

Recent Improvements in Production of Recombinant Proteins

Received: 19 June 2013

Revised: 3 September 2013

Accepted: 5 September 2013

ABSTRACT

Seyed Babak Mousavi¹
Seyed Abbas Shojaosadati^{2*}

¹Ph.D student, Biotechnology
Group, Chemical Engineering
Faculty, Tarbiyat Modares
University, Tehran, Iran.

²Professor, Biotechnology
Group, Chemical Engineering
Faculty, Tarbiyat Modares
University, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:**

Seyed Abbas Shojaosadati
Tel : (+98)9121300501

Email: shoja_sa@modares.ac.ir

Recombinant protein production is a fundamental aspect of biotech industry in 21st century in . Harnessing the natural protein expression powers of prokaryotic as well as eukaryotic hosts, enabled the development of a multi-billion dollar industries. Recombinant proteins have gained enormous importance for clinical applications. Most of therapeutic recombinant proteins are produced in mammalian cells although, Escherichia coli has been the most widely used host for the production of recombinant proteins. Various yeast expression systems have been successfully used over the years for production of recombinant proteins. Good characteristics of yeast, combined with revolutionary advances in systems and synthetic biology, micro-array technology and the rapidly evolving databases on the Web, have made a prominent place for yeast within the range of expression systems. The demand for recombinant therapeutic proteins is significantly increasing and there is a constant need to improve the existing expression systems, and also developing novel systems to face the therapeutic proteins demands. Cell-free expression system for production of recombinant proteins has also introduced which has many advantages over production of recombinant proteins in cell systems. Rapid growing and developing market of recombinant therapeutics and industrial enzymes have doubled the necessity of developing and optimizing industrial strains and biological process. Using systems biology and applying engineering principles for optimization and development of biological systems are effective strategies, that using them in the development of recombinant protein production processes is increasing rapidly.

Keywords: recombinant protein, e. coli, yeast, mammalian cell, systems biology

پیشرفت های اخیر در تولید پروتئین های نو ترکیب

تاریخ دریافت: ۲۹ خرداد ۱۳۹۲ تاریخ اصلاح: ۱۲ شهریور ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۴ شهریور ۱۳۹۲

چکیده

سید بابک موسوی^۱

سید عباس شجاع الساداتی^{*۲}

^۱ دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
^۲ آستاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول:

سید عباس شجاع اساداتی

تلفن: (+۹۸)۹۱۲۱۳۰۰۵۰۱

پست الکترونیک:

shoja_sa@modares.ac.ir

تولید پروتئین های نو ترکیب یکی از مهمترین دستاوردهای زیست فناوری در قرن بیستم است. استفاده از قدرت طبیعی سلول های میزبان پروکاریوتی و یوکاریوتی در بیان پروتئین های نو ترکیب باعث توسعه صنایع چند میلیارد دلاری شده است. پروتئین های نو ترکیب اهمیت بسیار زیادی برای کاربردهای پزشکی پیدا کرده اند. اکثر پروتئین های نو ترکیب دارویی در سلول های پستانداران تولید می شوند، با این حال باکتری اشریشیا کلاهی میزبانی است که بیشترین استفاده را برای تولید پروتئین های نو ترکیب داشته است. در طی سالیان سامانه های بیانی مختلفی از مخمرها برای تولید پروتئین های نو ترکیب با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته اند. ادغام ویژگی های خوب مخمرها با پیشرفت های مهم در زیست شناسی سامانه ها و زیست شناسی ترکیبی و فناوری ریز آرایه، جایگاه خوبی را برای مخمرها در بین سامانه های بیانی ایجاد کرده است. یک نیاز دائمی برای بهتر کردن سامانه های بیان موجود و همچنین توسعه سامانه های بیانی جدید برای رویارویی با تقاضای پروتئین های دارویی وجود دارد. سامانه بدون سلول برای سنتز پروتئین های نو ترکیب نیز مطرح شده و مزایای زیادی نسبت به تولید پروتئین در سامانه های سلولی دارد. رشد سریع و در حال توسعه بازار داروهای نو ترکیب و آزنیم های صنعتی نیاز به توسعه و بهینه سازی سوبه های صنعتی و فرآیندهای زیستی را دو چندان برابر کرده است. استفاده از زیست شناسی سامانه ها و به کار گیری اصول مهندسی برای بهینه سازی و توسعه سامانه های زیستی راهبردهای موثری هستند که استفاده از آن ها در توسعه فرایندهای تولید پروتئین های نو ترکیب به سرعت در حال افزایش است.

کلید واژه ها: پروتئین های نو ترکیب، اشریشیا کلاهی، مخمر، سلول پستانداران، زیست شناسی سامانه ها

مقدمه

نو ترکیب می توان پروتئین های صنعتی را به صورت اقتصادی با کیفیت پایدار و ایمنی اصلاح یافته تولید کرد. تولید صنعتی پروتئین نو ترکیب منجر به توسعه محصولات بهبود یافته ای برای کاربردهای مختلف می شود؛ مثل دارو رسانی (به عنوان مثال کپسول ژلاتین)، آزنیم های فرایندهای زیستی (به عنوان مثال سلولازها، زایلانازها، لیگنازها، پروتازها، آمیلازها، لیپازها و ایزومرازهای مورد نیاز برای

پروتئین ها واحدهای سازنده حیات هستند که در بخشی از فرایند سوخت و ساز طبیعی سلول های زنده ساخته می شوند. با استفاده از مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین می توان پروتئین ها را در مقیاس صنعتی تولید کرد [۱]. با استفاده از فناوری DNA

(منابع کربن و نیتروژن، شرایط القا و ۸) بهینه سازی پارامترهای فرآیندهای زیستی (دما، pH، انتقال اکسیژن) [۵].

