30-35 gibi yüksek oranda azaltılabilmektedir. pH kontrolü için kullanılan $NaHCO_3$ 'ün elimine edilmesi ile pCO_2 birikimindeki azalma %55-60'a ulaşabilir. Yapılan çalışmalar uygulamada pCO_2 birikimindeki azalmanın alınacak tedbirler ile daha yüksek oranlarda gerçekleştirilebileceği böylece hücrenin glikoz kullanımında yaklaşık %25-30 ve laktat üretiminde %40-70 oranında artış sağladığı ve X için %60-120 arasında artışlar gerçekleştirildiği bildirilmiştir. (Chetan et al., 2006).

2.11. Hayvan Hücre Kültürlerinde Havalandırma Stratejileri

Laboratuvar ölçekli sistemlerde iyi üreme özelliği gösteren hücreler, endüstriyel biyoreaktör sistemlerinde her zaman aynı üreme hızlarına ulaşamamaktadır. Bu sorunların bir kısmı ölçek büyütme çalışmaları bir kısmı da hatalı mühendislik yaklaşım ve dizaynlarından kaynaklanır. Yapılan son çalışmalar büyük ölçekli biyoreaktörlerde kütle transferleri ve çözünmüş CO_2 'in uzaklaştırılmasının önemine işaret etmektedir.

Sisteme pH kontrolü için kimyasal ilavesi yapılmadan çözünmüş CO_2 'in düşürülmesi için makrosparging uygulaması pratik bir metot olarak görülmekte ancak bu yöntem hücrelerin kabarcıklardan zarar görmesinden dolayı sınırlı olarak kullanılabilir (Michaels et al., 1995). Biyoproseste besiyerinin havalandırması ile CO_2 kontrolü sırasında eşzamanlı olarak çözünmüş CO_2 süpürülmekte ve böylece pCO_2 düşürülmektedir. Bu amaçla endüstride çift sparger sistemleri yardımıyla pH kontrolü uygulamaları yapılmakta ve bu sistemde hava veya inert bir gaz olan azot (N_2) ve CO_2 kullanılmaktadır. Çözünmüş CO_2 'nin süpürülmesinde ana mekanizma sıvı-gaz membran ara yüzeyinde difüzyon mekanizmasıdır; karbondioksitin diğer gazlara özellikle oksijene göre kütle transferi daha hızlıdır. Oksijen derişiminin kontrolü sırasında çözünmüş CO_2 'in dengede tutulması proses optimizasyonunda en önemli noktalardan birisidir.

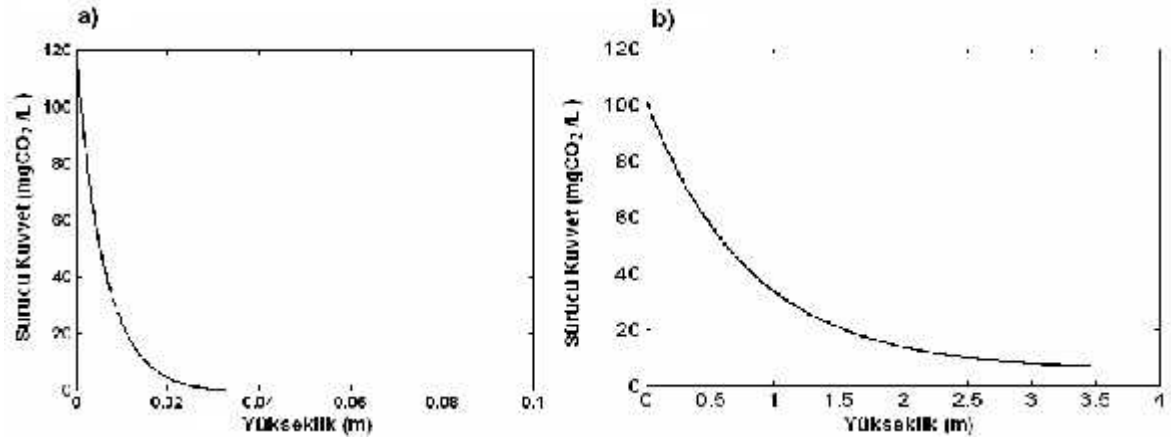
Makrospargingden azami oranda yararlanarak pH kontrolü için gerekli kimyasalların azaltılması ve böylece pürifikasyon proseslerinin yükünün azaltılması yanında, pOsm değişimleri ve bunun gibi zincirleme olumsuz etkileri de minimize etmek mümkündür.

Havalandırma ile ortama verilen kabarcık yukarı hareket halinde iken besiyeri içindeki çözünmüş CO₂ baloncuğa transfer olur ve yüzeyde baloncuğun patlaması ile serbest kalır. Endüstriyel ölçekli üretimlerde yüksek çözünmüş CO₂ derişimlerinin ozmolalite (pOsm) artışına da sebep olduğu böylece hücre metabolizmasına negatif olarak etki ettiği bildirilmiştir. Yüksek pOsm değerleri hibridoma hücrelerinde apoptoza neden olarak glutamin metabolizmasını etkilemekte, buna karşılık yüksek çözünmüş CO₂ derişimleri glikolizi engellemektedir (deZengotita et al., 1998; Kimura et al., 1996). Yapılan çalışmalarda 150 L hacimli biyoreaktörde çözünmüş CO₂'in 114 mmHg'ye kadar çıktığı gösterilmiştir (Garnier et al., 1996). Mustafa (2003), 1.5 L ve 1000 L biyoreaktörde çözünmüş CO₂ miktarının sırasıyla 70 mmHg ve 170 mmHg seviyelerine çıktığını rapor etmiştir. Çözünmüş karbondioksit kısmi basıncının (pCO₂) 36 mmHg'den 250 mmHg'ye yükselmesi ile ozmolalite 310 mOsm/kg'dan 376 mOsm/kg'ya çıkmış, biyoreaktörde makrosparging yapılması ile pCO₂ 60 mmHg'ye kadar düşürülebilmıştır (Chetan et al., 2006). Şekil 2.18'de pCO₂'nin süpürülmesi açısında makro-sparging ve mikro-sparging, yükseklik ilişkisi gösterilmiştir (Hu, 2007).

Hayvan hücre üretimi yapılan biyoproseslerde çift sparger sistemi ile toplamda daha az havalandırma yapılarak havalandırma hasarları ve enerji giderleri azaltılırken, ÇO ve pCO₂'nin daha iyi kontrol edilebileceği gösterilmiştir (Hu, 2007). Mikro-sparger yardımı ile yüksek k_{La} değerlerinde çalışılarak daha iyi bir ÇO kontrolü sağlanırken, makrosparger yardımı ile hava veya N₂ gazı ile pCO₂ kontrolü yapılabilir. Kullanılan gaz oranlarına bakıldığında pCO₂ kontrolü için kullanılan gazın toplam gaz miktarının %90'ını oluşturduğu gözlenmiştir. Daha az gaz kullanımı köpük oluşumu ve köpük kırıcı kullanımını da azaltmıştır.

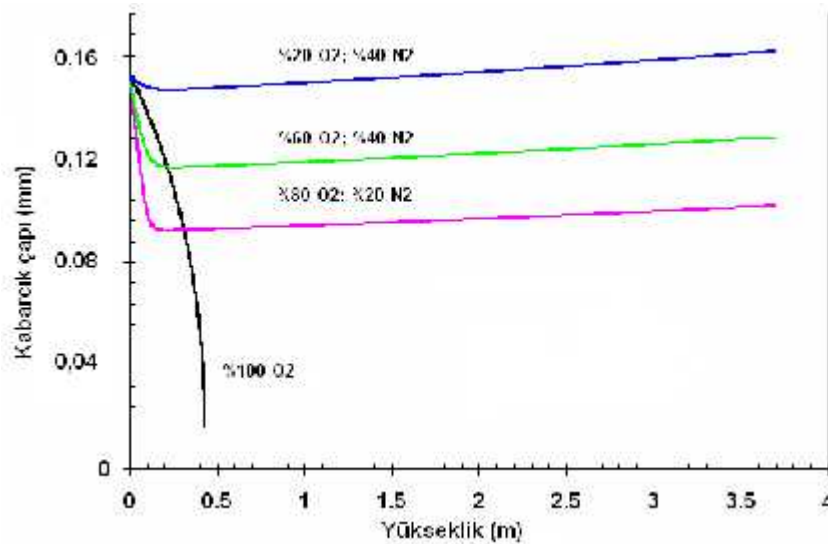
Sayılan faydalarına rağmen halen endüstride makrosparger ile CO₂ süpürülmesi yaygın olarak uygulanmamaktadır. Yapılan çalışmalarda mikro-kabarcıklarla yapılan havalandırmada şayet saf O₂ kullanılırsa kabarcıkların yüzeye yakın bir

mesafede tamamen çözünmelerinden dolayı çözünmüş CO_2 'yi süpüremedikleri gözlenmiştir. Kabarcığın biyoreaktörde yükseklikle hacim değişimi içindeki O_2 ve N_2 gazlarının oranları ile ilgilidir.



Şekil 2.18. pCO_2 'nin süpürülmesi a) Mikro-kabarcık kullanımı, b) Makro-kabarcık kullanımı, (Hu, 2007).

Şekil 2.19'da 10.000 L Biyoreaktörde gaz karışımlarının kabarcık çaplarının, yüksekliğe bağlı değişimleri gösterilmiştir. Saf oksijen kabarcıkları 0.5 m yükseklikte tamamen çözünmektedir (Hu, 2007).



Şekil 2.19. 10.000 L biyoreaktörde gaz karışımlarının kabarcık çaplarının yüksekliğe bağlı değişimleri, (Hu, 2007).

Biyoproses sırasında gözlenen iyi bir çözünmüş oksijen (ÇO) seviyesi her zaman çözünmüş CO_2 'nin ortamdan uygun şekilde uzaklaştırıldığı anlamına gelmemektedir. Mikro-kabarcıklarla yapılan havalandırma ile iyi bir OAH

sağlanmasına rağmen besiyeri ortamında çözünmüş CO₂ artışı ortaya çıkmaktadır. Düşük k_La ve makro-kabarcık kullanılan havalandırma sistemleri ile çözünmüş CO₂ birikimi inhibisyona sebep olmayacak seviyelere indirilebilmektedir.

2.12. Redoks Potansiyeli

Redoks potansiyeli besiyeri ortamının yükseltgenme potansiyelini göstermektedir. Oksidatif ve indirgenmiş kimyasallar, ÇO ve pH arasındaki dengeyi simgeler. Aminoasit üretimi veya tüketimi besiyeri redoks potansiyeli değişimine eşlik etmektedir. ÇO redoks potansiyelini değiştirerek hücre metabolizmasına özellikle amino asit metabolizmasına önemli ölçüde etki etmektedir. Toth (1984), redoks potansiyelinin üstel üreme evresinde düşmeye başladığını ve en düşük seviyesine durağan evreden önceki 24. saatte ulaştığını öne sürmüştür. (Balin et al., 1976; Brosemer et al., 1961).

2.13. Başlangıç Hücre Sayısı

Literatürdeki çalışmalarda hayvan hücrelerinin üreyebilmesi için minimum bir X₀ değerinin gerekli olduğu belirtilmiştir. Cıvcıv embriyo hücrelerinin üremesi için minimum bir X₀ gerektiği ispat edilmiş ve belirli kritik hücre derişimlerinin altında üreme olmadığı raporlanmıştır (Rubin, 1966; Rein, 1968). Hücre-hücre haberleşmesinde büyüme faktörleri etkili olup, X₀'ın artması ile ortamdaki büyüme faktörü miktarının artması μ 'ye olumlu etki etmektedir. Fakat sürekli hücre hatları için bu özgün bilgiler literatürde çok azdır; serumsuz besiyeri ile yapılan çalışmalarda sistematik çalışılmamış olunmasına rağmen X₀=0.25-0.30*10⁶ hücre/mL olduğu deneylerde son hücre sayısı 10-14 kat arasında artarken bu sayının 0.50*10⁶ hücre/mL'e yükseltilmesi ile son hücre sayılarında bu oran 4 kata kadar düşmüştür (Kadoi, 1984). Aynı çalışma koşullarında başlangıç hücre sayısının, biyoproses süresi ile olan ilişkisi incelenerek en uygun başlangıç sayısı ve ürün alma sürelerinin tespit edilmesi, işletme proseslerinin optimizasyon çalışmalarında faydalı bir parametredir. Besiyerlerinin besleyebilecekleri belirli toplam hücre sayıları vardır bu sayı besiyeri kompozisyonuna bağlı olarak değişir. Ancak başlangıç hücre sayısı ile metabolik atıkların kesikli üretim prosesinde birikmesi ile üremede sınırlayıcı derişimler daha erken oluşarak özgül üreme hızı (μ) ve son hücre sayısını (X) düşürebilir. X₀'ın μ 'ye etkisi olduğu ve Monod kinetiğinde K_s değerini etkilediğini bildirilmiştir (Glacken et al., 1988). Besiyerine

konulan glutaminin bozunma hızı; pH, sıcaklık, serum derişimi ve zamanın fonksiyonu olduğundan düşük X_0 ile başlandığında uzayan biyoproses süresi ile bozunan ve hücre tarafından kullanılamayan glutamin miktarı artacak ve besiyerine konulan glutamin verimsiz kullanıldığından $Y_{X/Sglu}$ düşecektir (Öztürk, 1990).

2.14. Deney Sistemlerinin Tasarlanması ve Optimizasyonu

Bir prosesin teorik ve pratik boyutlarda işlevsel olabilmesi için bazı şartları sağlaması gerekir. İstenen kalitede ürünü düşük maliyetle elde edebilmek için proses parametrelerinin en doğru şekilde saptanması önemlidir. Bu da ancak deneysel çalışmalarla gerçekleştirilebilir. Yapılan bir deneysel çalışmada kompleks ve birden fazla reaksiyon zinciri varsa ve bu reaksiyonların mekanizması bilinmiyorsa deneylerin planlanması oldukça güçtür. Bilimsel araştırmalarda bu problemin üstesinden gelebilmek için çeşitli modeller ve istatistiksel analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Proses parametrelerinin optimum değerlerini belirlemek ve fonksiyonel yaklaşımla prosesin değişimini izleyebilmek için geliştirilmiş metotlardan olan yüzey- cevap yöntemi (RSM; response surface methodology) mühendislik araştırmalarında en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Sanayi uygulamalarında ve bilimsel araştırmalarda bu yöntemin uygulama alanları gün geçtikçe artmaktadır.

2.14.1. Yüzey-Cevap metodu

Bu yöntemle matematiksel ve istatistiksel yöntemler ışığında deneylerin planlanması sağlanırken kritik deney parametreleri de saptanır. Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak matematiksel bir model geliştirilir ve modelin doğruluğu istatistiksel veriler kullanılarak test edilir. Sınanan model daha sonra optimizasyon sürecinde kullanılabilir.

2.14.2. Deneysel verilerden matematiksel model geliştirilmesi

İstatistiksel olarak planlanan deneyler sonucu elde edilen veriler analiz edilerek amaç bağımlı değişken için bir yaklaşım fonksiyonu belirlenebilir. Bu fonksiyonun belirlenmesi için öncelikle yüzey-cevap metodu kullanılarak bağımlı değişken (cevap) ile bağımsız değişkenler (çalışma koşulları) arasında bir model geliştirilir. İşletme parametrelerini değiştirerek elde edilen verilerin istatistiksel analizi ile optimum çalışma koşulları belirlenir.

Yüzey-cevap metoduyla elde edilen yaklaşım fonksiyonu, düşük ya da yüksek dereceli bir polinom olabilir. Elde edilen polinomun derecesi cevapla bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiye bağlıdır. Aralarında doğrusal bir ilişki varsa model 1. derece bir polinomdur. Eşitlik 2.32 doğrusal bir modeli temsil etmektedir. Bu eşitlikte “y”, bağımlı değişken “ β_i ”, regresyon katsayısı “i”, “ X_i ” bağımsız değişken, ve “ ε ” deneysel hata olarak tanımlanır. Regresyon katsayıları hesaplanırken deneyde elde edilen veriler kullanılır.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (2.32)$$

Eşitlik 2.33’te ikinci dereceden k bağımsız değişkenli bir matematiksel model verilmektedir. Bu modelde cevapla bağımsız değişkenlerin ilişkisi doğrusal değildir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (2.33)$$

Eşitlik 2.34 ve 2.35’de bağımsız değişkenlerin sayısına bağlı olarak gerekli modelin oluşturulabilmesi için kaç tane deneyin yapılacağı belirtilmiştir. Bu eşitliklerde N deney sayısını, k bağımsız değişken sayısını, n_0 ise merkezdeki deney sayısını göstermektedir (Güven, 2004).

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad k \leq 5 \quad (2.34)$$

$$N = 2^{k-1} + 2k + n_0 \quad k > 5 \quad (2.35)$$

2.14.3. Deneysel tasarım

Deneysel planlama yapılırken genelde bileşke tasarımların özel bir grubu olan merkezi bileşke tasarımı (CCD) tercih edilir. Bileşke tasarımlarda, ikinci derece yüzeylerin katsayılarını belirleyebilmek için birinci dereceden faktöriyel tasarımların nokta sayısı artırılır.

2.14.4. Sayısal optimizasyon

Design-Expert® 7.0 paket programı (deneme sürümü) yüzey-cevap metodunu kullanarak cevapların ve bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan ilişkilerine göre farklı faktör seviyelerinin kombinasyonlarını üretir, model yaklaşımını gerçekleştirir ve optimizasyon yapar. Optimizasyon grafiksel ya da sayısal olarak elde edilebilir. Bağımsız değişkenlerin herhangi bir değerini hesaplayabilmek için tahmini düğüm noktası analizi kullanılır.

Tasarımı etkileyen tüm parametreler için minimum ve maksimum seviyeler belirlendikten sonra istenen yaklaşım fonksiyonu maksimize ve minimize edilebilir, hedef gösterilerek veya istenen değerler arasında hesaplanabilir. Yaklaşım fonksiyonun şeklini ve büyüklüğünü ayarlayabilmek için ağırlık oranı değiştirilir. Design-Expert programı sonuçları bir araya getirerek amaç fonksiyonun optimizasyonunu sağlar. Sayısal optimizasyon yapılırken tercih oranını maksimum yapacak noktalar tespit edilir. Cevap yüzeylerinin fonksiyondaki farklı kombinasyonlarına bağlı olarak birden fazla maksimum elde edilebilir. Design-Expert® programı tasarımdaki birçok noktayı inceleyerek en iyi yerel maksimumu bulur (Desing-Expert User's Guide, 2001).

2.14.5. Ağırlık oranı

Tasarımda yer alan değişkenlerin birbirlerine üstünlükleri farklı olduğundan biri veya daha fazlası minimize, optimize veya maksimize edilerek istenilen en verimli optimum koşulların eldesi sağlanır. Bir değişkenin önemini, ne derecede modele katılacağını belirten 1 ile 5 arasında değişen değere ağırlık oranı denir. Bu değer kullanıcı tarafından atanır (Desing-Expert User's Guide, 2001).

2.14.6. Yüzey-Cevap yönteminde modelin belirlenmesi

Cevap ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren polinom modeli Design-Expert® programı tarafından otomatik olarak önerilir. Eşitlik 2.36 ve 2.37'da model sonuç değeri tanımlanmıştır. Bu eşitliklerde Adj R-Squared modele değer katkısı olmayan terimlerin sayısı arttıkça azalır. Deneysel verilerde veya uygulanan modelde bir sorun varsa Pred R-Squared ve Adj R-Squared değerleri arasındaki farkın 0.2'den fazla olduğu gözlenir (Desing-Expert User's Guide, 2001).

$$\text{Sonuç Değeri 1} = (M)(L)(\text{Pred R-Squared}) \quad (2.36)$$

$$\text{Sonuç Değeri 2} = (M)(L)(\text{Adj R-Squared}) \quad (2.37)$$

Burada;

M : Ardışık modeldeki fark karelerinin toplamı

L : Uyum göstermeyen sonuç değerleri

Pred R-Squared : Modelde tanımlanan kısıtlayıcı verilerin varyasyonunun ölçüsüdür.

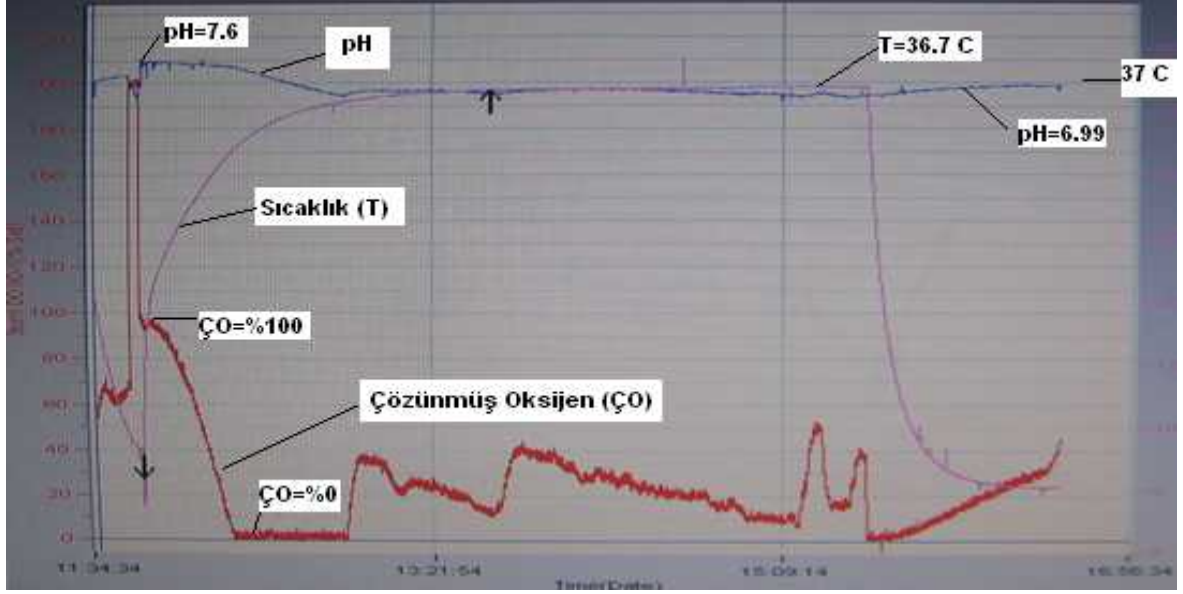
Adj R-Squared : Modelde belirlenmiş tüm değerlerin ortalamadaki varyasyonunun ölçüsüdür.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Hazırlık çalışmaları

Şap Enstitüsünde 2008 yılında yapılan ön çalışmalarda BHK-21 hücre üretim süreci ile ilgili olarak çalışma koşulları; ÇO, pH ve sıcaklık (T) ile ilgili veriler toplanmıştır. Şekil 3.1'de 3000 L hacimli vibro-biyoreaktörde, 6M besiyeri ile yapılan ve rutin üretim sürecini yansıtan tipik bir grafik görülmektedir. ÇO'nun kontrol edilmediği böyle bir biyoproseste, hücrelerin anaerobik şartlara maruz kalmalarıyla başlayan, laktat derişiminin artışı, pCO₂ artışı, besiyeri pH'sının düşmesi, pOsm artışı gibi zincirleme devam eden ve hücre metabolizmasını olumsuz etkileyen sonuçlar doğabilmektedir. Biyoreaktörün ısınma süresinin uzun olmasının hücre metabolizmasının geç aktifleşmesine, adaptasyon süresinin (lag time) uzamasına ve ürün kayıplarına neden olduğu düşünülmüştür.

Mevcut havalandırma kontrolünde amacın pH kontrolü olması nedeni ile üretim sürecinin başlangıcında ÇO seviyesi %100'den başlayarak 4-6 saat sonra %0'a yaklaşmaktadır. Bu süre zarfında havalandırma yapılmaması nedeniyle biriken çözünmüş karbondioksitin (CO₂) pH'yı düşürdüğü ve ÇO değerinin sıfıra yaklaşması ile pH düşüş hızının da arttığı açıkça görülmektedir. Kritik ÇO değerinin altında hücre anaerobik şartlara maruz kalmakta ve metabolik yolunu değiştirmeye zorlanmaktadır. Ortamda asidik bir gaz olan çözünmüş CO₂'nin artması ile pH düşüş hızı artmakta, Pastör etkisi ile glikoz tüketimi ve laktat üretimi artmakta ve $Y_{lak/gli}$ oranı teorik limit olan 2'ye ulaşmaktadır. Üretilen aşırı laktat ve çözünmüş CO₂ besiyeri pH'sını düşürdüğü gibi, ozmolaliteye de (pOsm) etki etmektedir. Bu olumsuz etkiler birbirini tetikleyerek devam ettiğinde, özgül üreme hızında (μ), son hücre sayısında (X) ve bu hücrelerden üretilen virüslerin 146S partikül miktarında düşüşler ortaya çıkmakta ve ürün kayıpları yaşanmaktadır. Bu biyoproseste temel sorunlar havalandırma ile pH kontrol yöntemi, ÇO derişiminin kontrol edilmemesi ve araştırma kapsamında ele alınan diğer parametrelerin (karıştırma hızı (N), başlangıç hücre sayısı (X₀)) etki derecelerinin bilinmemesi olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.1. 3000 L hacimli biyoreaktöre ait ÇO, pH ve T grafikleri (kayıt Temmuz 2008 yılına ait olup yaklaşık olarak 50 saatlik bir çalışmayı kapsamaktadır)

Deneylerin yapılacağı biyoreaktörde iç homojenitenin sağlanması amacıyla, çeşitli karıştırma hızlarında karışımın nasıl olduğunun gözlenmesi için vasat ortamına eklenen yaklaşık 0.6 mm çaplı reçineler yardımıyla karışım incelenmiş ve karıştırıcı tipi olarak 45° kanat açılı, 3-segmentli karıştırıcıya karar verilmiştir.

Hazırlık deneylerinde biyoreaktör havalandırılması mikro-sparger ($\varnothing=20 \mu\text{m}$) kullanılarak denenmiş, yüksek hacimsel kütle transfer katsayısı (k_La) nedeniyle çözünmüş oksijen (ÇO) kontrolü sırasında aşırı salınımlar ve köpük oluşum problemleri gözlenmiştir. Mikro-kabarcıkların çözünmüş karbondioksiti ortamdan uzaklaştıramaması nedeni ile pH düşüşleri gözlenmiş, sistem besiyeri pH değerini set edilen değerde tutabilmek için 1.5 L çalışma hacmine sahip hücre üretim prosesinde 150 mL'ye kadar baz (NaHCO_3) kullanımına sebep olmuştur. Baz kullanımı ile besiyeri ozmolalitesi 400 mOsm.kg^{-1} değerine ulaşmıştır. Böylece BHK-21 hücreleri için kritik değer olan 370 mOsm.kg^{-1} değeri aşılmış, ayrıca sistemde oluşan köpük nedeni ile köpük kırıcı çözelti (antifoam) kullanma gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu problemlerin aşılması amacıyla havalandırma için makrosparger sistemi denenmiş ancak bu standart düzeneğin de düşük havalandırma oranlarında verimli olmadığı ve biyoreaktörde homojen dağılım elde edilemediği görülmüştür. Yeni bir makrosparger tasarlanarak ÇO salınımı, köpürme, homojenite ve CO_2 birikme sorunları çözülmüştür. Bu yöntemle baz

kullanımı hazırlık çalışmalarına göre 3-10 kat oranında azaltılarak ozmolalite artışı engellenmiş, pH kontrolü için çözünmüş karbondioksitin süpürülmesinden azami oranda fayda sağlanmıştır. Bu çalışmada havalandırma için muhtelif yayınlarda bildirilen hayvan hücre üretim prosesleri için verilmiş olan 0.04 vvm üst sınırına hiçbir deneyde çıkılmamış, optimum işletim koşullarında belirtilen kritik havalandırma değerinin 1/2-1/3'ü arasında gaz debilerinde çalışılmıştır. Böylece tezin ilgili bölümlerinde detaylı olarak anlatıldığı gibi kabarcıkların mekanik etkilerinden kaynaklanan hücre hasarları minimize edilmiştir.

Her çalışmada hücre açısından standardizasyonu sağlamak amacıyla üretim laboratuvarından alınan örnekler 50 mL şişelerde dondurulmuş ve ön çalışmalarda bu yaklaşımın denemeleri yapılarak doğrudan süspanse üretime başlanması düşünülmüştür. Yapılan deneylerde bu yaklaşımda hücrelerin toparlanma sürecinin çok uzun sürdüğü ve hücrelerin büyük bir bölümünün dondurma ve çözündürme kaynaklı hasarlara maruz kaldıkları, hasarlı hücrelerin 20-40 saat canlılıklarını sürdürdükleri ve oluşan hasarın etkilerini üzerlerinden atmak için birkaç pasaj geçmesi gerektiği tespit edilmiş ve dondurma işleminden vazgeçilmiştir. Bu yaklaşım yerine endüstriyel üretim sisteminde olduğu gibi monolayer bir kaç pasaj görmüş hücrelerin aşı olarak kullanılmasına karar verilmiş ve biyoproseste mevcut üretim prosesinin taklit edilerek elde edilecek sonuçların uygulanabilir olması tercih edilmiştir.

Ön deneylerde hücre üretim yöntemi olarak halen kullanılmakta olan tekrarlı-kesikli üretim yöntemi esas alınmış deneme üretimleri yapılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Böylece çalışma metodu ve süreç yaklaşımı tamamlanmıştır. Ön çalışmalar sırasında yaklaşık 6 aylık bir süreçte 20 tane ayrı deney gerçekleştirilmiştir. Araştırma kapsamındaki asıl deneyler ve doğrulama amacıyla toplam olarak 60 adet deney yapılmıştır. Bu deneylerden 18 tanesi çeşitli arıza ve kontaminasyonlar nedeni ile değerlendirmeye alınmamıştır. Diğer deneylerden 7 tanesinde besiyeri değişiklikleri nedeni ile farklı sonuçlar elde edilmesine rağmen çok faydalı verilerin elde edilmesi nedeni ile sonuçlar kısmına dahil edilmiştir. Bu şekilde Design Expert (deneme sürümü) programı tarafından belirlenen 30 adet asıl deney yapılmıştır. Sonuçlar istatistik programında modellenmiş, programın optimizasyon modülü ile en fazla ürün eldesi için son hücre sayısı (X) ve 146S

partikülü çalışma koşulları optimize edilmiştir. Programın önerdiği çalışma koşullarında beş (5) adet deney yapılarak model doğrulanm ve sonuçların tekrarlanabilirliği gösterilmiştir.

3.1. Deneylerin Planlanması

Yapılan çalışmada BHK-21 C13 An 30 hücre üretimi yapılan biyoproseslerde; özgül üreme hızı (μ), son hücre sayısı (X), antijenik titre (AT), enfektif titre (IT), metabolit oluşumları (laktat ve amonyak) ve 146 S partikül miktarını etkileyen işletim parametrelerinin incelenmesi ve optimizasyonu amacıyla kesikli üretim yöntemi için deneyler planlanmıştır. Bu planlama yüzey-cevap metodunu kullanan Design Expert 7.0 (deneme sürümü) istatistiksel programı yardımıyla yapılmıştır. Program vasıtası ile en az sayıda deney ile çalışma yürütülmüştür. Klasik deney programlamada diğer parametreler sabit tutulurken bir parametre sırası ile değiştirilerek deneysel cevaplar belirlenir. Design Expert 7.0 programı ise sistemden alınacak cevabı etkileyecek parametreleri aynı anda değiştirerek çok etkileşimli cevapları sağlar. Bu şekilde elde edilen modelde parametrelerin iç etkileşimleri de incelenmiş olur. Deneylerdeki olası hataları minimize etmek amacıyla program tarafından önerilen deney seti Gauss kuramına uygun bir şekilde dağıtılır. Programın verimli kullanılması için bağımsız değişkenlerin ve cevap değişkenlerinin ve çalışma aralıklarının belirlenmesi büyük önem taşır.

a) Bağımsız değişkenler

Öncelikle deney sistemi üzerinde etkisi olacağı düşünülen bağımsız değişkenler belirlenir. Seçilen bu değişkenlerin uygulamada kolayca değiştirilebilir olmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca bu değişkenlerin aralıklarının mümkün olduğunca dar ve sayısı da düşük olmalıdır. Böylece deney sayısı en aza indirilerek zaman ve malzemedan kayıplar önlenir. Bu çalışma kapsamında bağımsız değişkenler olarak literatür ve üretim bilgileri ışığında; karıştırma hızı (N , d/dk), çözünmüş oksijen seviyesi (CO , %), pH , başlangıç hücre sayısı (X_0 , hücre/mL) belirlenmiştir.

b) Bağımlı değişkenler

Bağımsız değişkenlerin değiştirilmesi ile sistem cevaplarında ortaya çıkan değişimleri tespit etmek için bağımlı değişkenler tanımlanır. Bu değişkenlerin seçimi kolayca ölçülebilir olmalarına bağlıdır.

Yapılan açıklamalar ışığında BHK-21 C13 An₃₀ hücre üretimi yapılan biyoproseslerde; özgül üreme hızı (μ), son hücre sayısı (X), antijenik titre (AT), enfektif titre (IT), metabolit oluşumları (laktat ve amonyak) ve 146 S partikül miktarı bağımlı değişken olarak seçilmiştir. İşletim koşullarına bağlı ortaya çıkacak etkileri belirlemek amacıyla; X (hücre/mL), 146 S ($\mu\text{g/mL}$), AT, IT (pfu/mL), μ (sa^{-1}), $Y_{x/\text{gli}}$, q_{gli} (nmol glikoz 10^{-6} hücre/dk), q_{lak} (nmol laktat 10^{-6} hücre/dk), TP ($\mu\text{g/mL}$), pOsm (mOsm.kg^{-1}) her deneyde uygun zaman aralıklarında alınan örneklerle saptanmıştır.

c) **Bağımlı ve bağımsız değişkenlerin belirlenmesi**

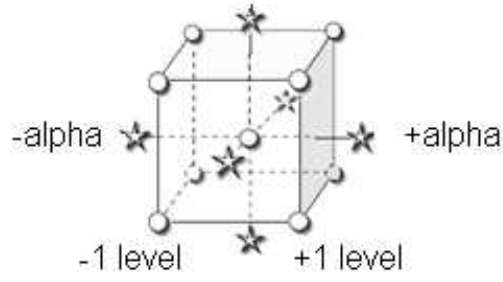
i. **pH** : Hücreler doğal ortamlarında kendilerine özgü belirli pH aralıklarında yaşayabilmektedir. Besiyeri pH'sı enerji metabolizmasına etki ederek $Y_{\text{lak/gli}}$ gibi metabolik oranların ve pOsm'un değişmesine neden olmaktadır. Hücre üremesi açısından optimum bir pH değerinde çalışılması önemli olmakla birlikte besiyeri pH'sının virüs verimi ile doğrudan ilişkili olan 146S partikül miktarını etkilemesi de mümkündür. Bu durumda hücre metabolizması için en uygun pH değeri ile en fazla 146S partikülünün elde edildiği pH değeri çakışmayabilir. Bu nedenle her iki amacın veya sadece 146S partikül miktarının maksimum olduğu pH noktasının saptanması ile daha fazla aşı üretimi yapılabilir. Çizelge 3.1'de çalışmanın planlandığı pH aralıkları görülmektedir.

ii. **Çözünmüş oksijen (ÇO)** : Hayvan hücreleri aerobik hücreler olduğundan oksijenli ortamda ürerler. Oksijenli solunum ile oksijensiz solunum ortamlarında metabolik faaliyetler değişmekte ve bu şartlar özgül üreme hızını (μ) önemli oranda etkilemektedir. Diğer taraftan havalandırmanın mekanik etkileri hücreler için çok önemlidir. Birçok bilimsel yayında hayvan hücreleri ile çalışmak için çok geniş çözünmüş oksijen (ÇO) aralıkları verilmiştir. Ancak her hücre hattı ve üretim amacına yönelik olarak optimum ÇO değişmektedir. Bu durumda hücrelerin havalandırmadan kaynaklanan zararlı etkileri en aza indirecek düşük ÇO noktalarında çalışılması akılcı gözükmemektedir. Bu şekilde en az havalandırma oranı ile ÇO ve pH kontrolü yapılması sağlanırken hücre hasarları minimize edilir, canlılık oranında artış ve ölü hücre oranında düşüş beklenebilir. Sonuç olarak son hücre sayısının (X) artması ve buna doğrudan bağlı olarak 146S partikülünün artması

umulabilir. Çizelge 3.1'de çalışmanın planlandığı çözünmüş oksijen aralıkları görülmektedir.

iii. **Karıştırma hızı (N) :** Biyoreaktör içindeki ortamın homojenliği doğrudan karıştırma hızı (N) ile ilişkilidir ancak hayvan hücreleri kesme gerilmelerine karşı hassastır. Düşük N ile yapılan çalışmalarda homojenite problemi ortaya çıkmakta yüksek N değerlerinde ise ortaya çıkan kesme gerilmeleri μ 'yü olumsuz etkilemektedir. Diğer taraftan hücrelerin reseptör kalitesine N'in etki ettiği bilindiğinden yüzey reseptör kalitesi açısından en uygun N değerinin bulunması ile 146S partikül miktarının artırılması mümkün olabilir. Bu nedenle N önemli görülmüş ve bağımsız değişken olarak belirlenmiştir. Çizelge 3.1'de çalışmanın planlandığı karıştırma hız aralıkları görülmektedir.

Başlangıç hücre sayısı (X_0) : Başlangıç hücre sayısı (X_0) doğrudan virüs üretimi için kullanılacak hücre miktarını belirler. Tekrarlı-kesikli üretim yönteminde biyoreaktör içinde bırakılacak hücre miktarı aynı zamanda ortamda kalacak atık madde miktarını değiştirmekte dolayısı ile bir sonraki prosesteki özgül üreme hızını (μ) etkilemektedir. Mevcut yayınlarda başlangıç hücre sayısı, $X_0=0,5-0,7 \cdot 10^6$ hücre/mL aralığında verilmekle birlikte bu aralık ulaşılabilecek son hücre sayısı (X) açısından geniş sayılabilir. Yapılacak optimum nokta tayini ile bu aralık daraltılarak ulaşılabilecek X ve dolaylı olarak 146S partikülü artırılabilir. Bu nedenle X_0 önemli bir parametre olarak görülmüş ve bağımsız değişken olarak belirlenmiştir. Design Expert 7.0 (Deneme sürümü) programı ile tasarlanan deney sisteminde bağımsız değişkenlere ait planlanan çalışma aralıkları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Program her çalışma aralığını Şekil 3.2'de görüldüğü gibi (-alpha, +alpha) 5' bölerek ve 6 tanesi de merkezde olmak üzere toplam 30 adet deney belirlemiştir. Merkez noktasındaki deneyler; pH=7.10, çözünmüş oksijen $\text{CO}=\%50$, karıştırma hızı, $N=200$ d/dk, başlangıç hücre sayısı $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL olarak atanmıştır.



Şekil 3.2. Design Expert 7.0 (deneme sürümü) bağımsız değişkenler ve değişim aralıkları

Çizelge 3.1. Bağımsız değişkenler (pH, çözülmüş oksijen (ÇO), karıştırma hızı (N), başlangıç hücre sayısı (X_0)) ve değişim aralıkları (Design Expert 7.0, deneme sürümü)

	Units	-1 Level	+1 Level	-alpha	+alpha
pH	Birim	6.9	7.3	6.7	7.5
ÇO	%	30	70	10	90
N	d/dk	150	250	100	300
X_0	hücre / mL	300.000	700.000	100.000	900.000

d) Deney sistemi

Şekil 3.3'te deneylerin gerçekleştirildiği ikiz tip 2 L çalışma hacimli biyoreaktör sistemi ve karıştırma için kullanılan 3 segmentli karıştırıcı görülmektedir.



a)



b)

Şekil 3.3. Biyoreaktör sistemi a) Biostat ® B plus biyoreaktör, b) 3-Segmentli karıştırıcı

Biyoreaktör Sisteminin Elemanları :

- Pt-100 – Sıcaklık sensörü
- Köpük kırıcı ve seviye elektrodu
- pH – Elektrodu (Hamilton, Easyferm Plus K8 200)
- pO₂ Elektrodu (Hamilton, Oxyferm FDA 225)
- Egzost yoğurturucu
- Peristaltik pompalar
- Besleme ve egzost hava filtreleri : 0.22 µm mini filtre, Sartorius, Almanya)
- Tekli ve çoklu malzeme transfer adaptörü
- Numune alma kiti
- Karıştırıcı ve motoru
- Isıtma sistemi

e) Deney listesi

Deneylerin planlanması için Design Expert 7.0 (Deneme sürümü), RSM ve merkezi bileşke tasarımı (CCD) kullanılmıştır. Dört çalışma koşulu (N, pH, ÇO, X₀) için farklı çalışma değerlerinde 30 adet deney tasarlanmıştır. Çizelge 3.2.'de program tarafından belirlenen deney listesi ve yapılış sırası görülmektedir.

Çizelge 3.2. Design Expert 7.0 (deneme sürümü) programı ile belirlenen deney listesi

Std	Run	Factor 1 A:pH	Factor 2 B:ÇO%	Factor 3 C:N (d/dk)	Factor 4 D:X ₀ (hücre/ mL)
29	1	7.1	50	200	500.000
17	2	6.7	50	200	500.000
11	3	6.9	70	150	700.000
14	4	7.3	30	250	700.000
16	5	7.3	70	250	700.000
3	6	6.9	70	150	300.000
1	7	6.9	30	150	300.000
26	8	7.1	50	200	500.000
4	9	7.3	70	150	300.000
24	10	7.1	50	200	900.000
20	11	7.1	90	200	500.000
21	12	7.1	50	100	500.000

8	13	7.3	70	250	300.000
12	14	7.3	70	150	700.000
6	15	7.3	30	250	300.000
27	16	7.1	50	200	500.000
23	17	7.1	50	200	100.000
18	18	7.5	50	200	500.000
7	19	6.9	70	250	300.000
2	20	7.3	30	150	300.000
28	21	7.1	50	200	500.000
30	22	7.1	50	200	500.000
9	23	6.9	30	150	700.000
15	24	6.9	70	250	700.000
25	25	7.1	50	200	500.000
22	26	7.1	50	300	500.000
19	27	7.1	10	200	500.000
5	28	6.9	30	250	300.000
13	29	6.9	30	250	700.000
10	30	7.3	30	150	700.000

3.2. BHK-21 An₃₀ Süspanse Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan BHK-21 An₃₀ M(17-27) hücre hattı Şap Enstitüsü Hücre Bankası stoklarından temin edilmiştir. Yeni doğan hamster böbrek epitel hücrelerinden elde edilen ve polioma ile transfekte edilen aneuploid (2n=44) özellikteki bu hücreler -196 °C sıvı azot içerisinde muhafaza edilmektedir. Hücreler protokole uygun bir şekilde çözündürülerek 850 cm²'lik döner şişelerde üretilmiştir. (Şap Enstitüsü Protokolü, 2004). Döner şişelerde tek tabaka (monolayer) pasaj yapılarak üretilen hücreler tripsinazisyon işlemi sonrasında süspanse ortama alınarak çalışmalar yürütülmüştür.

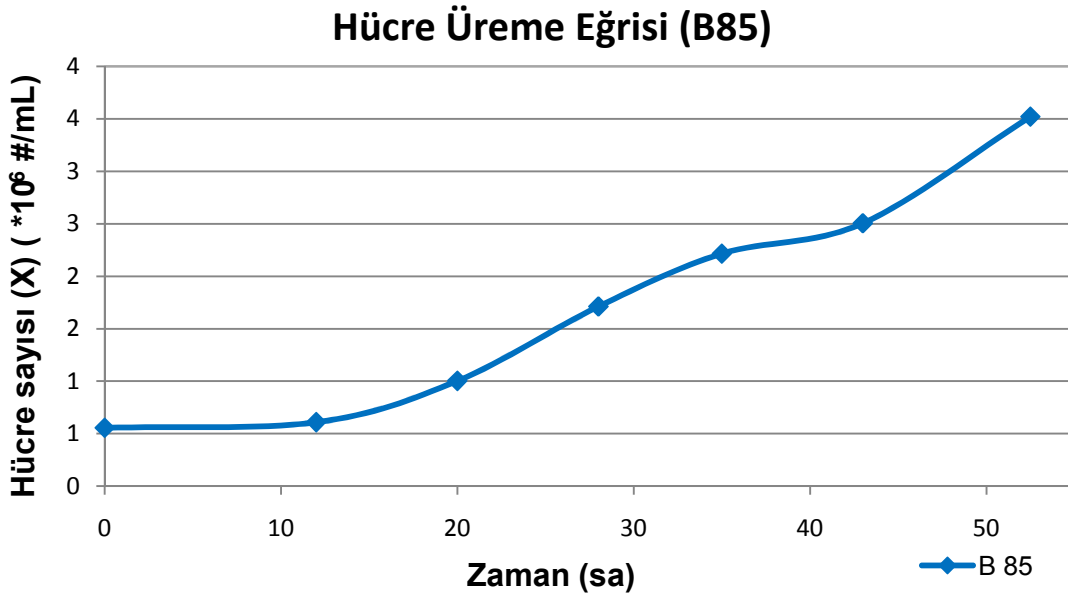
BHK-21 An₃₀ hücresi süspanse olarak üreyebilme özelliğine sahip bir hücredir. Bu özelliği nedeniyle tek tabakalı BHK-21 An₃₀ hücresinin karıştırmalı biyoreaktörlerde süspanse olarak üretim için adaptasyonu mümkündür. BHK-21 süspanse hücre üretimleri Girard (1973)'in bildirdiği şekilde hazırlanmış ve pasajları yapılmıştır.

BHK-21 hücreleri tripsinazisyon ile şişe yüzeyinden ayrıldıktan sonra hücre sayımı yapılarak, 5.0×10^5 – 7.0×10^5 hücre/mL olacak şekilde, 1500 mL %10 (v/v) sıgır serumlu ve %1 gentamisinli (v/v) (Sigma) 6M besiyeri içerisinde süspanse edilmiş ve önceden yıkanmış, bağlantıları yapılarak steril edilmiş ve biyoreaktöre steril ortamda aktarılmıştır.

3.3. Numune Alınması ve Hücre Sayım Yöntemi

Hücre üretiminin yapıldığı biyoproseslerde düzenli aralıklarla (6-12 saat) alınan numunelerde hücre sayısı ve canlılık durumu mikroskopta hemositometrik yöntemle sayılmıştır. Alınan hücre süspansiyon numunesinin, 0.9 mL üzerine 0.1 mL tripan mavisi (%0.4'lük Sigma) solüsyonu ilave edilmiş ve hemasiyometre (Bürker, Almanya) kullanılarak ışık mikroskobunda (Olympus CH, Japonya) hücre sayımları yapılmıştır. Sayımlarda canlı ve ölü hücreler ayrı ayrı sayılarak hücre canlılığı da tespit edilmiştir. Birkaç dakika boya ile inkübe edilen numunelerde canlı hücrelerin hücre zarı bütünlüğü korunduğundan boya hücre içine girememekte ancak ölü hücreler boyanmış olarak görülmektedir. Her deneyde özgül üreme hızlarının (μ) hesaplanması için canlı hücre sayısının (X) logaritmasının, biyoproses süresine çizilen grafikten üstel üreme bölgesinin eğimi hesaplanarak bulunmuştur. Örnek olarak Şekil 3.4'te Batch 85'e ait hücre derişim-zaman eğrisi görülmektedir.

Her çalışma için 6-12 sa aralıklarla, yaklaşık 6-8 adet numune alınmış, her numune 1,5 mL'lik 4 adet tüpte muhafaza edilmiştir. Alınan numuneler 1000 d/dk'da, 5 dk süre ile santrifüj (90 g, Kubota Marka 5220 Model) edilmiştir. Supernatan 4 adet, 2 mL eppendorf tüplere alınarak önce -20°C ve sonra -86°C derin dondurucuda analizlere kadar muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Örnek BHK-21 Hücre üreme eğrisi (B85, çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \times 10^6$ hücre/mL)

3.4. BHK-21 An₃₀ Hücre Kültürüne Şap Virüsü Ekimi ve Toplanması

Tez çalışması Şap Enstitüsü Virüs Kültürü Laboratuvarı'nda endüstriyel ölçekte üretilmiş süspanse virüs kültürü ultrafiltrasyon yöntemiyle konsantre edilmiş ve steril olarak muhafaza edilen O₁ Manisa suşu tohum virüs olarak kullanılmıştır. Virüsler 1 mL'lik kriyotüplerde -86 °C'de stoklanmış, her virüs ekiminde aynı yöntemle çözündürülerek hücreler enfekte edilmiştir. Virüs Kültürü Laboratuvarında aşı virüsü üretiminde kullanılan ve enfektif titresini, (IT) 7.70 pfu/mL, 146S (X17) partikül miktarı 146S=18.54 µg/mL ve antijenik titresini 6x4 (AT, KFT: komplement fiksasyon testi) olan süspanse olarak üretime adapte O₁ Manisa tipi şap virüsü kullanılmıştır.

O₁ manisa tipi şap virüsünün ekimi için her hücre pasajı sonrasında serumsuz 6M besiyeri (pH 7.40–7.80) ile hazırlanan hücre süspansiyonundan alınarak 500 mL'lik manyetik karıştırıcı cam biyoreaktöre konulmuştur. Daha sonra, cam biyoreaktördeki süspansiyona %1 (v/v) O₁ Manisa tipi şap virüsü inoküle edilerek, manyetik karıştırıcı ortamda, 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve gerektiğinde pH ayarlaması (%7.5'lik, NaHCO₃ ilavesi) yapılmıştır. Biyoreaktörden örnek alınıp, mikroskopta incelenerek, hücrelerin tamamen enfekte olup olmadığı kontrol edilmiştir. 16-18 saatlik inkübasyon sonunda, bütün hücreler enfekte olduğunda enfektif titre (IT) ve antijenik titre (AT) tayini için biyoreaktörden 20 mL alınarak 3500 d/dk'da 30 dk santrifüj edilmiş ve supernatan 2 adet 15 mL hacimli santrifüj tüpüne 10 mL/tüp taksim edilerek, -86 °C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Virüs kültürleri 1 L hacimli manyetik karıştırıcı cam fermentörlerde 500 mL çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Üretilen virüslerden (pH 7,45-7.50) numuneler alınarak Enstitü Araştırma Laboratuvarında rutin testlere (IT, AT, 146S ve toplam protein (TP)) tabi tutulmuştur.

3.5. Hücre ve Virüs Kültürlerinde Kullanılan Besiyerleri (6M)

Çalışmada hücre ve virüs üretim proseslerinde kullanılan 6M besiyeri Şap Enstitüsü Vasat Hazırlama Laboratuvarında Şap Enstitüsü protokolünde (2004) bildirilen içerikte ve rutin olarak kullanılmakta olan besiyeridir.

6M besiyeri İngiltere Pirbright Hayvan Sağlığı Enstitüsü'nde 1966'da Telling ve Radlett isimli araştırmacılar tarafından bildirilmiş olup standart Eagle's Medium'a laktalbumin, vitamin, glikoz ve glutamin ilavesiyle zenginleştirilmiş ancak amino asit

içeriği düşürülmüş bir besiyeridir. Hücre üretimi yapılan besiyerine %10 (v/v) ticari sığır serumu katılırken virüs kültürü çalışmalarında besiyerinin bikarbonat içeriği %50 arttırılmıştır (Telling ve Radlett,1966). Çizelge 3.3'te 6M besiyeri içeriğine ait bilgiler verilmiştir.

Çizelge 3.3. 6M Besiyeri İçeriği (Radlett at al.,1971)

S.NO	İçerik	Miktar (mg/L)
1	NaCl	5.12
2	KCl	321.00
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	160.00
4	NaH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	112.00
5	CaCl ₂	160.00
6	Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.08
7	NaHCO ₃	2.20
8	Glikoz	6.20
9	TBP Powder	2.00
10	Fenol-red	8.00
11	Riboflovin	0.32
12	Choline Klorür	3.20
13	Folik asit	3.20
14	Nictonamide	3.20
15	Pyridoxal HCl	3.20
16	Tiamin (aneurine)HCL	3.20
17	DL-Pantorenik asit kalsiyum tuzu	3.20
18	L-Arginine	8.40
19	L-Cystine	4.80
20	L-Histidine	3.84
21	L-Isaleucine	10.48
22	L-Lysine HCl	14.62
23	L-Phenylalanine	6.60
24	L-Threonine	9.52
25	L-Tryptophan	1.60
26	L-Tyrosine	7.24
27	L-Valine	9.36
28	L-Methionine	3.00
29	L-Glutamine	470.00
30	Inositol	0.70
31	PluronikF68	1.00
32	Lactalbumin hydrolisate	5.00
33	Bovine serum	100.00
34	Antifoam emulsion	0.40

3.6. Test ve Analizler : Üretilen virüsler aşağıda belirtilen testlere tabi tutulmuştur. Çalışmalar sonucunda üretilen virüslerin 146 S partikül miktarı ölçümü ve Enfektif titre (IT) ve toplam protein (TP) tayinleri Şap Enstitüsü Üretim Aşaması Kontrol Laboratuvarında, antijenik titre (AT) ise Şap Enstitüsü Seroloji Laboratuvarında belirlenmiştir.

Yapılan Test ve Ölçümler :

- a) Enfektif titre (IT) : Plak test metodu
- b) Antijenik titre (AT) : Komplement fiksasyon testi (KFT)
- c) 146S partikül miktarı : Sükroz Yoğunluk Gradiyenti ile 146S partikül miktarının belirlenmesi (Sucrose-density gradient-centrifugation method)
- d) Hücre canlılık testi : Mikroskopik bakı (Tripan mavisi, Olympus CH40)
- e) Hücre Sayımı (X) : Hemasitometre (Bürker Lamı)
- f) Ozmolalite Ölçümü (pOsm): Ozmometre (Osmomat 3320 Osmometer, Advance Instrument, ABD)
- g) Total protein miktarı (TP) : Bicinchoninic asit yöntemi (BCA) test kiti (Thermo Scientific, ABD)
- h) Glikoz, laktat derişimleri : Glucose-TR, GOD-POD, Lactate, LO-POD. (Spinreact, İspanya) ve Hach Lange DR 5000 Spektrofotometre (Almanya)
- i) Amonyak derişimi : İyon seçici elektrot (Thermo Scientific, ABD) ve Consort 931 (Belçika) ile tespit edilmiştir.

3.6.1. Plak test yöntemi ile şap virüsü enfektif titresinin belirlenmesi

50 mL hacimli cam biyoreaktörlerde üretilmiş süspanse hücrelere O₁ Manisa tipi şap virüsü inokülasyonundan sonra toplanan virüs örneklerinin enfektif titreleri (IT) plak test metodu ile belirlenmiştir (Şap Enstitüsü protokolü 2004, Sütçü 1985). Plak test yöntemi, yarı katı bir ortamda, enfektif bir virionun tek tabaka üretilmiş hücrelere verilmesi tek bir hücreye girmesi, çoğalması ve etrafındaki hücreleri enfekte ederek bir üreme bölgesi (plak) oluşturması ve bu plakların sayısına bakarak enfektif titrenin (IT) belirlenmesi esasına dayanır (Şap Enstitüsü Protokolü, 2004).

