

Optimization of Recombinant β -NGF Production in Bioreactor

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hajihassan Z.*¹ PhD, Sadat S.M.¹ MSc, Gholami Tilko P.¹ Msc

How to cite this article

Hajihassan Z, Sadat S M, Gholami Tilko P. Optimization of Recombinant β -NGF Production in Bioreactor. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):9-13.

ABSTRACT

Aims Nerve growth factor (β -NGF) is an important therapeutic agent for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease; so, recombinant production of it in industrial scale is of high importance. The aim of this study is to optimize the effective factors in achieving the highest rate of β -NGF protein production in the bioreactor.

Materials & Methods As *E. coli* is a suitable host for industrial production of recombinant proteins, *E. coli* DE₃ strain was used for production of recombinant β -NGF. Also, fermentation was performed in a 5-L bioreactor and % dissolved oxygen (%DO) and post-induction temperature values were optimized by response surface methodology (RSM). At first, the effects of these two variables on the level of total protein were studied. So, in every experiment, bacterial proteins were isolated and total protein concentration was determined by Bradford assay.

Findings The results indicated that %DO and post-induction temperature of 30% and 28.5°C were the best values for increased production of total protein; in these circumstances, total protein concentration was 9.6±0.61 mg/ml. Finally, the effects of these variables on recombinant β -NGF production were surveyed by dot blot analysis, indicating the maximum β -NGF expression level on the optimized condition.

Conclusion In conclusion, %DO and post-induction temperature not only affect cell growth of recombinant *E. coli*, but also have a direct impact on recombinant protein expression and production, such as β -NGF.

Keywords Bioreactor; *E. coli*; RSM; Recombinant β -NGF

CITATION LINKS

- [1] Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA ...
- [2] Nerve growth factor: Structure and ... [3] Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are ... [4] Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's ...
- [5] Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth ... [6] Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and ... [7] Production of recombinant proteins in ... [8] High-throughput expression screening and purification of recombinant proteins in ... [9] Glutathione production by recombinant Escherichia coli expressing bifunctional glutathione ...
- [10] Enhanced production of carboxymethylcellulase of a marine microorganism, Bacillus subtilis subsp. subtilis A-53 in a pilot-scaled bioreactor by a recombinant Escherichia coli JM109/A-53 from rice ... [11] Optimization and kinetic characterization of recombinant 1, 3- β -glucanase production in Escherichia coli K-12 strain BL21/pETSD10-a bioreactor ... [12] Improved Candida methylica formate dehydrogenase fermentation through statistical optimization of low-cost ... [13] Response surface methodology: Process and product optimization using designed ... [14] Molecular cloning: A laboratory ... [15] Enantioselective nitrilase from Pseudomonas putida: Cloning, heterologous expression, and bioreactor ... [16] Expression of human nerve growth factor beta and bacterial protein disulfide isomerase (DsbA) as a fusion protein (DsbA:: hNGF) significantly enhances periplasmic production of hNGF beta in Escherichia ... [17] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye ... [18] NIH image to image: 25 years of image ... [19] Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology ... [20] Optimizing conditions for production of high levels of soluble recombinant human growth hormone using Taguchi ... [21] Optimization of an induction strategy for improving interferon- α 2b production in the periplasm of Escherichia coli using response surface ... [22] Optimization of recombinant β -NGF expression in Escherichia coli using response surface ... [23] Optimization of the effective factors in E.coli growth producing recombinant β -NGF using response ... [24] Optimization of TNF- α overexpression in Escherichia coli using response surface ... [25] Characterization and optimization of ArtinM ...

¹Life Science Engineering Department, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, North Kargar Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1439957131
Phone: +98 (21) 86093294
Fax: +98 (21) 88497324
hajihasan@ut.ac.ir

Article History

Received: June 18, 2017

Accepted: February 18, 2018

ePublished: March 16, 2019

بهینه سازی تولید پروتئین نوترکیب β -NGF در بیوراکتور

زهرا حاجی حسن * PhD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

سیده مهديه سادات MSc

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

پوريا غلامی تیلکو MSc

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: فاکتور رشد عصبی β -NGF یک عامل درمانی مهم در درمان بسیاری از بیماری‌های تحلیل عصبی مثل آلزایمر است، لذا تولید نوترکیب آن در مقیاس انبوه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از بررسی حاضر بهینه‌سازی فاکتورهای موثر در دستیابی به بیشترین میزان تولید پروتئین β -NGF در فرماتور است.