انتخاب سامانه بیان پروتئین

برای هر محصول، سامانه بیان مناسب باید انتخاب و با توجه به خواص محصول و سامانه بیان، از لحاظ ژنتیکی و شرایط کشت بهینه سازی شود. ارزان ترین، راحت ترین و سریع ترین راه بیان پروتئین‌ها با استفاده از باکتری اشریشیاکلاهی انجام می‌شود. با این حال باکتری‌ها قادر به بیان پروتئین‌های خیلی بزرگ نیستند. همچنین، باکتری‌ها برای پروتئین‌های حاوی چندین پیوند دی سولفیدی و پروتئین‌هایی که نیاز به اصلاحات پس ترجمه‌ای دارند، سامانه مناسبی برای انتخاب نیستند. پروتئین‌های بزرگ معمولاً در سامانه‌های یوکاریوتی بیان می‌شوند در حالی که پروتئین‌های کوچک در سامانه‌های پروکاریوتی بیان می‌شوند. برای پروتئین‌هایی که نیاز به گلیکوزیلاسیون^۵ دارند، سامانه سلول‌های پستانداران، قارچ‌ها یا باکلوویروس‌ها انتخاب می‌شوند [۱]. پروتئین‌های غیر گلیکوزیله که ۴۰٪ کل پروتئین‌های درمانی موجود در بازار را تشکیل می‌دهند معمولاً با استفاده از اشریشیاکلاهی یا مخمرها تولید می‌شوند. پروتئین‌های N-گلیکوزیله معمولاً در سلول‌های پستانداران تولید می‌شوند که الگوی گلیکوزیلاسیون آن‌ها شبیه الگوی انسانی است. ۵۰٪ پروتئین‌های درمانی موجود در بازار با استفاده از سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) تولید می‌شوند که فرایند تولید خیلی پرهزینه است و گلیکوپروتئین‌هایی که تولید می‌شوند دقیقاً مانند نمونه انسانی نیستند و در بعضی موارد باید تغییراتی روی آن‌ها اعمال شود. مخمرها، قارچ‌ها و سلول‌های حشرات به طور کلی قادر به انجام الگوی گلیکوزیلاسیون پستانداران نیستند. با این حال پیکاپاستوریس بطور ژنتیکی مهندسی شده است تا بتواند الگوی گلیکوزیلاسیون انسانی را انجام دهد [۶].

در جدول ۱ فهرست پرفروش‌ترین داروهای نوترکیب در سال ۲۰۰۷ به همراه میزبان‌های آن‌ها آورده شده است. از بین ۲۷ محصول زیست دارویی تایید شده توسط FDA (از ژوئن ۲۰۰۸ تا ژانویه ۲۰۱۱)، ۱۸ مورد پروتئین‌های نوترکیبی هستند که با استفاده از سلول‌ها، سازواره‌ها یا حیوانات تولید می‌شوند. ۹ مورد بقیه واکسن‌ها

تبدیل مواد خام کشاورزی به سوخت‌های زیستی)، محصولات مصرفی (به عنوان مثال آنزیم‌های مورد استفاده در شوینده‌ها، آنزیم‌های مورد استفاده در صنایع نساجی، آنزیم‌های سفید کننده، پپتیدهای ضد یخ)، پپتیدهای آنتی‌بیوتیک، عوامل غیرفعال کننده مواد شیمیایی خطرناک و پلیمرهای مبتنی بر پروتئینی با عملکرد پیشرفته (به عنوان مثال ابریشم عنکبوت، الاستین، پپتیدهای طراح) [۲]. با ظهور فناوری DNA نوترکیب در دهه ۱۹۷۰، تولید پروتئین‌های نوترکیب درمانی به صورت اقتصادی و با بازدهی بالا با استفاده از باکتری اشریشیاکلاهی آغاز شد. در اوایل دهه ۱۹۸۰، FDA نخستین داروی پروتئینی نوترکیب (انسولین انسانی نوترکیب) تولید شده در باکتری اشریشیاکلاهی نوترکیب را برای درمان دیابت تایید کرد. سپس راه برای توسعه سایر داروهای نوترکیب باز شد. از آن زمان به بعد، علاوه بر اشریشیاکلاهی، میزبان‌های بیانی مختلف، مانند مخمر، قارچ‌های رشته‌ای، سلول‌های حشرات و سلول‌های پستانداران، حیوانات تراریخته و گیاهان برای تولید داروهای نوترکیب مختلف و یا پیچیده‌تر مانند پادتن مونوکلونال مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳]. تا کنون FDA و EMEA^۲ مجوز استفاده از ۱۵۰ پروتئین نوترکیب را برای استفاده به عنوان دارو صادر کرده‌اند. فروش جهانی زیست داروها حدود ۸۰-۷۰ میلیارد دلار برآورد می‌شود. همچنین تخمین زده می‌شود فروش سالیانه آنزیم‌های صنعتی (مانند پروتازها، آمیلازاها، لیپازها، سلولازها، پولولانازها و پکتینازها) نیز که به طور عمده با استفاده از فرآیندهای نوترکیب تولید می‌شوند، تا سال ۲۰۱۵ به ۷۴/۳ میلیارد دلار در سال برسد [۴].

طراحی سامانه بهینه برای تولید پروتئین نوترکیب شامل چندین مرحله مهم است: ۱) انتخاب سوبه میزبان که توانایی تازدن^۳ صحیح و تغییرات پس ترجمه‌ای^۴ پروتئین را داشته باشد؛ ۲) انتخاب حامل مناسب با پرموتر قوی و یک نشانگر انتخابگر؛ ۳) ژن بهینه سازی کدون؛ ۴) امتزاج ژن با یک برجسب اپیتوپ برای خالص سازی راحت‌تر پروتئین؛ ۵) انتخاب توالی سیگنال برای هدایت پروتئین نوترکیب به فضای داخل سلولی یا خارج سلولی؛ ۶) جلوگیری از تخریب محصول به وسیله پروتازها؛ ۷) طراحی محیط کشت تخمیر

¹: Food and Drug Administration, ²: European Medicines Agency, ³: Folding, ⁴: Post Translational Modification, ⁵: Glycosylation

و داروهایی هستند که به وسیله منابع طبیعی مانند پلاسما ی انسان، بافت، سلول های سرطانی، ویروس های ضعیف شده و باکتری تولید می شوند. از بین ۱۸ محصول نوترکیب، ۱۲ مورد با استفاده از سامانه های بیان سلول های پستانداران، ۳ مورد با استفاده از اشریشیاکلا ی و ۳ مورد باقی مانده با استفاده از باکلوو ویروس، مخمر و بزهای تراریخته تولید می شوند. که این هم اهمیت استفاده از سامانه های پستانداران را در تولید داروهای نوترکیب نشان می دهد [۷].

تقریباً ۴۵ سال پیش مشخص شد که می توان پروتئین های نوترکیب را علاوه بر بیان پروتئین های غیر متجانس در میزبان های پروکاریوتی و یوکاریوتی، با استفاده از عصاره سلول به دست آمده از کافت باکتری اشریشیاکلا ی، به صورت بدون سلول^۱ بیان کرد. در حال حاضر سنتز پروتئین به روش بدون سلول در مواردی که مشکلاتی از قبیل تجمع پروتئین ها به شکل توده های پروتئینی نامحلول، تخریب پروتئین به دلیل فعالیت شدید پروتئازهای داخل سلولی و سمی بودن پروتئین هدف برای سلول میزبان رخ می دهد،

جدول ۱: پرفروش ترین داروهای نوترکیب در سال ۲۰۰۷ [۷].

