اول دفتر به نام ایزد دانا

صانع پروردگار حیّ توانا

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای امیر مقصودی رساله ۲٤ واحدی خود را **با عنوان توسعه روش های جدید خوراك دهی در کشت های غیر مداوم با خوراك دهی مخمر پیکیا پاستوریس برای افزایش تولید پروتئین نو ترکیب** در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۹ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی پیشنهاد می کنند.

عضو هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
استاد راهنما	دکتر سید عباس شجاع الساداتی	استاد	
استاد مشاور	دکتر علی بهرامی	استادیار	
استاد مشاور	دکتر محسن نصرتی	استادیار	
استاد ناظر	دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی	استاد	
استاد ناظر	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	
استاد ناظر	دکتر فاطمه تابنده	استادیار	
استاد ناظر	دکتر باقر یخچالی	دانشیار	
استاد ناظر	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده 1- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده 2- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده 3- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده 4- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده 5- این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ 87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب ضمیر معموری دانشجوی رشته مهندسی شیمی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۶
مقطع دکتری دانشکده مهندسی شیمی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا: ضمیر معموری

تاریخ: ۹۰/۱۱/۱۰

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده 1: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته مهندسی شیمی است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر سجاد السادات، مشاوره ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر علی بهرامی و مشاوره ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر محسن نصری از آن دفاع شده است.»

ماده 3: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده 4: در صورت عدم رعایت ماده 3، 50٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده 5: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده 6: اینجانب امیر مسعودی دانشجوی رشته مهندسی شیمی مقطع دکتری تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: امیر مسعودی

تاریخ و امضا: ۹۰/۱۱/۲۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده مهندسی شیمی

رساله دوره دکتری مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی

توسعه روش‌های جدید خوراک‌دهی در کشت‌های غیرمداوم با خوراک‌دهی مخمر *پیکیا پاستوریس* برای افزایش تولید پروتئین نوترکیب

امیر مقصودی

استاد راهنما
دکتر سید عباس شجاع‌الساداتی

استادان مشاور
دکتر محسن نصرتی، دکتر علی بهرامی

دی ماه ۱۳۹۰

تقدیم به آن‌هایی که وجودم از آن‌هاست

پدر ارجمند و مادر مهربانم

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که بر من منت نهاد تا خوشه‌چین دانش بی‌منتهای او شوم. از استاد گران‌مایه‌ام جناب آقای دکتر سیدعباس شجاع‌الساداتی به جهت راهنمایی‌ها و حمایت‌های ارزشمند و بی‌دریغشان، کمال تشکر و قدردانی را دارم. همچنین از کلیه دوستانی که مرا در انجام این پروژه یاری فرمودند تشکر می‌کنم.

