



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

تولید پروتئین دگرسان در زیست لایه های اشرشیا کولی: یک فرم متداول کشت

چگالی سلول بالا

چکیده

اشرشیا کولی، یکی از میزبانان مساعد برای تولید پروتئین دارای صفات ارثی جدید است و به صورت یک مدل عالی برای مطالعات زیست لایه شناخته میشود. کشتهای چگالی سلول بالای (HCDC) این باکتری، بازده های تولید حجمی جذابی را میسر میسازند و سلولهایی که در زیست لایه رشد می یابند در برخی چالشهای کشتهای پلانکتونی چگالی بالای سلول دخیل هستند.

این اثر، پتانسیل تولید سلولهای زیست لایه E.coli JM109 (DE3) را ارزیابی میکنند که یک پروتئین الگو را بیان میکنند، پروتئین فلئورسان سبز ارتقا یافته (eGFP)، از یک پلاسمید دارای صفات ارثی متشکل جدید. یک صفت موروثی پرورش دهنده ی تیره ی پلاسمیدی یکسان اما دچار کمبود ژن eGFP برای ارزیابی اثر تولید پروتئین دگرسان بر تشکیل زیست لایه بکار رفت. نتایج نشان میدهد تولید eGFP از سلولهای زیست لایه در حدود ۳۰ برابر بالاتر از حالت پلانکتونی بود. به علاوه، سلولهای بیان کننده ی eGFP، تشکیل زیست لایه را در مقایسه با سلولهای کنترل ارتقا داده بودند. مقادیر تولید حجمی، دو برابر مقادیر قبلا گزارش شده با همان پروتئین بود و در طیف چیزی هستند که میتواند با HCDC در تولید پروتئینهای حلال بدست آید. گرچه چگالی بالای سلولی که بدست آمد از HCDC متداول پایین تر بود (۵،۰ برابر)، این سیستم نوین به مقادیر تولید خوبی دست یافت که احتمالا پس از بهینه سازی شرایط کشت، بهبود می یابند.

واژه های کلیدی: اشرشیا کولی، بیان پروتئین دگرسان، کشت چگالی سلول بالا، راکتور زیست لایه

۱. مقدمه

باکتری گیاهی گرم-منفی اشرشیا کولی، یک میزبان ارجح برای تولید پروتئینهای دارای صفات ارثی متشکل جدید محسوب میگردد که به خاطر رشد سریع آن در چگالی های بالای سلولی، شرایط مورد نیاز غذایی ساده، ژنتیک کاملا شناخته شده و دسترسی به شمار زیادی از حاملهای تولید مثل غیر جنسی و صفات موروثی میزبان

جهش یافته است. این باکتری گیاهی دارای توانایی انباشته کردن بسیاری از پروتئینهای دارای صفات ارثی متشکل به حداقل ۲۰٪ از پروتئین سلولی کل میباشد و در پاره ای از موارد، آنها را از سیتوپلاسم به پریپلاسم منتقل میکند. کشت ای.کولی در پرورشهای چگالی بالای سلول (HCDC)، مزایای زیادی را ارائه میدهد همانند حجم کشت کاهش یافته، فراوری پایین دست ارتقا یافته و هزینه های تولید پایین تر. با وجود این مزایا، هنوز هم چالشهای زیادی وجود دارد که باید در HCDC مورد بررسی قرار گیرند و آنها عبارتند از انتقال اکسیژن ناکافی، شرایط لازم محیط کشت ویژه، بازده ترکیب کاهش یافته در راکتور، تجمع کربن دی اکسید که مقادیر رشد تولید استات بیشتر را کاهش میدهند. تولید پروتئین دارای صفات ارثی متشکل جدید توسط سلولهای زیست لایه در برخی از چالشهای HCDC متداول بویژه پخش مواد مغذی و اکسیژن از طریق زیست لایه و هم چنین در انباشتن تولیدات ضایعات سمی دخیل است.

بیان پروتئین دارای صفات ارثی متشکل جدید در زیست لایه های ای.کولی توسط هوانگ و همکارانش پیشتاز شد که تولید بتا-گالاکتوسیداز را در E.coli DH5a حامل یک پلاسمید حاوی ترویج دهنده ی tac بررسی کرده اند. بعدها، اکونل و همکارانش، نخستین سیستم برای تولید پروتئین دگرسان سطح بالا را در سلولهای زیست لایه ای.کولی با استفاده از یک حامل مبتنی بر pUC برای بیان پروتئین فلئورسان سبز ارتقا یافته (e.GFP) توصیف نموده اند. با وجود پتانسیل عظیم این سیستم بیان کننده، تولید پروتئین دگرسان از سلولهای زیست لایه ای.کولی به طور وسیعی بررسی نشده باقی می ماند.