محصول	درآمد بر حسب دلار	تاریخ تایید	سامانه بیان	استعمال
EPOs	۱۰,۷۹۴	۱۹۸۹	سلول پستانداران	کم خونی
Insulins	۱۰,۱۳۲	۱۹۹۲	اشریشیاکلا ی	دیابت
IFNs	۷۴۵۵	۱۹۹۳	اشریشیاکلا ی و مخمر	عفونت ویروسی و سرطان
Enbrel	۵۲۷۵	۱۹۹۸	سلول پستانداران	آرتریت روماتوئید
Remicade	۴۹۴۸	۱۹۹۸	سلول پستانداران	آرتریت روماتوئید
Rituxan	۴۶۰۰	۱۹۹۷	سلول پستانداران	CLL و NHL
Neupogen/Neulasta	۴۲۷۷	۲۰۰۲/۱۹۹۸	اشریشیاکلا ی	مایلو زوپرسیو در شیمی درمانی
Clotting Factors	۴۱۶۸	۱۹۹۷	سلول پستانداران	هموفیلی
Herceptin	۴۰۴۶	۱۹۹۸	سلول پستانداران	سرطان پستان
Lovenox	۳۶۰۵	۲۰۰۷	N/A	بیماری عروق کرونر
Avastin	۳۴۲۴	۲۰۰۴	سلول پستانداران	سرطان
Humira	۳۰۰۰	۲۰۰۲	سلول پستانداران	آرتریت روماتوئید
Growth Hormones	۲۵۴۵	۱۹۸۵	اشریشیاکلا ی	کمبود هورمون رشد
Prevnar/Prevenar	۲۴۳۹	۲۰۰۲	باکتریایی	پیشگیری از بیماری ناشی از باکتری پنوموکوکوس
Gardasil	۱۴۸۱	۲۰۰۶	مخمر	جلوگیری از سرطان مهبل
Erbix	۱۳۳۶	۲۰۰۴	سلول پستانداران	سرطان
Lucentis	۱۲۱۹	۲۰۰۶	اشریشیاکلا ی	تباهی لکه زرد
Synagis	۱۲۰۰	۱۹۹۸	سلول پستانداران	عفونت ویروس سینسیتیل
Cerezyme	۱۱۴۴	۱۹۹۴	سلول پستانداران	دستگاه تنفسی بیماری گوشه

¹: Cell Free

جدول ۲: ویژگی‌های سامانه بیان اشریشیاکالای [۱]

مزایا	معایب
بیان سریع	مشکل در بیان پروتئین‌های حاوی پیوندهای دی سولفیدی
بازده بالا	تولید پروتئین همراه با زهرابه داخلی
آسان بودن کشت و ایجاد تغییرات ژنتیکی	تولید استات در کشت تراکم سلولی بالا
ارزان بودن فرآیند	بیان پروتئین به شکل توده‌های نامحلول غیر فعال
اقتصادی و سریع بودن کشت در مقیاس بالا	نیاز به باز تاخوردگی پروتئین‌های بیان شده به صورت اجسام الحاقی

تبدیل به یک روش مفید جایگزین برای سامانه‌های بیان سلولی شده است [۸].

نیاز مداوم برای بهبود سامانه‌های بیان موجود و همچنین توسعه روش‌های نوین برای پاسخ به تقاضای در حال رشد برای پروتئین‌های درمانی همواره وجود دارد. رده سلول انسانی به عنوان یک جایگزین جدید و قدرتمند برای تولید پروتئین‌های درمانی انسانی پدید آمده است چرا که انتظار می‌رود این سامانه، پروتئین نوترکیب را با تغییرات پس ترجمه‌ای شبیه به همتای طبیعی خود بیان کند و واکنش ایمنی بالقوه علیه اپیتوپ غیر انسانی را کاهش دهد. در حال حاضر، اطلاعات کمی در مورد کشت سلول‌های انسانی برای تولید زیست داروهای در دست است. این سلول‌ها در مقیاس آزمایشگاهی تولید کارآمدی نشان داده‌اند و می‌توانند به ابزار مهمی برای صنعت داروسازی تبدیل شوند [۹]. اطلاعات پروتئوم^۱ و ترانسکریپتوم^۲ ریزسازوارها اطلاعات ارزشمندی را به دست می‌دهند که می‌توان از آن‌ها برای توسعه روش‌های مهندسی متابولیک و مهندسی سلول استفاده کرد. در سال‌های اخیر ریز تراشه‌ها و ریز آرایه‌ها به ابزار استاندارد برای تجزیه و تحلیل با توان عملیاتی بالا در سطح بیان ژن تبدیل شده‌اند. استفاده از این اطلاعات و به کارگیری مهندسی ژنتیک و مهندسی سلول، پژوهشگران را قادر ساخته است تا با استفاده از روش‌های منطقی به جای روش‌های حدس و خطا میزبان بهتری برای کشت تراکم سلولی بالا طراحی کنند [۱۰]. با توجه به کاربرد زیاد باکتری اشریشیاکالای، مخمرها و سلول‌های پستانداران در تولید پروتئین‌های نوترکیب و همچنین

جذابیت سامانه‌های بدون سلول در تولید پروتئین‌های نوترکیب در ادامه این سامانه‌ها به طور خلاصه مورد بررسی قرار می‌گیرند.

اشریشیاکالای

سامانه بیان اشریشیاکالای همچنان به عنوان پرکاربردترین سامانه بیانی باکتریایی و به عنوان اولین انتخاب برای تحقیقات آزمایشگاهی و توسعه اولیه محصول در فعالیت‌های تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد و به عنوان یک معیار مناسب برای مقایسه میان سامانه‌های بیان مختلف است. همچنین در کارهای مهندسی پروتئین و تجزیه و تحلیل ساختاری توان بالا^۳ بیشتر از باکتری اشریشیاکالای استفاده می‌شود [۱۲ و ۱۱]. استفاده از باکتری اشریشیاکالای دارای مزایا و معایبی است که به طور خلاصه در جدول ۲ آورده شده است.

