



Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi

Şendoğan TOPCU^{1*}

Hatice ÇÖLGEÇEN¹

¹Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Zonguldak

*Sorumlu Yazar:

E-posta: sendogan@msn.com

Geliş Tarihi: 01 Haziran 2015

Kabul Tarihi: 05 Temmuz 2015

Özet

Bitki sekonder metabolitleri sağlık ve gıda olmak üzere bir çok endüstride yoğun talep gören hammaddelerdir. Bu yoğun ihtiyacı karşılamak için bitkilerde çok az miktarlarda üretilen sekonder metabolitlerin büyük miktarlarda üretilmesini sağlayan *in vitro* bitki doku kültürü çalışmaları gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda bitki doku kültürü teknikleri ile yapılan çalışmalar teknoloji ile buluşmuş ve biyoreaktör teknolojisinin gelişimi ile sonuçlanmıştır. Bu çalışmada öncelikle bitki sekonder metabolitlerinin çeşitleri ve önemi hakkında kısa bilgiler verilmiş, bitki doku kültürü tekniklerinin sekonder metabolit üretiminde kullanımı örneklerle anlatılmıştır. Son olarak biyoreaktörlerin tanımı, tarihsel gelişim ve çeşitleri, laboratuvar ölçeğinden başlanılarak şuan endüstriyel ölçekte kullanılan başarılı biyoreaktör uygulamaları hakkında bilgiler verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyoreaktörler; bitki biyoteknolojisi; Bitki sekonder metabolitleri; Bitki doku kültürü; kallus kültürü; süspansiyon kültürü.

The Production of Plant Secondary Metabolites Using Bioreactors

Abstract

Plant secondary metabolites are highly demanded raw materials in many industries such as healthcare and food. In order to meet this heavy demand, there have been ever increasing *in vitro* plant tissue culture studies which contribute to the production of large amounts of secondary metabolites that are produced scarcely in the plants. Studies regarding the plant tissue culture techniques have been integrated with the technology, leading to the improvement of bioreactor technology. In this study, the types and importance of plant secondary metabolites have been briefly explained and the use of plant tissue culture techniques in secondary metabolite production has been exemplified. Eventually, the definition, historical development and various types of bioreactors, along with the current successful bioreactor practices used at the industrial scale have been explained beginning from the laboratory scale.

Keywords: Bioreactors; plant biotechnology; plant secondary metabolites; plant tissue culture; callus cultures; suspension cultures.

GİRİŞ

Bitki kimyasal bileşikler sentezlendikleri metabolik yol ve fonksiyonlarına göre primer ve sekonder metabolitler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Primer metabolitlerin sentezi canlılar arasında hemen hemen aynıdır ve yaşam için temel görevleri vardır (büyüme, metabolizma ve üreme). Sekonder metabolitlerin ise farklı olarak bitki büyüme ve gelişmesinde temel bir görevleri yoktur ancak bitkinin çevresini saran ortama adaptasyonunda, üreme olayına yardımcı olmadıkça, bitki savunmasında ve çevre ile ilişkilerde önemli görevleri olan organik bileşiklerdir [3]. Sekonder metabolitler, eksiklikleri ya da yoklukları durumunda bitkinin uzun dönemde zarar görmesine hatta ölmesine sebep olacak kadar yaşamsaldırlar. Bu bileşikler primer metabolitlere nazaran daha kompleks yapıda olma eğilimindedirler [6].

Modern kimya ve biyolojinin son iki yüz yılı primer metabolitlerin, hücre bölünmesi ve büyümesi, solunum, depolama ve üreme gibi temel yaşamsal fonksiyonlardaki rolünü açıklamaktadır. Biyolojide sekonder metabolit kavramı ilk kez Kossel (1891) tarafından kullanılmıştır [10].

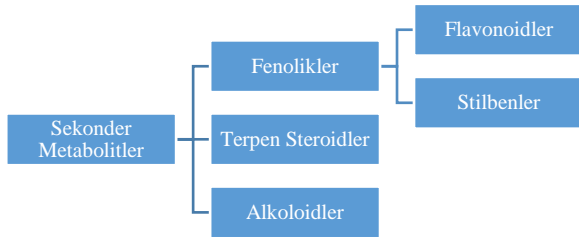
Bitkiler kimyasal çeşitliliği yönüyle insanlığın ilk zamanlarından beri ağrı kesici, keyif verici, hastalıkları tedavi edici olarak ve dinsel ritüellerde kullanılmıştır.

Biyolojik etkileri olan bu kimyasal maddeler çoğu durumda bitkilerde çok az miktarda bulunan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Örneğin *Taxus* bitkilerindeki paklitaksel, en çok bulunduğu kabukta kuru ağırlığının % 0,02'sinden azdır. Dolayısıyla çok yavaş yetişen *Taxus* bitkisinden bu diterpenoid'in doğal yollarla üretilmesi ticari açıdan ekonomik değildir. Wilson ve Roberts yıllık 25 kg'lık anti-tümör ilacı paklitaksel talebini karşılamada 340 ton *Taxus* kabuğunun veya 38000 ağacın gerektiğini hesaplamışlardır [23].

Ayrıca ilaç endüstrisinin ilgilendiği sekonder metabolitlerin bulunduğu bir çok bitki doğal popülasyonların hızla tüketilmesi sebebiyle nesli tükenmekte olan bitkilerdendir. Bu sebeple yüksek değerli moleküllerin sürdürülebilir üretimi için yeni yaklaşımlar bulunması bir zorunluluktur [23].

Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması

Sekonder Metabolitler farklı kimyasal yapılara sahiptirler ve genel olarak üç grupta sınıflandırılırlar: fenolikler, terpen - steroidler ve alkaloidler (Şekil 1). Çoğunun, bitkiler ile mikroorganizmalar, böcekler ve hayvanlar arasındaki ilişkileri düzenlemede ekolojik rolleri vardır. Çoğu zaman özelleşmiş hücrelerde, bitkinin belirli gelişim aşamasında ya da stres esnasında üretilen sekonder metabolitler bitkide çok küçük miktarlarda bulunur [3].



Şekil 1. Sekonder Metabolitlerin Genel Sınıflandırması [3].

Fenolikler

Bütün bitkilerde bulunan, çoğunlukla pigmentlerle temsil edilen büyük bir gruptur. Bu grupta lignin gibi hücre duvarlarını güçlendiren, yapısal fonksiyonu olan bileşikler de bulunmaktadır. Diğer bazıları bitki savunmasında (örneğin; kumarinler, stilbenler, isoflavonoidler, proantosiyandinler, yoğunlaşmış taninler), tozlaşmada, tohum gelişmesinde görev almaktadırlar. Kimyasal olarak bir yada daha fazla asidik hidroksil grubu içeren aromatik bileşiklerdir. Fenolikler flavonoidler ve stilbenler olarak iki sınıfa ayrılır [3].

Flavonoidler; Genelde vakuollerde bulunurlar. Birçok çiçeğin ve meyvenin renginin oluşmasında, polinatör çekiminde (pelargonidins, cyanidins, delphinidins), bitkiyi UV-B ışınımından korumada (kaempferol) vb. olaylarda rol alır. Yaralanma, kuraklık, metal ve açlık stresinde sentezlenirler. En bilinen flavonoidler olan fitoöstrojenler memelilerdeki 17 β -estradiol (E2)'e yapısal benzerlik gösterir (örneğin; genistein, kaempferol, daidzein) [3]. Fabaceae (baklagiller) familyası fitoöstrojenler yönünden zengindir.

Stilbenler; Küçük bir grubu oluşturan stilbenler daha çok bitki savunmasında görev alırlar. Resveratrol en çok bilinen stilbenlerdir. *Vitis* (asma) resveratrolce zengin bir bitki grubudur. *Cis* ve *trans* izomerleri bulunan resveratrol stres ortamında (yaralanma ve patojen saldırısı) üretilir. *Trans-resveratrol* insanlarda antioksidan aktivitesi ile kalp hastalıklarının tedavisinde faydalıdır. Ayrıca böbrek kanserinde de etkili olduğu düşünülmektedir. Günümüzde *Trans-resveratrol*'un elde edilebildiği birçok kaynak içinden *Polygonum cuspidatum* (*syn. Fallopia japonica*)'dan elde edilenler sağlık alanında, *Vitis* türlerinden elde edilenler kozmetikte kullanılmaktadır.

Terpenler ve Steroidler

Terpenler; beşli karbon birimlerine göre sınıflandırılırlar; hemiterpenler (C1), monoterpenler (C10), seskiterpenler (C15), diterpenler (C20), triterpenler (C30), tetraterpenler (C40) ve politerpenler (80-karbon biriminden fazla). Bitkiler, glandular trikomal, salgılama kavimleri ve glandular epidermis gibi özelleşmiş yapılarında çeşitli terpenoidler üretirler. Genellikle seskiterpenler, triterpenler ve politerpenler, sitozol ve endoplazmik retikulumda (asetat ve mevalonat yolu), isopren, monoterpenler, diterpenler, ve tetraterpenler (gliseraldehit fosfat/ pruvat yolu) plastidlerde üretilir. Terpenlerin çoğu halka yapıdadır. Bitki aromaları ile parfümeri ve gıda endüstrisinde kullanılan esansiyel yağların temel bileşeni monoterpenlerdir [3].

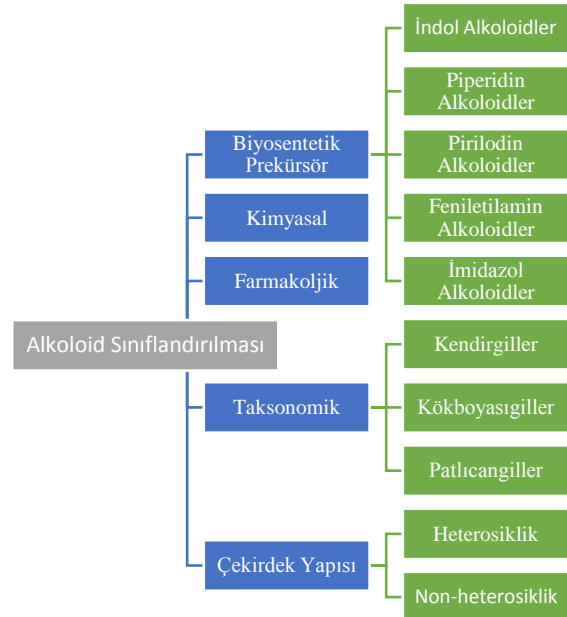
Steroidler; Fitosteroller bitki membranların önemli bir yapısal bileşenidir. Hayvan hücre zarlarında bulunan kolesterolün fonksiyonuna benzer olarak serbest fitosteroller bitki membranının çift fosfolipit tabakasını stabilize ederler. Bitkilerde 200'den fazla farklı çeşitte fitosterol bulunduğu bildirilmiştir. Fitosterollerin çoğu 28-29 karbon içerir ve bir ya da iki karbon-karbon çift bağı

bulundurur. Fitosterollerin tamamen doymuş (çift bağ içermeyen) türleri fitostanol alt grubunu oluşturur. Fitostanoller birçok bitkide iz miktarda bulunurken sadece birkaç tahıl dokularında çok miktarda bulunmaktadır [29]. Bitkilerde en çok miktarda bulunan bitki steroller β -sitosterol, kampesterol ve stigmasteroldür (bütün bitki sterollerinin %95-98). Kolesterol düşürücü ve kardiovasküler hastalıklardan koruyucu etkileri vardır. Ayrıca anti-aterosklerotik, anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve bazı kanserlerde anti-tümör aktiviteleri bulunmaktadır. Brassinosteroidler hücre genişlemesi ve uzamasını artıran, iletim farklılaşmasını, mikrotübüllerin yeniden düzenlenişini etkileyen, kök gelişimini ve senesensi baskılayıcı doğal bitki büyüme düzenleyicileridir [3].

Alkoidler

İnsanlar yüzyıllardır alkoidleri ağrı kesici, zehir vb. büyü veya tedavi edici yönleri için kullanmışlardır. Kodein ve morfin içeren *Papaver somniferum* (haşhaş) lateksinin Ortadoğu'da M.Ö. 1200-1400 yıllarında dahi kullanıldığı bilinmektedir. Alkoidler bitkilerde daha çok herbivor ve sineklere karşı (nikotin, kafein) ve mikroorganizmalara karşı (berberin, liriodin) kendini savunmada görev alır. Ayrıca bazıları doku hasarlarına (nikotin) cevap olarak da sentezlenir. Oldukça fazla biyolojik aktiviteler sahiptirler.

Birçok alkoid amino asit prekürsörlerinden (öncülerinden - ornitin, tirozin, triptofan ve histidin) veya anthranilik asit ve nikotinik asitten türetilmektedir. Genellikle özelleşmiş hücre ve dokularda üretilir, sentezlendikleri yerde biriktirilir veya depo alanlarına transfer edilirler.



Şekil 2. Alkoidlerin sınıflandırılması [3].

Farklı özelliklerine göre sınıflandırılabilirler; örneğin türetildikleri amino asitlerin nitrojen atomu taşıyan halka sisteminin yapısına göre (pyrrolidine-, indole-, piperidine-, pyrrolizidine, tropane-, quinoline-, isoquinoline-, aporphine-, imidazole-, diazocin-, purine-, steroidal-, amino-, and diterpene alkaloids), farmakolojik etkilerine göre (aneljezik, narkotik vb.), taksonomik sınıflandırmada en çok buldukları familya ismine göre (Kendirgiller - Cannabaceae, kökboyasgiller - Rubiaceae, Patlıcangiller - Solanaceae) ya da halkasal çekirdek yapısına göre (heterosiklik, non-heterosiklik) [3].

Bitkilerin yaklaşık %20'si alkaloid üretir ve çoğu bitki birden fazla alkaloid üretmektedir. Yüksek bitkilerin doku ve süspansiyon kültürlerinden elde edilen doğal ürünler Çizelge 1'de gösterdiği şekilde gruplandırılabilir [35].

Sekonder Metabolitlerin Ekonomik Önemi

İnsanlığın başlangıcından bu yana bitkiler yiyecek (tahıl, baklagil, sebze, meyve vb.), hayvan yemi (yonca, arpa, mısır vb.), koku verici ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bitki reçine ve sakızları çeşitli amaçlar için kullanılırken bazı bitkilerden iplik üretimi yapılmaktadır. Birçok bitkiden süs bitkisi olarak yararlanılırken, pek çok bitkiden ise ilaç elde edilmektedir. Dünyada 750.000 – 1.000.000 kadar bitki türünün var olduğu tahmin edilmektedir. Bunlardan yalnızca 500,000 kadar tanımlanıp isimlendirilmiştir. Gıda olarak kullanılan bitkiler 3.000 civarında olsa da bu sayının 10.000 civarında olabileceği düşünülmektedir. Türkiye'nin tedavi amacı ile kullandığı bitki miktarı en az 500 civarındadır. Dünya çapında düşünülürse kullanılacak tıbbi bitki miktarının 100.000 civarında olması gerektiği tahmin edilmektedir [7].

Günümüz teknolojisi ile bitkilere bu özellikleri kazandıran kimyasalların bir çoğu bilimsel olarak tesbit edilmiş ve endüstriyel ölçekte yararlanılmaya odaklanılmıştır.

Ticari öneme sahip farmasötiklerin çoğu bitkilerden elde edilmektedir, her yıl ABD'de 25 milyar dolardan fazla tüketimi bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre gelişmekte olan ülkelerdeki nüfusun %80'i tedavilerinde geleneksel ilaçları kullanmaktadır. Öte yandan Birleşmiş Milletler (UN) Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) dünya nüfusunun 2050'de 9 milyara ulaşacağını tahmin etmektedir. Bu da yakın gelecekte daha fazla gıda ve ilaca ihtiyaç duyacağımızı açıkça ortaya koymaktadır.