مواد و روش‌ها: از آنجا که باکتری *E. coli* سویه بیانی مناسبی برای تولید در مقیاس صنعتی است، در مطالعه حاضر از سویه DE_3 باکتری *E. coli* به منظور تولید پروتئین نوترکیب β -NGF استفاده شد. همچنین از بیوراکتور ۵ لیتری به منظور تولید پروتئین استفاده شد و میزان اکسیژن محلول ($DO\%$) و دمای پس از القا با استفاده از روش نرم‌افزار آماری سطح پاسخ (RSM) بهینه‌سازی شد. ابتدا تأثیر این دو متغیر بر میزان تولید پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در هر آزمایش کل محتوای پروتئینی استخراج و با روش برادفورد تعیین غلظت شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بهینه شرایط برای دستیابی به بیشترین میزان تولید پروتئین دمای پس از القا $28/5^\circ C$ و $DO\%$ ۳۰ است و در این شرایط غلظت پروتئین تولیدی $9/6 \pm 0/61$ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. نهایتاً تأثیر این فاکتورها بر تولید پروتئین β -NGF با استفاده از روش دات‌بلات مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان‌دهنده بیشترین میزان تولید در شرایط بهینه‌سازی شده است.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که میزان $DO\%$ و دمای پس از القا علاوه بر تأثیر بر رشد باکتری نوترکیب *E. coli* در بیوراکتور، بر میزان تولید و بیان پروتئین‌های نوترکیب (مثل β -NGF) نیز تأثیر مستقیمی دارد.

کلیدواژه‌ها: بیوراکتور، *E. coli*، RSM، β -NGF نوترکیب

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

* نویسنده مسئول: hajihasan@ut.ac.ir

مقدمه

فاکتور رشد عصبی (NGF) پروتئینی با وزن مولکولی بالا و شامل سه زیر واحد α ، β و γ است که در این بین زیر واحد β مسئول کلیه فعالیت‌های زیستی NGF است [1, 2]. پروتئین β -NGF نقش اساسی و کلیدی در تمایز، حفظ و حیات سیستم عصبی مرکزی و محیطی بازی می‌کند، لذا این پروتئین می‌تواند در درمان بیماری‌های تحلیل عصبی مثل آلزایمر به کار گرفته شود [3, 4]. از آنجا که NGF استخراج شده از منابع طبیعی مثل غدد بزاقی موش برای اهداف درمانی مناسب نیست، تولید نوترکیب این پروتئین می‌تواند حایز اهمیت باشد [5]. از میان سیستم‌های بیانی متنوع، باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*) به دلیل کشت آسان و سریع، نرخ رشد بالا و ژنتیک شناخته شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [6]. حتی در این باکتری نیز به منظور افزایش میزان بیان و تولید پروتئین نوترکیب مورد نظر بهینه‌سازی محیط کشت، شرایط کشت

و پارامترهای القا می‌بایست انجام پذیرد [7, 8]، که البته تولید در مقیاس صنعتی ملاحظات ویژه و خاصی را می‌طلبد. به‌طور مثال ترکیب محیط کشت، دور همزن، میزان هوادهی و دمای کشت از عوامل بسیار مهم و تأثیرگذار بر میزان رشد باکتری و تولید پروتئین در فرماتور هستند [9-11].