اگرچه ریز سازواره‌های مختلفی به عنوان میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند، باکتری اشریشیاکالای میزبان غالب استفاده شده در ۳۰٪ فرآیندهای زیستی در هر دو زمینه تولید زیست داروها و آنزیم‌های صنعتی است [۱۳]. کارهایی که برای افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در اشریشیاکالای انجام می‌شود در حالت کلی شامل چهار بخش است: (۱) کاهش پاسخ تنشی؛ (۲) افزایش اصلاحات پس ترجمه‌ای؛ (۳) افزایش ترشح پروتئین و (۴) کاهش تولید استات [۱۴ و ۱۰].

مطالعات نشان می‌دهد که روش‌های به کار رفته برای ترشح پروتئین تولید شده به محیط کشت در اشریشیاکالای در حالت کل به چهار دسته تقسیم می‌شوند. (۱) انجام کارهای مهندسی روی سامانه‌های اختصاصی که بطور طبیعی در اشریشیاکالای‌های بیماری

¹: Proteome, ²: Transcriptome, ³: High Throughput Structure Analysis

مخمرها

سامانه‌های بیانی متعددی از مخمرها به طور موفقیت آمیز برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفته اند. طیف گسترده‌ای از میزبان‌های بیان مخمری وجود دارد که شامل گونه‌های ساکارومایسیس سرویزیه، پیکیا پاستوریس، هانسولا پلیمورفا، کلویرومایسیس لاکتیس و ... است. این سویه‌ها ویژگی‌های زیادی مانند مقاوم بودن در برابر گرما یا نور، سرعت زیاد در رسیدن به تراکم سلولی بالا و استفاده از منابع کربن غیر عادی را دارا می‌باشند. چندین سویه نیز مهندسی شده‌اند تا پروتئاز منفی باشند و الگوی گلیکوزیلاسیون انسانی داشته باشند. همچنین، در دسترس بودن حامل‌ها، پروموتورها و نشانگرهای متنوع به همراه دانش گسترده در زمینه روش‌های تخمیر در مقیاس صنعتی و پیشرفت‌های اخیر در فناوری پست ژنومیکس، زیست شناسی سامانه‌ها و زیست شناسی ترکیبی^۲، امکان طراحی سامانه‌های اقتصادی تر مخمر را به منظور تامین نیاز در حال افزایش برای پروتئین‌های نو ترکیب و گلیکو پروتئین‌ها به وجود آورده است [۵].

دو گونه پر کاربرد مخمر برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب، ساکارومایسیس سرویزیه و مخمر متیلوتروف پیکیا پاستوریس، است. ساکارومایسیس سرویزیه اولین سامانه بیانی مخمر توسعه یافته شده است که مشخصاتش کاملاً تعیین شده است. اما به دلیل ناپایداری پلاسمید، بازده پایین در بیان پروتئین و گلیکوزیلاسیون بیش از حد پروتئین‌ها استفاده از آن را برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب محدود کرده است. این امر منجر به توسعه سامانه‌های بیان دیگری از مخمرها شده است که در حال حاضر به خوبی توسعه یافته‌اند [۱۸]. یکی از این سامانه‌ها مخمرهای متیلوتروف هستند که از مسیر سوخت و سازی استفاده می‌کنند که آن‌ها را قادر به استفاده از متانول به عنوان تنها منبع کربن می‌کند [۱۹ و ۱]. استفاده از مخمرهای متیلوتروف نسبت به ساکارومایسیس سرویزیه مزایایی دارد که عبارتند از: (۱) محصول دهی بالای پروتئین؛ (۲) اجتناب از گلیکوزیلاسیون بیش از حد؛ (۳) رشد در محیط کشت حاوی متانول که مانع از رشد دیگر میکرو ارگانیسم‌ها می‌شود؛ (۴) راه اندازی و نگهداری ارزان سامانه؛ (۵) ادغام چندین نسخه از DNA خارجی در

زا وجود دارد؛ (۲) استفاده از پروتئین‌های حامل با سازوکار جایابی ناشناخته؛ (۳) استفاده از سلول‌هایی با پوشش جهش یافته؛ (۴) بیان پروتئین مورد نظر همراه با پروتئینی که باعث افزایش کافت سلول می‌شود [۱۴].

برای کاهش تولید استات از سه روش می‌توان استفاده کرد:

(۱) حذف ژن مسیر تولید استات؛

(۲) جلوگیری از سوخت و ساز اضافی با محدود کردن سامانه جذب گلوکز با تغییر منبع کربن، به کار گیری روش‌های دقیق خوراک دهی و انجام کارهای مهندسی ژنتیک روی سامانه جذب گلوکز؛

(۳) جلوگیری از سوخت و ساز اضافی با هدایت جریان‌های سوخت و ساز مرکزی و حفظ مقدار کافی از پیش سازهای اسیدهای آمینه [۱۵].

مشکلات بالقوه استفاده از نشانگرهای آنتی بیوتیکی و نشانگرهای مقاوم در برابر آنتی بیوتیک در تولید پروتئین‌های نو ترکیب در مقیاس بالا از زمان‌های گذشته مورد توجه قرار گرفته است، اما به تازگی تلاش‌هایی برای توسعه روش‌های جایگزین برای گزینش پذیری سلول انجام شده است. در تولید پروتئین نو ترکیب، ژن مقاوم به آنتی بیوتیک موجود در پلاسمید معمولاً آنزیم مقاوم کننده را به صورت پیوسته در سطحی که لزوم ندارد، بیان می‌کند. این بیان بدون توقف، بار سوخت و ساز اضافی بر سلول میزبان وارد می‌کند و می‌تواند باعث شود که هم آنزیم مقاوم کننده و هم خود آنتی بیوتیک به صورت یک آلودگی در محصول مورد نیاز ظاهر شوند [۱۶]. علاوه بر این مهندسی فرایند گلیکوزیلاسیون و دیگر اصلاحات پس ترجمه‌ای در سامانه اشیریشیاکالی، پیشرفت‌های ارزشمندی در سال‌های اخیر به شمار می‌روند. تا چند سال گذشته تصور می‌شد که اشیریشیاکالی قادر به گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های بیان شده نیست، اما کشف سامانه گلیکوزیلاسیون بر پایه نیتروژن در باکتری گرم منفی کمپیلوباکتر ججونی^۱ و انتقال آن به سامانه اشیریشیاکالی امکان استفاده از اشیریشیاکالی برای بیان گلیکوپروتئین‌ها را فراهم آورده است [۱۷].