Günümüzde modern ilaçların %25'inden fazlası doğrudan ya da dolaylı olarak bitkilerden elde edilmektedir. Özellikle kanser tedavisi (%60) ve enfeksiyon hastalıklarında (%75) ayrıca metabolik sendrom ve immün baskılamada kullanılmaktadır. İsim vermek gerekirse, paklitaksel (Taxol®), galantamin (Nivalin® ve Reminyl®) ve artemisininin şüanda dünya çapında kullanılmakta olan belli başlı ilaçlardır [23]. Çizelge 1'de bitki kaynaklı farmasötiklerin ekonomik değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 1. Bitki kaynaklı farmasötiklerin önemi [35]

Ürün	Kullanım	Bitki Türü	Fiyat (US\$/ kilogram)
Ajmalisin	Antihipertansif	<i>Cath. roseus</i>	37, 000
Artemisinin	Antimalaryal	<i>Artemisiaannua</i>	400
Ajmalin	–	<i>Ra. serpentina</i>	75, 000
Asinitin	–	<i>Acotinum spp.</i>	n/a
Berberin	İntestinalailment	<i>C. japonica</i>	3250
Kamptotesin	Anti-tumör	<i>Camptothecaacuminata</i>	432, 000
Kapsaikin	Counterirritant	<i>Ca. frutescens</i>	750
Kastanospermin	Glycosideinhibitor	<i>Castanospermumastrale</i>	n/a
Kodein	Sedatif	<i>P. somniferum</i>	17, 000
Kolşisin	Anti-tumör	<i>Colchiumautumnale</i>	35, 000
Digoksin	Heartstimulant	<i>Di. lanata</i>	3000
Diosgenin	Steroidalprecursor	<i>Dioscoreadeltoidea</i>	1000
Elliptisin	Anti-tumör	<i>Orchrosiaelliptica</i>	240, 000
Emetin	–	<i>Cephaclisipeccuanha</i>	1500
Forskolin	Bronşiyal astım	<i>Coleusforskoli</i>	n/a
Cinsenosidler	Healthtonic	<i>Panaxginseng</i>	n/a
Morfin	Sedatif	<i>P. somniferum</i>	340, 000
Podopillotoksin	Anti-tumör	<i>Podophyllumpetalum</i>	n/a
Kuinin	Antimalaryal	<i>Cinchon. ledgeriana</i>	500
Sanguinarine	Antiplateque	<i>Sanguinariacandensis</i>	4, 800
		<i>P. somniferum</i>	
Şikonin	Antibakteriyal	<i>L. erythrorhizon</i>	4500
Paklitaksel	Anti-kanser	<i>Taxusbrevifolia</i>	600, 000
Vinkristin	Anti-lökemik	<i>Cath. roseus</i>	2, 000, 000
Vinblastin	Anti-lökemik	<i>Cath. roseus</i>	1, 000, 000

Bitki Hücre ve Doku Kültürü

In vitro bitki kültürleri; aseptik şartlarda, niteliği belirli kimyasal ve fiziksel ortamlarda hücre, doku, organ ve bitkilerin kültüre alınması olarak tanımlanır. Bitkilerde *in vitro* hücre kültüründe ilk çalışma, Haberlandt'a aittir (1902). Bitki doku kültüründe ilk ticari ilgi alanını süs ve gıda bitkileri olmuştur [3].

Alman botanikçi Gottlieb Haberlandt, tamamen farklılaşmış *Lamium purpureum* yapraklarından, *Eichhornia crassipes* petiyollerinden, *Pulmonaria mollissima* glandular tüylerinden ve *Tradescantia* stamen tüylerinden izole edilmiş hücreleri ilk kez Knop besin çözeltisinde kültüre alma girişiminde bulunmuştur. Deneyin amacı bu hücrelerde bölünmenin başarılması ve bütün bir bitki elde ederek Schleiden (1838) ve Schwann (1839)'ın ileri sürdüğü ünlü Hücre Teorisindeki hücresel totipotensi kavramını desteklemektir. Kültüre alınan

hücreler 1 aya kadar yaşamlarını sürdürdü ancak hacimlerinin artmasına rağmen bölünemediler [9].

Bu *in vitro* kültür çalışmalarının başlangıcından sonra hızlı gelişmeler göze çarpmaktadır.

- Hannig (1904) bazı *Brassica* bitkilerinin olgunlaşmakta olan embriolarını çıkararak mineral tuzlar ve şekerden oluşan ortamda olgunlaştırmayı başardı.

- 1922'de Almanya'da Kotte, ABD'de Robbins sürgün ve kök uçlarındaki meristematik hücrelerin *in vitro* kültürleri başlatmada kullanılabileceğini ileri sürdü. Kök kültüründe yaptıkları çalışmaları pek başarılı olmasa da bitki hücre ve doku kültürüne yeni bir yaklaşım getirdiler.

- Laibach (1925) *Linum perenne* ve *L. austriacum* 'u çaprazladı ve normalde yarım kalan tohum oluşumunu, olgunlaşmamış tohumdan embriyoları çıkarıp besin ortamında kültüre alarak melez bir bitki elde etmeyi başardı. Bu başarı bitki yetiştiriciliğine büyük katkılar sağlamıştır.

Çizelge 2. En çok kullanılan kültür ortamlarının makro ve mikro tuz içerikleri

En önemli ortamların Makro-Tuz İçeriği (mg l ⁻¹)							
	Knop	Knudsonc	Heller	Nitsch	Gamborg et al. BS	Schenk and Hildebrandt SH (1972)	Murashige and Skoog (1962)
İçerik	(1884)	(1946)	(1953)	(1972)	(1976)	(1972)	(1962)
KN03	250			950	2 500	2 500	1 900
NaN03			600				
Ca(N03)i. 4H20	1 000	1 000					
NH4N03				720			1 650
(NH4)iS04		500			134		
NH4H2P04						300	
NaH2P04. H20			125		150		
KH2P04	250	250		68			170
KO			750				
CaCl2. 2H20			75	220	150	200	440
MgS04. 7H20	250	250	250	185	250	400	370
Çizelge En önemli ortamların iyon içeriği (mmol l ⁻¹ içinde)							
N-total	10. 942	16. 036	7. 058	27. 385	26. 756	27. 336	60. 017
NHt		7. 567		8. 994	2. 028	2. 608	20. 612
N03	10. 942	8. 469	7. 058	18. 391	24. 728	24. 728	39. 405
H2P04	1. 837	1. 837	0. 906	0. 500	1. 087	2. 608	1. 249
K+	4. 310	1. 837	10. 060	9. 897	25. 815	24. 728	20. 042
ea2+	4. 234	4. 234	0. 510	1. 496	1. 163	1. 360	2. 993
Mg2+	1. 014	1. 014	1. 014	0. 751	1. 014	1. 623	1. 501
Sor	1. 014	4. 798	1. 014	0. 751	2. 028	1. 623	1. 501
Na+			7. 964				
c1-			11. 080	2. 991	2. 325	2. 721	5. 986
Total	23. 351	29. 756	39. 606	43. 771	60. 188	61. 999	93. 289
Çizelge En önemli ortamların Mikro-Tuz İçeriği (mg l ⁻¹) (in mg l ⁻¹)							
FeCl3·6H2O			1, 000				
FeS04. 7H20		25, 000		27, 800	27, 800	15, 000	27, 800
MnS04. 4H20		7, 500	0, 100	25, 000	13, 200	13, 200	22, 300
ZnS04. 7H20			1, 000	10, 000	2, 000	1, 000	8, 600
H3B03			1, 000	10, 000	3, 000	5, 000	6, 200
KI			0, 010		0, 750	1, 000	0, 830
CuS04. 5H20			0, 030	0, 025	0, 025	0, 200	0, 025
Na2Mo04. 2H20				0, 250	0, 250	0, 100	0, 250
CoCl2. 6H20					0, 025	0, 100	0, 025
NiCl2. 6H20			0, 030				
AlCl3			0, 030				
Na2EDTA				37, 300	37, 300	20, 000	37, 300

Çizelge 3. Günümüzde yüksek bitkilerin hücre ve doku süspansiyon kültürlerinden izole edilmiş doğal ürünlerin gruplandırılması

Fenilpropanoidler	Alkaloidler	Terpenoidler	Kinonlar	Steroidler
1. Anthosiyaninler	1. Akridinler	1. Karotenler	1. Antrokinonlar	1. Kardiyak glikosidler
2. Kumarinler	2. Betalainler	2. Monoterpenler	2. Benzokinonlar	2. Pregnenolon türevleri
3. Flavonoidler	3. Kuinolizidinler	3. Seskuiterpeneler	3. Naftokinonlar	
4. Hydroxycinnamoyl türevleri	4. Furonokinonlar	4. Diterpenler		
5. Isoflavonoidler	5. Harringtoninler	5. Triterpenler		
6. Lignanlar	6. Isokinolinler			
7. Fenolenonlar	7. Indoller			
8. Proanthosiyanidinler	8. Purinler			
9. Stilbenler	9. Piridinler			
10. Taninler	10. Tropan alkaloidler			

Bitki hücre ve doku kültürü uygulamalarının 3 temel alanı vardır;

- Sekonder metabolit üretimi (Çizelge 3)
- Mikroçoğaltım
- Bitki hücrelerinden genetik, fizyoloji, biyokimya ve patoloji alanında yapılan çalışmalar [52].

Yüksek değerli sekonder metabolitlerin üretiminde bütün bir bitki yerine farklı *in vitro* kültür tekniklerinin kullanılması cazip bir alternatif kaynak oluşturur. Bu tekniğin geleneksel üretime göre avantajları şu şekilde özetlenebilir;

- Coğrafik ve mevsimsel farklılıklardan ve çevre şartlarından bağımsızdır.
- Belirli kalite ve miktarda devamlı olarak üretim imkanı sunar.
- Ana bitkide normalde bulunmayan yeni bileşiklerin keşfine olanak sağlar.
- Tarım politikalarından etkilenmez.
- Hızlı üretim imkanı sunar [35].

Bitkilerde Sekonder Metabolit Üretimine in-vitro Olarak Hücre ve Doku Kültüründe Gerçekleştirilmesi

Biyoaktif bileşikler insan ve hayvanda farmakolojik veya toksikolojik etkileri olan bileşiklerdir. Bu moleküllerin doğal kaynaklardan ticari olarak üretilmesi çok verimli değildir. Biyoaktif maddeler genellikle kuru bitki ağırlığının %1'nden azdır. Bu yüzden bitki hücre ve doku kültürü teknolojisi yüksek değerli bu moleküllerin üretiminde alternatif üretim sistemi olarak görülmektedir.

Bitki doku kültürü ile biyoreaktör teknolojisinin birleşimi bitki kaynaklı biyoaktif moleküllerin ticari ölçekte üretilmesinde başarılı biyoreaktör teknolojisi gelişimi ile sonuçlanmıştır.

Biyoaktif bileşikler iki grupta sınıflandırılır:

- Sekonder Metabolitler (bitkiler, hayvanlar, mantarlar bakteriler vb. doğal kaynaklardan elde edilir)
- Terapötik rekombinant moleküller

Bileşikler farklı kaynaklardan üretilirse de bitkilerden elde edilen sekonder metabolitler piyasada daha çok talep görmektedir. Bu noktada bitki hücre ve doku kültür teknikleri ve biyoreaktör teknolojisinin birlikteliği kritik bir önem arz etmektedir.

İlaç endüstrisinde etken madde, tatlandırıcı, koku verici boyar madde, gıda takviyesi ve zirai kimyasallar olarak kullanım alanları bulunan sekonder metabolitlerin ana kaynağı bitkilerdir. Son yıllarda değerli sekonder metabolit üretiminde bütün bir bitkiyi yetiştirmek yerine bitki hücre ve doku kültürü uygulamaları bir alternatif olarak görülmektedir.

In vitro kültür ortamlarında sekonder metabolit üretimi için (1) kallus kültürü, (2) organ kültürü ve (3) somatik embriyo kültürü olmak üzere üç ana yol kullanılmaktadır (Şekil 3).

a) Kallus Kültürü

Temel olarak *in vitro* bitki hücre kültürü; bitki dokusundan (yaprak, kök gövde vb.) bir parçanın (eksplant), daha önceden steril edilmiş, bir kap içerisindeki (petri, erlen vb.) besin içeren ortama bırakılmasıyla başlar. Besi ortamı genellikle makro tuzlar, mikro tuzlar, vitaminler, myo-inositol, karbon kaynağı (örneğin; sükröz), bitki büyüme düzenleyicileri, eğer yarıkatı bir ortam ise katılaştırıcı madde olarak agar içerir. Günümüzde kullanılmakta olan ortamlara esas teşkil eden çeşitli kültür ortamları geliştirilmiştir (Murashige and Skoog 1962 ; Gamborg et al. 1968 ; Schenk and Hildebrandt 1972). Her bir bitki türü hatta her bir metabolit kendine özgü ortam ihtiyacı gösterir [3]. Bu farklı ortamlarda yapılan kültürler genellikle kallus kültürü ile başlar. Hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç noktası esas itibari ile kallus kültürüdür.

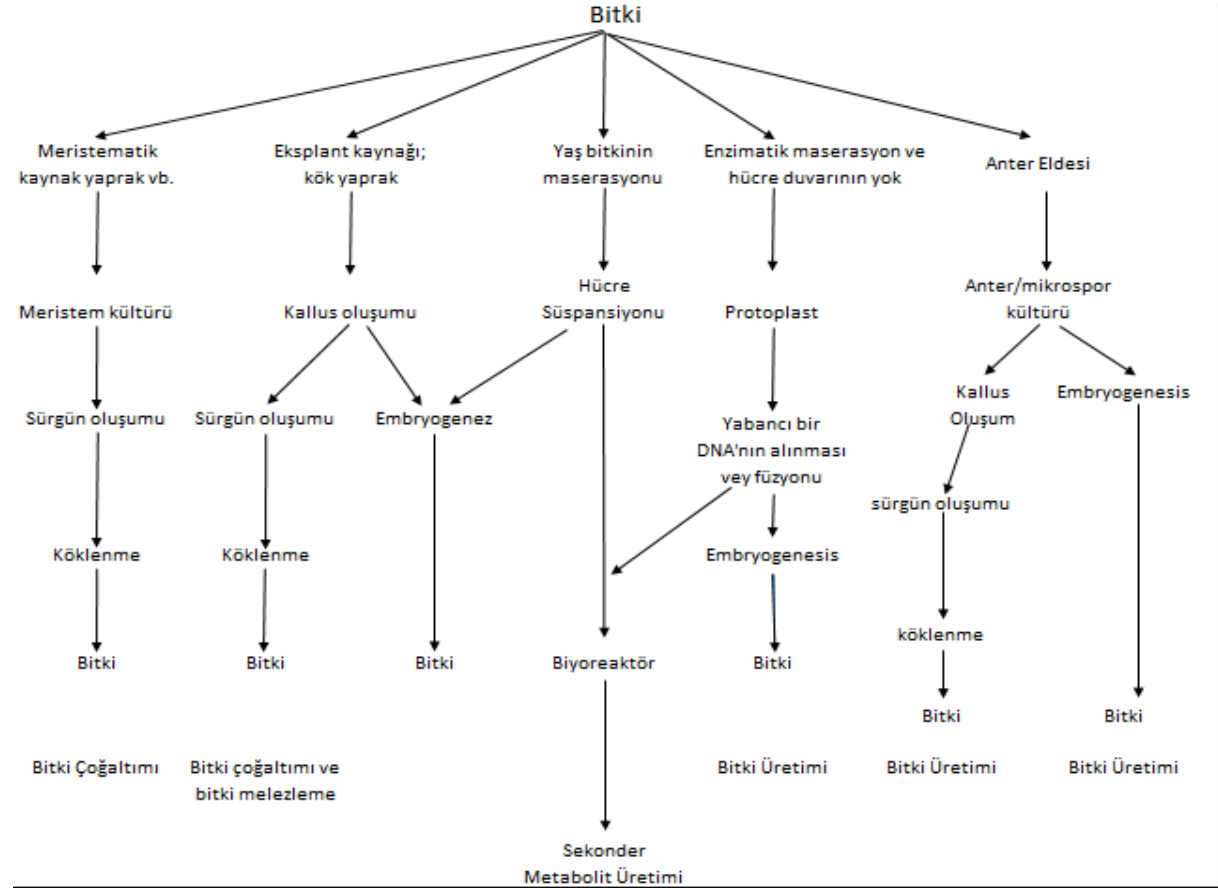
b) Hücre Süspansiyon Kültürü

Bitki *in vitro* kültürleri değerli sekonder metabolitlerin üretiminde teknolojik bir uygulama olarak oldukça dikkat çekmektedir. Farklılaşmamış hücreler bütünlüğü bozulmamış (intact) bir hücre ile karşılaştırıldıklarında çoğu zaman sekonder metabolit üretimleri indirgenmiş miktarlarda üretilir. Üretim miktarının azlığı kültürde farklılaşmanın olmaması nedeniyledir. Bu özellik büyüme eğrisi süresince değişebilmektedir. Fakat aynı zamanda bütün bir bitki karşılaştırıldıklarında kültürlerde bazı sekonder metabolitler yüksek miktarlarda üretilmektedir (Çizelge 4) [38]. Bazı metabolitler bitki hücre ve kök kültürlerinde bütün bir bitkide olduklarından çok daha fazla miktarda birikebilmektedir. Örneğin *Coleus*

blumei hücre süspansiyon kültürlerinde rosmarinik asit bütün bir bitkiye göre dokuz kat fazla elde edilebilmektedir. Bu noktada bitki sekonder metabolitlerinin üretiminde bütün bir bitki yerine *in vitro* hücre süspansiyon kültürlerinin veya farklı *in vitro* kültürlerin kullanılması büyük bir potansiyel oluşturmaktadır.