بیان پروتئینهای دگرسان در ای.کولی معمولاً از طریق درج ژن مورد نظر در یک پلاسمید چند نسخه ای تحت کنترل رونویسی یک ترویج دهنده ی تشکیل دهنده یا قابل کنترل انجام میگردد. کاملاً اثبات شده است پلاسمیدها، یک بار متابولیک را بر سلول میزبان تحمیل میکنند، همانطور که منابع سلولی باید برای رونوشت خود هم چنین بیان ژنهای رمزگذاری شده ی- پلاسمیدی بکار روند. در سلولهای پلانکتونی، این بار متابولیک مضاعف، مقادیر رشد سلولی و بازده های زیست توده ای را کاهش میدهد، به طور خاص زمانی که حامل پلاسمید برای تولید مستقیم یک پروتئین دارای صفات ارثی متشکل جدید بکار میرود. این بار متابولیک هم چنین ناپایداری پلاسمید تفکیک پذیر و ساختاری و چندین تغییر متابولیک را در سلول میزبان بالا برده که ممکن است به نوبه ی خود بر محصول و فعالیت پروتئین تولید شده اثر بگذارد. در مقایسه با سلولهای پلانکتونی، نشان

داده شده است وجود پلاسمیدها، تشکیل زیست لایه و پایداری پلاسمید را در مطالعات زیادی افزایش داده است. علی رغم این مساله، بسیاری از این مطالعات، با پلاسمیدهای مزدوج انجام شد. گرچه پلاسمیدهای غیر مزدوج معمولاً برای تولید پروتئین دگرسان در ای.کولی بکار میروند، اما اطلاعات پیرامون اثرشان بر تشکیل قشر زیستی، اندک است. نشان داده شده است در شرایط جاری، هنگامیکه یک پلاسمید (Ptkw106 یا pMJR1750) حاوی یک منشاء pMB1 جهش یافته به E.coli DH5a تبدیل شد، سلولهای حامل پلاسمید، زیست لایه ها را با چگالی سلول بالاتر از سلولهای غیر تبدیل شده تشکیل دادند. لیم و همکارانش هم چنین آشکار ساختند در هنگام تبدیل E.coli O157:H7 با یک پلاسمید سمی و غیر مزدوج (PO157)، تشکیل زیست لایه و معماری تحت تاثیر قرار گرفت. تحت شرایط جریان یکنواخت، PO157، رشد زیست لایه را از طریق تولید مضاعف مواد پلیمری خارج سلولی (EPS) و تولید گونه های فوق چسبنده میسر ساخت. در یک اثر قبلی، تاثیر تبدیل E.coli JM109(de3) با پلاسمیدهای غیر مزدوج (pet2ba و pucb) بر تشکیل زیست لایه تحت شرایط جریان متلاطم مورد ارزیابی قرار گرفت. سلولهای دارای پلاسمید، زیست لایه های دارای تراکم های سلول بالاتر از سلولهای غیر تبدیل شده را تشکیل دادند که نشان دهنده ی این است که سلولهای زیست لایه ممکن است پایگاه مناسبی برای تولید پروتئین دگرسان باشند، مگر اینکه بیان سطح بالای ژن خارجی برای تشکیل قشر زیستی، زیان بخش باشد.

یکی از دغدغه های اصلی در مورد HCDC این است که بهره وری ویژه ی پروتئین دارای صفات ارثی متشکل جدید اغلب از کشت داخل لوله ی آزمایشگاه، بسیار پایین تر است. هدف این اثر، ارزیابی میزان تولید ویژه ی سلولهای زیست لایه است، زمانیکه با سلولهای پلانکتونی مقایسه میشود و ارزیابی میشود که آیا بیان پروتئین دگرسان برای رشد زیست لایه زیان بخش است یا خیر.

۲. منابع و روشها

۲،۱ صفت موروثی باکتریایی، پلاسمیدها و شرایط کشت

E.coli MJ109(DE3) تولید شده در پرومگا (در ایالات متحده امریکا) بکار رفت زیرا یک میکروارگانسیم کاملاً توصیف شده و توصیه شده برای بیان پروتئین دارای سیستم PET است. به علاوه، این صفت موروثی، توانایی

تشکیل زیست لایه خوبی را در شرایط جریان متلاطم نشان داده است. ژنوتیپ آن

endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, λ⁻, Δ(lac-proAB), [F⁻, traD36, proAB, lacI^qΔM15], λ(DE3) است.

سلولهای ای.کولی صلاحیت دار از طریق شوک گرما با پلاسمید کنترل PET28A تبدیل شدند یا با پلاسمید PFM23 برای تولید درون سلولی E.GFP که با تولید مثل غیر جنسی ژن E.GFP در حامل PET28A بدست آمد، همانطور که قبلا شرح داده شد. ترانسفورمانها بر روی آگار لیسوزنی پروت تکمیل شده با کانامایسین انتخاب شدند.

بیان پروتئین دگرسان از طریق رونوشت ژن E.GFP بدست می آید که تحت کنترل ترویج دهنده ی T7 میباشد. رونوشت از طریق پلیمراز T7 RNA رمزگذاری شده ی کروموزومی صورت میگیرد که به نوبه ی خود توسط ترویج دهنده ی القا شونده ی lacUV5 کنترل میشود. القا میتواند با افزودن IPTG به محیط کشت کسب شود؛ در عین حال، همانند کاری که توسط آگونل و همکارانش انجام شد، هیچ IPTG برای جلوگیری از کاهش احتمالی در تولید پروتئین مشاهده شده در سلولهای حاوی پلاسمید چند نسخه ای یا کشت شده در واسطه ی کمپلکس افزوده نشد.