Test Özeti : 6 gözlü hücre üretme tabaklarında monolayer olarak üretilmiş ve doyumluğa ulaşmış hücreler üzerine, test edilecek virüs süspansiyonu ayrı tüplerde farklı oranlarda seyreltilip eklenir. Virüslerin genellikle bir saat hücrelere adsorbe olmaları beklendikten sonra tabaklardaki sıvı boşaltılarak gözler agaroz gibi yarı katı bir kaplama sıvısı ile doldurulur. Böylece her bir virüs tanesinin sadece belirli noktalarda çoğalması sağlanmış olur. Virüsler, adsorbe oldukları hücrede çoğalmalarının ardından bitişikteki hücrelere geçerek onların da ölümüne neden olurlar. Belli bir inkübasyon periyodu sonunda kristal viyole ile boyanan tabaklarda her bir virüs partikülünün üreyerek çoğaldığı bölgelerde boyanmamış boşluklar halinde 'plak' oluşumu şekillenmiş olur. Başlangıçta yapılan seyreltme faktörleri de göz önünde bulundurularak oluşan plak sayısından o tabağa kaç tane canlı virüs eklenmiş olduğu anlaşılır ve enfektif virüs miktarı pfu/mL olarak hesaplanabilir.

3.6.2. Komplement fiksasyon testi (KFT) ile antijenik titrenin (AT) belirlenmesi

Virüs numunelerinin antijenik titreleri (AT), Kolmer metodu (Sütçü, 1985) esas alınarak Şap Enstitüsü protokolünde (2004) belirtilen mikro-komplement fiksasyon (KFT) yöntemiyle belirlenmiştir.

Test Özeti : Testin ilk basamağında seyreltme işlemleri (1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/6 ve 1/8) yapılan test numunesi, antikor ve komplement sistemiyle birlikte reaksiyona girer. Kısa süreli bir inkübasyondan sonra ikinci basamakta duyarlı hale getirilmiş eritrositler reaksiyon indikatörü olarak teste ilave edilir.

Eğer test numunesi antijen içeriyorsa, antikor–antijen kompleksi şekillenerek komplement bu komplekse bağlanacaktır. Inkübasyon sonunda ortamda komplement kalmayacağından teste eklenen eritrositler hemoliz olmaz ve düğme şeklinde tüplerin veya tabak gözlerinin alt kısmında çöker. Test numunesi antijen içermiyorsa antikor ile kompleks oluşmadığı için komplement kompleks yapıya bağlanamaz ve teste ilave edilen eritrositlerin erimesine (lisis) neden olur. KFT sonuçları duyarlı hale getirilmiş eritrositlerin % lisis oranlarına göre aşağıdaki şekilde değerlendirilir.

Düğme oluşumu tam, tepken (reaktant, reagent) renksiz ise +4

Düğme oluşumu %75, tepken hafif kırmızı ise	+3
Düğme oluşumu %50, tepken açık kırmızı ise	+2
Düğme oluşumu yok, tepken koyu kırmızı ve berrak ise	+1

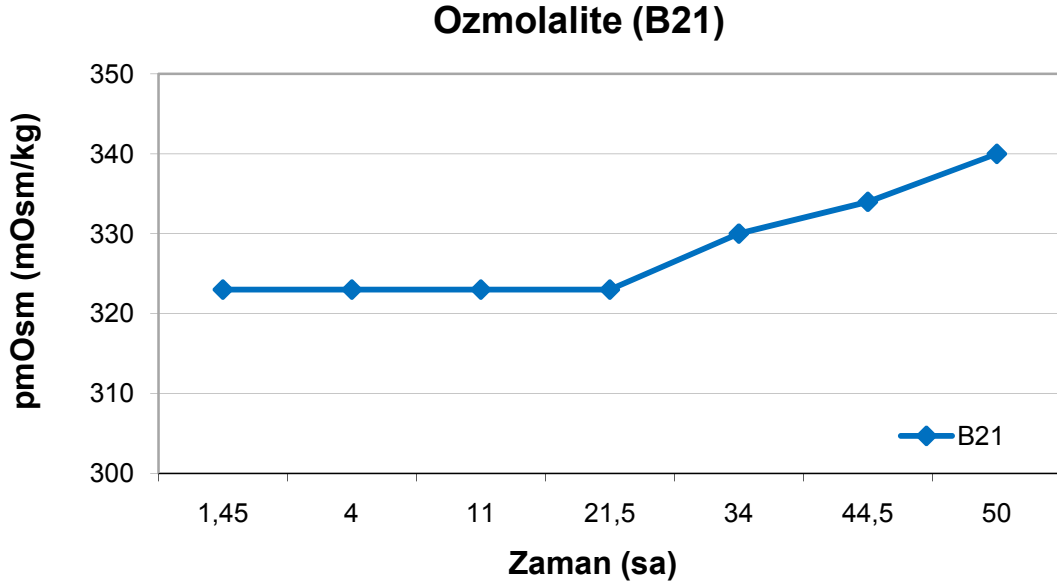
3.6.3. Sükroz yoğunluk gradiyenti ile 146S partikül miktarının belirlenmesi

O₁ Manisa tipi şap virüsü örneklerinin içerdiği 146S partikül miktarının belirlenmesi için Şap Enstitüsü Protokolünde (2004) belirtilen sükroz yoğunluk gradient santrifügasyon yöntemi ve sürekli akış UV spektrofotometre bir arada kullanılmıştır.

Test Özeti : Yüksek devirde yapılan santrifüj işlemi ile proteinlerin molekül ağırlıklarına göre sükroz gradiyenti içerisinde farklı katmanlar oluşturarak ayrılması esasına dayanır. Bu amaçla plastik tüp içerisinde NT tamponu içerisinde % 45'den başlayarak, %15'e kadar, yoğunundan az yoğununa doğru bir sükroz gradiyenti meydana getirildikten sonra bu gradiyentin üzerine 146S miktarı test edilecek örnek virüs solüsyonu ilave edilir. Bu şekilde hazırlanmış olan tüp yüksek devirde santrifüj edilirse her bir protein ve dolayısı ile 146S virüs partikülleri kendi yoğunluğu ile aynı olan sükroz bölgesine toplanır. Tüp içerisinde farklı bantlar halinde ayrılmış olan proteinler daha sonra tüpün altı, iğne ile delinip, peristaltik pompa yardımı ile doymuş sükroz çözeltisi UV spektrofotometreden ($\lambda=259$ nm) geçirilir. Numunedeki antijen yoğunluğuna göre absorbans genişliği az yoğun olanlar için 0.02, orta yoğunlukta 0.05 ve konsantre numuneler için 0.1 olarak belirlenir. Belirli bir zamandaki fraksiyon Şap virüsü 146 S partikülüne ait piki ifade eder. Bilgisayarda yazılım aracılığı ile bu pikin altındaki alandan o sıvıdaki 146S partikül miktarı bulunur ve $\mu\text{g/mL}$ cinsinden ifade edilir.

3.6.4. Ozmolalite ölçümleri

Alınan numunelerin santrifüj edilmesi ile elde edilen supernatanda tam otomatik donma noktası tayini esasına göre çalışan cihaz (Osmomat 3320 Osmometer, Advance Instrument) ile ozmolalite (pOsm) ölçümleri yapılmıştır. Düzenli olarak her ölçüm öncesi 290 mOsm/kg standart ile ozmometre kalibrasyonları yapılmıştır.



Şekil 3.5. Örnek ozmolalite (pOsm) grafiği (B21, $X_0 = 0.70 \times 10^6$ hücre/mL, $\text{ÇO} = \%30$, $\text{pH} = 7.30$, $N = 250$ d/dk, toplam 44mL NaHCO_3 kullanılmıştır)

Şekil 3.5'te örnek olarak B21'e ait ozmolalite grafiği görülmektedir. Çalışma koşulları; $X_0 = 0.7 \times 10^6$ hücre/mL, $\text{ÇO} = \%30$, $\text{pH} = 7.3$, $N = 250$ d/dk, olup biyoproseste pH kontrolü amacıyla toplam 44mL NaHCO_3 kullanılmıştır. Baz kullanımının özellikle üstel üreme fazında başlayıp biyoproses sonuna kadar devam ettiği görülmektedir.

3.6.5. BCA yöntemi ile toplam protein (TP) miktarının tespiti

Üretimin değişik aşamalarındaki virüs kültürü, konsantre virüs ve saflaştırma basamaklarındaki örneklerde toplam protein miktarının belirlenmesi BCA (Bicinchoninic acid) test kitleri ile yapılmaktadır. Test, bazik ortamda protein varlığı ile iki değerli bakırın bir değerli hale indirgenmesi ve bunun bicinchoninic asit içeren bir kimyasal yardımıyla oluşan renk değişimi ile ölçülebilir hale gelmesi temeline dayanmaktadır.

Test Özeti : Önce toz veya sıvı BSA (bovine serum albumin) ile 2 mg/mL protein derişimde olan ana stok çözelti hazırlanır. Sonra gerekli derişim işlemleri bir dizi sulandırma yapılarak gerçekleştirilir. Her aşamada pipet değiştirilir ve vortexleme yapılır. İşlem bittikten sonra her bir derişim basamağı porsiyonlara bölünerek -20°C'de muhafaza edilir. Dilüent olarak UP su (ultra saf su) kullanılır. Örnekler "konsantre virüs" ve "saflaştırma basamak" örnekleri olarak ikiye ayrılır. Konsantre örnekler UP su kullanılarak 1:40, diğerleri 1:20 oranında cam şişelerde seyreltilir.

Şişelerin ağızları kapatılarak vortex cihazında karıştırılır. Her şişeden 3'er mikropate gözüne 25'er µl aktarılır. Albumin standartlarının sulandırılmalarından 3'er göze her göze 25'er µl aktarılır. UP su toplam 9 göze 25'er µl "kör çözelti (blank)" olarak aktarılır. 50 kısım tepken (reagent) A ile 1 Kısım tepken B birleştirilir. Bu çalışma karışımından 200'er µl her göze konarak 30 dakika 37°C etüvde bekletilir. Süre sonunda tabağın oda sıcaklığına gelmesi için 5 dakika beklenir.

Sonuçların değerlendirilmesinde, tepkime sonucu oluşan yeşilden mora renk değişimi 562 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okunur. Standart BSA sulandırılmalarının verdiği grafik değerlerine göre örneklerin protein derişimleri µg/ml olarak belirlenir.

3.6.6. Glikoz ve laktat analizleri

Çalışmada besiyerinde bulunan glikoz miktarları Spinreact (İspanya) firmasına ait glikoz test kitiyle (Glucose-TR, Glucose Trinder.GOD-POD, Ref. No: 1001190), laktat miktarları ise yine Spinreact firmasına ait laktat test kitiyle (Lactate, LO-POD. Enzymatic colorimetric, Ref. No: 1001330) tayin edilmiştir.

Test Özeti :

Glikoz ve laktat test kitlerinin genel çalışma prensibi glikoz veya laktatın spesifik enzimleriyle okside edilmesi ve oluşan hidrojen peroksitin (H_2O_2) kinona (quinone) dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Glikoz oksidaz (GOD) glikozun glikonik aside oksidasyonunu katalizler. Oluşan hidrojen peroksit peroksidaz (POD) varlığında kromojenik oksijen alıcısı (acceptor) fenol-aminofenazon ile kinon bileşimini oluşturur. Laktat ise laktat oksidaz (LO) enzimiyle piruvat ve hidrojen peroksite oksitlenir. Oluşan hidrojen peroksit 4-aminofenazon (4-AP), 4-klorofenol ile peroksidaz (POD) enzimi varlığında kinonu oluşturur. Reaksiyonlar sonunda oluşan rengin yoğunluğu besi ortamında bulunan glikoz ve laktat derişimi ile orantılı olup 505 (490-550) nm'de absorbanlar ölçülerek derişimleri belirlenir. Analiz için test kitleri içerisinde bulunan primer standartlardan seyreltmeler yapılarak kalibrasyon çözeltileri hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri çıkartılmıştır.

Biyoproses sırasında belirli aralıklarla alınan besiyeri numuneleri 2 mL kriyotüpler içerisinde -20 °C ve -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Bu numuneler analiz

öncesinde hızla çözündürülerek analiz edilmiştir. Numuneler kare quartz küvetlerde çalışma reaktifi ile reaksiyona bırakılmış ve Hach Lange® DR 5000 UV-VIS spektrofotometre ile 505 nm’de ölçümleri yapılmıştır. Glikoz ölçümleri için birer dakika aralıklarla 30 dakika boyunca absorbanslar ölçülmüş ve en yüksek değer dikkate alınmıştır. Laktat ölçümlerinde ise 5-10 dakikalar arasındaki absorbans değeri esas alınmıştır. Test kitleri içerisinde bulunan liyofilize enzimler yöntemlerine uygun olarak kitler içerisinde bulunan tamponlar ile birleştirilerek çalışma reaktifi oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiğinin eldesinde ve numunelerin analizlerinde sadece çalışma reaktifi ve NaCl çözeltisinden (9 g/L, Merck) elde edilen absorbans değeri kör (blank) olarak değerlendirilmiştir.

Glikoz analiz yöntemi

1. Test kiti içerisinde bulunan bir şişe liyofilize enzim (R2) tampon çözeltisi (R1) içeren şişede çözülerek çalışma reaktifi hazırlanır. Hazırlanan çalışma reaktifi 2-8°C’de saklanır.
2. Spektrofotometre 505 nm’ye ayarlanır.
3. Okumalarda 1 cm ışık yollu kare kuvartz küvet (Hach Lange) kullanılır.
4. Spektrofotometrenin sıfırlanması distile su ile yapılır.
5. Kalibrasyon standartları Çizelge 3.4’e göre hazırlanır. Primer standart olarak test kitinde bulunan 100 mg/dL glikoz (Glucose CAL) kullanılır ve seyreltmeler distile su ile hazırlanmış 9 g/L NaCl çözeltisi ile yapılır.

Çizelge 3.4. Kalibrasyon standartlarının hazırlanması

S. No	Glikoz derişimi (mg/dL)	Alınan 100 mg/dL glikoz primer standart hacmi (µL)	Eklenen NaCl çözeltisi hacmi (µL)	Final Hacim (µL)
1	100	10	0	10
2	80	800	200	1.000
3	60	600	400	1.000
4	40	400	600	1.000
5	20	200	800	1.000
6	0	0	10	10

6. Analiz için küvete 1 mL çalışma reaktifi ve 10 µL standart/numune konur.

7. Çalışma reaktifi ve standart/numune içeren küvet hafifçe çalkalanarak karışım sağlanır ve oda sıcaklığında (20-25°C) 15 dk inkübasyona bırakılır.
8. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 1 dk arayla 30 dk boyunca absorbanslar okunur. En yüksek absorbans değeri kaydedilir.
9. Kör (blank) değeri olarak 1 mL çalışma reaktifi ve 10 µL tuz çözeltisinin vermiş olduğu absorbans değeri esas alınır.
10. Numune ve standartların absorbans değerinden körün absorbans değeri çıkarılarak net absorbanslar elde edilir.
11. Derişime karşı net absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilir.
12. 100 mg/dL üzerinde glikoz içeren numuneler 9 g/L NaCl çözeltisi ile seyreltilir.
13. Çözelti hazırlanmasında distile su kullanılır.
14. Dönüşüm faktörü : $\text{mg/dL} \times 0.0555 = \text{mmol/L}$ glikozdur.

Laktat analiz yöntemi

Glikoz analiz yöntemi basamakları ile aynı olup aşağıdaki farklılıkları içerir:

1. Test kiti içerisinde bulunan bir şişe tampon çözeltisi (R1) liyofilize enzim (R2) içeren şişeye eklenerek çalışma reaktifi hazırlanır. Hazırlanan çalışma reaktifi 2-8°C'de saklanır.
2. Kalibrasyon standartlarının hazırlanmasında primer standart olarak test kitinde bulunan 10 mg/dL laktat (Lactate CAL) kullanılır. Seyreltmeler distile su ile hazırlanmış 9 g/L NaCl çözeltisi ile yapılır. Son hacim 1 mL olacak şekilde 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/dL laktat içeren standart çözeltiler hazırlanır.
3. Çalışma reaktifi ve standart/numune içeren küvet hafifçe çalkalanarak karışım sağlanır ve oda sıcaklığında (20-25°C) 10 dk inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 1 dk arayla 10 dk boyunca absorbanslar okunur. 5-10 dk arasındaki absorbans değeri kaydedilir.
5. 10 mg/dL üzerinde laktat içeren numuneler 9 g/L NaCl çözeltisi ile seyreltilir.
6. Dönüşüm faktörü : $\text{mg/dL} \times 0.1123 = \text{mmol/L}$ laktattır.

3.6.7. Amonyak (NH₃) analizleri

Besiyerinde bulunan amonyak miktarının tayininde Thermo Scientific (ABD) Orion marka yüksek performans iyon seçici elektrot (High Performance Ammonia Ion Selective Electrode) kullanılmıştır.

Ölçümlerde Consort C931 (Belçika) cihazı mili voltmetre olarak kullanılmıştır. Cihaza yüksek performanslı amonyak iyonu seçici elektrot (Thermo Scientific) takılmış ve cihazdan çıkış olarak mV sinyali okunmuştur. Derişime karşı mV değerleri yarı logaritmik skala kullanılarak kalibrasyon grafiği çıkartılmıştır. Kalibrasyon çözeltileri için primer standart olarak amonyum klorür (NH₄Cl, VWR BDH Prolabo, Belçika) çözücü olarak distile su kullanılmıştır. Yüksek derişimden başlanarak derişimler 10'ar kat azalacak şekilde seri seyreltmeler yapılarak kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin derişimleri 0.1 M, 0.01 M, 0.001 M, 0.0001 M, 0.00001 M'dir. Standart/numune pH değerinin ayarlanmasında ISA (Ionic Strength Adjuster: İyonik şiddet ayarlayıcı) kullanılmıştır. 5 mL hacimli tüpün içerisine 1 mL standart/numune ve 20 µL ISA konmuş, tüpün kapağı kapatılarak karıştırılmış, ardından mV değer ölçümleri yapılmıştır. Sabit mV değer okununcaya kadar karıştırma devam ettirilmiştir.

Elektrot çalışma prensibi ve test özeti :

Numune içinde çözünmüş amonyak hidrofobik gaz-geçirgen membrandan difüzyon yolu ile geçer ve membranın her iki tarafındaki amonyak kısmi basıncı eşit oluncaya kadar bu geçiş devam eder. Verilen herhangi bir amonyak kısmi basıncı derişimle orantılıdır. Membrandan difüze olan amonyak doldurma sıvısı içinde çözünür ve aşağıdaki reaksiyon gerçekleşir.



Amonyak, amonyum iyonu ve hidroksit arasındaki ilişki aşağıdaki denklem ile verilir.

$$[\text{NH}_4][\text{OH}]/[\text{NH}_3] = \text{sabit} \quad (3.2)$$

Elektrot doldurma sıvısı yüksek seviyede amonyum klorür içerir ve amonyum iyonu sabit kabul edilebilir.

$$[\text{OH}] = [\text{NH}_3].\text{Sabit} \quad (3.3)$$

Elektrodun hissedici elemanının iç referans elemanı arasındaki potansiyel Nernst denkleminde ifade edilir;

$$E = E_0 - S \log [\text{OH}^-] \quad (3.4)$$

Burada;

E : Ölçülen elektrot potansiyeli

E₀ : Referans potansiyel

OH⁻ : Sıvı içindeki hidroksit derişimi

S : Eğim değeri (-59.2 mV/10 katlık derişim farkı)

Hidroksit derişimi amonyak derişimi ile orantılı olduğu için elektrodun amonyak cevabı da Nernst denkleminde uymaktadır.

$$E = E_0 - S \log [\text{NH}_3] \quad (3.5)$$

Referans potansiyel (E₀) kısmen doldurma solüsyonu içindeki sabit seviyedeki klorür iyonuna iç referans elektrodun cevabı ile belirlenir.

Amonyum İyonu :

Amonyak suda çözündüğünde hidronyum iyonu ile reaksiyona girer ve amonyum iyonu oluşur;



Amonyak ve amonyum iyonu dengesi pH'a göre değişir. Asidik çözeltilerde hidrojen iyonu kolayca ulaşılabilir olduğundan neredeyse tüm amonyak amonyum iyonuna dönüşür. pH 9.3 iken amonyağın yarısı amonyum iyonuna dönüşmüştür. Şayet pH biliniyorsa amonyak-amonyum oranı teorik olarak hesaplanabilir. Bu reaksiyon için denge sabiti;

$$[\text{NH}_4^+]/([\text{H}_3\text{O}^+][\text{NH}_3]) = [\text{NH}_4^+]/(10^{-\text{pH}}[\text{NH}_3]) = K \cdot 10^{-9.3} \quad (3.7)$$

(25°C, $\mu=0.1$ ve $\text{pK}=9.3$)'dır.

Amonyum-amonyak oranı aşağıdaki gibi verilebilir (Martell et al., 1974);

$$[\text{NH}_4^+]/[\text{NH}_3] = K \cdot 10^{-\text{pH}} = 10^{9.3-\text{pH}} \quad (3.8)$$

K'nın değeri sıcaklık ve iyonik şiddetin fonksiyonudur.

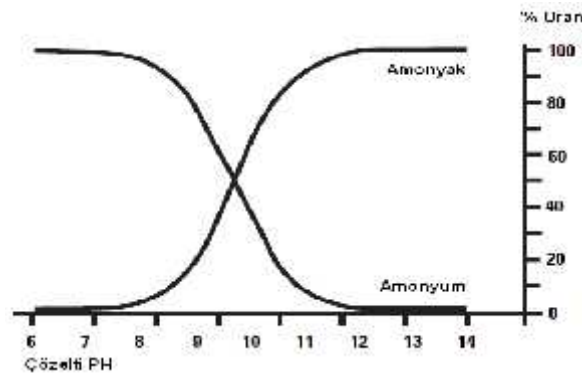
Amonyak kısmi basıncı :

Çözünmüş amonyak gazının kısmi basıncı Henry yasasına göre amonyak derişimi ile ilişkilidir.

$$K_H = [\text{NH}_3]_{\text{sıvı}}/p_{\text{NH}_3} = 56 \text{ mol/L-atm (25°C)} \quad (3.9)$$

K_H : Henry yasası sabiti olup sıcaklık ve çözünen cinsine bağlıdır.

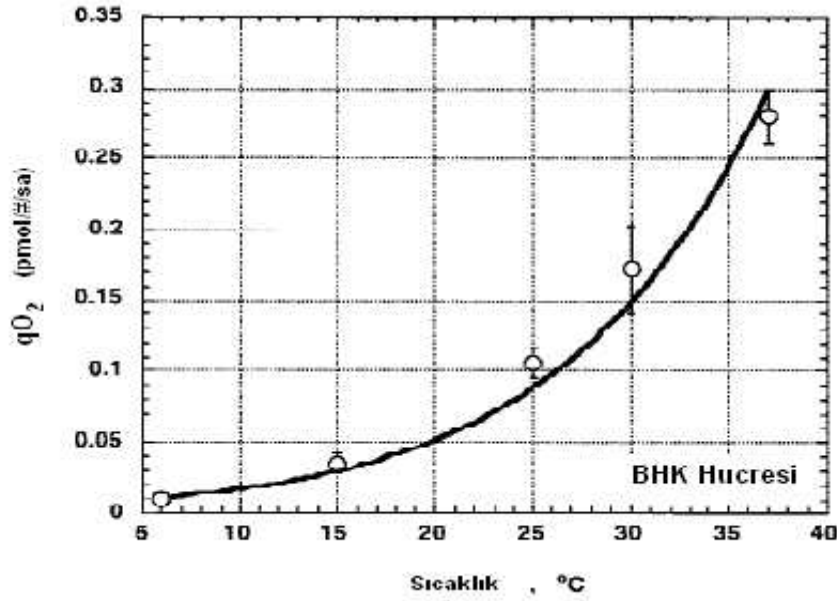
Şekil 3.6'da görüleceği gibi $\text{pH} \geq 12$ olduğunda amonyumun tamamı amonyak gazı formuna dönmektedir.



Şekil 3.6. pH'ın fonksiyonu olarak % amonyak-amonyum oranları (Yüksek performanslı amonyak elektrodu kullanım kılavuzu, 2007).

3.6.8. Dinamik metotla özgül oksijen tüketim hızı (qO_2) ve k_La hesabı

Özgül oksijen tüketim hızının (qO_2) hesaplanması amacıyla birçok yöntem bildirilmiştir. Bu çalışmada uygulama kolaylığı açısından qO_2 hesabı için dinamik yöntem seçilmiştir. Dinamik metodun en önemli avantajı gerçek üretim koşullar altında hacimsel kütle transfer katsayısının (k_La) tespitine imkan vermesidir. Besiyeri sıcaklığı hücrelerin qO_2 tüketimi için çok önemli bir parametredir. Şekil 3.7'de BHK hücreleri için sıcaklığa (T) bağlı olarak qO_2 'nin değişimi görülmektedir. qO_2 'nin en fazla olduğu sıcaklığın 37°C olduğu görülmekte olup bu nedenle çalışmalar bu sıcaklıkta yürütülmüştür.



Şekil 3.7. *BHK 21* hücresinin özgül oksijen tüketim hızının (qO_2) sıcaklığa (T) bağlı değişimi (Jordani P., 1999).

Özellikle endüstriyel hücre üretimi yapılan biyoproseslerde şayet qO_2 biliniyorsa OTH yardımı ile son hücre sayısı (X) pratik olarak hesaplanabilir (Kargı, 2006). Zhou (1994,1995), ancak dinamik metot ile qO_2 on-line bir ölçüm metodu değildir.

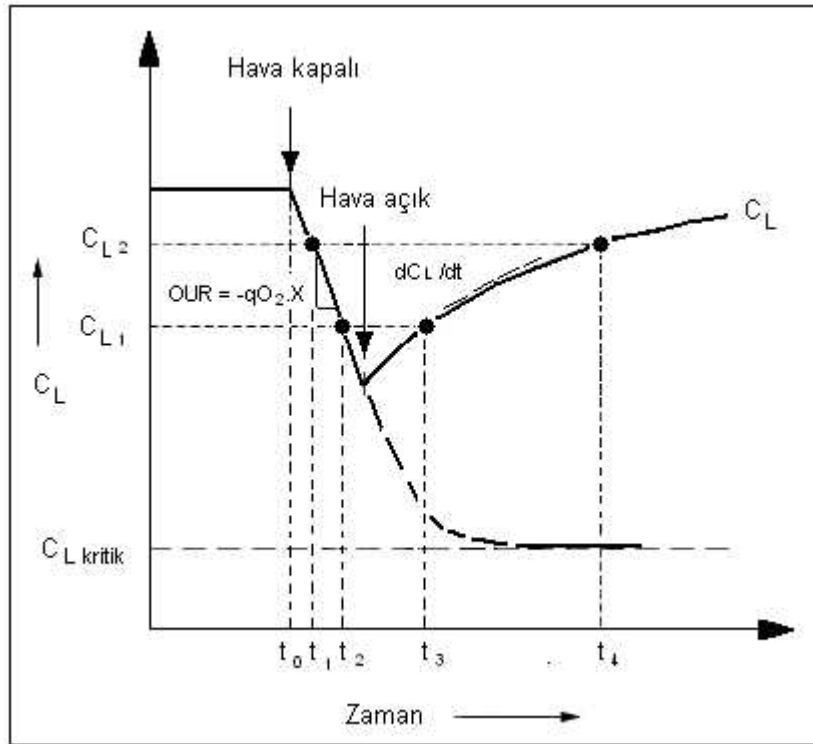
Dinamik metot, X 'in tespiti için kullanılabilecek etkin, güvenilir ve dolaylı bir yöntemdir (Perissmann, 1997). Dinamik metotla yapılan qO_2 ölçümlerinde yüzey havalandırma katkısı göz önüne alınarak düzeltme yapılmaktadır.

Yarı-kesikli üretimde on-line oksijen tüketim hızı (OTH) ölçümü yapıp hibridoma hücrelerinin metabolik ihtiyaçları belirlenerek ve verimli besleme stratejileri oluşturularak biyoproseste verimlilik artırılabilir. Çalışma sonuçları hücre metabolizmasının besleme stratejileri ile değiştirilebileceği ve hücre metabolizmasının okditatif seçeneğe yönlendirilebileceği ancak bunun bir adaptasyon süresi gerektirdiğini ortaya koymuştur (Zhou, 1997). Hibridoma hücreleri ile yapılan çalışmada OTH ile besin tüketimi arasında korelasyon olduğu ve OTH ölçümü ile yarı-kesikli üretim metodunda dinamik konsantre besin ilavesinin kontrol edilebileceği bildirilmiştir (Zhou et al., 1995).

Sunulan tez çalışmasında, optimum nokta doğrulama deneylerinde qO_2 'nin tespiti amacıyla belirli aralıklarla ölçümler yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle canlı hücre sayımı yapılarak X belirlenmiştir. Daha sonra $\dot{C}O$ set değeri %60-70'e kadar arttırılmıştır. Biyoreaktör havalandırma sistemi (gaz giriş ve çıkışları) kapatılarak $\dot{C}O$ 'nin zamanla değişim grafiği bilgisayar yazılımı ile alınmıştır. $\dot{C}O$ değerinin kritik değerin altına düşmesini önlemek için $\dot{C}O$ %20 olduğunda biyoreaktör tekrar havalandırılmaya başlanmıştır. Zhou ve Hu (1994) tarafından bildirildiği şekilde $\dot{C}O$ %30-50 arası gözlenen değişim grafiği OTH hesabı için kullanılmıştır (Ruffieux et al., 1998). Sistemde kullanılan $\dot{C}O$ probu tepki süresinin 20-25 sn olarak ölçüldüğü ve yapılan dinamik ölçümlerin yaklaşık 20-30 dk devam ettiği, bu ölçüm sonuçlarının ilk ve son kısımlarının değerlendirilmeye alınmadığı için gerçek $\dot{C}O$ değeri biraz daha düşük olmasına rağmen bunun eğimi değiştirmedığı göz önüne alınarak düzeltme yapılmasına gerek görülmemiştir.

qO_2 ; canlılık oranı, metabolik aktivite ve X açısından anlamlı bir parametredir. Hayvan hücrelerinin oksijen ihtiyacı hücre hattına göre ve çalışma koşullarına göre değişmekle birlikte BHK-21 hücresi için $qO_2=0.2 \mu M O_2 10^{-6}$ hücre. sa^{-1} (Radlett et al., 1972) ve $qO_2=0.28 \mu M O_2 10^{-6}$ hücre. sa^{-1} bildirilmiştir (Jordani et al., 1999).

Ortam koşulların en iyi olduğu üstel üreme evresinde birim hücre başına düşen özgül oksijen tüketim hızı (qO_2) değişmemektedir (Preissmann, 1997). Şekil 3.8'de gösterilen doğrunun eğimi $mol O_2 zaman^{-1}$ cinsinden OTH'nı verir. Biyoreaktör içine verilen gazın akışı kesilerek (OAH=0) $\dot{C}O$ miktarındaki doğrusal azalma (Şekil 3.6) takip edilerek biyoreaktörü denetleyen yazılım tarafından dönüştürülerek hücre derişimine bağlanabilir. Bu şekilde oluşturulacak kalibrasyon grafiği ile X belirli limitler içinde öngörülebilir (Singh et al., 1989). Eğrinin yataylaşmaya başladığı nokta hücreler için kritik oksijen derişimi olarak değerlendirilir ve biyoproses sırasında $\dot{C}O$ derişimi mutlaka kritik noktanın üzerinde tutulur. OTH ölçümlerinde oksijen kısıtlaması olmaması amacıyla $\dot{C}O$ derişimi alt sınırı genellikle %20 olarak seçilir (Preissmann, 1997).



Şekil 3.8. Dinamik yöntemle oksijen tüketim hızı (OTH) ve k_La 'nın belirlenmesi

Oksijen için yatışkın olmayan durumda havalandırma yapılırken kütle denklığı yapıldığında;

$$dC_L/dt = OAH - OTH \quad (3.10)$$

$$dC_L/dt = k_La(C^* - C_L) - qO_2 \cdot X \quad (3.11)$$

Havalandırma kapatılınca $OAH = 0$ olduğundan,

$$dC_L/dt = -OTH = qO_2 \cdot X \quad (3.12)$$

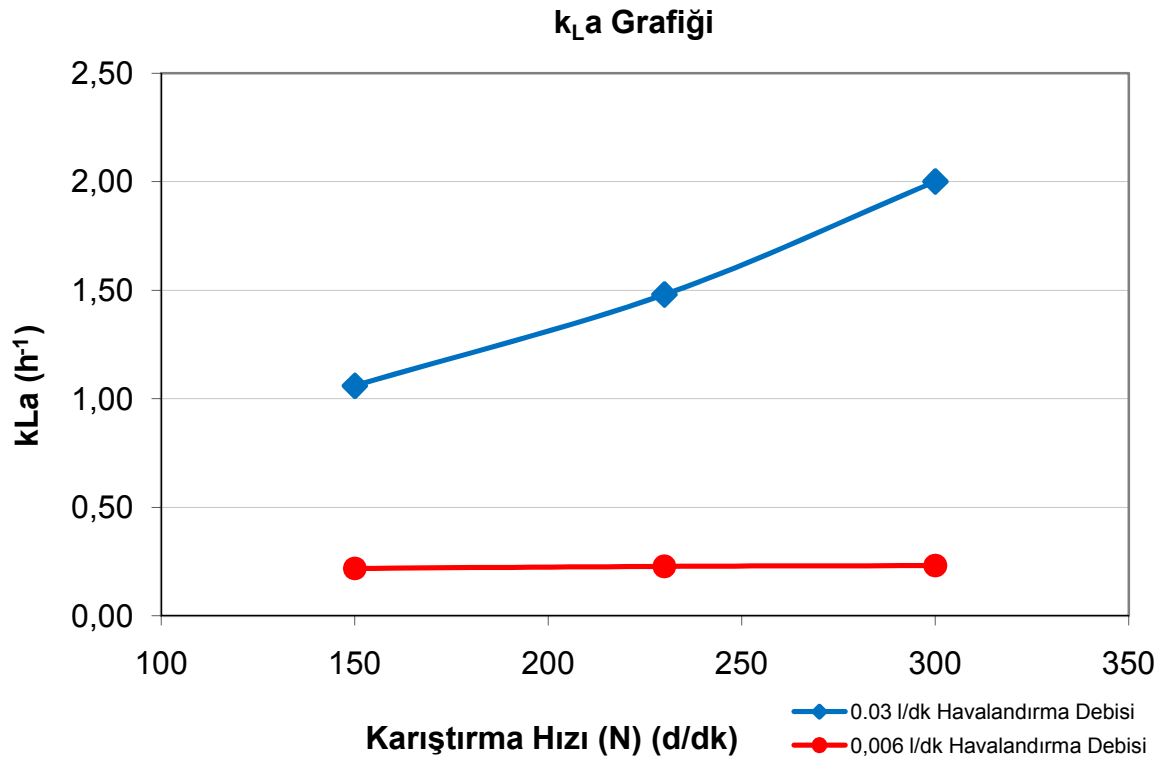
$$X = \frac{OTH}{qO_2} \quad (3.13)$$

bulunabilir.

Şekil 3.9'da karıştırma hızı $N=150, 230, 300$ d/dk ve havalandırma debisi 0.006 L/dk ve 0.03 L/dk yapıldığında elde edilen hacimsel kütle transfer direnci (k_La) grafiği görülmektedir. Grafikten deney çalışmalarının $k_La = 0.2-2$ sa^{-1} gibi düşük hacimsel kütle transfer direnci (k_La) değerlerinde yürütüldüğü görülmektedir. Zhu (1996)'nın tarif ettiği dinamik yöntem kullanılarak X 'in öngörülmesi, riskli ve yorucu bir süreç olan hücre sayımı ile prosesin izlenme yöntemi ve optimizasyonu kolaylaştıracak, numune alımı sırasındaki kontaminasyon riski ve sarf maliyetlerini

azaltacaktır. On-line tekniğin uygulanabilmesi için tüketimin yaklaşık 0.05 mM O_2 /sa (yaklaşık olarak 10^5 hücre/mL hücre derişimindeki tüketim) olması gereklidir (Singh, 1996).

Biyoreaktörlerde frekans konvertörü ile karıştırıcı devir ayarı yapılarak k_La artırılabilir veya havanın oksijen ile zenginleştirilmesi sonucu sürücü güç artırılarak değişen ihtiyaca göre oksijen transferi hızlandırılabilir. Makrosparging ile havalandırma yapıldığında k_La 1-20 sa^{-1} arasında değişmektedir. Mikro-kabarcık kullanıldığında ise k_La 'nın 50-80 sa^{-1} aralığında değiştiği rapor edilmiştir (Zhang et al., 1992).



Şekil 3.9. Deneylerde kullanılan havalandırma sistemine ait havalandırma debisi ve karıştırma hızına (N) bağlı k_La grafikleri

Ancak teorik hesaplamalar ile pratik uygulamalar arasında farklar ortaya çıkmakta bunun nedeni olarak kabarcık çap farkları ve ÇO probunun cevap süresi gösterilmektedir. ÇO problemleri için genel tepki süresi 20-90 s'dir. Bu çalışmada kullanılan ÇO probu için bu değer 20-25 sn olarak tespit edilmiştir. Az hücre sayısı ve tepki süresi kısa olan problemlerle yapılan ölçümlerde tepki süresinden gelen

farklar ihmal edilebilir. Ancak tepki süresi uzun ve hücre derişimi yüksek ise OTH ve $k_L a$ hesaplarında düzeltme gereklidir (Jordani et al., 1999).

3.7. Deney Yöntemi

Yapılan deneylerde mümkün olduğunca yüksek son hücre derişimi (X) ve 146S değerlerinin elde edilmesi için en uygun koşulların oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin üretim prosesine uygulanabilmesi için Şap Enstitüsündeki üretim sistemi temel alınmıştır. Bu nedenle bugün Enstitüde kullanılan yöntem olan tekrarlı-kesikli üretim yöntemi (repeated batch) deney sistemine uygulanmıştır. Böylece daha çok laboratuar ortamında yapılan çalışmalardan ziyade gerçek üretim prosesi taklit edilmeye çalışılarak elde edilen verilerin prosese uygulanabilmesi amaçlanmıştır.

Deneyde makro-sparger kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla standart aksesuarlarla ve mikro-sparger ile yapılan ön denemelerde tespit edilen sorunlar göz önüne alınarak yeni bir sparger tasarlanmış ve denemelerde başarılı sonuçlar alındığı için bu sistemin kullanılmasına karar verilmiştir. Makro-sparger ile uygun süpürme yapılarak pH kontrolüne yardımcı olunması ve baz kullanımının azaltılması amaçlanmış, önceki denemelerde kullanılan baz miktarı 3-10 kat arasında azaltılabiliştir. Böylece etkin bir ozmolalite (pOsm) kontrolü sağlanarak, kontrol edilememesinden kaynaklı sonuçların prosesi etkilemesi önlenmiştir. Yine ön çalışmalarda pOsm 400-450 mOsm.kg⁻¹ iken makro-sparger kullanılmasıyla pOsm 320-350 mOsm.kg⁻¹ aralığında tutulmuş ve böylece inhibisyon yapacak limit olan pOsm 370 mOsm.kg⁻¹ değerine ulaşması engellenmiştir. Biyoreaktörde kontrol edilmeyen diğer bir parametre olan pCO₂ yine makrosparging ile süpürülerek uzaklaştırılmış, inhibisyon yapmayacak ve pH kontrolünü güçleştirmeyecek seviyelerde tutulmuştur. Yapılan çalışmanın başarısı; sistemde pH düşüşü yaşanmaması ve daha az baz kullanımı, doğrulama deneylerindeki hücre sayılarının literatürde bildirilmiş olan en yüksek son hücre sayılarına daha kısa biyoproses süresinde çıkması ile açıklanabilmektedir. ÇO kontrolü endüstriyel amaçlı üretimdeki gibi derin hava ile yapılmış, yüzey havalandırması uygulanmamıştır. Her bir deneyin çalışma şartları diğerinden farklı olduğu için kontrollerde farklı PID (Proportional-Integral-Derivative kontrol) parametreleri

kullanılmış ve deney süresince sisteme gerekli görüldüğünde uygun kontrol için müdahale edilmiştir.

Deneylerin yapıldığı biyoreaktör Sartorius, Biostat B Plus (2-L, ikiz tip) biyoreaktör olup çalışma hacmi 1.5 L olarak belirlenmiştir. Karıştırma için 3-segmentli, 5.3 cm çaplı karıştırıcı kullanılmıştır. pH elektrodu olarak Hamilton Easyferm Plus K8 200-225 jelli elektrot kullanılmıştır. pH elektrodu sterilizasyon öncesi pH'ı 7.01 ve 9.21 olan (Hamilton) standart çözeltiler ile kalibre edilmiştir. Çözünmüş oksijen (ÇO) kontrolü için polarografik Oxyferm FDA 225 elektrodu (Hamilton) kullanılmıştır. Biyoreaktörler otoklava konulmadan önce içerisine 1 L deiyonize (DEI) su konulmuştur. 121°C'de sıvı sterilizasyonuna tabi tutulan ve soğuyan biyoreaktör kontrol panosuna montajı yapılarak, ÇO probu gece boyunca (en az 6 saat) polarizasyona bırakılmıştır. Polarizasyonu sağlanan ÇO elektrodu, biyoproses başlamadan önce saf azot (N₂) gazı ile %0 ve hava ile %100 su içerisinde kalibre edilmiştir. Oksijenin DEI su ve besiyerinde çözünürlüğünden gelecek fark hesap edilmiş, 6M besiyerinin DEI su ile kıyaslandığında %95 oranında oksijen çözebildiği tespit edilmiştir. Biyoproses sıcaklığı 37°C olarak uygulanmış, sıcaklık kalibrasyon cihazı ile sıcaklık sensörlerinin kalibrasyonları doğrulanmıştır. İşlemler tamamlandıktan sonra biyoreaktör içindeki DEI su birlikte steril edilen boş 2 L hacimli şişeye steril olarak transfer edilmiştir. Klas II A biyogüvenlik kabini (Holten Maxisafe 2010) içinde hücre ve besiyerinin aseptik olarak biyoreaktöre bağlantısı yapılmış ve steril koşullarda transfer edilmiştir. Bu çalışmalar sırasında demontaj işlemi yapılmadan ve cihaz- prob bağlantıları sökülmeden biyogüvenlik kabininde çalışılabilmesi için sistem biyogüvenlik kabinine yakın bir noktaya kurulmuştur. Doğal akış ile biyoreaktör içine alınan hücre ve besiyerinin deney tasarımındaki parametrelerine hızlı bir şekilde getirilmesinden sonra hücreler üremeye bırakılmıştır. pH kontrolü için hava, CO₂ gazı ve %7.5'lik hazırlanmış sodyum bikarbonat (NaHCO₃) kullanılmıştır. Deneylerde önce optimuma yakın koşullarda çalışılmış ve son deneyde uç koşullar çalışılarak mümkün olduğunca hücre metabolizmasının değişmesi önlenmiş ve sonraki deneyde problem yaşanması engellenmiştir. Hücre üretim prosesinde 6-12 saat aralıklarla 6-9 numune alınarak canlı ve ölü hücre sayımları hemositometre ile yapılmıştır. Sayım sonuçlarına göre hücre üreme eğrileri ve üreme hızları hesaplanmıştır. Analizler için alınan numuneler, 1000 d/dk'da 5 dk santrifüj edilip 2 mL eppendorf tüplere taksim

edilerek (4 adet) önce -20 °C sonra -86 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Deneylerin bitimini müteakip stoklanan numunelerin glikoz, laktat, amonyak (NH_3^+) ve pOsm ölçümleri yapılmıştır. Biyoprosesin sonlandırılmasından sonra üretilen hücreler Virüs Kültürü Laboratuvarına gönderilerek virüs ekimleri yapılmış, üretilen virüsler Enstitü çalışmalarına uygun olarak 146S partikül miktarı ölçümü, IT ve TP tayinleri Enstitü Üretim Aşaması Kontrol Laboratuvarında, AT analizleri Enstitü Seroloji Laboratuvarında glikoz-laktat ve amonyak tayinleri Enstitü ve Hacettepe Üniversitesi laboratuvarlarında belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Tez çalışmasında; şap virüsü üretiminde kullanılan ve karıştırıcılı biyoreaktörlerde kesikli üretim yöntemiyle süspanse olarak üretilen BHK-21 An₃₀ hücrelerinin kritik çalışma koşullarının (pH, N, ÇO, X₀) optimum değerleri, etki dereceleri belirlenmiştir. Anahtar işletme parametrelerinin (çalışma koşullarının) birbirleriyle olan ilişkilerinin, maksimum hücre sayısına (X), 146S partikül miktarına, hücre özgül üreme hızına (μ), antijenik titreye (AT), enfektif titreye (IT), laktat/glikoz oranına (Y_{lak/gli}), amonyak oluşum hızına (NH₃) ve toplam protein (TP) miktarına etkilerinin tespiti ve değerlendirilmesi amacıyla DX 7.0 (Design Expert 7.0, deneme sürümü) programı ile istatistiksel deney tasarımı gerçekleştirilmiş ve matematiksel modeller geliştirilmiştir.

4.1. Son Hücre Sayısı (X) Anova Testi Sonuçları

Design Expert 7.0 orijinal çıktısından alınmış olan son hücre sayısı (X) için Anova testi sonuçları aşağıdaki gibidir. İstatistik programı tarafından “*kuadratik*” model öngörülmüştür. Çizelge 4.1.’de görüldüğü gibi uygun istatistiksel değerler elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. Son hücre sayısına (X) ait modelin istatistik değerleri

Std. Dev.	242893	R-Squared	0,958
Mean	2368667	Adj R-Squared	0,924
C.V. %	10,25	Pred R-Squared	0,848
PRESS	3,42E+12	Adeq Precision	16,084

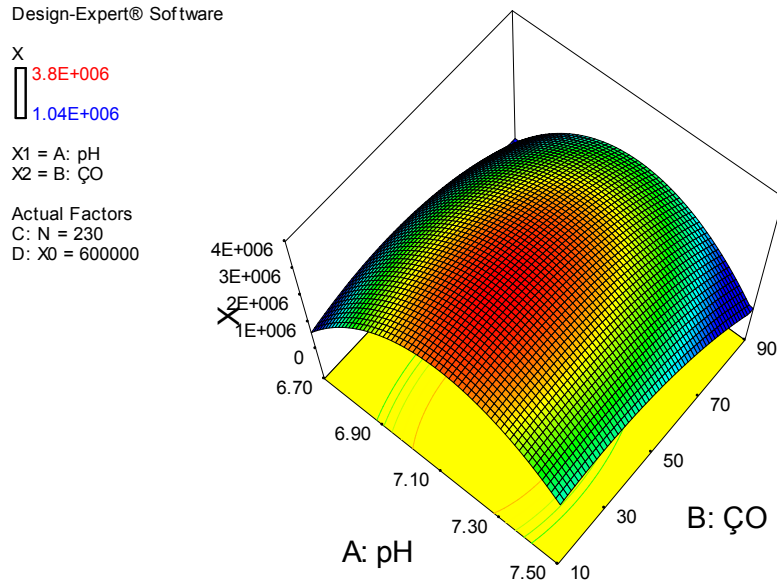
Modele ait son hücre sayısını (X), çalışma koşullarına göre (pH, ÇO, N, X₀) veren objektif fonksiyon aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} X = & -713707268,40 + (201380281,2 * \text{pH}) + (196876,8 * \text{ÇO}) - (13745,2 * \text{N}) - (10,8 * \text{X}_0) \\ & - (17398,2 * \text{pH} * \text{ÇO}) + (7951,8 * \text{pH} * \text{N}) + (3,59 * \text{pH} * \text{X}_0) - (0,0669 * \text{ÇO} * \text{X}_0) \\ & - (0,0055 * \text{N} * \text{X}_0) - (14349456,79 * \text{pH}^2) - (504,06 * \text{ÇO}^2) - (84,82 * \text{N}^2) \end{aligned}$$

Anova yüzey-cevap modeli incelendiğinde (EK 1) son hücre sayısı (X) için deneysel çalışma aralıklarında başlangıç hücre sayısının (X₀) ve karıştırma hızının (N) parametre ağırlıklarının oldukça önemli olduğu görülmektedir.

i) **Son hücre sayısı (X) - pH - çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi**

Şekil 4.1’de çalışma koşulları karıştırma hızı $N=230$ d/dk ve başlangıç hücre sayısı $X_0=0.60 \times 10^6$ hücre/mL olduğunda, son hücre sayısı (X), pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi görülmekte olup pH 7.00-7.30 ve ÇO=%20-50 bölgesi son hücre sayısının (X) maksimum olduğu bölge olarak izlenmektedir. Yüksek ve düşük çalışma pH’sı ve yüksek çözünmüş oksijen (ÇO) derişimlerinin BHK-21 hücresinin üremesini inhibe ettiği görülmektedir.



Şekil 4.1. Son hücre sayısı (X)-pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi (çalışma koşulları; $N=230$ d/dk, $X_0=0.60 \times 10^6$ hücre/mL)

Literatürde özellikle alkali ortamlarda yüksek çözünmüş oksijen (ÇO) seviyelerinin hayvan hücreleri üzerinde oldukça toksik etkiler oluşturduğu bildirilmiştir (Hu, 2007). Şekil 4.2.ve Şekil 4.3. incelendiğinde, yüksek besiyeri pH’sı ile yapılan çalışmada ÇO’nin etkisinin artan ÇO derişimi ile arttığı görülmektedir. Bu durumda diğer çalışma parametreleri aynı iken ($N=230$ d/dk ve $X_0=0.60 \times 10^6$ hücre/mL) yüksek çalışma pH’sı için düşük ÇO ($\text{ÇO}=\%30 \pm 5$) ve düşük çalışma pH’sı için biraz daha yüksek ÇO ($\text{ÇO}=\%40 \pm 5$) son hücre sayısını maksimum yapan ÇO değerleri olarak görülmektedir.

Design-Expert® Software

X

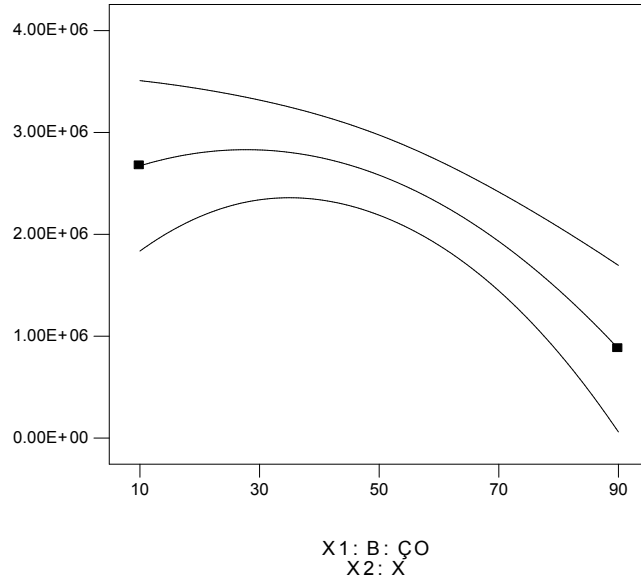
X1 = B: ÇO

Actual Factors

A: pH = 7.40

C: N = 230

D: X0 = 600000



Şekil 4.2. Yüksek besiyeri pH'sında çözülmüş oksijen (ÇO) - son hücre sayısı (X) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.40, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Design-Expert® Software

X

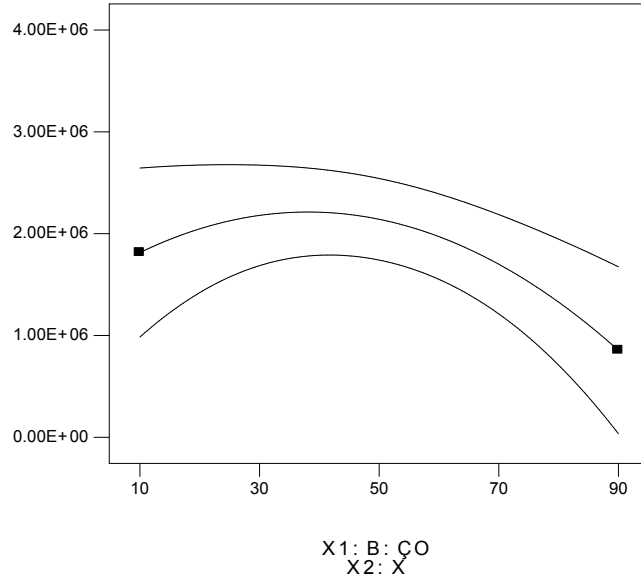
X1 = B: ÇO

Actual Factors

A: pH = 6.80

C: N = 230

D: X0 = 600000

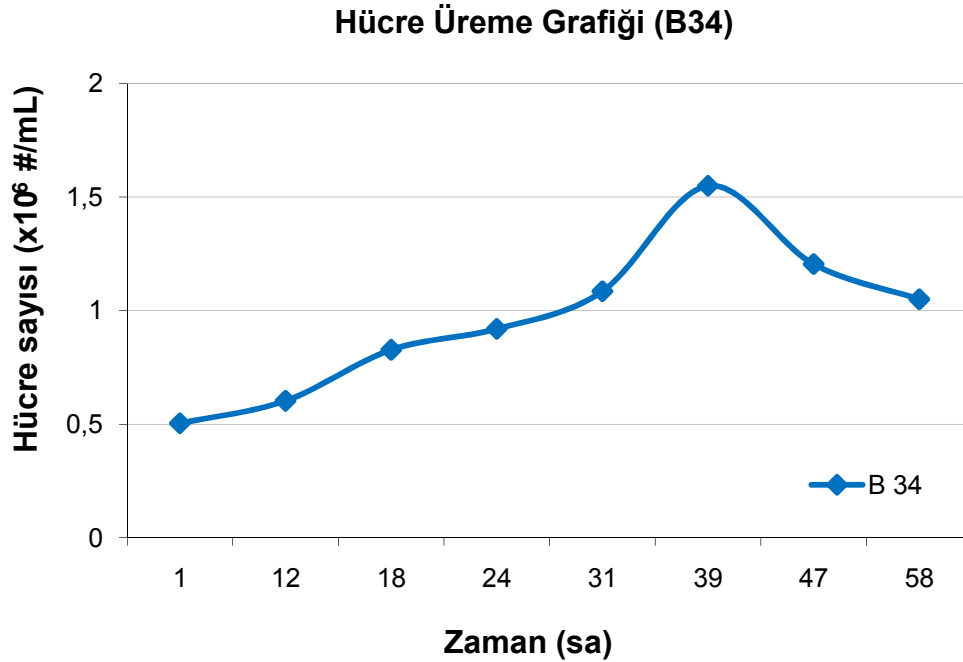


Şekil 4.3. Düşük besiyeri pH'sında çözülmüş oksijen (ÇO) - son hücre sayısı (X) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=6.80, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Elde edilen bu sonuçlar yüksek besiyeri pH'sında (alkali ortamlarda) yapılan çalışmalarda yüksek ÇO derişiminin X'e daha olumsuz etki ettiğini göstermekte olup besiyeri pH'sı ve ÇO ilişkisi açısından Hu (2007)'nin sonuçları ile uyumludur.