In vitro tekniklerin tarihi gelişimi süresince, bitki hücre kültürlerinden sekonder metabolit üretilebileceğine dair kanıtlar çok geç gelmiştir. Uzun bir süre kallus veya hücre

süspansiyon kültürlerindeki farklılaşmamış hücrelerin, farklılaşmış hücre veya özelleşmiş organlardan farklı olarak sekonder metabolit üretme yeteneklerinin olmadığı düşünülmüştür. Zenk ve arkadaşları (1991) *Morinda citrifolia* 'nın farklılaşmamış hücre kültüründen her bir litrede 2.5 gr antrakınon üretimini deneysel olarak göstermeleri bu hipotezin yanlış olduğunu göstermiştir. Bu gelişme endüstriyel kullanım amaçlı sekonder metabolitlerin üretiminde araştırmacılara yeni kapılar açmıştır [10].



Şekil 3. Bitki hücre ve doku kültürü kullanımının şematik gösterimi [31].

Çizelge 4. Hücre kültüründe yüksek miktarda üretilen sekonder metabolitler (% kuru ağırlık)

Bileşik	Bitki Türü	Kültür	Bitki	Kültür Tipi*
Şikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	20	1.5	s
Cinsenosid	<i>Panax ginseng</i>	27	4.5	c
Anthrakınonlar	<i>Morinda citrifolia</i>	18	0.3	s
Ajmalisin	<i>Catharanthus roseus</i>	1.0	0.3	s
Rosmarinik asit	<i>Coleus blumei</i>	15	3	s
Ubikinon-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	0.036	0.003	s
Diosgenin	<i>Dioscorea deltoides</i>	2	2	s
Benzilisoskinolin Alkaloidleri	<i>Coptis japonica</i>	11	5-10	s
Berberin	<i>Thalictrum minus</i>	10	0.01	s
Berberin	<i>Coptis japonica</i>	10	2-4	s
Anthrakınonlar	<i>Galium verum</i>	5.4	1.2	s
Anthrakınonlar	<i>Galium aparine</i>	3.8	0.2	s
Nikotin	<i>Nicotiana tabacum</i>	3.4	2.0	c
Bisoklaurin	<i>Stephania cepharantha</i>	2.3	0.8	s
Triptidolid	<i>Tripterygium wilfordii</i>	0.05	0.001	s

*s: süspansiyon; c: kallus.

Hücre süspansiyon kültürü ile sekonder metabolit üretmek her bitki için mümkün olamamaktadır. Bu sebepten, bir alternatif olarak, sekonder metabolit üretiminde kullanılmak üzere çeşitli bitki türleri için organ kültürü (örneğin, kök, embriyo, sürgün kültürleri) metotları geliştirilmiştir. Bir çok tıbbi bitkide doğada olduğundan oldukça fazla sekonder metabolit oluşumunun görüldüğü sürgün kültürleri yapılmıştır. Örneğin *Bacopa monnieri* bitkisinden bakozyd A (bacoside A) üretimi için oluşturulan sürgün kültüründe doğal ortamında yetiştirilen bitki ile kıyaslandığında 3 kat daha fazla bakozyd A üretilmiştir (Çizelge 5) [30].

c) Organ Kültürleri

Hücre süspansiyon kültürü farklılaşmamış hücrelerdir

ve depo yapıları yoktur. Sekonder metabolitler kültürdeki hücrelerin vakuollerinde veya stoplazmalarında biriktirilirler ya da ortama salgılanırlar. Hücre içerisinde sekonder metabolitlerin biriktirilmesi hücrelerin belirli bir süre sonra bozulmasına veya ölmesine neden olabilir. Ortama salınan ürünler ortama salınmış enzimler tarafından bozulmaya yatkındırlar. Bu nedenlerden dolayı bazı sekonder metabolitlerin üretiminde hücre süspansiyon kültürlerine nazaran organ kültürleri sekonder metabolit üretimine büyük katkılar sağlamaktadır. Çizelge 6'da organ kültürleri ile kallus ya da hücre süspansiyon kültürlerinden daha çok miktarda üretilmiş sekonder metabolitler gösterilmiştir. Son yıllarda birçok araştırmacı hücre süspansiyon kültürü yanında transformasyona uğramış kök kültürlerine yönelmiştir.

Çizelge 5. *in vitro* hücre kültürlerinde elde edilen sekonder metabolitler

Bitki Türleri	Sekonder Metabolitler	Aktivite	Referanslar
<i>Lavandula viridis</i> Her	3-O-kaffeoilkuinik, 4-O-kaffeoilkuinik, 5-O-kaffeoylquinic, rosmarinik asitler, luteolin ve pinosembriin	Antioksidan, anti-kolinesteraz	Costa et al. (2013)
<i>Ocimum basilicum</i>	β -karyofillen, esansiyel yağlar	Antiviral, antioksidan, antibakteriyel. Aroma	Bertoli et al. (2013)
<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	Labdan diterpenler	Antibakteriyel, sitotoksik	Skoric et al. (2012)
<i>Valeriana glechomifolia</i>	Valepotriatler	Mild sedative	Russowski et al. (2013)
<i>Larrea divaricata</i>	Nordihidroguaiaretik asit	Antioksidan, inhibitors of lipoksigenazlar	Palacio et al. (2012)
<i>Vitis vinifera</i>	Anthosiyeninler	Antioksidan	Nagamori et al. (2001)
<i>Salvia spp.</i>	Terpenoidler, polifenoller	Antioksidan, antimikrobiyal, anti-enflamatuar, anti- karsinojenik	Marchev et al. (2013)
<i>Berberis buxifolia</i> Lam	Berberin	Antibakteriyel, anti-diarrheal, antispasmodic	Alvarez et al. (2009)
<i>Silybium marianum</i> (L.)	Silimarin	Anti-enflamatuar, antioksidan, anti- karsinojenik	Sánchez- Sampedro et al. (2008)
<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	Steviosidler	Tatlandırıcı	Rajasekaran et al. (2008)
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hiperisin, psüdohiperisin ve hiperforin	Nörolojik rahatsızlıklar ve depresyon tedavisi	Zobayed et al. (2003)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Flavonoidler	Antimikrobiyal,	Li et al. (1998)
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenosidler	Antioksidan	Huang et al. (2013a), Huang et al. (2013b)
<i>Thalictrum minus</i>	Berberin	Anti-bakteriyel, anti-diaral, antispasmodik	Kobayashi et al. (1988)
<i>Papaver somniferum</i>	Sanguinarin	Anti-karsinojenik, antimikrobiyal	Park et al. (1990)

Çizelge 6. Kallus veya hücre süspansiyon kültürüne göre yüksek verimlikte sekonder metabolit üretilen organ kültürleri [13]

Metabolit	Bitki türü	Kültür formu
Digitoksin	<i>Digitalis purpurea</i>	Sürgün
Diosgenin	<i>Dioscorea composita</i>	Sürgün
Skopolamin	<i>Datura innoxia</i>	Kök
Tropan alkaloidler	<i>Hyoscyamus niger</i>	Kök
Vithanolidler	<i>Withania somnifera</i>	Sürgün
Thiofenler	<i>Tagetes patula</i>	Kök

Bitki hücre kültürlerinde, hücrelerin yavaş büyümesi, iki kat hacme ulaşma süresinin (doubling time) yüksekliği (yaklaşık 30-40 saat), belirli maddelerin üretim düşüklüğü (*L. erythrorhizon* süspansiyon kültüründen şikonin üretimin hacimsel miktarı 0,1 gr L⁻¹d⁻¹ olarak bildirilmiştir), parçalanmaya karşı yüksek hassasiyetleri ve kültür ortamına ürün salınımının kolay olmaması başlıca sorunları oluşturmaktadır. Hücre kültüründe yaşanan bu zorlukları üstesinden gelen en önemli organ kültürü çeşiti kök (hairy roots) kültürleridir. Kök kültürleri *Agrobacterium rhizogenes* ile dönüştürülmüş devamlı büyüme gösteren

dokularla elde edilir. *A. rhizogenes* bitkilerde kök hastalığına (hairy roots) sebep olan bir gram (-) toprak bakterisidir. Bitkilerde büyüme oranında artış, genetik stabilite ve hormonsuz ortamda büyüme *A. rhizogenes* ile dönüşüme uğramış bitkilerde *in vitro* kültürlerde görülen özelliklerdir. Normal kök kültürleri de sekonder metabolit üretebilmektedir ancak transforme edilmiş kök kültürleri biyokütle üretiminde daha hızlıdır, daha fazla yanal dallanma ve sekonder metabolit verimi göstermektedir (Çizelge 7).

Çizelge 7. Kök (HR) kültürlerinden sekonder metabolit üretiminde yapılmış güncel çalışmalar [11].

Bitki türü	Sekonder metabolit	Hacim	İçerik	Referans
<i>Arachis hypogaea</i>	Resveratrol	250 ml F	4. 3 nmol/g DW (kök),	Condori et al. (2010)
			420. 7 nmol/g DW (ortam)	
			1. 2% DW (ort. Ekstrat)	
<i>Artemisia annua</i>	Drimartol A	250 ml F	383. 2 mg/l	Zhai and Zhong (2010)
<i>Beta vulgaris</i>	Betalains	500 ml F	47. 1 mg/g DW	Georgiev et al. (2010)
<i>Brassica rapa</i>	Glucosinolates	250 ml F	80 l mol/g DW	Kastell (2009)
<i>Brugmansia candida</i>	Anisodamine	1. 5 l B	10. 1 mg/g DW	Cardillo et al. (2010)
<i>Centella asiatica</i>	Triterpenoids	100 ml F	0. 55% DW	Kim et al. (2010)
<i>Catharanthus roseus</i>	Catharanthine	250 ml F	1. 96 mg/g DW	Wang et al. (2010)
	Alkaloid	250 ml F	4 mg/g DW	Li et al. (2011)
<i>Chinese cabbage</i>	Indole glucosinolates	100 ml F	1. 6 l mol/g FW	Zang et al. (2009)
<i>Coleus blumei</i>	Rosmarinic acid	100 ml F	78 mg/g DW	Bauer et al. (2009)
<i>Datura stramonium L.</i>	Hyoscyamine	250 ml F	110. 3 mg/l	Amdoun et al. (2010)
<i>Fagopyrum esculentum M.</i>	Rutin	100 ml F	1. 3 mg/g DW	Kim et al. (2010)
<i>Gentiana macrophylla</i>	Gentiopicroside	150 ml F	0. 11 mg/g DW	Zhang et al. (2010)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Flavonoid	100 ml F	28. 38 mg/g DW	Zhang et al. (2009)
<i>Gossypium hirsutum L.</i>	Gossypol	250 ml F	2. 43 mg/g DW	Verma et al. (2009)
<i>Panax quinquefolium L.</i>	Ginsenoside	250 ml F	200 mg/g DW	Mathur et al. (2010)
<i>Plumbago indica</i>	Plumbagin	250 ml F	11. 96 mg/g DW	Gangopadhyay et al. (2011)
<i>Psoralea corylifolia</i>	Daidzein	250 ml F	2. 06% DW	Shinde et al. (2010)
	Genistein	250 ml F	0. 37% DW	
	Psoralen	250 ml F	3 mg/g DW	Baskaran and Jayabalan (2009)
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Tanshinone	200 ml F	6. 9 mg/l	Yan et al. (2011)
		250 ml F	2. 727 mg/g DW	Kai et al. (2011)
		125 ml F	1. 59 mg/g DW	Zhao et al. (2010)
<i>Salvia sclarea</i>	Diterpenoid	10 l B	67. 5 mg/g DW	Kuzma et al. (2009)
<i>Taxus x media var. Hicksii</i>	Paklitaksel	250 ml F	568. 2 l g/l	Syklowska-Baranek et al. (2009)

F Erlen, B biyoreaktor, DW kuru ağırlık, FW yaş ağırlık

d) Somatik Embriyo Kültürleri

Bitki doku kültüründe somatik embriyogenez kavramı ilk kez 1958 havuç vejetatif hücrelerinde keşfedilmiştir [36,44].

Somatik embriyogenez, Williams ve Maheswaran (1986) tarafından gametlerin birleşimi olmaksızın haploid veya diploid hücrelerin karakteristik embriyonik aşamalardan geçerek bitkiyi oluşturması süreci olarak tanımlanmıştır [51]. Kısacası, vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak isimlendirilir. Direkt ve indirekt olmak üzere üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Aralarındaki fark kallus oluşum safhasının direkt embriyogenezde bulunmamasıdır.

Türkiye'nin endemik tıbbi bitkilerinden *Digitalis trojana* Ivan. için hem sürgünlerinden organogenez yolu ile hem de direkt somatik embriyo kültürleri başarı ile gerçekleştirilmiştir [15,48]. *Digitalis* türlerinde görülen sekonder metabolitler olan digoksin üretiminde somatik embriyogenezin de kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

In vitro Kültürlerde Sekonder Metabolit Üretimi için Optimizasyon

Bitki hücre ve doku kültürleri sekonder metabolit üretimi amacıyla yapılıyorsa çalışmaları bazı aşamaları tamamlayarak ilerletmek gerekir (Çizelge 8).

Çizelge 8. Bitki hücre ve organ kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırma stratejileri (Murthy et al.'dan değiştirilerek 2014).

1. Aşama

- **Hücre hatları veya klonların seçimi**
- **Ortam optimizasyonu**
 - Besin ortamının ve tuz direncinin etkisi
 - Karbonhidrat kaynağının ve konsantrasyonunun etkisi
 - Azot kaynağının etkisi
 - Fosfat ve büyüme düzenleyicileri miktarlarının etkisi
- **İçerik hacminin etkisi**
- **Kültür şartlarının optimizasyonu**
 - Sıcaklığın etkisi
 - Işık yoğunluk ve kalitesinin etkisi
 - Hidrojen iyonu konsantrasyonunun (ortam pH) etkisi
 - Karıştırma ve havalandırmanın etkisi

2. Aşama

- Elisitasyon
- Besin eklenmesi
- Prekürsör eklenmesi
- Permeabilizasyon
- Sabitleme
- Metabolitlerin seçici emilimi veya faz sistemler
- Biyotransformasyon
- Sekonder metabolit kaynağı olarak organ kültürleri
- Hücre ve organ kültürlerinin ölçek artırımı
- Biyoreaktor uygulamalarına geçiş

Genel olarak, sekonder metabolit üretimi için *in vitro* bitki hücre kültürlerinin uygulanmasında iki temel aşama vardır. Birincisi *in vitro* kültür ortamının kurulması ve sürdürülmesi ile ilgilidir. Bu aşama kültür şartlarının optimizasyonunu (kültürün içeri, ışık, karanlık, sıcaklık vb) ve yeni ortamlara geçişler (alt kültür) esnasında kültürün canlılığının sürdürülmesini içerir. Genellikle bu aşamada doğada görülenden daha sıklıkta, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikiminden kaynaklanan *in vitro* kültürlerin karakteristiği olarak somaklonal varyasyonlar görülür. Bu varyasyonlar dokular kaynak bitkiden alınıp kültür ortamına alındığında genellikle indirekt kültürlerde görülür.

Hücre çoğalması morfolojik, genetik, moleküler ve biyokimyasal seviyede heterojen bir hücre popülasyonu üretir ve zaman geçtikçe artar. Bu nedenle üretim hattı boyunca sürekli olarak gözlem ve seçimin uygulanması gereklidir. Eğer *in vitro* kültürlerde bu esas ihmal edilirse yüksek verim elde etme girişimine çoğu zaman ulaşılamaz. İkinci aşama verimi artırmak için şartların optimizasyonu ve laboratuvar ölçeğinden biyoreaktör ölçeğine yükselmektir [3].

Bitk hücre kültürleri ile sekonder metabolit üretimi için yapılan çalışmaların çok az bir kısmı endüstriyel ölçekte uygulama alanı bulabilmiştir (Çizelge 9).

