

Hücre Kültür Teknikleri

Ders 7: Ölçek Büyütme

Küçük Ölçekte Kültür

- Bir çok doku kültürü deneylerde nispeten düşük sayıda hücreye ihtiyaç duyulduğu için küçük ölçekte gerçekleştirilir
- Bu ölçekte 25cm^2 ile 225cm^2 arasında değişen yüzey alanına sahip T flasklar kullanılır
- 225 cm^2 yüzey alanına sahip flaskların ulaşabileceği maksimumu sayı **ml'de 1×10^7 'dir**



What are small cultures?

- Experiments require **multiple samples**
 - To observe **cell growth** and to perform **substrate or product assays**
 - Culture volumes – **100 ml**
 - Conducted in **T-flasks** or **spinner flasks** in Incubator

Culture Vessels

• Flasks

- Plastic flasks are available with a range of growing areas, a variety of shapes, with several different neck designs
- Flasks surfaces are specially treated for growing anchorage-dependent cells



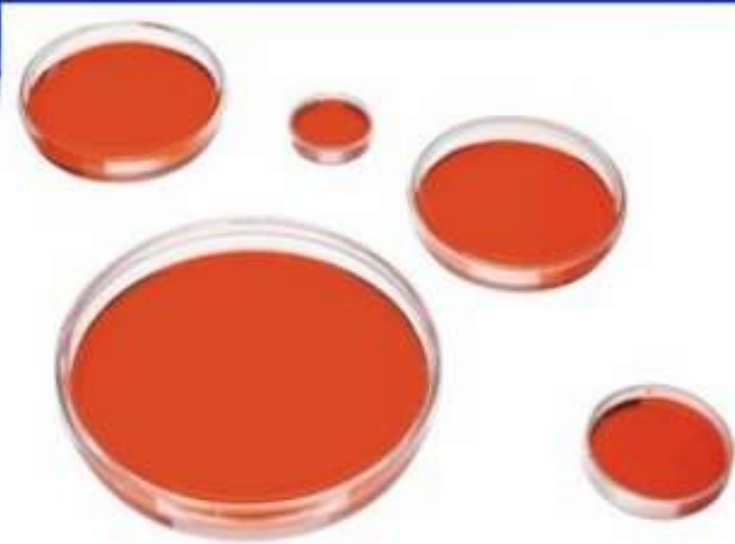
Description	Growth area (cm ²)	Recommended working volume (mL)	Cell yield*
T-25	25	5 – 10	2.5×10^6
T-75	75	15 – 25	7.5×10^6
T-150	150	30 - 50	15×10^6
T-175	175	35 - 60	17.5×10^6
T-225	225	45 - 75	22.5×10^6

*Cell line dependent. Based upon a density of 1×10^5 cells/cm².

Culture Vessels

- **Cell culture dishes**

- Cell culture dishes offer the best economy and access to the growth surface
- Cell culture dishes surfaces are specially treated for growing anchorage-dependent cells



Description	Growth area (cm ²)	Recommended working volume (mL)	Cell yield*
35	8	1 - 2	0.8×10^6
60	21	4 - 5	2.1×10^6
100	55	10 - 12	5.5×10^6
150	148	28 - 32	14.8×10^6

*Cell line dependent. Based upon a density of 1×10^5 cells/cm².

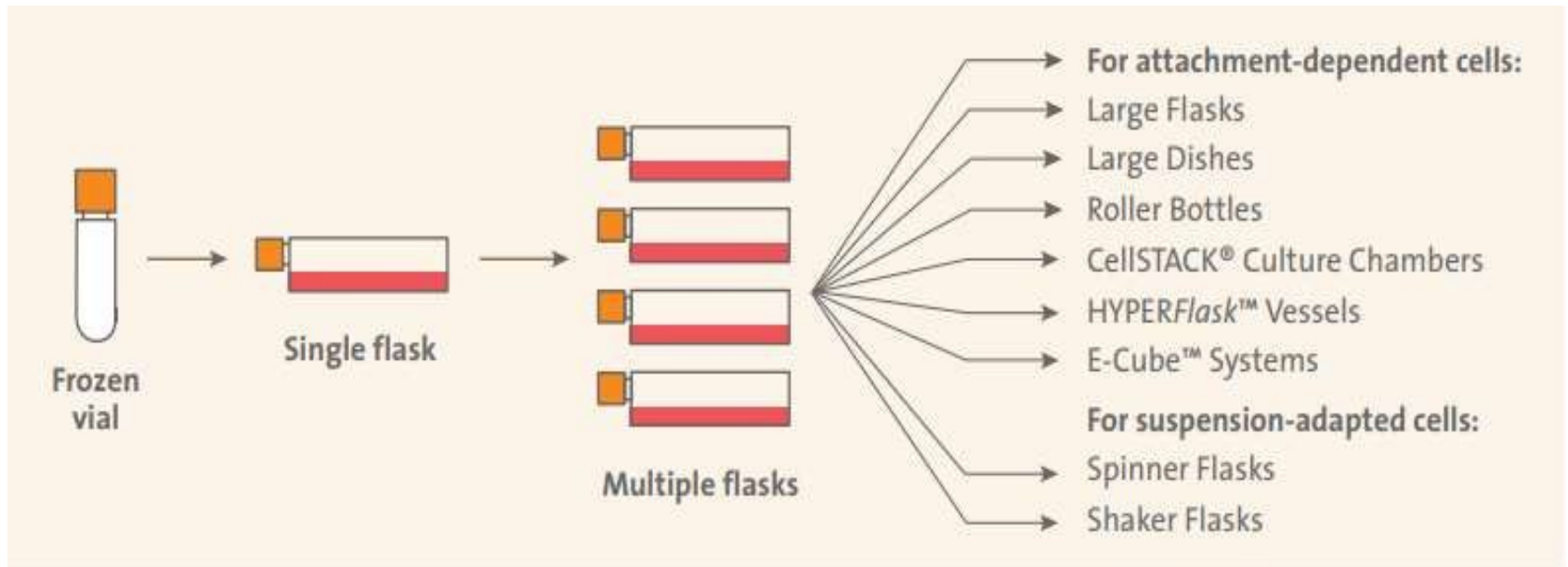
Küçük ölçekte kültür

- Çok sayıda flask kullanarak ölçek büyütmek pratik bir uygulama değildir.
- Zaman kaybı
- Hücrelerin devamlı pasajlanması gerekliliği
- Alan yetersizliği
- Yüksek maliyet

Ölçek Büyütme Prosesi

- Scale-up prosesi kültürün laboratuvar ölçeğinden kademeli olarak endüstriyel ölçeğe çıkarılmasıyla gerçekleştirilir.
- Bu yöntem direkt olarak hücrelerin aktarıldıkları ortama adapte olup prolifer olmalarıyla işlerlik kazanmaktadır

Scale Up Process



Ölçek Büyütme Prosesi

- Büyük ölçeğe geçiş sırasında bazı problemler yaşanabilir:
- Besin tükenmesi
- Oksijen tükenmesi
- Gaz alışverişi
- Toksik metabolitlerin oluşması

Ölçek Büyütme Prosesi

1. Monolayer kültürde ölçek büyütme
2. Süspansiyon kültürde ölçek büyütme

Monolayer kültürde ölçek büyütmeye

- Monolayer kültürde hücreler flask yüzeyine tutunarak çoğalırlar
- Bu sebeple, monolayer kültürlerde ölçek büyütmeye yapmak için yüzey alanının ve besiyeri hacminin artırılması gerekmektedir.

Avantajları

- i. Besiyeri değişimi ve yıkama işlemi kolay
- ii. Hücre perfüzyonu kolay
- iii. Farmasötik açıdan önemli bileşenler (interferon, antikor vb.) yüksek düzeyde üretilebilir
- iv. Aynı deney düzeneği ve ekipmanlar farklı hücreler ve besiyeri ile birlikte tekrar tekrar kullanılabilir

Dezavantajları

- i. Yorucu
- ii. Çok fazla boş alana ihtiyaç duyar
- iii. Hücre büyümesi efektif olarak izlenemez
- iv. Önemli parametrelerin ölçümü zor (O_2 pH, CO_2 etc.)