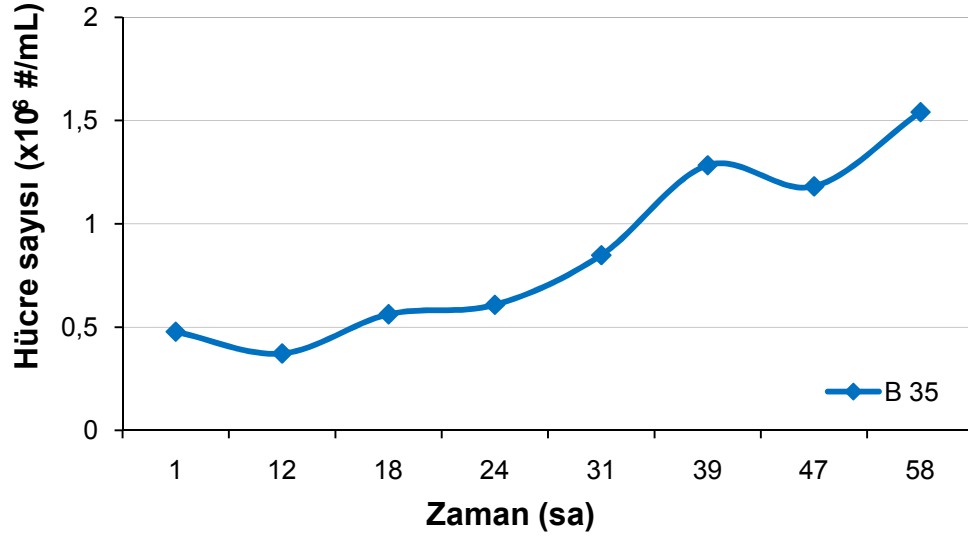
ii) Son hücre sayısı (X) - pH ilişkisi

Son hücre sayısı (X) ve pH ilişkisini göstermek için B34 ile B35 deneyleri incelenebilir. Bu deneylerde pH dışında çalışma koşulları ($N=250$ d/dk, $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL, $\text{ÇO}=\%50$) aynıdır. Çalışma pH'sı ise B34 için $\text{pH}=7.50$ ve B35 için $\text{pH}=6.70$ 'tır. Son hücre sayıları (X) her iki çalışmada da $X=1.20 \cdot 10^6$ hücre/mL olarak gerçekleşmiştir. Üstel üreme evresinde özgül üreme hızları (μ) B34 ve B35 için sırasıyla $\mu=0.029 \text{ sa}^{-1}$ ve $\mu=0.035 \text{ sa}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.4 ve 4.5'te B34 ve B35'e ait BHK-21 hücrelerinin üreme eğrileri görülmektedir. yüksek pH ($\text{pH}=7.50$) değerinde yapılan çalışmada (B34) hücrelerin 39. saatte oldukça erken ve hızlı bir şekilde ölüme geçtikleri gözlenmiştir. B35'te daha düşük pH ($\text{pH}=6.70$) değerinde üreme hızı düşük olsa da hücrelerin 48. saate kadar ölüme geçmediği görülmektedir. B35 için adaptasyon evresinde hücre sayısında düşüş gözlenmiş olmasına rağmen B34 için benzer bir durumun gözlenmemiştir. Şekillerden görülen diğer bir husus ise B34'e ait hücre üreme eğrisinde adaptasyon evresinin kısa, buna karşılık B35 için bu evrenin normalden uzun olduğudur.



Şekil 4.4. B34'e ait hücre üreme eğrisi (çalışma koşulları; $\text{pH}=7.50$, $N=250$ d/dk, $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL, $\text{ÇO}=\%50$)

Hücre Üreme Grafiği (B35)



Şekil 4.5. B35'e ait hücre üreme eğrisi (çalışma koşulları; pH=6.70, N=250 d/dk, $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL, ÇO=%50)

BHK-21 hücrelerinin düşük pH değerlerinde (pH=6.60-7.00) yüksek pH değerlerine göre daha kolay ürediği ve hafif alkali ortamda özellikle pH=7.60'nın üzerindeki değerlerde hücrelerin aşırı zarar gördüğü bildirilmiştir (Girard, 1973). Girard (1973)'in aksine literatürde hayvan hücrelerinin düşük pH değerlerinden daha fazla etkilendiğine dair bilgiler de verilmiştir (Hu, 2007).

Design-Expert® Software

X

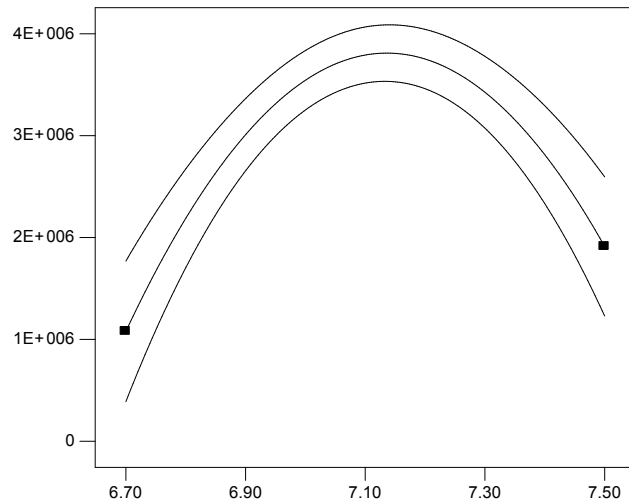
X1 = A: pH

Actual Factors

B: ÇO = 30

C: N = 225

D: X0 = 600000



X1: A: pH

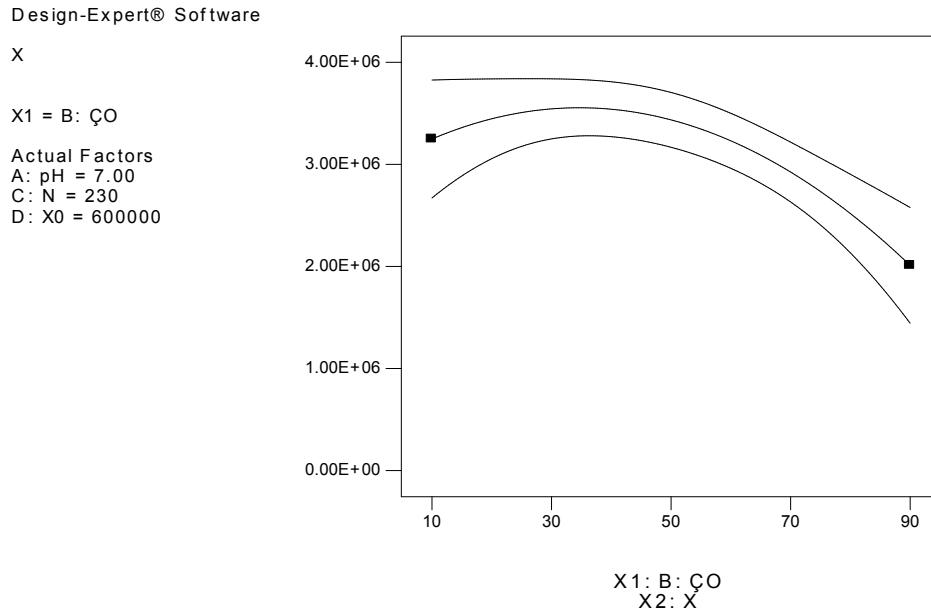
X2: X

Şekil 4.6. Son hücre sayısı (X)-pH ilişkisi (çalışma koşulları; ÇO=%30, N=225 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL).

Şekil 4.6. incelendiğinde elde edilen son hücre sayılarının (X) B34 ve B35'te aynı ($X=1.20 \cdot 10^6$ hücre/mL) olması nedeniyle düşük çalışma pH'sı ile yüksek çalışma pH'sı arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. B34 ve B35 deneylerinde elde edilen son hücre sayılarının (X) doğrulama deneylerinde elde edilen son hücre sayılarına ($X \approx 3.50 \cdot 10^6$ hücre/mL) göre çok düşük olması nedeniyle literatürden farklı sonuçlar elde edildiği söylenebilir. Çalışma sonuçlarına göre (çalışma koşulları; $\text{ÇO}=\%30$, $N=225$ d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL) BHK-21 hücrelerinin son hücre sayısı (X) açısından düşük ve yüksek pH değerlerinden benzer şekilde etkilendiğini söylemek mümkündür.

iii) Son hücre sayısı (X) - çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi

Literatürde hayvan hücrelerinin çözünmüş oksijen (ÇO) ihtiyaçlarının hücre hattına ve çalışma koşullarına göre değiştiği bildirilmiş ve optimum ÇO değerleri için çok farklı sonuçlar verilmiştir (Lightfoot, 1986). Hibridoma hücreleri ile yapılan çalışmada %10 ÇO'da son hücre sayısında (X) %20 oranında azalma bildirilmiştir (Öztürk et al., 1990b). Şekil 4.7'de merkez deneylerinde ÇO %50 derişiminde son hücre sayısı $X \approx 3.50 \cdot 10^6$ hücre/mL iken ÇO %10 ve ÇO %90 da bu değerler sırasıyla $X \approx 2.86 \cdot 10^6$ hücre/mL ve $X \approx 2.51 \cdot 10^6$ hücre/mL olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 4.7. Çözünmüş oksijen (ÇO) – son hücre sayısı (X) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL),

Bu da son hücre sayısı açısından ÇO %10 için yaklaşık %20'lik bir azalmayı, ÇO %90 için ise %30'luk bir azalmayı ifade etmektedir.

BHK-21 hücrelerinin Öztürk (1990b)'ün çalışmasındaki hibridoma hücrelerine göre düşük çözünmüş oksijen (ÇO) derişimlerinden benzer şekilde etkilendiği ancak yüksek ÇO derişimlerinden düşük derişimlere göre daha fazla olumsuz etkilendiği söylenebilir. Artan ÇO derişimi ile son hücre sayısında (X) gözlenen düşüşün hayvan hücre üretimi proseslerinde bildirilmiş olan oksidatif hasarlardan kaynaklandığı öngörülebilir. Aynı zamanda yüksek ÇO derişimleri yüksek havalandırma oranları gerektireceğinden havalandırma kaynaklı hücre hasarlarının artması da söz konusudur. Bu durumda biyoprosesin hücre üremesini inhibe etmeyecek en düşük çözünmüş oksijen (ÇO) derişiminde yürütülmesinin son hücre sayısı (X) açısından daha uygun olacağı söylenebilir.

iv) **Son hücre sayısı (X) - karıştırma hızı (N) ilişkisi**

Literatürde 1 L ve 1.2 L çalışma hacmine sahip biyoreaktörlerle ve süspanse olarak üretimi yapılan hibridoma hücrelerinin incelendiği bir çalışmada karıştırma hızı $N=190-220$ d/dk arasındayken hücrelerin özgül üreme hızlarında (μ) ani düşüşler gözlemlendiği bildirilmiştir (Kunas, 1990; Handa et al., 1987). Karıştırma hızından (N) kaynaklanan hücre hasarları biyoreaktörlerin tasarım özelliklerine göre değişmekle birlikte genel olarak karıştırma hızı $N=150-350$ d/dk aralığında başladığı ifade edilmiştir (Kunas, 1990). Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda BHK-21 hücrelerinin üretimi için 100-300 devir aralığı taranmıştır. Karıştırma hızının $N>230$ d/dk olduğu biyoproseste elde edilen son hücre sayılarında (X) düşüş ortaya çıkmıştır. Karıştırma hızından (N) kaynaklı hücre sayılarındaki düşüşün literatürde bildirildiği gibi ani düşüşten ziyade parabolik bir eğri şeklinde olduğu gözlenmiştir. Karıştırma hızı $N=200$ d/dk ve $N=300$ d/dk'da yapılan çalışmalarda ulaşılan son hücre sayıları (X) arasında yaklaşık %5-10 fark ortaya çıkmakta ve yüksek karıştırma hızlarında son hücre sayısı (X) azalmaktadır. Şekil 4.8'de verilen çalışma koşullarında son hücre sayısı (X) ve karıştırma hızı (N) ilişkisi incelendiğinde maksimum hücre sayısına (X_{max}) $N=230\pm10$ d/dk karıştırma hızında ulaşıldığı ve bu karıştırma hızının altında ve üstünde ulaşılan son hücre sayısında (X) düşüşlerin ortaya çıktığı görülmektedir.

Design-Expert® Software

X

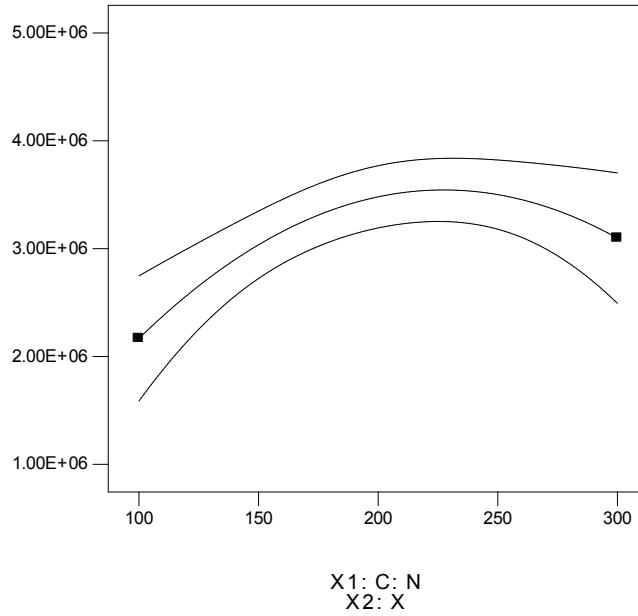
X1 = C: N

Actual Factors

A: pH = 7.00

B: ÇO = 30

D: X0 = 600000



Şekil 4.8. Karıştırma hızı (N) ve son hücre sayısı (X) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Yapılan çalışma ile hücre hasarlarının başladığı karıştırma hızı (N) için yayınlarda verilmiş olan geniş aralıklar yerine bu çalışmada kullanılan BHK-21 hücresi ve biyoreaktör için oldukça dar bir aralıkta ve $N=230 \pm 10$ d/dk (impeller Reynolds sayısı $Re_i \approx 17.000$) olarak tespit edilmiştir.

v) Son hücre sayısı (X)-karıştırma hızı (N)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi

Şekil 4.9. incelendiğinde verilen çalışma koşullarında (pH=7.00, ÇO=%30) son hücre sayısı (X) açısından başlangıç hücre sayısının (X_0) çok önemli bir parametre olduğu görülmektedir. Son hücre sayısını (X) maksimum yapan başlangıç hücre sayısı $X_0=0.60-0.80 \cdot 10^6$ hücre/mL ve karıştırma hızı $N=230 \pm 10$ d/dk olarak görülmektedir.

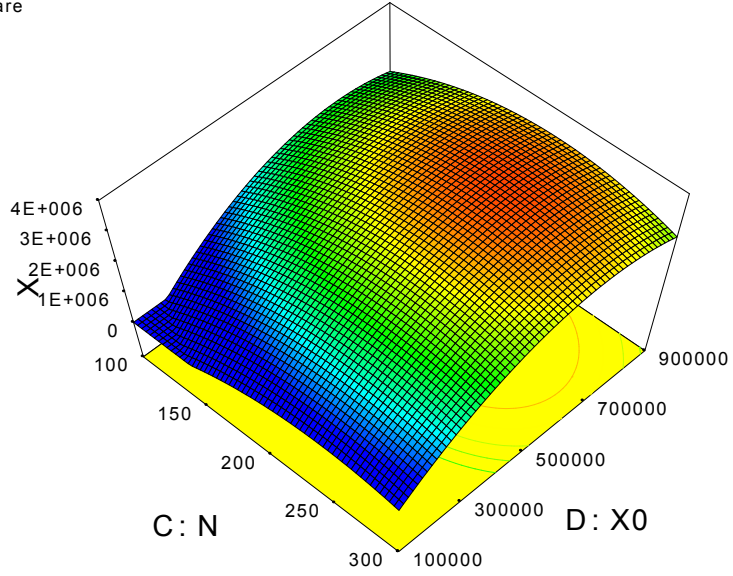
Son hücre sayısı (X), düşük başlangıç hücre sayısı (X_0) ve düşük karıştırma hızlarında (N) minimum olarak izlenmektedir. Ancak şekilden başlangıç hücre sayısının (X_0) son hücre sayısını (X) etkileyen çok önemli bir çalışma koşulu olduğu görülmektedir.

Design-Expert® Software

X
3.8E+006
1.04E+006

X1 = C: N
X2 = D: X0

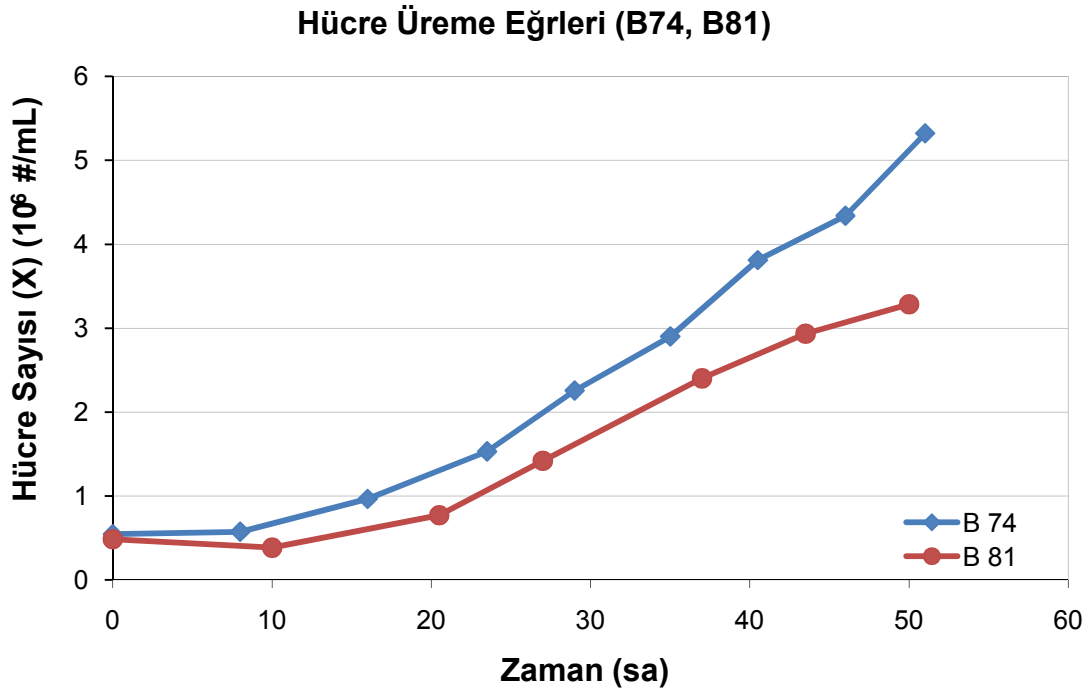
Actual Factors
A: pH = 7.00
B: ÇO = 30



Şekil 4.9. Son hücre sayısı (X) – karıştırma hızı (N) – başlangıç hücre sayısı (X₀) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30)

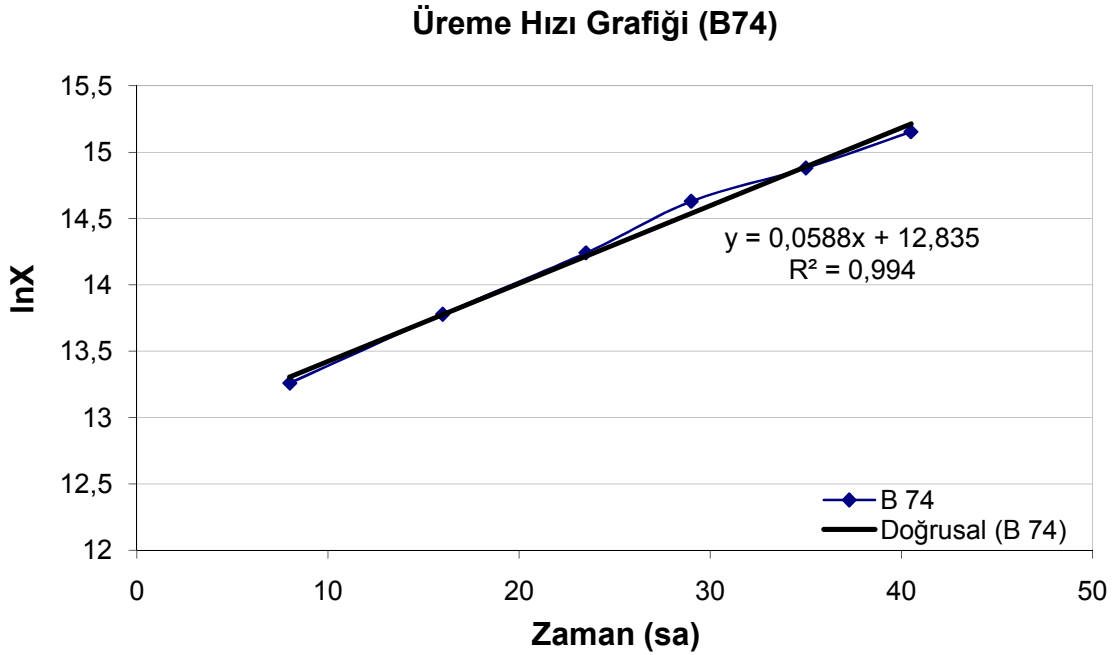
vi) Son hücre sayısı (X) - özgül üreme hızı (μ) ve besiyeri ilişkisi

Doğrulama deneyleri incelendiğinde besiyeri değişikliği yapılan B89'da (besiyeri-2) son hücre sayısının $X=5.95 \cdot 10^6$ hücre/mL olduğu görülmektedir. Besiyeri-2'nin kullanıldığı B74 ve besiyeri-1'in kullanıldığı B81'e ait üreme grafiklerinden B81'in B74'ten yüksek özgül üreme hızına (μ) sahip olduğu görülecektir. Ancak aynı biyoproses süresinde son hücre sayısında (X) tersine bir durum söz konusu olup B74'ün son hücre sayısının (X) B81'e göre neredeyse iki katı olduğu görülmektedir. Bu çelişkili gibi görünen durum hücrelerin maksimum özgül üreme hızında (μ_{max}) geçirdikleri sürelerle açıklanabilmektedir. Şekil 4.10. incelenirse B74 için özgül üreme hızı $\mu=0.0588 \text{ sa}^{-1}$ olmasına rağmen üstel üreme evresinde geçirilen süre 32.5 saat ve son hücre sayısı $X=5.32 \cdot 10^6$ hücre/mL'dir. B81 için özgül üreme hızı $\mu=0.0694 \text{ sa}^{-1}$ olmasına rağmen üstel üreme evresinde geçirilen süre 27 saat ve son hücre sayısı $X=3.28 \cdot 10^6$ hücre/mL'dir. Genel olarak besiyeri-1 ile yapılan çalışmalarda hücreler 25-30 saat maksimum özgül üreme hızında (μ_{max}) kaldıkları halde besiyeri-2'de bu süre 35-40 saat olarak gerçekleşmiştir. İkinci fark ise B74 ve B81 durağan evre süreleri arasındaki farktır. B74 için durağan evre süresi yaklaşık 8 saat iken B81 için 13 saat görünmektedir.

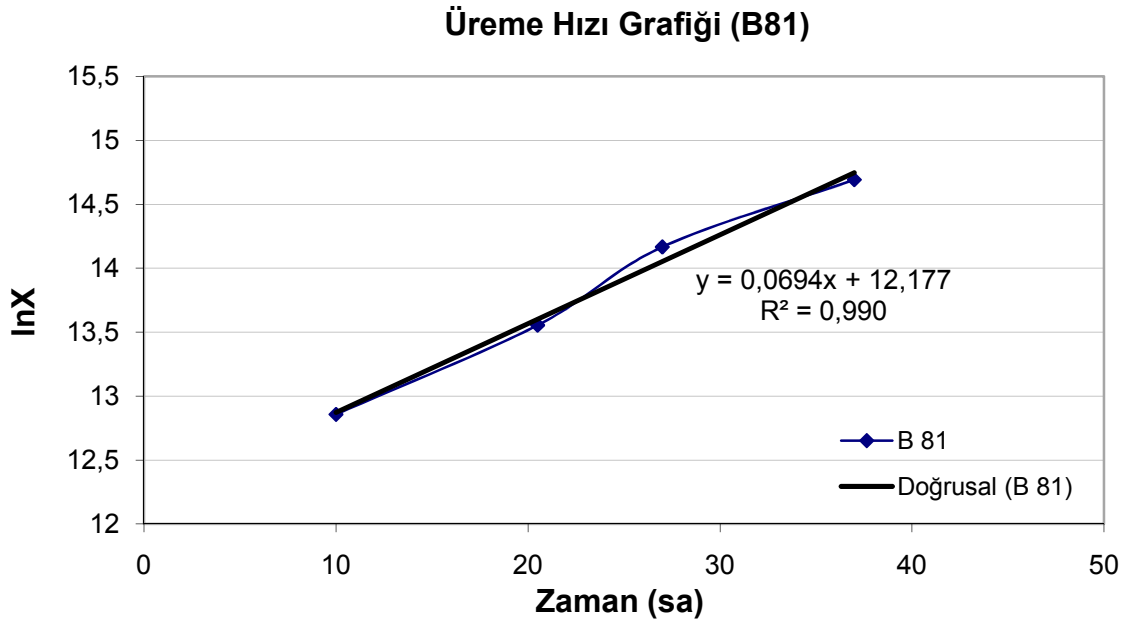


Şekil 4.10. B74 (besiyeri-2) ve B81 (besiyeri-1) hücre üreme eğrileri, çalışma koşulları aynı ancak besiyeri farkı vardır (besiyeri değişiklikleri verilmemiştir.) (pH=7.10, ÇO=%50, N=300 d/dk, $X_0=0.50 \times 10^6$ hücre/mL).

Şekil 4.11. ve 4.12. incelendiğinde sırasıyla B74 ve B81'e ait maksimum özgül üreme hızında geçirilen sürelerin değişimi görülebilir.



Şekil 4.11. B74 için maksimum özgül üreme hız grafiği ($\mu=0.0588 \text{ sa}^{-1}$, besiyeri-2 kullanıldı, çalışma koşulları; pH=7.10, ÇO=%50, N=300 d/dk, $X_0=0.50 \times 10^6$ hücre/mL)



Şekil 4.12. B81 için maksimum özgül üreme hızı grafiği ($\mu=0.0694 \text{ sa}^{-1}$, besiyeri-1 kullanıldı, çalışma koşulları; pH=7.10, ÇO=%50, N=300 d/dk, $X_0=0.50 \times 10^6$ hücre/mL)

Sonuç olarak maksimum özgül üreme hızının ($\mu=\mu_{\max}$) hücre üreme kabiliyetini ve son hücre sayısını (X) ifade etmede tek başına yeterli bir veri olmadığı yapılan çalışmalarda mutlaka üstel üreme evresinde geçirilen sürenin de verilmesi gerektiği söylenebilir.

4.2. 146S Partikül Miktarı Anova Testi Sonuçları

Design Expert 7.0 orijinal çıktısından alınmış olan 146S partikül miktarı için Anova testi sonuçları aşağıdaki gibidir. İstatistik programı tarafından “*kuadratik*” model öngörülmüştür. Çizelge 4.2’de 146S partikül miktarına ait modelin istatistik değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.2. 146S partikül miktarına ait modelin istatistik değerleri

Std. Dev.	0,108	R-Squared	0,911
Mean	0,834	Adj R-Squared	0,807
C.V. %	12,935	Pred R-Squared	0,732
PRESS	0,387	Adeq Precision	11,065

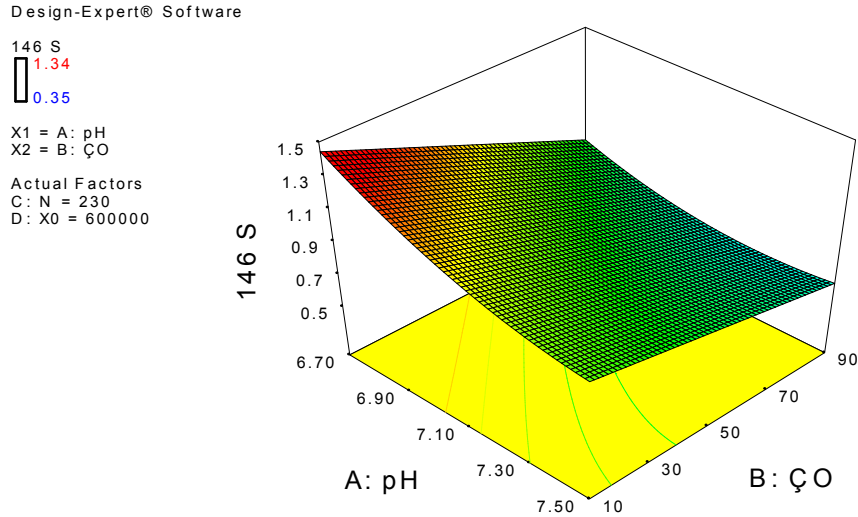
Modele ait 146S partikül miktarına ait objektif fonksiyon aşağıda verilmiştir.

$$146S = 51,547 - (11,534 \cdot \text{pH}) - (0,030 \cdot \text{ÇO}) - (0,088 \cdot \text{N}) + (0,005 \cdot \text{pH} \cdot \text{ÇO}) \\ + (0,013 \cdot \text{pH} \cdot \text{N}) + (0,589 \cdot \text{pH}^2)$$

Anova yüzey-cevap modeli sonuçları incelendiğinde (EK 2) 146S partikül miktarı açısından yapılan çalışma aralıklarında pH ve çözünmüş oksijen (ÇO)'in parametre ağırlıklarının oldukça önemli olduğu görülmektedir.

i) **146S partikül miktarı – pH – çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi**

Şekil 4.13.'te verilen çalışma koşulları için 146S partikül miktarının düşük pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) derişimlerine paralel olarak arttığı ve hücreye ait çalışma koşullarının 146S partikül miktarını yaklaşık 2 kata varan oranlarda değiştirdiğı görülmektedir. Özellikle düşük ÇO derişimlerinde üretilen hücrelere ait 146S partikül miktarlarının yüksek olmasının bir sebebi de, zaten düşük çözünmüş ÇO göre metabolizmasını



Şekil 4.13. 146S-pH-ÇO ilişkisi (çalışma koşulları; N=230 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

düzenlemiş olan hücrelerin, virüs kültürü sırasında çözünmüş oksijen kontrolü yapılmaması nedeni ile bu ortama çabuk adapte olmaları ve bunun da virüsün çoğalmasına olumlu etki edebileceğidir. pH artışının 146S partikül miktarını düşürmesinde; yüksek çalışma pH'sında besiyerine dışarıdan baz ilavesinin gerekli olması, dolayısıyla besi ortamının ozmolalite (pOsm) artışı, ilave edilen bazın hücre yüzey reseptörleri üzerinde olumsuz etki yapması ve artan havalandırma oranlarının olumsuz etkileri sayılabilir.

ii) 146S partikül miktarı-karıştırma hızı (N)-başlangıç hücre sayısı (X₀) ilişkisi

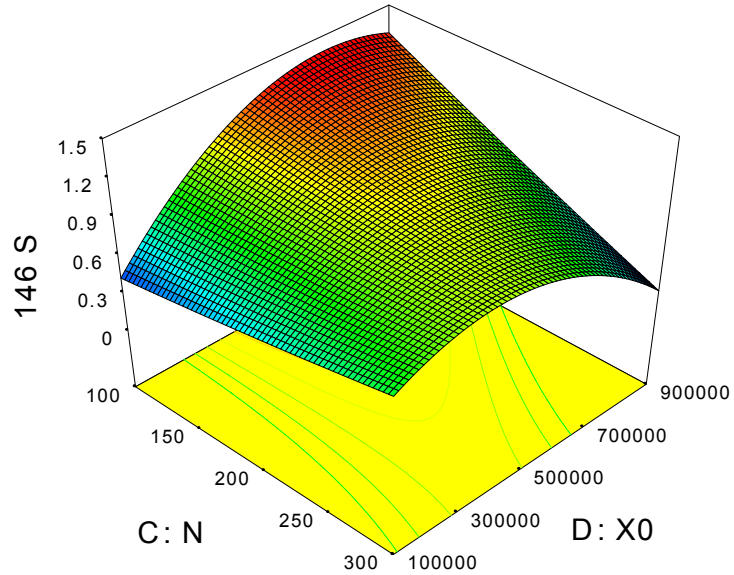
İnsan *promyelocytic leukemia* hücreleri ile yapılan çalışmada karıştırıcı hızının N= 80, 300 ve 400 d/dk'ya yükseltilmesi ile mRNA seviyesinde ve yüzey reseptör içeriklerinde değişimler ortaya çıktığı bildirilmiştir (McDowell ve Papoutsakis, 1998). Şekil 4.14. incelendiğinde verilen çalışma parametrelerinde (pH=7.00, ÇO=%30) artan karıştırma hızı (N) ile 146S partikül miktarının düştüğü görülebilir. Aynı grafikten düşük ve yüksek başlangıç hücre sayılarının da (X₀) 146S partikül miktarını düşürdüğü gözlenir. 146S partikül miktarı açısından verilen çalışma koşullarında (pH=7.00, ÇO=%30).en uygun çalışma aralığının başlangıç hücre sayısı $X_0=0.65\pm0.05*10^6$ hücre/mL ve karıştırma hızı N=100-150 d/dk olduğu görülmektedir.

Design-Expert® Software

146 S
1.34
0.35

X1 = C: N
X2 = D: X0

Actual Factors
A: pH = 7.00
B: ÇO = 30



Şekil 4.14. 146S partikül miktarı – karıştırma hızı (N) – başlangıç hücre sayısı (X₀) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30).

DeneySEL çalışma sonuçları McDowell (1998) tarafından bildirilen ve karıştırma hızının (N) hücre yüzey reseptör miktar ve kalitesine etki ettiği görüşünü desteklemektedir. Yapılan çalışmalarda karıştırma hızının (N) BHK-21 hücrelerinin kümeleşmesine (klemp) etki ettiği ve düşük karıştırma hızlarında daha fazla kümeleşme olduğu gözlenmiştir. Azalan karıştırma hızı ile artan 146S miktarı, düşük karıştırma hızlarında artan klempleşmeye paralel olarak sayılamayan hücre

sayısının artması ile ilişkili olması da mümkündür. 146S partikül miktarında değişimin çalışma koşullarına bağlı olarak 0.40-1.40 aralığında değiştiği ve bu değişimin %300'lerin üzerine kadar çıktığı görülmüştür.

4.3. Özgül Üreme Hızı (μ) Anova Testi Sonuçları

Design Expert 7.0 orijinal çıktısından alınmış olan özgül üreme hızı (μ) için Anova testi sonuçları aşağıdaki gibidir. İstatistik programı tarafından “*kuadratik*” model öngörülmüştür. Çizelge 4.3'te özgül üreme hızına (μ) modeline ait istatistik veriler görülmektedir.

Çizelge 4.3. Özgül üreme hızına (μ) modeline ait istatistik veriler.

Std. Dev.	0,006	R-Squared	0,838
Mean	0,051	Adj R-Squared	0,766
C.V. %	11,007	Pred R-Squared	0,574
PRESS	0,002	Adeq Precision	13,697

Modele ait özgül üreme hızınının (μ) çalışma koşullarına (pH, ÇO, N, X_0) bağlı değişimini veren objektif fonksiyon aşağıda verilmiştir.

$$\mu = -7,27421 + (2,06368 * \text{pH}) + (0,00264 * \text{ÇO}) - (0,00089 * \text{N}) - (0,00039 * \text{pH} * \text{ÇO}) \\ + (0,00017 * \text{pH} * \text{N}) - (0,14593 * \text{pH}^2)$$

Anova yüzey – cevap modeli sonuçları incelendiğinde (EK 3) açıkça görüleceği üzere özgül üreme hızı (μ) açısından yapılan çalışma aralıkları için elde edilen sonuçlara göre en önemli çalışma parametreleri başlangıç hücre sayısı (X_0) ve karıştırma hızı (N)'dir.

i) Özgül üreme hızı (μ) – pH - çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi

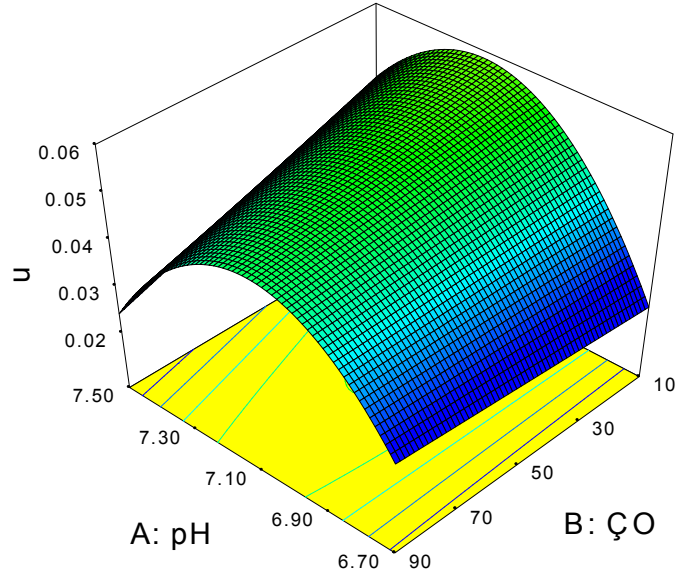
Hibridoma hücreleri ile yapılan çalışmada, çözünmüş oksijenin ÇO=%20-80 aralığındaki derişimlerinde özgül üreme hızında (μ) değişim gözlenmediği bildirilmiştir (Öztürk et al.,1991). Şekil 4.15 incelendiğinde verilen çalışma koşullarında (karıştırma hızı N=230 d/dk, başlangıç hücre sayısı $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL) özgül üreme hızınının (μ) maksimum olduğu bölge pH=7.15±0.15 ve çözünmüş oksijen ÇO=%10-30 olarak görülmektedir.

Design-Expert® Software

u
0.0783
0.0291

X1 = A: pH
X2 = B: ÇO

Actual Factors
C: N = 230
D: X0 = 600000



Şekil 4.15. Özgül üreme hızı (μ)-pH-çözünmüş oksijen (ÇO)-ilişkisi (çalışma koşulları; $N=230$ d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

BHK-21 hücresi için düşük ve yüksek çalışma pH'sının hücre üremesini inhibe ettiği ve yüksek ÇO derişimlerinin de özgül üreme hızına olumsuz etkilediği izlenmektedir.

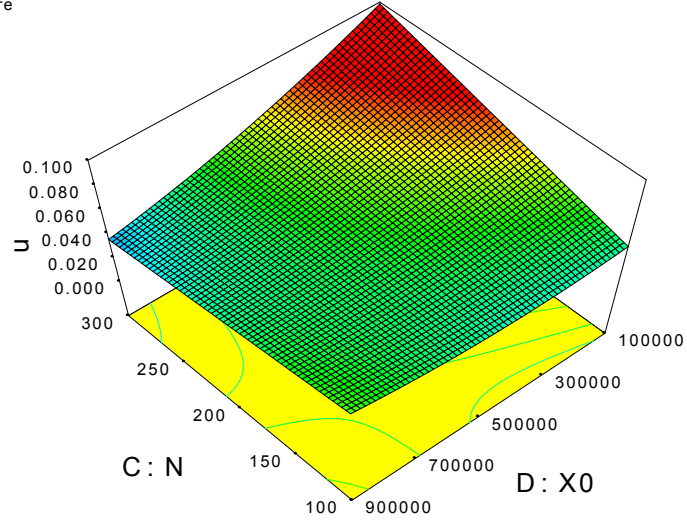
ii) Özgül üreme hızı (μ)-karıştırma hızı (N)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi

Şekil 4.16'da çalışma koşulları $pH=7.00$, $\text{ÇO}=\%30$ olduğunda; özgül üreme hızı (μ), karıştırma hızı (N) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi görülmektedir. Grafik incelendiğinde karıştırma hızı $N=250-300$ d/dk ve başlangıç hücre sayısı $X_0=0.10-0.30 \cdot 10^6$ hücre/mL çalışma aralıklarının özgül üreme hızını maksimum yaptığı görülmektedir. Burada özgül üreme hızının (μ) yüksek olmasının son hücre sayısının (X) maksimum olmasını garanti etmediğini belirtmek faydalı olacaktır. Çünkü son hücre sayısı açısından en önemli çalışma parametrelerinden birisi de başlangıç hücre sayısıdır (X_0).

u
0.0783
0.0291

X1 = C : N
X2 = D : X0

Actual Factors
A: pH = 7.00
B: ÇO = 30

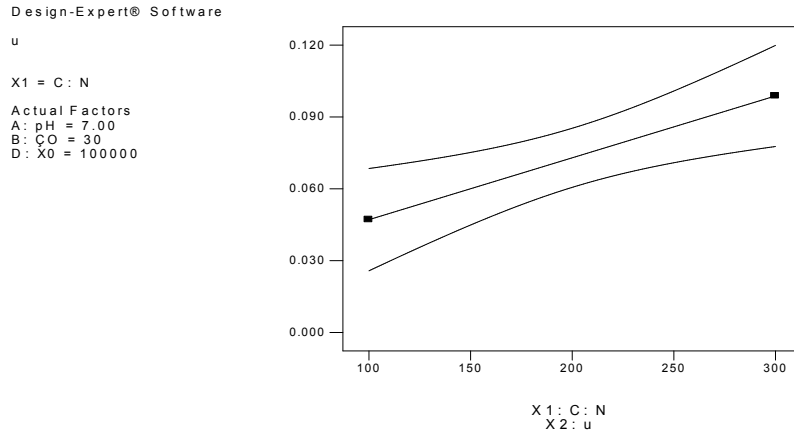


Şekil 4.16. Özgül üreme hızı (μ), karıştırma hızı (N) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30)

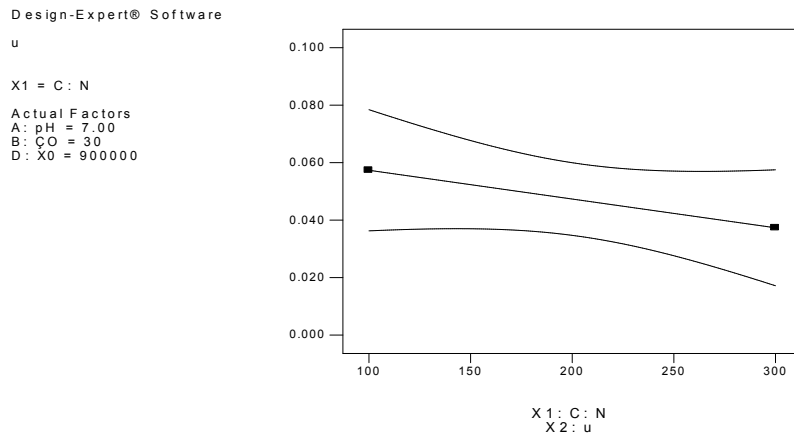
Karıştırma hızı ve dolayısı ile karıştırıcı uç hızının (v) kesme gerilmesi açısından önemli olduğu ve $v=1.5 \text{ m.s}^{-1}$ 'in üzerindeki durumlarda hücre hasarlarının başladığı bildirilmiştir (Varley, 1999). Hoeks yaptığı çalışmada büyük ölçeklerde bu karıştırıcı uç hızının aşıldığını bildirmiştir. Amanullah (2003)'ün yaptığı çalışma karıştırıcı uç hızının Varley (1999)'in bildirdiği değeri geçmesine rağmen özgül hücre üreme hızında (μ) artışlar tespit etmiştir. Bu çalışma da göre karıştırma hızı $N=230 \text{ d/dk}$ üzerine çıktığında son hücre sayısında düşüş başlamaktadır. Karıştırma hızının $N=230 \text{ d/dk}$ olduğu durumda karıştırma hızına bağlı hücre ölüm hızı (k_d) ile özgül üreme hızının (μ) eşit olduğunu söylenebilir. Yapılan çalışmada hücre sayısındaki azalmanın başladığı karıştırıcı uç hızı (v) Varley'in bildirdiği hızın yarısından daha düşük olarak $v=0.64 \text{ m/s}$ olarak hesaplanmıştır. Bu durumda karıştırıcı ucu hızının anlamlı bir parametre olarak göz önüne alınmasının uygun olmadığı görüşünü destekleyen bir sonuç elde edilmiştir. Yine BHK-21 hücrelerinin Varley (1999)'in çalıştığı hücrelere göre daha düşük karıştırma hızlarında (N) hasar görmeye başladıkları da söylenebilir.

Şekil 4.16'da başlangıç hücre sayısı (X_0), özgül üreme hızı (μ) ilişkisi görülmekte, X_0 azaldıkça μ artmaktadır. Parametre ilişkilerinin yönünün çalışma koşullarına göre değiştiği görülmektedir. Şekil 4.17'de incelenirse düşük başlangıç hücre sayılarında (X_0), artan karıştırma hızı (N) ile özgül üreme hızında (μ) artış gözlenirken, şekil 4.18'den görüleceği gibi bir çalışma koşulunun değişmesi ile

yüksek başlangıç hücre sayılarında (X_0) artan karıştırma hızı (N) ile azalan özgül üreme hızı (μ) görülmektedir.



Şekil 4.17. Özgül üreme hızı (μ) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisinde X_0 'ın düşük olduğu duruma ait grafik (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30, $X_0=0.1 \cdot 10^6$ hücre/mL)



Şekil 4.18. Özgül üreme hızı (μ) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisinde X_0 'ın yüksek olduğu duruma ait grafik (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30, $X_0=0.9 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Bu durum sadece çalışma koşullarından bir tanesinin değişmesi ile iki boyutlu olarak incelenen bir sistemde çelişkili sonuçlar elde edilmesinin mümkün olduğunu ve aslında her iki sonucun da kendi içinde doğru olabileceğini de açıkça göstermektedir. Bu durum çalışmaların yüzey taraması şeklinde (3 boyutlu) incelenmesinin önemini göstermektedir.

4.4. Antijenik Titre (AT) Anova Testi Sonuçları

Design Expert 7.0 orijinal çıktısından alınmış olan antijenik titre (AT) miktarı için Anova testi sonuçları aşağıdaki gibidir. İstatistik programı tarafından “kuadratik” model öngörülmüştür. Çizelge 4.4’te antijenik titreye (AT) ait oluşturulmuş modele ait istatistiksel değerler görülmektedir.

Çizelge 4.4. Antijenik titreye (AT) ait modelin istatistik değerleri.

Std. Dev.	3,076	R-Squared	0,884
Mean	92,120	Adj R-Squared	0,768
C.V. %	3,340	Pred R-Squared	0,611
PRESS	380,659	Adeq Precision	11,157

Antijenik titrenin (AT) çalışma koşullarına (pH, ÇO, N, X₀) bağlı objektif fonksiyonu aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} AT = & -2361,620 + (703,547 \cdot pH) + (3,73409 \cdot \text{ÇO}) - (0,60257 \cdot N) - (0,00002 \cdot X_0) \\ & - (0,42093 \cdot pH \cdot \text{ÇO}) + (0,06544 \cdot pH \cdot N) - (0,00001 \cdot pH \cdot X_0) - (0,001589 \cdot \text{ÇO} \cdot N) \\ & - (49,93499 \cdot pH^2) - (0,00472 \cdot \text{ÇO}^2) \end{aligned}$$

Anova yüzey-cevap modeli sonuçları incelendiğinde (EK 4) açıkça görüleceği üzere antijenik titre (AT) açısından yapılan çalışma aralıkları için elde edilen sonuçlara göre çalışma parametrelerinin önem sırası pH, N olmaktadır. pH hem 146S partikül miktarı hem de AT için son derece önemli bir çalışma koşuludur. AT ifadesinde verilmiş olan değerler; dönüştürülmüş (%) değerlerdir. Test protokolündeki ardışık seyreltme (6 seyreltme; 1,1/2, 1/3, 1/4, 1/6, 1/8) oranlarına göre seyreltme oranları toplamı %100 kabul edilmiştir. Diğer sonuçların tam sonuçla ilişkilendirilmesi ile elde edilen % değerler çalışmalarda kullanılmıştır.

i) Antijenik titre (AT) – pH – çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi

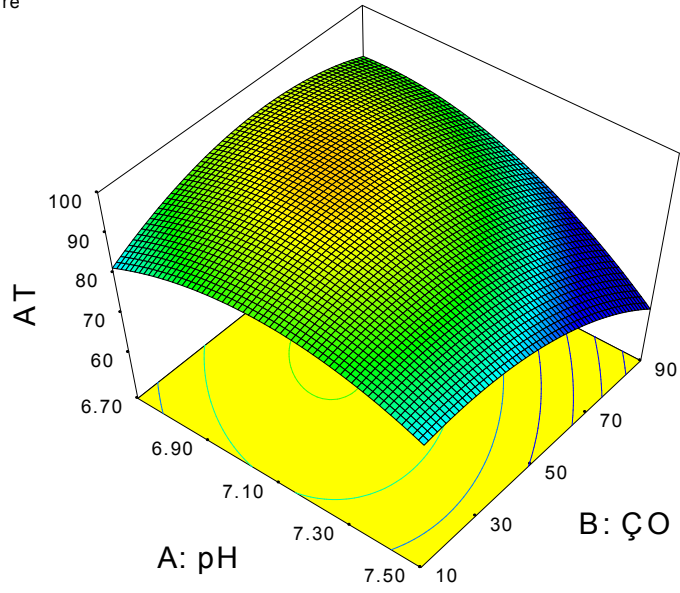
Şekil 4.19’da görüleceği gibi antijenik titrenin (AT) çalışma koşulları karıştırma hızı N=230 d/dk ve X₀=0.60*10⁶ hücre/mL olduğunda daha düşük pH (pH 6.9-7.0) ve çözünmüş oksijen derişiminde (ÇO %40-50) maksimum olduğu görülmektedir. Grafikten artan pH ve ÇO değerleri ile antijenik titrenin (AT) önemli oranda düştüğü izlenebilmektedir.

Design-Expert® Software

AT
100
77.2

X1 = A: pH
X2 = B: ÇO

Actual Factors
C: N = 230
D: X0 = 600000



Şekil 4.19. Antijenik titre (AT) - pH - çözülmüş oksijen (ÇO) ilişkisi (çalışma koşulları; karıştırma hızı $N=230$ d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

ii) Antijenik titre (AT)-karıştırma hızı (N)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi

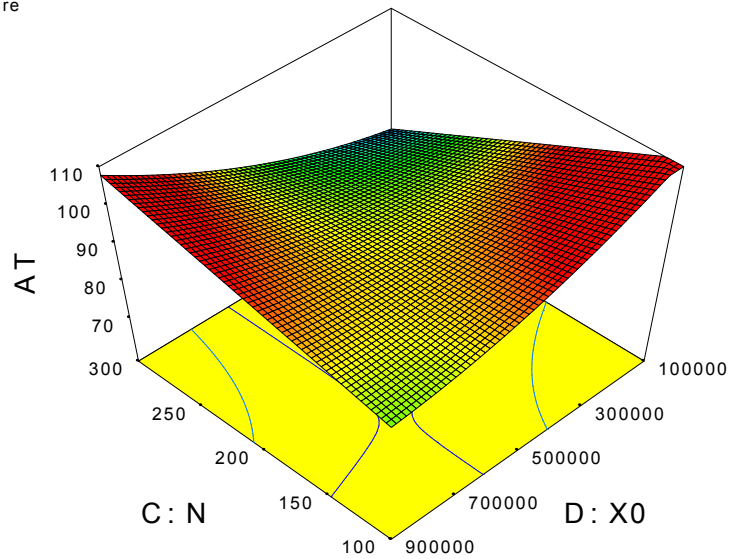
Şekil 4.20'de çalışma koşulları; pH 7.00 ve çözülmüş oksijen ÇO %30 iken düşük karıştırma hızlarının ($N=100-150$ d/dk) ve düşük başlangıç hücre sayılarının ($X_0=0.10-0.30 \cdot 10^6$ hücre/mL) antijenik titre (AT)'yi arttırdığı görülmektedir.

Design-Expert® Software

AT
100
77.2

X1 = C: N
X2 = D: X0

Actual Factors
A: pH = 7.00
B: ÇO = 30



Şekil 4.20. Antijenik titre (AT) - karıştırma hızı (N) - başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30)

Aynı şekilde yüksek karıştırma hızları (N) ve yüksek başlangıç hücre sayıları (X_0) da antijenik titre (AT)'yi arttırmaktadır. Benzer şekilde düşük başlangıç hücre sayıları ve yüksek karıştırma hızları da AT açısından en kötü çalışma koşulları olarak görülmektedir.

4.5. Enfektif Titre (IT) Anova Testi Sonuçları

Design Expert 7.0 orijinal çıktısından alınmış olan enfektif titre (IT) miktarı için Anova testi sonuçları aşağıdaki gibidir. İstatistik programı tarafından “*kuadratik*” model öngörülmüştür. Çizelge 4.5'te Enfektif titre (IT) için oluşturulan modele ait istatistiki değerler verilmiştir.

Çizelge 4.5'te Enfektif titre (IT) için oluşturulan modelin ait istatistiki değerleri.