Çizelge 9. Bitki hücre kültürü ile sekonder metabolitlerin endüstriyel üretimi [2].

Metabolit	Bitki Türü	Üretici
Şikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.
Cinsenosidler	<i>Panax ginseng</i>	Nitto Denko Corp.
Purpurin	<i>Rubia akane</i>	Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.
Paklitaksel	<i>Taxus spec.</i>	Phyton Biotech

Kültür Ortamı Bileşenleri ve Kültür Ortamı Koşulları

Ortam bileşenleri (karbon, azot, fosfor ve potasyum kaynakları) hem primer metabolizmayı hem de sekonder metabolizmayı etkiler. En çok kullanılan *in vitro* kültür ortamlarından biri olan Murashige ve Skoog (MS) ortamının kültür içeriği çizelge 10'da gösterilmiştir.

Çizelge 10. Murashige ve Skoog kültür içeriği (Murashige and Skoog 1962)

Grup	İçerik
Major inorganik tuzlar	NH ₄ NO ₃ , KNO ₃ , CaCl ₂ . 2H ₂ O, MgSO ₄ . 7H ₂ O, KH ₂ PO ₄
Minor inorganik tuzlar	KI, H ₃ BO ₃ , MnSO ₄ . 4H ₂ O, ZnSO ₄ . 7H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O, CuSO ₄ . 5H ₂ O, CoCl ₂ . 6H ₂ O
Demir Kaynağı	FeSO ₄ . 7H ₂ O, Na ₂ EDTA. 2H ₂ O
Vitaminler	Myo-inositol, nikotik asit, piridoksin-HCl, thiamin-HCl, glisin
Karbon kaynağı	Sükroz

Kültür ortamının temel bileşenleri makro elementler olarak bilinen azot, fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve sülfür; mikro elementler olarak bilinen demir, mangan, çinko, bor, bakır, molibden; karbon kaynağı (sükroz, glukoz, laktoz, maltoz, nişasta), vitaminler, myo-inositol ve bitki büyüme düzenleyicileridir.

Genelde hücre büyümesi ile büyümenin ileri aşamalarındaki sekonder metabolit üretimine yönelik ürün verimi arasında ters bir ilişki vardır. Bu nedenle karbon, azot ve fosfor kaynaklarını sınırlandırarak büyümeyi engellemek sekonder metabolit üretimini artırmada önerilen bir stratejidir.

Kültür ortamının diğer bileşenleri de verimi artırmak amacıyla değiştirilebilir. Örneğin, *Silybum marianum* (L.) Gaertn hücre süspansiyonu kalsiyum bulundurmeyen MS ortamında büyütülmüş ve sonuçta silimarin üretiminde artış görülmüştür. Bir paradoks olarak soya fasulyesi kültürlerinden kalsiyum çıkarıldığında isoflavonoid üretimi azalmaktadır.

Hücre ve doku kültürlerinde ışık, sıcaklık, ortam pH seviyesi ve ortamdaki temel gazlar gibi kültürün ortam koşullarının biyokütle artışı ve sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkisi de araştırılmıştır [30].

Kültüre alınmış hücre ve organlar için genellikle 17 – 25 °C sıcaklık kullanılmıştır. Ancak her bir bitki türü farklı sıcaklıklarda optimum büyüme ve metabolizma sergileyebilmektedir. Bitki biyoteknolojisinin ilk gelişim dönemlerinden itibaren sıcaklığın etkisi araştırılmaktadır. Morris (1986) *Catharanthus roseus*'un C87 hücre hattında yaptığı çalışmalarında maksimum büyümenin 35 °C'de, maksimum kuru ağırlık veriminin (0.47 g g⁻¹) 25 °C'de gerçekleştiğini bulmuştur. Scragg ve arkadaşları (1988) ise aynı bitkinin ID1 hücre hattını 20, 25 ve 30 °C'de çalışmış ve maksimum biyokütle veriminin (0.65 g g⁻¹) 25 °C'de gerçekleştiğini bulmuştur [30].

Işık, hücre ve organ kültürlerinde büyüme ve sekonder metabolit üretimini etkileyen bir enerji kaynağıdır. Chan ve arkadaşları (2010) *Melastoma malabathricum* kültürlerinde farklı ortam faktörü olarak ışık yoğunluğu ve nın (devamlı ve devamlı karanlık) hücre biyokütle verimine ve antosiyanin üretimine olan etkisini araştırmıştır. Ortalama bir yoğunlukta (300 - 600 lux) antosiyanin üretiminde artış tetiklemiş, 10 gün boyunca devamlı karanlığa bırakılmada en düşük pigment içeriği gözlenmiş ve 10 gün boyunca ışığa bırakılmada en yüksek pigment içeriği gözlemlenmiştir.

Ortam pH seviyesi genellikle 5-6 arasında (otoklavlanmadan önce) ayarlanır ve ekstrem değerlerden kaçınılır. Hidrojen iyonlarının konsantrasyonu kültür ortamında besinlerin tüketilmesi veya metabolit birikimi nedeniyle değişir. Örneğin McDonald ve Jackman (1989) kültür ortamında amonyum asimilasyonu ve nitrat tüketimi nedeniyle ortam pH seviyesinde azalış ve artışlar olduğunu bildirmişlerdir [30].

Bitki Yaşı Ve İçeriğin Hacı

Başlangıç materyalinin yaşı sekonder metabolit üretiminin organizmanın fizyolojik yaşına duyarlı olması nedeniyle anahtar bir etkidir. Ayrıca kültüre alınan canlı içeriğin (inoculum) hacmi de önemlidir. Her bir alt kültüre alma işleminde taze besi ortamına konulan hücrelerin miktarı büyüme oranını ve de dolayısıyla sekonder metabolit üretim verimini de etkileyecektir. Genel olarak konulan hücre yoğunluğunun düşürülmesi büyüme oranı ve sentez hızını artırır ve son ürün miktarını düşürür.

İçerik hacminin biyokütle ve sekonder metabolit üretimini üzerine olan etkisi konusunda birçok çalışma yapılmıştır. *Perilla frutescens* hücre süspansiyon kültüründe, litre başına konulacak hücre hacminin 50 g. yaş ağırlığa ayarlanması ile litrede maksimum 38,3 g. kuru ağırlıkta hücre yoğunluğu elde edilmiş, ayrıca antosiyanin üretimi 23 kat artmıştır [30].

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (BBD)

BBD'lerin hücre büyümesi ve sekonder metabolit üretimine önemli bir etkisi vardır. Primer metabolizma bitki hayatına enerji ve yapısal birimler getirirken BBD'ler her bir kısmın büyümesini düzenler ve bitkinin bütününe entegre eder. Genel anlamda BBD'ler düşük konsantrasyonlarda fizyolojik süreçlere etki eden bitki-organik molekülleridir. Bu süreçler büyüme, farklılaşma ve gelişmedir. Stoma hareketleri gibi diğer süreçler de BBD'lerden etkilenirler. BBD'ler genelde şu gruplar içinde sınıflandırılır; oksinler, sitokininler, giberilinler, etilen, absisik asit ve jasmonik asit. Bunlardan oksinler ve sitokininler in vitro kültürde önemlidirler.

Çıkarma ve Eklemeler, Prekürsörler (Removal and Addition or Precursors)

Son ürünlerin çıkarılması inhibitör etkisini gidermek maksatlıdır. Bu yaklaşımın faydalı etkisi *C. roseus* süspansiyonlarında *Miracloth* gözeneklerine ilişik reçine eklenmesine müteakip ajmalisin artışında gösterilmiştir (Wong et al. 2004).

Uyarma (Elisitasyon)

Bitki kökleri, hücre süspansiyonları ve kalluslardan ortama salınan kimyasallar genel olarak eksüdatlar olarak tanımlanır. Eksüdatlar bitkinin çevresine adaptasyonunda önemli rolleri olan çok miktarda çeşitli biyoaktif bileşik içerirler. Ortama bir çok çeşit bileşik salma yeteneği bitki hücrelerinin en göze çarpan metabolik özellikleridir. Fotosentez yolu ile fikse edilen karbonun %5-21'i kök hücrelerinden eksüde edilir. Eksüstasyon süreci iyonlar, serbest oksijen, su, enzimler, müsilaj ve karbon bulunduran çeşitli primer ve sekonder metabolitlerin salınımını kapsar. Eksüstasyon beslenme durumu, ışık yoğunluğu, sıcaklık gibi bir çok biyotik ve abiyotik faktörlerden etkilenir. Eksüstasyonla salınan bileşiklerin verimini artırmak için çeşitli teknikler geliştirilmiştir [11].

Elisitörler, biyolojide, yaşayan bir organizma ile karşılaştıklarında başka bir bileşimin sentezlenmesini aktive eden bileşiklerdir. Örnek olarak, üzüm asması hücre kültürlerinde delta-viniferin biosentezini uyaran jasmonik asit molekülü gösterilebilir [39].

Günümüzde sekonder metabolitler hakkında genel kabul bitkinin savunma sisteminin parçaları olduğudur. Hücre veya kök hücreleri çeşitli biyotik [enzimler, mikroorganizmaların hücre duvarı kısımları, mikroorganizma polisakaritleri (kitin, gluklan), glikoproteinler, fiziksel hasarlara karşı bitki tarafından üretilen fitokimyasallar, mantar yada bakteri saldırıları, bitki hücre duvarı polisakaritleri (pektin, selüloz) çitosan, gluklanlar, saliklik asit, bitki aktivetleri ile mikroorganizma hücre duvarında oluşan metil jasmonat] yada abiyotik [inorganik tuzlar, ağır metaller, UV ışınlar, aşırı tuzluluk, yüksek yada düşük ozmolarite, aşırı sıcaklık, ve yüksek basınç] faktörlere maruz kaldıklarında sekonder metabolit verimlerinin arttığı görülmüştür [11]. Elisitör kullanmanın avantajı olarak bu ürünler sıklıkla ortama salınırlar (Brodellius 1990).

Farklılaşma ve Kompartmanlaşma (Differentiation and Compartmentation)

Sekonder metabolit birikimi bitkinin büyüme ve gelişmesine bağlı olarak iki farklı şekilde gerçekleşir: (1) Büyümenin durgun fazı esnasında yada farklılaşma ile bağlantılı olarak (*V. vinifera* kültürlerinden antosiyanin üretiminde olduğu şekilde), (2) Hızlı büyüme fazı esnasında, (soya bitkisinin kallus süspansiyon kültürlerinden flavonoid üretiminde olduğu gibi). İkinci durum daha sık görülür çünkü bitkinin belirli sekonder metabolitleri sentezleyebilmesi için belirli bir derecede farklılaşmaya ihtiyacı vardır. Sekonder metabolitlerin biosentezi bitkinin bütün hücre ve dokularında yapılabilsede genellikle bazı sekonder metabolitlerin biosentezi belirli dokularla hatta belirli hücrelerle sınırlandırılmıştır.

Hücre kompartmanlaşmasına da ayrıca önemlidir. Bazı moleküller sadece stoplazmada üretilirken diğerleri kloroplast, mitokondri ve endoplazmik retikulumda üretilir. *Panax japonicus* var. *repens*'in in vitro hücrelerinde cinsenosid oluşumunun, PPD-tipi cinsenosidlerin biriktirilmek üzere vakuollere yönlendirilmesinin

malonilasyona bağlı olması nedeniyle kompartmanlaşma ile yakından ilgili olduğu ileri sürülmüştür.

Sekonder metabolitlerin büyük bir kısmı hidrofiliktir ve dolayısıyla hücrede ana depo alanları vakuollerdir. Hidrofobik sekonder metabolitlerin depo alanları ise membranlar, veziküller, ölü hücreler ve hücre duvarı gibi hücre dışı yapılarıdır [11].

Ürün elde etme maliyetlerini düşürmede bileşiklerin vakuollerden kültür ortamına transferini artırmak faydalıdır. Sıvı ortamlardan metabolitlerin alınması en kolay ve verimli yoldur. Bu nedenle hücre süspansiyon kültürleri ve kök kültürleri daha çok ilgi görmektedir [11].

Biyotransformasyon

Biyotransformasyonlar hücre, organ veya enzimler tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyonlardır. Biyotransformasyonlar hücre, organ veya organizmalar tarafından basit substratların bir araya getirilmesi ile oluşturulan kompleks ürünlerin biyosentezinden farklıdır. Ayrıca kompleks maddelerin küçük birimlerine indirgendiği biyodegradasyonları da farklıdır. Biyotransformasyon yeni ürünler oluşturmada ve bilinen ürünleri daha verimli üretmede büyük bir potansiyele sahiptir [24].

Ramachandra et al. (2000) *Capsicum frutescens* serbest yüzey ve sabitlenmiş hücrelerini protokatekuik aldehid ve kafeik asiti (protocatechuic aldehyde and caffeic acids) vanilin ve kapsaikine (capsaicin) dönüştürmek için kullanmışlardır. Ayrıca Li et al. (2005) kültüre alınmış hücre ve kültürlerde cinsengi paeonol'ü glikozidlerine dönüştürmede kullanmışlardır [30].

Permeabilizasyon

Kültüre alınmış hücreler, hücre içi sekonder metabolitlerini daha çok vakuollerde biriktirir. Dolayısıyla bu ürünlerin ortama salınımının gerçekleştirilmesi amacıyla çeşitli uygulamalar geliştirilmeye çalışılmıştır. Ürünlerin vakuollerden salınımının başarılması için aşılması gereken iki adet membran engeli vardır; hücre zarı ve tonoplast. Hücre permeabilizasyonu bir veya daha fazla membran sisteminde moleküllerin geçebileceği por oluşumuna dayanır. Bitki hücrelerinde permeabilizasyonu hızla gerçekleştirmek için bir çok girişimde bulunulmuştur. Hücre geçirgenliğini artırmak için çok çeşitli metotlar ve ajanlar kullanılmıştır. Bu ajanlar arasında pH değişikliği, dimetilsülfoksit (DMSO), Tween 20 (polioksietilen sorbitan monolurat) ve çitosan eklenmesi gibi kimyasal uygulamalar ve vurgulu (pulsed) elektrik alanlar, ultrasonik ve yüksek hidrostatik basınç gibi fiziksel uygulamalardır [11].

Sabitlenme (Immobilization)

Hücre sabitlemesinde başlıca iki yöntem vardır; (1) jelle hapsedme yöntemi ve (2) yüzey sabitleme yöntemi. En çok kullanılan yöntem ise jelle hapsedme yöntemidir [30]. Sabitleme (Immobilization) bitki hücrelerini, koşulları sekonder metabolit üretimi için daha uygun hale getiren bir mikro çevre içinde yakın temas halinde büyümeye zorlar. Temel olarak, bitki hücreleri, bir polimerik matris (aljinat, agar, karrajenan, kitosan, jelatin boncuklar veya yüzeyler) içine sabitlenir ve büyümelerinin durağan fazındaki hücrelere uygun ortam koşulları sağlayan bir tank içinde kültüre alınır [3]. En çok kullanılan matris kalsiyum aljinattır. Kullanılan matris, hücrelere karşı toksik olmamalı, pahalı olmamalı ve iyi bir polimerizasyon aktifliğine sahip olmalıdır [30].

Sabitlenme yöntemini ilk kez Brodelius ve arkadaşları (1979) tarafından *Morinda citrifolia*, *Digitalis purpurea* ve *Catharanthus roseus* kültürlerinde rapor edilmiştir [30]. Diğer bir yöntem olarak yüzey sabitleme, kültüre alınmış hücrelere, sıvı içine daldırılmış sabit yüzeylere tutunma avantajı sağlar. DiCosmo ve arkadaşları (1994) *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* ve *Glycine max*'ta metabolit üretiminde bitki hücrelerinin yüzeylere tutunumu ve cam elyaflara sabitlenmesi çalışmalarını derlemiştir [30].

Attree ve arkadaşları (1994) biyoreaktörde Ak ladin (*Picea glauca*) embriyolarını ürettiklerini bildirmişlerdir. Biyoreaktör kültür haznesi ve ortam deposundan oluşmuştur. Kültür haznesine olgunlaşmamış somatik embriyolar (proembryo) sıvı ortamın yüzeyindeki emici pedde kültüre bırakılmıştır. Taze ortam peristaltik pompa ile hazneye bir uçtan verilmiş, diğer taraftan tükenen ortam yerçekimi etkisiyle alınmıştır. 7 haftalık kültür döneminin sonunda elle müdahale edilmeden tek haznedeki 6300 adet normal görünümülü kotiledon aşamasında embriyo elde edilmiştir. Somatik embriyolar kurumadan sonra yüksek oranda normal fidelere dönüşmüştür [26].