Silindir Şişe Kültürleri

- Silindir şeklinde şişelerin kendi etrafında dönerek besiyerinin hücreler arasında hareket etmesi yöntemine dayanır.
- Hücreler adezif olduklarından şişenin iç kısmına yapışık halde bulunurlar ve monolayer şeklinde büyürler



Figure 4. Roller Deck

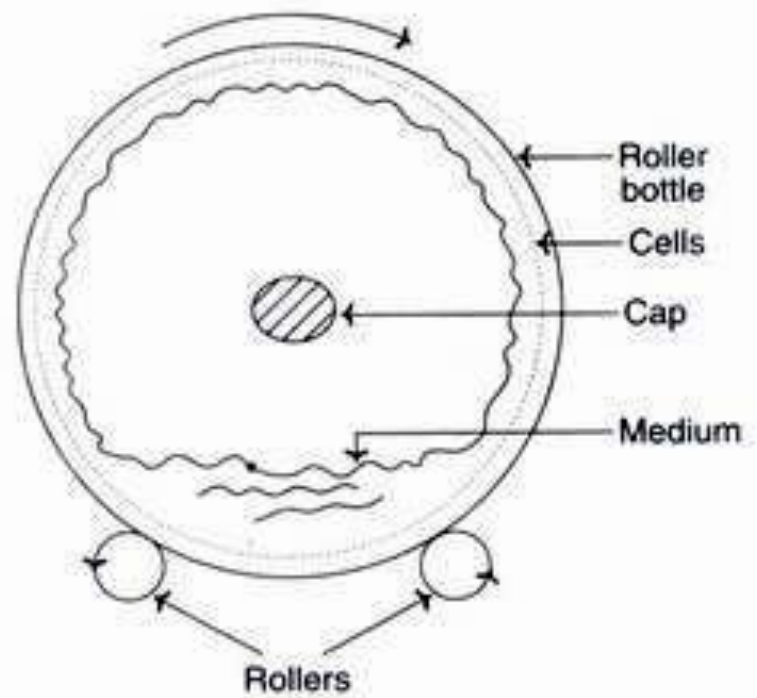


Fig. 37.6 : Roller bottle culture.



Silindir Şişe Kültürleri

Avantajları;

- i. Besiyeri düşük seviyede sabit bir şekilde çalkalanır
- ii. Hücre büyümesi için yeterli yüzey alanı bulunur
- iii. Süpernatantın toplanması kolay.

Dezavantajları

- i. Görüntüleme zor
- ii. Ekipman gerekiyor
- iii. Pahalı

Multi Flasklar

- Çok güneş yüzey alanları sağlanabilir (1,000-25,000 cm²).
- Üniteler, birbirine bitişik iki köşede dikey borularla birbirine bağlanır.
- Besiyeri bölmeler arasına tek bir uçtan geçebilir



Fig. 37.7 : A diagrammatic representation of Nunc cell factory.



Süspanse Kültürlerde Ölçek Büyütme

Spinner Flask Culture

- Bu yöntem kan hücreleri, hibridomalar ve HeLa S3 gibi süspanse ortamda büyümeyi seven kültür hatları için kullanılabilir.
- Bu flasklar plastik ya da cam bir şişeden oluşur ve ortasında manyetik karıştırıcı bir şaft ve besiyeri eklenmesi veya boşaltılmasında kullanılan kollar bulunur

Spinner Flask Culture

- Bu flasklar hücre hattı için uygun ortamda manyetik bir karıştırıcıya yerleştirilir
- Kültürler 100- 250 rpm'de karıştırılır

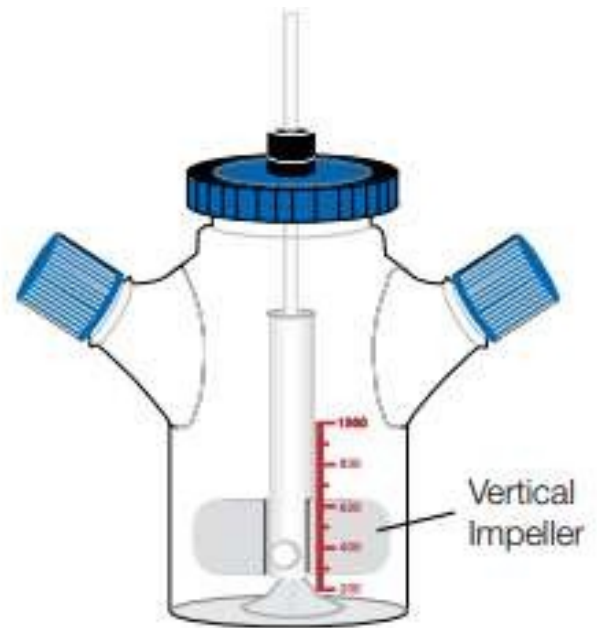
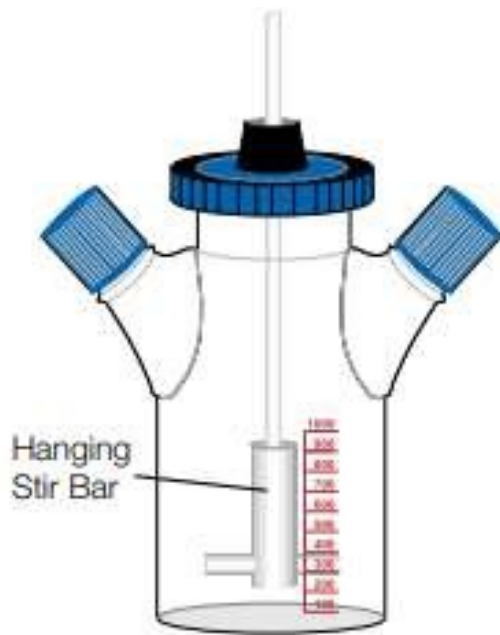


Spinner Flask Culture

- Bu flasklar karıştırıcı bir çubuk ve buna bağlı olan bir çarktan (pervane) oluşur. Bu sistem hücrelerin havalandırılması için uygundur
- İyi bir havalandırma için total kültür hacmi flask hacminin yarısını aşmamalıdır (500 mL hacme sahip flasktaki kültür hacmi 250 mL'yi aşmamalıdır.



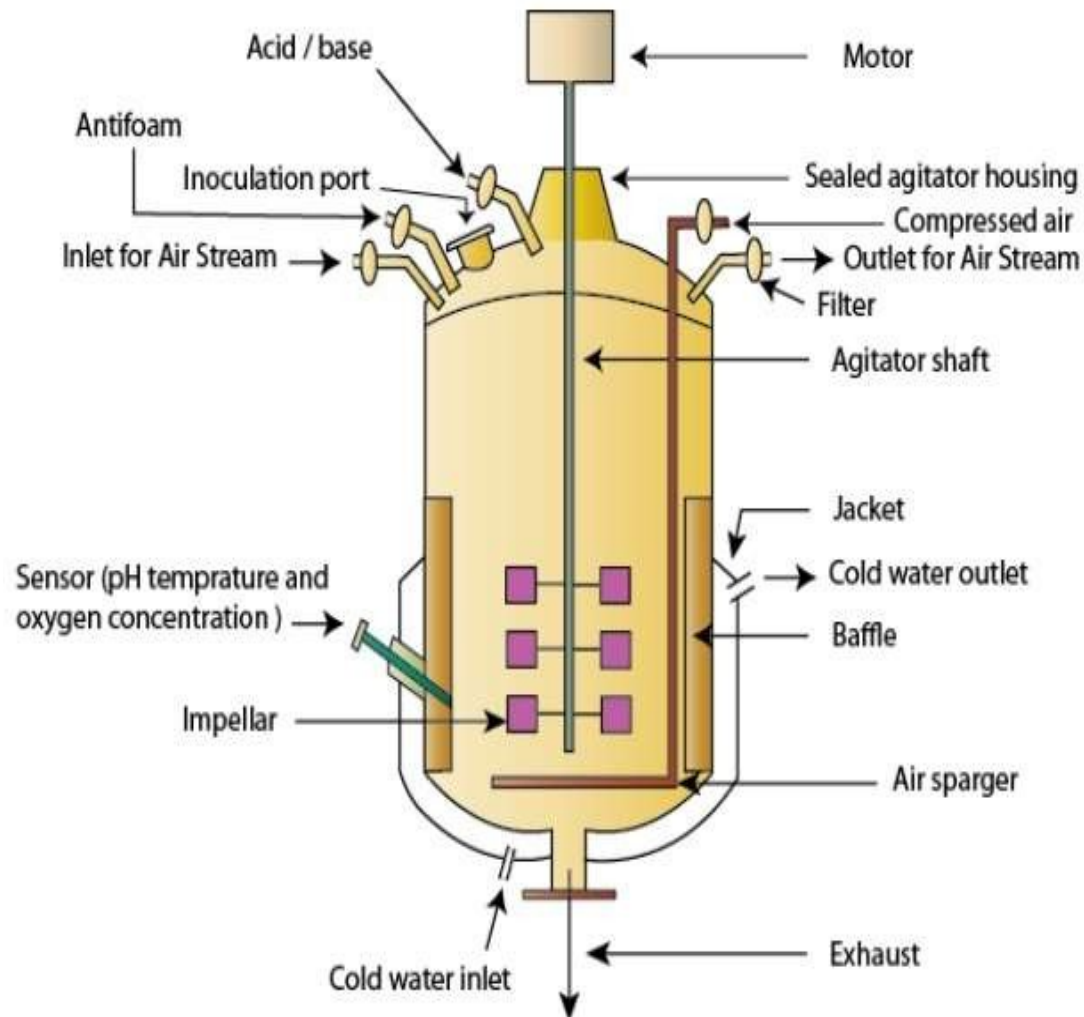
Spinner Flask Culture



Biyoreaktörler

- Hücrelerin steril ortamda ve kontrol edilebilir ortam koşullarında büyütülmesini sağlayan geniş tanlara biyoreaktörler denir.
- Mikroorganizma, bitki veya hayvan hücrelerinin büyütülebilmesi için kullanılabilir
- Prose aerobik ya da anaerobik şekilde yürütülebilir