همچنین در مطالعه‌ای که روی بهینه‌سازی تولید آنزیم فورماتور دهیدروژناز در باکتری *E. coli* در مقیاس نیمه‌صنعتی و در فرماتور انجام شد از ملاس چغندر به عنوان منبع ارزان قیمت کربن استفاده شد [12]. از آنجا که تا کنون مطالعات کمی در مورد بهینه‌سازی بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس صنعتی و نیمه‌صنعتی و در بیوراکتور صورت گرفته است، در این مطالعه به منظور دستیابی به بیشترین میزان تولید پروتئین β -NGF نوترکیب از بیوراکتور ۵ لیتری به منظور کشت باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE_3) استفاده شد و دو پارامتر بسیار مهم، یکی میزان اکسیژن محلول ($DO\%$) و دیگری دمای پس از القا با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) که یک روش آماری دقیق است [13] بهینه‌سازی شدند.

مواد و روش‌ها

کلیه مواد و بافرهای استفاده شده در این تحقیق به غیر از موارد خاصی که به آنها در متن اشاره شده است از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

سویه باکتری و وکتور: در این تحقیق از سویه باکتریایی *E. coli* BL21 (DE_3) به عنوان میزبان بیانی استفاده شد. از وکتور بیانی pET39b(+) (نواژن؛ ایالات متحده) استفاده شد. وکتور مذکور به روش شوک حرارتی به باکتری مربوطه ترانسفورم شد [14].

شرایط کشت: محیط کشت استفاده شده محیط سوپر اپتیمال براث (SOB) با ترکیب ۲۰ گرم بر لیتر تریپتون، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۵/۵ گرم بر لیتر سدیم کلرید، ۱۸۶/۰ گرم بر لیتر پتاسیم کلرید، ۱۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم و ۱۰ میلی‌مولار منیزیم سولفات بود.

به منظور تهیه کشت ثانویه از کشت شبانه ۱۲ ساعته، به میزان ۱٪ حجمی/حجمی به محیط کشت تازه حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۱۲ ساعت در دمای $37^\circ C$ با دور ۲۰۰ rpm انجام شد [15].

فرمانتاسیون در یک بیوراکتور ۵ لیتری (زیست‌فرآیند صنعت؛ ایران) حاوی ۲ لیتر محیط کشت با تلقیح ۱۰۰ میلی‌لیتر از کشت ثانویه انجام گرفت. در آزمایش pH به صورت اتوماتیک و با افزودن سدیم هیدروکسید و هیدروژن کلرید دو نرمال در ۷ ثابت نگه داشته شد. میزان اکسیژن محلول با تغییر سرعت همزن در مقادیر مختلف تنظیم شد. سرعت هوادهی در ۱۷ vvm در آزمایش ثابت نگه داشته شد.

تولید پروتئین β -NGF نوترکیب: تولید در بیوراکتور ۵ لیتری و در شرایط ذکر شده در مرحله قبل صورت پذیرفت. رشد باکتری‌های ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب β -NGF::pET39b(+) تا رسیدن به $OD_{600\text{ nm}} = 0/6$ در $37^\circ C$ ادامه یافت. سپس القای پروموتور با افزودن IPTG در غلظت ۰/۳ میلی‌مولار انجام شد و رشد در حرارت‌های مختلف به مدت ۲ ساعت دیگر ادامه یافت. سپس سلول‌ها با سانتریفیوژ در $5000g$ به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند و رسوب سلولی تحت تیمار با اوره ۸ مولار و سونیکاسیون قرار گرفت [16]. سوپ رویی حاوی کل محتوای پروتئینی، برای آزمایشات بعدی نگهداری شد.