رشد باکتریایی و تغذیه راکتور همانطور که توسط تئودوسیو و همکارانش شرح داده شد، انجام گرفت. مخزن گردش مجدد یک لیتری (بدون همزدن مکانیکی) با استفاده از یک پمپ هوا، هوادهی شد (سرعت جریان 108 L h^{-1}) و به طور پیوسته با 0.025 L h^{-1} واسطه ی مغذی حاوی 0.55 g L^{-1} گلوکز، 1.25 g L^{-1} دارای صفات ارثی متشکل جدید تون، 0.125 g L^{-1} عصاره ی مخمر و بافر فسفات ($0.188 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$) و $0.26 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ ، PH7.0 تغذیه شد. برای حفظ فشار گزینشی، کانامایسین آنتی بیوتیک به واسطه ی رشد و تغذیه در یک غلظت نهایی $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ افزوده شد.

۲،۲ سیستم تشکیل زیست لایه و نمونه برداری

برای ارزیابی بیان E.GFP هم در زیست لایه و هم سلولهای پلانکتونی، یک راکتور سلول جریان زیست لایه متصل به یک مخزن گردش مجدد، بکار رفت (منابع مکمل را ملاحظه نمایید). سلول جریان از یک مجرای پرسپکس نیم دایره ای (به قطر ۳،۰ سانتیمتر و طول ۱،۲ متر) با روزنه هایی بر روی دیواره ی تخت آن در اندازه

ی کوبنهای برداشتنی تشکیل میشود. صفحات لغزنده ی پلی وینیل کلراید (PVC) بر روی کوبنها چسبانده شدند و زیست لایه ها بر روی وجه های فوقانی تشکیل شد که در تماس با تعلیق باکتریایی در حال گردش از طریق سیستم قرار داشتند. سلولهای ای.کولی حاوی پلاسمید PET28A یا PFM23 با گردش مجدد تعلیق باکتریایی در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در طول ۱۲ روز تحت جریان متلاطم با یک عدد رینولد (Re) ۴۶۰۰ (میانگین تنش برشی دیوار تقریباً ۰,۳ pa) رشد یافتند. Re در اینجا به صورت ذیل تعریف میشود:

$$Re = \frac{\rho U D_h}{\mu} \quad (1)$$

در اینجا ρ و μ ، به ترتیب چگالی و ویسکوزیته ی دینامیک سیال هستند، U سرعت متوسط در سلول جریان و D_h قطر هیدرولیک سلول جریان نیم دایره ای قطر D است ($D_h = \pi D / (2 + \pi) = 1.8 \text{ cm}$). به منظور نمونه برداری قشر زیستی، این سیستم متوقف شد تا اجازه دهد برداشتن کوپن صورت گیرد و به دقت بار دیگر با حفظ همان شرایط جریان آغاز شود. روز ۱ به شروع کار سیستم راکتور مربوط است و نمونه برداری در روز ۳ آزمایش شروع شد.

۲,۳ روشهای تحلیلی

عکسهای کوپن با زیست لایه های مرطوب تشکیل شده پس از ۳ و ۷ روز رشد، با یک دوربین دیجیتال فاین پیکس اس ۱۵۰۰ (شرکت فوجی فیلم، ژاپن) گرفته شد.

وزن مرطوب زیست لایه با توزین هر کوپن قبل از آزمایش و کم کردن این مقدار از وزن همان کوپن در هر بار نمونه برداری تعیین شد. ضخامت زیست لایه هم با استفاده از یک میکرومتر دیجیتالی مشخص شد و پس از آن، زیست لایه مجدد در ۲۵ میلی لیتر محلول $8.5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ به حالت تعلیق در آمد و هموژنیزه شد تا تعداد کل سلولها و قابلیت کشت ارزیابی گردد. تعداد کل سلولهای زیست لایه با رنگ شدن با **4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)** ارزیابی شد همانطور که گومز و همکارانش شرح داده بودند. به طور مختصر، تعلیق قشر زیستی، از طریق یک غشای پلی کربنات سیاه نوکلئوپور ترک-ات (شرکت واتمن امریکا) (اندازه ی منفذ $0.2 \mu\text{m}$) تصفیه شد و سلولها با ۱ میلی لیتر واکنشگر DAPI (0.5 mg L^{-1}) برای مدت ده دقیقه در تاریکی رنگ شدند. مشاهده و شمارش باکتریایی با استفاده از میکروسکوپ اپی فلوئورسانس لیکا دی ام

ال بی ۲ متصل به یک دوربین لیکا دی اف سی ۳۰۰ اف ایکس (شرکت میکروسیستمز لیکای سوئیس) انجام شد. تعداد سلولهای روی هر غشا، از شمارش حداقل ۲۰ میدان دید تخمین زده شد و مقادیر نهایی به صورت لگاریتم سلول بر سانتی متر مربع ارائه شد.

برای قابلیت کشت زیست لایه ، نمونه ها به یک چگالی سلولی مناسب برای کسب واحدهای تشکیل کلنی (CFU) < 10 و > 300 به ازای هر صفحه ی واسطه ی رشد جامد تکمیل شده با کانامایسین ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) رقیق شدند. شمارش کلنی پس از ۲۴ ساعت خواب در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انجام شد و مقادیر نهایی به صورت $\log \text{CFU mL}^{-1}$ ناحیه کوپن بیان شد.