DIAGRAM OF A TYPICAL BIOREACTOR



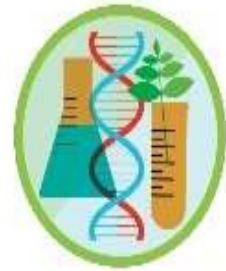
Biyoreaktörler

Biyoreaktör tasarımıındaki en önemli konulardan biri kütle aktarımıdır. Kütle aktarımı istenilen düzeyde olmadığı takdirde, üretilen dokuların yeterli derecede beslenememesi söz konusudur. Biyoreaktörler, öncelikle, hücrelere besinleri (glikoz ve amino asitler), biyokimyasal faktörleri ve oksijeni sürekli olarak ulaştırmalıdır.

Biyoreaktörler

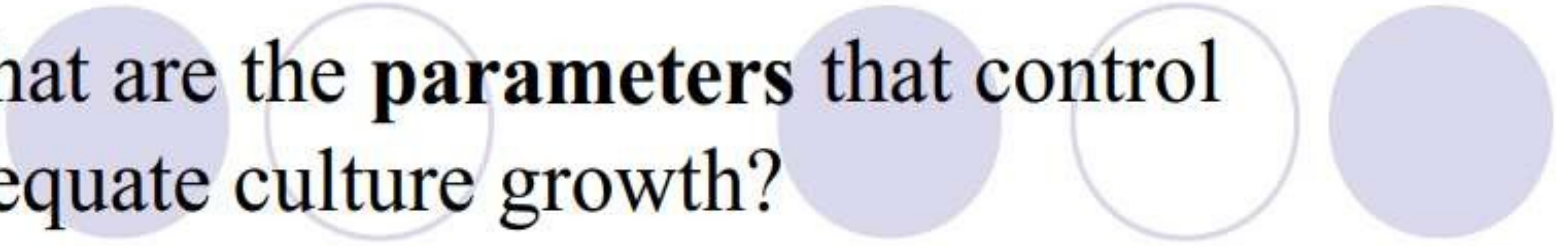
Çeşitli kimyasalların doku iskelesinin iç kısımlarına difüzyonunu sağlamalı ve laktik asit gibi hücre metabolizmasının yan ürünlerini sürekli uzaklaştırmalıdır. Ayrıca pH, oksijen oranı ve besin miktarı gibi çok önemli parametreler, kütle aktarımının etkinliğine bağlı olarak kontrol edilebilmektedirler.

SPECIFICATIONS OF A BIOREACTOR



A typical bioreactor consists of following parts:

- **Agitator** – used for the mixing of the contents of the reactor which keeps the “cells” in the perfect homogenous condition for better transport of nutrients and oxygen to the desired product(s).
- **Baffle** – used to break the vortex formation in the vessel, which is usually highly undesirable as it changes the center of gravity of the system and consumes additional power.
- **Sparger** – In aerobic cultivation process, the purpose of the sparger is to supply adequate oxygen to the growing cells.
- **Jacket** – The jacket provides the annular area for circulation of constant temperature of water which keeps the temperature of the bioreactor at a constant value



What are the **parameters** that control adequate culture growth?

- **Agitation –**
- **Bubble bursting** on culture surface resulting from culture aeration
- **Stirring speed is low – rotation of a suspended bar by a magnetic stirrer**
- **are not suitable in larger volumes**
- **Impellers – vertical and horizontal movement**



Parameter – **Temperature control**

- **Thermocirculator** – pumps heated water around an outer jacket
- **Larger fermenters** – pumps water through coiled pipes within culture
- **Circulating warm air**
- **Low volume fermenters** – External heating pads



Parameter – pH control

- **Optimal pH - 7.4** – for maximum growth
- **Enriched CO₂ atmosphere** decreases pH fluctuations
- 1-litre culture @ 2×10^6 cells/ml @ **gas flow of 100 ml/min**