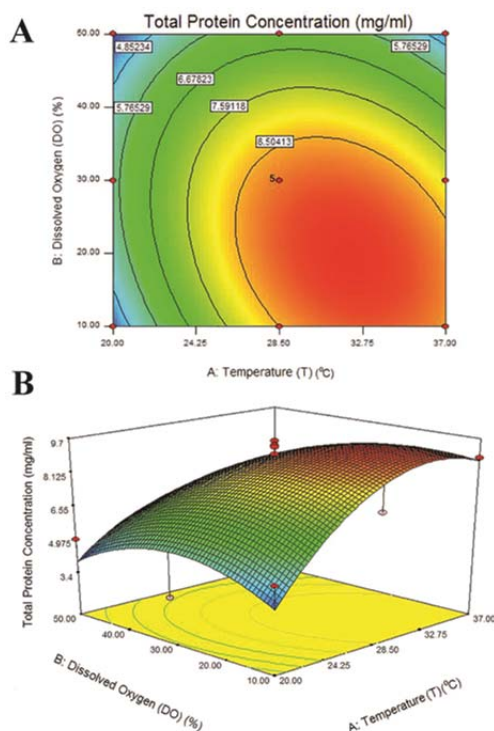
پلی هیستیدینی گذاشته شد تا میزان تولید پروتئین مذکور مورد ارزیابی قرار گیرد. همان طور که نتایج دات بلات و تحلیل با نرم افزار Image J نشان می دهد بیشترین میزان بیان و تولید پروتئین نوترکیب β -NGF نیز در آزمایش شماره ۹ است (نمودار ۱ و شکل ۲)؛ ظهور لکه نشان دهنده واکنش آنتی بادی ضد دنباله پلی هیستیدینی و پروتئین β -NGF نوترکیب حاوی این دنباله است.

جدول ۱) طراحی آزمایش برای دو متغیر (دمای پس از القا و میزان اکسیژن محلول) و یک پاسخ (غلظت پروتئین)

آزمایش	دمای پس از القا (°C)	درصد اکسیژن محلول (%DO)	پاسخ (غلظت کل محتوای پروتئینی (mg/ml))
۱	-۱	-۱	۵/۲۷±۰/۶۸
۲	+۱	-۱	۸/۸۳±۰/۲۰
۳	-۱	+۱	۵/۰۰±۰/۷۲
۴	+۱	+۱	۴/۶۳±۰/۷۸
۵	-۱	۰	۳/۴۵±۰/۱۳
۶	+۱	۰	۷/۷۳±۰/۶۴
۷	۰	-۱	۷/۳۱±۰/۶۰
۸	۰	+۱	۵/۰۳±۰/۸۸
۹	۰	۰	۹/۶۰±۰/۶۱
۱۰	۰	۰	۹/۰۰±۰/۷۵
۱۱	۰	۰	۹/۴۵±۰/۶۵
۱۲	۰	۰	۹/۴۰±۰/۷۱
۱۳	۰	۰	۹/۳۰±۰/۷۵

جدول ۲) تحلیل انحراف معیار برای میزان پروتئین تولید شده در *E. coli*

عبارت	مجموع مربعات	مربع میانگین	F	p-value
مدل	۴۸/۸۷	۹/۷۷	۶/۱۶	۰/۰۱۶۸
دمای پس از القا (A)	۹/۳۰	۹/۳۰	۹/۳۰	۰/۰۴۶۰
درصد اکسیژن محلول (B)	۷/۵۹	۷/۵۹	۷/۵۹	۰/۰۶۴۹
AB	۳/۸۶	۳/۸۶	۲/۴۳	۰/۱۶۲۷
A ²	۱۱/۶۶	۱۱/۶۶	۷/۳۵	۰/۰۳۰۲
B ²	۶/۰۰	۶/۰۰	۳/۷۸	۰/۰۹۲۸



شکل ۱) نمایش دوبعدی (A) و سه بعدی (B) تاثیر %DO و دمای پس از القا بر میزان تولید پروتئین کل سلولی (غلظت پروتئین)

بهینه سازی درصد DO و دمای پس از القا: درصد اکسیژن محلول و دمای پس از القا به عنوان دو متغیر مستقل در نظر گرفته شدند. بهینه سازی این دو متغیر با استفاده از روش RSM و توسط نرم افزار Design expert 7.0 (استاتیس؛ ایالات متحده) انجام شد. ۱۳ آزمایش در ۳ سطح مختلف و ۵ بار تکرار طراحی شد. پاسخ در اینجا میزان تولید پروتئین در نظر گرفته شد. معنی دار بودن مدل از طریق F -test ارزیابی شد. همچنین با استفاده از منحنی برجسته برهم کنش دو متغیر بر پاسخ مشخص شد. تمام منحنی های مربوطه در این قسمت با نرم افزار Design expert 7.0 ترسیم شدند.