Std. Dev.	0,264	R-Squared	0,938
Mean	6,787	Adj R-Squared	0,885
C.V. %	3,890	Pred R-Squared	0,766
PRESS	3,403	Adeq Precision	16,400

Enfektif titre (IT) için oluşturulan modele ait objektif fonksiyon aşağıda verilmiştir.

$$IT = -112,69229 + (42,16237 \cdot pH) - (0,44756 \cdot \text{ÇO}) - (0,18580 \cdot N) + (0,00001 \cdot X_0) \\ + (0,05721 \cdot pH \cdot \text{ÇO}) + (0,02693 \cdot pH \cdot N) - (0,00023 \cdot \text{ÇO} \cdot N) - (3,59997 \cdot pH^2)$$

Anova yüzey-cevap modeli sonuçları incelendiğinde (EK 5) görüleceği gibi enfektif titre (IT) açısından çalışma parametreleri değerlendirildiğinde önem sırası ÇO, X_0 , pH olmaktadır. Enfektif titreyi en fazla etkileyen çalışma koşullarından birisinin çözünmüş oksijen (ÇO) derişimi olması önemli bir bulgu olarak görülmektedir.

i) Enfektif titre (IT) – pH – çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi

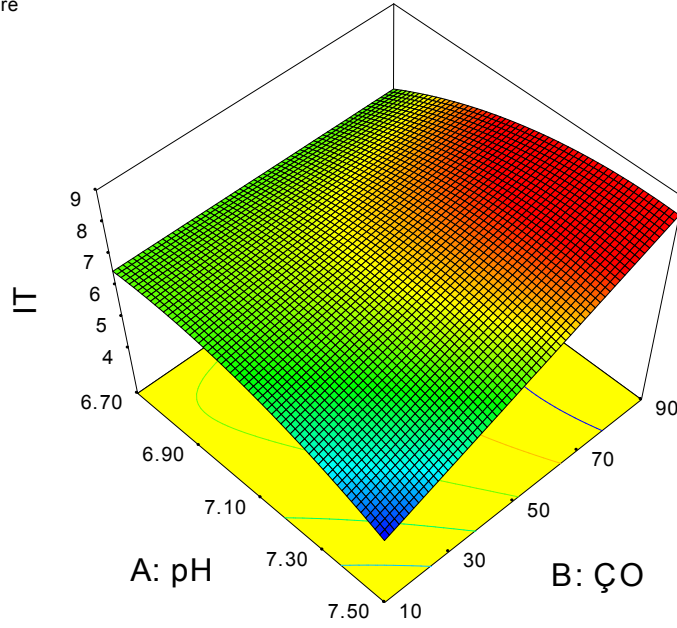
Şekil 4.21 incelendiğinde düşük çözünmüş oksijen (ÇO) derişimlerinde artan çalışma pH'sı enfektif titreyi (IT) azaltırken bu ilişki yüksek çözünmüş oksijen (ÇO) derişimlerinde tersine dönmekte ve artan çalışma pH'sı ile enfektif titre (IT) artmaktadır. Çalışma koşulları karıştırma hızı $N=230$ d/dk ve başlangıç hücre sayısı $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL iken yüksek besiyeri pH'sı $pH=7.40 \pm 0.10$ ve yüksek çözünmüş oksijen derişimlerinde $\text{ÇO}=\%70-90$ enfektif titre $IT \geq 8$ pfu/mL olmaktadır.

Design-Expert® Software

IT
7.82
4.86

X1 = A: pH
X2 = B: ÇO

Actual Factors
C: N = 230
D: X0 = 600000



Şekil 4.21. Enfektif titre (IT)-pH-çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi (çalışma koşulları; karıştırma hızı N=230 d/dk ve başlangıç hücre sayısı $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Grafikten görülen diğer bir nokta ise yüksek pH ve düşük çözünmüş oksijen (ÇO) derişimlerinin enfektif titreyi (IT) son derece olumsuz etkilediğidir. Bu durumda çalışma koşullarından bir tanesinin hiç kontrol edilmemesi veya uygun olmayan çalışma koşullarında bulunması elde edilecek enfektif titre (IT) değerin her defasında farklı olması sonucunu doğurabilecektir.

ii) Enfektif titre (IT)-karıştırma hızı (N)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi

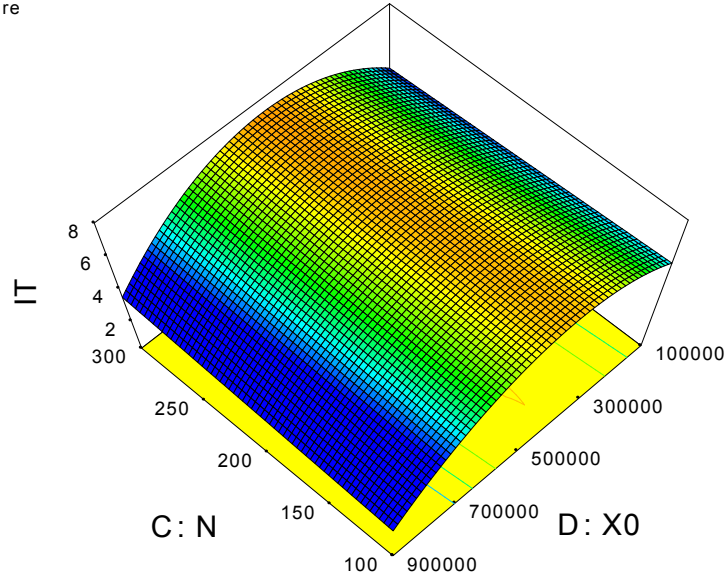
Şekil 4.22’de verilen çalışma koşulları (pH=7.00, ÇO=%30) için enfektif titrenin (IT) neredeyse karıştırma hızından (N) bağımsız olduğu ve başlangıç hücre sayısının (X_0) enfektif titreyi (IT) çok önemli oranda etkilediği görülmektedir. Enfektif titreyi maksimum yapan başlangıç hücre sayısının $X_0=0.40 \pm 0.10 \cdot 10^6$ hücre/mL olduğu görülmektedir. Çalışma koşulları pH=7.00 ve çözünmüş oksijen derişimi ÇO=%30 için enfektif titrenin IT=7.5 pfu/mL olarak bulunmuştur.

Design-Expert® Software

IT
7.82
4.86

X1 = C: N
X2 = D: X0

Actual Factors
A: pH = 7.00
B: ÇO = 30



Şekil 4.22. Enfektif titre (IT)-karıştırma hızı (N)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi (çalışma koşulları pH=7.00, ÇO=%30)

4.6. Laktat/Glikoz Oranı ($Y_{lak/gli}$) Anova Testi Sonuçları

Design Expert 7.0 orijinal çıktısından alınmış olan laktat/glikoz oranı için ($Y_{lak/gli}$) Anova testi sonuçları aşağıdaki gibidir. İstatistik programı tarafından “kuadratik” model öngörülmüştür. Kuadratik model ve Çizelge 4.6’da verilen uygun istatistiksel değerler elde edilmiştir.

Çizelge 4.6. Laktat/Glikoz oranına ($Y_{lak/gli}$) ait istatistik veriler

Std. Dev.	0,1754	R-Squared	0,9064
Mean	1,3196	Adj R-Squared	0,8304
C.V. %	13,2948	Pred R-Squared	0,6585
PRESS	1,7970	Adeq Precision	16,8561

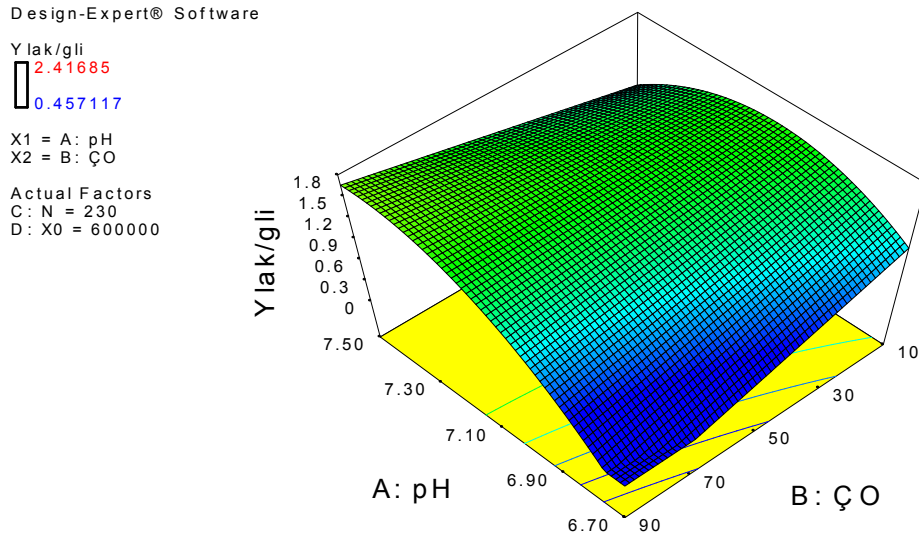
Laktat/glikoz oranını ($Y_{lak/gli}$) çalışma koşullarına (pH, ÇO, N, X_0) göre objektif fonksiyonu aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned}
 Y_{lak/gli} = & -178,813139 + (50,5336667 \cdot \text{pH}) - (0,21505185 \cdot \text{ÇO}) + (0,08751245 \cdot N) \\
 & - 2,6628 \cdot 10^{-5} \cdot X_0 + (0,03150989 \cdot \text{pH} \cdot \text{ÇO}) - (0,00891403 \cdot \text{pH} \cdot N) \\
 & + (3,5481 \cdot 10^{-6} \cdot \text{pH} \cdot X_0) - (0,00017786 \cdot \text{ÇO} \cdot N) + (4,9099 \cdot 10^{-8} \cdot \text{ÇO} \cdot X_0) \\
 & - (1,782 \cdot 10^{-8} \cdot N \cdot X_0) - (3,59004519 \cdot \text{pH}^2) - (1,4102 \cdot 10^{-5} \cdot N^2)
 \end{aligned}$$

Anova yüzey-cevap modeli sonuçları incelendiğinde (EK 6) açıkça görüleceği üzere laktat/glikoz oranı $Y_{lak/gli}$ açısından yapılan çalışma aralıkları için elde edilen sonuçlara göre en önemli çalışma parametresinin pH olduğu görülmektedir.

i) $Y_{lak/gli}$ - pH – çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi

Literatürde hayvan hibridoma hücrelerinin alkali koşullarda daha fazla laktat üreterek canlılığını sürdürdüğü, düşük pH değerlerinde ise laktat üretimini azalttığı bildirilmiştir (Öztürk et al., 2006). Yapılan deneysel çalışmalarda pH=6.70 ile pH=7.50 aralığı taranmış olup elde edilen sonuçlara göre yüksek pH değerlerinde $Y_{lak/gli}$ oranında literatüre uygun olarak artış gözlenmiştir. Şekil 4.23'te $Y_{lak/gli}$ - pH – çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi görülmektedir.



Şekil 4.23. Laktat/glikoz oranı ($Y_{lak/gli}$) - pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi (çalışma koşulları; N=230 d/dk ve $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

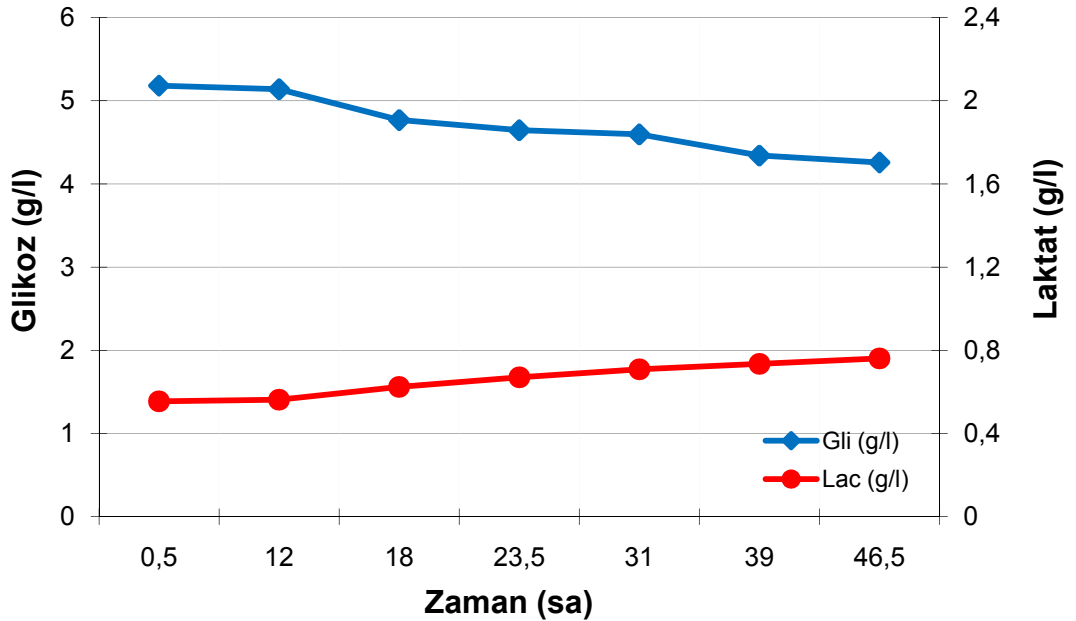
Şekilden besiyeri pH'sının $Y_{lak/gli}$ oranını önemli oranda değiştirdiği görülmektedir. Çözünmüş oksijen (ÇO) derişiminin azalması ile düşük pH değerlerinde artan $Y_{lak/gli}$ oranı, yüksek çalışma pH'sında tersine dönmekte ve azalan ÇO derişimi ile azalan bir $Y_{lak/gli}$ oranı görülmektedir.

BHK-21 hücreleri düşük pH değerlerinde daha az glikoz kullanarak daha az laktat oluşturmaktadır. Diğer çalışma koşulları aynı iken çalışma pH'sının 6.7 olduğu B35 ve çalışma pH'sının pH=7.50 olduğu B34 için glikoz tüketim ve laktat oluşum hızları ile ilgili şekil 4.24 ve şekil 4.25'ten de görüleceği gibi oldukça önemli farklar vardır. Her iki deney için başlangıç ve son değerler göz önüne alınarak yapılan

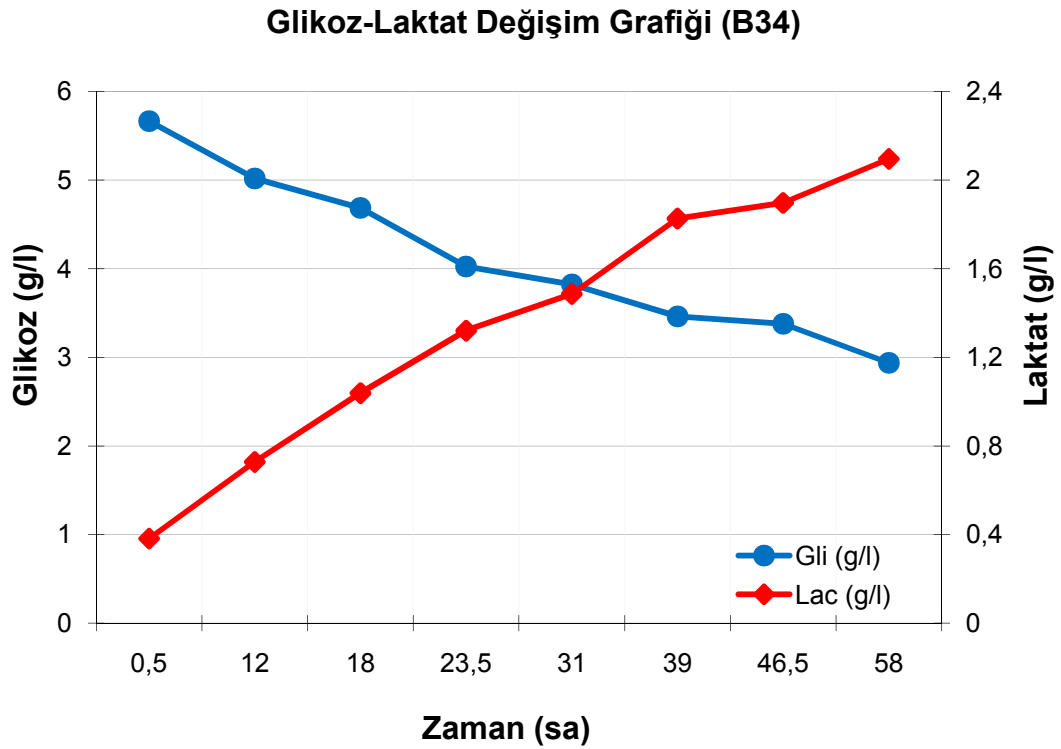
değerlendirmede düşük çalışma pH'sında (B35) BHK-21 hücreleri az glikoz tüketip ($\Delta_{gli}=6.41$ mM (1.15 g/L)), az laktat oluşturmakta ($\Delta_{lak}=5.05$ mM (0.45g/L)) ve $Y_{lak/gli}=0.79$ mmol/mmol olarak gerçekleşmektedir. pH 7.5 değerinde (B34) son hücre sayısı (X) aynı olduğu halde, $\Delta_{gli}=15.14$ mM (2.73 g/L), $\Delta_{lak}= 19.24$ mM (1.71 g/L) ve $Y_{lak/gli}=1.27$ mmol/mmol olarak gerçekleşmiş birim tüketilen glikozdan üretilen laktat miktarı artmıştır. Üstel üreme evresinde açıklanan durum daha net olarak izlenmekte B35 için $Y_{lak/gli}=0,46$ mmol/mmol ve B34 için $Y_{lak/gli}=1.28$ mmol/mmol olarak hesaplanmış artan çalışma pH'sı ile $Y_{lak/gli}$ oranı yaklaşık üç kat artmaktadır.

Bu çalışmaların 146S partikül miktarları incelendiğinde önemli bir fark görülmektedir. B35'te (pH 6.70) elde edilen 146S partikül miktarı 1.34 $\mu\text{g/mL}$ iken B34'te (pH 7.50) 146S partikül miktarı 0.69 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Her iki çalışmada da son hücre sayısı (X) açısından her ne kadar fark gözlenmemiş olsa da 146S partikül miktarları arasında yaklaşık iki kat fark olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar 146S partikül miktarının çalışma pH'sından etkilendiğini göstermekte olup 146S partikül miktarı için oluşturulan model sonuçları ile örtüşmektedir.

Glikoz-Laktat Değişim Grafiği (B35)



Şekil 4.24. B35 glikoz-laktat derişimlerinin zamana göre değişimleri (pH=6.70, $\text{ÇO}=\% 50$, $N=200$ d/dk, $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL)



Şekil 4.25. B34 glikoz-laktat derişimlerinin zamana göre değişimleri (pH=7.50, ÇO=% 50, N=200 d/dk, $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Artan çalışma pH'sı ile glutamin çevriminin yerini glikoliz almakta ve $Y_{lak/gli}$ oranı artmaktadır. Çalışma sonuçlarına göre belirli çalışma pH'sı aralığı dışında $Y_{lak/gli}$ oranlarında düşme izlenmektedir. Bu durum hücrelerin hücre içi pH'larını sabit tutmak için metabolizmasını değiştirmesi ile açıklanabilir. Deneysel sonuçlar literatürde hibridoma hücreleri ile yapılmış çalışmalarla uyum göstermektedir ancak bu durumun aksine bilgilerin verildiği yayınlar da mevcuttur.

ii) $Y_{lak/gli}$ – karıştırma hızı (N) – başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi

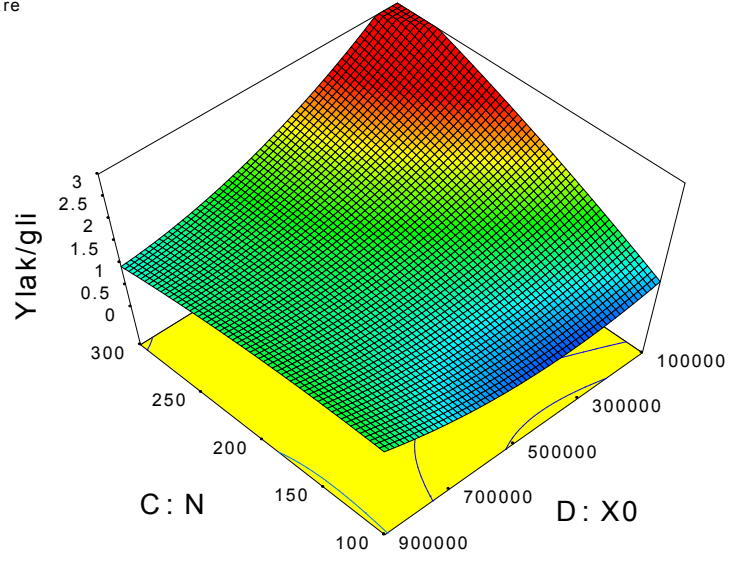
Şekil 4.26'da görüldüğü gibi başlangıç hücre sayısı $X_0=0.55-0.75 \cdot 10^6$ hücre/mL aralığındayken $Y_{lak/gli}$ oranı minimum olmakta ve bu aralık dışında artış gözlenmektedir. Ayrıca $Y_{lak/gli}$ açısından en yüksek oranların düşük başlangıç hücre sayıları (X_0) ve yüksek karıştırma hızlarında (N) oluştuğu görülmektedir.

Design-Expert® Software

Y_{lak/gli}
2.41685
0.457117

X1 = C : N
X2 = D : X0

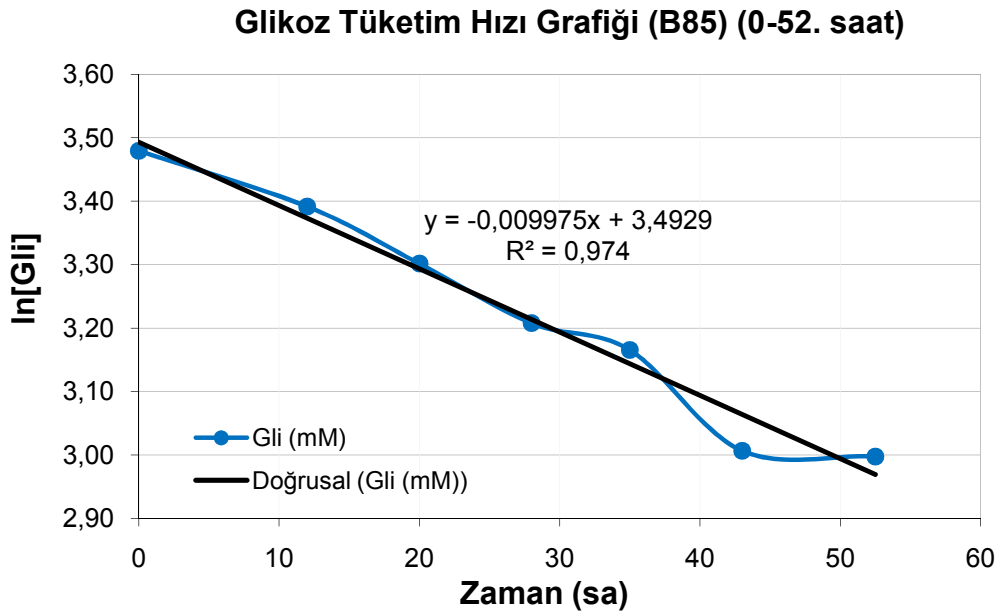
Actual Factors
A: pH = 7.00
B: ÇO = 30



Şekil 4.26. $Y_{lak/gli}$ - karıştırma hızı (N) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00 ve çözülmüş oksijen ÇO=%30)

iii) Glikoz tüketim hızı ve laktat oluşum hızları

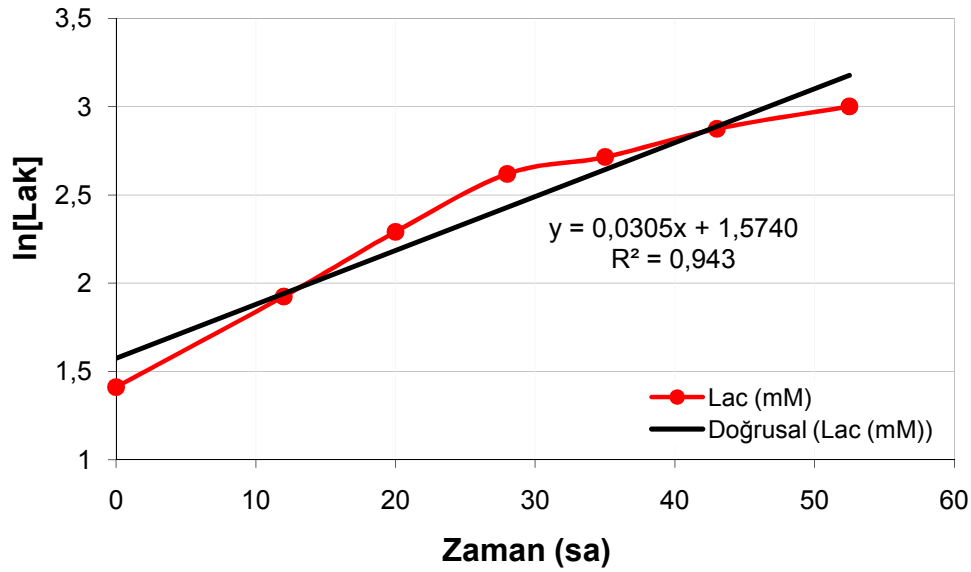
Glikoz tüketim hızı için doğrulama deneylerinden (B85) aşağıda verilen örnek grafik genelde tüm çalışmalarda gözlenen glikoz tüketim hızı ve laktat oluşum hızına ait grafikleri sembolize etmektedir. Şekil 4.27’de görüldüğü gibi glikoz tüketim hızı biyoproses süresince doğrusal bir düşüş göstermektedir.



Şekil 4.27. B85 için glikoz tüketim hızının zamana karşı değişim grafiği

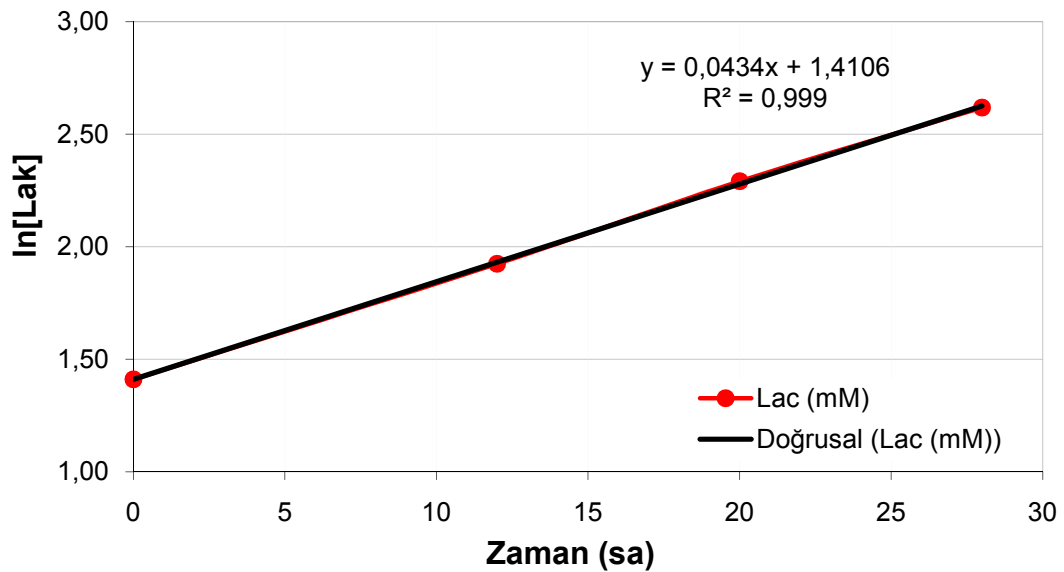
Şekil 4.28'den görüleceği gibi laktat oluşum hızında 28. saatte değişim gözlenmekte ve parabolik bir ilişki göze çarpmaktadır. Şekil 4.29 ve şekil 4.30'da laktat oluşum hızı iki kısımda incelendiğinde biyoprosesin 25-30. saatine kadar elde edilen ilk hızının ($\approx 0.044 \text{ sa}^{-1}$) 25-30.saatten biyoproses sonuna kadar hesaplanan hızdan ($\approx 0.016 \text{ sa}^{-1}$) yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu bulunmuştur.

Laktat Üretim Hızı Grafiği (B85, 0-52. saat)

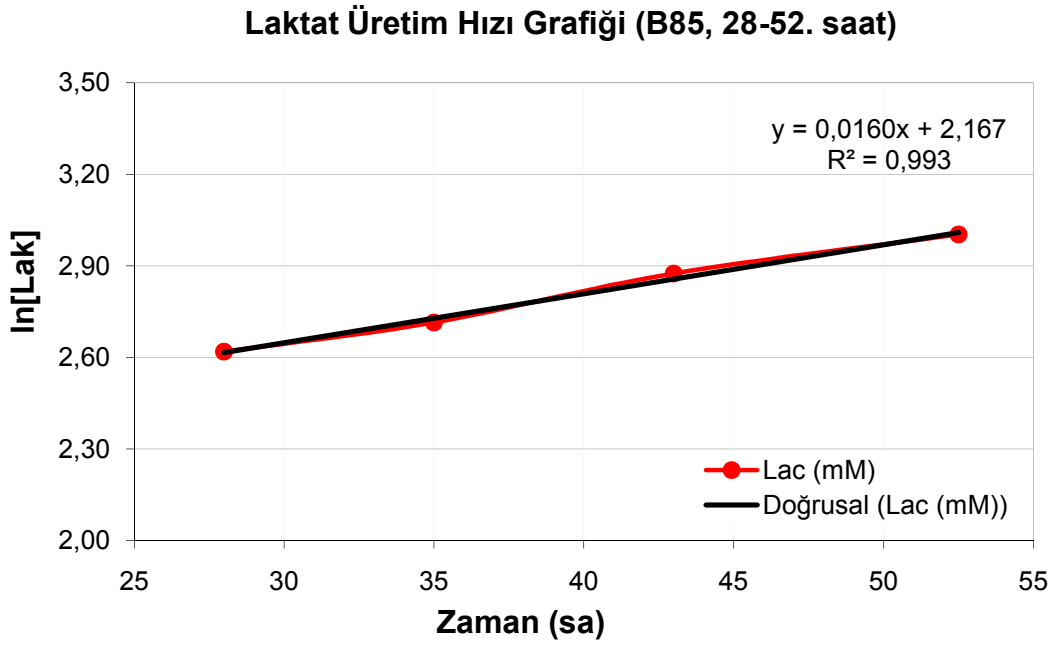


Şekil 4.28. B85 için laktat oluşum hızının zamana karşı değişim grafiği

Laktat Üretim Hızı Grafiği (B85, 0-28. saat)



Şekil 4.29. B85 için laktat oluşum hızının zamana karşı değişim grafiği (0-28. saat)
(çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30, N=230, $X_0=0.55 \cdot 10^6$ hücre/mL)



Şekil 4.30. B85 için laktat oluşum hızının zamana karşı değişim grafiği (28-52. saat) (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30, N=230, $X_0=0.55 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Glikoz tüketim hızının doğrusal olarak azalmasına karşılık laktat oluşum hızında çok önemli değişiklik olmaktadır. Çalışma koşullarının değişimi ile glikoz tüketim hızı ve laktat oluşum hızı grafiklerinde bahsedilen durum genelde gözlenmeye devam etmektedir. Yapılan kontrollerde laktat oluşumundaki bu hız değişiminin besiyeri laktat derişimi ile ilişkisi olduğuna dair bir veri elde edilememiştir. Ancak laktat oluşum hızındaki bu değişimin 25-30. saatlerde olması glutamin derişimindeki düşmeye bağlı olarak hücrenin metabolizmasını değiştirmesi ile daha az laktat oluşumunun sağlandığı öngörülmektedir. Şekil 4.36'de B85'e ait amonyak oluşum grafiği incelendiğinde yapılan öngörü daha netlik kazanacaktır.

iv) Laktat/glikoz oranı ($Y_{lak/gli}$) - pH – başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi

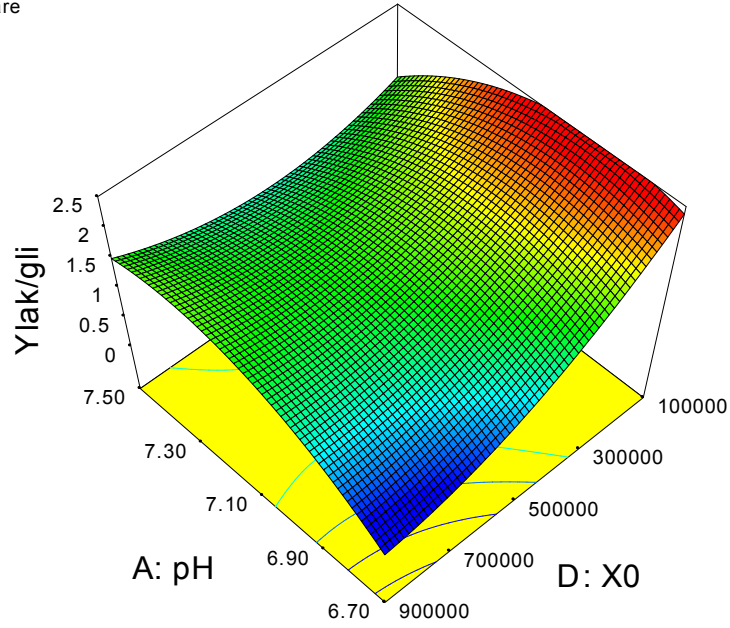
Şekil 4.31 incelendiğinde $Y_{lak/gli}$ oranının en fazla başlangıç hücre sayısından (X_0) çok fazla etkilendiği ve X_0 azaldıkça $Y_{lak/gli}$ oranının önemli oranda arttığı görülmektedir. Grafikte düşük çalışma pH'sı ve yüksek X_0 $Y_{lak/gli}$ oranının düşük olduğu görülmektedir. Hücre için elde edilmiş optimum çalışma pH'sından ($pH=7.15 \pm 0.05$) düşük çalışma pH'sı ve düşük X_0 , $Y_{lak/gli}$ oranını maksimum yapmaktadır.

Design-Expert® Software

Y_{lak/gli}
2.41685
0.457117

X1 = A: pH
X2 = D: X0

Actual Factors
B: ÇO = 30
C: N = 230



Şekil 4.31. $Y_{lak/gli}$ - pH-başlangıç hücre sayısı (X_0) ve ilişkisi (çalışma koşulları; $\text{ÇO}=\%30$, $N=230$ d/dk)

v) Laktat/glikoz oranı ($Y_{lak/gli}$) - çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi

Çözünmüş oksijen (ÇO)'nin hücre metabolizmasına etki ettiği bilinmektedir. Hücre düşük ÇO değerlerinde glikozu daha verimsiz kullanmakta ve laktat/glikoz oranı ($Y_{lak/gli}$) oranı artmaktadır. Ancak %10 ile %90 ÇO seviyeleri arasında ani değişimler gözlenmemektedir. Anaerobik çalışma koşullarında glikoliz metabolizması çok önem kazanmaktadır. Öztürk (1990), hibridoma hücreleri ile yaptığı çalışmada %5-100 ÇO aralığında metabolik oranlarda önemli bir değişiklik olmadığını söylemektedir. Şekil 4.32'de BHK hücresi için elde edilen sonuçlarda ise ÇO'nun $Y_{lak/gli}$ oranına verilen çalışma koşullarında önemli ölçüde etki ettiği ve ÇO düştükçe $Y_{lak/gli}$ oranının arttığı görülmektedir. Ön çalışmalarda gözlenmiş ani pH düşümü sorununun biyoproses başlangıcındaki ÇO derişiminin sınır derişim değerinin ($\text{ÇO}=\%20$) altına düşmesinden kaynaklandığı görülmektedir. Düşük ÇO derişimi yüksek miktarda laktat oluşumu ve $Y_{lak/gli}$ 'nin artışına neden olmakta bu nedenle prosesin başlangıcında besiyeri pH'sında hızlı düşüş ortaya çıkmaktadır. Böylece başlangıç hücre sayısına (X_0) bağlı olarak daha biyoproses başlangıcında ortam koşullarının kötüleştiğini söylemek mümkündür. Dolayısıyla biyoprosesin optimum çalışma pH'sına en kısa sürede getirilmesi, ÇO derişiminin kontrol edilmesi ve uygun X_0 'da çalışılması zaruri görülmektedir.

Design-Expert® Software

Y_{lac/gli}

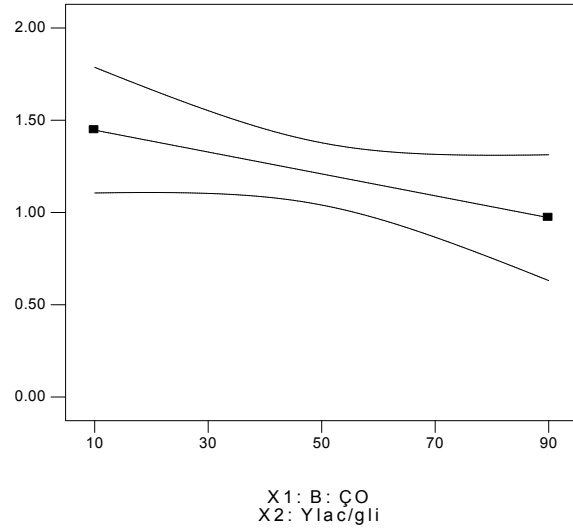
X1 = B: ÇO

Actual Factors

A: pH = 7.00

C: N = 230

D: X0 = 600000



Şekil 4.32. Y_{lac/gli} – çözülmüş oksijen (ÇO) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, N=230 d/dk, X₀=0.60*10⁶ hücre/mL);

Öztürk (1991)'de yaptığı çalışmada artan çözülmüş oksijen (ÇO) derişimi ile Y_{lac/gli} oranının azaldığını bildirmiştir. Başlangıç hücre sayısı X₀=0.5*10⁵ hücre/mL ve %1 ÇO için Y_{lac/gli}=2.1 olarak bulunmuş, yine bu oranın %100 ÇO için 1.54'e kadar düştüğü bildirilmiştir (Öztürk,1991). Deneysel çalışma sonuçları düşük başlangıç hücre sayıları X₀=0.1*10⁶ hücre/mL için benzer profil izlemiştir. Şekil 4.33'te verilen çalışma koşulları (pH=7.00 ve N=230 d/dk) için bu oranların artan başlangıç hücre sayısı (X₀) ve çözülmüş oksijen (ÇO) derişimine göre değişimi görülmektedir.

Design-Expert® Software

Y_{lac/gli}

2.41685

0.457117

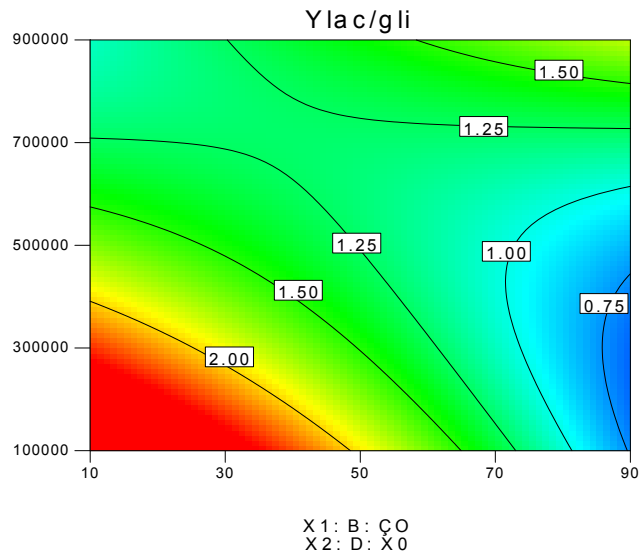
X1 = B: ÇO

X2 = D: X0

Actual Factors

A: pH = 7.00

C: N = 230



Şekil 4.33. Çözülmüş oksijen (ÇO)-başlangıç hücre sayısı (X₀) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, N=230 d/dk)

Şekilden de görüldüğü gibi düşük ve yüksek başlangıç hücre sayıları (X_0), $Y_{lak/gli}$ oranını önemli ölçüde değiştirmektedir. Yine $Y_{lak/gli}$ oranının teorik limit olan 2'nin üzerine çıkabileceği de öngörülmektedir. Burada yine iki boyutlu çalışmalar ile, yüzey taraması ile (3 boyutlu) yapılan çalışmaların farkı ortaya çıkmaktadır.

Hibridoma hücreleri ile yapılan çalışmada laktat derişiminin 40 mM üzerindeki değerlerinin özgül üreme hızına (μ) olumsuz etkileri olduğu ve 78 mM'da μ 'nün yarıya düştüğü bildirilmiştir (Glacken et al., 1989). Süspanse BHK hücre üretim proseslerinde 38 mM laktat derişimine ulaşıldığında ölü hücreler gözlenmeye başladığı ve amonyak kaynaklı ölümlerin genellikle apoptozla, laktat kaynaklı olanların ise nekrozla gerçekleştiği bildirilmiştir. BHK-21 hücresi ile yapılan kesikli üretimlerde final laktat derişimi 30 mM olarak bildirilmiştir (Cruz et al., 2000). Model oluşturulması için ve doğrulama için yapılan deneylerde tekrarlı-kesikli üretim yöntemi uygulanmıştır. Tekrarlı-kesikli üretim yönteminde bir önceki biyoproseste bırakılan hücreli besiyeri üzerinde taze besiyeri ilavesi yapılmaktadır. Bu nedenle kültür başlangıç laktat derişimi aşılama için biyoreaktörde bırakılan hacim ve bu hacimdeki laktat derişiminin taze besiyeri ile seyreltilmesi sonucu oluşmakta ve derişim seyreltme oranı ile doğrusal ilişki göstermektedir. Deneysel çalışmalarda başlangıç laktat derişimi 4.0-8.0 mM arasında olmasına rağmen son laktat derişiminin en düşük değeri 6.75 mM (B39; pH=6.90, ÇO=70, N=250, $X_0=0.70 \cdot 10^6$ hücre/mL) olarak ve en yüksek değeri 34.4 mM (B79; pH=7.30, ÇO=30, N=150, $X_0=0.70 \cdot 10^6$ hücre/mL)) olarak analiz edilmiştir. Doğrulama çalışmalarında ise son laktat derişimleri 20-29.5 mM aralığında gerçekleşmiş ve Cruz (2000) tarafından hücre inhibisyon limiti olarak bildirilen 30 mM'lik laktat derişimlerine çıkılmamıştır.

Cruz (2000) $Y_{lak/gli}=1.40$ mol/mol olarak vermiş olup bu değer doğrulama deney çalışmalarında uyumlu şekilde gerçekleşmiştir (Cruz et al., 2000). BHK hücrelerinin ve kesikli üretim yönteminin kullanıldığı bir çalışmada yapılan 11 deney sonucunda $Y_{lak/gli}=1.38-1.78$ mol/mol aralığında gerçekleştiği bildirilmiştir (Linz et al., 1997). Çizelge 4.7'de görüleceği gibi doğrulama deney sonuçları (B82 dışında) ortalama $Y_{lak/gli}=1.37 \pm 0.10$ mol/mol olarak literatürde bildirildiği şekilde hatta biraz daha düşük olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.7. Başlangıç ve son laktat derişimleri ve $Y_{lak/gli}$ oranları

Batch No	Başlangıç laktat derişimi (mM)	Son laktat derişimi (mM)	$Y_{lak/gli}$ (mol/mol)
B78	5.40	23.70	1.33
B80	5.60	29.50	1.52
B82	7.00	22.00	1.90*
B85	4.00	20.00	1.29
B89	4.60	25.80	1.35**

* B 82, biyoreaktör 2 saate yakın bir süre % 1.5 ÇO'da kalmış olduğundan dolayı $Y_{lak/gli}$ oranı yükselmiştir.

** B 89, besiyeri-2'nin kullanıldığı ve son hücre sayısının $X=5.95 \cdot 10^6$ hücre/mL olduğu çalışmadır.

Deneylerde uygulanan tekrarlı-kesikli üretim yönteminde (süspanse ilk pasajı (S1) dışında) besiyerinde bulunan glikoz derişiminin, 6M besiyerinde bulunması gereken başlangıç glikoz derişiminden ortalama olarak $\%20 \pm 5$ düşük olduğu görülmektedir. Bu durum son glikoz derişimi başlangıç derişimi ile oranlandığında (gli_{son}/gli_{ilk}) yaklaşık olarak $\%40 \pm 10$ oranındaki glikozun tüketilemediği görülmekte ve bu nedenle başlangıç glikoz derişimi açısından biyoproseste glikoz kısıtlamasının oluşmadığını göstermektedir. 6M besiyerine giren glikoz derişimlerinin değerlendirilmesi ayrı bir çalışma konusu olabilir.

vi) Laktat/glikoz oranına ($Y_{lak/gli}$) çalışma koşullarının etkisi

BHK hücresi ile yapılan çalışmalarda düşük glikoz derişimlerinde hücre metabolizmasını değiştirerek (metabolic shift) glikozun daha verimli kullanılması ve daha az laktat oluşturmasını amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır. Muhtelif yayınlarda yarı-kesikli üretim yönteminde besiyeri glikoz ve glutamin derişimleri değiştirilerek hücre metabolizmasının değiştirilebileceği bildirilmiştir. Kesikli üretim yöntemi kullanıldığında 30 mM olarak gerçekleşen final laktat derişimi yarı-kesikli üretim sisteminde 16 mM olarak gerçekleştiği ve $Y_{lak/gli}$ 1.40'ten 0.40-0.90'a düşürüldüğü bildirilmiştir (Cruz et al., 2000). Yapılan analiz sonuçları incelendiğinde tekrarlı-kesikli üretim yönteminde çalışma koşullarının değişimi ile yarı-kesikli üretim yönteminde üretilen laktat miktarı ve $Y_{lak/gli}$ oranlarının elde edildiği görülmektedir. Örnek olarak B39 incelendiğinde toplam laktat oluşum miktarının 6.76 mM olduğu ve $Y_{lak/gli}$ oranının 0.67 olduğu görülmektedir. Çizelge 4.8 incelendiğinde bu çalışmaya benzer sonuçları olan 5 tane daha deneysel

çalışma görülebilir. Çalışma sonuçlarına göre besiyeri kimyasal bileşiminde bir değişiklik yapılmadan yalnızca çalışma koşullarının değişimi ile hücre metabolizmasının değiştirilmesi ve istenen şekilde yönlendirilmesinin de mümkün olduğu açıkça görülmektedir. Bu sonuç hücre metabolizma mühendisliği açısından metabolizmanın kontrolü için kullanılabilecek bir araç olarak görülmektedir.

Çizelge 4.8. Kesikli-üretim yöntemiyle yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen ve normalden düşük olarak tespit edilen son laktat derişimleri ve $Y_{lak/gli}$ oranları

Batch No	Std	Run	Başlangıç laktat derişimi	Son laktat derişimi (mM)	Oluşan laktat miktarı (mM)	$Y_{lak/gli}$
32	7	19	3.12	10.71	7.59	0.974
35	17	2	6.22	11.27	5.05	0.457
39	15	24	3.59	6.75	3.16	0.679
40	3	6	2.42	7.15	4.73	0.631
41	1	7	1.77	8.25	6.48	0.921

4.7. Amonyak (NH₃) Oluşum Hızı Anova Testi Sonuçları

Design Expert 7.0 orijinal çıktısından alınmış olan amonyak (NH₃) oluşum hızı Anova testi sonuçları aşağıdaki gibidir. İstatistik programı tarafından “kuadratik” model öngörülmüştür. Çizelge 4.9’da Amonyak (NH₃) oluşum hızına ait modelin istatistik değeri verilmiştir.

Çizelge 4.9’de Amonyak (NH₃) oluşum hızına ait modele ait istatistik değeri.

Std. Dev.	6,6998E-05	R-Squared	0,8842
Mean	0,0006	Adj R-Squared	0,7993
C.V. %	11,0503	Pred R-Squared	0,6216
PRESS	2,2006E-07	Adeq Precision	10,4481

Amonyak (NH₃) oluşum hızını çalışma koşullarına (pH, ÇO, N, X₀) bağlı olarak veren objektif fonksiyon aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned}
 NH_3 = & -0,00363186 + (0,00052696 \cdot pH) + (2,4605E-05 \cdot \text{ÇO}) + (2,3311E-05 \cdot N) \\
 & + (5,9387E-10 \cdot X_0) - (3,4437E-06 \cdot pH \cdot \text{ÇO}) - (2,5939E-06 \cdot pH \cdot N) \\
 & + (3,4928E-08 \cdot \text{ÇO} \cdot N) + (1,829E-11 \cdot \text{ÇO} \cdot X_0) - (1,3212E-07 \cdot \text{ÇO}^2) \\
 & - (1,9867E-08 \cdot N^2)
 \end{aligned}$$

Anova yüzey – cevap modeli sonuçları incelendiğinde (EK 7) görüleceği gibi amonyak (NH_3) oluşum hızı açısından çalışma parametreleri değerlendirildiğinde en önemli parametrelerin sırasıyla N ve ÇO olduğu görülmektedir.

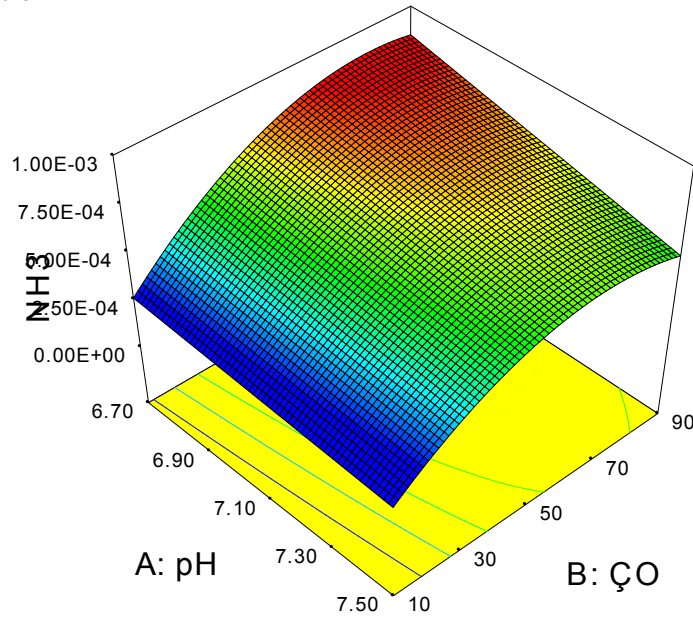
i) **Amonyak (NH_3) oluşum hızı– pH – çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi**

Hibridoma hücreleri ile yapılan çalışmada çalışma pH'sının artmasının $Y_{\text{lak/gli}}$ oranını düşürürken $Y_{\text{NH}_3/\text{glu}}$ 'ni arttırdığı ve $\text{pH} < 7.2$ değerlerinde glutamin tüketimi ve amonyak oluşum oranlarının arttığı bildirilmiştir (Öztürk et al.,1990). Şekil 4.34'te çalışma pH'sı ile çözünmüş oksijen derişimine bağlı amonyak oluşumuna ait hızın değişimi görülmektedir. Grafikten görüldüğü gibi amonyak oluşum hızı çalışma pH'sından kısmen etkilenirken, çözünmüş oksijen derişimi (ÇO) son derece etkili olmaktadır. Amonyak oluşum hızı düşük çalışma pH'sı ve yüksek çözünmüş oksijen (ÇO) derişimlerinde maksimum olmaktadır. Düşük çözünmüş oksijen (ÇO) derişimleri ise çalışma pH'sından bağımsız olarak amonyak oluşum hızını düşürmektedir.

Design-Expert® Software

NH_3
0.000845
0.00029

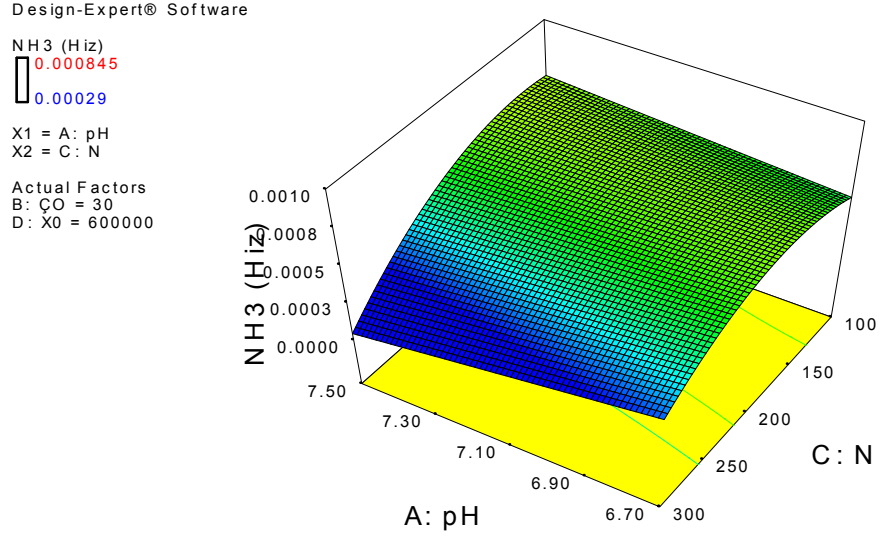
X1 = A: pH
X2 = B: ÇO
Actual Factors
C: N = 230
D: $X_0 = 600000$



Şekil 4.34. Amonyak (NH_3) oluşum hızı– pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi (çalışma koşulları; $N=230$ d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

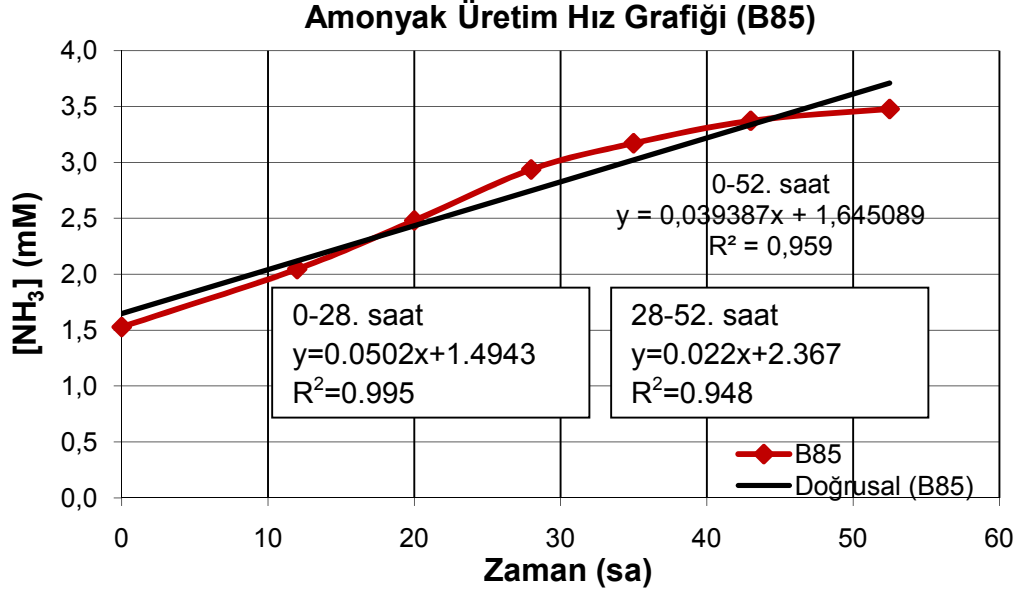
Düşük çalışma pH'sında amonyak oluşum hızında artış gözlenmekte ve bu sonuç literatür ile uyum göstermektedir. Ancak bu durum yüksek karıştırma hızları için

geçerlidir. Düşük karıştırma hızlarında ise neredeyse amonyak oluşumu sabit olarak izlenmekte hatta kısmen düşük pH değerlerinde azalma da gözlenmektedir. Şekil 4.35'te yüksek karıştırma hızı ve yüksek pH'ın amonyak oluşum hızını sıfıra yaklaştırdığı görülmektedir.