برای سلولهای پلانکتونی، تعداد کل سلولها و قابلیت کشت با استفاده از همان روشهای بکار رفته برای زیست لایه ها ارزیابی شد. نتایج به صورت $\log \text{CFU mL}^{-1}$ ارائه شدند.

غلظت و مصرف گلوکز در کل سیستم به صورت یک شاخص فعالیت متابولیک مشخص شد. مصرف گلوکز با ضرب اختلاف بین غلظت گلوکز وارد شونده به سیستم و غلظت گلوکز در مخزن توسط سرعت جریان تغذیه (0.025 L h^{-1}) بدست آمد. اکسیژن حل شده و PH کشت مجدد انتشار یافته هم ذکر شد.

۲،۴ بیان پروتئین دگرسان

برای سلولهای ای.کولی دارای حامل بیان E.GFP, PFM23 هم برای سلولهای زیست لایه و هم پلانکتونی تحلیل شد. این پروتئین سیتوپلاسمی حل پذیر به صورت بیان شده در مرگولها و مانتیرو تعیین کمیت شد. یک حجم نمونه ی متناظر با یک معادل $\text{OD}_{610\text{nm}}=1$ برای برداشت سلولها از طریق سانتریفیوژ (3202 گرم برای ۱۰ دقیقه) بکار رفت. این حب در $100 \mu\text{L}$ بافر | ($50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 300 mM NaCl , $\text{pH } 8$) مجدداً به حالت تعلیق در آمد و به صفحه ی میکروتایتر خوب-۹۶ افزوده شد که از قبل حاوی $100 \mu\text{L}$ بافر | بود. فلئورسانس با استفاده از یک خوانشگر صفحه ی میکروتایتر (شرکت اسپکترامکس او تو ای، دستگاه های مولکولی، انگلستان) با فیلتر تحریک 488 nm و فیلتر انتشار 507 nm اندازه گیری شد. به منظور بررسی اینکه آیا اتلاف پروتئین دارای صفات ارثی متشکل جدید از طریق نشت سلولی با فلئورسانس **gfp** تداخل دارد یا خیر مورد اندازه گیری قرار گرفت، یک عیارگری در زمانی صورت گرفت که قرائتها قبل و بعد از شستشو با بافر |

انجام شد. اختلاف بین این مقادیر فقط ۲٪ بود که بیانگر این است E.GFP از دست رفته در واسطه ی برون سلولی در این عیارگری قابل توجه نبوده است.

منحنیهای درجه بندی با استانداردهای E.GFP تصفیه شده ی (0-3.14 μg) در ترکیب با ۱۰۰ μL سلول JM109(DE3) میزبان پلاسمید PET28A ($\text{OD}_{610\text{nm}}=1$) ساخته شد. بافر ۱ به یک حجم نهایی ۲۰۰ μL قبل از اندازه گیری فلئورسان افزوده شد و مقادیر نهایی در تولید E.GFP ویژه (fg cell^{-1}) بیان شد.

محتوای EPS اصلی در زیست لایه ها (پروتئین ها و پلی ساکاریدها) برای هر دو صفت موروثی پس از هفت روز رشد ارزیابی شد. پروتئینهای ماتریسی و پلی ساکاریدهای حاصل از زیست لایه ها از سلولها با استفاده از رزین دوئکس (۸ × ۵۰، به فرم Na^+ ، ۲۰-۵۰ منفذ؛ فلوکا کمیکا، سوئیس) تفکیک شدند همانطور که توسط گومز و همکارانش شرح داده شد. این زیست لایه در ۲۰ میلی لیتر بافر عصاره گیری (2 mM Na_3PO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , 9 mM NaCl and 1 mM KCl, pH 7) مجدداً به تعلیق در آمد و ۲ گرم رزین دوئکس به ازای هر گرم وزن مرطوب به تعلیق زیست لایه افزوده شد. این عصاره گیری در ۴۰۰ rpm برای ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد و در نهایت اجزای برون سلولی (ماتریس) از طریق سانتریفیوژ از سلولها جدا شد.

غلظتهای پروتئین برای هر صفت موروثی با استفاده از کیت عیارگری پروتئین اسید بیسینکونینیک - کیت عیارگری پروتئین BCV^{TM} (ترمو فیشر ساینتیفیک، امریکا) و غلظتهای پلی ساکارید از طریق روش اسید فنول سولفوریک دابیوس و همکارانش مشخص شد. عیارگری های پروتئین و پلی ساکارید با استفاده از تعلیق زیست لایه قبل از عصاره گیری eps (کل مواد تشکیل دهنده) و با سلولها (مواد تشکیل دهنده ی سلولی) و eps (مواد تشکیل دهنده ماتریس) پس از عصاره گیری انجام شد. مقادیر نهایی با مد نظر قرار دادن وزن خشک زیست لایه ارزیابی شده همانطور که توسط سیموئز و همکارانش شرح داده شد محاسبه شدند.