¹: Campylo Bacter Jejuni , ²: Synthetic Biology

سلول‌های پستانداران، در بسیاری از موارد، از ویروس‌های سرطان‌زا به دست می‌آیند و از رده‌های سلولی تراریخت شده به عنوان میزبان استفاده می‌شود. بنابراین، استفاده از آن‌ها برای تولید داروهای نگرانی‌ها در مورد ایمنی محصولات را افزایش می‌دهد [۲۳]. در طول ۲۵ سال گذشته بازده حجمی رده‌های سلولی نوترکیب در حدود ۲۰ برابر افزایش یافته است که به طور عمده نتیجه پیشرفت در بهینه‌سازی محیط کشت و طراحی فرآیندهای زیستی است. انتظار می‌رود افزایش بازده در آینده از روش‌های انتقال ژن، استفاده از سویه‌های اصلاح ژنتیکی شده و بهینه‌سازی فرآیندهای زیستی در زیست واکنش‌گاه‌ها حاصل شود [۲۴]. اخیراً محصول دهی کشت سلول‌های پستانداران در زیست واکنش‌گاه‌ها در برخی موارد به حدود یک گرم در لیتر نیز رسیده است که تقریباً ۱۰۰ برابر بازده فرآیندهای مشابهی است که در اواسط سال‌های ۱۹۸۰ انجام می‌شد. این افزایش بهره‌وری حجمی محصول، حاصل پیشرفت‌هایی در بهینه‌سازی محیط کشت و کنترل فرایند است. هنوز هم زمینه‌هایی برای بهبود سامانه‌های سلول‌های پستانداران از طریق پیشرفت‌های بیشتر در سامانه‌های تولید و همچنین از طریق مهندسی سلول میزبان و حامل وجود دارد [۲۵].

سامانه بیان بدون سلول

نیروی محرکه توسعه این فناوری، توانایی بالقوه آن در بیان سریع پروتئین فعال از DNA نوترکیب (rDNA) بوده است. سامانه‌های بدون سلول دارای مزایای متمایزی نسبت به استفاده از سامانه‌های سلولی برای تولید پروتئین از rDNA می‌باشند. بدون نیاز به فرآیندهای فرعی مورد نیاز برای زیست‌پذیری و رشد سلول، سامانه سنتز پروتئین به روش بدون سلول امکان بهینه‌سازی عصاره سلولی برای تولید انحصاری محصول تک پروتئینی را فراهم می‌کند. فقدان دیواره سلولی، محیط باز و چند منظوره‌ای را برای نظارت فعال، نمونه‌گیری سریع و دستکاری مستقیم فرایند سنتز پروتئین و همچنین امکان غربال‌گری بدون نیاز به مرحله کلونینگ ژن را فراهم می‌کند که باعث توسعه سریع محصول و فرایند می‌شود [۲۶]. اگرچه هر سازواره‌ای می‌تواند به صورت بالقوه متشابه کافت خام برای سامانه بدون سلول باشد، اما عمومی‌ترین سامانه‌های بیان بدون

داخل DNA کروموزومی که سویه‌های نوترکیب پایداری را نتیجه می‌دهد [۲۰].

با این حال استفاده از پیکیا پاستوریس برای بیان پروتئین نوترکیب معایبی نیز دارد. تعدادی از پروتئین‌ها برای تاخوردگی صحیح به چارپون‌ها نیاز دارند که پیکیا پاستوریس قادر به تولید آن‌ها نیست. گرین-گراس^۱ با عوض کردن آنزیم‌های مسئول گلیکوزیلاسیون در مخمر با مشابه آن‌ها از سلول‌های پستانداران، الگوی گلیکوزیلاسیون پیکیا پاستوریس را تغییر داد تا پروتئین نوترکیب به شکل کاملاً فعال بیان شود [۲۱].

همچنین مدل‌های ریاضی جامعی از سوخت و ساز مخمر برای شناسایی یا شبیه‌سازی روش‌های مهندسی متابولیک مورد استفاده قرار می‌گیرند، که ممکن است به میزان قابل توجهی به توسعه فرآیندهای تولید پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از مخمرها کمک کند [۲۲].

سلول‌های پستانداران

سلول‌های پستانداران منبع طبیعی بسیاری از پروتئین‌های درمانی می‌باشند و به عنوان بهترین سامانه برای تولید پروتئین‌ها ی نوترکیب با کاربرد بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند. زیرا این سامانه‌ها توانایی تغییرات پس ترجمه‌ای دارند و پروتئین‌هایی شبیه به پروتئین‌های انسانی تولید می‌کنند. بیش از نیمی از زیست داروهای موجود در بازار با استفاده از سلول‌های پستانداران تولید می‌شوند و چند صد مورد نیز در مراحل توسعه بالینی هستند [۲۳] و [۷]. اگر چه بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب به طور کامل توسعه یافته و سلول‌های تخمدان موش چینی برای اکثر محصولات موجود در بازار و محصولات در حال توسعه مورد استفاده قرار می‌گیرد، پیشرفت‌های مهمی در زمینه توسعه و مهندسی رده‌های سلولی جدید (شامل سازوکار ژنتیکی بیان، خاموش کردن ژن و هدف‌گیری ژنی) در سال‌های اخیر گزارش شده است [۷]. با پیشرفت‌های اخیر در مهندسی ژنتیک می‌توان پروتئین‌های نوترکیب را با بازده بالایی در سلول‌های پستانداران تولید کرد. در برخی موارد، استفاده از سلول‌های پستانداران به عنوان میزبان غیر قابل اجتناب است. حامل‌ها یا اجزای مورد استفاده برای مهندسی

¹: Gerngross

شود. یکی از مشکلات مهم نحوه بیان پایین پروتئین است که فرایند خاص سازی را نیز پیچیده و کل فرایند را به خطر می اندازد [۳۲]. اخیراً استفاده از ابزار زیست شناسی سامانه ها در توسعه و بهبود سویه ها و استفاده از روش های زیست فناوری سامانه ها با استفاده از اطلاعات امیکس (ژنومیکس، پروتئومیکس و ...) و به کارگیری مهندسی ژنتیک برای ارزیابی و توسعه مهندسی زیست فناوری سویه های صنعتی، به شدت در حال افزایش است [۳۳]. در شکل ۱ طرح شماتیک استفاده از ابزار زیست شناسی سامانه ها در توسعه مهندسی زیست فناوری سویه های صنعتی و مهندسی فرآیندهای زیستی نشان داده شده است.