امیر مقصودی

دی ماه ۱۳۹۰

چکیده

در بخش اول این پژوهش، از سویه *پیکیا پاستوریس* فنوتیپ Mut^+ تولید کننده درون سلولی آنزیم بتا-گالاکتوزیداز برای مطالعه راهبردهای متداول خوراک‌دهی متانول و توسعه راهبرد جدیدی استفاده شد. سه راهبرد متداول خوراک‌دهی، شامل μ-stat، DO-stat و غلظت متانول ثابت مطالعه شدند و از نظر فعالیت آنزیم‌های الکل اکسیداز، فرمات دهیدروژناز و بتا-گالاکتوزیداز، وزن خشک سلولی، غلظت فرمالدهید و غلظت متانول با یکدیگر مقایسه شدند. در روش خوراک‌دهی متانول با μ-stat $0/025\ h^{-1}$ بالاترین فعالیت بتا-گالاکتوزیداز به دست آمد. یک راهبرد جدید خوراک‌دهی بر پایه داده‌های حاصل از مطالعه راهبردهای متداول خوراک‌دهی توسعه یافت که در آن خوراک‌دهی متانول به مدت ۵ ساعت با μ-stat $0/025\ h^{-1}$ شروع شد، پس از آن با خوراک‌دهی متانول μ-stat $0/030\ h^{-1}$ تا قبل از شرایط محدودیت اکسیژن ادامه یافت و در نهایت با مشکل شدن کنترل اکسیژن محلول در ۲۰٪ اشباع هوا به DO-stat تغییر یافت. کاربرد این خوراک‌دهی جدید منتج به وزن خشک سلولی g/L ۱۰۷/۲، فعالیت ویژه الکل اکسیداز $0/1890\ U/mg_{CDW}$ و فعالیت بتا-گالاکتوزیداز kU/mL ۱۷۳/۵ پس از ۲۹ ساعت از تخمیر شد، که به ترتیب افزایشی ۵/۶، ۲۹/۱ و ۱۵/۷ درصدی نسبت به خوراک‌دهی μ-stat $0/025\ h^{-1}$ نشان می‌دهد. در بخش دیگری از پژوهش حاضر، با استفاده از سویه *پیکیا پاستوریس* فنوتیپ Mut^S و تولید کننده برون سلولی سرم آلبومین انسانی، کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی جدیدی در شرایط نیتروژن محدود ارائه شده است. در این روش خوراک‌دهی، منبع نیتروژن لازم برای رشد سلولی و تولید پروتئین نوترکیب با انتخاب هیدروکسید آمونیوم به عنوان باز در کنترل pH تأمین می‌شود؛ با تغییر پیش فرض‌های t_{ON} و t_{OFF} کنترل کننده pH سرعت تیتراسیون یا به عبارتی سرعت افزودن باز برای تنظیم pH تغییر می‌کند و از این طریق سرعت رشد سلولی کنترل می‌شود. تنظیم نسبت t_{ON}/t_{OFF} در ۰/۵ بر ۱۰ و ۰/۵ بر ۱۵ برای فراهم کردن خوراک‌دهی نیتروژن محدود منتج به رشدی خطی شد و سرعت رشد سلولی را به ترتیب تا g/Lh ۲/۶۴ و ۱/۸۵ کاهش داد. پس از اتمام گلیسرول اولیه موجود در محیط کشت و افزودن مقدار اضافه‌تر از گلیسرول، رشد سلولی در شرایط خوراک‌دهی نیتروژن محدود ادامه یافت. فاز القا با افزودن مخلوطی از متانول و سوربیتول به عنوان گوهرمایه مخلوط و انتخاب مقادیر ۰/۵ بر ۱۰ و ۰/۵ بر ۲۰ برای t_{ON}/t_{OFF} در دو کشت مختلف انجام شد. نسبت t_{ON}/t_{OFF} کم‌تر باعث سرعت رشد و تولید پروتئین نوترکیب پایین‌تری شد. این یافته امکان کنترل سرعت رشد و تولید پروتئین نوترکیب را در تراکم سلولی بالا با استفاده از راهبرد جدید کنترل نیتروژن محدود تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *پیکیا پاستوریس*، بتا-گالاکتوزیداز، سرم آلبومین انسانی، تراکم سلولی بالا، کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱- مقدمه ۱