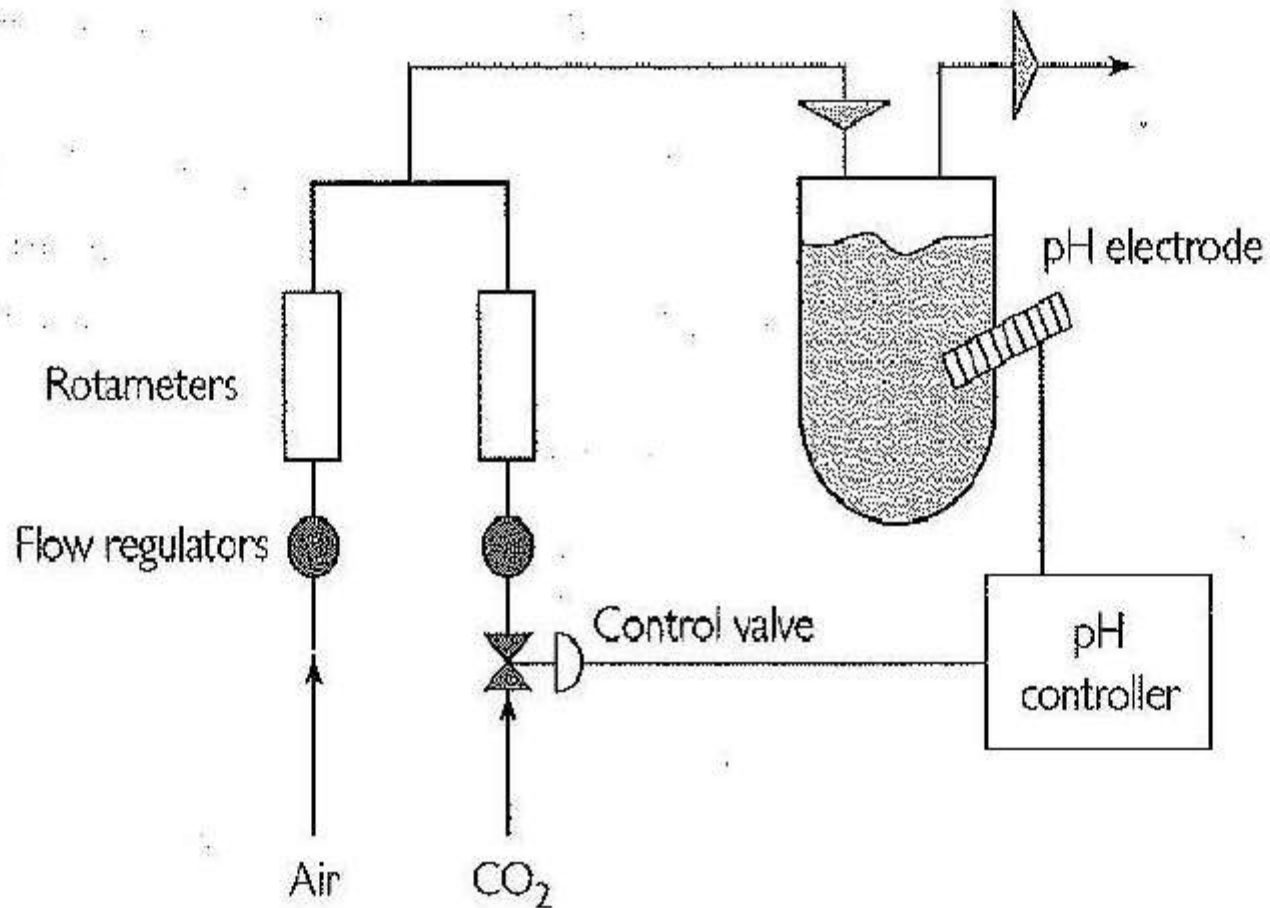
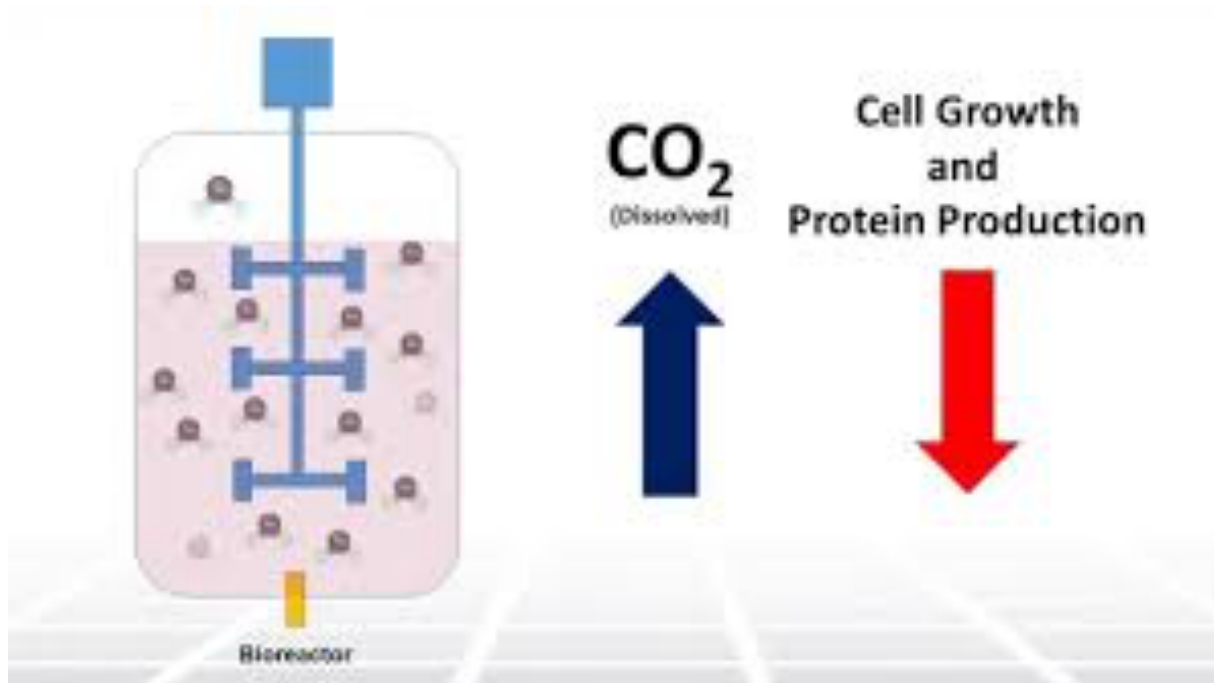
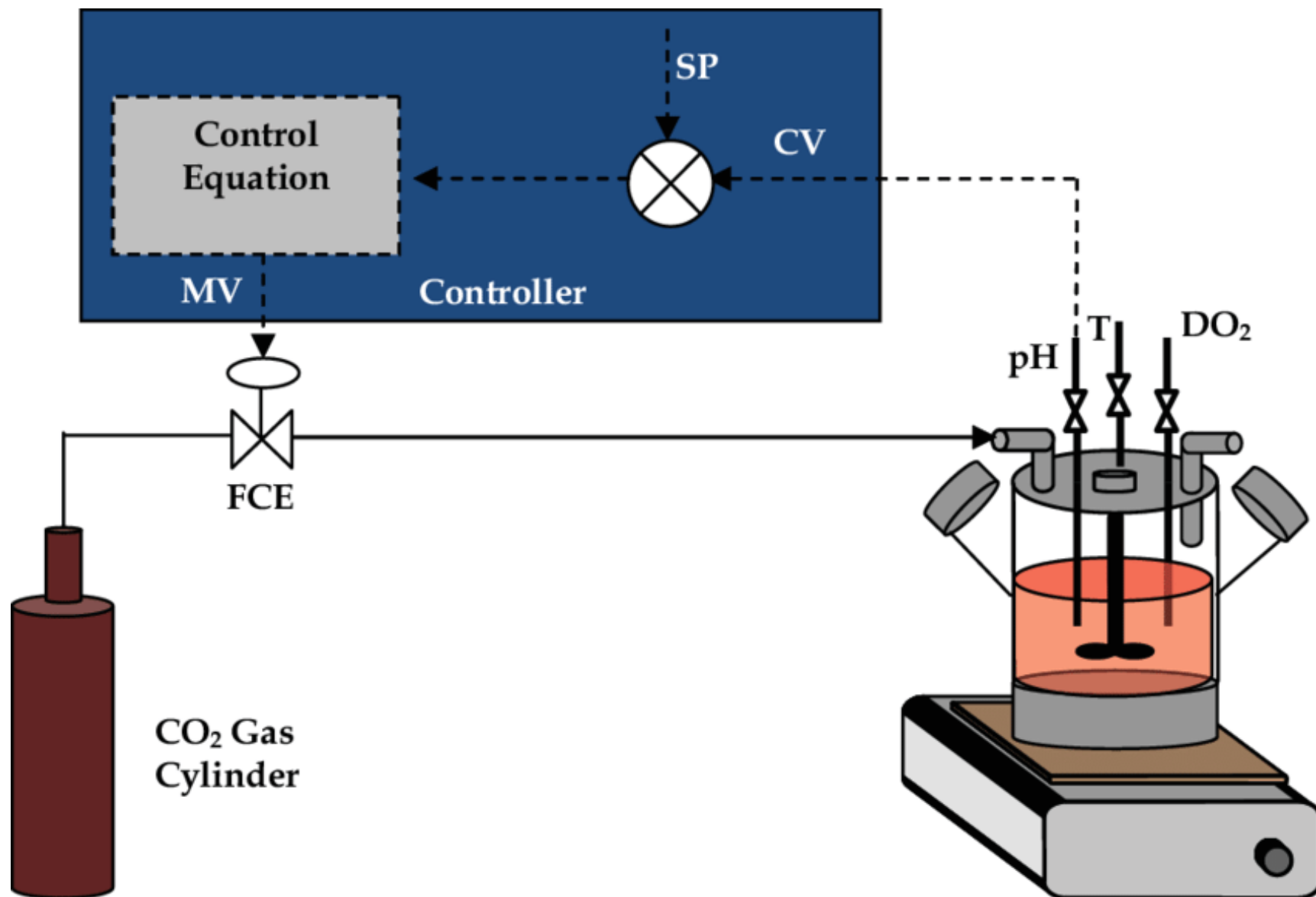


Figure 9.6

CO₂ control of culture pH in a bioreactor (from Kilburn, 1991).







Parameter – pH control

- Direct **acid** or **alkali** addition
- Net acidic production (**lactic acid**) from cellular metabolism – alkali (**NaHCO₃**)
- **HCl** is added
- Computer-controlled pump or gas valve to a pre-set pH value
- **Rotameters** indicate rate of gas flow – controlled by **flow regulators (fig-9.6)**

Requirements for a bioreactor for animal cell culture

- 1) well-controlled environment (T, pH, DO, nutrients, and wastes)
- 2) supply of nutrients
- 3) gentle mixing (avoid shear damage to cells)
- 4) gentle aeration (add oxygen slowly to the culture medium, but avoid the formation of large bubbles which can damage cells on contact).
- 5) removal of wastes

Scale-up

- Start with small volume reactors
 - T flasks, shaker flasks (5-25 mL)

- Intermediate scale
 - Small, highly controlled bioreactors (1-5 L)

- Production scale
 - Large reactors (20-1,000 L)

Types on the basis of mode of operation

- Batch
- Fed Batch
- Continuous

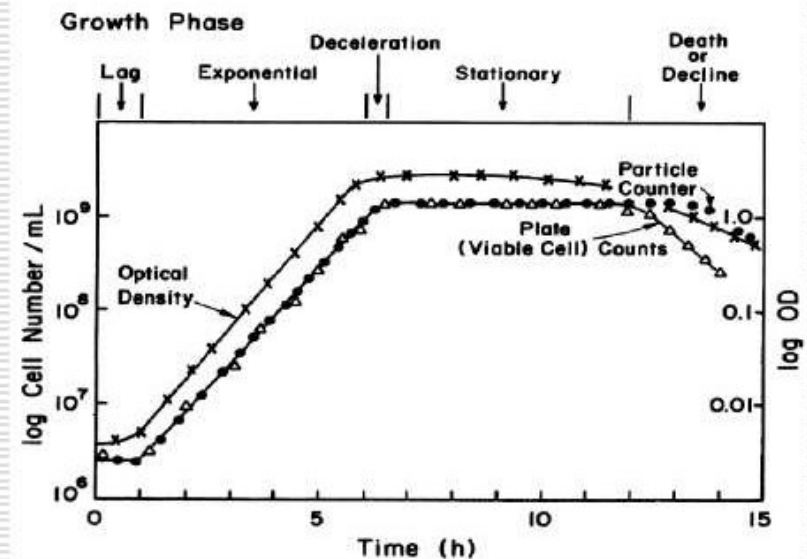
Kesikli Biyoreaktörler

Reaksiyona girecek bileşenler reaksiyon başlangıcında reaktöre beslenir. Reaksiyon süresince reaktöre tekrar bir besleme yapılmaz ve ürün çıkışı gerçekleşmez. Reaksiyon belli bir süre sonra sona erdirilir ve ürünler ile reaksiyona giren bileşenlerin kalanları reaktörden alınır. Bu şekilde çalışan reaktör sistemine Kesikli biyoreaktör denir