Paques ve arkadaşları (1995) sıvı ortam üzerinde poliüretan katmanlı biyoreaktörde EMSs'den (embryonal suspensor masses) *Picea abies*'ta kotiledon aşama embriyolarını üretmeyi başardıklarını bildirmişlerdir. EMSs'ler sıvı olgunlaşma ortamına dik olarak yerleştirilen poliüretan katmana sabitlenmiş ve aralıklarla sıvı ortama daldırılmıştır [26].

Biyoreaktörler

Tanım ve Tarihsel Gelişimi

Biyoreaktör için yapılan çeşitli tanımlar bulunmaktadır. Biyoreaktörler, içlerinde canlı organizma, hücre veya dokuların, sıvı besin ortamında kültüre alındığı, içerisindeki şartların sıkı bir şekilde kontrol altında tutulduğu mekanik kap veya tanklar olarak tanımlanabilir. Biyoreaktör terimi genellikle fermentör ile eş anlamlı kullanılır. Ancak fermentör anaerobik ortamda şekerden alkol elde etmekte kullanılan dar bir anlam taşımaktadır. Biyoreaktörleri geleneksel kimya reaktörlerinden ayıran temel fark canlı-biyolojik içeriklerin kontrolü ve desteklenmesidir [41].

Biyoreaktör, bir başlangıç materyalinden ulaşılmak istenen ürünleri elde etmek için bir yada daha fazla biyokimyasal tepkimeyi gerçekleştirmekte kullanılan bir araç veya aygıt olarak da tanımlanabilir. Biyoreaktörler biyolojik temelli süreçlerin gelişiminde ulaşılan son adımları temsil eder. Genel olarak, biyoreaktörün temel işlevi; etkin hücre büyümesi ve metabolizma için çeşitli anahtar çevresel (kimyasal ve fiziksel) faktörleri sıkı bir şekilde düzenlenmek suretiyle en uygun koşulları sağlamaktır [23].

Biyoreaktör, kültür ortamındaki pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen miktarını algılayan problemlerin yerleştirildiği, kültür ortamının aseptik şartlarını bozmaksızın taze ortam eklenmesine ve ürünlerin çıkarılmasına (operasyon moduna göre), pH düzenlemesi, hava sağlama, karıştırma ve ısı kontrolüne imkan sağlayan bir elektronik kontrol paneline sahip cam, plastik veya çelikten yapılmış tanktır. Böylelikle biyoreaktör kültür şartlarının yakın takibini mümkün kılan, gerekli fiziksel ve kimyasal müdahaleleri programlandığı şekliyle yerine getiren mekanik ve elektronik özelliklere sahip teknolojik bir sistemdir.

29 Mayıs 1956'da Routine ve Nickell (Pfizer & Co Inc, NY, ABD ile birlikte) bitki hücrelerinin *in vitro* üretiminde ilk patenti almışlardır. "Bitki dokularının kültüre alınması" başlığı altındaki patentte bazı bitkilerin (örneğin; ekşi yonca- sorrel, kokulu yonca- sweet clover-*Melilotus ssp.*, sabır otu- Agave ...) dokularını 20 L damacana sistemine daldırılarak kültüre aldıklarını belirtmişlerdir [22].

1960'ların başında NASA yenileyici hayat destek sistemleri için bitki hücre kültürleri üzerine bir araştırma başlattı. Bitki hücre kültürleri farklı yerçekimi ortamlarında (uzay mekikleri, parabolik uçuşlar, biyosatelitler, Salyut ve Mir uzay istasyonları) yetiştirildi. Sonrasında V-şeklinde camdan yapılmış konik bir reaktör (Veliky ve Martin 1970) bitki hücre süspansiyonu için kullanıldı. 1970'lerin sonunda bitki hücrelerinin parçalanma stresi kavramı gelişti ve bir 10 yıl süre boyunca sadece hava kaldırılmalı (air-lift) biyoreaktörler kullanıldı [22].

Biyoreaktörler mikroçoğaltım için ilk kez 1981'de süs bitkisi olarak ticari önemi olan begonya çiçeği (*Begonia hiemalis*) çoğaltımında kullanılmıştır [46].

Şikonin biyoreaktör ile üretilerek piyasaya sürülen ilk sekonder metabolittir (1984). Mitsui Petrochemical Ind. Co. Ltd. şirketi 750 L.'lik biyoreaktörlerde *Lithospermum erythrorhison* bitkisi hücrelerinde elde etmiştir.

İkinci olarak ise 2002 de piyasaya sürülen Taxol'dür (Bristol Myers Squibb). Bugüne kadar bitki hücre ve doku kültürünün ticari olarak uygulanan en büyük örneğini teşkil eder (*Taxus chinensis*) [13].

Bu arada akademik çalışmalar devam etsede 20 yıllık bir boşluk bulunmaktadır. Sonrasında birçok sekonder metabolit biyoreaktörlerle üretilerek piyasaya sürülmüştür. Son zamanlardaki diğer başarılı bir ticari uygulama Güney Kore'de "CBN Biotech Company" firmasının 2002 yılından itibaren 10, 000 L'lik biyoreaktörlerde yıllık ortalama 45 ton (yaş ağırlık) ginseng yanal köklerini GMP (good manufacturing practice) standartlarında üretmesidir [5].

Hücre ve Doku Kültürü Tekniklerinin Biyoreaktörlerde Uygulanması

Bitki hücreleri farklı şekillerdeki biyoreaktörlerde yetiştirilmektedir ancak bu teknolojinin faydalı sekonder metabolitlerin geniş çapta üretimine uyarlanmasında çözülmesi gereken çeşitli problemler mevcuttur. Biyoreaktörlerde kültür ortamını ve sekonder metabolit üretimini etkileyen çeşitli faktörler arasında; atmosfer gazları, oksijen desteği, CO₂ döngüsü, pH, karbohidratlar, büyüme düzenleyiciler, sıvı ortam akışkanlığı, hücre yoğunluğu sayılabilir.

Somatik embriyo kültüründe ölçek artırma ilk kez havuç için 20 L'lik bir damacana (carboy) sistemi (Backs-Husemann and Reinert, 1970) içerisinde denenmiş ancak sadece birkaç tane embriyo oluşturulabilmiştir. Bu bitkide somatik embriyo üretimi çalışmaları devam etmiş ve Kessel ve Carr (1972) doğru çözünmüş oksijen miktarı %16 olduğunu tespit etmiş, Dougall ve Verma (1978) azot kaynağı olarak sadece amonyum kulanarak ve uygun pH sağlayarak başarıya ulaşmıştır.

Yonca (alfalfa)'dan indirekt embriyogenez ile embriyo üretimi için farklı kültür sistemleri denemeleri yapılmıştır. Chen ve arkadaşları, (1987) karıştırmalı biyoreaktörde yaptığı denemede 110 rpm'de karıştırılan 2 L'lik erlenmayerdekine yakın sonuçlar elde etmiştir [17].

Biyoreaktör Çeşitleri

Biyoreaktörler ilk olarak mikrobiyal teknolojiye yönelik olarak kullanıldı ve hemen hemen karıştırmalı tank reaktörleri (STR) ile sınırlıydı. Sonrasında bitki hücre kültürlerine uygulandı. Karıştırma ve havalandırmayı sağlamada mekanik veya gaz üfleyen biyoreaktörler kullanıldı (Ziv, 1995). Daha sonra biyoreaktörlerde biyokütle üretimi, organogenez ve somatik embriyogenezle mikroçoğaltımda etkin bir şekilde uygulandı. Sıvı kültür ortamı mikroçoğaltımda besin maddelerinin alınımı arttı ve büyümeyi teşvik etti. Ancak sıvı ortamda *in vitro* kültürün bu avantajları yanında çoğu zaman oksijen yetmezliği (asphyxia), hiperhidrisite (hyperhydricity) ve parçalanma etkileri (shear forces) gibi teknik sorunlarla karşılaşıldı. Bu sorunları aşmak için biyoreaktörler zamanla oldukça geliştirildi ve bir çok model üretildi (Şekil 4).

Yaptığımız bu çalışmada biyoreaktörler için farklı sınıflandırmaların yapıldığı görülmüştür. Biz ise bu farklı sınıflandırmalardan üç tanesini burada sıralayacağız [(1) operasyon moduna göre, (2) kültür sistemlerine göre ve (3) Ortamların fazına göre biyoreaktörler].

Operasyon moduna göre biyoreaktörler

Operasyon moduna göre biyoreaktörler 3 türe ayrılır;

a) Seri (batch)

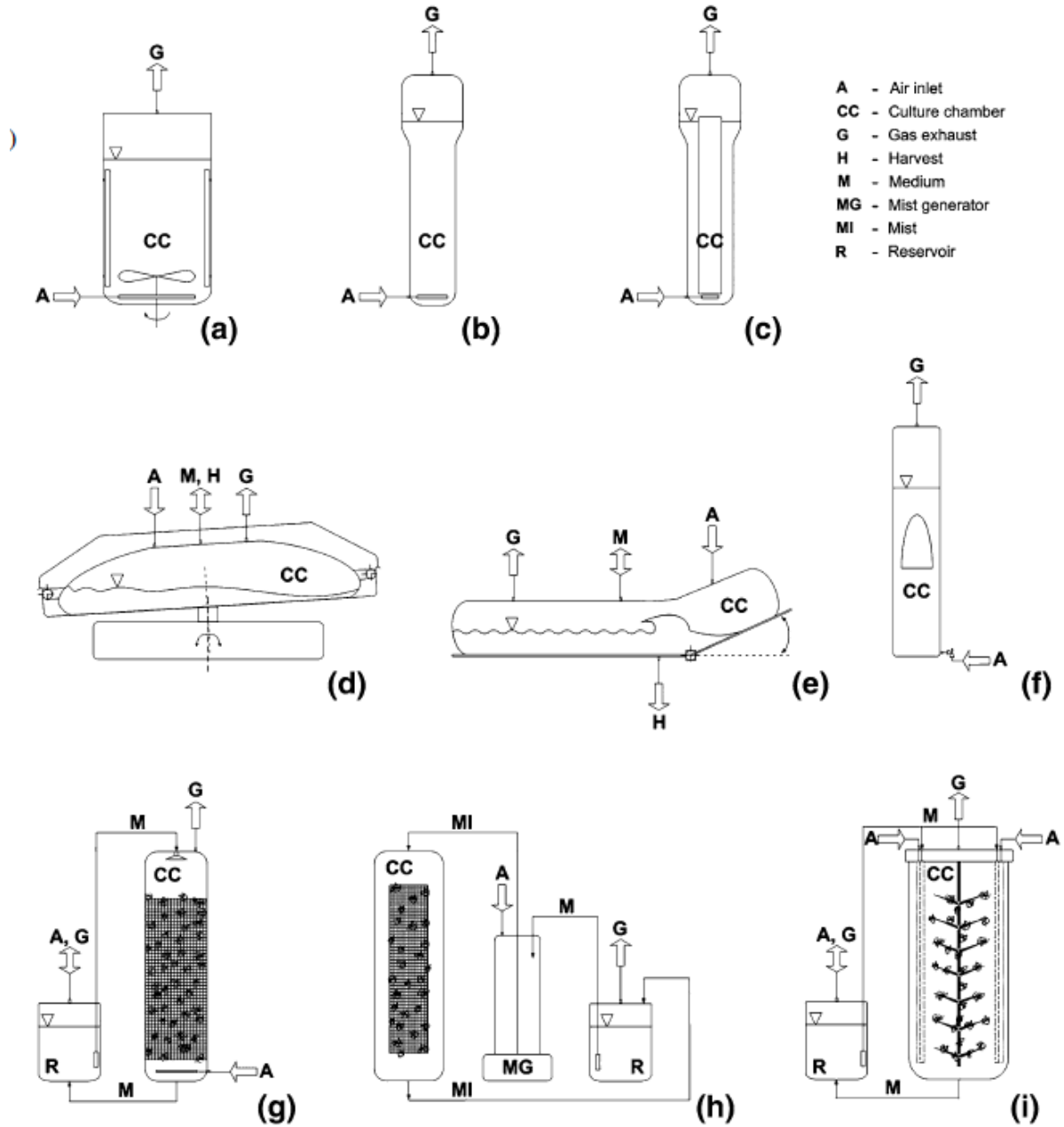
Seri (Batch) biyoreaktör, gerekli bütün içeriğin sürecin en başında konulduğu, süreç içerisinde herhangi bir eklemenin veya çıkışın yapılmadığı kapalı bir sistemdir. Sistem içindeki şartlar besin maddesi tüketildikçe ve ürünler biriktikçe değişir. Biriken hücre içi ve hücre dışı ürünler ancak sürecin sonunda çıkarılır. Süreç içerisinde pH, çözünmüş oksijen ve sıcaklık sabit tutulur. Optimizasyon parametreleri başlangıçtaki ortam içeriğidir [27].

b) Yarı Kesikli (fed batch)

Yarı Kesikli (Fed Batch) biyoreaktörde, hücre büyümesi ve ürün oluşumu için gerekli besinler aralıklı veya devamlı olarak bir yada daha fazla hatla takviye edilir. Kültür ortamından alınacak hücre biyokütlesi veya ürünler genellikle sadece sürecin sonunda alınır. Bu işlemden kültür ortamı tamamen alınabileceği gibi kısmi olarak da (kalan kısım sonraki süreçte içerik olarak devam edebilir) gerçekleştirilir. Ürünler sürecin sonunda alınacağı için kültür hacmi gittikçe artar. Fed Batch biyoreaktör, batch kültür sistemine göre dinamik bir süreç oluşturur. Besin ortamının akışı ve sınırlayıcı besinlerin istenildiği zamanda değiştirilebilir olması istenilen ürünlerin konsantrasyonunu ve ürünlerin verimini maksimuma ulaştırmada etkili olur [27].

c) Devamlı (Continuous)

Devamlı (Continuous) biyoreaktörlerde gerekli besleyiciler, bir yada daha fazla hatla devamlı yada aralıklı olarak ortama takviye edilirken tahliye hattından hücreler, ürünler ve atıklar devamlı olarak dışarı alınır. Takviye ve tahliye hattından akışın hacmi eşit tutularak istikrarlı bir ortam sağlanır. Böylelikle kültür ortamının hacmi sabit tutulur ve besleyici konsantrasyonu optimal koşullarda sağlanır. Genellikle kimya endüstrisinde kullanılmaktadır. Tek hücre protein üretimi, bazı biralara, belediyeatın atık su sistemleri haricinde endüstriye geniş çapta adapte edilememiştir. Sterilitenin sağlanmasındaki zorluk gibi nedenlerden dolayı endüstride baskın operasyonel kullanımı olan biyoreaktör sistemi değildir [27].



Şekil 4. Farklı biyoreaktör dizaynları [19, 21].

(a) Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörü - Stirred Tank Bioreactor (STBR), (b) Baloncuk Kolon Biyoreaktörü- Bubble Column Bioreactor (BCBR), (c) Hava Kaldırılmalı Biyoreaktör- Air-Lift Bioreactor, (d) Dalga ile karıştırılan (Wave-Mixed Bag) biyoreaktörler- BioWave bioreactor, (e) Wave & Undertow Biyoreaktör, (f) Slug Bubble Biyoreaktör, (g) Sprey biyoreaktör, (h) Nemli (Mist) biyoreaktör, (i) Düşük Maliyetli Nemli Biyoreaktör - Low Cost Mist Bioreactor (LCMB)

Öte yandan, *Taxus cuspidata*'dan paklitaksel üretiminde uygulanan devamlı sistemin, batch sistemden daha verimli olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [40].


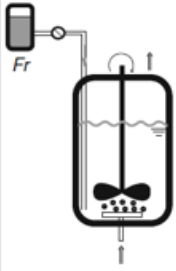
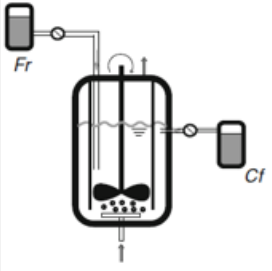
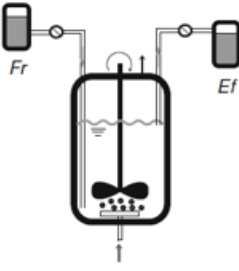
Ayrıca devamlı operasyon modunun bir modifikasyonu olarak tahliye anında hücreler hariç tutularak içeriğin dışarı alındığı **perfüzyon modu** da geliştirilmiştir. Böylece kültür ortamında hücre yoğunluğu artırılarak sekonder metabolit veriminin artırılacağı düşünülmüştür. Her bir operasyon modunun avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Şekil 5).