۲- مروری بر مطالعات انجام شده ۶

۲-۱- تاریخچه به‌کارگیری پیکیا *پاستوریس* ۶

۲-۲- سوخت‌وساز و سامانه بیان در پیکیا *پاستوریس* ۸

۲-۲-۱- مسیرهای مصرف متانول ۸

۲-۲-۲- بیان با پروموتر *pAOX1* ۱۱

۲-۲-۳- فواید و کاستی‌ها در استفاده از سامانه بیان پیکیا *پاستوریس* ۱۳

۲-۳- کشت تراکم سلولی بالا با استفاده از پروموتر *pAOX1* ۱۵

۲-۳-۱- مرحله غیرمداوم گلیسرول ۱۶

۲-۳-۲- مرحله غیرمداوم با خوراک‌دهی گلیسرول و انتقال ۱۷

۲-۳-۳- مرحله القا با متانول ۱۹

۲-۳-۳-۱- راهبردهای کنترل کشت‌های غیرمداوم با خوراک‌دهی ۱۹

۲-۳-۳-۱-۱- کنترل DO-stat ۲۰

۲-۳-۳-۱-۲- کنترل µ-stat ۲۳

۲-۳-۳-۱-۳- غلظت ثابت متانول ۲۵

۲-۳-۳-۱-۴- کشت‌های غیرمداوم با خوراک‌دهی محدود شده با اکسیژن ۲۷

۲-۳-۳-۱-۵- کشت‌های غیرمداوم با خوراک‌دهی محدود شده با دما ۲۸

۲-۳-۳-۲- گوهرمایه‌های مخلوط ۲۹

۲-۴- سوابق پژوهشی مرتبط در گروه بیوتکنولوژی ۳۹

۳- مواد و روش‌ها ۴۱

۳-۱- ریزسازواره ۴۱

۳-۲- محیط‌های کشت و مایه تلقیح ۴۱

۳-۳- شرایط کشت ۴۲

۳-۴- روش‌های اندازه‌گیری ۴۴

۳-۴-۱- حسگر و کنترل کننده غلظت متانول ۴۴

۳-۴-۲- وزن خشک سلولی ۴۵

۳-۴-۳- سنجش فعالیت آنزیمی ۴۵
۳-۴-۴- اندازه‌گیری غلظت فرمالدهید ۴۷
۳-۴-۵- اندازه‌گیری غلظت منیزیم ۴۷
۳-۴-۶- اندازه‌گیری غلظت متانول ۴۷
۳-۴-۷- اندازه‌گیری غلظت‌های گلیسرول و سوربیتول ۴۸
۳-۴-۸- سنجش پروتئین کل، الکتروفرز ژل پلی‌اکریل‌آمید و تعیین غلظت آمونیوم ۴۸
۴- نتایج و بحث ۵۰
۴-۱- کشت‌های غیرمداوم با خوراک‌دهی متانول محدود ۵۰
۴-۲- کشت‌های غیرمداوم با خوراک‌دهی نیتروژن محدود ۶۴
۴-۲-۱- کشت غیرمداوم نیتروژن نامحدود ۶۵
۴-۲-۲- کشت‌های غیرمداوم با خوراک‌دهی نیتروژن محدود ۶۶
۴-۲-۳- کشت‌های تراکم سلولی بالای غیرمداوم با خوراک‌دهی نیتروژن محدود ۶۸
۵- نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۷۵
۵-۱- نتیجه‌گیری ۷۵
۵-۲- پیشنهادها ۷۶
مراجع ۷۷
واژه‌نامه (فارسی به انگلیسی)
واژه‌نامه (انگلیسی به فارسی)

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱: مسیرهای اصلی و آنزیم‌های مرتبط با سوخت‌وساز متانول در مخمرهای متیلوتروف ۹

شکل ۲-۲: سوخت‌وساز ساده شده رشد *پیکیا پاستوریس* روی متانول ۱۱

شکل ۲-۳: مراحل مختلف در کشت *پیکیا پاستوریس* تا رسیدن به تراکم سلولی بالا ۱۶

شکل ۴-۱: نمودار وزن خشک سلولی در برابر زمان القا برای راهبردهای خوراک‌دهی مختلف ۵۱

شکل ۴-۲: نمودار فعالیت ویژه آنزیم الکل اکسیداز در برابر زمان القا برای راهبردهای خوراک‌دهی مختلف ۵۳

شکل ۴-۳: نمودار فعالیت ویژه فرمات دهیدروژناز در برابر زمان القا برای راهبردهای خوراک‌دهی مختلف ۵۴

شکل ۴-۴: نمودار فعالیت بتا-گالاکتوزیداز در برابر زمان القا برای راهبردهای خوراک‌دهی مختلف ۵۶

شکل ۴-۵: نمودار غلظت متانول در برابر زمان القا برای راهبردهای خوراک‌دهی مختلف ۵۷

شکل ۴-۶: نمودار غلظت فرمالدهید در برابر زمان القا برای راهبردهای خوراک‌دهی مختلف ۵۸

شکل ۴-۷: وزن خشک سلولی، غلظت آمونیوم در محیط کشت و مقدار تجمعی افزوده شده هیدروکسید آمونیوم برای تنظیم pH در برابر زمان کشت در کشت غیرمداوم نیتروژن نامحدود ۶۵

شکل ۴-۸: تغییرات غلظت گلیسرول با زمان در کشت‌های نیتروژن نامحدود و نیتروژن محدود با t_{ON}/t_{OFF} برابر ۰/۵ بر ۱۰ و ۰/۵ بر ۱۵ ..... ۶۶

شکل ۴-۹: وزن خشک سلولی، غلظت آمونیوم در محیط کشت و مقدار تجمعی افزوده شده هیدروکسید آمونیوم برای تنظیم pH در برابر زمان کشت در کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی نیتروژن محدود با t_{ON}/t_{OFF} برابر ۰/۵ بر ۱۰ ..... ۶۷

شکل ۴-۱۰: وزن خشک سلولی، غلظت آمونیوم در محیط کشت و مقدار تجمعی افزوده شده هیدروکسید آمونیوم برای تنظیم pH در برابر زمان کشت در کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی نیتروژن محدود با t_{ON}/t_{OFF} برابر ۰/۵ بر ۱۵ ..... ۶۸