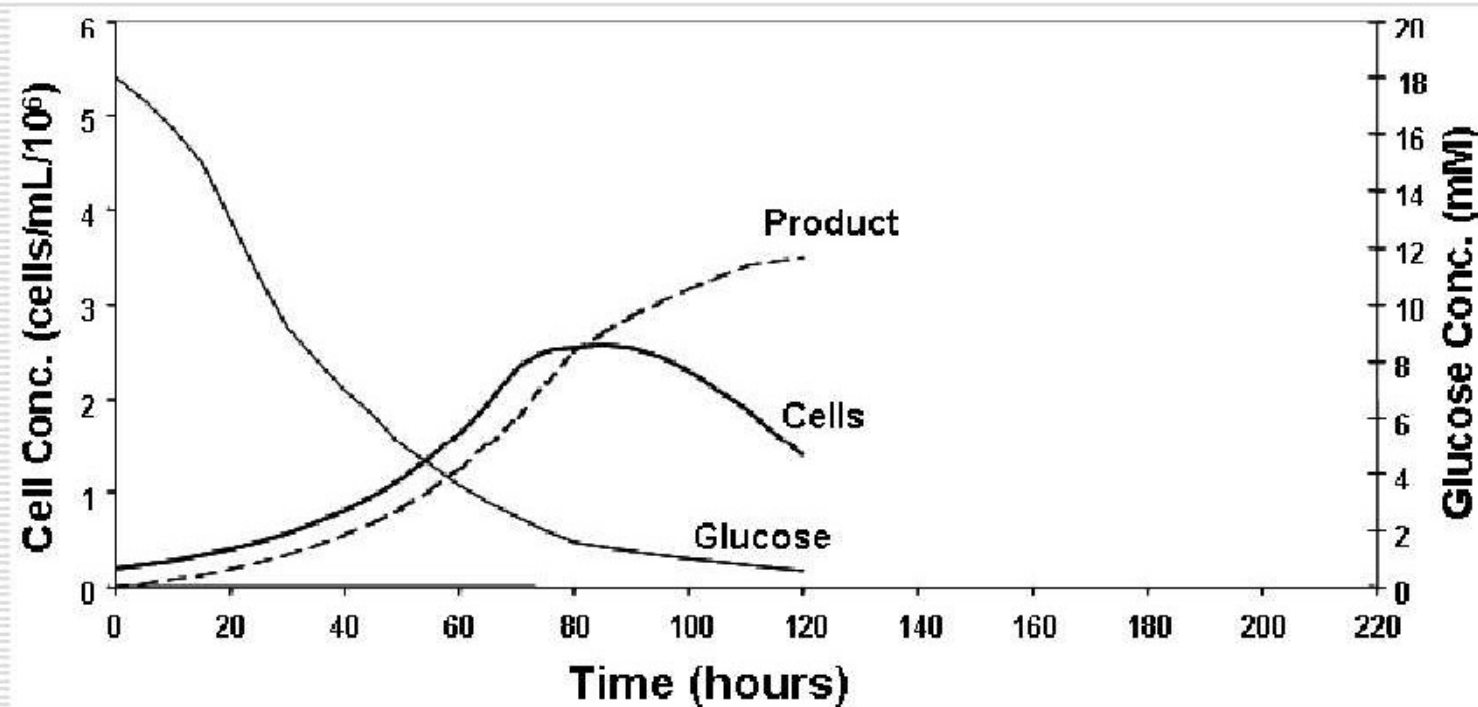
Batch Culture

- A closed culture system which contains an initial, limited amount of nutrient. The inoculated culture will pass through a number of phases following a growth curve. The growth curve contains four distinct regions as

- Lag Phase
- Exponential Phase
- Stationary Phase
- Death Phase

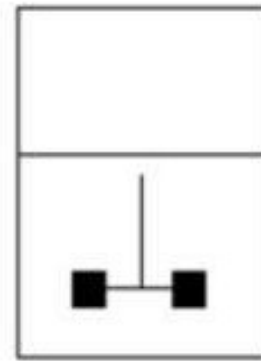


Batch Curve

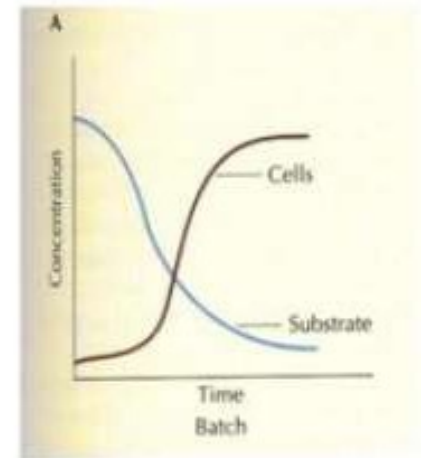


I. Batch fermentation

In batch fermentation, the sterile growth medium is inoculated with the appropriate microorganisms, and the fermentation proceeds without the addition of fresh growth medium.



Batch



(1) The composition of culture medium, the concentration of microorganisms, the internal chemical composition of the microorganisms and the amount of metabolite all change during fermentation.

(2) All 6 phases of bacterial growth cycle are observed.

Yarı kesikli fermentörler

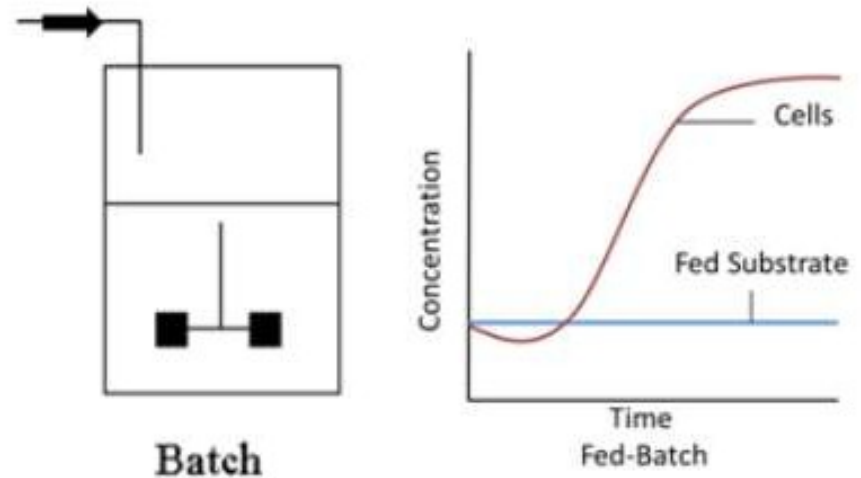
Yarı kesikli işletimde, biyoreaktöre fermantasyon boyunca substrat beslemesi yapılır. Reaktörden alınan örnekler dışında herhangi bir ürün uzaklaştırması söz konusu değildir. Sürekli substrat beslemesi yapılması ve ürün uzaklaştırılmaması nedeniyle toplam reaksiyon hacmi zamanla artar.

Yarı kesikli fermentörler

Yarı kesikli işletim, girdi beslemesi yapılarak kesikli işletimin devamı olarak çalıştırılabileceği gibi hücre büyüme ve çoğalma evreleri ayrı fazlar olarak kontrol edilebilir. Bunun yanında yarı kesikli işletimde farklı besleme şekilleri ile farklı kontrol metotları uygulanabilir. Bu işletimde yüksek derişimde biyokütle ve ürün elde edilir.

II. Fed-Batch fermentation

In fed-batch fermentation, fresh growth medium is added continuously during fermentation, and no growth medium is removed until the end of the process.



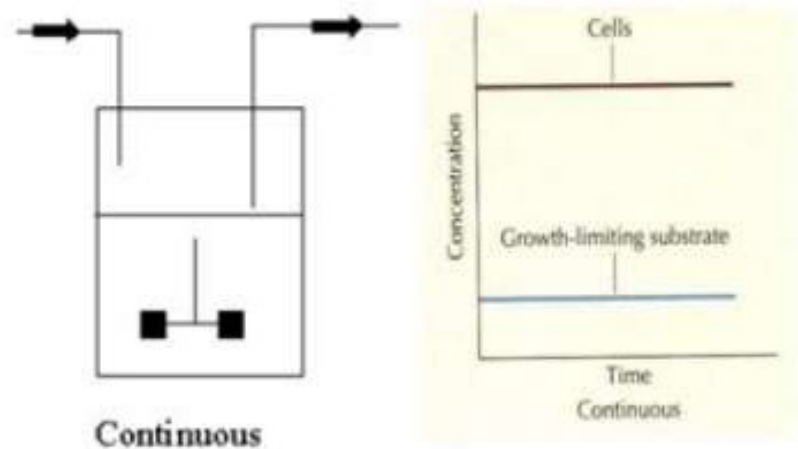
- (1) The continuous addition of medium prolongs both the log and stationary phases, thereby increasing the biomass and the amount of metabolites.
- (2) However, microorganisms in stationary phase often produce proteolytic enzymes (proteases) to degrade proteins.
- (3) A fed-batch fermentation strategy can increase the yield from 25% to more than 1,000% compared with batch fermentation.