Şekil 4.35. pH – karıştırma hızı (N) – amonyak (NH₃) oluşum hızı ilişkisi (çalışma koşulları; ÇO=%30, N=230 d/dk, X₀=0.60*10⁶ hücre/mL)

Şekil 4.36'da B85 için elde edilmiş amonyak oluşum hız grafiği görülmekte olup daha önce laktat oluşumunda gözlenen durumla benzerlik gözlenmektedir. Grafikte 0-28. saat 1. eğim (amonyak oluşum hızı, 0.0502 sa⁻¹) ve 28-52. saat arası 2. eğim (amonyak oluşum hızı, 0.022 sa⁻¹) söz konusu olup 28. saat sonrası yaklaşık olarak amonyak oluşum hızında 2.5 katlık bir azalma söz konusudur. Bu durum daha önce de laktat oluşum hızı için açıklandığı gibi besiyerinde bulunan glutamin derişiminin azalması ve hücrenin kısıtlı koşullara metabolizmasını adapte etmesi bu nedenle verim faktörlerinde ve hızlarda eş zamanlı değişmelerin görülmesi şeklinde öngörülmektedir.



Şekil. 4.36. B85'e ait amonyak (NH₃) oluşum hızı grafiği (Çalışma koşulları; pH= 7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, X₀=0.60*10⁶ hücre/mL)

ii) Amonyak (NH₃) oluşum hızı - toplam protein (TP) ilişkisi

Toplam protein (TP) miktarı ve amonyak (NH₃) oluşum hızına ait şekiller (Şekil 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41, 4.42, 4.43, 4.44) incelenirse bu şekiller arasındaki benzerlik dikkat çekecektir. Modellere ait istatistiksel verilerin incelenmesinden her iki sistem içinde en önemli çalışma koşulunun karıştırma hızı (N) olduğu görülmektedir.

Süspanse BHK üretim proseslerinde 38 mM laktat derişimine ulaşıldığında ölü hücrelerin gözlenmeye başladığı amonyak kaynaklı ölümlerin genellikle apoptozla, laktat kaynaklı olanların ise nekrozla gerçekleştiği bildirilmiştir (Cruz et al., 2000). Açıklamalar ışığında amonyak derişiminin hücre ölümlerinde etkili olduğunu söylenebilir. Amonyak (NH₃) oluşum hızı ve toplam protein (TP) miktarına ait grafiklerdeki benzerliğin hücre üretim prosesindeki çalışma koşulları sonucu yüksek amonyak oluşum hızlarından kaynaklanan hücre ölümleri nedeniyle ortaya çıkan hücre kaynaklı proteinlerin toplam proteine (TP) etkisi nedeniyle mi yoksa ortaya çıkan toplam protein (TP) miktarının tespiti için kullanılan analiz yöntemi ile amonyak derişimlerinin analiz metotları ile mi ilişkili olduğu tartışma konusudur.

Design-Expert® Software

Protein

2602
910

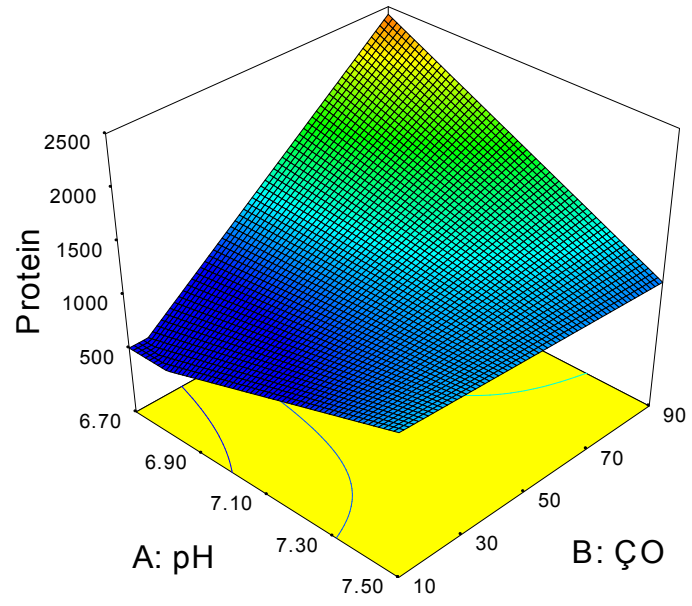
X1 = A: pH

X2 = B: ÇO

Actual Factors

C: N = 230

D: X0 = 600000



Şekil 4.37. Toplam protein (TP)-pH-çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi

Design-Expert® Software

NH₃

0.000845
0.00029

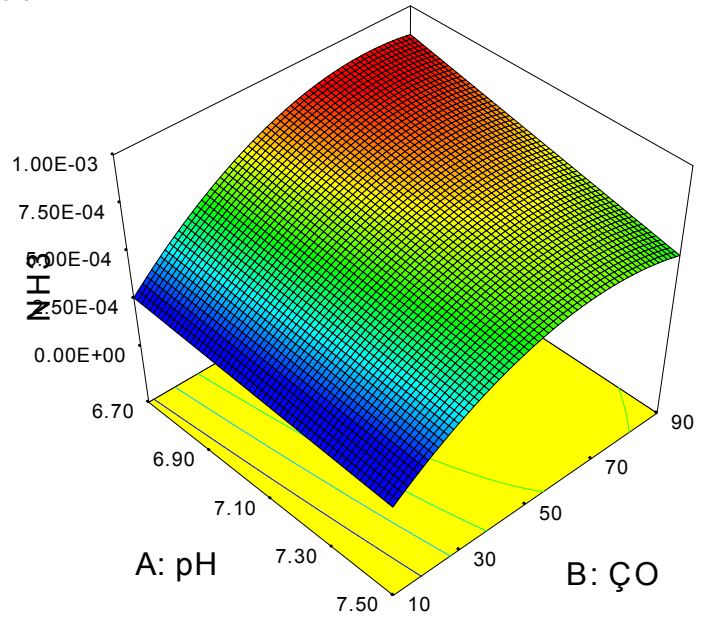
X1 = A: pH

X2 = B: ÇO

Actual Factors

C: N = 230

D: X0 = 600000



Şekil 4.38. Amonyak (NH₃) oluşum hızı -pH- çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi

Design-Expert® Software

Protein

2602

910

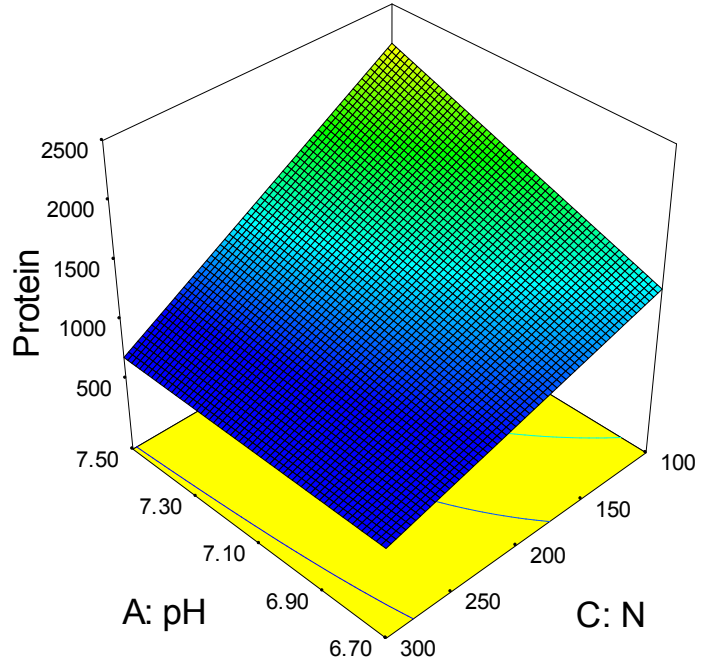
X1 = A: pH

X2 = C: N

Actual Factors

B: ÇO = 30

D: X0 = 600000



Şekil 4.39. Toplam protein (TP)-pH-karıştırma hızı (N) ilişkisi

Design-Expert® Software

NH₃

0.000845

0.00029

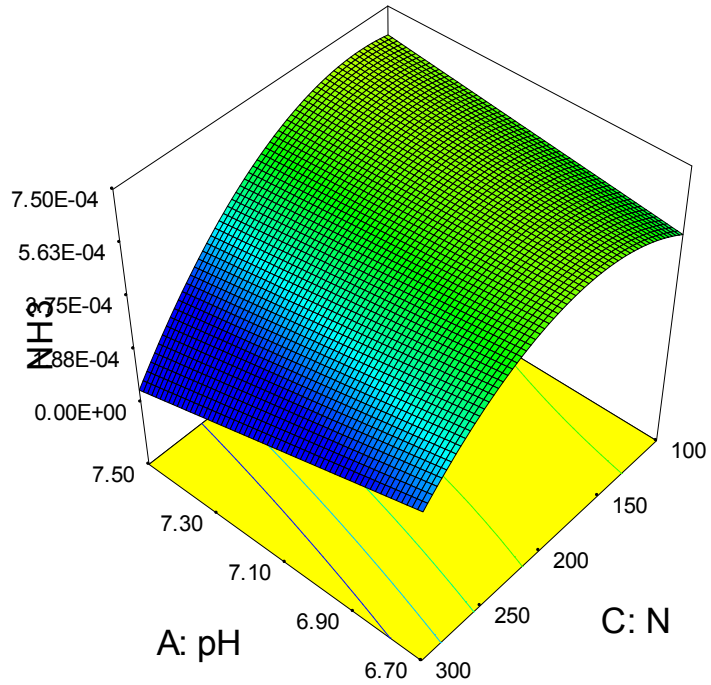
X1 = A: pH

X2 = C: N

Actual Factors

B: ÇO = 30

D: X0 = 600000



Şekil 4.40. Amonyak (NH₃) oluşum hızı -pH-karıştırma hızı (N) ilişkisi

Design-Expert® Software

Protein
2602
910

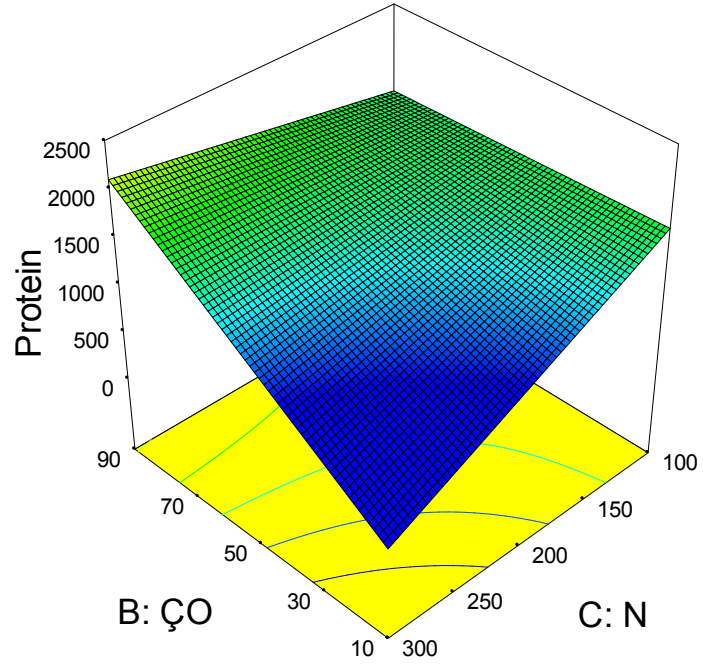
X1 = B: ÇO

X2 = C: N

Actual Factors

A: pH = 7.00

D: X0 = 600000



Şekil 4.41. Toplam protein (TP)-çözünmüş oksijen (ÇO)- karıştırma hızı (N) ilişkisi

Design-Expert® Software

NH₃
0.000845
0.00029

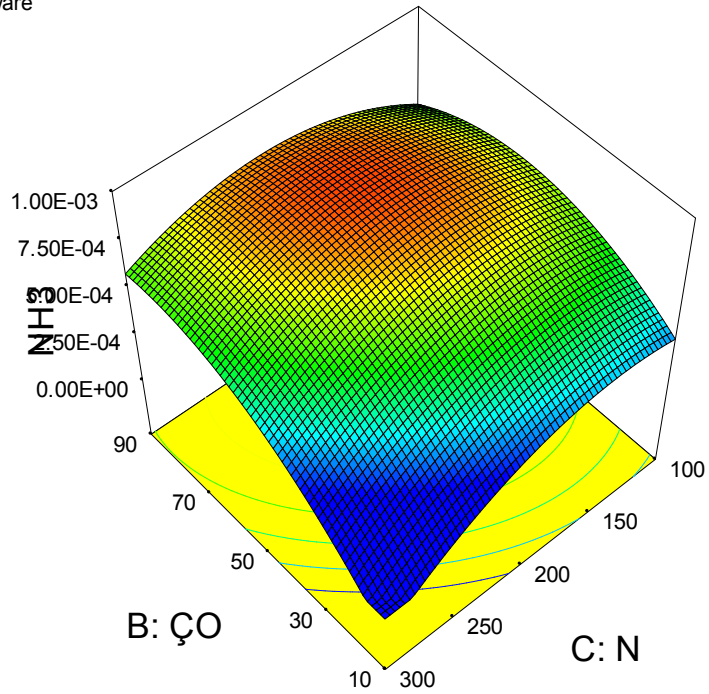
X1 = B: ÇO

X2 = C: N

Actual Factors

A: pH = 7.00

D: X0 = 600000



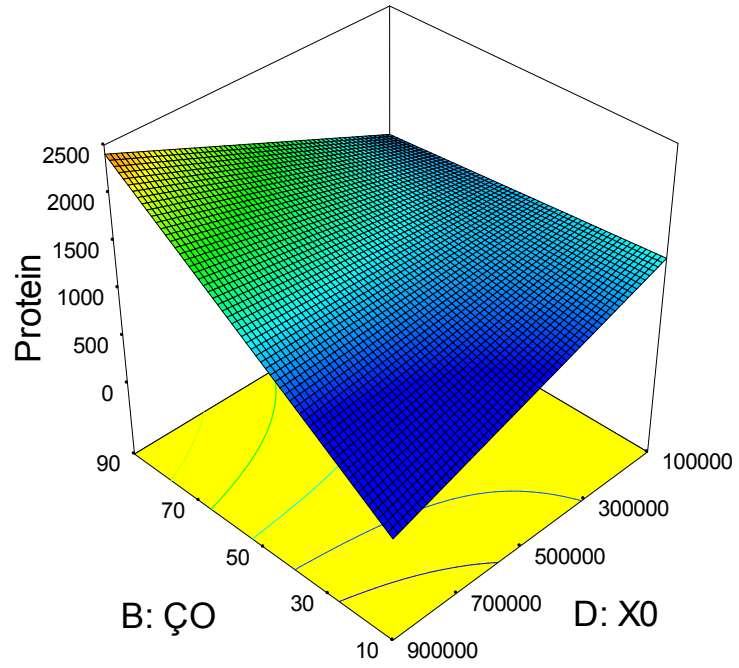
Şekil 4.42. Amonyak (NH₃) oluşum hızı-çözünmüş oksijen (ÇO)-karıştırma hızı (N) ilişkisi

Design-Expert® Software

Protein
2602
910

X1 = B: ÇO
X2 = D: X0

Actual Factors
A: pH = 7.00
C: N = 230



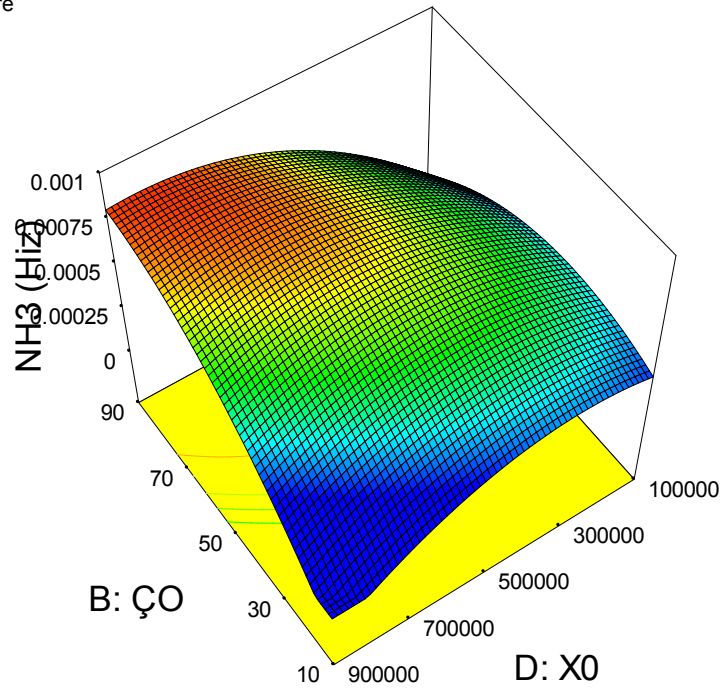
Şekil 4.43. Toplam protein (TP)-çözülmüş oksijen (ÇO)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi

Design-Expert® Software

NH3 (Hiz)
0.000845
0.00029

X1 = B: ÇO
X2 = D: X0

Actual Factors
A: pH = 7.00
C: N = 230



Şekil 4.44. Amonyak (NH_3) oluşum hızı-çözülmüş oksijen (ÇO)- X_0 ilişkisi

iii) **Başlangıç ve son amonyak (NH₃) derişimi ilişkisi**

Tekrarlı-kesikli hücre üretim yönteminde başlangıç laktat derişimi için daha önce Madde 4.6 (v)'te yapılan açıklamalar başlangıç amonyak (NH₃) derişimi için geçerli olmamaktadır. Aşılama için bırakılan miktar ve taze besiyeri oranı ile elde edilmesi gereken başlangıç derişimine göre yüksek başlangıç derişimleri analiz edilmiştir. Doğrulama deneylerinde başlangıç amonyak (NH₃) derişimi 1.50-2.50 mM aralığında değişmiş olup bu değer son amonyak derişimlerinin 3.20-4.30 mM aralığında olduğu göz önüne alındığında başlangıç amonyak derişiminin %50±10 olduğu görülmektedir. Bu durumun iki nedeni olabilir. Birincisi daha önce bahsedilen tekrarlı-kesikli üretim yöntemi ve diğeri ise kullanılan besiyerlerinin beklemiş olması veya serum gibi diğerkaynakların amonyak içermesi olabilir. Besiyeri kullanılıncaya kadar her ne kadar +4 °C'de bekletilse de glutaminin pH, sıcaklık ve zamana bağlı olarak bozunması amonyak (NH₃) oluşturmaktadır. Bu durum tekrarlı-kesikli üretim yönteminin dezavantajı olarak değerlendirilmektedir. Tekrarlı-kesikli üretim yapılan biyoproseslerde başlangıç amonyak derişiminin düşürülmesi için aşılama da kullanılacak hücrenin besiyerinden herhangi bir yöntemle ayrılması (örneğin; çöktürme yöntemiyle) ve yeni biyoproses için tamamen taze besiyeri kullanılması bir çözüm yolu olarak düşünülebilir. Açıklanan durumlar nedeni ile 6M besiyerinde bulunan glutamin derişimi tekrarlı-kesikli üretim yöntemi için iyi değerlendirilmesi ve izlenmesi gereken önemli bir parametre olarak ortaya çıkmaktadır.

4.8. **Toplam Protein Miktarı (TP) Anova Testi Sonuçları**

Design Expert 7.0 orijinal çıktısından alınmış olan virüs kültürü sonrası alınan numunelerin toplam protein (TP) miktarları için Anova testi sonuçları aşağıdaki gibidir. İstatistik programı tarafından “2FI-Lineer” model öngörülmüş ve aşağıdaki istatistiksel değerler elde edilmiştir. Çizelge 4.10'da toplam protein (TP) miktarı için oluşturulan modele ait istatistik değerkler verilmiştir.

Çizelge 4.10. Toplam protein (TP) miktarına it modele ait istatistik değerkler.

Std. Dev.	215,05	R-Squared	0,830
Mean	1454,96	Adj R-Squared	0,730
C.V. %	14,78	Pred R-Squared	0,590
PRESS	1895069,33	Adeq Precision	12,079

Toplam protein (TP)'e ait model için önerilen objektif fonksiyon aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} TP = & - 16593,7755 + (3362,8307 \cdot pH) + (207,0902 \cdot \text{ÇO}) + (11,8533 \cdot N) \\ & + (0,0014218 \cdot X_0) - (34,6344 \cdot pH \cdot \text{ÇO}) - (5,0530 \cdot pH \cdot N) - (0,001252 \cdot pH \cdot X_0) \\ & + (0,1260720 \cdot \text{ÇO} \cdot N) + (3,6319E-05 \cdot \text{ÇO} \cdot X_0) + (2,4731E-05 \cdot N \cdot X_0) \end{aligned}$$

Anova yüzey-cevap modeli sonuçları incelendiğinde (EK 8) görüleceği gibi toplam protein (TP) açısından yapılan çalışma aralıkları için elde edilen sonuçlara göre çalışma parametreleri değerlendirildiğinde en önemli parametrelerin sırasıyla N, X_0 , ÇO olduğu görülmektedir. Çalışma pH'sının toplam protein miktarına diğer parametrelere göre daha düşük etkisi olduğunun tespiti önemli görülmektedir. Yine toplam protein açısından ağırlığı en fazla olan parametrenin karıştırma hızı (N) çıkması beklenebilir bir durumdur. Ancak beklenin aksine yüksek karıştırma hızı yerine düşük devirlerde toplam protein (TP) miktarında gözlenen artış değerlendirilmesi gereken bir konudur.

i) **Toplam protein (TP)-çözünmüş oksijen (ÇO)-karıştırma hızı (N) ilişkisi**

Şekil 4.45. incelenirse yüksek ÇO derişimlerinde toplam protein miktarında artış meydana geldiği ve yüksek karıştırma hızlarında ise tersine düşüş görülmektedir.

Design-Expert® Software

Protein

2602

910

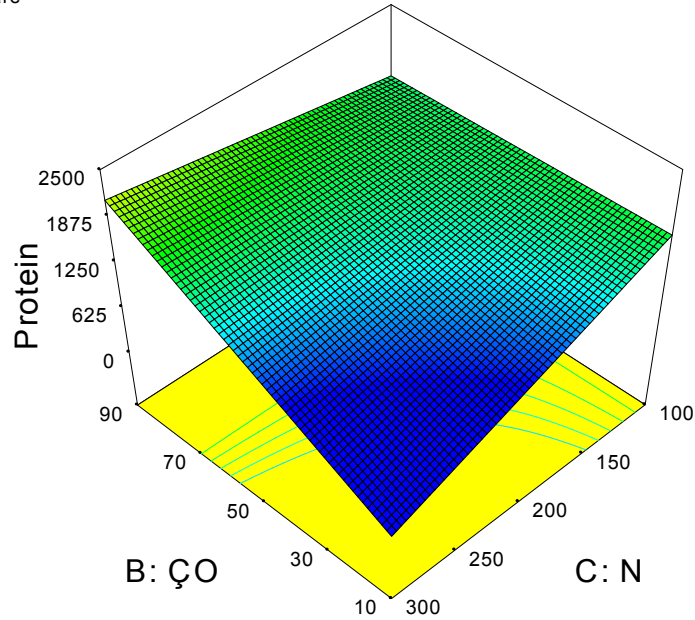
X1 = B: ÇO

X2 = C: N

Actual Factors

A: pH = 7.00

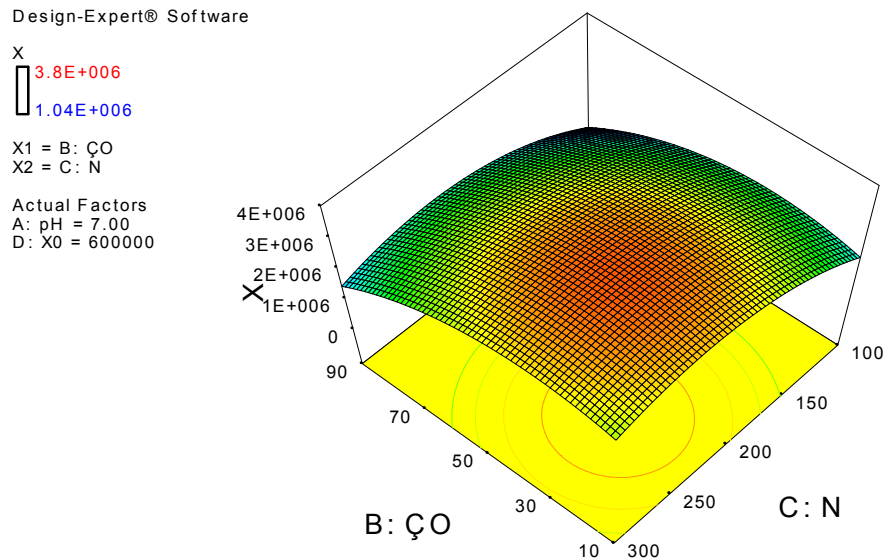
D: $X_0 = 600000$



Şekil 4.45. Toplam protein (TP)-çözünmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızı (N) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Düşük çözünmüş oksijen (ÇO) ve yüksek karıştırma hızlarında (N), toplam protein (TP) miktarı minimum olmaktadır. Benzer şekilde iyi homojenite ve havalandırma oranının düşmesi ve hücre membranlarının literatürde bildirilen oksidatif hasarlara maruz kalmaması ile ilişkilendirilmektedir. TP miktarının virüs kültüründen alınan numunelere ait olduğu ve nedenle hücre üretim koşullarıyla ilgisinin olmadığını düşünmek de mümkündür. Ancak hücre üretim prosesinde alınan numunelerin amonyak (NH_3) oluşum hızları ile virüs kültürü sonrası analiz edilen TP miktarlarındaki benzerlik olup bu durum üretim koşulları ile TP arasında bir ilişkinin varlığına işaret etmektedir. Aşağıda hususlarda göz önüne alındığında TP miktarının hücrelerin üretim koşullarından etkilendiğini söyleyebiliriz.

Şekil 4.46'da görüldüğü gibi hücre metabolizmasının en iyi çalıştığı durumda son hücre sayısı (X) maksimum iken toplam protein miktarı (TP) ve amonyak (NH_3) oluşum hızı minimum olarak izlenmektedir. Virüs kültürü için kullanılan besiyeri TP miktarı ölçülmüş ve 1500 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Metabolik olarak sağlıklı hücrelerin virüs kültürüne aktarıldıklarında da üreme ortamı çalışma koşullarına göre metabolik faaliyetlerini belirli bir süre (virüs siklusunu tamamlayıncaya kadar (6-12 saat) sürdürdüklerini ve besiyeri TP miktarını düşürdüklerini aksi durumun ise besiyeri TP miktarında artışa neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.46. Son hücre sayısı (X)-çözünmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızı (N) ilişkisi (çalışma koşulları pH=7.00, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Virüs kültürü çalışma koşullarına yakın koşullarda üreyen hücrelerin besiyeri değişimi ile metabolizmalarında değişiklik yapmadan metabolik faaliyetlerine devam etmeleri böylece kısalan adaptasyon süresinin de etkili olabileceği değerlendirilebilir. Diğer bir yaklaşım olarak hücre kültürü sonrası virüs kültürü başlangıç hücre sayısı ayarlanması için çöktürme yöntemi kullanılması sırasında ortamdaki proteinlerinde kısmen çökmüş olabileceği ve virüs kültürü için alınan taze besiyerine geçtikleri düşünülmektedir. Son hücre sayısı (X) ve buna bağlı sayı ayarlamasına ($X \approx 1.70 \cdot 10^6$ hücre/mL) göre konsantre edilmesi veya besiyeri ile konsantrasyonunun düşürülmesi ile ortama geçen protein miktarlarının değiştiği düşünülebilir. Uygun çalışma koşullarında metabolik olarak sağlıklı ve hızlı üremiş hücrelerde virüs kültürü besiyeri ile konsantrasyonun azalma yönünde etki edeceği aksine optimum nokta dışında üretilmiş ve son hücre sayısı $X \approx 1.70 \cdot 10^6$ hücre/mL'in altında olan hücreler için ise tersine olarak TP'nin normalden yüksek olması durumu da söz konusudur. Ancak bu durum sadece protein miktarı virüs besiyeri toplam protein miktarından ($TP \approx 1500 \mu\text{g/mL}$) düşük ise gerçek değerinden yüksek ve yüksek ise gerçek değerine göre daha düşük bulunması sonucunu doğurabilir. Son olarak da çalışma koşullarının hücrelerin protein sentezine etki ettiği göz önüne alınarak her çalışma koşulunda farklı protein miktar ve yapılarına sahip hücre üretildiği ve bu nedenle çalışma koşullarının toplam protein miktarını doğrudan değiştirdiği de düşünülebilir. Böylece biyoproses çalışma koşullarının TP ile ilişkisi kısmen de olsa açıklanmış olmaktadır. Modelde bulunmuş olan TP değerlerinin yapılmış olan açıklamaların kombine etkilerinin sonucu olduğu öngörülmektedir.

ii) Toplam protein (TP) - çözünmüş oksijen (ÇO) - pH ilişkisi :

Şekil 4.47. incelendiğinde ortamdaki toplam protein (TP) miktarının pH ve çözünmüş oksijen (ÇO)'e bağlı değişimi izlenmektedir. En düşük TP miktarının düşük pH ve ÇO derişimlerinde gerçekleşmesi havalandırma oranını hatırlatmaktadır. Şöyle ki en az havalandırma oranı (vvm) düşük ÇO derişimlerinde ve düşük pH kontrolü yapılan sistemde kullanılmıştır.

Design-Expert® Software

Protein

2602

910

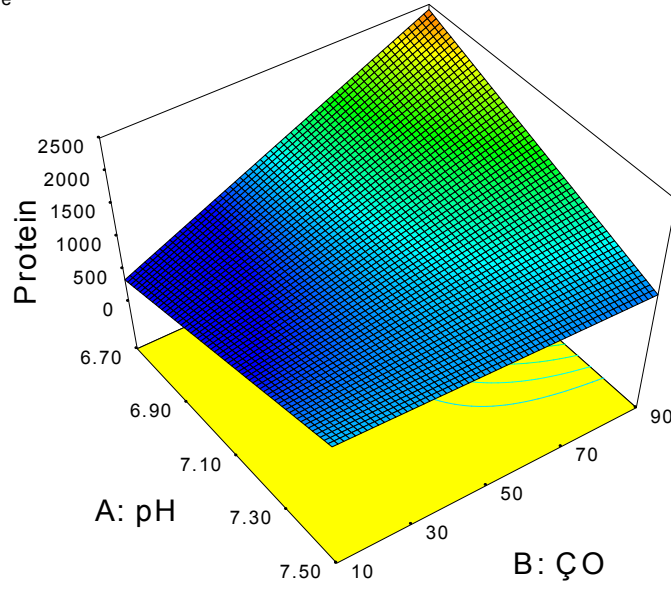
X1 = A: pH

X2 = B: ÇO

Actual Factors

C: N = 230

D: X0 = 600000



Şekil 4.47. Toplam protein (TP)-pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) ilişkisi (çalışma koşulları; N=230 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Düşük pH değerlerinde hücrelerin artan çözünmüş oksijen (ÇO) derişimleri ile artan havalandırma oranlarına daha hassas olduğu için hücrelerin daha fazla hasar gördüğü ve ortamdaki protein miktarının bu nedenle arttığını düşündürmektedir. Burada düşük pH ve yüksek ÇO derişimlerinde çalışan sistemlerin kontrolünde yaşanan önemli bir sorun da görülmektedir. Düşük pH değerlerinde çalışmalar yapılırken besiyerindeki çözünmüş karbondioksiti uzaklaştırmak için havalandırma ile süpürme yapılmasına ihtiyaç yoktur, bu nedenle daha düşük havalandırma oranları (vvm) kullanılmaktadır. Ancak koşullardan esas belirleyici olan ÇO derişimidir. Çünkü şayet yüksek ÇO derişimlerinde çalışılacaksa; ÇO seviyesini artırmak için yapılan havalandırma aynı zamanda süpürme etkisi ile besiyeri içindeki çözünmüş karbondioksiti uzaklaştırmakta ve pH'yı yukarı çekmektedir. Bu durumda çalışma pH'sını istenen set değerinde tutabilmek için besiyerine karbondioksit (CO_2) verilmesi gerekmektedir. Bu ters ilişki nedeni ile pH ve ÇO derişimlerinin kontrolü açısından en zor durumun düşük pH ve yüksek ÇO derişimleri ile yapılan çalışmalar olduğu söylenebilir. Bu çalışma koşullarında kullanılan toplam gaz miktarlarının artması söz konusu olmaktadır. Deney sisteminde yalnızca makrosparger ile çalışıldığından dolayı toplam gaz debisinde artış söz konusu olmuştur.

Düşük ÇO derişimi ile yapılan çalışmalarda hücre daha dayanıklı olmasına rağmen pH artışına paralel olarak toplam protein miktarının kısmi artışı yüksek pH seviyelerinde makrosparging uygulamasının çözünmüş CO₂'i süpürmesi nedeniyle kullanılan hava debilerinin artması ve kısmen de kullanılan baz kullanım miktarındaki artışla ilişkili olabilir.

Yüksek ÇO derişimlerinde artan pH ile toplam protein miktarının azalması yine yüksek ÇO için yapılan havalandırmanın aynı zamanda süpürme etkisi ile besiyeri pH'sının yükseltilmesine katkısından dolayı toplam havalandırma oranının (vvm) artan besiyeri pH'sı ile azalması şeklinde açıklanabilir. Bu durumda besiyerindeki toplam protein miktarının her ne kadar besiyeri pH ve ÇO derişimine bağlı olarak değiştiği görölse de aslında ana mekanizmanın havalandırma oranı (vvm) olduğu ve bunun hücre membran bütünlüklerini bozması esas neden olarak görölmektedir. Bu durumda hücre için optimum çalışma değerleri tespit edilirken mümkün olan en düşük havalandırma oranını (vvm) sağlayan çalışma koşullarının tercih edilmesi ile daha düşük TP elde edilmesi sayesinde üretim sonrası saflaştırma (down stream) aşamalarını da kolaylaştıracağı düşünölmektedir.

iii) **Toplam protein (TP) - karıştırma hızı (N) - pH ilişkisi**

Şekil 4.48 incelenirse verilen çalışma koşulları için yüksek karıştırma hızlarında (N) toplam protein (TP) miktarının pH'tan bağımsız ve minimum olduğu görölmektedir. Yapılan çalışma aralığındaki karıştırma hızlarının (N) neden olduğu kesme gerilmelerinin hücre bütünlüğüne önemli oranda zararı olmadığını düşöndürmektedir. Şekilden düşük karıştırma hızlarında (N) toplam proteinin (TP) arttığı görölmektedir. Bu durum düşük karışma zamanı (t_m) nedeni ile ortaya çıkan lokal olarak homojen olmayan bölgelerin hücrelere zarar vermesi ile ilişkilendirilebilir. Düşük karıştırma hızlarında (N) toplam protein (TP) miktarı, artan çalışma pH'sı ile artmaktadır. Bu koşullarda proseste kullanılan baz miktarının ve havalandırma oranının (vvm) arttığı not edilmelidir. Ayrıca daha önce (Bölüm 4.7.2.) açıklandığı gibi amonyak oluşum hızına ait grafikler ile toplam protein (TP) grafiklerinin benzer olması nedeni ile yapılan tüm bu açıklamaların amonyak oluşumu hızı ile de ilişkili olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Design-Expert® Software

Protein

2602

910

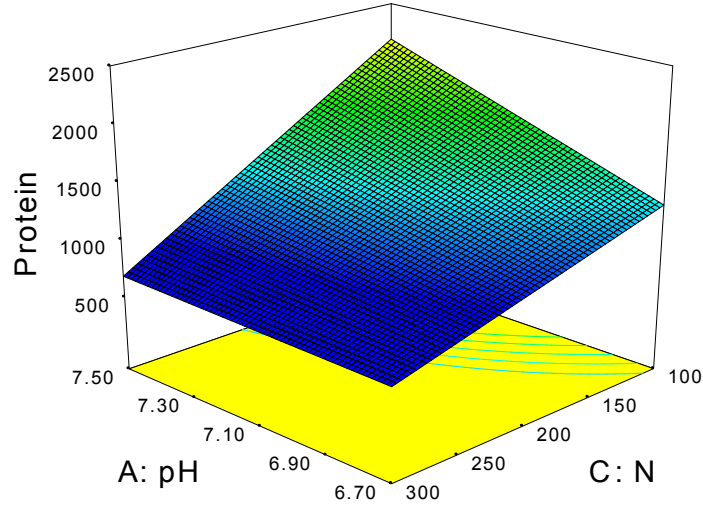
X1 = A: pH

X2 = C: N

Actual Factors

B: ÇO = 30

D: X0 = 600000



Şekil 4.48. Toplam protein (TP)-pH ve karıştırma hızı (N) ilişkisi (çalışma koşulları; ÇO=%30, $X_0=0.60 \times 10^6$ hücre/mL)

4.9. Deney Sonuçlarının Optimizasyonu

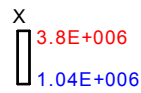
Biyoteknoloji ürünlerinin üretimlerinde kullanılan her hücre ve üretim sisteminde çok sayıda girdi vardır. Biyolojik madde üretiminde birçok kimyasal ve metabolik faaliyetler gerçekleşmekte olup bu reaksiyon mekanizmalarının çok büyük bir bölümü halen anlaşılamamış olduğundan üretim prosesinin tamamen kontrol altında tutulmaları mümkün değildir. Bütün bu koşullar altında belirlenen bağımlı değişkenler için yüzey-cevap yöntemi kullanılarak eşitlikler geliştirilmiş ve bağımsız parametrelerin optimum değerleri saptanmıştır. Son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarının çarpımlarının maksimizasyonu için elde edilen modellerin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Şekil 4.49 ve 4.50, incelenirse 146S partikül miktarını maksimum yapan çalışma koşulları; pH, çözünmüş oksijen (ÇO), karıştırma hızı (N) ve başlangıç hücre sayısı (X_0) ile maksimum son hücre sayısının (X), elde edildiği çalışma koşullarının tez başlangıcında öngörüldüğü gibi farklı olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.11'de çalışma parametreleri arasındaki farklar gösterilmiş ve optimum çalışma koşullarının genelleştirilmiş değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.11. Son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarlarını tek ve birlikte maksimum yapan çalışma koşulları

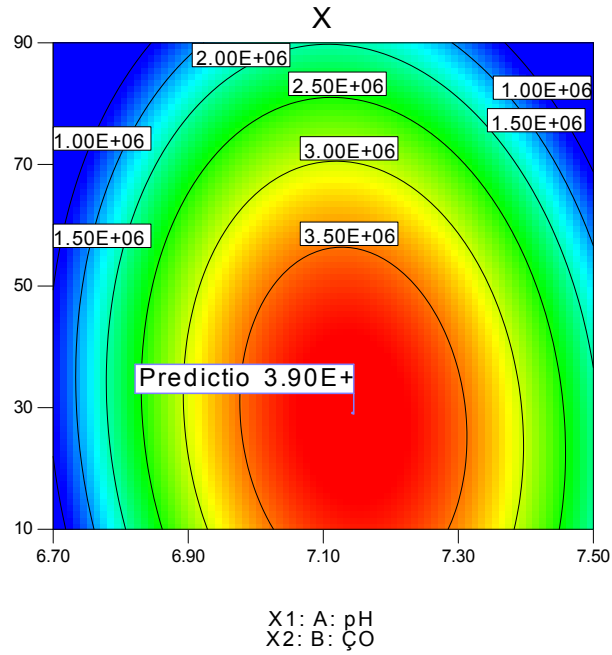
Çalışma Parametresi	Maksimum son hücre sayısı (X) için (hücre/mL)	Maksimum 146S partikül miktarı için (µg/mL) Çözüm 1	Maksimum 146S partikül miktarı için (µg/mL) Çözüm 2	X ve 146S Partikül miktarı için optimize edilmiş çalışma parametreleri
pH	7.15±0.05	6.90±0.10	7.40±0.05	7.00±0.05
ÇO (%)	%30±5	%25-70	%30±5	%25±5
N (d/dk)	230±20	150±20	285±15	180±20
X ₀ (hücre/mL)	0.65±0.05*10 ⁶	0.60±0.05*10 ⁶	0.40±0.10*10 ⁶	0.65±0.05*10 ⁶

Design-Expert® Software

X


X1 = A: pH
X2 = B: ÇO

Actual Factors
C: N = 223
D: X0 = 662349



Şekil 4.49. Son hücre sayısını (X) maksimum yapan çalışma parametreleri (N=223 d/dk, X₀=0.66*10⁶ hücre/mL)

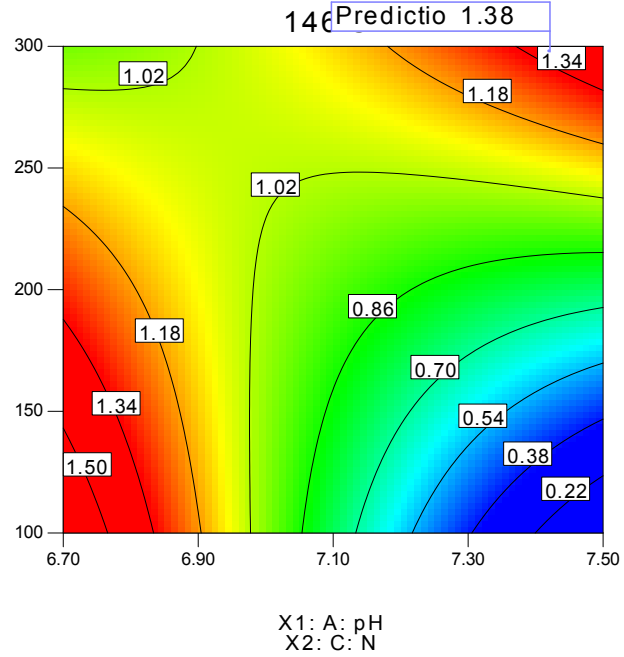
Şekil 4.49'da model; N=223 d/dk, X₀=0.66*10⁶ hücre/mL, pH=7.15±0.05 ve ÇO=%30±5 çalışma koşullarında elde edilecek son hücre sayısını X=3.90*10⁶ hücre/mL olarak öngörmektedir.

Design-Expert® Software

146 S
1.34
0.35

X1 = A: pH
X2 = C: N

Actual Factors
B: ÇO = 25
D: X0 = 309753



Şekil 4.50. Maksimum 146S partikül miktarının elde edileceği çalışma parametreleri (çalışma koşulları; ÇO=%25, $X_0=0.31 \cdot 10^6$ hücre/mL).

Şekil 4.50’de 146S partikül miktarının maksimum olarak elde edilebileceği iki bölge görülmektedir. Model tarafından çalışma koşulları; ÇO=%25, $X_0=0.31 \cdot 10^6$ hücre/mL, pH=6.75, $N=125 \pm 25$ d/dk olduğunda 146S=1.50 µg/mL olarak önerilmektedir. Şekil 4.51’de model tarafından önerilen ve maksimum 146S partikül miktarının elde edileceği optimize edilmiş çalışma koşullarına ait bir örnek verilmiştir. Model; pH =6.97, ÇO=%27, $N=169$ d/dk, $X_0=0.66 \cdot 10^6$ hücre/mL çalışma koşullarında son hücre sayısını $X=3.18 \cdot 10^6$ hücre/mL ve 146S=1.23 µg/mL olarak öngörmektedir.

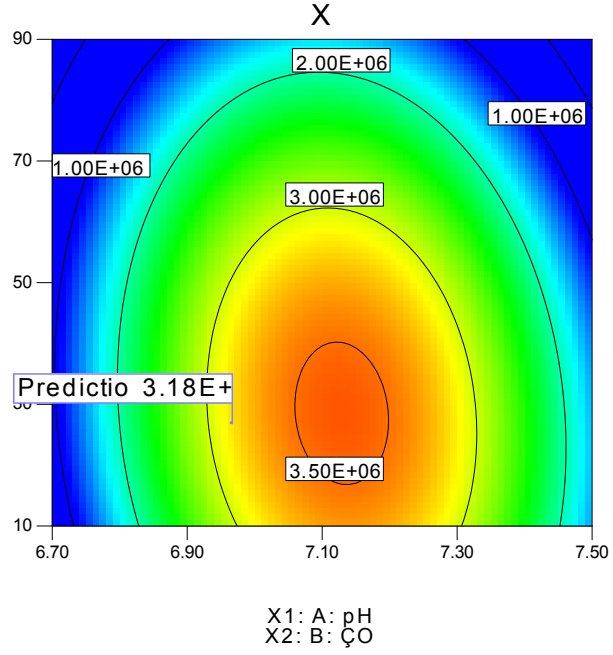
Kesikli üretimde maksimum 146S partikül miktarının elde edilebilmesi için öncelikle son hücre sayısını maksimum yapan pH ve karıştırma hızında (N) çalışılarak maksimum hücre sayısına çıkılması sonra besiyeri pH’sı düşürülerek maksimum 146S partikülü elde edilmesi düşünülebilir. Elde edilen modeller otomasyon senaryosuna tanıtılarak bu işlemlerin otomatik olarak yapılması da mümkündür. Burada hücrenin metabolik cevap süresi önem kazanmaktadır.

Design-Expert® Software

X
3.8E+006
1.04E+006

X1 = A: pH
X2 = B: ÇO

Actual Factors
C: N = 169
D: X0 = 658778



Şekil 4.51. Son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarının birlikte maksimum olarak elde edileceği çalışma koşulları (pH=6.97, ÇO=%27, N=169 d/dk, $X_0=0.66 \cdot 10^6$ hücre/mL).

Son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarı açısından karıştırma hızı (N) ve çözünmüş oksijen (ÇO) etkili parametreler olarak izlendiğinden sadece pH değil N ve ÇO kontrolü ile biyoprosesin belirli sürelerinde otomatik olarak kontrol edilen çalışma koşulları kontrol sistemi yardımıyla öngörülebilir.

4.10. Doğrulama Deneyleri

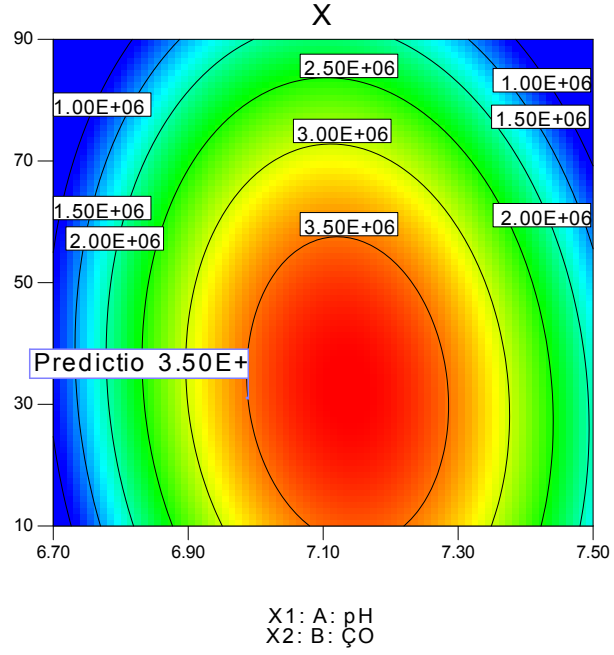
Oluşturulan modeller hem son hücre sayısı (X) için hem de 146S partikül miktarını maksimum yapacak şekilde Design Expert 7.0 (deneme sürümü) programının optimizasyon kısmı yardımı ile optimize edildiğinde ağırlık oranlarına bağlı olarak belirli çalışma aralıkları önermektedir. Doğrulama deneyleri çalışma koşulları bu aralıklara uygun ve pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \pm 0.05 \cdot 10^6$ hücre/mL olarak belirlenmiştir. Şekil 4.52'de program tarafından üretilmiş grafikte, verilen çalışma koşullarında son hücre sayısı $X=3.50 \cdot 10^6$ hücre/mL olarak öngörülmüştür.

Design-Expert® Software

X
3.8E+006
1.04E+006

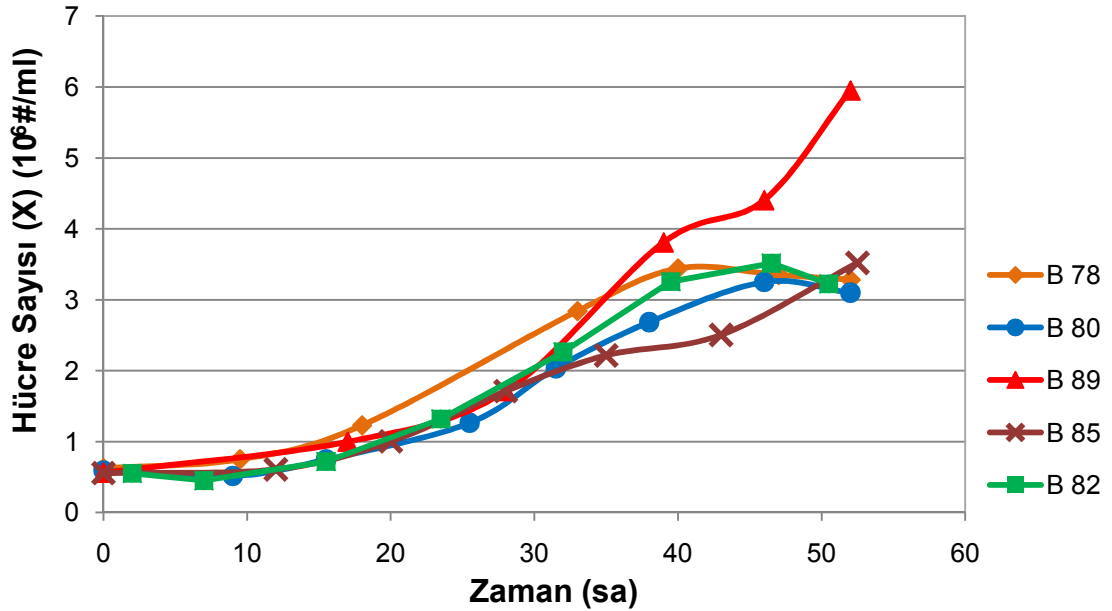
X1 = A: pH
X2 = B: ÇO

Actual Factors
C: N = 230
D: X0 = 600000



Şekil 4.52. Doğrulama deneyleri için önerilen çalışma koşullarında (pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL) çalışılması durumunda (son hücre sayısı (X) ve 146S'i birlikte maksimum yapan) model tarafından öngörülen son hücre sayısı (X) grafiği

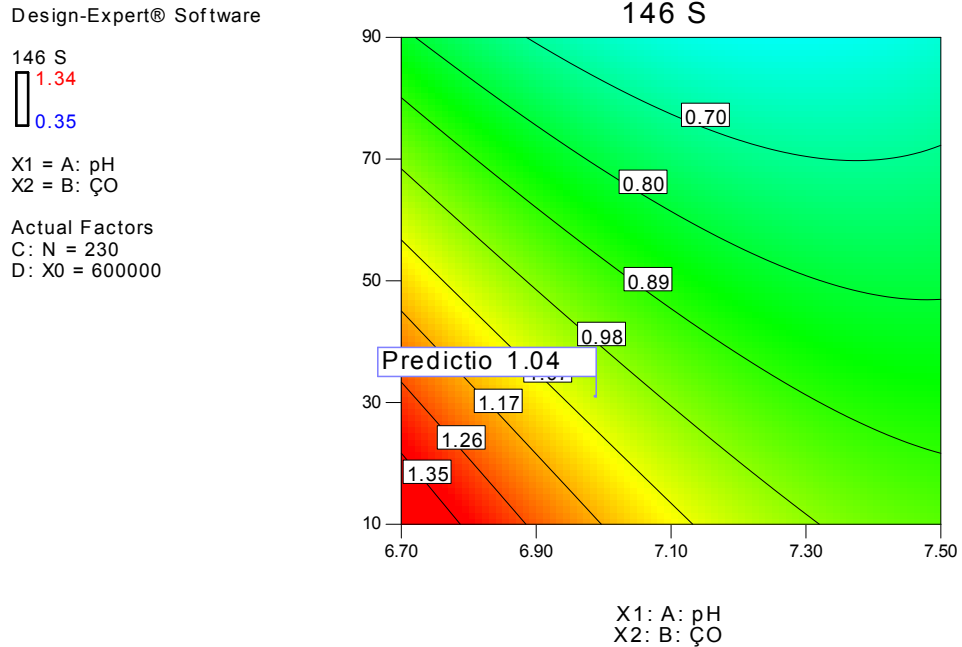
Validasyon Deneyleri Üreme Eğrileri



Şekil 4.53. Doğrulama deneylerine ait hücre üreme grafikleri B78, B80, B82, B85 (besiyeri-1) ve B89 (besiyeri-2) (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \pm 0.05 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Şekil 4.53'te doğrulama deneylerine B78, B80, B82, B85 (besiyeri-1) ait hücre üreme eğrileri görülmektedir. Doğrulama deneylerinde elde edilen son hücre sayıları $X=3.36\pm0.16\cdot10^6$ hücre/mL'dir. Doğrulama deneylerinden 5. çalışmada (B89) besiyeri-2 kullanılmış ve son hücre sayısı $X=5.95\cdot10^6$ hücre/mL olarak elde edilmiştir. Hemositometrik sayımlarda $\pm\%10$ hata yapılmasının kabul edilebilir bir sayım hatası olduğu düşünülürse modelin önerdiği son hücre sayılarına (X) ulaşılmıştır.