شکل ۴-۱۱: وزن خشک سلولی، غلظت آمونیوم در محیط کشت و مقدار تجمعی افزوده شده هیدروکسید آمونیوم برای تنظیم pH در برابر زمان کشت در کشت تراکم سلولی بالای غیرمداوم با خوراک‌دهی نیتروژن محدود با t_{ON}/t_{OFF} برابر ۰/۵ بر ۱۰ ..... ۶۹

شکل ۴-۱۲: غلظت پروتئین کل در محیط کشت در برابر زمان القا در کشت‌های تراکم سلولی بالای غیرمداوم با خوراک‌دهی با t_{ON}/t_{OFF} برابر ۰/۵ بر ۱۰ و ۰/۵ بر ۲۰ ..... ۷۰

شکل ۴-۱۳: آزمایش SDS-PAGE نمونه‌های کشت‌های تراکم سلولی بالای غیرمداوم با خوراک‌دهی با t_{ON}/t_{OFF} برابر ۰/۵ بر ۱۰ و ۰/۵ بر ۲۰ در زمان‌های مختلف پس از القا ۷۱

شکل ۴-۱۴: غلظت متانول و سوربیتول در محیط کشت در برابر زمان القا در کشت‌های تراکم سلولی بالای غیرمداوم با خوراک‌دهی با t_{ON}/t_{OFF} برابر ۰/۵ بر ۱۰ و ۰/۵ بر ۲۰..... ۷۲

شکل ۴-۱۵: وزن خشک سلولی، غلظت آمونیوم در محیط کشت و مقدار تجمعی افزوده شده هیدروکسید آمونیوم برای تنظیم pH در برابر زمان کشت در کشت تراکم سلولی بالای غیرمداوم با خوراک‌دهی نیتروژن محدود با t_{ON}/t_{OFF} برابر ۰/۵ بر ۲۰..... ۷۳

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۴-۱: مقادیر بیشینه اندازه‌گیری شده برای راهبردهای مختلف خوراک‌دهی متانول طی ۲۹ ساعت تخمیر در کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی تراکم سلولی بالای *پیکیا پاستوریس*..... ۶۱

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

فرآیند کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی یکی از انواع فرآیندهای کشت ریزسازواره‌ها یا سلول‌های جانوری و گیاهی است. در یک فرآیند غیرمداوم با خوراک‌دهی، ابتدا کشت سلول موردنظر در شرایط غیرمداوم در محیط کشت مربوط با سرعت رشد ویژه بیشینه انجام می‌شود. پس از اتمام مواد مغذی محیط کشت، تا رسیدن به هدف موردنظر خوراک مغذی به فرمانتور افزوده می‌شود و نهایتاً محصول در انتهای فرآیند برداشت می‌شود. در برخی از فرآیندها، کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی برتری ویژه‌ای نسبت به کشت غیرمداوم دارد، مانند فرآیندهایی شامل مهار کاتابولیت[1]، تولید آمینو اسیدها با سویه‌های جهش یافته اکسوتروف[2]، افزایش زمان تولید و جایگزینی اتلاف آب از طریق تبخیر برای کاهش گرانروی محیط کشت. به علاوه، معمولاً فرآیندهای غیرمداوم با خوراک‌دهی برای رسیدن به تراکم بالای سلولی و محصول‌دهی بالاتر به کار می‌روند. فرآیند غیرمداوم با خوراک‌دهی مشکلات ناشی از کشت تراکم سلولی بالا را، مانند بازدارندگی گوهرمایه[3] یا ماده مغذی، تشکیل محصول فرعی بازدارنده، و محدودیت اکسیژن محلول در کشت هوازی، به حداقل می‌رساند (Yee & Blanch, 1992).

برخی مواد مغذی، از جمله منابع کربن یا نیتروژن، بالاتر از غلظت خاصی می‌توانند باعث بازدارندگی رشد شوند. به این پدیده عمدتاً «بازدارندگی گوهرمایه» اطلاق می‌شود. با خوراک‌دهی این مواد مغذی در کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی، می‌توان غلظت این گوهرمایه‌ها را در مقداری مناسب برای رشد و بدون اثر بازدارندگی نگه داشت. اغلب در حضور مقدار اضافی منبع کربن یا محدودیت اکسیژن در محیط کشت، امکان تجمع محصولات ناخواسته سوخت‌وساز تا غلظت‌های بازدارنده وجود دارد. با خوراک‌دهی گوهرمایه در سرعت‌های محدود کننده رشد، احتمال بالا رفتن غلظت منبع کربن،

[1] catabolite repression
[2] auxotrophic
[3] substrate

محدود شدن اکسیژن محلول و تجمع محصولات فرعی تخمیر از بین می‌رود. این امر در کشت‌های غیرمداوم با خوراک‌دهی امکان‌پذیر است.