Kesikli Beslemeli Fermentasyon

Proses başlangıçta kesikli olarak başlar. Besin elementleri tükenmeye başlayınca substrat, fermantasyon sırasında çeşitli zamanlarda azar azar ortama ilave edilir. İlave besin eklenmesi hem logaritmik hem de durgun faz sırasında yapılır. İşlem hem biyomas hem de sekonder metabolit miktarının artmasına neden olur. Özellikle rekombinant mikroorganizmalardan protein üretiminde kesikli beslemeli fermantasyon tipi benimsenmektedir.

III. Continuous fermentation

In continuous fermentation, fresh growth medium is added continuously during fermentation, but there is also continuous removal of an equal volume of medium containing suspended microorganisms.



- (1) A steady-state condition of the total number of cells and the total volume in the bioreactor is maintained.
- (2) A single reaction can be maintained for a much longer period.
- (3) However, potential drawbacks are loss recombinant plasmid constructs in some cells, difficulty in maintenance of an industrial scale and variation from batch to batch.

Sürekli (Continuous) Fermantasyon

Sürekli (Continuous) Fermantasyon:

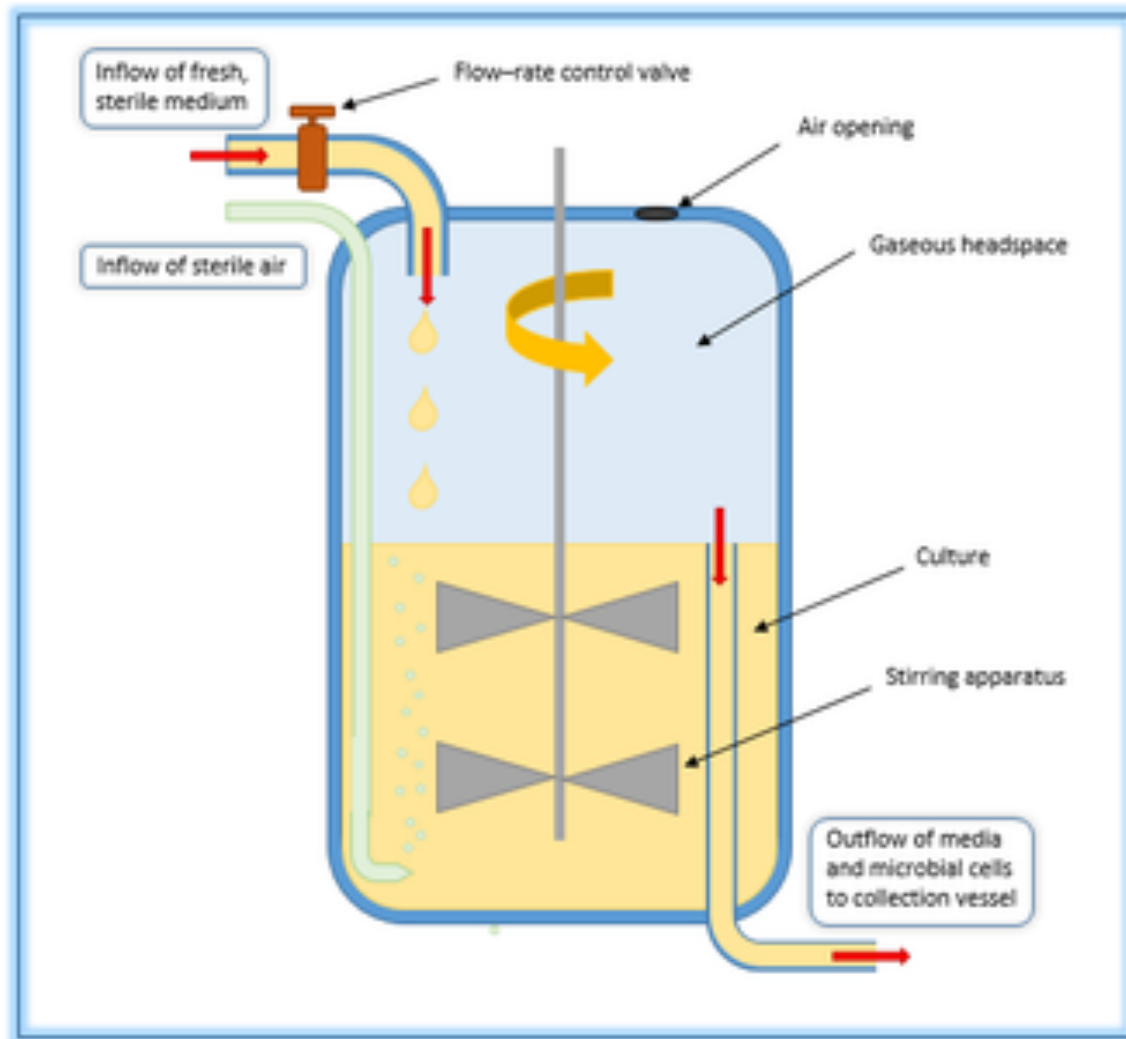
- Açık sistemlerdir. Bu sistemde steril besin biyoreaktöre ilave edilirken, eşit miktarda ürün ve onunla birlikte mikroorganizma sistemden alınır.
- Ürünün alımı sırasında kaybedilen mikroorganizmalar, reaktördeki hücre bölünmesiyle dengelenir.

Sürekli Fermantasyon

Sürekli Fermantasyon:

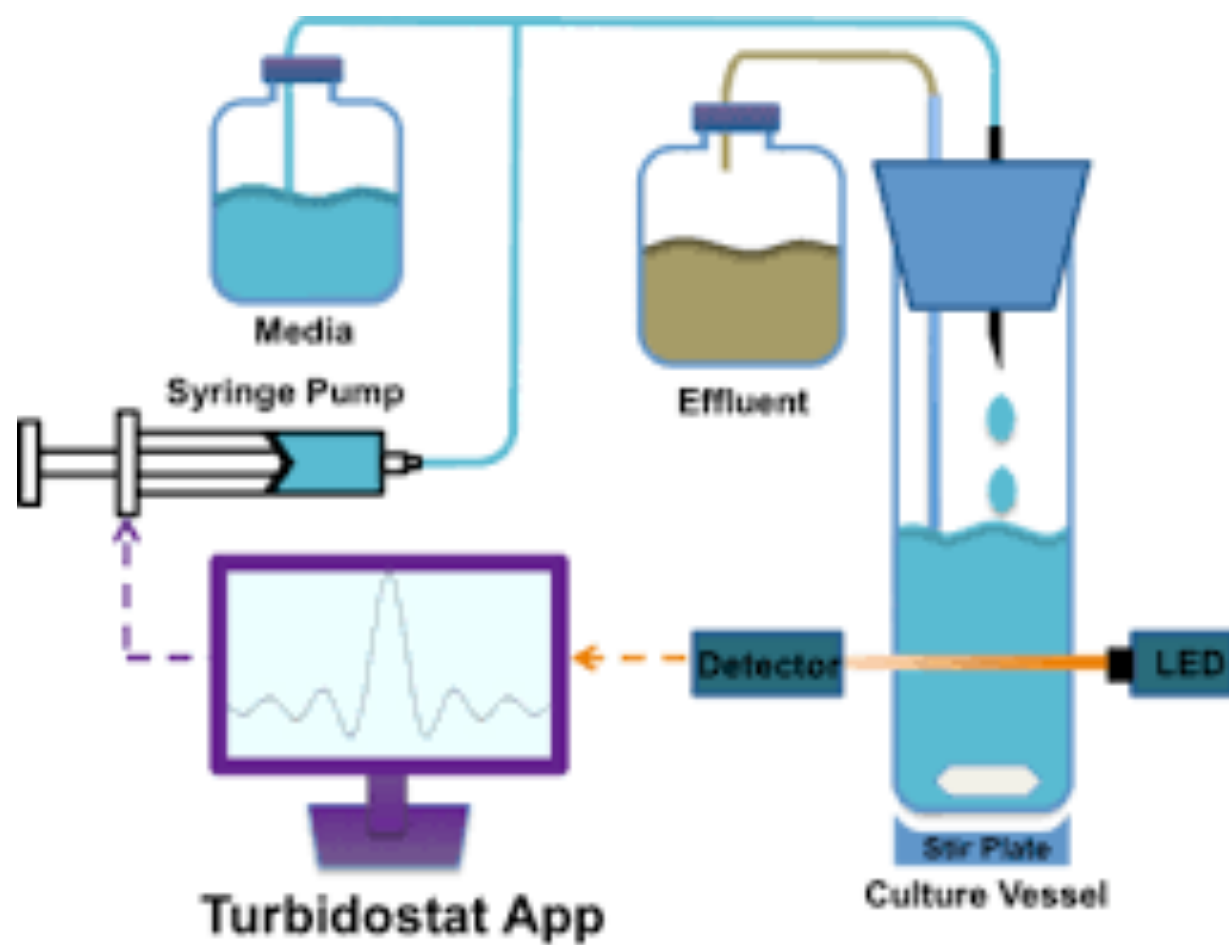
- Homojen karışımın sağlandığı reaktörlerde: **Kemostat** veya **türbidostat** olarak çalışılabilir.