۲,۶ تحلیل آماری

نتایج نشات گرفته از سه مجموعه داده در آزمایشات مستقل برای هر صفت موروثی بدست آمد. انحرافات استاندارد متوسط (SDها) بر روی سه مجموعه برای کل پارامترهای تحلیل شده محاسبه شد. برای تشکیل زیست لایه (شکل ۱)، میانگینهای زیر بدست آمد: $\text{SD}<17\%$ برای مصرف گلوکز، $\text{SD}<29\%$ برای وزن مرطوب

زیست لایه، $SD < 28\%$ برای ضخامت زیست لایه ، $SD < 9\%$ برای قابلیت کشت پلانکتونی و زیست لایه و $SD < 5\%$ برای تعداد کل سلولهای زیست لایه . در زمینه ی قرائتهای فلوروسان برای تعیین کمیت E.GFP (شکل ۳)، $SD < 16\%$ و $SD < 10\%$ به ترتیب برای سلولهای پلانکتونی و زیست لایه بدست آمد.

برای اثبات معناداری آماری، آنالیز آزمون تی جفتی، بر مبنای یک میزان اطمینان ۹۰٪ (تفاوتها برای مقادیر $P > 0.1$ و مشخص شده با * به صورت معنادار گزارش شد) و ۹۵٪ (تفاوتها برای مقادیر $P > 0.05$ و مشخص شده با

*
*
به صورت معنادار گزارش شد) انجام شد.

۳. نتایج

برای ارزیابی اینکه آیا تولید E.GFP بر رشد زیست لایه تاثیر داشت یا خیر، ظرفیت تشکیل زیست لایه در سلولهای E.coli JM109 (DE3) حاوی پلاسمید PFM23 با یک صفت موروثی پرورش دهنده ی همان تیره ی پلاسمیدی (PET28A) اما عاری از ژن E.GFP مقایسه شد (شکلهای ۱-۳).

شکل ۱ الف، خصوصیات مصرف گلوکز را در کل سیستم جریان (سلولهای چسبیده به علاوه ی پلانکتونی) نشان میدهد. مقادیر مصرف گلوکز بالاتر (به طور متوسط ۱۳٪) برای صفت موروثی بیان کننده ی E.GFP بدست آمد، گرچه از نظر آماری تفاوتها معنادار فقط در ۴ نقطه ی آزمایشی بدست آمد ($P < 0.05$ و $P < 0.1$). به علاوه، مصرف گلوکز در طول زمان برای هر دو صفت موروثی تا روز نهم افزایش یافت. از آن به بعد، حالت یکنواخت برای صفت موروثی بیان کننده ی E.GFP بدست آمد و یک کاهش جزئی برای سلولهای ای.کولی دارنده ی پلاسمید PET28A مشاهده شد.

مقادیر وزن مرطوب زیست لایه (شکل ۱ ب) به طور کلی برای صفت موروثی بیان کننده ی E.GFP با تفاوتها معنادار آماری تقریباً یافته شده در حالت یکنواخت، بالاتر بود (در روزهای ۸، ۹ و ۱۱، $P < 0.05$).

قابلیت کشت پلانکتونی (شکل ۱ ث)، اختلاف نسبتاً کمی را بین دو صفت موروثی نشان داد. با این حال، در حالیکه قابلیت کشت سلولهای پلانکتونی حاوی PET28A، عملاً در طول زمان ثابت باقی ماند (در حدود $7.9 \log \text{CFU mL}^{-1}$)، قابلیت کشت صفت موروثی بیان کننده ی E.GFP در طول نیمه ی اول آزمایش

قبل از کاهش مجدد پس از روز دهم، افزایش یافت. زمان مقایسه ی قابلیت زیست لایه، مقادیر مشابه هم چنین برای هر دو صفت موروثی بدست آمد (شکل ۱د).

تعداد کل سلولهای پلانکتونی (شکل ۱ ای). برای سلولهای بیان کننده ی E.GFP (به طور متوسط ۰.۶۲٪) با تفاوت‌های آماری معنادار در روزهای ۴ و ۵ ($P < 0.1$) و ۹ و ۱۲ ($P < 0.05$) بالاتر بود. به نظر رسید تعداد کل سلولهای پلانکتونی از روز ششم به بعد ثابت شد. تعداد کل سلولهای زیست لایه (شکل ۱ اف) برای صفت موروثی بیان کننده ی E.GFP (به طور متوسط ۰.۹۳٪) برای بیشترین مدت زمان آزمایش، بالاتر بود (تفاوت‌های معنادار از نظر آماری برای کل روزها تایید شد، $P < 0.05$ ، به استثناء روزهای ۴ و ۱۲)، که روند مشابه مقادیر وزن مرطوب زیست لایه را دنبال میکرد.