بازدهی حجمی یک محصول نوترکیب هم وابسته به تراکم توده زیستی و هم بازدهی ویژه سلولی است. درحالی‌که، فرآیندهای غیرمداوم با خوراک‌دهی در اصل متمرکز بر افزایش تراکم توده زیستی هستند، شرایط کشت می‌تواند بر بازدهی ویژه سلولی مؤثر باشد. بنابراین، برای بیشینه‌سازی بازدهی حجمی محصول باید هر دوی این عوامل در کشت‌های با تراکم سلولی بالا مدنظر قرار بگیرد (Yee & Blanch, 1992).

پیکیا پاستوریس به عنوان یک مخمر متیلوتروف به شکل گسترده‌ای در تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب به کار رفته است. مخمر *پیکیا پاستوریس* شاخص‌های مورد نظر در تولید پروتئین‌های نوترکیب مانند فرآوری صحیح پروتئین، ترشح کارا، رشد سریع، محیط کشت ارزان، سهولت افزایش مقیاس و کاربرد، و رشد تا تراکم سلولی بالا را دارا است. به هر حال، شاید بارزترین ویژگی *پیکیا پاستوریس* به عنوان ریزسازواره میزبان، وجود پروموتر قوی ژن الکل اکسیداز ۱، *pAOX1*، است که با حضور متانول به عنوان منبع کربن القا می‌شود.

روش‌های کشت تراکم سلولی بالا برای بهبود محصول‌دهی پروتئین‌های نوترکیب در کشت‌های *پیکیا پاستوریس* توسعه یافته‌اند. روشی که بیشتر برای کشت تراکم سلولی بالای *پیکیا پاستوریس* استفاده می‌شود یک فرآیند غیرمداوم با خوراک‌دهی چهار مرحله‌ای است. در مرحله اول، توده سلولی با کشت غیرمداوم روی محیط کشت معین با منبع کربن گلیسرول افزایش می‌یابد. مرحله بعد کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی گلیسرول است که طی آن توده زیستی تا سطح تراکم سلولی بالا افزایش می‌یابد. در مرحله انتقال، متانول به مقدار کم به کشت تزریق می‌شود و در عین حال سرعت خوراک‌دهی گلیسرول متوقف می‌شود یا با سرعت غیر مهار کننده ادامه می‌یابد تا با عدم حضور گلیسرول اضافه در محیط کشت *pAOX1* فعال شود. مرحله چهارم، مرحله القا یا تولید است که معمولاً شامل خوراک‌دهی مداومی از متانول است. راهبردهای خوراک‌دهی یا کنترل مختلفی تا به

امروز برای افزایش تولید پروتئین نوترکیب در این مرحله ایجاد شده‌اند. راهبردهای متداول خوراک‌دهی شامل خوراک‌دهی اکسیژن محلول[1] (DO) ثابت، خوراک‌دهی سرعت رشد ویژه ثابت، خوراک‌دهی غلظت متانول ثابت، کشت اکسیژن محدود و کشت دما محدود است.

در فرآیندهای DO ثابت، غلظت DO در محیط کشت با کنترل سرعت خوراک‌دهی گوهرمایه در سطح ثابتی نگه داشته می‌شود. این راهبرد خوراک‌دهی به شکل ویژه مناسب کشت‌های تراکم سلولی بالایی است که در آن‌ها احتمال وقوع کمبود اکسیژن می‌رود. به هر حال، هنگامی که تجمع منبع کربن وجود دارد کنترل DO با تغییر سرعت خوراک‌دهی امکان‌پذیر نیست چون کنترل DO در چنین شرایطی حساسیت خود را از دست می‌دهد. به علاوه، کشت‌های تراکم سلولی بالای *پیکیا پاستوریس* در خوراک‌دهی DO ثابت رفتاری نوسانی دارند. این امر ممکن است به از بین رفتن بازگشت ناپذیر محصول‌دهی کشت منجر شود.

کنترل μ ثابت به عنوان یک راهبرد کنترل حلقه باز ذاتاً مشکلاتی از نظر مقاومت و پایداری فرآیند دارد. اگرچه کاربرد سامانه‌های حلقه باز ساده است اما نمی‌توانند پاسخی به اختلال‌ها و نوسان‌های احتمالی کشت اعمال کنند. اختلال در متغیرهای فرآیند و تغییر در شرایط اولیه ممکن است باعث تجمع بیش از حد متانول شوند. بنابراین، برای دوری از تجمع متانول معمولاً μ در مقدار پیش‌فرضی پایین‌تر از μ_{max} حفظ می‌شود که می‌تواند محصول‌دهی را پایین بیاورد.