تعیین غلظت پروتئین: غلظت پروتئین توسط روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه گیری شد [17].

تشخیص پروتئین با روش دات بلات: پس از لکه گذاری نمونه ها روی کاغذ نیترو سلولز (مبلی پور؛ ایالات متحده)، کاغذ توسط بافر بلاک کننده TBS-T (Tris-HCl, NaCl, Tween 20) حاوی ۵% شیر خشک بدون چربی بلاک شد. پس از انجام ۳ مرحله شست و شو با بافر TBS-T، آنتی بادی مونوکلونال ضد دنباله پلی هیستیدینی متصل به آنزیم هورس رادیش پراکسیداز (HRP) (سیگما؛ ایالات متحده) با رقت ۱:۱۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفت. در پایان کاغذ با سوبسترای رنگی DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (بیوبیسیک؛ کانادا) در حضور پراکسید هیدروژن در محیط تاریک انکوبه شد.

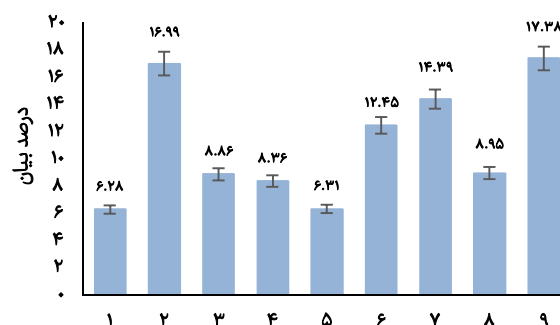
مساحت هر لکه که نشان دهنده میزان بیان پروتئین β -NGF حاوی دنباله پلی هیستیدینی است از طریق نرم افزار Image J مورد ارزیابی قرار گرفت [18].

یافته ها

تحلیل داده های حاصل از بهینه سازی دمای پس از القا و میزان %DO به روش RSM: دو فاکتور %DO و دما فاکتورهای هستند که به طور مستقیم بر رشد باکتری ها و متعاقباً میزان تولید پروتئین ها در آنها تاثیر می گذارند؛ لذا در این بررسی تاثیر این دو متغیر بر میزان تولید پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان پروتئین سلولی که به کمک روش برادفورد اندازه گیری شد به عنوان پاسخ به کمک نرم افزار Design expert 7.0 تحلیل شد (جدول ۱). همان طور که نتایج نشان می دهند بیشترین میزان تولید پروتئین، $9/6 \pm 0/61$ میلی گرم بر میلی لیتر است که مربوط به آزمایش شماره ۹ یعنی دمای پس از القا $28/5^{\circ}\text{C}$ و میزان DO ۳۰% است. مقدار معنی داری محاسبه شده برای مدل و دمای پس از القا (A) که مقادیری کمتر از ۰/۰۵ است نشان دهنده دارای اعتبار بودن مدل مورد بررسی و اهمیت این ترم در تولید بیشینه پروتئین سلولی است (جدول ۲).

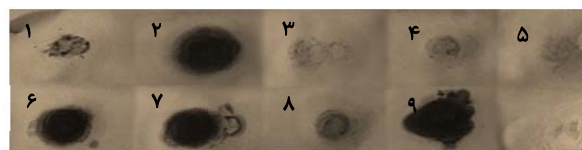
همچنین منحنی های دوبعدی و سه بعدی ترسیم شده در شکل ۱ نشان می دهند که بیشترین میزان تولید پروتئین در دمای $28/5^{\circ}\text{C}$ و DO ۳۰% است. کاهش دما و افزایش درصد DO باعث کاهش شدید تولید پروتئین با شیب بسیار تند می شود. در مقابل با کاهش درصد DO و افزایش دما تا 37°C کاهش چشمگیری در تولید پروتئین مشاهده نمی شود.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب β -NGF: از آنجا که هدف از این مطالعه بررسی میزان تولید پروتئین نوترکیب β -NGF است، در هر مورد دات بلات با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد دنباله