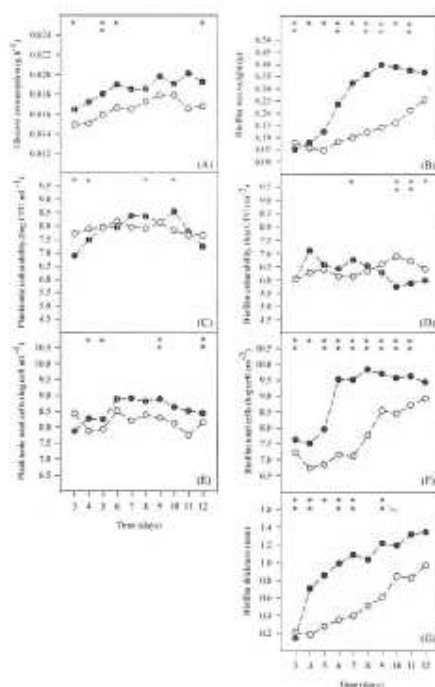
ضخامت زیست لایه (شکل ۱ جی) برای صفت موروثی بیان کننده ی E.GFP، پیرو روند منحنی وزن مرطوب زیست لایه (شکل ۱ ب) با اختلافات معنادار آماری در اکثر نقاط داده ای ($P < 0.05$)، بالاتر بود. با در نظر گرفتن ضخامت زیست لایه در حالت یکنواخت، چگالی سلولی زیست لایه های تولید کننده ی E.GFP برآورد شد به میزان $3.8 \times 10^{10} \text{ cells mL}^{-1}$ باشد. با در نظر گرفتن وزن خشک متوسط سلول ای.کولی، این مساله به غلظت سلولی تقریبی 10.8 g L^{-1} مربوط است.

شکل ۲، عکسهای زیست لایه های مرطوب تشکیل شده توسط هر دو صفت موروثی در راکتور سلول جریان را نشان میدهد. در این تصاویر بدیهی است صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP، تشکیل زیست لایه بیشتری را نسبت به صفت موروثی دارنده ی PET28A نشان داد، که تایید کننده ی نتایج ضخامت و وزن مرطوب ارائه شده در شکل ۱ ب و ج است. پس از هفت روز رشد، زیست لایه های تشکیل شده توسط صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP، همگن تر و بی ثبات تر به نظر رسید، در حالیکه زیست لایه های تشکیل شده توسط صفت موروثی PET28A، بر روی سطح PVC، پراکنده تر بود.

شکل ۳، بیان سلولهای پلانکتونی و زیست لایه پرورش دهنده ی پلاسمید PFM23 را ارائه میدهد. تولید ویژه ی سلولهای زیست لایه، در روز اول نمونه برداری بسیار بالا بود که در آن زمان تشکیل زیست لایه به سختی شروع شده بود. همانطور که زیست لایه شروع به رشد کرد، تولید ویژه توسط این سلولها کاهش یافت، که مقدار ثابت در حدود 5.8 fg cell^{-1} را در حالت یکنواخت (از ۷ روز به بعد) بدست می آورد. تولید پروتئین

دگرسان توسط سلولهای پلانکتونی، در حدود $0.18 \text{ fg cell}^{-1}$ تا انتهای آزمایش ثابت باقی ماند. بنابراین، محیط زیست لایه ، بیان پروتئین دگرسان ویژه را در حدود ۳۰ برابر ارتقا داد در هنگامیکه با سلولهای پلانکتونی در حالت یکنواخت مقایسه شد ($P < 0.05$). مقادیر اکسیژن حل شده در کشت تولید کننده ی GFP بین 5 mg L^{-1} تا ۷ در کل آزمایش متغیر بود، در حالیکه PH عملا در 7.1 ± 0.3 ثابت ماند، که حاکی از این است تجمع استات، قابل توجه نبوده است.

ماتریس اگزوپلیمری زیست لایه های تشکیل شده توسط هر دو صفت موروثی، بر حسب محتوای پروتئین و پلی ساکارید استخراج و تعیین کمیت شد (جدول ۱). گرچه زیست لایه های تشکیل شده توسط صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP، از محتوای پروتئین کل بالاتر برخوردار بودند، درصد جرم پروتئینها مستقر در ماتریس، مشابه بود (۲۸٪ برای صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP و ۲۵٪ برای صفت موروثی دارنده ی PET28A). صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP هم چنین زیست لایه های دارای پلی ساکاریدهای بیشتر را تولید کرد، با این وجود درصد پلی ساکاریدها در ماتریس این زیست لایه ، در زمان مقایسه با ۵۳٪ صفت موروثی دارنده ی PET28A فقط ۱۸٪ بود.



شکل ۱. تکامل دوره ی زمانی پارامترهای سنجیده ی پلانکتونی و زیست لایه : (الف) مصرف گلوکز، (ب) وزن مرطوب زیست لایه ، (ث) قابلیت کشت پلانکتونی، (د) قابلیت کشت زیست لایه ، (ای) کل سلولهای پلانکتونی،

اف) کل سلولهای زیست لایه ، جی) ضخامت زیست لایه .

برای سه $\pm SD$ میانگینهای *E. coli* JM109(DE3) + pFM23 (-●-), *E. coli* JM109(DE3) + pET28A (-○-)

آزمایش مستقل نشان داده میشود. SDهای متوسط زیر بدست آمد: $SD < 17\%$ برای مصرف گلوکز.