Model önerdiği çalışma koşullarında (pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60\cdot10^6$ hücre/mL) yapılacak doğrulama deneyleri için 146S partikül miktarını 146S=1.04 µg/mL olarak öngörmüş ve yapılan doğrulama deneylerinde 146S partikül miktarı 146S=0.94±0.30 µg/mL olarak bulunmuştur. Doğrulama deneylerinde elde edilen 146S partikül miktarları modelin öngördüğü değeri kapsamakla birlikte standart sapma değerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu noktada deney sonuçlarının hücre üretimi dışında konuları da ilgilendirdiği ve virüs üretim aşamalarının optimizasyonu ile 146S partikül miktarının tespit edildiği test doğrulama çalışmalarının bu kapsamda değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

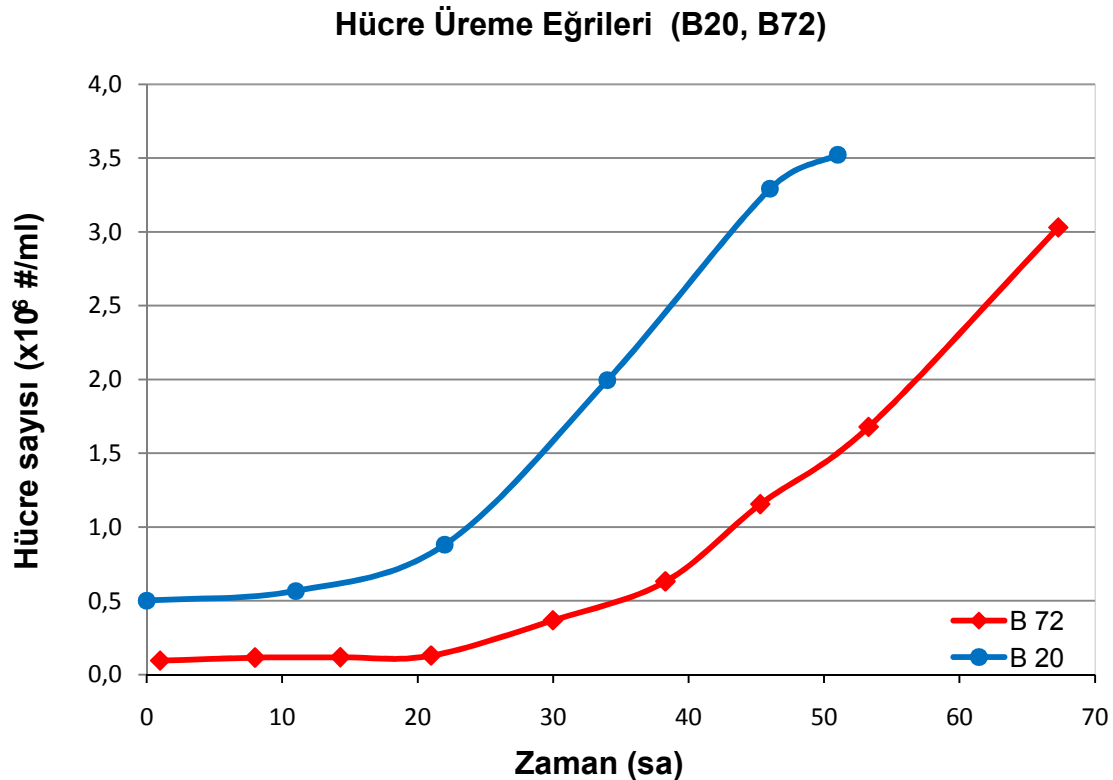


Şekil 4.54. Modelin doğrulaması için yapılacak deneylerde (son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarı kombinasyonunu maksimum yapan) önerilen çalışma koşullarında (pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60\cdot10^6$ hücre/mL) öngörülen 146S partikül miktarı

Şekil 4.54'te elde edilen modelin optimize edilmesi ile program tarafından önerilen çalışma noktalarında (pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL) yapılacak deneylerde son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarı kombinasyonunu maksimum yapan durumda elde edilecek 146S partikül miktarına ait grafik görülmektedir. Grafikten 146S partikül miktarı için öngörülen değerin 146S=1.04 µg/mL olduğu görülmektedir.

4.11. Başlangıç hücre sayısı (X_0) ve biyoproses süresi ilişkisi

Düşük başlangıç hücre sayısı (X_0) ile başlanan hücre üretim proseslerinde hücre maksimum son hücre sayısına (X) daha uzun biyoproses süresinde ulaşmaktadır. Şekil 4.55'te B20 ve B72'ye ait hücre üreme grafikleri görülmektedir. B20 ve B72 düşük başlangıç hücre sayıları farklı (B20 için $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL ve B72 için $X_0=0.095 \cdot 10^6$ hücre/mL) ancak diğer çalışma koşulları (N=200 d/dk, pH=7.10, ÇO=%50) aynıdır.



Şekil 4.55. Düşük ve yüksek başlangıç hücre sayılarının (X_0) biyoproses süresine etkisi (Çalışma koşulları; B20 için N=200 d/dk, pH=7.10, ÇO=%50, $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL ve B72 için N=200 d/dk, pH=7.10, ÇO=%50, $X_0=0.095 \cdot 10^6$ hücre/mL).

B72'de 68. saatte $X=3.0 \cdot 10^6$ hücre/mL son hücre sayısına ulaşılmıştır. Hücre üreme eğrisi incelenirse henüz son hücre sayısına ulaşılmadan deneyin sonlandırıldığı görülecektir. Yani son hücre sayısının (X) elde edileceği süre gerçekte yaklaşık 70-75 saat civarındadır. B20'de maksimum son hücre sayısına (X) ulaşma süresi 50. saat olarak görülmektedir. Benzer şekilde doğrulama deneylerinde maksimum son hücre sayısına (X) ulaşma süresi 40-48 saat olarak gerçekleşmiştir. Bu durumda başlangıç hücre sayısının (X_0) biyoproses süresini çok önemli oranda değiştirdiği görülmektedir. Bu sonuç biyoproses optimize edilirken biyoproses süresinin düzenlenmesi için kullanılabilir.

Yapılacak diğer deneysel çalışmalar ile maksimum 146S partikül miktarının elde edildiği biyoproses süresi tespit edildikten sonra hücre üretim sürecinin en yüksek son hücre sayısının (X) ve en yüksek 146S partikül miktarlarının alındığı koşullara göre biyoproses süresinin optimize edilmesi ile ürün artışı sağlanabileceği düşünülmektedir.

4.12. Hacimsel Kütle Transfer Katsayısı (k_La) – X İlişkisi

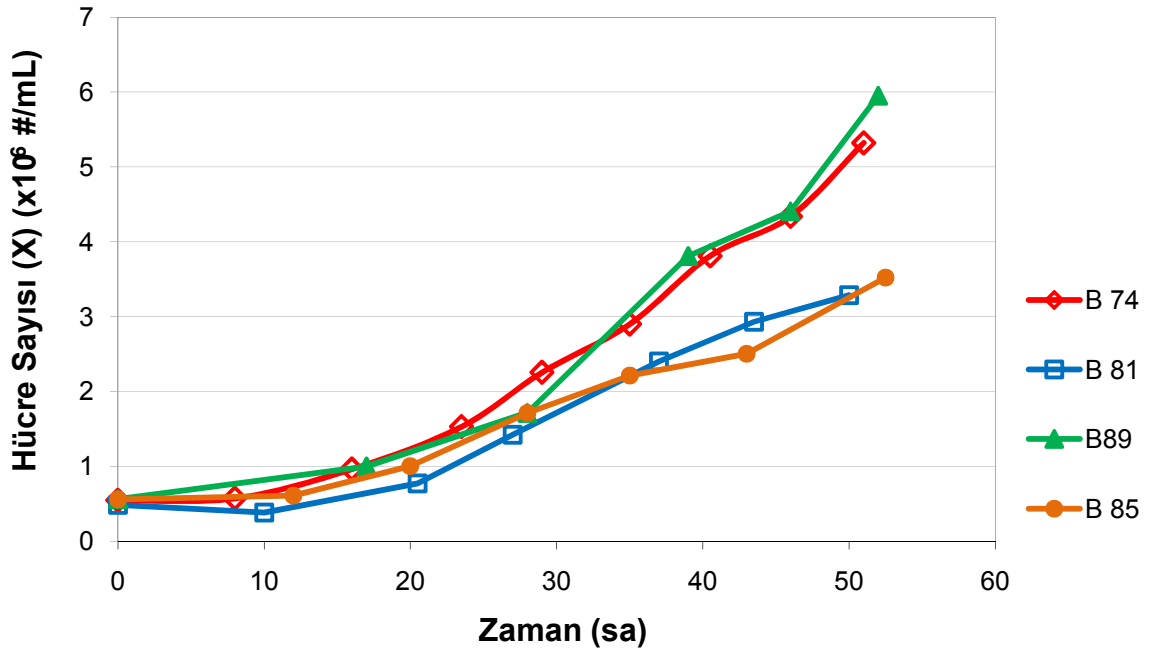
Hayvan hücrelerinin özgül oksijen tüketim hızlarının (qO_2) düşük olması nedeniyle hacimsel kütle transfer katsayısı $k_La=1 \text{ sa}^{-1}$ olduğunda yaklaşık olarak $X=1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ hücre/mL hücre derişimindeki bir biyoprosesin çözünmüş oksijen (ÇO) ihtiyacının karşılanabileceği bildirilmiştir (Fenge, et al.,1993). Şekil 3.6'da anlatıldığı şekilde dinamik yöntemle ve yapılan deneysel çalışmalarda hesaplanan k_La değerleri Şekil 3.7'de $k_La=0.2$ - 2.0 sa^{-1} aralığında bulunmuş olup, Fenge (1993)'nin verdiği $k_La=1 \text{ sa}^{-1}$ değerine oldukça yakındır. Ek 11'de k_La çalışmalarına ait örnek bir çalışma verilmiştir. Deneysel çalışmalarımızda elde edilen hücre sayıları, $X=1 \cdot 10^6$ – $6 \cdot 10^6$ hücre/mL arasında gerçekleşmiş olup çalışmamız Fenge (1993) tarafından yapılan önermeyi doğrulamaktadır.

4.13. Besiyeri – Son Hücre Sayısı (X) İlişkisi

Şekil 4.56'da B74, B81, B85 ve B89'a ait hücre üreme eğrileri verilmiştir. Çalışma koşulları B74 ve B81 için tamamen aynı ve $pH=7.10$, $\text{ÇO}=\%50$, $N=300 \text{ d/dk}$, $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL'dir. Benzer şekilde B85 ve B89 deneyleri içinde çalışma koşulları tamamen aynı ve $pH=7.00$, $\text{ÇO}=\%30$, $N=230 \text{ d/dk}$, $X_0=0.60 \pm 0.05 \cdot 10^6$ hücre/mL'dir. Bu çalışmalar arasındaki tek fark besiyeri değişikliğidir. B74 ve B89

için besiyeri-2 ve B81 ve B85 besiyeri-1 kullanılmıştır (besiyeri-1 ve besiyeri-2 arasındaki değişiklikler verilmemiştir). Grafiklerin incelenmesi ile hücre üreme eğrilerinde besiyeri değişiminin paralel bir sonuç değişikliği oluşturduğu göze çarpmaktadır. B81 için $X=3.28 \cdot 10^6$ hücre/mL iken B74 için bu değer $X=5.33 \cdot 10^6$ hücre/mL olarak bulunmuştur. Aynı şekilde doğrulama deneylerinde de B85 için $X=3.52 \cdot 10^6$ hücre/mL iken B89 için $X=5.95 \cdot 10^6$ hücre/mL olarak bulunmuştur.

Hücre Üreme Eğrileri (B74, B81, B89, B85)



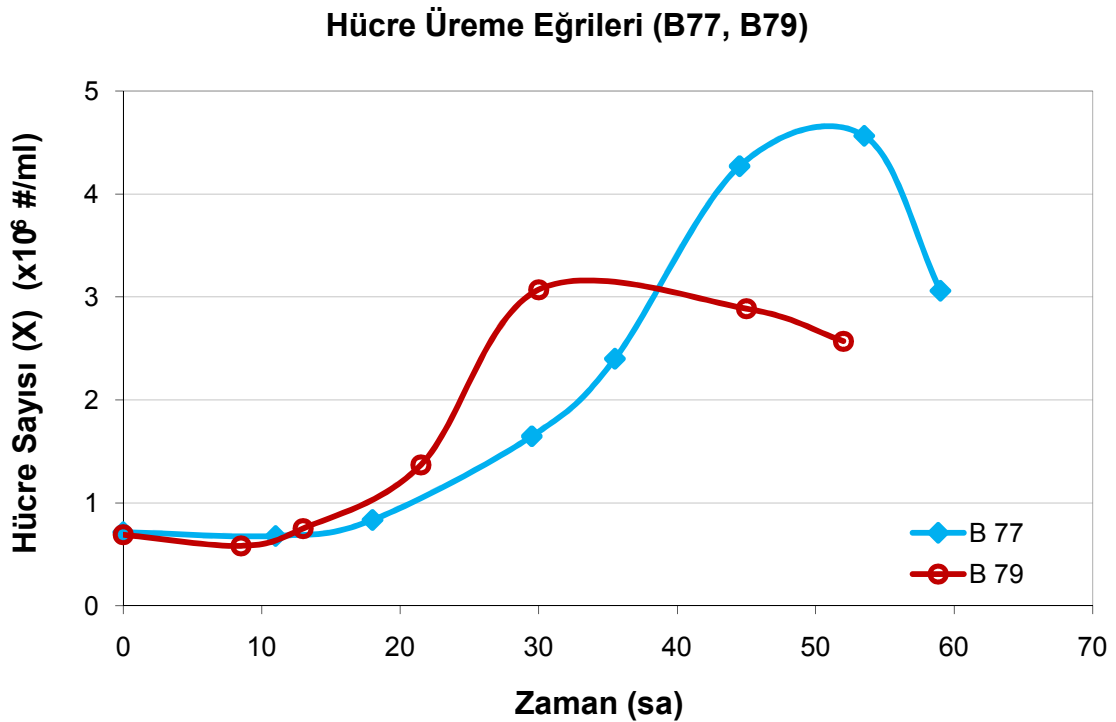
Şekil 4.56. B81, B85 (besiyeri-1), B74, B89 (besiyeri-2) deneylerine ait hücre üreme grafikleri (çalışma koşulları; B74 ve B81 için; pH=7.10, ÇO=%50, N=300 d/dk, $X_0=0.50 \cdot 10^6$ hücre/mL, B85 ve B89 için; pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, $X_0=0.60 \pm 0.05 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Grafiklerden deney sonuçlarının tekrarlanabilir olduğunu görülmektedir. Hücre üremesi açısından bakıldığında yapılmış olan 4 deneyin 3'ünde 40-45 saat aralığında hücre üreme hızının (μ) yavaşladığı açıkça görülmektedir. Bu yavaşlamadan sonra tekrar üreme hızı artmaktadır. Bu noktada besiyeri bileşenlerinden bir veya birkaçının sınır değere ulaşması özellikle glutamine bağlı olarak hücrenin metabolizmasını yeniden düzenlediği bu nedenle hücre üreme hızlarında değişim ortaya çıktığı düşünülmektedir. Daha önce açıklanan laktat ve amonyak üretim eğrilerinde gözlenen hız değişimleri de bu görüşü desteklemektedir. Besiyeri bileşimindeki kısmi değişikliklerin (besiyeri-1 ve besiyeri-2) özgül üreme hızını (μ) ve üstel üreme evresinde geçirilen süreyi

artırdığı böylece son hücre sayısının (X) artış oranının her iki çalışmada ve burada gösterilmeyen diğer bazı çalışmalarda yaklaşık olarak 1.60 ± 0.1 kat olduğu görülmektedir. Aynı besiyerinde kullanılan bileşenlerin değişiminin son hücre sayısı üzerine çok önemli etkisi olduğu ve %60 fark oluşturduğu görülmektedir.

4.14. Çalışma Koşullarının Hücre Üremesine Etkileri

Şekil 4.57’de B77 ve B79 deneylerine ait hücre üreme eğrileri görülmektedir. Her iki deneyde de çalışma koşulları aynı olup ($N=150$ d/dk, $pH=7.30$, $X_0=0.70 \cdot 10^6$ hücre/mL ve $\text{ÇO}=\%30$) sadece besiyeri bileşenlerinde değişiklik yapılmıştır. Son hücre sayısı (X) ve özgül üreme hızı (μ) her iki çalışma için aynı hesaplanmıştır. Üreme grafiklerinde BHK-21 hücrelerinin erken ve ani olarak ölüm evresine geçtikleri görülmektedir.

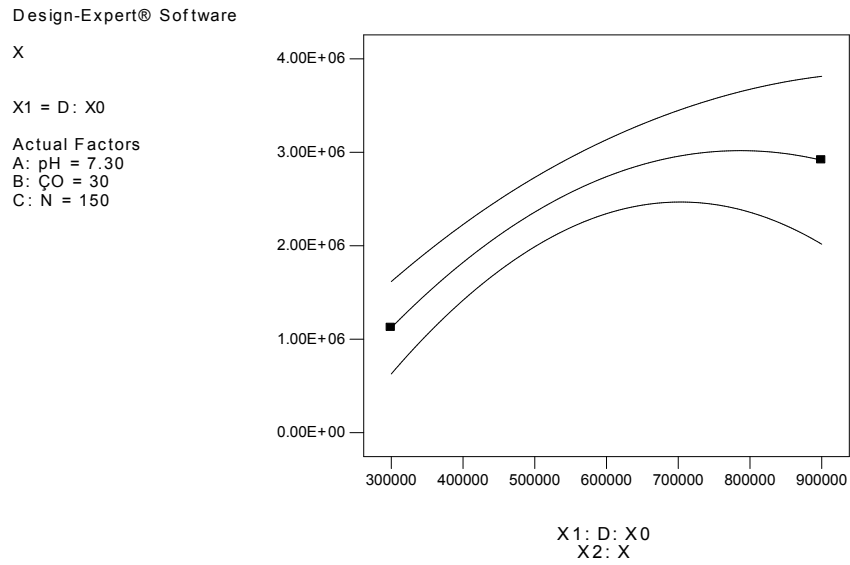


Şekil 4.57. B77 (besiyeri-1) ve B79 (besiyeri-2) için hücre üreme grafikleri (Deneylerde çalışma koşulları aynıdır. ($N=150$ d/dk, $pH=7.30$, $X_0=0.70 \cdot 10^6$ hücre/mL ve $\text{ÇO}=\% 30$)

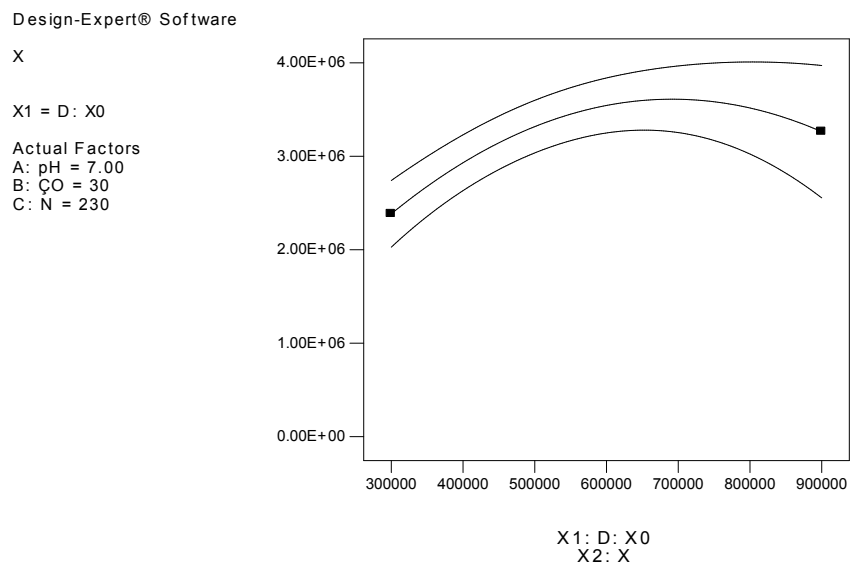
Bu durumun hangi çalışma koşullarının etkisi altında olduğu net olarak izlenememektedir. Ancak B34 ile B35 arasında yapılan değerlendirme göz önüne alındığında Bölüm 4.1.2’de açıklandığı gibi pH’ın hücre üremesine etkisinin pH arttıkça hücrenin üstel üreme evresinden çıkması ve ani ölüme geçmesinin söz konusu olduğu düşünülmektedir. B77 ve B79 için etkilerden birisinin yüksek pH’tan

kaynaklandığını söylemek mümkündür. İkinci faktörün ise Şekil 4.58. ve 4.59'dan görüleceği gibi düşük karıştırma hızı (N) olduğu söylenebilir.

Deney sonuçlarının incelenmesi ile çözünmüş oksijen (ÇO %30) ve başlangıç hücre sayısının ($X_0=0.50-0.70 \times 10^6$ hücre/mL) verilen çalışma değerlerinin hücrelerin ani olarak ölüm evresine geçmelerine neden olmadıkları görülmüştür. Bu durumda çalışma koşullarından karıştırma hızı (N) ve pH'sını incelenmesine karar verilmiştir.

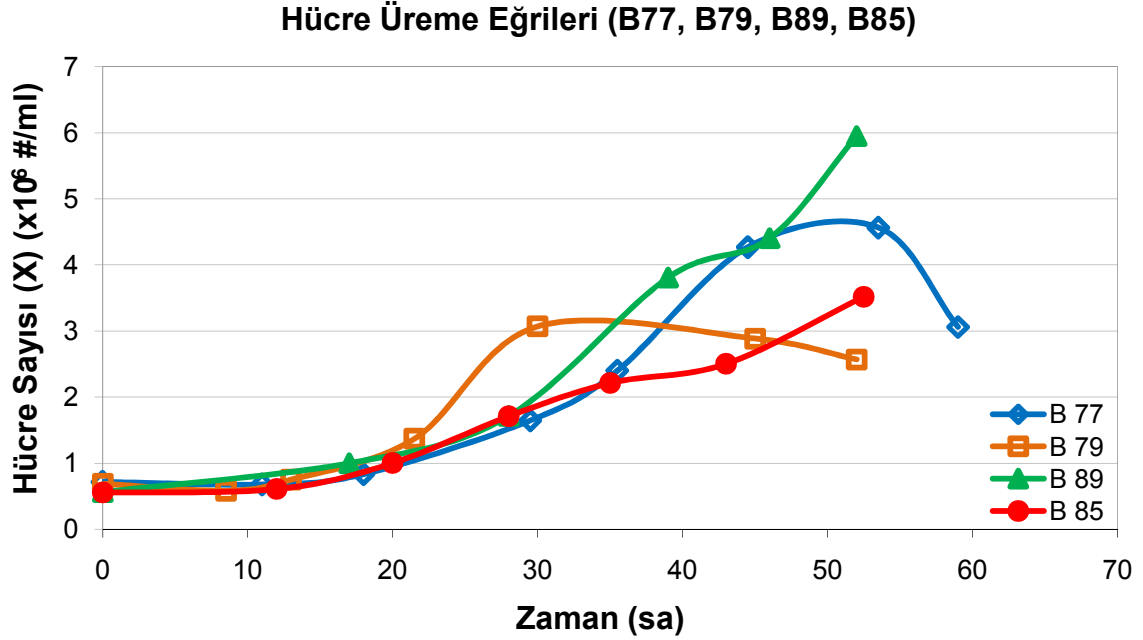


Şekil 4.58. Son hücre sayısı (X)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.30, ÇO=%30, N=150 d/dk).



Şekil 4.59. Son hücre sayısı (X)-başlangıç hücre sayısı (X_0) ilişkisi (çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk)

Şekil 4.60'ta aynı çalışma koşullarında besiyeri-1 ve 2'nin kullanılması durumunda elde edilmiş paralel grafikler görülmektedir. Besiyeri değişse bile çalışma koşulları hücre üremesine benzer şekilde etki göstermektedir.



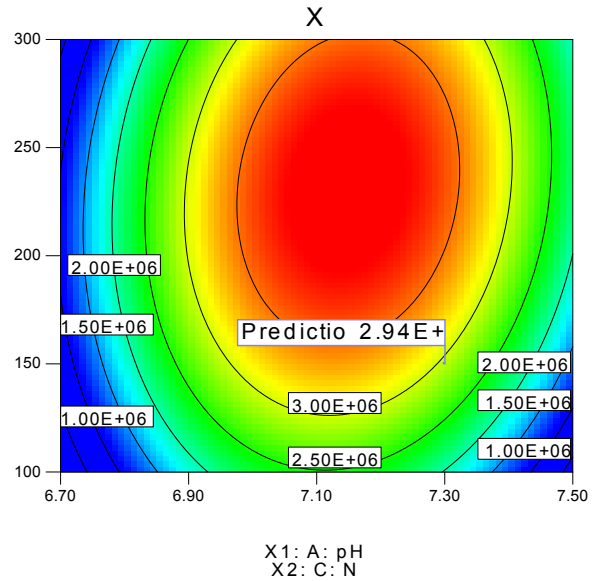
Şekil 4.60. Besiyeri-1 (B79, B85) ve besiyeri-2 (B77, B89) kullanıldığında aynı çalışma koşullarında üretilen B85-B89 ve B77-B79'a ait hücre üreme grafiklerinde gözlenen değişim (B77-B79 çalışma koşulları; $N=150$ d/dk, $pH=7.30$, $X_0=0.70 \cdot 10^6$ hücre/mL ve $\text{ÇO}=\%30$; B85-B89; $pH=7.00$, $\text{ÇO}=\%30$, $N=230$ d/dk, $X_0=0.60 \pm 0.05 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Design-Expert® Software

X
3.8E+006
1.04E+006

X1 = A: pH
X2 = C: N

Actual Factors
B: $\text{ÇO} = 30$
D: $X_0 = 690000$



Şekil 4.61. Son hücre sayısı (X)-pH-karıştırma hızı (N) ilişkisi (çalışma koşulları; $\text{ÇO}: \%30$, $X_0=0.69 \cdot 10^6$ hücre/mL)

Besiyeri-1 için doğrulama çalışması B79, B85'e göre çalışma şartlarından dolayı üstel üreme evresinden daha erken çıkmakta ve hızlı bir şekilde ölüme geçmektedir. Benzer durum besiyeri-2 ile yapılan doğrulama deneyleri için de görülmektedir. B79 ve B77 aynı çalışma koşullarında ($N=150$ d/dk, $pH=7.30$, $X_0=0.70 \times 10^6$ hücre/mL ve $\text{ÇO}=\% 30$) gerçekleştirilmiştir. B85 ve B89 ise besiyeri-1 ve besiyeri-2 ile doğrulama deney çalışma koşullarında ($N=230$ d/dk, $pH=7.00$, $X_0=0.60 \times 10^6 \pm 0.05$ hücre/mL ve $\text{ÇO}=\%30$) yapılan çalışmalardır. Sonuç olarak Şekil 4.61'den görüleceği gibi düşük karıştırma hızı ($N=150$ d/dk) ve göreceli olarak yüksek besiyeri pH'sının ($pH=7.30$) hücrelerin ani ölüme geçmelerine neden olduğu öngörülebilir. Yüksek pH ve düşük karıştırma hızlarının (N) amonyak oluşum hızını maksimize ettiği bu durumun hücre üremesi açısından uygun olmayan çalışma koşulları ile ilişkili olduğu daha önce açıklanmıştır.

4.15. BHK-21 Hücresinin Üretiminde Makro-Kabarcıkların Kullanımı

Elde edilen deney sonuçlarının kontrol edilmeyen diğer çalışma koşullarından etkilenmesini önlemek için ön deneyler yapılarak bir dizi tedbir alınmıştır. Yüksek ozmolalitenin ($pOsm$) olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak ve havalandırma etkisi ile hücre hasarlarını minimize etmek için makrosparging metodu uygulanmıştır. Şekil 3.7'de görüleceği gibi hacimsel kütle transfer katsayısı (k_{La}) değeri düşük makrosparger tasarlanarak besiyerinde biriken karbondioksit (CO_2) süpürülmüş ve pH kontrolüne katkı sağlanarak baz kullanımı azaltılmış böylece ozmolalite ($pOsm$) değişimi dar bir aralıkta tutularak kritik değer olarak bildirilmiş $pOsm=370$ mOsm/kg değerine ulaşmamıştır. Elde edilen en yüksek değer 346 mOsm/kg olmuştur. Doğrulama deneylerinde $pOsm$ 310-330 mOsm/kg aralığında kalmıştır. Alınan tedbirler ile baz kullanımı çok önemli ölçüde azaltılmıştır. Hazırlık deneylerine göre 3-5 kat daha az baz kullanımı mümkün olmuştur. Böylece makrosparging uygulamasının BHK-21 An_{30} hücrelerinin üretiminde başarılı bir şekilde uygulanabildiği gösterilmiştir. Literatürde de bildirildiği gibi çift sparger (mikro ve makro sparger) sistemlerinin birlikte kullanılması durumunda mikro-kabarcıklar ile kütle transferi artırılarak çözünmüş oksijen (ÇO) kontrolü yapılması, makro-kabarcıklar ile de çözünmüş CO_2 süpürülerek PH kontrolü yapılmasının endüstriyel ölçekte hücre üretim prosesleri için uygun bir yaklaşım olduğu görülmüştür.

4.16. Hücre Üretim Sürecinin Standardizasyonu ve Tekrarlanabilirliği

BHK-21 hücre hatlarının endüstriyel ölçekte kullanılmaya başlanması ile biyoproseslerde üretilen son hücre sayıları önem kazanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda özel besiyeri tasarımları yapılmıştır. Özellikle eksik olması durumunda hücre üremesini sınırlayıcı besin maddesi olarak glutamin, lakta-albumin hidrolizat öne çıkmıştır. Pirbright Enstitüsünde yapılan çalışmalarda son hücre sayısı $X=2-3 \cdot 10^6$ hücre/mL hücre elde edilirken Zoletto ve Gagliardi 96 saatlik bir kesikli üretim yöntemi ile başlangıç hücre sayısına (X_0) göre 12 katlık bir artış ile $X=6.0 \cdot 10^6$ hücre/mL son hücre sayısına ulaşmayı başarmışlar ancak aynı besiyeri ile yaptıkları çalışmalarda Radlett ve arkadaşları (1971) aynı sonucu elde edememişlerdir. Ortalama $X=3.5 \cdot 10^6$ hücre/mL hücre sayısına ulaşılar (Radlett et al., 1971). Yaptığımız çalışmada deney sonuçları besiyeri bileşenlerinde bazı kelimelerin değiştirilmesi (besiyeri-1 ve besiyeri-2, veriler konulmamıştır) ile literatürde sözü edilen her iki sonuç da elde edilmiştir. Çalışmalar deneylerin büyük bir bölümünün yürütüldüğü besiyeri-1 için modellenmiş olmakla birlikte besiyeri-2 için yapılan kontrol deneylerinde çalışma koşullarının değişimi ile elde edilen sonuçların paralel değişimi son hücre sayısı (X) için oluşturulan modelin geçerli olduğunu açıkça göstermiştir.

Çizelge 4.12. incelenirse, Radlett (1971)'in yaptığı kesikli üretim çalışmasında biyoproses süresini yaklaşık 60 sa ve özgül üreme hızını $\mu=0.05 \text{ sa}^{-1}$ olarak vermiştir. Yapılan doğrulama deneylerinde kesikli üretim prosesi maksimum son hücre sayısına ulaşılması nedeni ile 48. saatte sonlandırılmış ve deneylerde daha yüksek özgül üreme hızları $\mu=0.0614 \pm 0.0036 \text{ sa}^{-1}$ elde edilmiştir. Çalışmalarımızda Radlett (1971) tarafından 10-12 saat olarak bildirilen adaptasyon evresi 8-12 saat olarak tespit edilmiştir. İnkelenme süresi Radlett (1971)'in bildirdiği $t_d=14$ saat değerinden daha kısa $t_d=11.3 \pm 0.66$ saat olarak hesaplanmıştır. Başlangıç hücre sayıları (X_0) her iki çalışmada da yakındır. Bu durumda optimizasyon çalışmasının amacına ulaştığı ve optimum noktalarda çalışılması ile ürün artışı sağlanabileceği gösterilmiştir.

Radlett (1971) yayınında prosesin 45. saatinde 3 g/L glikoz ilavesi ile daha iyi sonuçlar alındığından bahsetmektedir. Ancak yapılan çalışmada glikoz analizleri sonucunda hücrelerin glikozu tamamen tüketemedikleri ve biyoproses sonunda

Çizelge 4.12. Çalışma sonuçlarının diğer yayınlarla karşılaştırılması

İzlenen-Kontrol Edilen Parametre	Literatür Radlett ve Telling (1972)	X ve 146S için Doğrulama Deney Sonuçları
Başlangıç Hücre Sayısı (X_0)	$0.5 \cdot 10^6$ hücre/mL	$0.55-0.62 \cdot 10^6$ hücre/mL
Son Hücre Sayısı (X)	$5.5 \cdot 10^6$ hücre/mL	$3.5-5.95 \cdot 10^6$ hücre/mL
Biyoproses Süresi	63 sa	50 sa
Özgül Üreme Hızı (μ)	0.05 h^{-1}	$0.0614 \pm 0.0036 \text{ sa}^{-1}$
Durağan Evre Süresi	10-12 sa	8-12 sa
İkilenme Süresi (t_d)	14 sa	$11.3 \pm 0.66 \text{ sa}$
Canlılık oranı	%95	>%96.5
10^6 hücre için tüketilen	$1.0 \pm 0.1 \text{ g/L}$	$0.80 \pm 0.14 \text{ g/L}$
Çalışma pH'sı	7.40-7.10	7.00 ± 0.10
Özgül Oksijen Tüketim Hızı	$0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{sa}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{ hücre}^{-1}$	$0.15 \pm 0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{sa}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{ hücre}^{-1}$
146S Partikül Miktarı	---	$0.94 \pm 0.30 \mu\text{g/mL}$
Laktat/glikoz oranı ($Y_{\text{lak/gli}}$)	---	$1.37 \pm 0.10 \text{ mol/mol}$
İzlenen-Kontrol Edilen Parametre	Cruz et al.,2000	X ve 146S için Doğrulama Deney Sonuçları
Özgül glikoz tüketim hızı	$3.42 \cdot 10^{-10} \text{ mmol/hücre} \cdot \text{sa}$	$2.47 \pm 0.47 \cdot 10^{-10} \text{ mmol/hücre} \cdot \text{sa}$
Özgül laktat oluşum hızı	$3.12 \cdot 10^{-10} \text{ mmol/hücre} \cdot \text{sa}$	$3.85 \pm 1.05 \cdot 10^{-10} \text{ mmol/hücre} \cdot \text{sa}$
Özgül amonyak (NH_3) ol.	$6.0 \cdot 10^{-11} \text{ mmol/hücre} \cdot \text{sa}$	$4.42 \pm 0.40 \cdot 10^{-11} \text{ mmol/hücre} \cdot \text{sa}$

ortamda $3.0 \pm 0.5 \text{ g/L}$ glikoz kaldığı tespit edilmiştir. Hücre üreme eğrileri 50. saate kadar benzer olup bu saatten sonra farklılık ortaya çıkmakta hücreler durağan evre ve ölüm evresine geçmektedir. Laktat ve amonyak oluşum hızlarının biyoprosesin 25-30. saatlerinde gözlenen 2-3 katlık ani hız düşüşlerinin sebebinin besin maddelerinin sınır değerlere düşmesi sonucunda hücrelerin metabolizmalarını yeni duruma adapte etmeleri olarak düşünüldüğünden bahsedilmiştir. Besiyerine konulan en önemli besin kaynakları glikoz ve glutamin olduğu bilinmektedir. Biyoproseste glikoz fazlası olduğu bilindiğine göre hücrenin belirli süre sonunda metabolizmasını değiştirmeye (metabolic shift) zorlayan etkenin kritik değere düştüğü öngörülen glutamin olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle glutaminin biyoproseste hücrenin üstel üreme evresinden çıkmasından önce besiyerine ilave edilmesi bir çözüm yolu olarak düşünülebilir.

Modelin doğrulama deneylerinde biyoproses çalışma koşulları (pH, çözünmüş oksijen (ÇO), karıştırma hızı (N) ve başlangıç hücre sayısı (X_0)) sabit tutularak deneyler yapılmış; hücre üretiminin ve deney sonuçlarının tekrarlanabilir olduğu açıkça ortaya koyulmuştur.

4.17. Sonuçlar ve neriler

- Design Expert 7.0 programı (demo sürümü) yardımı ile son hücre sayısı (X), 146S partikül miktarı, özgül üreme hızı (μ), antijenik titre (AT), enfektif titre (IT), laktat/glikoz oranı ($Y_{lak/gli}$), amonyak (NH_3) tkretim hızı, toplam protein (TP) miktarlarına ait istatistik modeller oluşturulmuştur.
- Çalışma koşullarına bağlı olarak 146S partikül miktarlarında çok önemli miktarlarda değişim ($146S=0.40-1.40 \mu g/mL$) olduğu tespit edilmiştir. Belirli alışma koşullarında, artan karıştırma hızının (N), düşük ve yüksek başlangıç hücre sayılarının (X_0) 146S partikül miktarını düşürdüğü gösterilmiştir.
- Çalışma koşullarının birbirleri ile olan ilişkilerinin yönünün belirli koşullarda geçerli olduğu çalışma parametrelerinden sadece birisinin değiştirilmesi ile ilişkilerin yönünün değişebildiği gösterilmiştir. İki boyutlu olarak incelenen sistemlerde çelişkili sonuçlar elde edilmesinin mümkün olduğu, aslında her iki sonucun da kendi koşullarında doğru olabileceği tespit edilmiştir. Bu nedenle iki boyutlu yapılan çalışma sonuçlarının genelleştirilmesinin doğru olamayacağı ve çalışmaların yüzey taraması ile üç boyutlu olarak incelenmesinin çok önemli olduğu grlmştr.
- Antijenik titrenin (AT) alışma koşulları karıştırma hızı $N=230 \text{ d/dk}$ ve $X_0=0.60 \cdot 10^6$ hücre/mL olduğunda daha düşük pH (pH 6.9-7.0) ve çözünmüş oksijen (O %40-50) değişiminde maksimum olduğu grlmştr. Düşük başlangıç hücre sayıları (X_0) ve yüksek karıştırma hızları antijenik titre (AT) açısından en kötü çalışma koşulları olarak tespit edilmiştir.
- Düşük znmş oksijen (O) değişimlerinde artan çalışma pH'sı enfektif titreyi (IT) azaltırken bu ilişki yüksek çözünmüş oksijen (O) değişimlerinde tersine dönmekte ve artan çalışma pH'sının enfektif titreyi (IT) artmaktadır. Bu da çalışma koşullarının kontrol edilmesinin önemini göstermektedir. Aksi halde elde edilecek enfektif titre (IT) değerleri her defasında farklı olabilecektir.

- Çalışma koşulları (pH=7.00, ÇO=%30) için enfektif titrenin (IT) neredeyse karıştırma hızından (N) bağımsız olduğu ve başlangıç hücre sayısının (X_0) enfektif titreyi (IT) çok önemli oranda etkilediği görülmüştür. Enfektif titre (IT)'nin maksimum olduğu başlangıç hücre sayısı $X_0=0.40\pm0.10\cdot10^6$ hücre/mL olarak tespit edilmiştir.
- 146S partikül miktarının çalışma pH'sından doğrudan etkilendiği ve elde edilen 146S partikül miktarlarında çalışma pH'sına bağlı olarak iki kata yakın değişimler olduğu görülmüştür.
- Glikoz tüketim hızı biyoproses süresince doğrusal olarak azalmaktadır. Buna karşılık laktat oluşum hızında biyoprosesin 25-30. saatine kadar elde edilen hızın, 25-30.saatten biyoproses sonuna kadar hesaplanan hızdan yaklaşık 3 kat yüksek olduğu görülmüştür. Laktat oluşum hızındaki bu değişimin 25-30. saatlerde olması glutamin derişimindeki düşmeye bağlı olarak hücrenin metabolizmasını değiştirmesi ile ilişkili olduğu öngörülmüştür.
- Hücre düşük çözünmüş oksijen (ÇO) değerlerinde glikozu daha verimsiz kullanmakta ve laktat/glikoz oranı ($Y_{lak/gli}$) oranı artmaktadır. Üretim prosesinde çözünmüş oksijen kontrolü yapılmaması nedeniyle ön çalışmalarda tespit edilmiş olan, biyoproses başlangıcında ortam koşullarının hızla kötüleşme sebebinin ÇO olduğu tespit edilmiştir.
- Doğrulama deneylerinde son laktat derişimleri 20-29.5 mM aralığında gerçekleşmiştir. Hücre üremesi için inhibisyon limitine (>30 mM) çıkmadığı görülmüştür.
- Deneylerde uygulanan tekrarlı-kesikli üretim yönteminde (süspanse ilk pasajı (S1) dışında) besiyerinde bulunan glikoz derişiminin, 6M besiyerinde bulunması gereken başlangıç glikoz derişiminden ortalama olarak $\%20\pm5$ düşük olduğu görülmüştür. Buna rağmen son glikoz derişimi başlangıç derişimi ile oranlandığında (gli_{son}/gli_{ilk}) yaklaşık olarak $\%40\pm10$ oranındaki glikozun tüketilemediği görülmekte ve bu nedenle başlangıç glikoz derişimi açısından biyoproseste glikoz kısıtlamasının oluşmadığını göstermektedir.

6M besiyerine giren glikoz derişiminin tekrar değerdendirilmesinin gerekli olduğu g r lm şt r.

- Doğrulama deneylerinde başlangıç amonyak (NH₃) derişiminin son amonyak derişiminin %50±10'ne eşit olduğu hesaplanmıştır. Sebebin tekrarlı-kesikli üretim yöntemi, kullanılan besiyerlerinin beklemiş olması (glutaminin bozunarak amonyak (NH₃) oluşturması) ve serum gibi diğer kaynakların amonyak içermesi olabileceği düşünülmüştür. Tekrarlı-kesikli üretim yapılan biyoproseslerde başlangıç amonyak derişiminin düşürülmesi için aşılamada kullanılacak hücrenin besiyerinden herhangi bir yöntemle ayrılması ( rneğin; çöktürme yöntemiyle) ve yeni biyoproses için tamamen taze besiyeri kullanılması değerdendirilmelidir.
- Biyoproseste, tekrarlı-kesikli üretim yönteminin uygulanmasından kaynaklanan ve glikoz derişimi için açıklanan başlangıç derişim düşüklüklerinin glutamin derişimi için de geçerli olduğu yani başlangıç glutamin derişim 6M besiyerinde bildirilen derişim değerdinden en az %20-25 daha düşük olduğu hesaplanmıştır. Besiyerinde glikoz fazlası olduğu tespit edildiğine göre hücreleri belirli biyoproses süresi sonrası metabolizmalarını değiştirmeye (metabolic shift) zorlayan etkenin, kritik değere düştüğü öngörülen glutamin olduğu d ş n lmektedir. Bu nedenle glutaminin tekrarlı-kesikli üretim yöntemi için tekrar değerdendirilmesi gereken önemli bir parametre olduğu ve hücrelerin üstel üreme evresinden çıkmasından önce besiyerine ilavesinin değerdendirilmesi önerilmektedir.
- Tekrarlı kesikli-üretim yönteminde çalışma koşullarının değişimi ile bazı çalışmalarda kesikli üretim yöntemlerinde elde edilen derişimlere göre çok daha düşük yarı-kesikli üretim yöntemlerinde görülen laktat derişimleri elde edilmiştir. Besiyeri kimyasal bileşiminde bir değişiklik yapılmadan yalnızca çalışma koşullarının değişimi ile hücre metabolizmasının değiştirilmesi ve istenen şekilde yönlendirilmesinin mümkün olduğu anlamına gelmektedir. Bu sonuç hücre metabolizma mühendisliği açısından metabolizmanın kontrolü için kullanılabilecek bir araç olabileceği d ş n lmektedir.

- Amonyak (NH_3) oluşum hızının çalışma pH'sından kısmen etkilendiği buna karşılık çözünmüş oksijen derişiminden (ÇO) çok önemli oranda etkilendiği görölmüştür.
- Amonyak (NH_3) oluşum hız grafiklerinde biyoprosesin 25-30. saatlerinde yaklaşık 2.5 katlık bir azalma söz konusudur. Bu durum besiyerinde bulunan glutamin derişiminin azalması ve hücrenin kısıtlı koşullara metabolizmasını adapte etmesi bu nedenle verim faktörlerinde ve hızlarda eş zamanlı değişmelerin görölmesi olarak değerlendirilmiştir.
- Yüksek çözünmüş oksijen (ÇO) derişimlerinde toplam protein (TP) miktarında artış meydana gelmiş ve yüksek karıştırma hızlarında (N) ise düşüş gözlenmiştir. Düşük ÇO ve yüksek karıştırma hızlarında (N), toplam protein (TP) miktarı minimum olarak izlenmiştir.
- Son hücre sayısının (X) maksimum olduğu çalışma koşullarında toplam protein miktarı (TP) ve amonyak oluşum hızı (NH_3) minimum olarak izlenmiştir. Çalışma koşullarının hücrelerin protein sentezine etki ettiği ve bu nedenle toplam protein miktarını doğrudan değiştirdiği düşünölmektedir.
- En düşük toplam protein (TP) miktarının düşük pH ve çözünmüş oksijen (ÇO) derişimlerinde gerçekleşmesi havalandırma oranı ile TP'nin ilişkili olduğunu gösterdiği ve biyoproseste en düşük havalandırma oranını (vvm) sağlayan çalışma koşullarının tercih edilmesi gerektiği görölmüştür.
- Yüksek karıştırma hızlarında (N) toplam protein (TP) miktarının pH'tan bağımsız ve minimum olduğu görölmüştür. Deney aralığındaki karıştırma hızlarının (N) neden olduğu kesme gerilmelerinin hücre bütönlüğüne önemli oranda zararı olmadığı düşünölmektedir. Buna karşılık düşük karıştırma hızlarında (N) toplam protein (TP) miktarının arttığı tespit edilmiştir.
- Belirlenen bağımlı değişkenler için yüzey-cevap yöntemi kullanılarak eşitlikler geliştirilmiş ve bağımsız parametrelerin optimum değerleri saptanmıştır. 146S partiköl miktarını maksimum yapan çalışma koşulları ile maksimum son hücre sayısının (X), elde edildiği çalışma koşullarının öngöröldüğü gibi farklı olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.13'te göröleceği

gibi son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarının çarpımlarının maksimizasyonu için elde edilen modeller optimize edilmiş ve çalışma koşullarının optimum değerleri bulunmuştur.

- Çizelge 4.13. Son hücre sayısı (X) ve 146S partikül miktarlarını birlikte maksimum yapan çalışma koşulları

Çalışma Parametresi	X ve 146S Partikül miktarı için optimize edilmiş çalışma koşulları
pH	7.00±0.05
ÇO (%)	%25±5
N (d/dk)	180±20
X ₀ (hücre/mL)	0.65±0.05*10 ⁶

- Doğrulama deneyleri çalışma koşulları; pH=7.00, ÇO=%30, N=230 d/dk, X₀=0.60±0.05*10⁶ hücre/mL olarak belirlenmiştir. Model tarafından üretilmiş grafikte, verilen çalışma koşullarında son hücre sayısı X=3.50*10⁶ hücre/mL olarak öngörülmüştür. Doğrulama deneylerinde elde edilen son hücre sayıları X=3.36±0.16*10⁶ hücre/mL olarak hesaplanmış böylece deney sonuçlarının tekrarlanabilir olduğunu ortaya koyulmuştur. Besiyeri-2'nin kullanıldığı 5. doğrulama deneyinde son hücre sayısı X=5.95*10⁶ hücre/mL olarak elde edilmiştir.
- Model, doğrulama deneyleri için 146S partikül miktarını 146S=1.04 µg/mL olarak öngörmüş, yapılan deneylerde 146S=0.94±0.30 µg/mL olarak bulunmuştur. Doğrulama deneylerinde elde edilen 146S partikül miktarları modelin öngördüğü değeri kapsamakla birlikte standart sapma değerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu noktada deney sonuçlarının hücre üretimi dışında konuları da ilgilendirdiği ve virüs üretim aşamalarının optimizasyonu ile 146S partikül miktarının tespit edildiği test yöntemlerinin bu kapsamda değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.
- Düşük başlangıç hücre sayısı (X₀) ile başlanan hücre üretim proseslerinde son hücre sayısına (X) daha uzun sürede ulaşıldığı ve X₀'ın biyoproses süresini çok önemli oranda değiştirdiği görülmüştür. Biyoproses süresinin optimizasyonunda X₀'ın kullanılabileceği tespit edilmiştir.

- Deneylerde kullanılan sparger için dinamik yöntemle hesaplanan hacimsel kütle transfer katsayısı (k_La) havalandırma oranı (vvm) ve karıştırma hızına (N) bağlı olarak $k_La=0.2-2.0 \text{ sa}^{-1}$ aralığında bulunmuştur.
- Maksimum özgül üreme hızının ($\mu=\mu_{\max}$) hücre üreme kabiliyetini ve son hücre sayısını (X) ifade etmede tek başına yeterli bir veri olmadığı yapılan çalışmalarda üstel üreme evresinde geçirilen sürenin de verilmesi gerektiği görülmüştür.
- Besiyeri bileşimindeki kısmi değişikliklerin (besiyeri-1 ve besiyeri-2) üstel üreme evresinde geçirilen süreyi artırdığı böylece son hücre sayısının (X) %60 oranında arttığı tespit edilmiştir. Çalışmalar deneylerin büyük bir bölümünün yürütüldüğü besiyeri-1 için modellenmiş olmakla birlikte besiyeri-2 için yapılan kontrol deneylerinde çalışma koşullarının değişimi ile elde edilen sonuçların paralel değiştiği görülmüştür.
- Yapılan doğrulama deneylerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. Son hücre sayısı (X) ve 146S için doğrulama deney sonuçları

İzlenen-Kontrol Edilen Parametre	X ve 146S için Doğrulama (Validation) Deney Sonuçları
Başlangıç Hücre Sayısı (X_0)	$0.55-0.62 \cdot 10^6$ hücre/mL
Son Hücre Sayısı (X)	$3.5-5.95 \cdot 10^6$ hücre/mL
Biyoproses Süresi	50 sa
Özgül Üreme Hızı (μ)	$0.0614 \pm 0.0036 \text{ sa}^{-1}$
Durağan Evre Süresi	8-12 sa
İkilenme Süresi (t_d)	$11.3 \pm 0.66 \text{ sa}$
Canlılık oranı	>%96.5
10^6 hücre için tüketilen glikoz	$0.80 \pm 0.14 \text{ g/L}$
Çalışma pH'sı	7.00 ± 0.10
Özgül Oksijen Tüketim Hızı (q_{O_2})	$0.15 \pm 0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{sa}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{ hücre}^{-1}$
146S Partikül Miktarı	$0.94 \pm 0.30 \mu\text{g/mL}$
Laktat/glikoz oranı ($Y_{\text{lak/gli}}$)	$1.37 \pm 0.10 \text{ mol/mol}$
Glikoz tüketim hızı (q_{gli})	$2.47 \pm 0.47 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{hücre}^{-1} \cdot \text{sa}^{-1}$
Laktat oluşum hızı (q_{lak})	$3.85 \pm 1.05 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{hücre}^{-1} \cdot \text{sa}^{-1}$
Amonyak (NH_3) oluşum hızı (q_{amo})	$4.42 \pm 0.40 \cdot 10^{-11} \text{ mmol} \cdot \text{hücre}^{-1} \cdot \text{sa}^{-1}$

- Yüksek pH ve düşük karıştırma hızlarının (N) hücrenin üstel üreme evresinden çıkması ve ani ölüme geçmesine neden olduğu görülmüştür.
- Makrosparging uygulamasının BHK-21 An₃₀ hücrelerinin üretiminde başarılı bir şekilde uygulanabildiği gösterilmiştir.

Yapılan çalışmanın en önemli sonuçlarından bir tanesi biyoreaktör işletim parametrelerinin (çalışma koşullarının) hücrelerinin üremesini (BHK-21 C13 An₃₀) çok önemli ölçüde etkilediğidir. Son hücre sayısının maksimum (X) olması ve 146S partikül miktarının maksimum olması durumları için çalışma koşullarının (pH , ÇO, N , X₀) optimum değerleri farklıdır. Bu nedenle maksimum hücre sayısının elde edildiği noktada 146S partikül miktarı düşmektedir. Bu durumun tersi de geçerli olup maksimum 146S partikül miktarının elde edildiği çalışma koşullarında son hücre sayısı (X) azalmaktadır. Böylece maksimum ürün elde edilmesi için ortak çözüm yapılarak bulunmuş olan ve Çizelge 4.13'te verilmiş olan optimum çalışma koşullarında çalışılması gereklidir. Mevcut biyoreaktör sistemlerinin mekanik ve otomasyon altyapılarının belirlenen ihtiyaçları karşılamak için yetersiz olduğu, başta çözünmüş oksijen (ÇO) ve pH kontrolleri olmak üzere biyoreaktör mekanik ve kontrol sistemlerinin modernize edilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

Tekrarlı-kesikli üretim yönteminin başlangıç metabolit değerleri açısından gözden geçirilmesi, başlangıç değerlerinin düşürülmesi için tedbir alınması veya daha verimli üretim yöntemlerinin araştırılması verimliliğin artmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

Şap virüsü üretiminde kullanılan BHK-21 C13 An₃₀ hücrelerinin üretildiği 6 M besiyerinin, sonuçlar kısmında belirtilmiş olan açıklamalar ışığında optimize edilmesi veya bu konuda alternatif çözümler üzerinde çalışılması verimliliği artıracak diğer bir sonuç olarak düşünülmektedir.

Belirtilen modernizasyon çalışmalarına ek olarak üretim öncesi ve üretim aşamasında yapılan kontrollere besiyeri analizlerinin (glikoz, laktat, amonyak vs) dahil edilmesinin üretim prosesinin izlenmesine, kontrol altına alınmasına, standardizasyonuna ayrıca sorunların tespit edilmesine ve çözümlerin üretilmesine faydalı olacağı görülmüştür.

KAYNAKLAR :

- Al-Rubeai, M., Oh S.K.W., Musaheb R., Emery A.N.,1990, Modified cellular metabolism in hybridomas subjected to hydrodynamic and other stresses. *Biotechnol Lett* 12:323–328.
- Altamirano, C., Illanes, A., Casablanco, A., Gámez, X., Cairó, J.J., Gódia, F., 2001, Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture, *Biotechnol. Prog.*, 17, 1032–1041.
- Ararhoon, W.R. and Birch J.R., 1986, Large-Scale Cell Culture in Biotechnology, Problems and Limitations in Large-Scale Cell Culture, *Science* Vol 232 Articles 1390-1395.
- Augenstein, D.C., Sinskey A.J., Wang DIC.,1971, Effect of shear on the death of two strains of mammalian tissue cells. *Biotech. and Bioeng.*; 13:409–418.
- Aunins, J.G., Henzler H.J.,1993, Aeration in Cell Culture Bioreactors. In: *Biotechnology, Second, Rev. Ed., Volume 3: Bioprocessing*: 219–281.
- Bachrach, H.L., 1968, Foot-and-mouth disease virus, *Annu. Rev. Microbiol.*, 22, 201–244.
- Backer, M.P., Metzger L.S., Slaber P.L., Nevitt K.L., Boder G.B.,1988, Large scale production of monoclonal antibodies in suspension culture. *Biotech. Bioeng* 32:993–1000.
- Balin, A.K.; Goodman, D.B.P.; Rasmussen, H.; Cristofalo, V.J., 1976, The Effect of Oxygen Tension on the Growth and Metabolism of WI-38 Cells. *J. Cell Physiol.*, 89, 235-250.
- Barngrover, D., Thomas J., and Thilly W.G., 1985, High density mammalian cell growth in Leibovitz bicarbonate-free medium: effects of fructose and galactose on culture biochemistry *Journal of Cell Science*, Vol 78, Issue 1 173-189.