Biyoreaktörler, kültür sistemlerine göre üç ana sınıfa ayrılır;

- Mikrobiyal biyoreaktörler
- Memeli hücre kültürü biyoreaktörleri
- Bitki hücre/doku kültürü biyoreaktörleri

Ortamların fazına göre biyoreaktörler

Bitki hücre ve doku kültürlerinde kültüre alınan bitki materyaline besin maddelerinin ulaştırılması için kurulan ortamın türüne göre kabaca sıvı, gaz ve hibrit biyoreaktörler olarak üç sınıfa ayrılabilir. McKelvey ve

	Batch	Fed- Batch	Perfüzyon	Devamlı
				
Sürece Müdahale	Düşük/ Orta	Orta	Yüksek	Orta
Maliyet	Düşük/ Orta	Düşük	Orta	Düşük
Toplam Verim	Düşük/ Orta	Düşük	Yüksek	Düşük
Hacimsel ürün Verimi	Düşük	Yüksek	Orta	Düşük

Şekil 5. Opreasyon modlarının karşılaştırılması [23]. Fr besin takviyesi, Cf hücre içermeyen kullanılmış ortam, Ef tahliye tankı

arkadaşları 1993) *Hyoscyamus muticus* bitkisinde köklere besin ve oksijen iletiminde sıvı ve gaz fazlı biyoreaktörlerin temel farklılıklarını araştıran ilk çalışmayı yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada reaktör ortamının kök gelişimine etkisini değerlendirmiş ve farklı kültür ortamlarının biyokütle oluşumunu nasıl etkilediğini göstermişlerdir [41].

Biz de bu çalışmamızda Sharma ve Shahzad 'ın (2013) sınıflandırmasını esas alıp biyoreaktörleri öncelikle klasik ve gelişmiş biyoreaktörler olarak iki sınıfta inceleyeceğiz

Klasik Biyoreaktörler

- Likit (sıvı) Fazlı Biyoreaktörler
 - Karıştırmalı Tank Biyoreaktörü - Stirred Tank Bioreactor (STBR)
 - Hava Kaldırılmalı Biyoreaktör- Air-Lift Bioreactor (ALBR)
 - Baloncuk Kolon Biyoreaktörü- Bubble Column Bioreactor (BCBR)
 - Balon Tip Baloncuk Biyoreaktörü-Balloon Type Bubble Bioreactor (BTBR)
 - Gel-git Biyoreaktörler - Ebb and Flood Bioreactor (EFBR)
 - Taşımalı Akış Biyoreaktörler - Convective Flow Bioreactor (CFBR)
 - Turbin Kanat Biyoreaktörler- Turbine Blade Bioreactor (TBBR)
 - Döner Kazan Biyoreaktörler -Rotating Drum Bioreactor (RDBR)
- Gaz Fazlı Biyoreaktörler
 - Nemli (aerosol) Kültür Sistemleri - Nutrient Mist Bioreactor (NMBR)

3. Hibrit Biyoreaktörler

Gelişmiş Biyoreaktörler

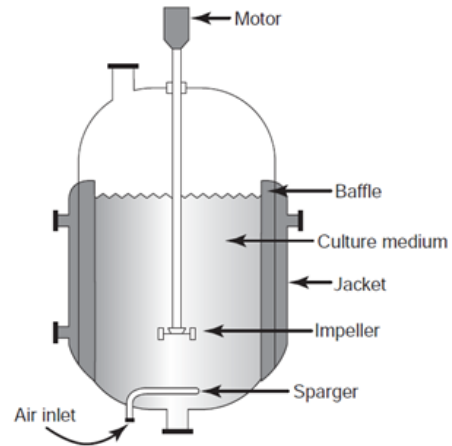
- Tek Kullanımlık (disposable) Biyoreaktörler
- Dalga ile karıştırılan (Wave-Mixed Bag) biyoreaktörler
 - Karıştırmalı torba (Stirred Bag) biyoreaktörler
 - Hava ile karıştırılan torba (Pneumatically-Driven Bag) biyoreaktörler
 - Kutu (Box-In-Bag) biyoreaktörler

Klasik Biyoreaktörler

1. Likit (sıvı) Fazlı Biyoreaktörler

Karıştırmalı Tank Biyoreaktörü - Stirred Tank Bioreactor (STBR)

Mekanik olarak karıştırılan sıvı fazlı biyoreaktörlerdir. Hayvan hücre kültürlerinden çok bitki hücre kültürlerinde tercih edilir. Bitki hücre kültürlerinin yüksek ölçekteki biyosentetik süreçlerde en çok bu tipteki reaktörler kullanılır. Dünyanın en büyük bitki hücre kültürü tesisi Almanya'nın Ahrensburg şehrinde kurulmuştur ve 75 000 L hacme ulaşan STBR bataryalarına sahiptir [41]. Karıştırmalı tank biyoreaktörler; cam veya paslanmaz çelikten imal edilen basit karıştırıcılardır. Karıştırma düzeneği üstte yada altta olabilir. Biyoreaktörün yönlendirme plakası (baffle) girdap oluşumunu engeller. Ticari biyoreaktörlerin çoğu STBR dizaynındadır (Şekil 6). Bu biyoreaktörün farklı bitkiler için kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır.



Şekil 6. Karıştırmalı tank biyoreaktör. Tank içindeki kültürü karıştırmak için bir mekanik karıştırıcı kullanılır. Bir sparger ile taze havanın girişi sağlanır. [1]

Beta vulgaris'ten elde edilen bir hücre içi metabolit olan betalain gıda endüstrisinde doğal boyama maddesi ve farmasötikde kullanılmaktadır. Betalain üretiminde 125 ml erlenmayer ile 2 L. karıştırmalı biyoreaktör kültürünün karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmış ve sonucunda biyokütle, betalain üretimi ve büyüme oranının

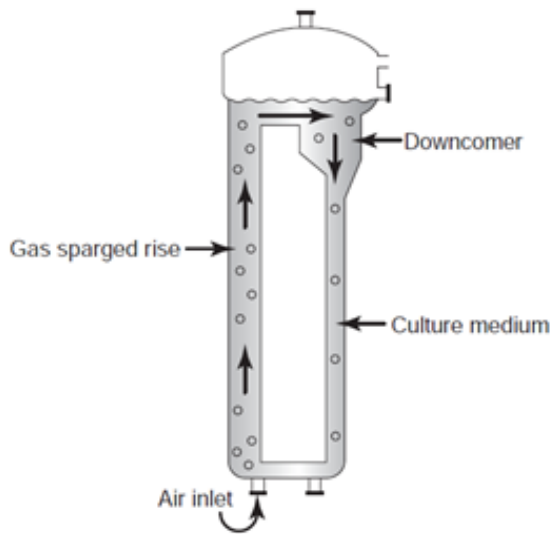
biyoreaktörde daha düşük olduğu görülmüştür. Ancak hücre agregat ölçüsü değişiminde ve hücresel canlılıkta bir fark gözlemlenmemiştir. Hücrelerin hidrodinamik strese karşı dışarıya protein ve polisakkarit salgıladığı dolayısıyla ortamın akışkanlığının (rheology) değiştirmesinin olumsuz etkileri görülmüştür [37].

Decker ve Reski (2007) tohumuz bir bitki olan *Physcomitrella patens*'i 15 litrelik karıştırmalı cam fotobiyoreaktörde kültüre almıştır [16]. Sonrasında bu çalışma kompleks farmasötiklerin üretimi için 100 litrelik ölçekte endüstriye uyarlanmıştır. Beike ve arkadaşları (2015) tarafından yine bir bataklık yosunu olan *Sphagnum palustre*'nin gametoforları karıştırmalı tank fotobiyoreaktörde başarı ile kültüre alınmıştır [8].

Picea glauca-engelmannii ve *P. mariana*' da (kara ladin) somatik embriyo üretimi 7. 5 L kapasiteli karıştırmalı biyoreaktörlerde başarılı sonuçlar vermiştir (60 mM sükröz ve 10-12 günlük inkübasyon sonrasında *P. mariana* için 3076 embriyo ml⁻¹ ve 6, 3 gr L⁻¹ kuru ağırlık, *P. glauca-engelmannii* için 2278 embriyo ml⁻¹ ve 4, 3 gr L⁻¹ kuru ağırlık). Yapılan bu çalışmada sükröz konsantrasyonlarının 30 mM ile 60 mM arasındaki değişimi biyokütle ve somatik embriyo sayısındaki artışla sonuçlanmıştır. Ayrıca mekanik karıştırmanın (240 rpm) somatik embriyo üretiminde parçalanma stresi (shear stress) oluşturmadığı, dolayısıyla diğer çalışmalarda parçalanma stresini azaltmak için tavsiye edilen hava kaldırmalı (air-lift) biyoreaktörlerin kullanıma gerek olmadığı tesbitinde bulunulmuştur [47].

Hava Kaldırmalı Biyoreaktör- Air-Lift Bioreactor (ALBR)

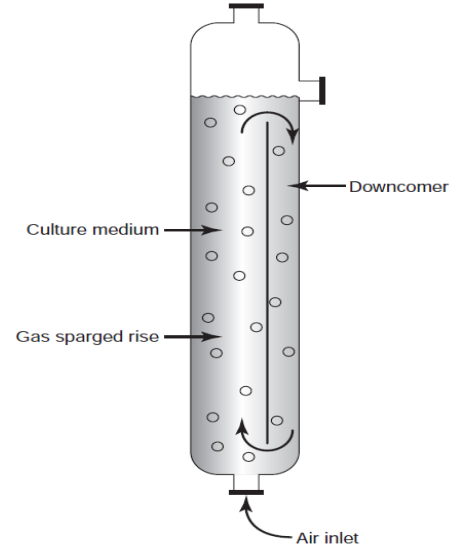
Kule reaktör olarak da bilinen ALBR'ler; içinde bulundurduğu hava sızdırmayan (draught tube) bir tüpe, hava yada başka bir gaz karışımının girişi ile ortamın karıştırıldığı ve havalandırıldığı balon sütun (bubble column) olarak tarif edilebilir. Gaz sirkülasyonu içteki hava sızdırmaz tüp veya dıştaki bir çember (loop) vasıtasıyla (Şekil 7-8) sağlanır. Dolayısıyla dikey bir akım döngüsünün olduğu reaktör gaz içeren ve içermeyen bölümler olarak iki bölüme ayrılmış olur. STBR'lere benzerdir ancak karıştırıcı yoktur [41].



Şekil 7. Dıştan tüplü ALBR. [1].

Bitki hücreleri büyük vakuollere ve yavaş büyüme hızına sahiptirler. Bitki kökleri daha düşük seviyede

oksijene ihtiyaç duyarlar. ALBR'ler düşük miktarda oksijeni düşük parçalanma oranı etkisi ile sağlayabilmektedir. Hava, cam ızgaradan geçerek havalandırma fonksiyonu görür. Bu yöntem kök hücre kültürlerinde STBR'lere göre daha başarılı bulunmuştur.



Şekil 8. İçten tüplü ALBR. Hava tankın dip tarafından girer ve dikey yönde akım oluşturur [1].

Airlift sistemlerin sunduğu avantajlar:

- Basit tasarım; 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:

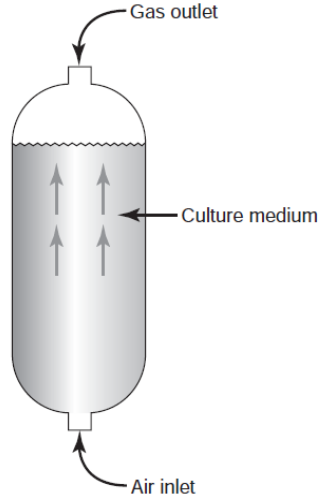
- Geniş ölçekte üretim için yatırım maliyeti fazlalığı
- Köpük oluşumu, köpük oluştuğunda gaz/sıvı ayırmada zorluk

Echinacea purpurea yanal kökleri air-lift biyoreaktörlerde (20 L ve 500 L balon tip kabarcık, 1000 L davul tip kabarcık) kültüre alınmış ve total fenolik, flavonoid ve kafeik asit içeriği araştırılmıştır (Biyoreaktör ortamları 0.1 vvm'de steril ile havalandırıldı ve 0.5 den küçük çaptaki kabarcıklara karıştırıldı). 60 günlük inkübasyon sonucunda 20 L'lik biyoreaktörle kıyaslandığında 500 L ve 1000 L'lik biyoreaktörlerde biyokütle ve kafeik asit içeriğinde bir kayıp yaşanmamıştır. Bu çalışma *E. purpurea* yanal köklerinden yüksek ölçekte kafeik asit üretimi için faydalı bir biyoteknolojik uygulama olarak gösterilmiştir [50].

Baloncu Kolon Biyoreaktörü- Bubble Column Bioreactor (BCBR)

Köklerin ortama daldırıldığı sütun şeklinde reaktörlerdir (Şekil 9). Sıvı ortamın karıştırılması sütunun dibine yerleştirilmiş hava dağıtıcıdan kaynaklanan hava kabarcıklarının yukarı yönlü hareketi ile sağlanır. ALBR'lerde olduğu gibi düşük parçalanma etkisi vardır. Dolayısıyla sürgün, soğan (bulbs, corms), yumru, kök gibi organize yapılar için kullanışlıdır [41]. Bu

biyoreaktörlerde karşılaştırmalı olarak yapılan çalışmalar bulunmaktadır.



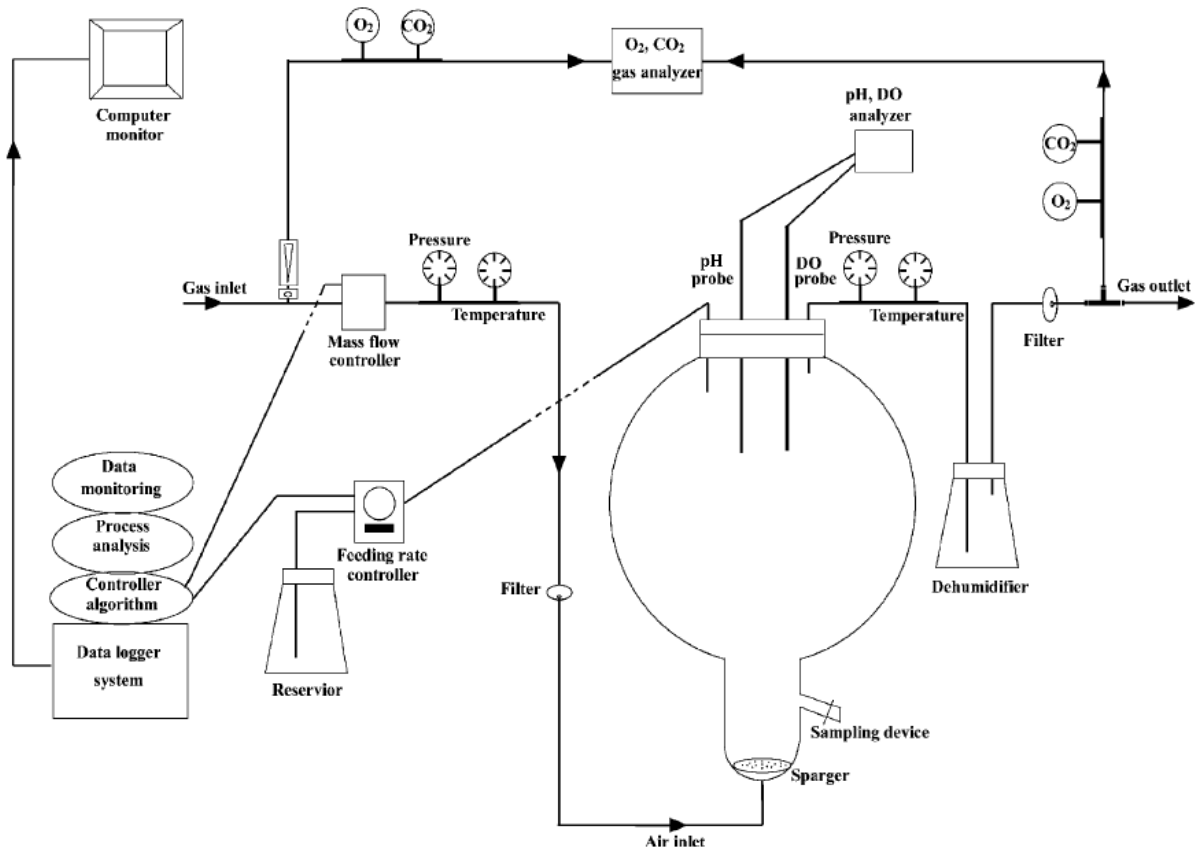
Şekil 9. Bir BCBR. Kültür ortamı tankın dip tarafından giren havanın etkisiyle karıştırılır. [1].