SD<29% برای وزن مرطوب زیست لایه ، SD<28% برای ضخامت زیست لایه ، SD<9% برای قابلیت

کشت پلانکتونی و زیست لایه و SD<5% برای تعداد کل سلولهای پلانکتونی و زیست لایه . تحلیل آماری

*

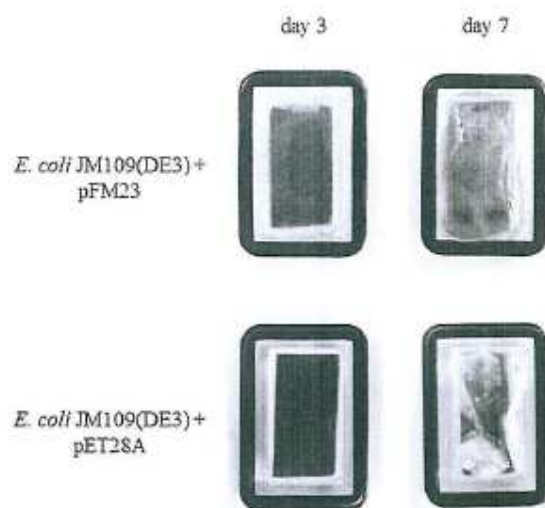
مربوط به هر نقطه ی زمانی با * برای سطح اطمینان بیشتر از ۹۰٪ ($P < 0.1$) و با * برای یک سطح اطمینان

بیشتر از ۹۵٪ ($P < 0.05$) نشان داده میشود.

۴. بحث

هدف اصلی این اثر، مقایسه ی تولید ویژه ی پروتئین دگرسان توسط سلولهای پلانکتونی و زیست لایه بود. به

علاوه، اثبات اینکه آیا بیان پروتئین دگرسان برای رشد زیست لایه زیان بخش نبوده است، حائز اهمیت بود.

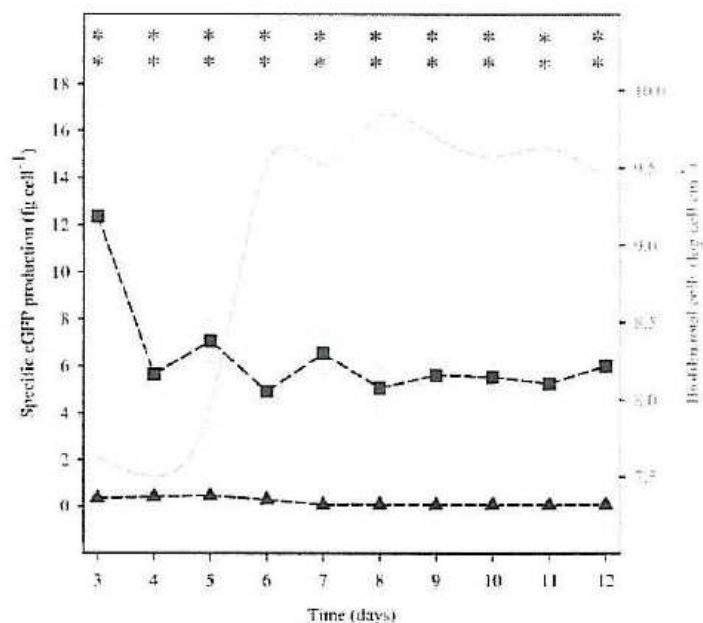


شکل ۲. عکسهای کوبنهای دارای زیست لایه های مرطوب تشکیل شده توسط

E. coli JM109(DE3) + pFM23 and *E. coli* JM109(DE3) + pET28A بر روی صفحات پی وی سی پس از سه و

هفت روز از رشد. عکسها با یک دوربین دیجیتالی فاین پیکس اس ۱۵۰۰ (شرکت فوجی فیلم، ژاپن) گرفته شده

بودند.



شکل ۳. تکامل دوره ی زمانی تولید E.GFP ویژه برای *E. coli* JM109(DE3) + pFM23 در سلولهای

پلانکتونی (-▲-) و سلولهای زیست لایه (-■-). خط نقطه چین خاکستری، تکامل تعداد کل سلولهای

زیست لایه را نشان میدهد که با رنگ کردن با DAPI سنجیده شده است. میانگینهای \pm SDs برای سه

آزمایش مستقل نشان داده شده است. $SD < 10\%$ و $SD < 16\%$ متوسط برای غلظتهای E.GFP ویژه

* در سلولهای پلانکتونی و غغ به ترتیب بدست آمدند. آنالیز آماری برای نتایج تولید E.GFP ویژه به صورت

برای یک میزان اطمینان بیشتر از ۹۵٪ ($P < 0.05$) نشان داده میشود.

نتایج نشان داد تولید زیست لایه برای صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP ارتقا یافت (که با وزن مرطوب،

ضخامت و تعداد کل سلولها سنجیده شد)، زمانیکه با صفت موروثی پرورش دهنده ی پلاسمید PET28A

مقایسه شد. معمولاً تصدیق میشود انواع مختلف پلاسمید من جمله پلاسمیدهای مزدوج و غیر مزدوج میتوانند

تولید غغ را ارتقا دهند. در مطالعه ی کنونی، بیان ژنها برای تولید پروتئین دگرسان، این اثر را تقویت کرد.