این یافته ها در طراحی مسیرهای سوخت و ساز و روش های تخمیر برای تولید پروتئین های نو ترکیب و متابولیت ها با استفاده از کشت تراکم سلولی بالا خیلی ارزشمند هستند [۱۰]. با افزایش تقاضا برای داروهای نو ترکیب نیاز به افزایش مقیاس فرایندهای تولید پروتئین نو ترکیب افزایش یافته است. در کشت غیر مداوم می توان به ۵-۱۰ گرم وزن خشک در هر لیتر دست یافت ولی با استفاده از روش های خوراک دهی در کشت غیر مداوم می توان به وزن خشک بالای ۵۰ گرم بر لیتر نیز دست پیدا کرد [۳۴]. مطالعات و کارهای توسعه ای زیادی در زمینه کشت تراکم سلولی بالا انجام شده است. کشت تراکم سلولی بالا به طور گسترده ای برای تولید پروتئین نو ترکیب از باکتری اشریشیا کلاهی استفاده می شود و بسیاری از کارهای تحقیقاتی روی تولید پروتئین نو ترکیب به دلیل شناخته شده بودن ژنتیک و ساختار اشریشیا کلاهی، روی این باکتری انجام می شوند [۱۰، ۳۵].

پارامترهای عملیاتی فرآیندهای زیستی که می توانند عملکرد و کیفیت محصول را خیلی تحت تاثیر قرار دهند عبارتند از: ترکیب محیط کشت، دما، pH، میزان اختلاط و هوادهی، استراتژی های خوراک دهی و روش های القا [۳۶]. در کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی هدف اصلی رسیدن به غلظت بالای محصول است و روش خوراک دهی یکی از مهم ترین عوامل در موفقیت این فرایند است. روش های خوراک دهی مختلف شامل خوراک دهی با سرعت ثابت، افزایش مرحله به مرحله سرعت خوراک دهی و خوراک دهی

سلول شامل عصاره اشریشیا کلاهی (ECE)، رتیکولوسیت خرگوش (RRL)، جوانه گندم (WGE) و سلول های حشرات (ICE) هستند. از آنجا که نحوه عمل این سلول ها خیلی با همدیگر تفاوت دارد، عصاره به دست آمده از آن ها نیز خیلی با هم متفاوت است [۲۸ و ۲۷].

فرایند سنتز پروتئین به روش بدون سلول را می توان به دو صورت غیر مداوم (بسته) و پیوسته انجام داد. اجزای ضروری مورد نیاز برای سنتز پروتئین در هر دو روش یکسان است. با این حال در روش غیر مداوم (سامانه بسته) فرایند سنتز پروتئین تا زمانی ادامه پیدا می کند که یکی از اجزا تجزیه شود (مانند mRNA) یا یکی از اجزا در مخلوط واکنش تمام شود (مانند ATP)، که معمولاً این فرایند یک تا دو ساعت طول می کشد [۲۹]. در روش جریان پیوسته اسیدهای آمینه، منبع انرژی و دیگر اجزای مورد نیاز به طور پیوسته به محفظه واکنش افزوده می شوند و فرآورده های جانبی سنتز پروتئین (GDP, AMP و غیره) از طریق غشای اولترا فیلتر از محفظه واکنش حذف می شوند تا فرایند سنتز پروتئین برای مدت طولانی تری ادامه پیدا کند تا امکان تولید صدها مولکول پروتئین از یک مولکول mRNA فراهم شود [۳۰]. در طول چندین سال پیشرفت های زیادی در زمینه روش های سنتز پروتئین به روش بدون سلول حاصل شده است که در نتیجه این پیشرفت ها، مدت زمان واکنش تا ۱۰۰ ساعت افزایش پیدا کرده است. با بهینه سازی شرایط واکنش میزان سنتز پروتئین با استفاده از این روش برای کلورامفنیکول استیل ترنسفرز در ۲۱ ساعت تا ۶ گرم در هر میلی لیتر مخلوط واکنش افزایش پیدا کرد [۳۱]. این پیشرفت ها سنتز پروتئین به روش بدون سلول را به سامانه ای مناسب برای مقاصدی مانند برچسب زنی ایزوتوپی پروتئین ها، سنتز پروتئین های مصنوعی دارای اسید آمینه های غیر طبیعی، سنتز کتابخانه های پروتئینی برای ژنومیک وظیفه گرا، زیست شناسی ساختاری و بیان ذرات شبیه ویروس تبدیل کرده است [۲۹، ۳۱، ۲۶].

تولید صنعتی پروتئین های نو ترکیب

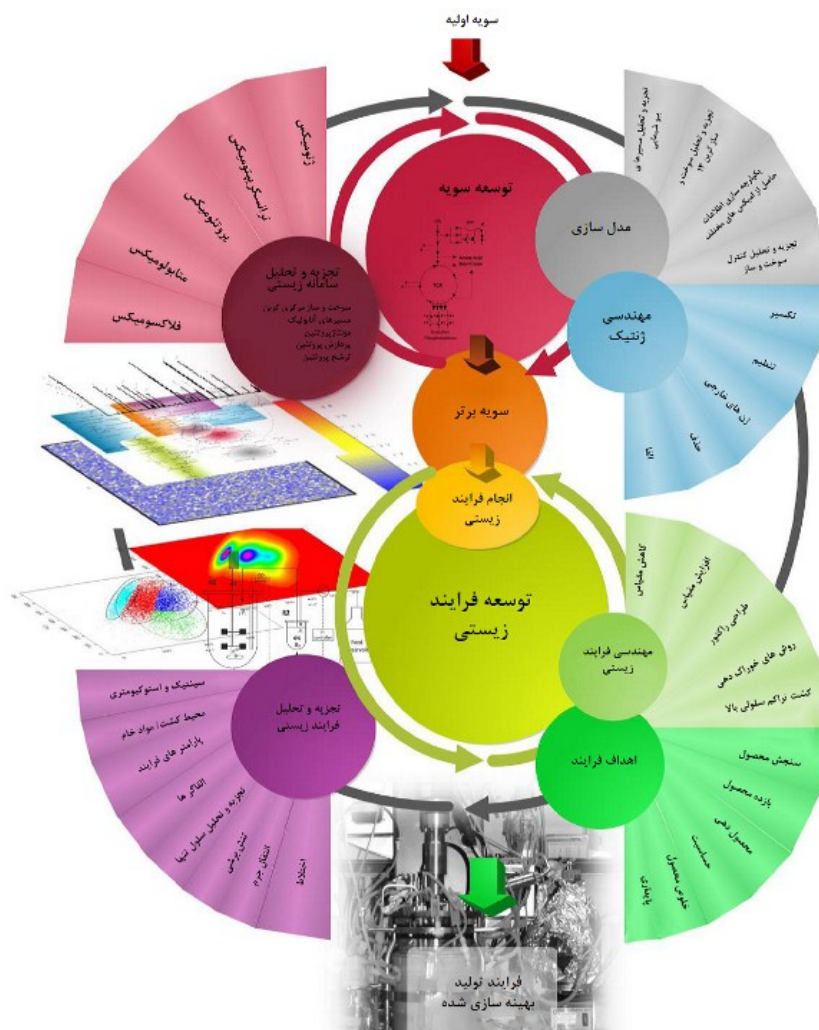
قبل از راه اندازی فرایند تولید صنعتی پروتئین های نو ترکیب باید بسیاری از مشکلات در ارتباط با تولید و خالص سازی آن برطرف