- Barteling, S.J., 2002, Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease , *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 21 (3), 577-588.
- Barteling, S.J., Vreeswijk J., 1991, Vaccine. Feb; 9(2):5-88. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. Central Veterinary Institute, Lelystad, The Netherlands.
- Berinstein, A., Roivainen M., Hovi T., Mason P.W, Baxt B., 1995, Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha\beta 3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol.* 69:2664–2666.
- Birch, J.R., Edwards D.J., 1980, The effect of pH on the growth and carbohydrate metabolism of a lymphoblastoid cell line. *Dev Biol Stand*; 46:59–63.
- Birch, J.R., Racher, A.J., 2006, Antibody production, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 671–685.
- Boraston, R.; Thompson, P. W.; Garland, S.; Birch, J. R., 1984, Growth and Oxygen Requirements of Antibody Producing Mouse Hybridoma Cells in Suspension Culture. *Dev. Biol. Stand.* 55, 103-111.
- Boron, W.F., 2004, American Physiological Society, Regulation of intracellular pH , Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06520-8026, Dept. of Cellular and Molecular Physiology, Yale Univ. School of Medicine, *Adv Physiol Educ* 28:160-179, Gillies RJ, Martinez-Zaguilan R, Peterson EP, Perona R. 1992. Role of intracellular pH in mammalian cell proliferation. *Cell Physiol Biochem* 2:159–179.
- Boulton, G.M., Blake J.R., 1993, Gas bubble bursting at a free surface. *J Fluid Mech*; 154:437–466.
- Bödeker, B.D.G., 1994, Production of recombinant factor VIII from perfusion cultures: Large-scale fermentation, *Animal Cell Technology: Products of Today, Prospects of Tomorrow*, Spier, R.E., Griffiths, J.B., Berthold, W., (eds), Butterworth- Heinemann, London, 580–583.

- Breman, B.B., Beenackers AACM, Bouma MJ, Van der Werf MH., 1996, Axial liquid mixing and a gas–liquid multi-stage agitated contactor (MAC). *Che Eng Res Des* 74A:669–678.
- Brosemer, R.W., and Rutter, W. J., 1961, *J. Biol. Chem.*, 236, 1253.
- Brown, F., 1985, Antigenic structure of foot-and-mouth disease virus, *Immunochemistry of Viruses: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines*, Regenmortel M.H.V., Neurath, A. R., (eds), Elsevier, 265–280.
- Busa, W.B., 1986, In: Aronson PS, Boron WF, editors. *Na⁺/H⁺-Exchange, Intracellular pH and Cell Function*. New York: Academic Press. p 291.
- Capstick, P.B., 1963, Growth of Baby Hamster Kidney Cells in Suspension, *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, p. 30-32.
- Capstick, P.B., Garland, A.J., Chapman, W.G., Masters, R.C., 1965, Production of Foot-and Mouth Disease Virus Antigen from BHK-21 Clone 13 Cell Grown and Infected in Deep Suspension Cultures, *Animal Virus Research Institute, Pirbright, Woking, Surrey*, reprinted from *Nature*, Vol.205, No. 4976, pp. 1135-1136.
- Castilha, L.R., Moroes A.M., Augusta E.F.P., Butler M., 2008, *Animal Cell Technology from Biopharmaceuticals to Gene Technology*. *Animal Cell Basic Concepts Chapter 2*.
- Castilho, L.R., Medronho, R.A., 2002, Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 74, 129–169.
- Chalmers, J.J., 2000, Animal cell culture, effects of agitation and aeration on cell adaptation. In: Spier R, Griffiths JB, Scragg AH, eds. *Encyclopedia of Cell Technology*. New York: John Wiley & Sons.
- Chetan, T. Goudar, Ricaredo Matanguihan, Edward Long, Christopher Cruz, Chun Zhang, James M. Piret, Konstantin B. Konstantinov, 2006, Decreased pCO₂ Accumulation by Eliminating Bicarbonate Addition to High Cell-Density Cultures. *Biotech. and Bioeng.* Vol 96, Issue 6, pp: 1107-1117.

- Chisti, Y., 1993, Animal Cell Culture in Stirred Bioreactors: Observation on Scale-Up. *Bioprocess Eng.* 9,191-196.
- Chisti, Y, 2000, Animal-cell Damage in Sparged Bioreactors, *Tibtech Oct*, Vol 18.
- Christi, L. McDowell and Eleftherios T. Papoutsakis, 1998, Decreasing Extracellular pH Increases CD13 Receptor Surface Content and Alters the Metabolism of HL60 Cells Cultured in Stirred Tank Bioreactors, *Biotechnol. Prog.* 14, 567-572.
- Chu, L., Robinson, D.K., 2001, Industrial choices for protein production by large-scale cell culture, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 180–187.
- Crowel, R.L., & Tomco, R.P., 1994, Receptors for Picornaviruses (book), Chapter 6
- Cruz, H.J., Ferreira, Freitas C.M., Moreira J.L., Carrondo M.J.T., 1999, Metabolic Responses to Different Glucose and Glutamine Levels in Baby Hamster Kidney Cell Culture. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 51: 579-585.
- Cruz, H.J., Freitas C.M., Alves P.M., Moreira J.L., Carrondo M.J.T., 2000, Effects of Ammonia and Lactate on Growth, metabolism, and Productivity of BHK Cells. *Enzyme and Microbial Technology.* 27: 43-52.
- Cruz, H.J., Moreira J.L., Carrondo M.J.T., 2000, Metabolically Optimized BHK Cell Fed-Batch Cultures. *Journal of Biotechnology* 80, 109-118.
- Cruz, H.J., Moriera J.L., Dias E.M., Peixoto C.M., Ferreira A.S., Carrondo M.J.T., 1998, Correlation Between BHK Cell Specific Productivity and Metabolism, O.-W. Merten et al. (eds.), *New Developments and New Applications in Animal Cell Technology*, 219-221, kluwer Academic Publishers.
- Desing-Expert User's Guide, 2001.
- deZengotita, V. M., Kimura, R., Miller, W. M., 1998, Effects of CO₂ and Osmolality on Hybridoma Cells: Growth, Metabolism and Monoclonal Antibody Production. *Cytotechnology* 28, 213-227.

- Dodge, T.C., Hu W.S., 1986, Growth of hybridoma cells under different agitation conditions. *Biotechnol Lett*; 8:683–686.
- Doel, T. R., 2003, FMD vaccines, Merial Animal Health Ltd, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey, UK, *Virus Research* 91:81-99.
- Doran, P.M., 1995, *Bioprocess Engineering Principles*.
- Dowd, E.J., Jubb A., Kwok K.E., Piret J.M., 2003, Optimization and Control of Perfusion Cultures Using a Viable Cell Probe and Specific Perfusion Rates, *Cytotechnology* 42 : 35-45.
- Doyle, A., Griffiths J.Bryan, 1998, *Cell and Tissue Culture Lab. Procedures in Biotechnology*, Chapter 4.6: Oxygenation.
- Eibl, R., Eibl D., Pörtner R., Catapano G., Czermak P., 2009, *Cell and Tissue Engineering*, Chapter 2.
- Eigenbrodt, E., Fister P., Reinacher M., 1985, New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells. In: Baitner R, ed. *Regulation of Carbohydrate Metabolism*. Boca Raton: CRC Press, 141.
- Eleftherios, T. Papoutsakis, 1991, Fluid-Mechanical Damage of Animal Cells in Bioreactors. *Trends Biotechnol.* 9(12):427-37.
- Fenge C., Klein C., Heuer C., Siegel U., Fraune E., 1993, Agitation, Aeration and Perfusion Modules for Cell culture Bioreactors. *Cytotech.*, vol 11, N. 3, 233-244.
- Frangos, J.A., Eskin S.G., McIntire L.V., Ives C.L., 1985, Flow effects on prostacyclin production by cultured human-endothelial cells. *Science* 227:1477-79.
- Freshney, R. Ian, 1987, *Culture of Animal Cells*. (book).
- Galaction, A.I., Cascaval D., Oniscu C., Turnea M., 2004, Enhancement of Oxygen Mass Transfer in Stirred Bioreactors Using Oxygen Vectors. 1. Simulated Fermentation Broth. *Bioprocess Biosyst Eng.* 26: 231-238.

- Garcia-Briones, M. , Chalmers, J.J., 1991, Cell-bubble Interactions : Mechanisms of Suspended Cell Damage. Ann. NY Acad. Sci. 665: 219-229.
- Garcia-Briones, M.A., Brodkey R.S., Chalmers J.J., 1994, Computer simulations of the rupture of a gas bubble at a gas–liquid interface and its implications in animal cell damage. Chem Eng Sci 49:2301–2320.
- Garnier, A., Voyer R., Tom R., Perret S., Jardin B., Kamen A., 1996, Dissolved carbon dioxide accumulation in a large scale and high density production of TGFb receptor with baculovirus infected Sf-9 cells. Cytotechnology 22:53–63.
- Girard H.C., Okay G., Kivılcım Y., 1973, Use of the Vibrofermentor for multiplication of BHK cells in suspension and for replication of FMD virus.
- Glacken, M.W., Adema E., Sinskey A.J., 1988, Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics: I. Initial metabolic rates. Department of Applied Biological Sciences, Massachusetts Institute of Technology, USA. Biotechnol Bioeng. Aug 5; 32(4):491-506.
- Gonzalez-Saiz, J.M., Garrido-Vidal D., Pizarro c., 2009, Scale up and Design of Processes in Aerated-Stirred Fermenters for the Industrial Production of Vinegar. Journal of Food Engineering, 93, 89-100.
- Gray, D.R., Chen S., Howarth W., Inlow D., Maiorella R.L., 1996, CO₂ in large-scale and high density CHO cell perfusion culture. Cytotechnology; 22:65–78.
- Gürhan, S.İ., Gürhan B., Öztürkmen, H., 1987, Klonlama yöntemi ile elde edilen BHK-21 hücre kültürlerinin üreme özelliklerinin ve şap virüsüne duyarlılıklarının incelenmesi. Doğa. Vet. Ve Hay. Der., 11 (1), 21-27.
- Güven, G., 2004, Peyniraltı Atıksuyunun Arıtılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Handa, A., et al., 1987, On The Evaluation of Gas-Liquid Interfacial Effects on Hybridoma Viability in Bubble Column Bioreactors. *Dev. Biol. Stand.* 66, 241-253.
- Handa-Corrigan, A., Emery A.N., Spier R.E., 1989, Effect of gas-liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells: mechanisms of cell damage by bubbles. *Enzyme Microb. Technol* 11:230-235.
- Hassell, T., Gleave, S., Butler, M., 1991, Growth inhibition in animal cell culture: the effect of lactate and ammonia, *Appl. Biochem. Biotech.*, 1, 29-41.
- Henzler, H.J., Kauling D.J., 1993, Oxygenation of Cell Cultures. *Bioprocess Engineering*, 9: 61-75.
- Hu, W., 2007, Characterization of Hydrodynamic Forces and Interfacial Phenomena in Cell Culture Processes, Chapter 6: Investigation of Aeration Strategy in Mammalian Cell Culture. Dissertation; Presented in Partial Fulfillment of the Requirements For the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of The Ohio State UniversityThe Ohio State University.
- Hu, W.S. and Aunins J.G., 1997, Large-scale mammalian Cell Culture, *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 148-153.
- Hu, W.S., Meier J., Wang D.I.C., 1986, Use of surface aerator to improve oxygen transfer in cell culture. *Biotech. and Bioeng.*, 28: 122-125.
- Jan, D.C.H., Petch D.A., Huzel N., Butler M., 1997, The Effect of Dissolved Oxygen on the Metabolic Profile of a Murine Hybridoma Grown in Serum-Free Medium in Continuous Culture. *Biotech. and Bioeng.*, Vol. 54, Issue 2, pp 153-164.
- John Bonham-Carter, 2005, *Aeration and Gas Analysis in Cell Culture*, Magellan Instruments Publication.
- Jordan, M., Sucker, H., Einsele, A., Widmer, F., Eppenberger, H.M. 1994. Interactions Between Animal Cells and Gas Bubbles: The Influence of

Serum and Pluronik® F68 on the physical properties of the Bubble Surface. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 446-454.

Jordani, P., Öztürk S.S., 1999, Effects of Cell Density and Temperature on Oxygen Consumption Rate for Different Mammalian Cell Lines. *Biotech. and Bioeng.* Vol: 64 , No: 3

Ju, L.K, Chase G.G., 1992, Improved Scale up Strategies of Bioreactors. *Bioprocess Engineering* 8:49-53.

Kadoi, K., 1984, Studies on BHK Cell Culture in Suspension, Attempts at Preparing Low-cost Serum-free Media, *Bull Coll. Agr.& Vet. Med., Nihon Univ.*, No. 42, p. 22-26 (1985).

Kadouri, A., Spier, R.E., 1997, Some myths and messages concerning the batch and continuous culture of animal cells, *Cytotechnology*, 24, 89–98.

Kargı, F., Shuler L. M., 2006, *Bioprocess Engineering Basic Concepts Second Edition* (Book).

Kilburn, D.G., Webb F.C., 1968, The cultivation of animal cells at controlled dissolved oxygen partial pressure. *Biotech. and Bioeng.* Vol. X, pp. 801-814.

Kimura, R., Miller W.M., 1996, Effects of elevated pCO₂ and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells, *Chemical Engineering Department, Northwestern University, Evanston, Illinois 60208-3120, Metabolic Engineering and Cell Physiology, Biotech. and Bioeng*, Vol : 52, pp 152-160.

Kitching, P., Hammond J., Jeggo M., Charleston B., Paton D., Rodriguez L., Heckert R., 2007, Global FMD Control- Is it an Option? *Vaccine* (25), 5660-5664.

Kossen, N.W.F., Scale-up. In: Galindo E, Ramirez OT, 1994, *Advances in Bioprocess Engineering*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 53–65.

Krahe, M., 2000, *Biochemical Engineering*, Reprint from *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.

- Kurt, T. Kunas, Eleftherios T. Papoutsakis, 1990, Damage Mechanisms of Suspended Animal Cells Agitated Bioreactors with and Without Bubble Entrainment. *Biotechnol. And Bioeng.*, Vol. 36, pp, 476-483.
- Langheinrich, C., Nienow A.W., 1999, Control of pH in Large-Scale Animal Cell Bioreactors: Alkali Addition and pH Excursions. *Biotech. and Bioeng*, Vol: 66: No:3.
- Lee, G.M., Huard T.K., Kaminski M.S., Palsson B.O.,1988, Effect of mechanical agitation on hybridoma cell growth. *Biotechnol Lett* 10:625–628.
- Leforban, Y., 1999, Prevention measures against foot-and- mouth disease in Europe in recent years, *Vaccine*, 17 : 1755–1759.
- Linz, M., Zeng A.P., Wagner R., Deckwer W.D., 1997, Stoichiometry, Kinetics, and Regulation of Glucose and Amino Acids Metabolism of a Recombinant BHK Cell Line in Batch and Continuous Cultures. *Biotech. Prog*, 13: 453-463.
- Ma, N., Chalmers Jeffrey J., and Mollet Mike, 2005, Aeration, Mixing and Hydrodynamics in Bioreactors, (Chapter 7), Citation Information, *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*, Edited by Sadettin S. Ozturk and Wei-Shou Hu ,CRC Press.
- MacMicheal, G.J., 1989, The Effects of pH and Oxygen on the Growth, Monoklonal Antibody Production, and Metabolism of a Mouse Hybridoma. *Am. Biotechnol. Lab.*: 7, 44-47.
- Marteijn, Oude-Elferink, D.E. Martens, Gooijer, J. Tramper, 2000, Effect of Low Inoculation Density in the Scale-Up of Insect Cell Cultures. *Biotechnol. Prog.* 16: 795-799
- Mason, P.W., C. Beard, G. Ward, E. Rieder 1, J. Chinsangaram, M.J. Grubman, 1999, Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J. Biotechnol* 20:73(2-3).243-9.

- Matanguihan, R., Sajan E., Zachariou M., Olson C., Michaels J., Thrift J., Konstantinov K., 2001, Solution to the high dissolved DCO_2 problem in high-density perfusion culture of mammalian cells. *Animal cell technology: Kluwer*. p 399–402.
- McKeehan, W.L., 1986, Glutaminolysis in Animal Cells. In *carbohydrate Metabolism in Cultured Cells*; Morgan, M.J.; Plenum Press: New York, pp 111-150.
- Michael, S. Kallos, Leo A. Behie, 1999, Inoculation and growth conditions for high-cell-density expansion of mammalian neural stem cells in suspension bioreactors. *Biotechnol. And Bioeng.* 20:63(4):473-83.
- Michaels, J.D., Jason E. Nowak, Ameet K. Mallik, Kalman Koczko, Darsh T. Wasan and Eleftherios T. Papoutsakis, 1995, Analysis of Cell-to-Bubble Attachment in Sparged Bioreactors in the Presence of Cell-Protecting Additives, *Biotech. and Bioeng.* Vol. 47, P.407-419.
- Miller, W. M.; Blanch, H. W.; Wilke, C. R., 1987, The Effects of Dissolved Oxygen Concentration on Hybridoma Growth and Metabolism in Continuous Culture. *J. Cell. Physiol.*, 132, 524-530.
- Mirabet, M., Navarro A., Lopez A., Canela E.I., Mallol J., Lluís C., Franco R., 1997, Ammonium Toxicity in Different Cell Lines. *Biotech. And Bioeng.* Vol.56, No: 5.
- Mishra, V.P., Joshi J.B., 1994, Flow generated by a disc turbine. 4. Multiple-impellers. *Chem. Eng. Res. Des.*; 73:657–668.
- Mizrahi, A., 1984, Oxygen in Human Lymphoblastoid Cell Line Cultures and Effect of Polymers in Agitated and Aerated Cultures. *Dev. Biol. Stand.* 1984, 55, 93-102.
- Mollet, M., Ma N., Zhao Y., Brodkey R.S., Taticek K., Chalmers J.J., 2004, Bioprocess Equipment: Characterization of Energy Dissipation Rate and its potential to damage cells. *Biotechnol. Progress*; 20:1437–1448.

- Mostafa, S.S., Gu X., 2003, Strategies for improved dCO₂ removal in largescale fed-batch cultures. *Biotechnol Prog* 19:45–51.
- Mowat, G.N., Chapman W.G., 1962, Growth of Foot and Mouth Disease Virus in a Fibroblastic Cell Line Derived From Hamster Kidney.
- Mukhopadhyay, S.N., *Process Biotechnology Fundamentals*, 2001.
- Murhammer, D.W., Goochee C.F., Scale-up of insect cell cultures: Protective effects of Pluronic F-68. *BioTechnology* 1988; 6:1411–1418.
- Nagata, S., 1975, *Mixing Principles and Applications*. Tokyo: Kodansha.
- Nienow, A.W., 1996, Gas–liquid mixing studies: a comparison of Rushton turbines with some modern impellers. *Che Eng Res Des*; 74A:417–423.
- Nienow, A.W., 2006, Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*., 50 (1-3): 9-33.
- Oh, S.K.W., Nienow A.W., Al-Rubeai M., Emary A.N., 1989, The effect of agitation intensity with and without continuous sparging on the growth and antibody production of hybridoma cells. *J Biotechnol* 12:45–62.
- OIE Terrestrial Manual, 2009, Chapter 2.1.5.- Foot and mouth disease.
- Orton, D., Wang D.I.C., 1991, Fluorescent visualization of cell death in bubble aerated bioreactors. *Bitehnol prog*. 7: 151-158.
- Öztürk, S.S., 1996, Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnology*; 22:3–16.
- Öztürk, S.S., and Wei-Shou Hu, 2006, *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*, CRC Press.
- Öztürk, S.S., Meyerhoff, M., Palsson B.O., 1989, Measurement of Ammonia and Glutamine in Cell Culture Media by Gas Sensing Electrodes. *Biotechnol. Techniques*. 3: 217-222.

- Öztürk, S.S., Palsson B.O., 1990a, Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. *Biotechnol Prog* 6:121-128.
- Öztürk, S.S., Pallson, B.O., 1991, Effect of Medium Osmolarity on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody Production. *Biotech. and Bioeng.*, Vol. 37, pp. 989-993.
- Öztürk, S.S., Palsson B.O., 1990b, Effects of Dissolved Oxygen on Hybridoma Cell Growth, Metabolism, and Antibody Production Kinetics in Continuous Culture. *Biotechnol prog.* 6(6), pp 437-446.
- Öztürk, S.S., Palsson B.O., 1991, Growth, Metabolic, and Antibody Production Kinetics Of Hybridoma Cell Culture: 1. Analysis Of Data From Controlled Batch Reactors.
- Öztürk, S.S., Palsson B.O., 1991, Growth, Metabolic, and Antibody Production Kinetics of Hybridoma Cell Culture: Effects of Serum Concentration, Dissolved Oxygen Concentration, and Medium pH in a Batch Reactor. *Biotechnol prog.* 7(6), pp 481-494.
- Öztürk, S.S., Palsson B.O., 2006, Wei-Shou Hu, *Cell Culture Tecnology for Pharmaceutical and cell-based therapies.*
- Papoutsakis, E.T., 1991, Fluid Mechanical Damage of Animal Cells in Bioreactors *Tibtech* Vol. 9, 316–324.
- Perry, B.D., Randolph, T.F., 2003, The economics of foot and mouth disease, its control and its eradication. In: Bodet B, Vicari M. (Eds.), *Foot and mouth disease strategies, symposium proceedings.* Paris: Elsevier 23-41.
- Peterson, H.J., McIntire L.V., Papoutsakis E.T., 1988, Shear sensitivity of cultured hybridoma cells (CRL-8018) depends on mode of growth, culture age and metabolite concentration. *J .Biotechnol* 7:229–246.
- Pol, L.V.D., and Tramper, J., 1998, Shear sensitivity of Animal Cells from a Culture-Medium Perspective. *Tibtech* August (Vol 16).

- Preissmann, A., Werner Rolf G., Noe W., 1997, Monitoring and Control of Large-Scale Vaccine Production Via dynamic Oxygen Uptake Rate Measurement. M.J.T. Carrondo et al. (eds). *Animal Cell Tech.* 169-174.
- Radlett, P.J., 1987, The Use of BHK Suspension Cells for the Production of Foot and Mouth Disease Vaccines, *Advances in Biochem. Eng. Biotech.* Vol.34.
- Radlett, P.J., Telling, R.C., Stone, C.J., and Whiteside J.P., 1971, Improvements in Growth of BHK-21 Cells in Submerged Culture, *Applied Microbiology*, p. 534-537.
- Ramirez, O.T., Mutharasan R., 1990, The role of the plasma membrane fluidity on the shearsensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. *Biotechnol Bioeng*; 36:911–920.
- Rein, A. and Rubin, H., 1968, Effects of Local Cell Concentrations upon The Growth of Chick Embryo Cells in Tissue Culture. *Exp. Cell Res.* 49,666-678.
- Reitzer, L. J.; Wice, B. M.; Kennell, D., 1979, Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254, 2669-2674.
- Reuss, M., Schmalzriedt S., Jenne M., 1994, Structured modelling of bioreactors. In: Galindo E, Ramirez, eds. *Advances in Bioprocess Engineering*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 207-215.
- Rubin, H., 1966, A Substance in Conditioned Medium Which Enhances The Growth of Small Number of Chick Embryo Cells. *Exp Cell Res.* 41,138-48.
- Ruffieux, P.A., von Stockar U., Marison I.W., 1998, Measurement of volumetric (OTH) and determination of specific (qO_2) oxygen uptake rates in animal cell cultures. *J. Biotechnol*; 63:85–95.
- Singh, V., 1996, On-line Measurement of Oxygen Uptake in Cell Culture Using the Dynamic Method, *Biotechnology Development*. Vol 52, Iss 3, pp: 443-448.

- Singh, V., Gunnerson, A., 1989, On-line Measurement of Oxygen Uptake in Cell Culture Using the Dynamic Method, AIChE National Meeting, Miami.
- Spier R.E., 2000, Encyclopedia of Cell Technology.
- Spier, R.E. and J.B Griffiths, 1985, Animal Cell Tech. Vol 1, Academic Pres.
- Sütçü, M., 1985, Şap Hastalığı. Şap Enstitüsü Yayın No: 2, Ongun Kardeşler Mat., Ankara, 1-3s, 56-81s.
- Şap Enstitüsü, 2004, Yağ adjuvantlı şap aşısı protokolü, Ankara.
- Taticek, R., Petersen S., Konstantinov K., Naveh D., 1998, Effect of dissolved carbon dioxide and bicarbonate on mammalian cell metabolism and recombinant protein productivity in high density perfusion culture. San Diego, CA: Cell Culture Engineering VI, February 7–12.
- Thomas, C.R., Zhang Z., 1998, The effect of hydrodynamics on biological materials. In: Galindo E, Ramirez OT, eds. Advances on Bioprocess Engineering II. Dordrecht: Kluwer Academic, 137–170.
- Thomas, R.C., 1995, Bicarbonate briefly CO₂-free. Nature 374:597–598.
- Tramper, J., Smith J.D., Sreeratman J., Valk J.M., 1988, Bubble-column design for growth of fragile insect cells. Bioprocess Eng; 3:37–41.
- Tremper, J., Vlask J.M., Gooijer C.D., 1996, Scale up aspects of sparged insect-cell bioreactors. Cytotechnology 20:221–229.
- Trinh, K., Garcia- Briones, M., Hink, F., Clamers, J.J., 1994, Quantification of Damage to Suspended Insect Cells as a result of Bubble Rupture. Biotechnol. Bioeng. 43: 37-45.
- Valk, van der, P., Gille J.J. P., Oostra, A.B., Roubos, I. W., Sminia, T., Joenje, H., 1985, Characterization of an oxygen-tolerant cell line derived from Chinese hamster ovary. Cell Tissue Res 239: 61-68.
- Varley, J., Birch J., 1999, Reactor Design for Large Scale Suspension Animal Cell Culture, Cytotechnology 29: 177-205.

- Venkat, R.V., Stock L.R., Chalmers J.J., 1996, Study of hydrodynamics in microcarrier culturespinner vessels: a particle tracking velocimetry approach. *Biotechnol Bioeng* 49:456–466.
- Wilhelm, G., Schulz, Hoffmann, E., 1971, pH Dependence of Aerobic Glycolysis in Erlich Ascites Tumor Cells *FEBS Lett.* 17,158-162.
- Yi, X., Xiangming S., Yuanxing Z., 2004, Effects of osmotic pressure on recombinant BHK cell growth and von willebrand factor (vWF) expression, *Process Biochemistry* 39(11):1817-1823.
- Zhang, S., Handa-Corrigan A., Spier R.E., 1992, Oxygen transfer properties of bubbles in animal cell culture media. *Biotechnol Bioeng* 40:252–259.
- Zhang, Z., Al-Rubeai M., and Thomas C.R., 1992, *Enzyme Mic. Tech.* 14, 980-983.
- Zhou, G, Kresta SM.,1996, Distribution of energy dissipation between convective and turbulent flow for three frequently used impellers. *Trans IChemE*; 74:379–389.
- Zhou, W., Bibila T., Glazomitsky K., Montalvo J., Chan C., Stefano D.Di, Munshi S., Robinson D., Buckland B., and Aunins J., 1996, *Cytotechn* 22, 239–50.
- Zhou, W., Rehm J., Europa A., Hu W.S., 1997, Alteration of mammalian Cell Metabolism by Dynamic Nutrient Feeding. *Cytotechnology*, 24: 99-108.
- Zhou, W., Rehm, J., and Hu, W.S., 1995, High Viable Cell Concentration Fed-Batch Cultures of Hybridoma Cells through On-line Nutrient Feeding. *Biotech. And bioeng.*, Vol. 46, pp. 579-587.
- Zhu, M. Marie, Asti Goyal, Douglas L. Rank, Sunil K. Gupta, 2005, Effects of Elevated pCO₂ and Osmolality on Growth of CHO Cells and Production of Antibody-Fusion Protein B1, *Biotechnology Development*, Bristol Myers Company.
- Zielke, H. R.; Sumbilla, C. M.; Sevdalian, D. A.; Hawkins, R. L.;Ozand, P. T., 1980, Lactate: A Major Product of Glutamine Metabolism by Human Diploid Fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 104, 433-441.

EKLER DİZİNİ

- EK 1. Son Hücre Sayısı (X) Anova Testi Sonuçları
- Ek 2. 146S Partikül Miktarı Anova Testi Sonuçları
- Ek 3. Özgül Üreme Hızı (μ) Anova Testi Sonuçları
- Ek 4. Antijenik Titre (AT) Anova Testi Sonuçları
- Ek 5. Enfektif Titre (IT) Anova Testi Sonuçları
- Ek 6. Laktat/Glikoz Oranı ($Y_{lak/gli}$) Anova Testi Sonuçları
- Ek 7. Amonyak (NH_3) Tüketim Hızı Anova Test Sonuçları
- Ek 8. Toplam Protein Miktarı (TP) Anova Testi Sonuçları
- Ek 9 :Çalışma Koşullarının Çoklu Etkileri
- EK10. Glikoz ve Laktat Kalibrasyon Grafikleri
- EK 11: Amonyak (NH_3) Kalibrasyon Grafiği
- Ek 12. k_{La} Çalışmaları
- Ek 13. Özgül Oksijen Tüketim Hızı (qO_2) Örnek Hesabı

EK 1. Hücre sayısı (X) Anova Testi Sonuçları

(Design Expert 7.0 orijinal çıktısı)

Response 1 X Transform: None

*** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	1,683E+14	1	1,68317E+14			
Linear vs Mean	8,419E+12	4	2,10484E+12	3,732	0.0163	
2FI vs Linear	2,059E+12	6	3,43099E+11	0,541	0.7703	
Quadratic vs 2FI	1,11E+13	4	2,7754E+12	44,317	< 0.0001	Suggested
Cubic vs Quadratic	6,747E+11	11	61340214501	0,927	0.5869	Aliased
Residual	2,646E+11	4	66160828270			
Total	1,908E+14	30	6,36121E+12			

"Sequential Model Sum of Squares [Type I]": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Linear	1,41E+13	24	5,87407E+11	326,3373	0.0437	
2FI	1,204E+13	18	6,68843E+11	371,5796	0.0408	
Quadratic	9,376E+11	14	66970405185	37,2057	0.1279	Suggested
Cubic	2,628E+11	3	87614437693	48,6746	0.1049	Aliased
Pure Error	1,8E+09	1	1800000000			

"Lack of Fit Tests": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	750987,94	0,374	0,27370033	0,171753	1,865E+13	
2FI	796075,21	0,465	0,18387229	-0,015622	2,287E+13	
Quadratic	250251,30	0,958	0,91935032	0,821465	4,02E+12	Suggested
Cubic	257217,47	0,988	0,91479779	+		Aliased

Case(s) with leverage of 1.0000: PRESS statistic not defined

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Response 1 X

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
--------	----------------	----	-------------	---------	------------------

Model	2,1575E+13	13	1,65962E+12	28,130603	< 0.0001	significant
A-pH	17635539497	1	17635539497	0,298923	0.5921	
B-ÇO	1,05609E+12	1	1,05609E+12	17,900792	0.0006	
C-N	2,14299E+12	1	2,14299E+12	36,323838	< 0.0001	
D-X0	5,03811E+12	1	5,03811E+12	85,396367	< 0.0001	
AB	76596753000	1	76596753000	1,298320	0.2713	
AC	1,00499E+11	1	1,00499E+11	1,703469	0.2103	
AD	3,50965E+11	1	3,50965E+11	5,948888	0.0268	
BD	1,20622E+12	1	1,20622E+12	20,445530	0.0003	
CD	52777230603	1	52777230603	0,894578	0.3583	
A^2	9,04485E+12	1	9,04485E+12	153,310909	< 0.0001	
B^2	1,11548E+12	1	1,11548E+12	18,907464	0.0005	
C^2	1,2297E+12	1	1,2297E+12	20,843558	0.0003	
D^2	2,64802E+12	1	2,64802E+12	44,884071	< 0.0001	
Residual	9,43949E+11	16	58996788281			
Lack of Fit	9,42149E+11	15	62809907499	34,894393	0.1322	not significant
Pure Error	1800000000	1	1800000000			
Cor Total	2,25189E+13	29				

The Model F-value of 28.13 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case B, C, D, AD, BD, A², B², C², D² are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The "Lack of Fit F-value" of 34.89 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 13.22% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

Std. Dev.	242893	R-Squared	0,958
Mean	2368667	Adj R-Squared	0,924
C.V. %	10,25	Pred R-Squared	0,848
PRESS	3,42E+12	Adeq Precision	16,084

The "Pred R-Squared" of 0.8483 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.9240.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 16.084 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Factor	Coefficient	df	Standard	95% CI		VIF
	Estimate		Error	Low	High	
Intercept	3420041,7860	1	100010,86130	3208028,232	3632055,3	
A-pH	27171,7972	1	49697,91569	-78183,07756	132526,67	1,004753
B-ÇO	-210396,5713	1	49728,17538	-315815,5938	-104977,5	1,005977
C-N	300274,7818	1	49822,21047	194656,4139	405893,15	1,009785
D-X0	450564,1714	1	48756,99761	347203,9538	553924,39	1,016991

AB	-69593,0472	1	61076,60072	-199069,6567	59883,562	1,011676
AC	79518,4521	1	60925,73556	-49638,33744	208675,24	1,006684
AD	143792,6569	1	58954,74922	18814,17162	268771,14	1,020206
BD	-267702,4268	1	59204,28121	-393209,8962	-142195	1,026631
CD	-55515,0921	1	58695,11413	-179943,1756	68912,991	1,028851
A^2	-573978,2714	1	46356,31686	-672249,2732	-475707,3	1,049016
B^2	-201624,8268	1	46368,96104	-299922,633	-103327	1,049588
C^2	-212072,5322	1	46451,36621	-310545,0295	-113600	1,053322
D^2	-320048,8795	1	47771,64429	-421320,2413	-218777,5	1,066507

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 X = & 3420041,786 \\
 & 27171,79723 * A \\
 & -210396,5713 * B \\
 & 300274,7818 * C \\
 & 450564,1714 * D \\
 & -69593,04722 * A * B \\
 & 79518,45219 * A * C \\
 & 143792,6569 * A * D \\
 & -267702,4268 * B * D \\
 & -55515,09219 * C * D \\
 & -573978,2714 * A^2 \\
 & -201624,8268 * B^2 \\
 & -212072,5322 * C^2 \\
 & -320048,8795 * D^2
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 X = & -713707268,40 \\
 & 201380281,20 * \text{pH} \\
 & 196876,84 * \text{ÇO} \\
 & -13745,24 * \text{N} \\
 & -10,81 * \text{X0} \\
 & -17398,26 * \text{pH} * \text{ÇO} \\
 & 7951,84 * \text{pH} * \text{N} \\
 & 3,59 * \text{pH} * \text{X0} \\
 & -0,0669 * \text{ÇO} * \text{X0} \\
 & -0,0055 * \text{N} * \text{X0} \\
 & -14349456,79 * \text{pH}^2 \\
 & -504,06 * \text{ÇO}^2 \\
 & -84,82 * \text{N}^2 \\
 & 0 * \text{X0}^2
 \end{aligned}$$

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node.
In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

Ek 2. 146S Partikül Miktarı Anova Testi Sonuçları

Response **2** **146S** Transform: None

*** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	17,406	1	17,406			
Linear vs Mean	0,622	4	0,155	3,768	0.0193	
2FI vs Linear	0,407	6	0,068	2,277	0.0960	
Quadratic vs 2FI	0,309	4	0,077	7,073	0.0057	Suggested
Cubic vs Quadratic	0,033	8	0,004	0,110	0.9913	Aliased
Residual	0,076	2	0,038			
Total	18,852	25	0,754			

"Sequential Model Sum of Squares [Type I]": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0,203	0,430	0,316	0,080	1,331	
2FI	0,173	0,711	0,505	0,446	0,801	
Quadratic	0,104	0,925	0,819	0,732	0,387	Suggested
Cubic	0,195	0,948	0,372		+	Aliased

Case(s) with leverage of 1.0000: PRESS statistic not defined

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Response **2** **146S**

These Rows Were Ignored for this Analysis.

23, 3, 26, 25, 22

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1,319	13	0,101	8,708	0.0005	significant
A-pH	0,403	1	0,403	34,592	0.0001	
B-ÇO	0,145	1	0,145	12,423	0.0048	
C-N	0,098	1	0,098	8,422	0.0144	
D-X0	0,045	1	0,045	3,852	0.0755	
AB	0,006	1	0,006	0,507	0.4913	
AC	0,204	1	0,204	17,511	0.0015	
AD	0,017	1	0,017	1,437	0.2558	

BC	0,074	1	0,074	6,368	0.0283
BD	0,008	1	0,008	0,707	0.4182
CD	0,090	1	0,090	7,728	0.0179
A^2	0,014	1	0,014	1,159	0.3046
C^2	0,000	1	0,000	0,017	0.8979
D^2	0,231	1	0,231	19,835	0.0010
Residual	0,128	11	0,012		
Cor Total	1,447	24			

The Model F-value of 8.71 implies the model is significant. There is only a 0.05% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise. Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A, B, C, AC, BC, CD, D² are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Std. Dev.	0,108	R-Squared	0,911
Mean	0,834	Adj R-Squared	0,807
C.V. %	12,935	Pred R-Squared	0,732
PRESS	0,387	Adeq Precision	11,065

The "Pred R-Squared" of 0.7322 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.8068.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 11.065 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Factor	Coefficient	df	Standard	95% CI		VIF
	Estimate		Error	Low	High	
Intercept	0,938	1	0,043	0,842	1,034	
A-pH	-0,146	1	0,025	-0,201	-0,092	1,161
B-ÇO	-0,083	1	0,024	-0,135	-0,031	1,047
C-N	-0,085	1	0,029	-0,149	-0,020	1,318
D-X0	0,050	1	0,025	-0,006	0,105	1,246
AB	0,021	1	0,030	-0,045	0,088	1,086
AC	0,132	1	0,032	0,063	0,202	1,190
AD	-0,038	1	0,032	-0,107	0,032	1,262
BC	-0,076	1	0,030	-0,142	-0,010	1,082
BD	0,024	1	0,029	-0,040	0,088	1,084
CD	-0,085	1	0,030	-0,152	-0,018	1,214
A^2	0,024	1	0,022	-0,025	0,072	1,093
C^2	0,004	1	0,028	-0,058	0,066	1,160
D^2	-0,103	1	0,023	-0,154	-0,052	1,156

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$146S = 0,938$$

-0,146 * A
 -0,083 * B
 -0,085 * C
 0,050 * D
 0,021 * A * B
 0,132 * A * C
 -0,038 * A * D
 -0,076 * B * C
 0,024 * B * D
 -0,085 * C * D
 0,024 * A^2
 0,004 * C^2
 -0,103 * D^2

Final Equation in Terms of Actual Factors:

146S =
 51,547
 -11,534 * pH
 -0,030 * ÇO
 -0,088 * N
 0,000 * X0
 0,005 * pH * ÇO
 0,013 * pH * N
 0,000 * pH * X0
 0,000 * ÇO * N
 0,000 * ÇO * X0
 0,000 * N * X0
 0,589 * pH^2
 0,000 * N^2
 0,000 * X0^2

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node.

In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

Ek 3. Özgül Üreme Hızı (μ) Anova Testi Sonuçları

Response 3 μ Transform: None

*** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	0,0785	1	0,0785			
Linear vs Mean	0,0017	4	0,0004	4,9042	0.0047	
2FI vs Linear	0,0005	6	8,98462E-05	1,0275	0.4379	
Quadratic vs 2FI	0,0011	4	0,0003	8,1298	0.0011	Suggested
Cubic vs Quadratic	0,0005	11	4,37952E-05	4,1014	0.0925	Aliased
Residual	4,271E-05	4	1,0678E-05			
Total	0,0825	30	0,0027			

"Sequential Model Sum of Squares [Type I]": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Linear	0,0022	24	9,10816E-05	6,2470	0.3074	
2FI	0,0016	18	9,14935E-05	6,2753	0.3056	
Quadratic	0,0005	14	3,64199E-05	2,4979	0.4629	Suggested
Cubic	2,813E-05	3	9,37736E-06	0,6432	0.6991	Aliased
Pure Error	1,458E-05	1	0,00001458			

"Lack of Fit Tests": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0,0094	0,4397	0,3500	0,1503	0,0033	
2FI	0,0094	0,5769	0,3543	0,0649	0,0037	
Quadratic	0,0059	0,8665	0,7418	0,3275	0,0026	Suggested
Cubic	0,0033	0,9891	0,9211		+	Aliased

+ Case(s) with leverage of 1.0000: PRESS statistic not defined

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Response 3 u

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0,00329	9	0,00037	11,534	< 0.0001	significant
A-pH	0,00004	1	0,00004	1,132	0.3000	
B-ÇO	0,00010	1	0,00010	3,032	0.0970	
C-N	0,00055	1	0,00055	17,334	0.0005	
D-X0	0,00102	1	0,00102	32,310	< 0.0001	
AB	0,00004	1	0,00004	1,195	0.2873	
AC	0,00005	1	0,00005	1,451	0.2424	
CD	0,00035	1	0,00035	10,959	0.0035	
A ²	0,00097	1	0,00097	30,543	< 0.0001	
D ²	0,00007	1	0,00007	2,138	0.1592	
Residual	0,00063	20	0,00003			
Lack of Fit	0,00062	19	0,00003	2,238	0.4882	not significant
Pure Error	0,00001	1	0,00001			
Cor Total	0,00393	29				

The Model F-value of 11.53 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise. Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case C, D, CD, A² are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The "Lack of Fit F-value" of 2.24 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 48.82% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

Std. Dev.	0,006	R-Squared	0,838
Mean	0,051	Adj R-Squared	0,766
C.V. %	11,007	Pred R-Squared	0,574
PRESS	0,002	Adeq Precision	13,697

The "Pred R-Squared" of 0.5736 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.7658.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 13.697 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	0,05500	1	0,00200	0,05100	0,05800	
A-pH	0,00123	1	0,00115	-0,00118	0,00363	1,004

B-ÇO	-0,00201	1	0,00115	-0,00441	0,00040	1,004
C-N	0,00481	1	0,00115	0,00240	0,00721	1,008
D-X0	-0,00640	1	0,00113	-0,00875	-0,00405	1,009
AB	-0,00155	1	0,00141	-0,00450	0,00140	1,009
AC	0,00170	1	0,00141	-0,00124	0,00464	1,004
CD	-0,00448	1	0,00135	-0,00730	-0,00166	1,017
A^2	-0,00584	1	0,00106	-0,00804	-0,00363	1,013
D^2	0,00159	1	0,00109	-0,00068	0,00386	1,030

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 u &= \\
 &0,05460 \\
 &0,00123 * A \\
 &-0,00201 * B \\
 &0,00481 * C \\
 &-0,00640 * D \\
 &-0,00155 * A * B \\
 &0,00170 * A * C \\
 &-0,00448 * C * D \\
 &-0,00584 * A^2 \\
 &0,00159 * D^2
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 u &= \\
 &-7,27421 \\
 &2,06368 * pH \\
 &0,00264 * \text{ÇO} \\
 &-0,00089 * N \\
 &0,00000 * X0 \\
 &-0,00039 * pH * \text{ÇO} \\
 &0,00017 * pH * N \\
 &0,00000 * N * X0 \\
 &-0,14593 * pH^2 \\
 &0,00000 * X0^2
 \end{aligned}$$

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node.
In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

Ek 4. Antijenik Titre (AT) Anova Testi Sonuçları

Response 4 AT Transform: None

*** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	212.152,36	1	212.152,36			
Linear vs Mean	443,23	4	110,81	4,14	0.0133	
2FI vs Linear	236,23	6	39,37	1,84	0.1622	
Quadratic vs 2FI	188,89	4	47,22	4,29	0.0282	Suggested
Cubic vs Quadratic	34,41	8	4,30	0,11	0.9905	Aliased
Residual	75,79	2	37,89			
Total	213.130,90	25	8.525,24			

"Sequential Model Sum of Squares [Type I]": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	5,174	0,453	0,344	0,136	845,347	
2FI	4,622	0,694	0,476	0,272	712,184	
Quadratic	3,320	0,887	0,730	0,534	456,419	Suggested
Cubic	6,156	0,923	0,071		+	Aliased

Case(s) with leverage of 1.0000: PRESS statistic not defined

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Response 4 AT

These Rows Were Ignored for this Analysis.

3, 5, 11, 16, 22

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	864,973	12	72,081	7,616	0.0007	significant
A-pH	250,267	1	250,267	26,444	0.0002	
B-ÇO	9,943	1	9,943	1,051	0.3256	
C-N	204,276	1	204,276	21,585	0.0006	
D-X0	12,448	1	12,448	1,315	0.2738	
AB	33,834	1	33,834	3,575	0.0830	
AC	5,587	1	5,587	0,590	0.4571	
AD	1,540	1	1,540	0,163	0.6938	

BC	30,023	1	30,023	3,172	0.1002
CD	115,444	1	115,444	12,198	0.0044
A ²	99,638	1	99,638	10,528	0.0070
B ²	48,463	1	48,463	5,121	0.0430
D ²	19,475	1	19,475	2,058	0.1770
Residual	113,567	12	9,464		
Cor Total	978,540	24			

The Model F-value of 7.62 implies the model is significant. There is only a 0.07% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A, C, CD, A², B² are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Std. Dev.	3,076	R-Squared	0,884
Mean	92,120	Adj R-Squared	0,768
C.V. %	3,340	Pred R-Squared	0,611
PRESS	380,659	Adeq Precision	11,157

The "Pred R-Squared" of 0.6110 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.7679.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 11.157 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	94,505	1	1,250	91,781	97,229	
A-pH	-3,603	1	0,701	-5,130	-2,077	1,141
B-ÇO	-0,859	1	0,838	-2,684	0,967	1,287
C-N	-3,206	1	0,690	-4,709	-1,702	1,107
D-X0	0,779	1	0,679	-0,701	2,259	1,060
AB	-1,684	1	0,890	-3,624	0,256	1,173
AC	0,654	1	0,852	-1,201	2,510	1,061
AD	-0,362	1	0,898	-2,319	1,595	1,196
BC	-1,582	1	0,888	-3,518	0,353	1,167
CD	3,058	1	0,876	1,150	4,966	1,160
A ²	-1,997	1	0,616	-3,339	-0,656	1,067
B ²	-1,888	1	0,834	-3,706	-0,070	1,253
D ²	0,936	1	0,653	-0,486	2,358	1,085

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$AT = 94,50492 - 3,60319 * A$$

-0,85871 * B
 -3,20570 * C
 0,77896 * D
 -1,68372 * A * B
 0,65444 * A * C
 -0,36227 * A * D
 -1,58225 * B * C
 3,05836 * C * D
 -1,99740 * A^2
 -1,88789 * B^2
 0,93629 * D^2

Final Equation in Terms of Actual Factors:

AT =
 -2361,620
 703,547 * pH
 3,73409 * ÇO
 -0,60257 * N
 -0,00002 * X0
 -0,42093 * pH * ÇO
 0,06544 * pH * N
 -0,00001 * pH * X0
 -0,00158 * ÇO * N
 0,00000 * N * X0
 -49,93499 * pH^2
 -0,00472 * ÇO^2

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node.

In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

Ek 5. Enfektif Titre (IT) Anova Testi Sonuçları

Response **5** **IT** Transform: None
 *** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	1151,516	1	1151,516			
Linear vs Mean	2,953	4	0,738	1,273	0.3137	
2FI vs Linear	6,250	6	1,042	2,725	0.0573	
Quadratic vs 2FI	4,570	4	1,142	14,610	0.0004	Suggested
Cubic vs Quadratic	0,553	9	0,061	0,269	0.9143	Aliased
Residual	0,229	1	0,229			
Total	1166,072	25	46,643			

"Sequential Model Sum of Squares [Type I]": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0,762	0,203	0,043	-0,339	19,486	
2FI	0,618	0,632	0,370	-0,863	27,111	
Quadratic	0,280	0,946	0,871	0,645	5,170	Suggested
Cubic	0,478	0,984	0,623		+	Aliased

+ Case(s) with leverage of 1.0000: PRESS statistic not defined

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Response **5** **IT**

These Rows Were Ignored for this Analysis.

9, 30, 17, 10, 25

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	13,649	11	1,241	17,800	< 0.0001	significant
A-pH	0,417	1	0,417	5,985	0.0294	
B-ÇO	0,810	1	0,810	11,614	0.0047	
C-N	0,017	1	0,017	0,246	0.6283	
D-X0	0,607	1	0,607	8,702	0.0113	
AB	0,652	1	0,652	9,347	0.0092	
AC	0,884	1	0,884	12,682	0.0035	
BC	0,605	1	0,605	8,682	0.0113	

BD	7,329	1	7,329	105,142	< 0.0001
CD	0,145	1	0,145	2,076	0.1733
A^2	0,542	1	0,542	7,777	0.0154
D^2	3,522	1	3,522	50,525	< 0.0001
Residual	0,906	13	0,070		
Cor Total	14,555	24			

The Model F-value of 17.80 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A, B, D, AB, AC, BC, BD, A², D² are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Std. Dev.	0,264	R-Squared	0,938
Mean	6,787	Adj R-Squared	0,885
C.V. %	3,890	Pred R-Squared	0,766
PRESS	3,403	Adeq Precision	16,400

The "Pred R-Squared" of 0.7662 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.8851.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 16.400 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Factor	Coefficient	df	Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate			Low	High	
Intercept	7,2555	1	0,0895	7,0621	7,4488	
A-pH	-0,1423	1	0,0582	-0,2680	-0,0166	1,0602
B-ÇO	0,2045	1	0,0600	0,0749	0,3341	1,1361
C-N	-0,0301	1	0,0607	-0,1613	0,1011	1,1552
D-X0	0,2224	1	0,0754	0,0595	0,3853	1,2553
AB	0,2288	1	0,0748	0,0671	0,3905	1,1251
AC	0,2693	1	0,0756	0,1059	0,4326	1,1350
BC	-0,2267	1	0,0769	-0,3929	-0,0605	1,1888
BD	0,7755	1	0,0756	0,6121	0,9389	1,2086
CD	0,1072	1	0,0744	-0,0535	0,2680	1,2217
A^2	-0,1440	1	0,0516	-0,2555	-0,0324	1,0189
D^2	-0,7640	1	0,1075	-0,9962	-0,5318	1,2947

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$IT = 7,25547$$

-0,14232	* A
0,20447	* B
-0,03010	* C
0,22241	* D
0,22883	* A * B
0,26926	* A * C
-0,22670	* B * C
0,77553	* B * D
0,10722	* C * D
-0,14400	* A^2
-0,76399	* D^2

Final Equation in Terms of Actual Factors:

IT	=
-112,69229	
42,16237	* pH
-0,44756	* ÇO
-0,18580	* N
0,00001	* X0
0,05721	* pH * ÇO
0,02693	* pH * N
-0,00023	* ÇO * N
0,00000	* ÇO * X0
0,00000	* N * X0
-3,59997	* pH^2
0	* X0^2

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node.

In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

Ek 6. Laktat/glikoz oranı ($Y_{lak/gli}$) Anova Testi Sonuçları

Response 6 $Y_{lak/gli}$ Transform: None

*** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	52,2412	1	52,2412			
Linear vs Mean	1,3188	4	0,3297	2,0904	0.1122	
2FI vs Linear	2,4104	6	0,4017	4,9795	0.0032	
Quadratic vs 2FI	1,0694	4	0,2673	8,6527	0.0008	Suggested
Cubic vs Quadratic	0,2429	11	0,0221	0,4004	0.8965	Aliased
Residual	0,2206	4	0,0551			
Total	57,5033	30	1,9168			

"Sequential Model Sum of Squares [Type I]": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Linear	3,8187	24	0,1591	1,2781	0.6148	
2FI	1,4084	18	0,0782	0,6285	0.7767	
Quadratic	0,3390	14	0,0242	0,1945	0.9603	Suggested
Cubic	0,0961	3	0,0320	0,2573	0.8568	Aliased
Pure Error	0,1245	1	0,1245			

"Lack of Fit Tests": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0,3972	0,2506	0,1307	-0,1385	5,9910	
2FI	0,2840	0,7087	0,5554	0,3957	3,1797	
Quadratic	0,1758	0,9119	0,8297	0,6666	1,7542	Suggested
Cubic	0,2348	0,9581	0,6961		+	Aliased

Case(s) with leverage of 1.0000: PRESS statistic not defined

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Response 6 Ylak/gli

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	4,7696	13	0,3669	11,9202	< 0.0001	significant
A-pH	1,2023	1	1,2023	39,0633	< 0.0001	
B-ÇO	0,0529	1	0,0529	1,7173	0.2085	
C-N	0,0361	1	0,0361	1,1731	0.2948	
D-X0	0,0520	1	0,0520	1,6905	0.2119	
AB	0,2513	1	0,2513	8,1635	0.0114	
AC	0,1263	1	0,1263	4,1032	0.0598	
AD	0,3410	1	0,3410	11,0788	0.0043	
BC	0,5036	1	0,5036	16,3606	0.0009	
BD	0,6505	1	0,6505	21,1360	0.0003	
CD	0,5433	1	0,5433	17,6511	0.0007	
A^2	0,5776	1	0,5776	18,7648	0.0005	
C^2	0,0346	1	0,0346	1,1251	0.3046	
D^2	0,3242	1	0,3242	10,5326	0.0051	
Residual	0,4925	16	0,0308			
Lack of Fit	0,3680	15	0,0245	0,1971	0.9603	not significant
Pure Error	0,1245	1	0,1245			
Cor Total	5,2621	29				

The Model F-value of 11.92 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A, AB, AD, BC, BD, CD, A², D² are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The "Lack of Fit F-value" of 0.20 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 96.03% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

Std. Dev.	0,1754	R-Squared	0,9064
Mean	1,3196	Adj R-Squared	0,8304
C.V. %	13,2948	Pred R-Squared	0,6585
PRESS	1,7970	Adeq Precision	16,8561

The "Pred R-Squared" of 0.6585 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.8304.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 16.856 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	1,3579	1	0,0613	1,2279	1,4880	
A-pH	0,2244	1	0,0359	0,1483	0,3004	1,0047
B-ÇO	-0,0471	1	0,0359	-0,1232	0,0291	1,0060
C-N	0,0390	1	0,0360	-0,0373	0,1153	1,0098
D-X0	0,0458	1	0,0352	-0,0289	0,1204	1,0170
AB	0,1260	1	0,0441	0,0325	0,2196	1,0116
AC	-0,0891	1	0,0440	-0,1824	0,0041	1,0067
AD	0,1419	1	0,0426	0,0515	0,2323	1,0229
BC	-0,1779	1	0,0440	-0,2711	-0,0846	1,0051
BD	0,1964	1	0,0427	0,1058	0,2870	1,0245
CD	-0,1782	1	0,0424	-0,2681	-0,0883	1,0298
A^2	-0,1436	1	0,0332	-0,2139	-0,0733	1,0283
C^2	-0,0353	1	0,0332	-0,1057	0,0352	1,0336
D^2	0,1110	1	0,0342	0,0385	0,1835	1,0475

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{lak/gli}} = & 1,3579 \\
 & 0,2244 * A \\
 & -0,0471 * B \\
 & 0,0390 * C \\
 & 0,0458 * D \\
 & 0,1260 * A * B \\
 & -0,08914026 * A * C \\
 & 0,1419233 * A * D \\
 & -0,17785785 * B * C \\
 & 0,19639774 * B * D \\
 & -0,17819618 * C * D \\
 & -0,14360181 * A^2 \\
 & -0,03525402 * C^2 \\
 & 0,1109788 * D^2
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{lak/gli}} = & -178,813139 \\
 & 50,5336667 * \text{pH} \\
 & -0,21505185 * \text{ÇO} \\
 & 0,08751245 * \text{N} \\
 & -2,6628\text{E-}05 * \text{X0} \\
 & 0,03150989 * \text{pH} * \text{ÇO} \\
 & -0,00891403 * \text{pH} * \text{N}
 \end{aligned}$$

3,5481E-06	* pH * X0
-0,00017786	* ÇO * N
4,9099E-08	* ÇO * X0
-1,782E-08	* N * X0
-3,59004519	* pH^2
-1,4102E-05	* N^2
0	* X0^2

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node.