آزمایش

نمودار ۱) درصد بیان پروتئین نوترکیب β FGN اندازه‌گیری شده با نرم افزار ImageJ



شکل ۲) بررسی دات‌بلات از پروتئین‌های استخراج شده از باکتری‌های نوترکیب حاوی پلاسمید pET39:: β -NGF با استفاده از آنتی‌بادی ضد دنباله پلی‌هیستیدین متصل به HRP

بحث

امروزه یکی از راه‌های متداول تولید پروتئین‌های دارویی، تولید به‌صورت نوترکیب است. در این روش می‌توان از میزبان‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی متعددی بهره جست، اما استفاده از باکتری *E. coli* به‌دلیل سهولت کشت و دست‌کاری آسان در مقام نخست قرار دارد [19].

در مطالعاتی که توسط افراد مختلف انجام شده تولید پروتئین‌های نوترکیب متفاوتی در این باکتری بهینه‌سازی شده است و در هر مورد شرایط کشت، دمای پس از القا، زمان پس از القا یا غلظت القاگر مورد بررسی قرار گرفته است [20-22]. به‌طور مثال سواری و همکاران نشان دادند که به‌منظور دست‌یابی به بیشترین میزان تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در باکتری *E. coli* بهترین محیط کشت TB، بهترین دمای کشت 25°C و بهترین زمان پس از القا ۱۰ ساعت است [20]. آزمون و همکاران تولید اینترفرون آلفا را در پری پلاسم باکتری *E. coli* بهینه‌سازی کردند و غلظت IPTG 0.5 میلی مولار و دمای 25°C را به‌عنوان شرایط بهینه معرفی کردند [21]. همچنین غلامی و همکاران بهینه‌سازی تولید β -NGF نوترکیب را در باکتری *E. coli* در مقیاس آزمایشگاهی انجام دادند و بهترین غلظت القاگر IPTG، دمای پس از القا و زمان پس از القا را به‌ترتیب ۱ میلی مولار، 25°C و ۲ ساعت به دست آوردند [22]. همین گروه تحقیقاتی از گلیسرول و عصاره مخمر به‌عنوان منابع کربن و نیتروژن استفاده کردند و بهترین غلظت گلیسرول و عصاره مخمر را به‌منظور دست‌یابی به بیشترین میزان تولید پروتئین نوترکیب β -NGF به دست آوردند [23]. شایان ذکر است که اغلب این بررسی‌ها در مقیاس آزمایشگاهی و در فلاسک کشت انجام شده است. بررسی‌های انجام‌شده در فلاسک کشت حاکی از این مطلب است که در مورد هر پروتئین نوترکیب شرایط کشت و القا مثل غلظت القاگر، دمای پس از القا و زمان پس از القا متفاوت است و در هر مورد باید به‌منظور دست‌یابی به بیشترین بازده تولید، بهینه‌سازی این عوامل صورت پذیرد.

از آنجا که تولید در مقیاس وسیع‌تر و در فرمانتورهای بزرگ پیچیده‌تر است، عوامل و فاکتورهای متعددی باید در نظر گرفته شوند و بهینه‌سازی باید با دقت بیشتری انجام پذیرد. اما به‌دلیل پیچیدگی و هزینه‌بر بودن تولید در مقیاس صنعتی گزارشات اندکی در زمینه بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های نوترکیب در بیوراکتور در دست است [9-11]. شایان ذکر است که تا کنون هیچ مطالعه‌ای در مورد تولید یا بهینه‌سازی بیان و تولید پروتئین β -NGF نوترکیب در بیوراکتور صورت نگرفته است، لذا در مطالعه حاضر ابتدا فاکتورهای $\text{DO}\%$ و دمای پس از القا به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند و با استفاده از روش آماری RSM تولید پروتئین در باکتری *E. coli* در بیوراکتور ۵ لیتری بهینه‌سازی شد. نتایج بررسی حاضر نشان داد که با افزایش دمای پس از القا تا $28/5^{\circ}\text{C}$ و میزان $\text{DO}\%$ ۳۰٪ تولید پروتئین کل سلولی افزایش یافته و پس از آن تولید اندکی کاهش می‌یابد. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده توسط ونگ و همکاران کاملاً مطابقت دارد. ونگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که DO یک فاکتور ضروری برای رشد سلول و تولید پروتئین در بیوراکتور است. در بررسی انجام‌شده توسط این دانشمندان $\text{DO}\%$ ۲۰٪ یا ۳۰٪ برای تولید افزایش‌یافته گلوکاتایون سنتتاز نوترکیب گزارش شد [9]. همچنین لی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که دمای محیط کشت، فاکتور بسیار مهمی در تولید پروتئین در بیوراکتور است. این افراد دمای محیط کشت 35°C را برای تولید افزایش یافته کربوکسی‌متیل‌سلولاز نوترکیب در باکتری *E. coli* گزارش کردند [10].