Kuş gribinin (influenza A, H5N1) tedavisinde oral olarak kullanılabilen tek ilaç olan oseltamivir'in -ticari ürün Tamiflu® (Roche Pharmaceuticals)'nin-, endüstriyel sentezinde tek kaynak olarak kullanılan şikimik asiti sandal ağacından (*Santalum album*) hücre süspansiyon kültürü ile

üretimi air-lift biyoreaktöre uygulanmıştır. 7 adet paralel 2 L'lik air-lif biyoreaktör ile 3 haftalık kültür sonucunda 0.95 kg biyokütle elde edilmiştir (Çin yıldız anasonunun 30 kg biyokütlesinden 1 kg şikimik asit elde edilmektedir). 100 gr'lık sandal ağacı süspansiyon kültürü biyokütlesinden 700 mg şikimik asit elde edilmektedir. Bu miktar 5 adet (her biri 75 mg) oseltamivir üretimi için yeterli olmaktadır. Anason bitkisinde (*Illicium verum L.*) altı yıllık olgunluk sonrası tohum kabuklarından şikimik asit eldesi ancak mümkünken iki haftalık *in vitro* kültürlerden şikimik asit üretimi başlamaktadır. Anason bitkisinde 1 kg tohum kabuğu eldesi için olgunluk sonrası 6 yıl gerekmektedir. Bu çalışmada Çin yıldız anasonu bitkisinden elde edilen şikimik asite biyoreaktör kullanılarak alternatif bir endüstriyel üretim modeli getirilmiştir [28].

Balon Tip Baloncuk Biyoreaktörü-Balloon Type Bubble Bioreactor (BTBR)

ALBR ve BCBR biyoreaktörlerde fazla miktarda havanın sebep olduğu köpüklenme ve üst boşlukta hücre büyümesi dezavantajları bulunmaktadır. Köpüklenme ve tankın duvarlarında hücre büyümesinin sebebi tankın üst tarafının da aynı yarıçapta olması nedeniyle. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için ALBR biyoreaktörler üst kısımları genişletilmek suretiyle modifiye edilmiştir. Tankın üst kısmında hücreleri kaldırmak amacıyla balon şeklinde bir tüp kullanmak köpüklenmeyi büyük miktarda azaltmıştır [41].

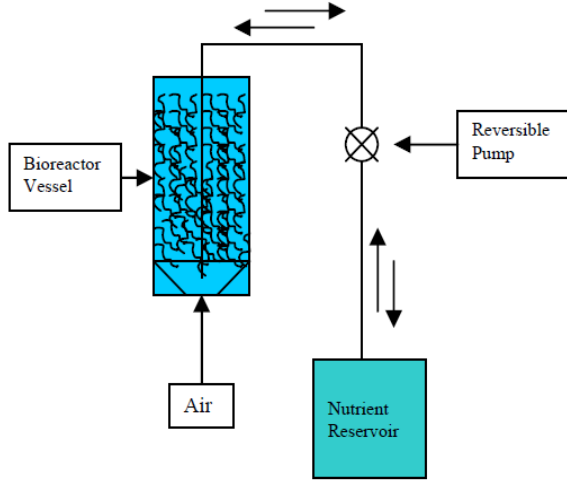


Şekil 10. BTBR sisteminin şematik gösterimi [33].

Shohaël ve arkadaşları (2013) Sibiryâ ginsengin (*Eleutherococcus senticosus Maxim*) somatik embriyolarını BTBR de (3L) kültüre almışlar (40-45 Gün) ve havalandırmanın somatik embriyo üretimi ve sekonder metabolit (Eleutherosid ve klorogenik asit) verimi üzerine etkilerini araştırmışlardır [43].

Gel-git Biyoreaktörler - Ebb and Flood Bioreactor (EFBR)

Çeşitli bitkilerin çoğaltımı için geliştirilmiş gel-git tarzı (periyodik daldırma sistemi) yeni bir biyoreaktör çeşitidir. Bu tip reaktörlerde bitki materyalinin sıvı ortama tamamen batmasını engelleyen bir destek yapısı bulunur. Besin ortamı takviye tankından kültür tankına pompalanır. Eşit oranda büyüme sağlanabilmesi için besin ortamı, bitki materyallerine bir kanallar serisi yardımıyla düzenli olarak iletilir. Besin ortamı tankta bir kaç dakika kalır ve tekrar kullanılacak üzere takviye tankına geri süzülür. Süzülme süreci bitki türü ve eksplant tipine göre solenoid bir valf tarafından 4 ve 8 saat aralıklarında kontrol edilir. Programlanabilir bir pompa besin ortamını ileri ve geri yönde hareket ettirir, sıkıştırılmış hava ortam dipteki bir dağıtıcı ile verilir (Şekil 11) [41].



Şekil 11. Gel-git tarzı biyoreaktörün şematik gösterimi [14].

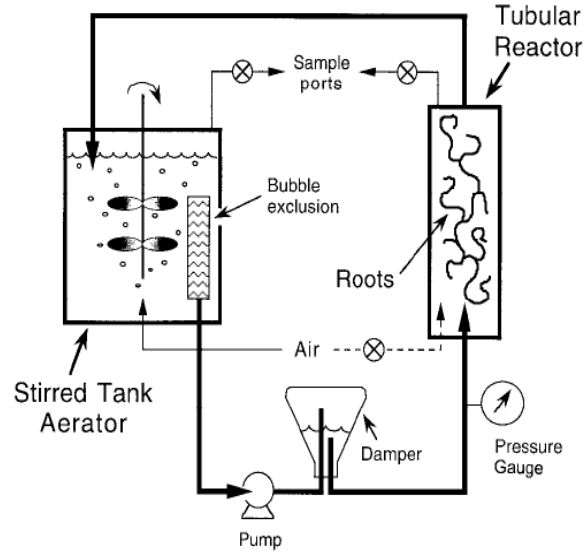
EFBR lerde ilk başarılı çalışma Cuello ve arkadaşları, (1991) tarafından kök kültürlerinde yapılmıştır [14].

Süs bitkisi *Spathiphyllum canifolium* mikroçoğaltımı için biyoreaktör denemeleri yapılmıştır. EFBR ve BTBR biyoreaktörlerde yapılan çalışmalar sonucunda bitkinin sıvı ortama batmasını engelleyen bir ızgara kullanıldığında BTBR'nin en iyi sonucu verdiği ve EFBR biyoreaktörün bu bitki için kullanışsız olduğu bildirilmiştir [18].

Bu konfigürasyon geçici daldırma sistemi (temporary immersion system - TIS) olarak da kullanılmaktadır. Başka bir örnek olarak kardiyak glikozidlerin üretimi gösterilebilir. Kalbin pompalama gücünü artıran ve kalp ritminini düzenlemeye yardımcı olan kardiyotonic glikozidler en çok *Digitalis* bitkisinin yapraklarından ekstrakte edilir. Digitoksin, digoksin ve lanatosid C glikozidlerini üretmek amacıyla *D. purpurea* sürgünleri TIS biyoreaktörlerde kültüre alınmıştır. Uygulama sonucunda digoksin ve digitoksin üretiminde başarılı olunmuş ancak lanatosid C elde edilememiştir [34].

Taşımali Akış Biyoreaktörler-Convective Flow Bioreactor (CFBR)

Bu biyoreaktör Carvalho ve Curtis (1998) tarafından geliştirilmiş olup bir karıştırıcı tank, peristaltik pompa ve tüp şeklinde yetiştirme tankından oluşur [12]. Karıştırıcı tank içinde ortam oksijenlendirilir ve pozitif yerdeğiştirme pompası sıvının karıştırma tankı ve yetiştirme tankı arasında sirkülasyonunu sağlar (Şekil 12) [41].



Şekil 12. CFBR biyoreaktör

Carvalho ve Curtis (1998) transforme edilmiş ban otu (*Hyoscyamus muticus*) kökleri 2 L. 'lik CFBR biyoreaktörde kültüre almış ve BCR- bubble column biyoreaktörle biyokütle artışını karşılaştırmıştır [12]. Deney sonucunda CFBR ile besinlerin bitkiye ulaştırılmasındaki başarı biyokütlede görülen etkili artışla gösterilmiştir [12] Besin ortamının sirkülasyonu için yüksek basınç gerektirdiğinden büyük ölçekte biyoreaktörlerin kurulması zordur.

Turbin Kanat Biyoreaktörler- Turbine Blade Bioreactor (TBBR)

TBBR'ler ALBR ve STBR reaktörlerin bir kombinasyonudur. Bu sistemde yetiştirme alanı ile karıştırma alanı paslanmaz çelikten yapılmış bir ızgara (mesh) ile ayrılmıştır. Böylelikle kökler karıştırıcı (impeller) ile temas etmezken hava dipteki sekiz-bıçaklı karıştırıcı tarafından verilerak ortam karıştırılmış olur. Kondo ve arkadaşları (1989) havuç kök hücrelerinde TBBR'lerin etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada oksijen ulaştırmada TBBR'lerin, diğer biyoreaktörlerden daha avantajlı olduğunu bulmuşlardır. 10 g/l kök hücrelerinin 30 günlük kültürü sonucunda en fazla büyüme oranının (günde 0, 63 g/l) TBR'lerde olduğu bulunmuştur [41].

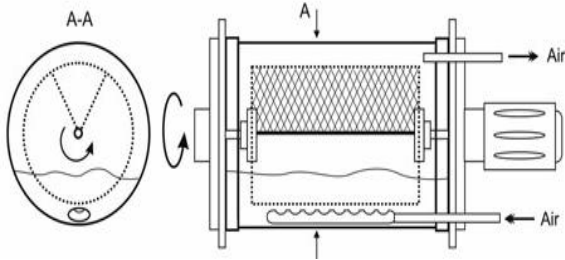
Döner Kazan Biyoreaktörler -Rotating Drum Bioreactor (RDBR)

RDBR'ler diğer biyoreaktörlere kıyasla oldukça fazla yüzey alanına sahiptir. Bunun bir sonucu olarak madde taşınımı için daha az enerji harcanmaktadır. Bu özellik parçalanmaya hassas dokular ve fotobiyoreaktörler için tercih sebebidir. Kazan şeklindeki taşıyıcı tank destek ve

rotasyon için bir çevricinin üzerine monte edilmiştir. Kazan 2-6 rpm küçük bir hızda çevrilmekte, dolayısıyla köklerde parçalanma stresini en aza indirmektedir [41].

Shibasaki ve arkadaşları (1992) *Nicotiana tabacum* hücrelerini RDBR biyoreaktörde kültüre almışlar ve oksijen transferi ve hücre hasarı yönünden ALBR'lerden üstün olduğunu göstermişlerdir [42].

Bu sistem oksijen transferinde avantajlı olsa da bitki doku kültürleri sabitlenmedikleri durumlarda kırılmalara sebep olması ve ölçek artırılmak istendiğinde yüksek enerji gereksinimi göstermesinden dolayı dezavantajlı olabilmektedir. Şekil 13'de çalışma prensibi şematize edilmiştir [44].



Şekil 13. RDBR şematik gösterimi.

2. Gaz Fazlı Biyoreaktörler

Nemli (aerosol) Kültür Sistemleri - Nutrient Mist Bioreactor (NMBR)

Nemli kültür sistemi kavramı ilk kez Weathers ve arkadaşları (1988) tarafından önerildi. Gaz fazlı biyoreaktörlerde biyokütle hava veya gaz karışımına maruz kalır ve besinler damlacıklar vasıtasıyla ulaştırılır.

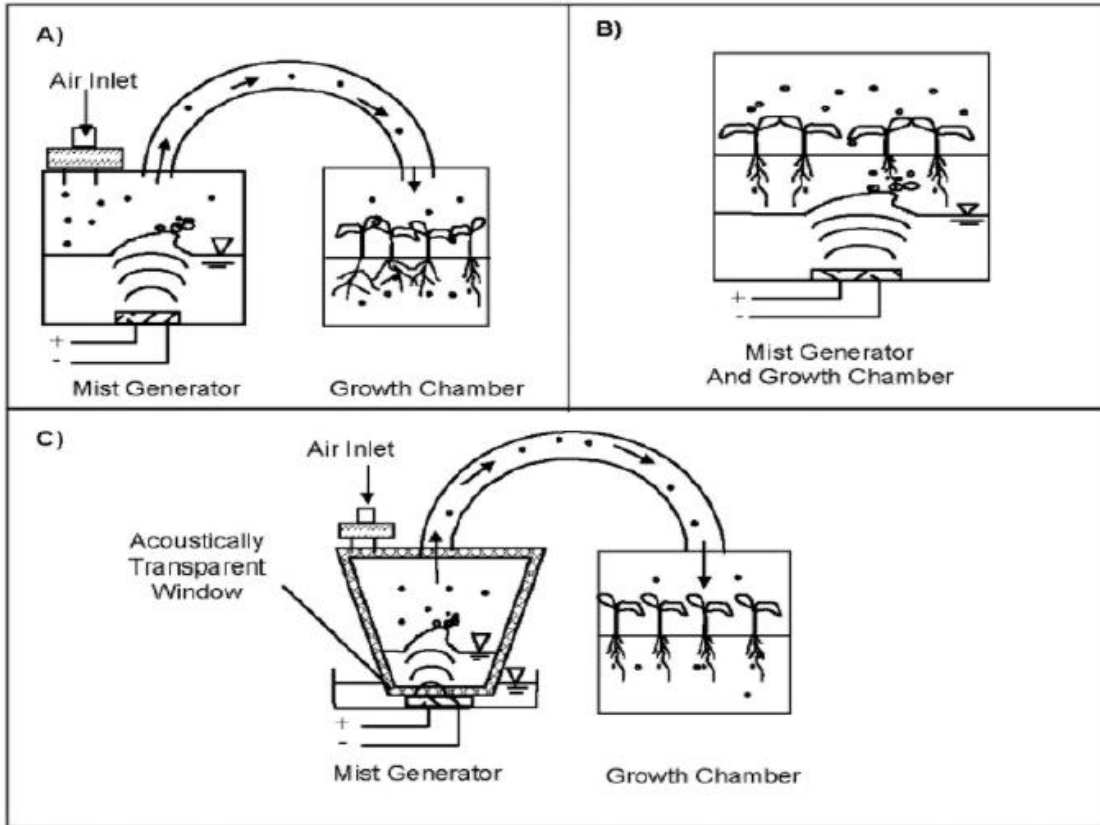
Damlacık çapı buğu için 0.01-10 µm, sis için 1-100 µm, püskürtme-sprey için 10-10³µm arasında değişir. Gaz fazlı reaktör kullanıldığında madde taşınımındaki zorluklar (özellikle de oksijenin) önemli ölçüde indirilebilir veya yok edilebilir [48].

Buğu oluşturu ve büyüme ortamı ayrı tanklarda (A), buğu oluşturu ve büyüme ortamı aynı tankta (B), dönüştürücü otoklavlanmış içerikten akustik bir pencere ile ayrılmış (C). Buğu hareketinin yönü ok ile gösterilmiştir

Bitki hücreleri buldukları ortamdaki gazlara, özellikle de O₂, CO₂ ve etilene, karşı son derece duyarlıdır. Bu gazların çözünürlüklerinin düşüklüğü nedeniyle sıvı ortamda köklere ulaştırılmasında zorluklar yaşanmaktadır. Gazların ulaştırılması amacıyla sıvı ortamın karıştırılması, çalkalanması yada kabarcıklandırılması bitki dokularında parçalanma hasarına sebebiyet verebilmektedir. Dolayısıyla gaz fazlı reaktörler sıvı fazlı reaktörlere göre bir çok avantaj sunmaktadır.

Nuutila ve arkadaşları (1997) çilek kök kültürlerini (*Fragaria X ananassa Duch.*) üç farklı biyoreaktörde denemişler ve NMBR de en iyi sonucu elde etmişlerdir [32].