انتقال اکسیژن در زیست واکنش گاه، می توان به تراکم سلولی و محصول دهی بالاتری دست یافت. زیرا محدودیت اکسیژن باعث تولید چندین متابولیت مانند مخلوط اسیدهای مانند ساکسینیت، استات، اتانول، لاکتات و هیدروژن می شود که نامطلوب هستند و باعث کاهش محصول دهی در زیست واکنشگاه می شوند. همچنین باید در نظر گرفته شود که اکسیژن خود به تنهایی برای بعضی ریز سازوارهها سمی است [۱۰].

با بهینه سازی محیط کشت تعریف شده و معرفی استراتژی های خوراک دهی برای تامین منبع کربن می توان از تجمع اجزای محیط کشت پیچیده اجتناب کرد. برای به حداقل رساندن تولید این مواد مهار کننده رشد می توان شرایط کشت را بهینه سازی کرد. بهینه سازی محیط کشت برای تولید پروتئین نوترکیب جدید با توجه به

نمایی برای دستیابی به تراکم سلولی بالا در کشت های غیر مداوم همراه با خوراک دهی مورد استفاده قرار گرفته اند [۳۷ و ۱۰]. روش خوراک دهی نمای برای رشد سلول ها در سرعت رشد ویژه ثابت یا متغیر توسعه یافته است. در این روش با کنترل سرعت رشد ویژه در مقادیر کمتر از مقدار بحرانی، می توان تولید استات (یکی از مهم ترین مشکلات کشت تراکم سلولی بالا) را به حداقل رساند [۳۸]. بابایی پور با طراحی روش خوراک دهی «سرعت رشد ویژه بیشینه قابل دسترس» توانست در ۱۸ ساعت به وزن خشک ۱۲۰ گرم بر لیتر و ۴۰ گرم بر لیتر اینترفرون گاما دست پیدا کند [۳۵].

مشکل اصلی در ارتباط با کشت سلولی تراکم بالا، سرعت مصرف بالای اکسیژن و سوبسترا و تجمع متابولیت های مهار کننده رشد در سوسپانسیون سلولی در حین کشت است [۳۹]. با افزایش ظرفیت



شکل ۱: زیست فناوری سامانهها برای توسعه سویه های صنعتی و مهندسی فرایندهای زیستی [۳۳]

¹: Functional Genomics

حاصل می شود. روش های مختلف کشت با به کارگیری سویه های میزبان و سامانه های بیان مختلف با موفقیت برای تولید پروتئین های نوترکیب به کار گرفته شده اند. روش های مختلف از جنبه های متفاوت را می توان برای بهبود تولید پروتئین های نوترکیب به کار گرفت از جمله: طراحی میزبان، تنظیم بیان پروتئین نوترکیب، طراحی محیط کشت، روش های کشت و حتی کنترل و تجزیه و تحلیل فرآیند، با موفقیت برای افزایش بازده فرایند کشت تراکم سلولی بالا مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه محدوده کاملی از ابزار آزمایشی و محاسباتی زیست شناسی سامانه ها برای بررسی اجزاء مختلف سلولی در سطح ترنسکریپتوم، پروتئوم یا متابولوم و بر هم کنش کارکردی آن ها یعنی فلاکسوم، در دسترس است. این ابزار پایگاهی عقلگرایانه برای مهندسی متابولیک سامانه ها به منظور تغییر طراحی ریز سازواره ها به سویه های سطح بالا فراهم می کند.

منابع

1. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Bio-technol Adv* 2009; 27: 297-306.
2. Ritala A, Wahlström EH, Holkeri H, Hafren A, Mäkeläinen K, Baez J, et al. Production of a recombinant industrial protein using barley cell cultures. *Protein Expr Purif* 2008; 59: 274-81.
3. Huang CJ, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2012; 39: 383-99.
4. Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discov Today* 2010; 15: 773-80.
5. Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotech Adv* 2012; 30: 1108-18.
6. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks—2003. *Nat Biotech* 2003; 21: 865-70.
7. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotech Adv* 2012; 30: 1158-70.
8. Nathans D, Notani G, Schwartz JH, Zinder ND. Biosynthesis of the coat protein of coliphage f2 by *e. coli* extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962; 48: 1424-31.
9. Swiech K, Picanco-Castro V, Covas DT. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr Purif* 2012; 84: 147-53.
10. Shojaosadati SA, Varedi Kolaei SM, Babaeipour V, Farnoud AM. Recent Advances in High Cell Densi-

نوع میکروارگانیزم و محصول متفاوت است [۴۰ و ۳۹]. یک روش دیگر برای حذف مواد مهار کننده رشد استفاده از راکتورهای دیالیزی است که در آن ها متابولیت های مهار کننده رشد با استفاده از غشاهای دیالیزی از سوسپانسیون سلولی حذف می شوند و در نتیجه مدت زمان فاز رشد لگاریتمی سلول ها و بازده تولید افزایش می یابد. فکس^۱ و کاستر^۲ موفق شدند در کشت باکتری نوترکیب اشریشیاکالی K12 با استفاده از راکتور دیالیزی با حجم ۳۰۰ لیتری با مدول غشایی خارجی به وزن خشک ۱۹۰ گرم بر لیتر برسند که مقدار پروتئین نوترکیب تولید شده با این روش در مقایسه با کشت غیر مداوم خوراک دهی شده ۸/۳ برابر بود [۳۹].