از آنجا که هدف اصلی کشت و تولید در بیوراکتور دست‌یابی به پروتئین نوترکیب هدف است، لذا در بررسی حاضر میزان تولید پروتئین نوترکیب β -NGF نیز در همین شرایط مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از روش دات‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد دنباله پلی‌هیستیدینی استفاده شد و شدت رنگ هر لکه که متناسب با میزان پروتئین β -NGF است با نرم‌افزار Image J مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده بیشترین میزان تولید پروتئین نوترکیب β -NGF در دمای پس از القای $28/5^{\circ}\text{C}$ و $\text{DO}\%$ ۳۰٪ است. به عبارت دیگر شرایطی که سبب افزایش تولید پروتئین کل در باکتری *E. coli* در بیوراکتور استفاده‌شده در این مطالعه شده است تولید افزایش‌یافته β -NGF نوترکیب را نیز به همراه داشته است. این نتایج تا حدودی با نتایج به‌دست‌آمده در فلاسک کشت مطابقت دارد زیرا در فلاسک کشت نیز بهینه تولید β -NGF نوترکیب در دماهای نسبتاً پایین حاصل می‌شد [22]. همچنین گزارشات متعددی نشان می‌دهد که بیان و تولید پروتئین‌های پیچیده دیگری علاوه بر پروتئین β -NGF، با کاهش دمای پس از القا افزایش می‌یابد زیرا با کاهش دما علاوه بر کاهش عملکرد پروتئین‌های سلولی، پیچش صحیح پروتئین‌ها بهتر صورت خواهد گرفت [20, 24, 25].

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که میزان $\text{DO}\%$ و دمای پس از القا که دو فاکتور مهم و تاثیرگذار بر رشد باکتری‌های نوترکیب مثل *E. coli* در بیوراکتور هستند، بر میزان تولید و بیان پروتئین‌های نوترکیب (مثل β -NGF) نیز تاثیر مستقیمی دارند. شایان ذکر است که بیشترین میزان تولید پروتئین β -NGF در دمای $28/5^{\circ}\text{C}$ و $\text{DO}\%$ ۳۰٪ اتفاق افتاده است و در مورد پروتئین‌های دیگر بهینه‌سازی به‌صورت مجزا باید انجام شود.

Tamerler C. Improved *Candida methylica* formate dehydrogenase fermentation through statistical optimization of low-cost culture media. *Prep Biochem Biotechnol*. 2012;42(6):507-19.

13- Myers RH, Montgomery DC, Anderson-cook CM. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. 4th Edition. New York: Wiley; 2016.

14- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd Edition. 1st Volume. New York: Cold Spring-Harbour Laboratory Press; 2001.

15- Banerjee A, Dubey S, Kaul P, Barse B, Piotrowski M, Banerjee UC. Enantioselective nitrilase from *Pseudomonas putida*: Cloning, heterologous expression, and bioreactor studies. *Mol Biotechnol*. 2009;41(1):35-41.

16- Hajihassan Z, Sohrabi M, Rajabi Bazl M, Eftekhary H. Expression of human nerve growth factor beta and bacterial protein disulfide isomerase (DsbA) as a fusion protein (DsbA:: hNGF) significantly enhances periplasmic production of hNGF beta in *Escherichia coli*. *Rom Biotechnol Lett*. 2016;21(5):11850-6.

17- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.

18- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to imagej: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-75.

19- Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem*. 2008;307(1-2):249-64.

20- Savari M, Zarkesh Esfahani SH, Edalati M, Biria D. Optimizing conditions for production of high levels of soluble recombinant human growth hormone using Taguchi method. *Protein Expr Purif*. 2015;114:128-35.

21- Azaman SNA, Ramakrishnan NR, Tan JS, Rahim RA, Abdullah MP, Ariff AB. Optimization of an induction strategy for improving interferon- α 2b production in the periplasm of *Escherichia coli* using response surface methodology. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010;56(4):141-50.

22- Gholami Tilko P, Hajihassan Z, Moghimi H. Optimization of recombinant β -NGF expression in *Escherichia coli* using response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*. 2017;47(4):406-13.

23- Gholami tilko P, Hajihassan Z, Nazari N, Moghimi H. Optimization of the effective factors in *E.coli* growth producing recombinant β -NGF using response surface methodology. *Modares J Biotechnol*. 2017;8(3):53-63. [Persian]

24- Papanephytous CP, Kontopidis GA. Optimization of TNF- α overexpression in *Escherichia coli* using response surface methodology: Purification of the protein and oligomerization studies. *Protein Expr Purif*. 2012;86(1):35-44.

25- Pranchevicius MCS, Oliveira LL, Rosa JC, Avanci NC, Quiapim AC, Roque-Barreira MC, et al. Characterization and optimization of ArtinM lectin expression in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*. 2012;12:44.

تشکر و قدردانی: تحقیق حاضر با حمایت مالی ستاد توسعه و علوم سلول‌های بنیادی تحت شماره طرح ۱۱/۲۵۸۰۲ به دکتر زهرا حاجی حسن انجام شده است. همچنین نویسندگان از دانشگاه تهران به دلیل حمایت مالی به‌منظور انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: زهرا حاجی حسن (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۰٪)؛ سیده مهدیه سادات (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ پوریا غلامی تیلکو (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪).

منابع مالی: دانشگاه تهران و ستاد توسعه و علوم سلول‌های بنیادی از این پروژه حمایت مالی کرده‌اند.

منابع

- 1- Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, De Vos AM. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature*. 1999;401(6749):184-8.
- 2- Wiesmann C, De Vos AM. Nerve growth factor: Structure and function. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2001;58(5-6):748-59.
- 3- Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell*. 1994;77(5):627-38.
- 4- Heese K, Low JW, Inoue N. Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's disease. *Neurosignals*. 2006;15(1):1-2.
- 5- Mobley WC, Schenker A, Shooter EM. Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor. *Biochemistry*. 1976;15(25):5543-52.
- 6- Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5:172.
- 7- Schumann W, Ferreira LC. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet Mol Biol*. 2004;27(3):442-53.
- 8- Saez NJ, Vincentelli R. High-throughput expression screening and purification of recombinant proteins in *E. coli*. *Methods Mol Biol*. 2014;1091:33-53.
- 9- Wang D, Wang Ch, Wu H, Li Z, Ye Q. Glutathione production by recombinant *Escherichia coli* expressing bifunctional glutathione synthetase. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2016;43(1):45-53.
- 10- Lee EJ, Lee BH, Kim BK, Lee JW. Enhanced production of carboxymethylcellulase of a marine microorganism, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53 in a pilot-scaled bioreactor by a recombinant *Escherichia coli* JM109/A-53 from rice bran. *Mol Biol Rep*. 2013;40(5):3609-21.
- 11- Zaslona H, Trusek-Holownia A, Radosinski L, Hennig J. Optimization and kinetic characterization of recombinant 1, 3- β -glucanase production in *Escherichia coli* K-12 strain BL21/pETSD10-a bioreactor scale study. *Lett Appl Microbiol*. 2015;61(1):36-43.
- 12- Kahraman M, Ordu EB, Yeşiladalı K, Karagüler NG,