Kemostat sisteminde fermantasyonunun kararlılığı substratlardan bir tanesinin konsantrasyonu ayarlanarak hücre büyümesi kontrol edilerek sağlanır.



Sürekli Fermentasyon

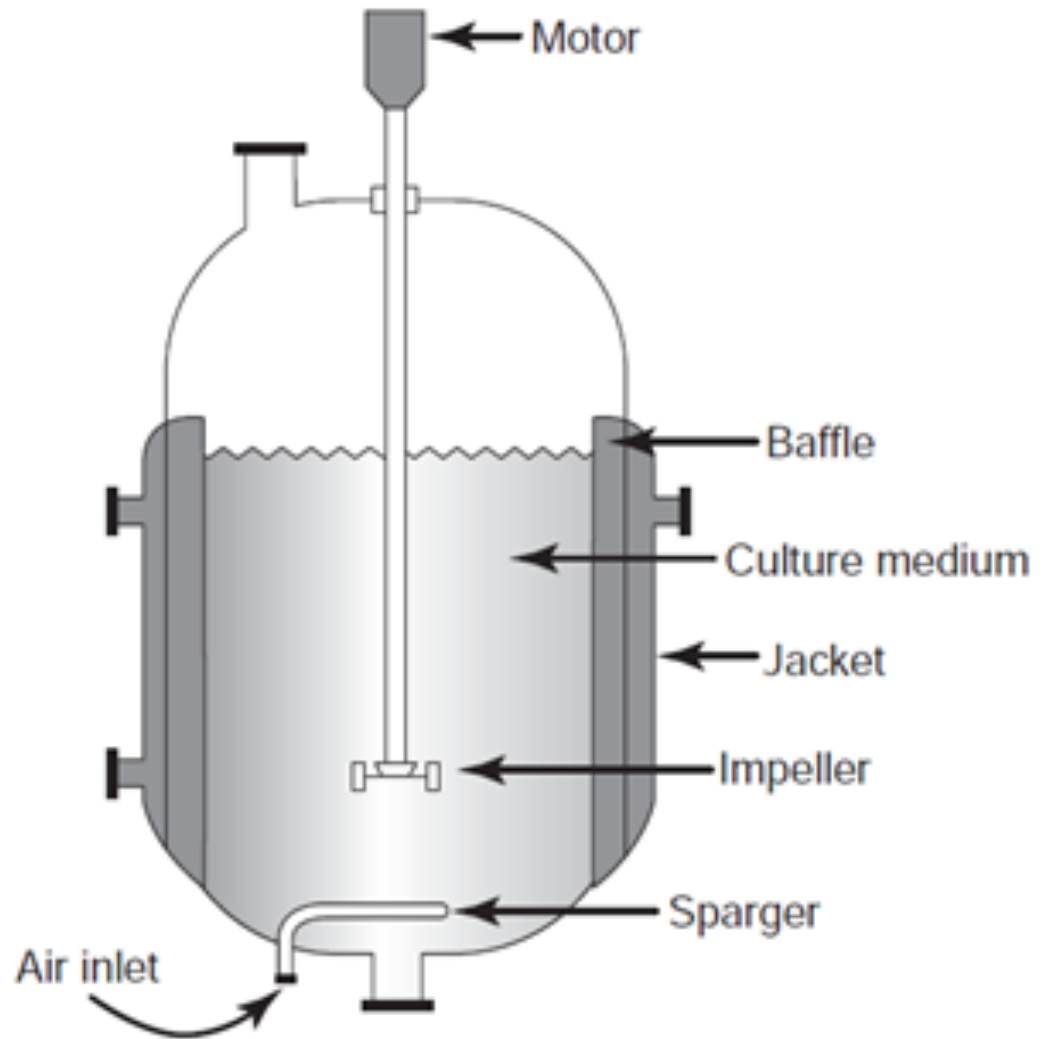
Türbidostat yönteminde ise fermantasyonda biyomas konsantrasyonu türbidimetrik olarak ölçülür ve elde edilen verilere göre besin ilave edilerek kararlılık sağlanır.



Karıştırırmalı Tank Biyoreaktörü

- Mekanik olarak karıştırılan sıvı fazlı biyoreaktörlerdir.
- Karıştırırmalı tank biyoreaktörler; cam veya paslanmaz çelikten imal edilen basit karıştırıcılardır. Karıştırma düzeneği üstte yada altta olabilir. Biyoreaktörün yönlendirme plakası (baffle) girdap oluşumunu engeller.
- Bir sparger ile taze havanın girişi sağlanır.

Karıştırırmalı Tank Biyoreaktörü



Balon Kolon Biyoreaktörleri

- Sıvı ortamın karıştırılması sütunun dibine yerleştirilmiş hava dağıtıcıdan kaynaklanan hava kabarcıklarının yukarı yönlü hareketi ile sağlanır.
- Hava dağıtıcıdan küçük baloncuklar halinde çıkan gazlar yüksek basınç altında büyük baloncuklara dönüşür
- Bu baloncuklar yukarıya doğru çıktıkça gaz dağılımını sağlar

Types of bioreactors/fermenters

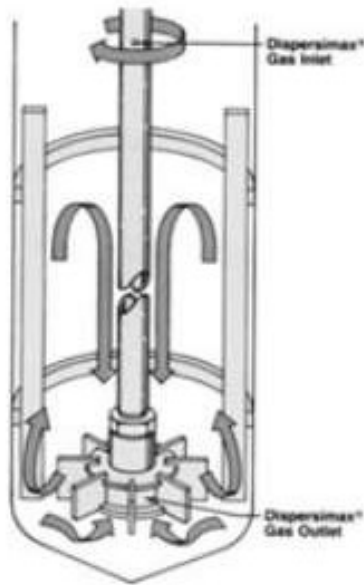
There are 3 fundamental classes of bioreactors

- Stirred-tank reactors (STRs),
- Bubble columns and
- Airlift reactors.

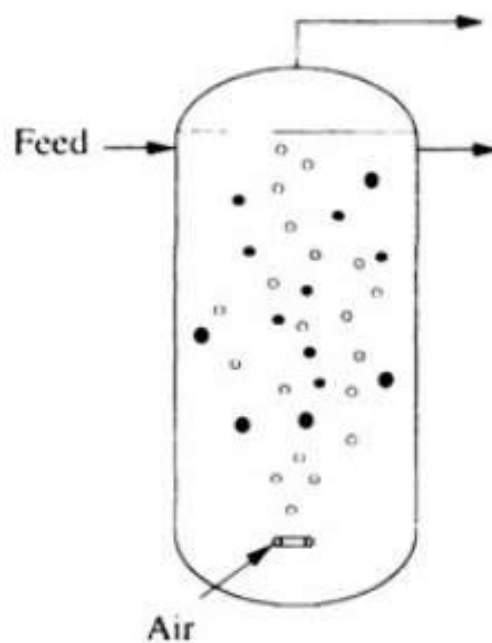
A. STRs:

- (1) STRs have internal mechanical agitation and are the most commonly used.
- (2) STRs are usually constructed from stainless steel or glass for laboratory-scale.
- (3) Heat generated from metabolism of the growing cells or the energy input by agitation is a limitation of the size of a bioreactor.