نتیجه گیری

تولید پروتئین های نوترکیب به عنوان یکی از مهمترین شاخه های زیست فناوری مدرن است و شامل کسب و کار میلیارد دلاری در هر دو زمینه تولید زیست داروها و آنزیم های صنعتی است. اگرچه ریز سازواره های مختلفی به عنوان میزبان برای تولید پروتئین های نوترکیب مورد استفاده قرار می گیرند، باکتری اشریشیاکالی میزبان غالب استفاده شده در ۳۰٪ فرآیندهای زیستی در هر دو زمینه تولید زیست داروها و آنزیم های صنعتی است. بطور معمول پروتئین های بزرگ و پیچیده در سامانه های یوکاریوتی بیان می شوند در حالی که پروتئین های کوچکتر و ساده تر در سامانه های پروکاریوتی بیان می شوند. کشت سلول های پستانداران، به دلیل توانایی آن ها برای تازدن صحیح پروتئین ها، مونتاژ و اصلاحات پس ترجمه ای تبدیل به سامانه غالب برای تولید پروتئین نوترکیب برای کاربردهای بالینی شده است. بنابراین، کیفیت و اثر بخشی پروتئین های نوترکیبی که در سلول های پستانداران تولید می شوند در مقایسه با میزبان دیگر مثل باکتری ها، گیاهان و مخمر بهتر است. همچنین سنتز پروتئین به روش بدون سلول به عنوان یک فناوری قدرتمند برای تولید راحت و کارآمدتر پروتئین های نوترکیب به سرعت در حال توسعه است. وقتی سامانه های بیان سلولی و بیان بدون سلول پروتئین با هم ادغام می شوند، یک ابزار قدرتمند برای سنتز و تولید پروتئین ها فراهم می آورند. وقتی که اصول مهندسی نیز وارد کار شود، تاثیر فوق العاده ای در پژوهش های زیستی و تولید صنعتی

¹: Fochs, ²: koster

- ty Cultivation for Production of Recombinant Protein. Iran J Biotech 2008; 6: 63-84.
11. Gordon E, Horsefield R, Swarts HGP, de Pont JJHMM, Neutze R, Snijder A. Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 2008; 62: 1-8.
 12. Koehn J, Hunt I. High-Throughput Protein Production (HTPP): A review of enabling technologies to expedite protein production. Methods Mol Biol 2009; 498: 1-18.
 13. Waegeman H, Mey MD. Increasing Recombinant Protein Production in *E. coli* by an Alternative Method to Reduce Acetate. Advances in Applied Biotechnology 2012.
 14. Ni Y, Chen R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. Biotechnol Lett 2009; 31: 1661-70.
 15. De Mey M, Lequeux GJ, Beauprez JJ, Maertens J, Van Horen E, Soetaert WK, et al. Comparison of Different Strategies to Reduce Acetate Formation in *Escherichia coli*. Biotechnol Prog 2007; 23: 1053-63.
 16. Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. Biotech Adv 2012; 30: 1102-7.
 17. Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, Hitchen PG, Marolda CL, Kowarik M, et al. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 3016-21.
 18. Gellissen G, Strasser AW, Suckow M. Key and criteria to the selection of an expression platform. Production of recombinant proteins—Novel microbial and eukaryotic expression systems 2005: 1-5.
 19. Maghsoudi A, Hosseini S, Shojaosadati SA, Vasheghani-Farahani E, Nosrati M, Bahrami A. A new methanol-feeding strategy for the improved production of β -galactosidase in high cell-density fed-batch cultures of *Pichia pastoris* Mut⁺ strains. Biotechnol. Bioprocess Eng 2012; 17: 76-83.
 20. Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 5022-7.
 21. Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nat Biotech 2004; 22: 1409-14.
 22. Papini M, Salazar M, Nielsen J. Systems Biology of Industrial Microorganisms. In: Wittmann C, Krull R, editors. Biosystems Engineering I. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. 120: Springer Berlin Heidelberg 2010; 51-99.
 23. Ramabhadran TV. Products from genetically engineered mammalian cells: Benefits and risk factors. Trends Biotechnol 1987; 5: 175-9.
 24. De Jesus M, Wurm FM. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. Eur J Pharm Biopharm 2011; 78: 184-8.
 25. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotech 2004; 22: 1393-8.
 26. Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC. Cell-free protein synthesis: Applications come of age. Biotech Adv 2012; 30: 1185-94.
 27. Zawada JF, Yin G, Steiner AR, Yang J, Naresh A, Roy SM, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. Biotechnol Bioeng 2011; 108: 1570-8.
 28. Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. Trends Biotechnol 2005; 23: 150-6.
 29. Stiege W, Erdmann VA. The potentials of the in vitro protein biosynthesis system. J Biotechnol 1995; 41: 81-90.
 30. Rattan SI, Kristensen O. Continuous gene expression in vitro: the Spirin system. Trends Biotechnol 1990; 8: 275-6.
 31. Kigawa T, Yabuki T, Yoshida Y, Tsutsui M, Ito Y, Shibata T, et al. Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. FEBS Lett 1999; 442: 15-9.
 32. Rolland D, Raymond F, Gauthier M, Fournier C, Charrier JP, Jolivet M, et al. Strategies for improving production and purification of a recombinant protein: rP30 of *Toxoplasma gondii* expressed in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2008; 861: 186-95.
 33. Korneli C, David F, Biedendieck R, Jahn D, Wittmann C. Getting the big beast to work—Systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins. J Biotechnol 2013; 163: 87-96.
 34. Yee L, Blanch HW. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. Biotechnology (N Y) 1992; 10: 1550-6.
 35. Babaeipour V, Shojaosadati SA, Robatjazi SM, Khalilzadeh R, Maghsoudi N. Over-production of human interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. Process Biochem 2007; 42: 112-7.
 36. Choi JH, Keum KC, Lee S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chem Eng Sci 2005; 61: 876-85.
 37. Liu C, Gong Z, Shen B, Feng E. Modelling and optimal control for a fed-batch fermentation process. Appl Math Model 2013; 37: 695-706.
 38. Lee J, Lee SY, Park S, Middelberg APJ. Control of fed-batch fermentations. Biotechnol Adv 1999; 17: 29-48.

39.Fuchs C, Köster D, Wiebusch S, Mahr K, Eisbrenner G, Märkl H. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of Escherichia coli. J Biotechnol 2002; 93: 243-51.

40.Mahmoud K. Recombinant Protein Production:Strategic Technology and a Vital Research Tool. Res J Cell Mol Biol 2007; 1: 9-22.