پایش دقیق و متعاقب آن کنترل مؤثر غلظت متانول، ملزومات ایجاد فرآیندهای زیستی مقاوم و تکرارپذیر در راهبرد خوراک‌دهی غلظت متانول ثابت هستند. راهبرد کنترل متانول «روشن-خاموش» تنها برای سامانه‌های خطی مناسب است، درحالی‌که عموماً تولید پروتئین ناهمگون در *پیکیا* فرآیندی پیچیده و غیرخطی است. بنابراین، ممکن است این راهبرد کنترل باعث نوسان حول نقطه پیش‌فرض شود. روش‌های کنترل تجربی انتگرالی-نسبی و مشتقی-انتگرالی-نسبی در کنترل غلظت متانول مؤثر بوده‌اند. به دلیل پیچیدگی و غیرخطی بودن فرآیند تخمیر که متأثر از تغییرات ذاتی و بیرونی است،

[1] dissolved oxygen (DO)

تنظیمات بهینه کنترل کننده مشتقی-انتگرالی-نسبی از طریق تنظیم سعی و خطایی یا روش‌های تجربی دیگر تعیین می‌شود.

در کشت‌های اکسیژن محدود، غلظت متانول ثابت نگاه داشته می‌شود اما غلظت اکسیژن محلول متغیر است. در این فرآیندها همیشه به علت محدودیت اکسیژن، DO تا ۰٪ کاهش می‌یابد که این امر باعث افزایش نیروی محرکه انتقال اکسیژن می‌شود. اگرچه باید از محدودیت اکسیژن در خلال مرحله القا دوری جست، به دلیل اثر منفی که بر تولید و بازده پروتئین نوترکیب دارد، در برخی از کشت‌های اکسیژن محدود تولید موفق پروتئین گزارش شده است. به علاوه، بعضی از پروتئین‌ها حتی با بازدهی‌های بالاتری در کشت‌های اکسیژن محدود نسبت به کشت‌های متانول محدود تولید شده‌اند.

در سامانه‌های دما محدود، غلظت متانول در محیط کشت ثابت نگه داشته می‌شود، درحالی‌که برای کاهش مصرف متانول و حفظ DO در مقدار پیش‌فرض، دمای کشت کاهش داده می‌شود. محدودیت دما اغلب برای دوری از کمبود اکسیژن در تراکم سلولی بالا اعمال می‌شود. از این جهت، کشت دما محدود به شکل خاص در کشت فنوتیپ‌های Mut^+ مناسب است، زیرا در کشت‌های این فنوتیپ وجود غلظت نامحدود متانول منجر به محدودیت اکسیژن و مرگ سلولی می‌شود. به هر حال، کاربرد دمای پایین کشت روند افزایش مقیاس را در جایی که ظرفیت انتقال حرارت محدود است دچار مشکل می‌کند.

با در نظر گرفتن محدودیت‌های مرتبط با هر یک از راهبردهای کنترل یاد شده در کشت‌های *پیکیا پاستوریس* به صورت غیرمداوم با خوراک‌دهی، هنوز نیاز به توسعه راهبردهای کنترل جدیدی است که مبتنی بر بازخوردی از کشت باشند، احتمال بیش خوراک‌دهی و تجمع گوهرمایه در آن‌ها نباشد، دارای دمای پایین فرآیندی نباشند، با کمک کنترل کننده‌های معمول در راکتور انجام شوند، و توانایی رسیدن به محصول‌دهی‌های بالا را دارا باشند. همچنین تا کنون پژوهش‌های چندانی در زمینه تغییرات فعالیت آنزیم‌های مسیر سوخت و ساز متانول طی راهبردهای خوراک‌دهی مختلف در کشت‌های غیرمداوم با خوراک‌دهی متانول و رابطه آن با تولید پروتئین نوترکیب صورت نگرفته است.

بنابراین، در پژوهش حاضر هدف اصلی توسعه راهبردهای جدید خوراک‌دهی در مرحله اول از طریق مطالعه روش‌های متداول خوراک‌دهی برای توسعه یک راهبرد متانول محدود و در مرحله بعد از طریق به‌کارگیری یک کنترل کننده pH برای توسعه یک راهبرد نیتروژن محدود بود.

فصل دوم

مروری بر

مطالعات انجام شده