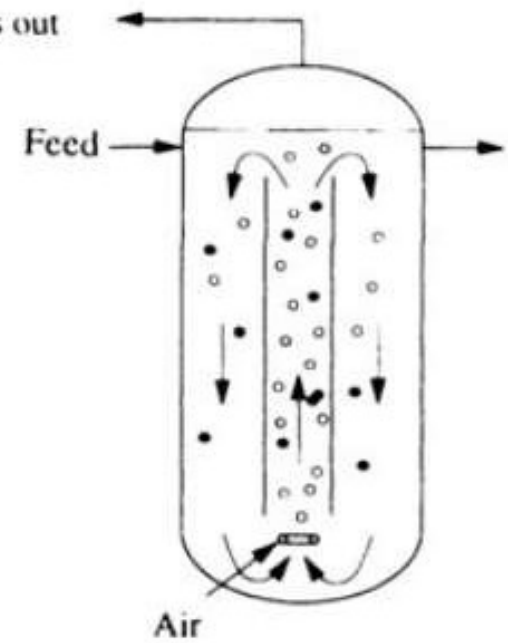
Types of bioreactors/fermenters



**Stirrer Tank
Reactor**



**Bubble column
reactor**



**Air lift
reactor**

Hava Kaldırmalı Biyoreaktör

- İçinde bulundurduğu hava sızdırmayan (draught tube) bir tüpe, hava yada başka bir gaz karışımının girişi ile ortamın karıştırıldığı ve havalandırıldığı balon sütun (bubble column) olarak tarif edilebilir.
- Gaz sirkülasyonu içteki hava sızdırmaz tüp veya dıştaki bir çember (loop) vasıtasıyla sağlanır.
- Dolayısıyla dikey bir akım döngüsünün olduğu reaktör gaz içeren ve içermeyen bölüm olarak iki bölüme ayrılmış olur.

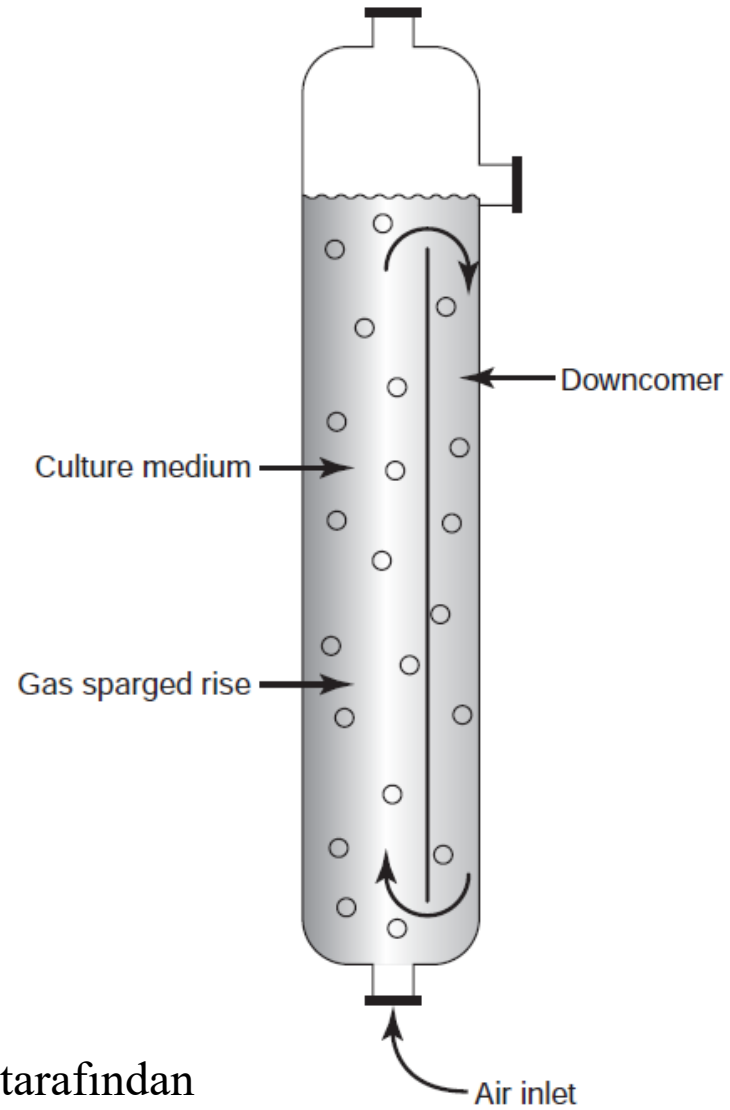
Airlift sistemlerin sunduğu avantajlar:

- Basit dizayn; hareketli parça ve karıştırıcı mekanizma bulunmaz, daha az bakım gerektirir, hasar riski yoktur ve sterilizasyon daha kolaydır.
- Daha az parçalanma oranı(shear rate) görülür. Bitki ve hayvan hücrelerine uygulanabilir
- Kontrollü akım ve etkili karıştırma
- Bütün aşamalar için iyi tanımlanmış süre
- Ürün miktarını artırmada büyük hacimde tank imkanı

Airlift sistemlerin dezavantajları:

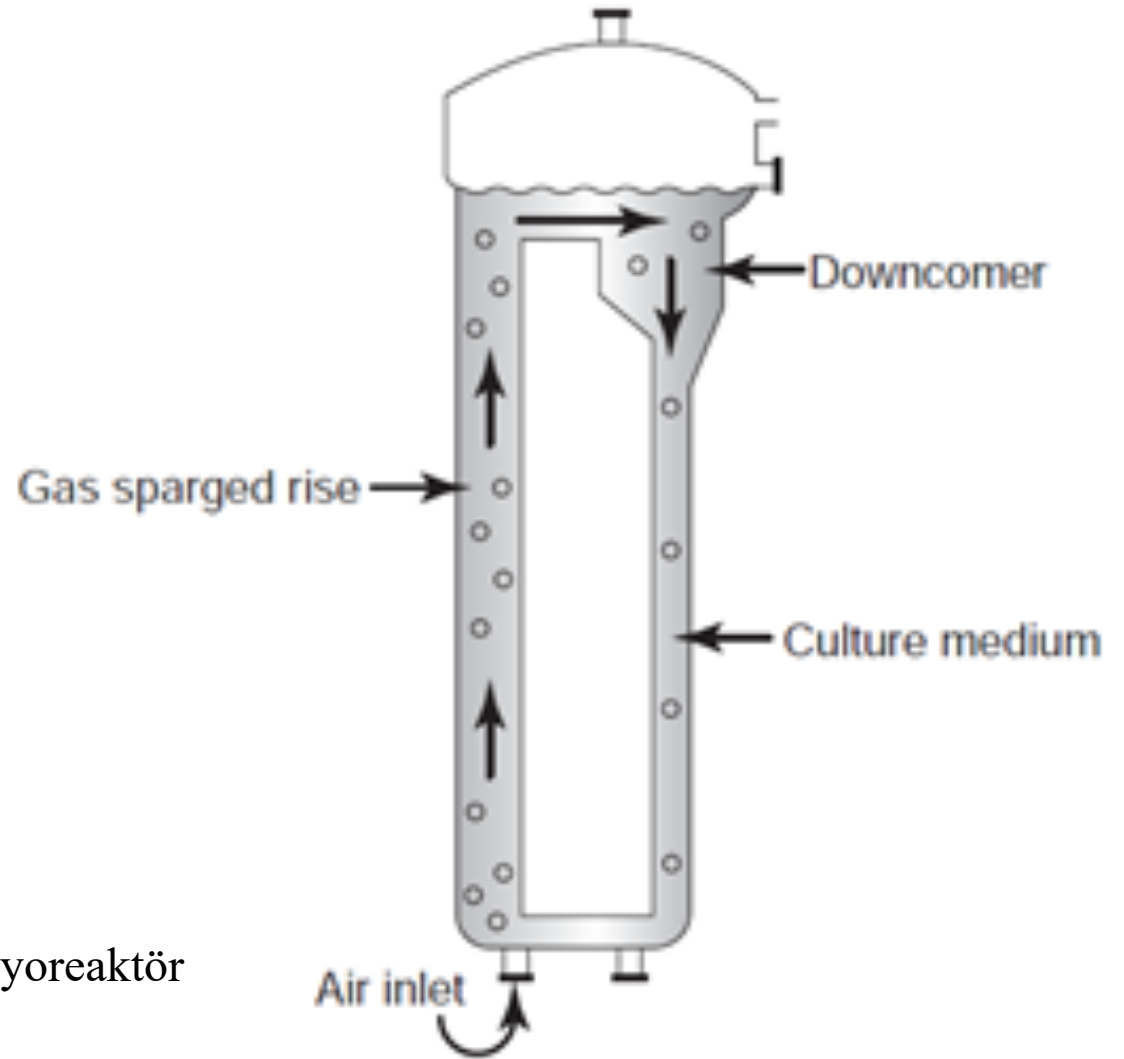
- Geniş ölçekte üretim için yatırım maliyeti fazlalığı
- Köpük oluşumu, köpük oluştuğunda gaz/sıvı ayırmada zorluk

Airlift Biyoreaktör



İçten tüplü ALBR. Hava tankın dip tarafından girer ve dikey yönde akım oluşturur

Airlift Biyoreaktör



Dıştan tüplü Airlift Biyoreaktör

Perfüzyon Biyoreaktörler