ROOTek Bioactives AG (Witterswil, Basel, İsviçre) firması, kök kültürlerinin ideal şartlar altında kültüre alınabilmesi için düşük maliyetli buğu reaktör (LCMRs; low-cost mist reactor) piyasaya sürmesi biyoteknolojisi alanındaki son gelişmelere bir örnek olarak gösterilebilir. LCMR plastik filmden yapılmış bir yetiştirme ortamına sahiptir. Geleneksel reaktörlerden farklı olarak LCMR'de kökler steril şartlar altında büyümektedir. Herhangi bir herbisid yada insektisid gerek yoktur. LCMR'nin modüler yapıda olması kullanımında esneklik sağlamaktadır.



Şekil 14. Ultrasonik nemli biyoreaktörlerinin çeşitleri [48].

3. Hibrit Biyoreaktör

İl kez Ramakrishnan ve arkadaşları tarafından gaz fazlı biyoreaktörlerin olumsuzluklarına bir çözüm olarak önerilmiştir (1994). Hibrit biyoreaktörlerde kökler öncelikle sıvı ortamda tutulduktan sonra gaz fazlı ortamda büyümeye bırakılır. En çok atıfta bulunan ve en büyük hibrit biyoreaktör *Datura stramonium* kökleri için kullanılan 500 L'lik Wilson-Biyoreaktörüdür (1997). Wilson bu hibrit biyoreaktörde (bubble column-spray reactor) *D. Stramonium* köklerini 21 gün gün sıvı ortama daldırılmış ve devamında 40 gün nemli fazda tutmuştur [41].

Gelişmiş Biyoreaktörler

Tek Kullanımlık (disposable) Biyoreaktörler

Bitki Doku Kültüründe Kullanılan Tek Kullanımlık (Disposable) Reaktörler

- Dalga ile karıştırılan (Wave-Mixed Bag) biyoreaktörler
- Karıştırmalı (Stirred Bag) biyoreaktörler
- Hava ile karıştırılan (Pneumatically-Driven Bag) biyoreaktörler
- Kutu (Box-In-Bag) biyoreaktörler

Yukarıda 4 grupta belirttiğimiz tek kullanımlık biyoreaktörler başlangıçta böcek ve memeli hücrelerinden antikör ve aşı üretimi için geliştirilmiş ve günümüzde de daha çok bu amaçla kullanılmaktadır.

Tek kullanımlık reaktörler, plastik torbaların içine ortamların yerleştirildiği, plastik vanalarla havalandırılan, genelde bir sallayıcı üzerinde tutularak karıştırılan biyoreaktörlerdir. Yetiştirme ortamı taşıyıcıları (torbalar) tipik olarak FDA (Food and Drug Administration) onaylı biyoyumlu plastiklerden (polietilen - HDPE veya LDPE, polistiren - PET, polietrafloroetilen - PTFE, polipropilen - FEP) imal edilir. Plastikten imal edilmiş ancak tekrar kullanılabilen yada çoklu kullanım için üretilen yetiştirme ortamları (ROOTek'in LCMR'ı veya CIRAD'IN RITA'sı gibi) tek kullanımlık biyoreaktör olarak kabul edilmez [20,41].

Tek kullanımlık biyoreaktörler genellikle küçük ölçekteki üretimler için kullanılır. Bu biyoreaktörlerin temel avantajı temizleme ve sterilizasyon konularını sorun olmaktan çıkarması ve yatırım maliyetini azaltmasıdır [41].

Diğer taraftan dezavantajlarını ise şu şekilde sıralanabilir;

- En büyük eksiklikleri ulaşılabilir olmamaları ve devamlı yeni torbaların alınmak durumunda olunması nedeniyle artan uygulama maliyeti,
- Depolama alanı gerektirmesi ve çok miktarda katı atık oluşturmaları,
- Karıştırmada sallamaktan başka seçenek olmaması başka bir eksiklikler,
- Sensörler pahalıdır, dolayısıyla kullanılıp atılması uygun değildir. Steril edilerek tekrar kullanılmaları gerekir,
- Oksijen gereksinimleri yüksek ölçekte sınırlayıcı olmaktadır. Bu reaktörlerde havalandırma genelde yüzeyde olmaktadır.

Tek kullanımlık dalga biyoreaktör (disposable wave bioreactor) sistemlerinin geliştirilmesi yeni avantajlar sağlamıştır. Bu sistemin çalışma prensibi dalga başlatarak (wave induced) sağlanan karıştırmaya dayanır ve en belirgin avantajı stres kaynaklarını azaltmasıdır. Ayrıca tek kullanımlık olmaları dolayısıyla temizleme ve sterilizasyon yönünden çalışan ve zaman tasarrufu sağlarlar. İyi üretim uygulamaları (GMP) beklentilerini de kolaylaştırmaktadır. *P. ginseng* köklerinden ginsenoid üretimi 2 L'lik dalga biyoreaktörde ayrıntılı bir şekilde çalışılmış ve sonuç olarak çalkalan erlene nazaran önemli ölçüde yüksek miktarda biyokütle ve sekonder metabolit üretimi görülmüştür. 600 L ölçeğe çıkarılarak endüstriyel olarak İsviçre'de kullanılmaktadır [38].

Tek kullanımlık biyoreaktörlerde henüz memeli hücre kültürlerinde ulaşılan seviyeye bitki hücre kültürlerinde ulaşılamamıştır.

Çizelge 11. Bitki hücre kültüründe kullanılan tek kullanımlık biyoreaktörler (Eibl et al., 2009).

Biyoreaktör	Kültür Hacmi	Hücreler	Ürün
Wave-mixed bag biyoreaktörler (AppliFlex, BioWave®, BIOSTAT®CultiBagRM, CELL-tainer®, Optima-mini™, Tsunami®Biyoreaktör, Wave Biyoreaktör, WUB-Wave and Undertow Biyoreaktör)	1–500 L	Bitki hücre ve doku kültürleri (<i>G. max</i> , <i>M. domestica</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>T. baccata</i> , <i>V. vinifera</i> 'dan hücre süspansiyon kültürleri) ve (<i>H. muticus</i> , <i>H. procumbens</i> , <i>P. ginseng</i> kök kültürleri)	Biyokütle, sekonder metabolitler (örneğin; bakkatin III, cinsenosidler, hyoscyamine, paklitaksel, skopolamin), mABS (e. g. anti-RV mABS)
Bubble column bag biyoreaktör (SBB-Slug Bubble Biyoreaktör, Plastic-lined Biyoreaktör)	10–150 L	Bitki hücre ve doku kültürleri (<i>G. max</i> , <i>H. muticus</i> , <i>N. Tabacum</i> hücre süspansiyon kültürleri) ve <i>H. muticus</i> kök kültürleri	Biyokütle, izoflavonlar
Airlift bag biyoreaktör (LifeReactor™)	0.8–7 L	Organ kültürleri (örneğin; muz, eğrelti, kuzgun kılıcı, orkide, ananas, patates meristematik yığınları ve somatik embriyoları)	Mikroçoğaltım, Biyokütle



Şekil 15. BIOSTAT®CultiBag RM tek kullanımlık biyoreaktör sistemi (<http://microsite.sartorius.com>) [25]

Biyoproses ve Bitki Biyoteknolojisinin Geleceği

Yaklaşık 60 yıllık süreç içerisinde *in vitro* kültürlerin kullanıldığı biyokütle ve bitki kaynaklı metabolit, terapötik proteinlerin üretiminde büyük değişimler ve ilerlemeler yaşandı. Bunlardan onlarcası endüstriye uygulandı ve bir o kadarı da geliştirilme aşamasında bulunmaktadır. Günümüzde biyoreaktör dizayn ve donanımları bitki hücre ve doku kültürlerinin fizyolojik ihtiyaçlarını karşılamada önemli mesafeler katetmiş olup yeni teknolojik gelişmelerle sürekli yenilikler eklenerek ilerlemeye devam edecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Acquaah G (2004) Understanding Biotechnology An Integrated and Cyber-Based Approach, Pearson Education,
- [2] Alfermann A W (2010) Production of Natural Products by Plant Cell and Organ Cultures, Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites, Second edition
- [3] Alvarez M A (2014) Plant Biotechnology for Health : From Secondary Metabolites to Molecular Farming, Springer International Publishing
- [4] Babaoğlu, M. , Gürel, E. , Özcan, S. (Editörler; 2001) Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları. S. Ü. Vakfı Yayınları, Konya.
- [5] Baque M A, Moh S H, Lee E J, Zhong J J, Paek K Y (2012) Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor, Biotechnol Adv. 2012 Nov-Dec; 30(6):1255-67.
- [6] Bartwal A, Mall R, Lohani P, Guru S K, Arora S (2012) Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses, J Plant Growth Regul
- [7] Baytop T (1999) Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Kitapevi, İstanbul
- [8] Beike et al. (2015) Clonal *in vitro* propagation of peat mosses (*Sphagnum L.*) as novel green resources for basic and applied research, Plant Cell Tiss Organ Cult (2015) 120:1037–1049
- [9] Bhojwani S S and Dantu P K (2013) Plant Tissue Culture: An Introductory Text, Springer India
- [10] Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, Plant Science 161 p 839–851
- [11] Cai Z, Kastell A, Knorr D, Smetanska I (2012) Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures, Plant Cell Rep 31:461–477
- [12] Carvalho E B, Curtis W R (1998) Characterization of Fluid-Flow Resistance in Root Cultures with a Convective Flow Tubular Bioreactor, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 60, No. 3, 375-384
- [13] Chandra S, Chandra R (2011) Engineering secondary metabolite production in hairy roots, Phytochem Rev (2011) 10:371–395
- [14] Cuello J L and Yue L C (2008) Ebb-and-Flow Bioreactor Regime and Electrical Elicitation: Novel Strategies for Hairy Root Biochemical Production, Electronic Journal of Integrative Biosciences 3(1): 45-56
- [15] Çördük N, Akı C (2010) Direct shoot organogenesis of *Digitalis trojana* Ivan., an endemic medicinal herb of Turkey, African Journal of Biotechnology Vol. 9(11), pp. 1587-1591.
- [16] Decker E L, Reski R (2007) Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals, Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:393–398
- [17] Denchev P D, Kuklin A I, Scragg A H (1992) Somatic embryo production in bioreactors, Journal of Biotechnology, 26 p 99-109
- [18] Dewir Y H, Chakrabarty D, Hahn E J, Paek K Y (2006) A Simple method for mass propagation of *Spathiphyllum cannifolium* using an airlift bioreactor, In Vitro Cell. Dev. Biol. —Plant 42:291–297
- [19] Eibl R, Eibl D (2009) Application of Disposable Bag Bioreactors in Tissue Engineering and for the Production of Therapeutic Agents, Adv Biochem Engin/Biotechnol 112: 183–207
- [20] Eibl R, Eibl D (2006) Design and use of the Wave Bioreactor for plant cell culture. In: Dutta Gupta S, Ibaraki Y (eds.) Plant tissue culture engineering, series: focus on biotechnology, vol 6. Springer, Dordrecht, p. 203
- [21] Eibl R, Eibl D (2008). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. Phytochemistry Reviews, 7, 593–598.
- [22] Georgiev M I, Eibl R, Zhong J J (2013) Hosting the plant cells *in vitro*: recent trends in bioreactors, Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 97, Issue 9, pp 3787-3800
- [23] Georgiev M I (2014) K.-Y. Paek et al. (eds.), Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology, Springer
- [24] Giri A, Dhingra V, Giri C C, Singh A, Ward O P, Narasu M L (2001) Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects, Biotechnology Advances 19 (2001) 175–199
- [25] http://microsite.sartorius.com/single-use-technology/products/biostat-cultibag_rm/documents.html 07/05/2015
- [26] Ibaraki Y, Kurata K (2001) Automation in somatic embryo production, Progress in Biotechnology vol. 18, pp. 365-374
- [27] Lim H C, Shin H S (2013) Fed-Batch Cultures Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors, Cambridge University Press
- [28] Misra B B, Dey S (2013) Shikimic Acid (Tamiflu Precursor) Production in Suspension Cultures of East Indian Sandalwood (*Santalum album*) in Air-lift Bioreactor, PostDoc Journal Vol. 1, No. 1
- [29] Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB (2002) Phytosterols, phytosteranols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-

promoting uses. *Prog Lipid Res.* 2002 Nov; 41(6):457-500.

[30] Murthy H N, Lee E, Paek K Y (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation, *Plant Cell Tiss Organ Cult*

[31] Neumann N K, Kumar A, Imani J (2009) *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology*

[32] Nuutila A. M., Lindqvist A. -S., Kauppinen V. (1997) Growth of hairy root cultures of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) in three different types of bioreactors. *Biotechnol. Tech.*, 11, 363-366.

[33] Paek K Y, Chakrabarty D, Hahn E J (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2005) 81: 287-300

[34] Perez-Alonso N, Wilken D, Gerth A, Jahn A, Nitzsche HM, Kerns G, Capote-Perez A, Jiménez E (2009) Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99:151-156

[35] Ramachandra S R, Ravishankar G A (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances* 20 101-153

[36] Reinert J (1959) Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gew- ebekulturen aus karotten. *Planta* 53:318-333

[37] Rodriguez-Monroy M, Galindo E (1999) Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank, *Enzyme and Microbial Technology* 24:687-693

[38] Ruffoni B, Pistelli L, Bertoli A and Pistelli L (2010) *Plant Cell Cultures: Bioreactors for Industrial Production*. In: *Bio-Farms for Nutraceuticals Functional Food and Safety Control by Biosensors*, edited by Maria Teresa Giardi, Guiseppina Rea and Bruno Berra, Springer Science+Business Media, LLC

[39] Santamaria A R, Mulinacci N, Valletta A, Innocenti M, and Pasqua G (2011) Effects of Elicitors on the Production of Resveratrol and Viniferins in Cell Cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia, *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 9094-9101

[40] Seki, M., Ohzora, C., Takeda, M., & Furusaki, S. (1997). Taxol (Paklitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 53 (1), 214-219.

[41] Shahid, M., Shahzad, A., Malik, A., Sahai, A. (Eds.) (2013) *Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants*, Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

[42] Shibasaki N, Hirose K, Yonemoto T and Tadak T (1992) Suspension culture of *Nicotiana tabacum* cells in a rotary-drum bioreactor, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* Volume 53, Issue 4, pages 359-36

[43] Shohael, A M and Kee Yoeup Paek (2013) Production of eleutherosides, total phenolics and total flavonoids from somatic embryos of Siberian ginseng affected by different aeration volume in bioreactor, *International Journal of Biosciences* Vol. 3, No. 4, p. 213-221

[44] Steingroewer J, Bley T, Georgiev V, Ivanov I, Lenk F, Marchev A and Pavlov A (2013) Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems, *Engineering in Life Sciences* Volume 13, Issue 1, pages 26-38

[45] Steward F C, Mapes M O, and Smlth J (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45, 693-703

[46] Takayama, S.; Misawa, M. (1981) Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlet by shake culture. *Plant Cell Physiol.* 22:461-467.

[47] Tautorus T E, Lulsdorf M M, Kikcio S I, and Dunstan D I (1992) Bioreactor culture of *Picea mariana* Mill. (black spruce) and the species complex *Picea glauca-engelmannii* (interior spruce) somatic embryos. Growth parameters, *Appl Microbiol Biotechnol* (1992) 38:46-51

[48] Towler, M. J., Kim, Y., Wyslouzil, B. E., Correll, M., Weathers, P. J., (2006) Design, development, and applications of mist bioreactors for micropropagation and hairy root culture. In: Ibaraki, Y., Gupta, S. D., (Eds.), *Plant Tissue Culture Engineering. Focus on Biotechnology*, vol. 6, Springer, Heidelberg, pp. 119-134

[49] Verma S K, Sahin G, Yucesan B, Eker I, Sahbaz N, Gurel S, Gurel E (2012) Direct somatic embryogenesis from hypocotyl segments of *Digitalis trojana* Ivan and subsequent plant regeneration, *Industrial Crops and Products* 40 (2012) 76-80

[50] Wu C H, Murthy H N, Hahn E J, Paek K Y (2007) Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid, *Biotechnol Lett* (2007) 29:1179-1182

[51] Venkatachalam P, Geetha N, Priya P, Jayabalan N, Sita G L (2003) Somatic Embryogenesis, P. K. Jaiwal and R. P. Singh (eds.), *Improvement Strategies for Leguminosae Biotechnology*, 87-132.

[52] Zhong, J. -J. (2001) *Biochemical Engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 72, 1-26.