In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

Ek 7. Amonyak (NH₃)Tüketim Hızı Anova Test Sonuçları

Response 7 NH₃ Transform: None

*** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	9,925E-06	1	9,92507E-06			
Linear vs Mean	2,813E-07	4	7,03288E-08	5,1527	0.0044	
2FI vs Linear	8,963E-08	6	1,49379E-08	1,1346	0.3868	
Quadratic vs 2FI	1,446E-07	4	3,61612E-08	6,5741	0.0048	Suggested
Cubic vs Quadratic	5,663E-08	10	5,66340E-09	1,2085	0.5350	Aliased
Residual	9,372E-09	2	4,68618E-09			
Total	1,051E-05	27	3,89136E-07			

"Sequential Model Sum of Squares [Type I]": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0,0001	0,4837	0,3898	0,2430	4,403E-07	
2FI	0,0001	0,6378	0,4114	0,0689	5,415E-07	
Quadratic	0,0001	0,8865	0,7541	0,4682	3,093E-07	Suggested
Cubic	0,0001	0,9839	0,7905			+ Aliased

Case(s) with leverage of 1.0000: PRESS statistic not defined

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Response 7 NH₃

These Rows Were Ignored for this Analysis.

9, 16, 22

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	5,1426E-07	11	4,6751E-08	10,4154	< 0.0001	significant
A-pH	2,3963E-08	1	2,3963E-08	5,3386	0.0355	
B-ÇO	8,2593E-08	1	8,2593E-08	18,4003	0.0006	
C-N	9,3853E-08	1	9,3853E-08	20,9089	0.0004	
D-X0	2,2114E-08	1	2,2114E-08	4,9266	0.0423	
AB	2,7225E-09	1	2,7225E-09	0,6065	0.4482	
AC	9,7092E-09	1	9,7092E-09	2,1630	0.1620	
BC	1,7395E-08	1	1,7395E-08	3,8752	0.0678	

BD	7,9887E-08	1	7,9887E-08	17,7974	0.0007
B^2	7,1051E-08	1	7,1051E-08	15,8289	0.0012
C^2	6,3148E-08	1	6,3148E-08	14,0682	0.0019
D^2	6,9344E-08	1	6,9344E-08	15,4486	0.0013
Residual	6,733E-08	15	4,4887E-09		
Cor Total	5,8159E-07	26			

The Model F-value of 10.42 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A, B, C, D, BD, B², C², D² are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Std. Dev.	6,6998E-05	R-Squared	0,8842
Mean	0,0006	Adj R-Squared	0,7993
C.V. %	11,0503	Pred R-Squared	0,6216
PRESS	2,2006E-07	Adeq Precision	10,4481

The "Pred R-Squared" of 0.6216 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.7993.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 10.448 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	0,00073649	1	2,6834E-05	0,000679299	0,000793691	
A-pH	-3,2801E-05	1	1,4196E-05	-6,306E-05	-2,5424E-06	1,0310
B-ÇO	6,147E-05	1	1,433E-05	3,09259E-05	9,20137E-05	1,0505
C-N	-6,5283E-05	1	1,4277E-05	-9,5714E-05	-3,4853E-05	1,0428
D-XO	3,1101E-05	1	1,4012E-05	1,23513E-06	6,09676E-05	1,0382
AB	-1,3775E-05	1	1,7687E-05	-5,1475E-05	2,39248E-05	1,0429
AC	-2,5939E-05	1	1,7637E-05	-6,353E-05	1,1653E-05	1,0369
BC	3,4928E-05	1	1,7743E-05	-2,8902E-06	7,27456E-05	1,0494
BD	7,316E-05	1	1,7342E-05	3,61968E-05	0,000110124	1,0607
B^2	-5,2847E-05	1	1,3283E-05	-8,1158E-05	-2,4535E-05	1,0773
C^2	-4,9668E-05	1	1,3242E-05	-7,7892E-05	-2,1443E-05	1,0707
D^2	-5,4115E-05	1	1,3768E-05	-8,3461E-05	-2,4769E-05	1,0988

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\text{NH}_3 = 0,00073649$$

-3,2801E-05	* A
6,147E-05	* B
-6,5283E-05	* C
3,1101E-05	* D
-1,3775E-05	* A * B
-2,5939E-05	* A * C
3,4928E-05	* B * C
7,316E-05	* B * D
-5,2847E-05	* B^2
-4,9668E-05	* C^2
-5,4115E-05	* D^2

Final Equation in Terms of Actual Factors:

NH ₃	=
-0,00363186	
0,00052696	* pH
2,4605E-05	* ÇO
2,3311E-05	* N
5,9387E-10	* X0
-3,4437E-06	* pH * ÇO
-2,5939E-06	* pH * N
3,4928E-08	* ÇO * N
1,829E-11	* ÇO * X0
-1,3212E-07	* ÇO^2
-1,9867E-08	* N^2
0	* X0^2

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node.
In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

Ek 8. Toplam Protein Miktarı (TP) Anova Testi Sonuçları

Response **8** **Protein** Transform: None

*** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	59273790,0	1	59273790,04			
Linear vs Mean	1794328,4	4	448582,10	3,6478	0.0192	
2FI vs Linear	2042206,2	6	340367,69	7,3597	0.0005	Suggested
Quadratic vs 2FI	223849,7	4	55962,43	1,2937	0.3229	
Cubic vs Quadratic	334614,9	10	33461,49	0,4408	0.8571	Aliased
Residual	227737,8	3	75912,60			
Total	63896527,0	28	2282018,82			

"Sequential Model Sum of Squares [Type I]": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	350,68	0,3882	0,2817	0,0739	4281326,56	
2FI	215,05	0,8299	0,7299	0,5901	1895069,33	Suggested
Quadratic	207,99	0,8784	0,7473	0,4794	2406425,65	
Cubic	275,52	0,9507	0,5566			+ Aliased

Case(s) with leverage of 1.0000: PRESS statistic not defined

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Response **8** **Protein**

These Rows Were Ignored for this Analysis.

26, 25

ANOVA for Response Surface 2FI Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	3836534,55	10	383653,46	8,2957	< 0.0001	significant
A-pH	34,01	1	34,01	0,0007	0.9787	
B-ÇO	198909,44	1	198909,44	4,3010	0.0536	
C-N	1407554,08	1	1407554,08	30,4354	< 0.0001	
D-X0	504302,18	1	504302,18	10,9045	0.0042	
AB	305561,50	1	305561,50	6,6071	0.0199	
AC	40650,88	1	40650,88	0,8790	0.3616	
AD	42566,35	1	42566,35	0,9204	0.3508	

BC	253176,40	1	253176,40	5,4744	0.0318
BD	357951,47	1	357951,47	7,7400	0.0128
CD	1056206,06	1	1056206,06	22,8383	0.0002
Residual	786202,41	17	46247,20		
Cor Total	4622736,96	27			

The Model F-value of 8.30 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case C, D, AB, BC, BD, CD are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Std. Dev.	215,05	R-Squared	0,830
Mean	1454,96	Adj R-Squared	0,730
C.V. %	14,78	Pred R-Squared	0,590
PRESS	1895069,33	Adeq Precision	12,079

The "Pred R-Squared" of 0.5901 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.7299.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 12.079 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Factor	Coefficient	df	Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate			Low	High	
Intercept	1441,85	1	40,85	1355,65	1528,05	
A-pH	-1,19	1	43,94	-93,90	91,51	1,0019
B-ÇO	91,19	1	43,97	-1,58	183,96	1,0034
C-N	-267,69	1	48,52	-370,06	-165,32	1,0109
D-X0	-142,34	1	43,11	-233,29	-51,40	1,0137
AB	-138,54	1	53,90	-252,25	-24,83	1,0050
AC	-50,53	1	53,90	-164,24	63,18	1,0050
AD	-50,12	1	52,24	-160,33	60,10	1,0218
BC	126,07	1	53,88	12,39	239,75	1,0045
BD	145,28	1	52,22	35,10	255,45	1,0187
CD	247,31	1	51,75	138,13	356,50	1,0199

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\text{Protein} = 1441,84902 - 1,19148827 * A$$

91,190392 * B
 -267,689221 * C
 -142,341671 * D
 -138,537967 * A * B
 -50,5301189 * A * C
 -50,1168955 * A * D
 126,072007 * B * C
 145,277702 * B * D
 247,313276 * C * D

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Protein =
 -16593,7755
 3362,83072 * pH
 207,090297 * ÇO
 11,8533358 * N
 0,0014218 * XO
 -34,6344918 * pH * ÇO
 -5,05301189 * pH * N
 -0,00125292 * pH * XO
 0,12607201 * ÇO * N
 3,6319E-05 * ÇO * XO
 2,4731E-05 * N * XO

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node.
 In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

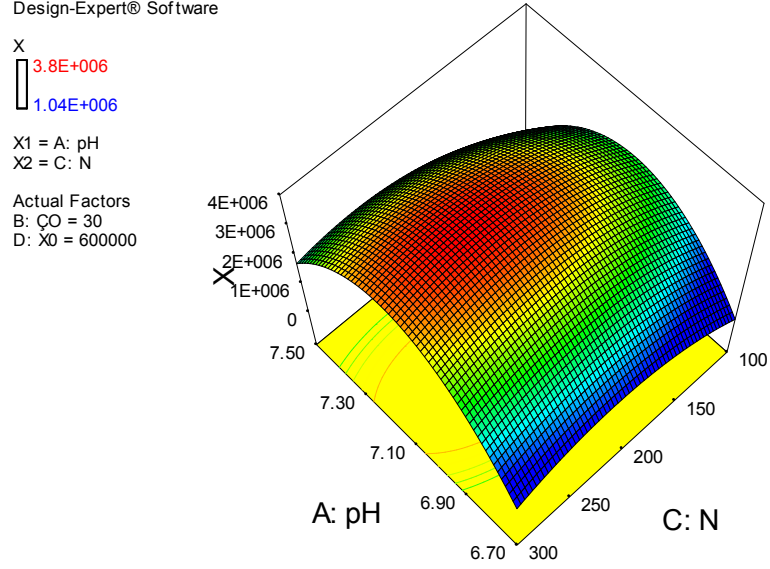
- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

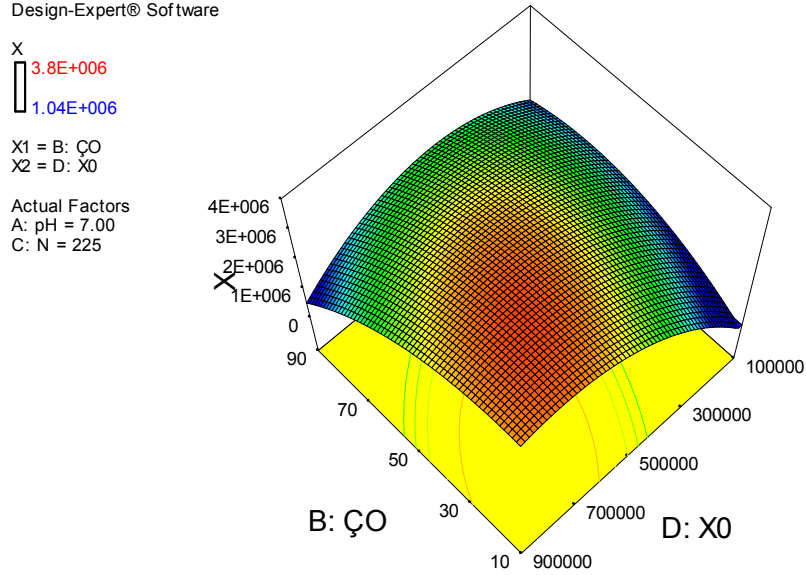
Ek 9 : ÇALIŞMA KOŞULLARININ ÇOKLU ETKİLERİ

Çalışma koşullarının sistem cevapları üzerindeki etkileri Design Expert 7.0 (Deneme sürümü) programı tarafından üretilmiş 3 boyutlu grafiklerle sunulmuştur.

Ek 9.1. Son Hücre Sayısı (X) Üzerindeki Etkiler

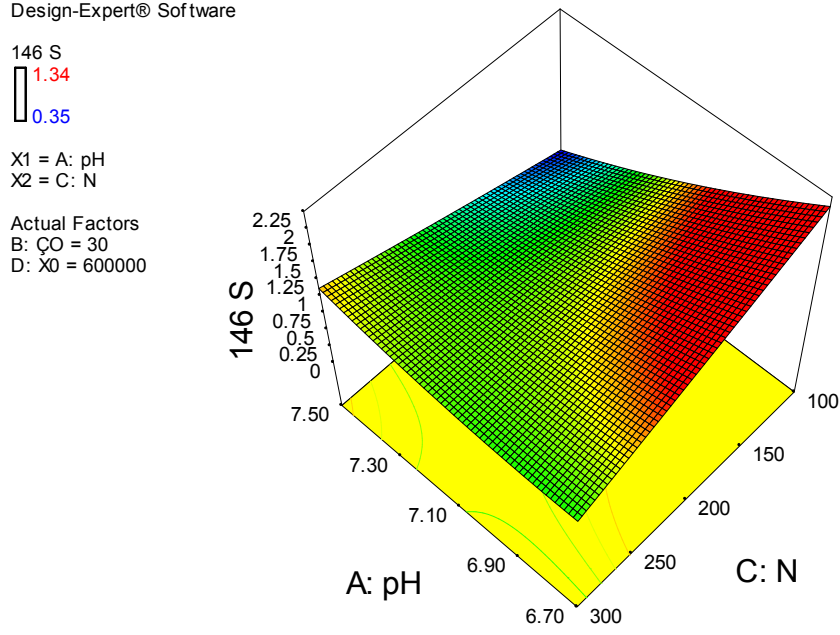


Şekil Ek-9.1. Son hücre sayısının (X), pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

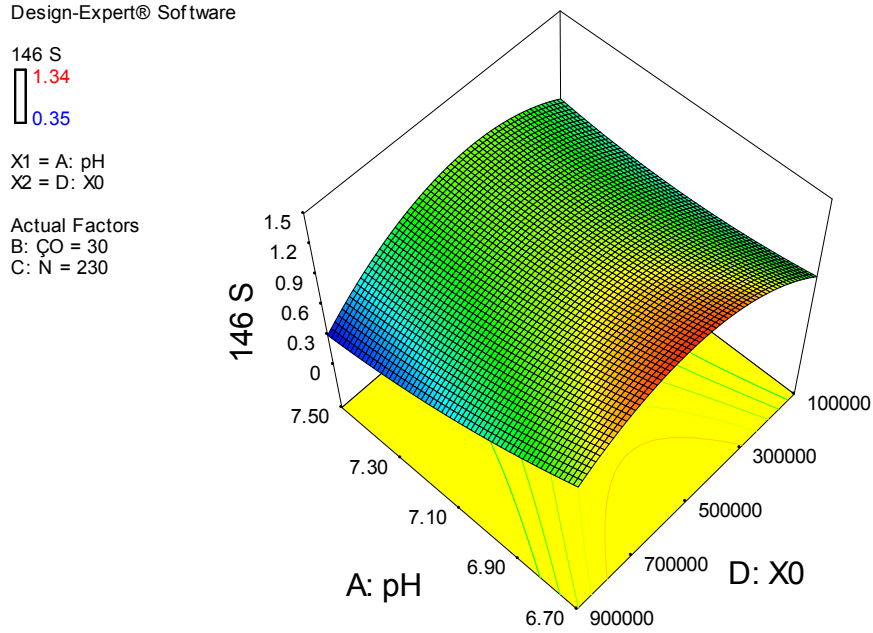


Şekil Ek-9.2. Son hücre sayısının (X), çözülmüş oksijen (ÇO) ve başlangıç hücre sayısına (X₀) göre değişimi

Ek 9.2. 146S Partikül Miktarı Üzerindeki Etkiler

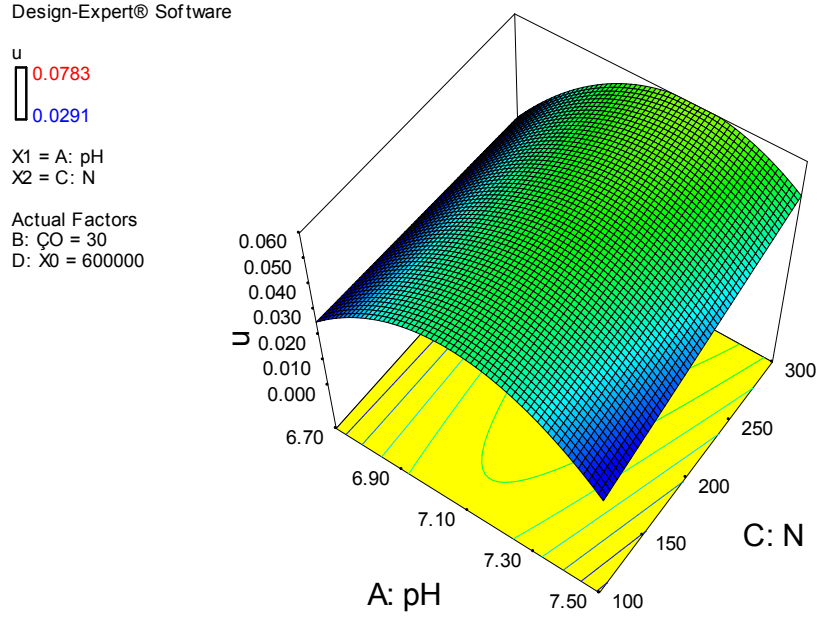


Şekil Ek-9.3. 146S partikül miktarının, pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi



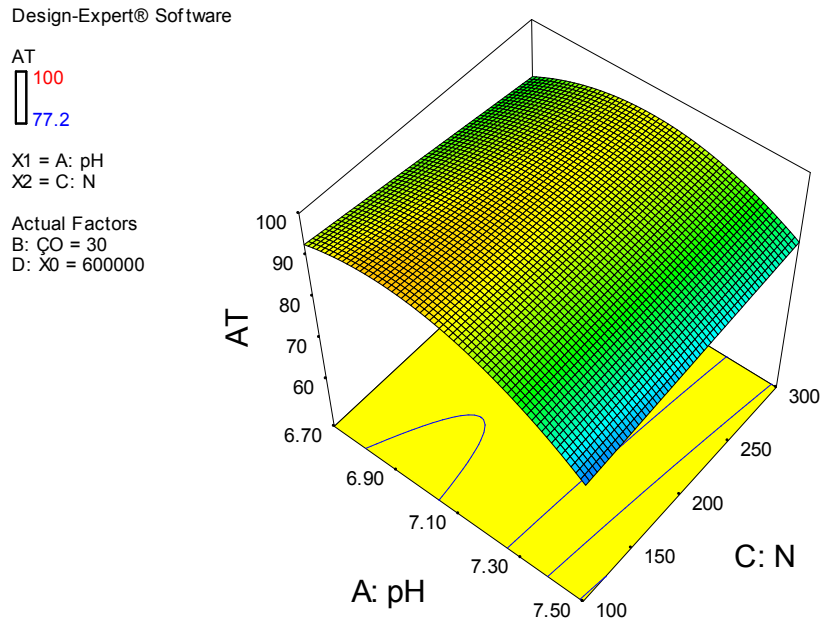
Şekil Ek-9.4. 146S partikül miktarının, pH ve başlangıç hücre sayısına (X_0) göre değişimi

Ek 9.3. Özgöl Üreme Hızı (μ) Üzerindeki Etkiler



Şekil Ek-9.5. Özgöl üreme hızının (μ), pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

Ek 9.4. Antijenik Titre (AT) Üzerindeki Etkiler



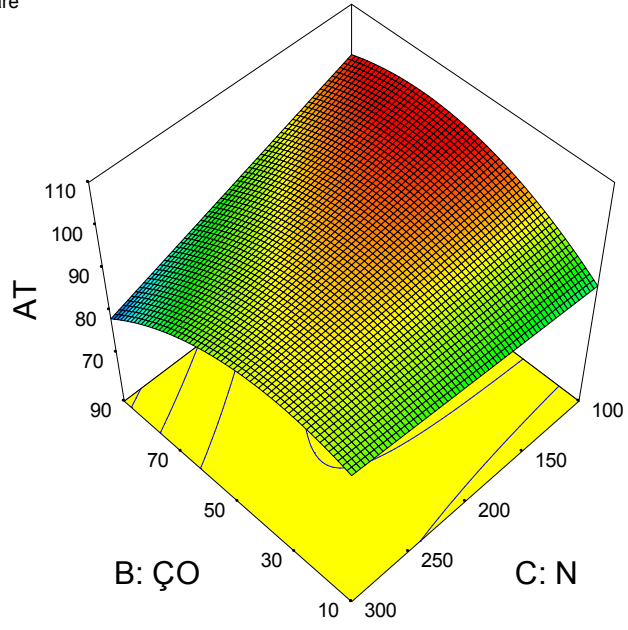
Şekil Ek-9.6. Antijenik titrenin (AT), pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

Design-Expert® Software

AT
100
77.2

X1 = B: ÇO
X2 = C: N

Actual Factors
A: pH = 7.00
D: X0 = 600000



Şekil Ek-9.7. Antijenik titrenin (AT), çözülmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

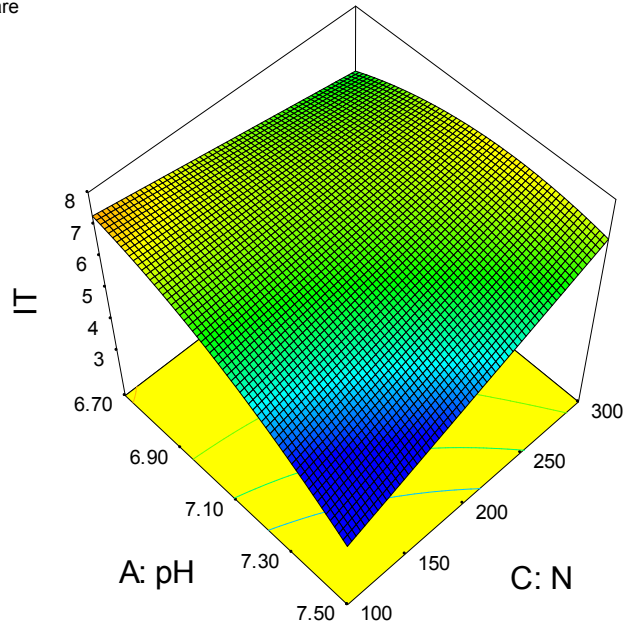
Ek 9.5. Enfektif Titre (IT) Üzerindeki Etkiler

Design-Expert® Software

IT
7.82
4.86

X1 = A: pH
X2 = C: N

Actual Factors
B: ÇO = 30
D: X0 = 600000



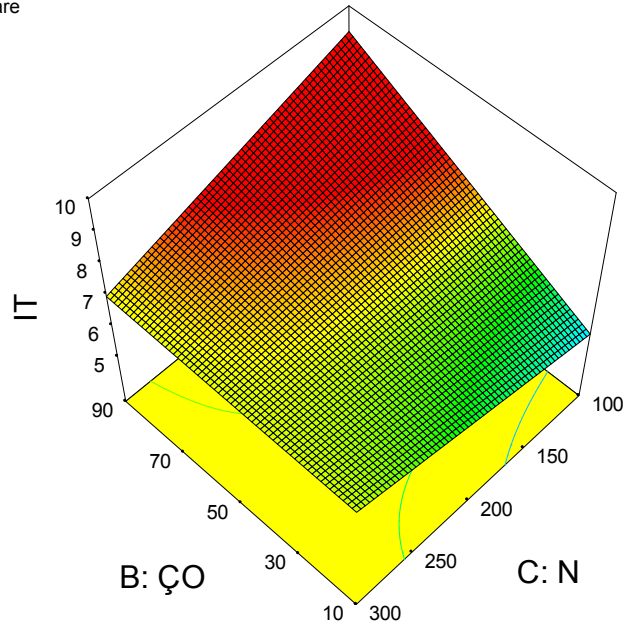
Şekil Ek-9.8. Enfektif titrenin (IT), pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

Design-Expert® Software

IT
7.82
4.86

X1 = B: ÇO
X2 = C: N

Actual Factors
A: pH = 7.00
D: X0 = 600000



Şekil Ek-9.9. Enfektif titrenin (IT), çözülmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

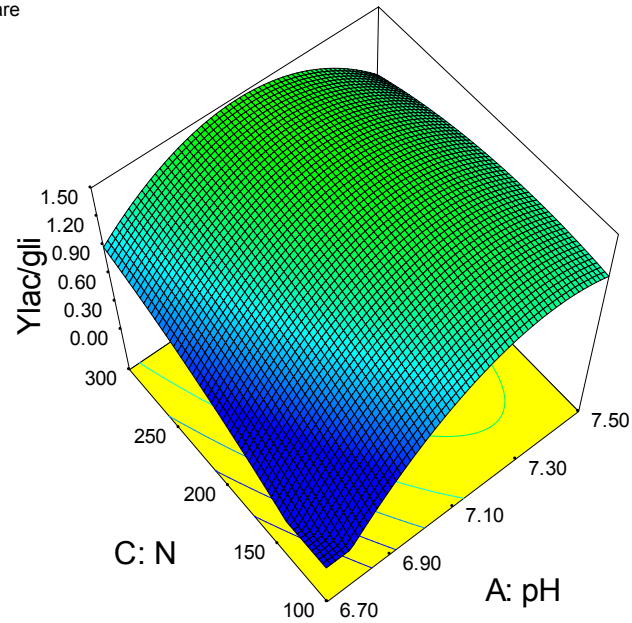
Ek 9.6. $Y_{lak/gli}$ Üzerindeki Etkiler

Design-Expert® Software

$Y_{lak/gli}$
2.41685
0.457117

X1 = A: pH
X2 = C: N

Actual Factors
B: ÇO = 30
D: X0 = 600000



Şekil Ek-9.10. $Y_{lak/gli}$ oranının pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

Design-Expert® Software

Y_{lac/gli}

2.41685
0.457117

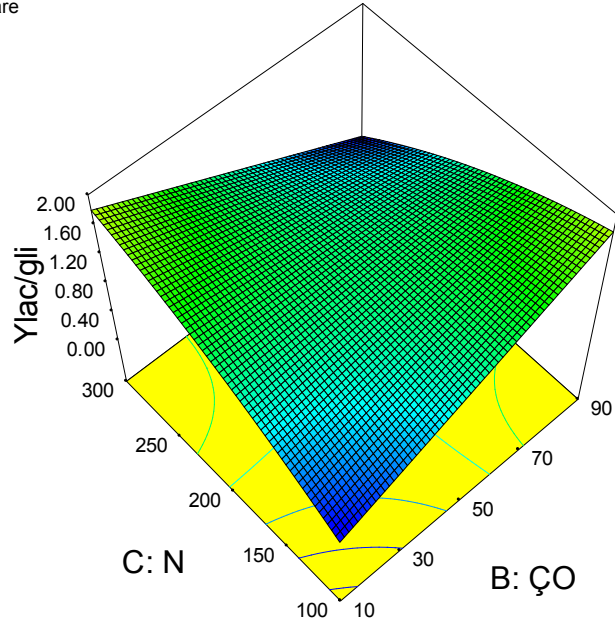
X1 = B: ÇO

X2 = C: N

Actual Factors

A: pH = 7.00

D: X0 = 600000



Şekil Ek-9.11. Y_{lac/gli} oranının çözünmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

Ek 9.7. Amonyak (NH₃) oluşum Hızı Üzerindeki Etkiler

Design-Expert® Software

NH₃

0.000845
0.00029

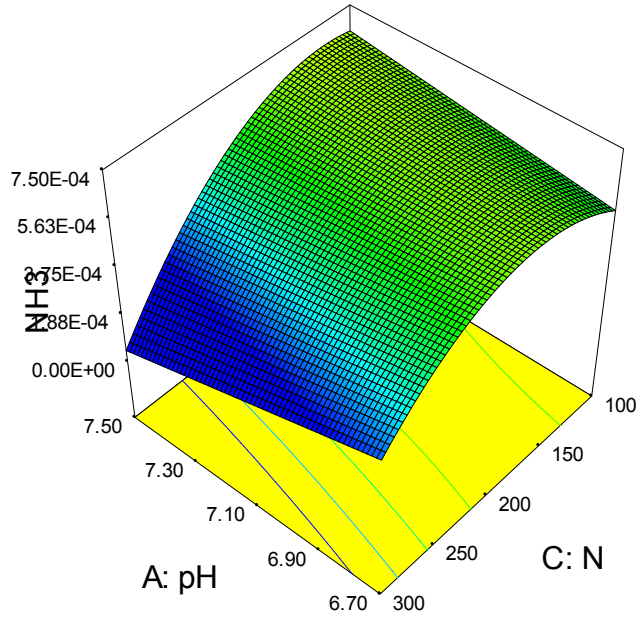
X1 = A: pH

X2 = C: N

Actual Factors

B: ÇO = 30

D: X0 = 600000



Şekil Ek-9.12. Amonyak oluşum hızının (görünen hız) pH ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

Design-Expert® Software

NH₃

0.000845

0.00029

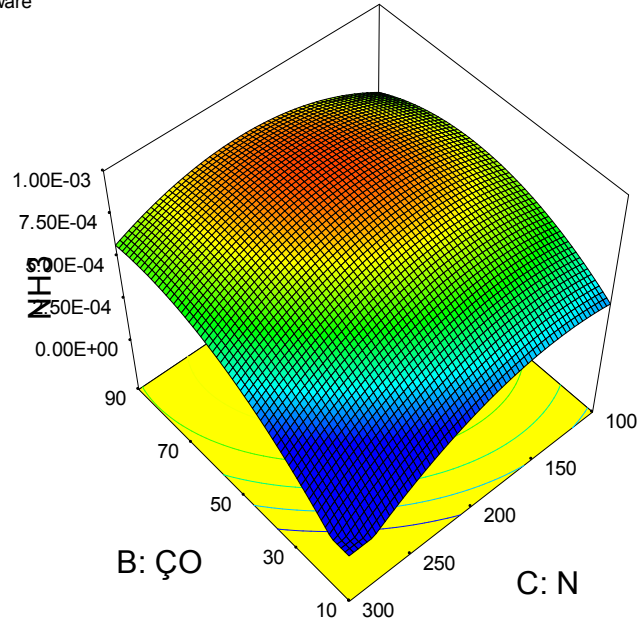
X1 = B: ÇO

X2 = C: N

Actual Factors

A: pH = 7.00

D: X0 = 600000



Şekil Ek-9.13. Amonyak oluşum hızının çözünmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (N) göre değişimi

Ek 9.8. Toplam Protein (TP) Hızı Üzerindeki Etkiler

Design-Expert® Software

Protein

2602

910

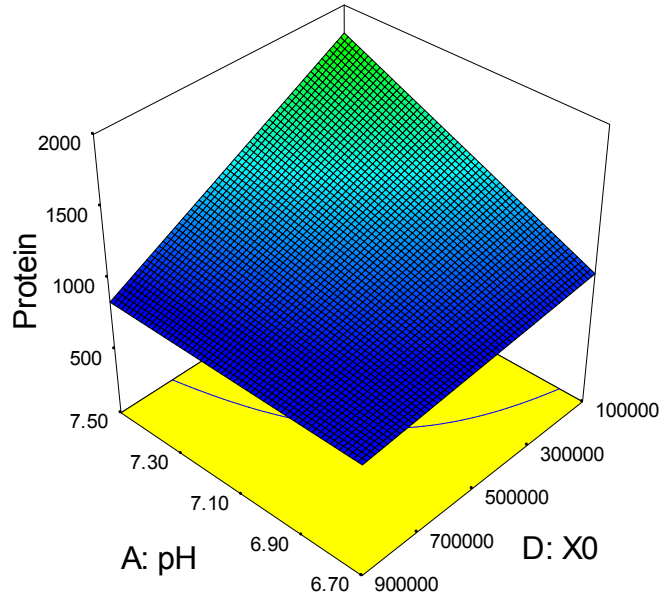
X1 = A: pH

X2 = D: X0

Actual Factors

B: ÇO = 30

C: N = 230



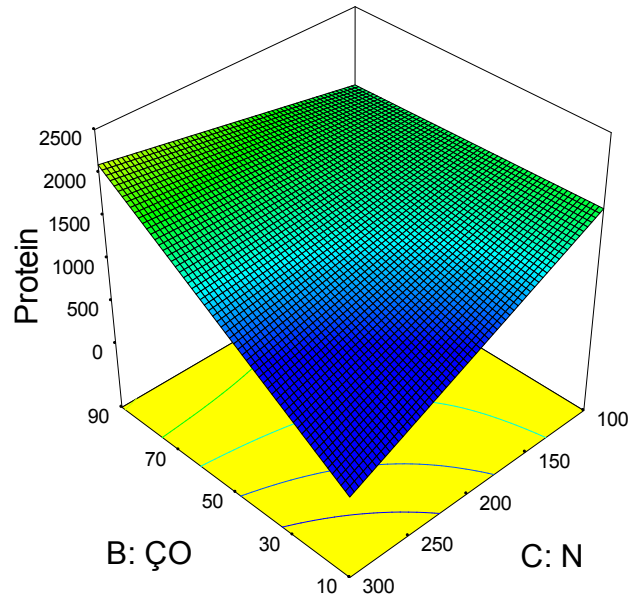
Şekil Ek-9.14. Toplam protein (TP) miktarına pH başlangıç hücre sayısının (X₀) göre değişimi

Design-Expert® Software

Protein
2602
910

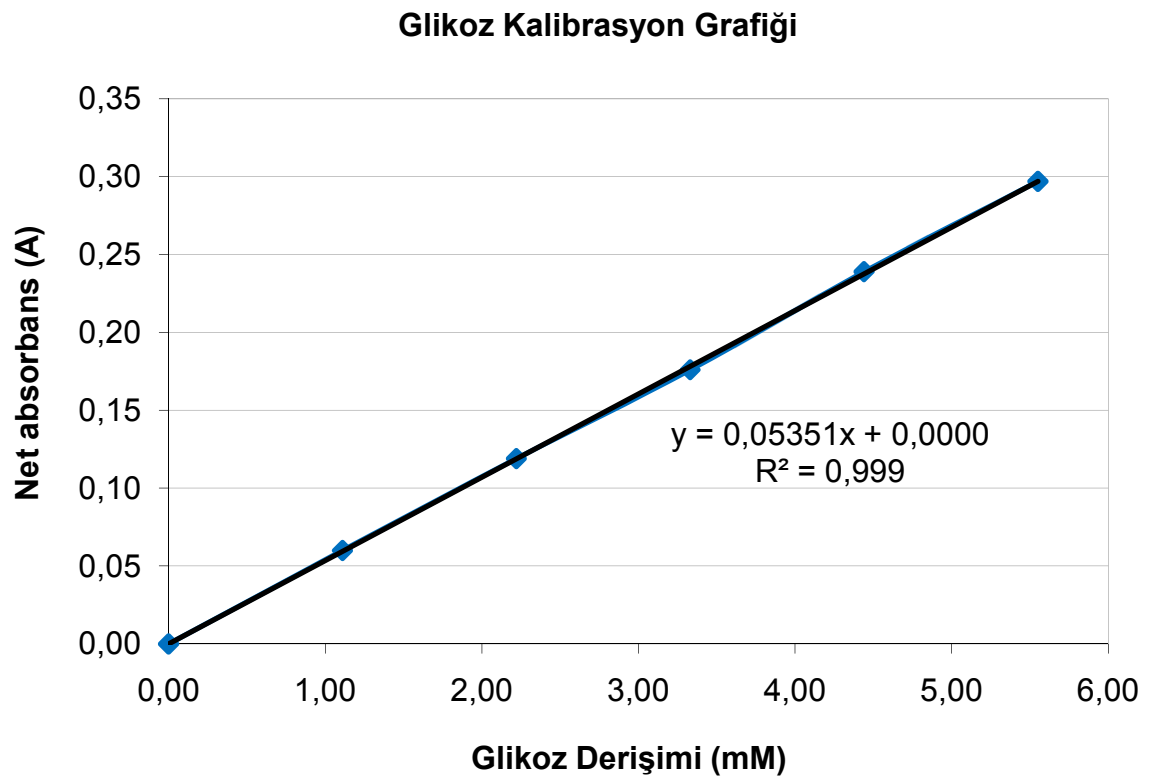
X1 = B: ÇO
X2 = C: N

Actual Factors
A: pH = 7.00
D: X0 = 600000

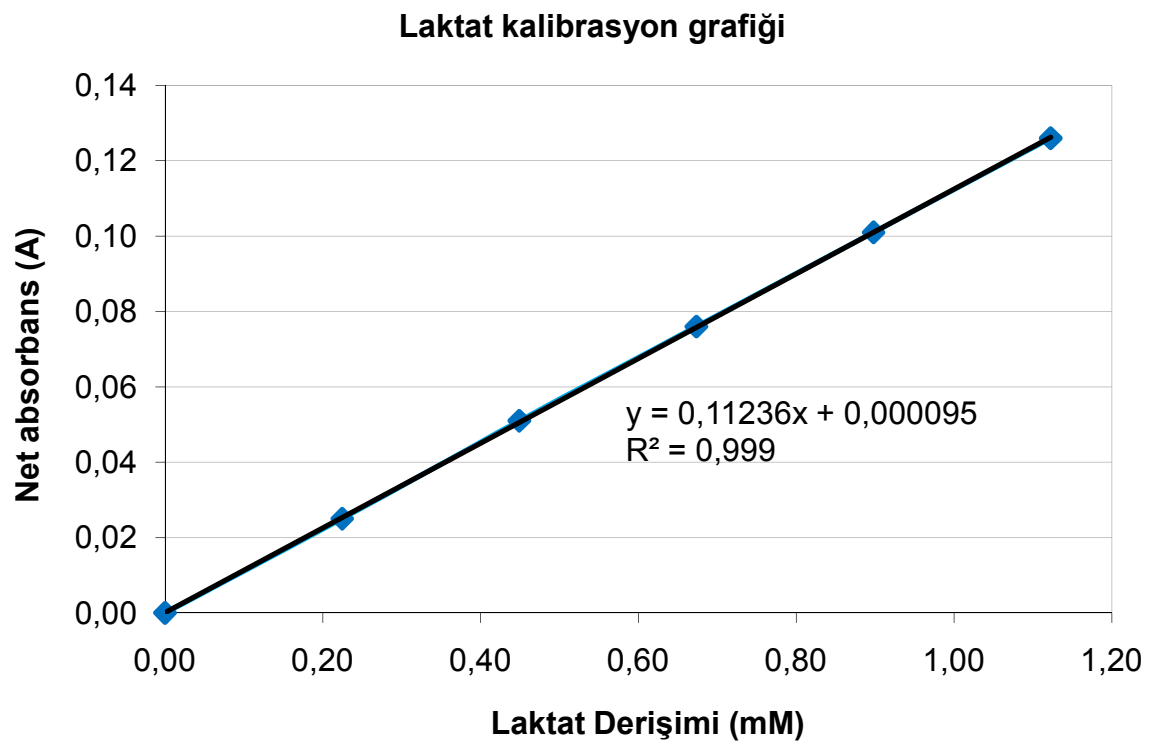


Şekil Ek-9.15. Toplam protein (TP) miktarının çözülmüş oksijen (ÇO) ve karıştırma hızına (X_0) göre değişimi

Ek 10 : Glikoz ve Laktat Kalibrasyon Grafikleri

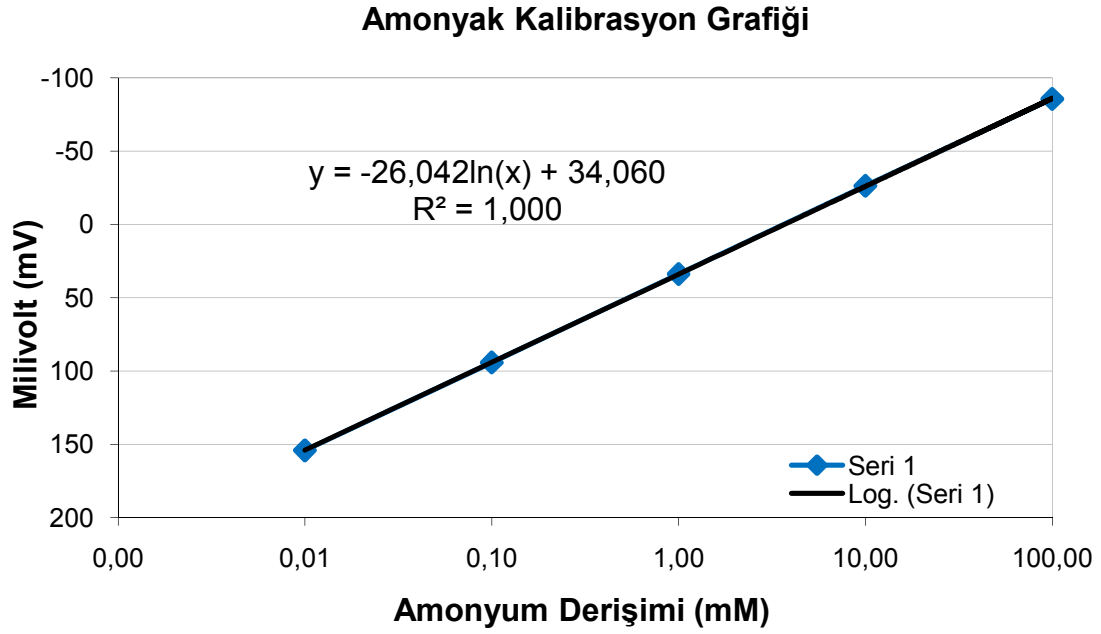


şekil Ek 10.1. Glikoz kalibrasyon grafiği



şekil Ek 10.2. Laktat kalibrasyon grafiği

EK11. Amonyak (NH₃) Kalibrasyon Grafiği



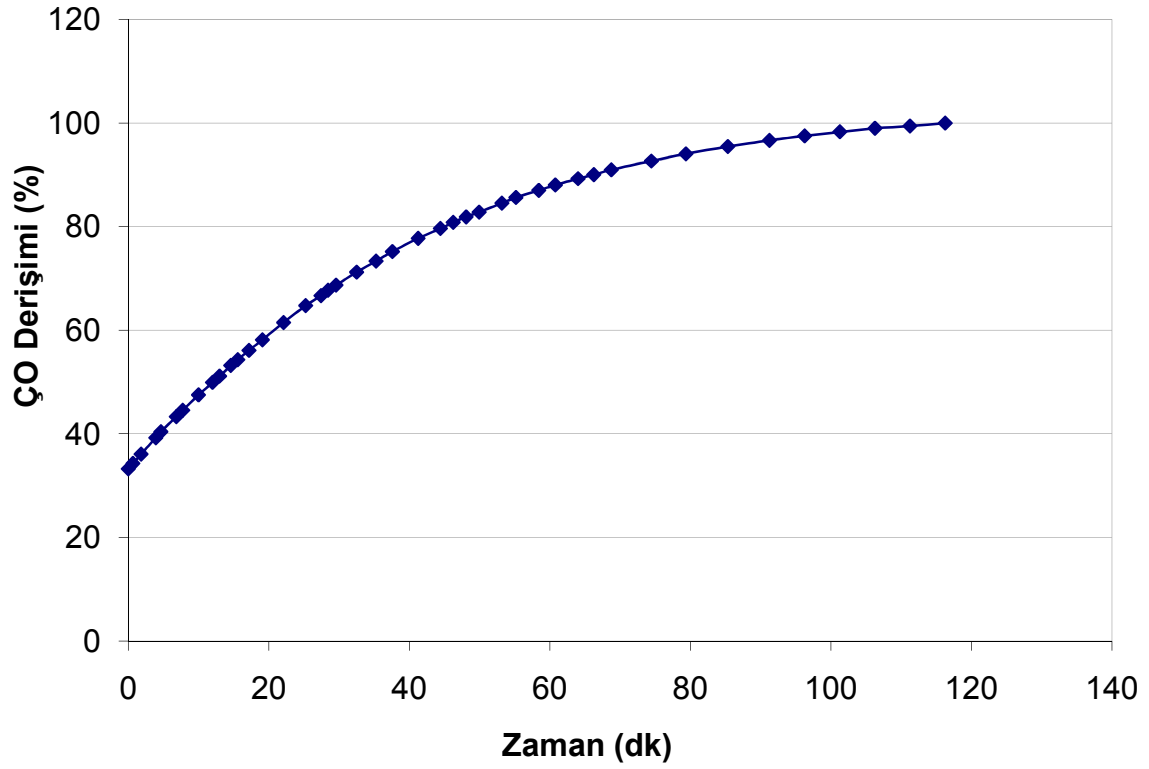
Şekil Ek-11.1. Amonyak kalibrasyon grafiği

EK 12: k_La çalışmaları

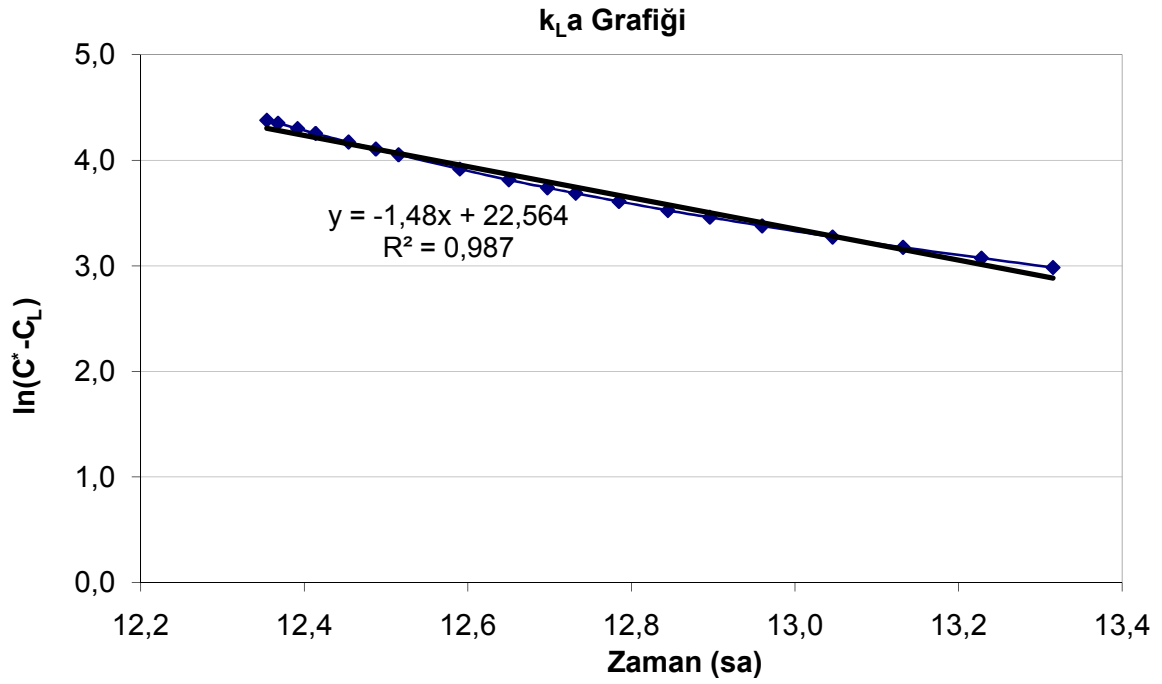
Çizelge Ek 12.1. 6M Besiyeri ile yapılan k_La çalışmaları örneği

S.No	Ölçülen % DO	(C*-C _L) 100- %DO	(C*-CL) 100-DO (mg/L)	Gerçek t (dk)	Başlangıç DK	Başlangıç Saat	ln(C*-C _L)
1	20,210	79,790	5,825	780,400	1,333	12,354	4,379398
2	22,440	77,560	5,662	781,233	2,166	12,368	4,351052
4	26,240	73,760	5,384	782,650	3,583	12,392	4,300817
5	29,610	70,390	5,138	783,983	4,916	12,414	4,254051
6	35,170	64,830	4,733	786,400	7,333	12,454	4,171768
7	39,300	60,700	4,431	788,400	9,333	12,488	4,105944
8	42,430	57,570	4,203	790,067	11,000	12,516	4,053002
9	49,760	50,240	3,668	794,567	15,500	12,591	3,916812
10	54,660	45,340	3,310	798,150	19,083	12,650	3,81419
11	57,890	42,110	3,074	800,983	21,916	12,698	3,740285
12	60,060	39,940	2,916	803,067	24,000	12,732	3,687378
13	63,010	36,990	2,700	806,233	27,166	12,785	3,610648
14	66,030	33,970	2,480	809,817	30,750	12,845	3,525478
15	68,190	31,810	2,322	812,900	33,833	12,896	3,459781
16	70,650	29,350	2,143	816,733	37,666	12,960	3,379293
17	73,580	26,420	1,929	821,900	42,833	13,046	3,274121
18	76,060	23,940	1,748	827,067	48,000	13,132	3,175551
19	78,360	21,640	1,580	832,817	53,750	13,228	3,074543
20	80,220	19,780	1,444	838,067	59,000	13,316	2,984671

Çözünmüş Oksijen (ÇO) Derişimi-Zaman Grafiği



Şekil Ek-12.1.6M Besiyeri; 0.03 l/dk havalandırma ve N=230 d/dk OAH Grafiği



Şekil Ek 12.2. 6M Besiyeri; 0.03 L/dk havalandırma ve N=230 d/dk ln(C* - C_L)-zaman grafiği

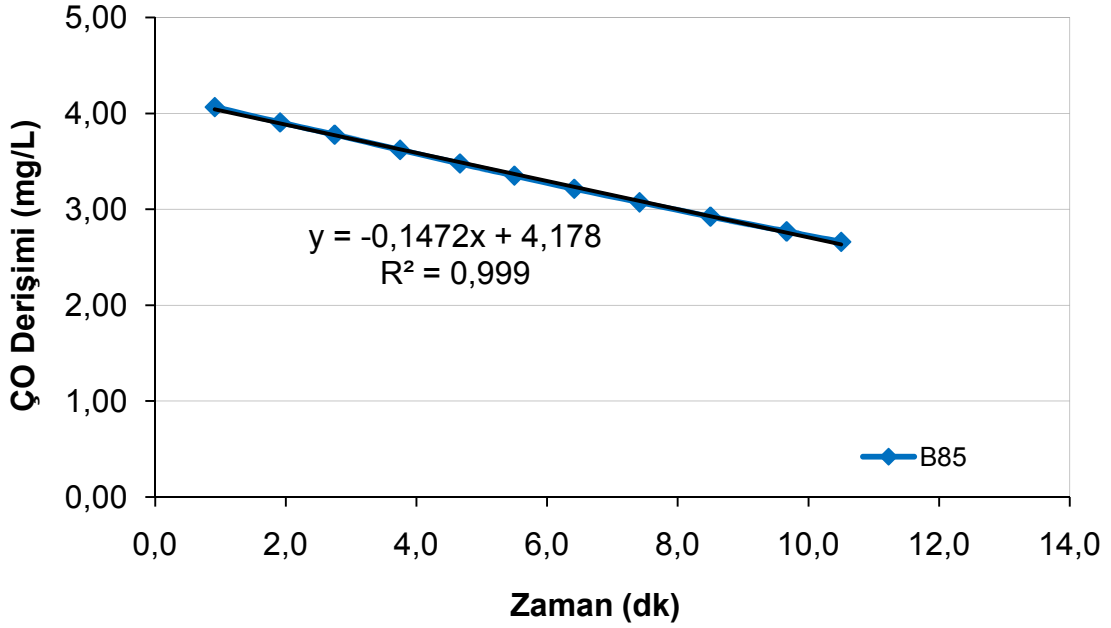
k_La = 1.48 sa⁻¹ olarak hesaplanır.

Ek 13. Özgül Oksijen Tüketim Hızı (qO₂) Örnek Hesap

Çizelge Ek 13.1. Çözünmüş oksijen-zaman çizelgesi

Gerçek saat	ÇO %	ÇO (mg/L)	Gerçek zaman (dk)	Fark zamanı (dk)
35,60	64,00	4,48	2135,97	0,00
35,61	62,07	4,34	2136,88	0,92
35,63	59,64	4,17	2137,88	1,92
35,65	57,68	4,04	2138,72	2,75
35,66	55,26	3,87	2139,72	3,75
35,68	53,10	3,72	2140,63	4,67
35,69	51,15	3,58	2141,47	5,50
35,71	49,06	3,43	2142,38	6,42
35,72	46,91	3,28	2143,38	7,42
35,74	44,62	3,12	2144,47	8,50
35,76	42,27	2,96	2145,63	9,67
35,77	40,61	2,84	2146,47	10,50
35,79	38,41	2,69	2147,63	11,67
35,80	37,42	2,62	2148,13	12,17

Çözünmüş Oksijen (ÇO)-Zaman Grafiği (B85)



Şekil Ek 13.1. Zamana bağlı olarak çözünmüş oksijen (ÇO, mg/L) derişimi grafiği

Şekil Ek 13.1.'de B85'te yapılan qO₂ çalışmaları için zamana göre çözünmüş oksijen derişiminin değişim grafiği verilmiştir. Grafik B85 deneyinin 35.5,36.2. saatlerine aittir. Hücre sayısı $X=2.215 \cdot 10^6$ hücre/mL olarak sayılmıştır. Saf suda; 1 atm basınç ve 37 °C'de 6.9 mg O₂/L civarında doygunluğa (C*) ulaşır. Besiyerinde

37 °C'de çözünen oksijen miktarının yaklaşık saf suya göre %95 olduğu tespit edilmişti. Buna göre besiyerinde maksimum 6.55 mg/L oksijen çözüneceği kabul edilerek hesaplar yapılmıştır.

$-dC_L/dt = OTH = 0.1472 \text{ mg O}_2/\text{dk}$ grafiğin eğiminden alınırsa,.

$X = 2.215 \cdot 10^6 \text{ hücre/mL}$

$qO_2 = OTH / X$

$qO_2 = 0.1472 / 2.215 \text{ (mg O}_2/\text{L.dk)} / (10^6 \text{ hücre/mL})$

$qO_2 = 0.125 \mu\text{mol O}_2 \cdot 10^{-6} \text{ hücre}^{-1} \cdot \text{sa}^{-1}$ olarak hesaplanır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Taşkın DENİZ

Doğum Yeri : Ardahan

Doğum Yılı : 1973

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1987 – 1991, Ziraat Meslek Lisesi, Beydere-Manisa

Lisans : 1991 – 1995, DEÜ Müh. Fak., Makine Mühendisliği Bölümü

: 2003-2007 AÜ AÖF İşletme Fakültesi, İşletme Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce (iyi düzeyde)

İş Tecrübesi : 1998 - devam Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

: 1995-1997 Tarım İl Müdürlüğü, Yozgat