جدول ۱

مشخصات غغ تشکیل شده توسط *E. coli* JM109(DE3) + pFM23 و *E. coli* JM109(DE3) + pPET28A

E. coli پس از ۷ روز رشد.

| <i>E. coli</i> JM109(DE3) + pET28A | <i>E. coli</i> JM109(DE3) + pFM23 | مشخصات زیست لایه |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 5.75 ± 1.06 | 8.00 ± 1.77 | جرم زیست لایه (mg _{biofilm} cm ⁻²) |
| 7.08 ± 0.150 | 9.09 ± 0.740 | لگاریتم چگالی سلولی (cells cm ⁻²) |
| 23.9 ± 5.52 | 97.4 ± 10.7 | کل پروتئینها (mg g _{biofilm} ⁻¹) |
| 6.09 ± 0.970 | 27.4 ± 2.01 | پروتئینهای ماتریس (mg g _{biofilm} ⁻¹) |
| 24.6 ± 2.96 | 104 ± 19.2 | کل پلی ساکاریدها (mg g _{biofilm} ⁻¹) |
| 13.1 ± 2.37 | 19.2 ± 1.68 | پلی ساکاریدهای ماتریس (mg g _{biofilm} ⁻¹) |

مقادیر مصرف گلوکز بالاتر بر روی سلولهای تولید کننده ی E.GFP کشف شد و این مشاهده احتمالاً پیامد بار متابولیک مورد هدف از طریق بیان پروتئین دگرسان است. اثبات شده است تولید پروتئینهای فشار، مقادیر تنفس ارتقا یافته و شرایط لازم با انرژی بالا از طریق ترکیب پروتئین دارای صفات ارثی متشکل جدید القا میشود. از آنجاییکه شرایط فشار میتواند به نفع تشکیل زیست لایه باشد، بار متابولیک مضاعف با بیان پروتئین دارای صفات ارثی متشکل جدید ممکن است تشکیل زیست لایه را از طریق صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP تحریک کرده باشد.

در یک اثر قبلی، نشان داده شده است، وجود یک پلاسمید غیر مزدوج در این صفت موروثی ای.کولی میتواند تشکیل زیست لایه را ارتقا بخشد. یک فشار انتخابی اغلب برای تضمین پایداری پلاسمید در جمعیت سلولی، ضروری است. این انتخاب اغلب از طریق بیان یک ژن مقاومت آنتی بیوتیک کسب میشود. در این اثر، هر دو پلاسمید حاوی ژن آمینوگلیکوسید فسفاترانس فراز است که مقاومت به کانامایسین را ایجاد میکند. معلوم است بیان این ژنها، یک دلیل اصلی برای یک بار متابولیک مضاعف است زیرا این پروتئینهای مقاومت میتوانند تا ۲۰٪ کل پروتئین سلولی پلاسمید را نشان دهد، که از سطوح لازم برای حفظ پلاسمید بسیار فراتر میرود. تعداد سلولهای قابل کشت زیست لایه هم برای صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP و هم غیر تولید کننده ی E.GFP، مشابه بود، که نشانه ی این است که بیان ژن مقاومت ممکن است بر قابلیت کشت اثر بگذارد. از آنجاییکه تعداد کل سلولها بر روی صفت موروثی PFM23 بالاتر است، تعداد سلولهای غیر زیست پذیر و یا

زیست پذیر اما سلولهای غیر قابل کشت (VBNC) برای این صفت موروثی، بالاتر است. وجود VBNCها در سیستم های زیست لایه ها در معرض فشارهای مختلف گزارش شده است.

چگالی سلولی که ممکن بود در حالت یکنواخت با راکتور سلول جریان زیست لایه بدست آید، در حدود 11 g L^{-1} بود. گرچه یک محدوده ی سلولی حداکثر در حدود 200 g L^{-1} برای HCDC تخمین زده شد، یک

طیف غلظت سلولی بین 11 g L^{-1} و 190 در بیان چندین پروتئین توسط صفات موروثی مختلف گزارش شده است. مشاهده ی این مساله جالب توجه است که چگالی سلول زیست لایه بدست آمده در این مطالعه

(11 g L^{-1}) شبیه به چگالی سلولی بدست آمده در یک HCDC ای کولی دارای صفات ارثی متشکل جدید بکار

رفته برای تولید هورمون رشد انسانی است. چگالی سلول زیست لایه میتواند با بهینه سازی شرایط کشت افزایش یابد همانند میزان مواد مغذی، خواص سطحی و هیدرودینامیک جریان. سرعت جریان به طور آشکار بر

روی چگالی زیست لایه دارای سرعت بالا اثر میگذارد که به یک چگالی زیست لایه نسبتا بالا مربوط است. راه

دیگری برای تشکیل زیست لایه های چگال، استفاده از سطوح متخلخل است که نواحی سطحی ویژه بسیار بالا را ارتقا میدهد. در سالهای گذشته، چندین پیکربندی راکتور زیست لایه از طریق اجتماع فاضلاب با هدف به

حداکثر رساندن چگالی زیست لایه محک زده شده اند، فناوری هایی که میتوانند الهامی برای توسعه ی بیشتر

سیستم های زیست لایه برای تولید پروتئینهای دارای صفات ارثی متشکل جدید در چگالی های سلول بالاتر باشد.

بیان سطح بالای پروتئینهای دارای صفات ارثی متشکل جدید در زیست لایه های ای.کولی اولین بار توسط

هوآنگ و همکارانش ، با استفاده از یک راکتور سلولی جریان و در یک کموستات برای تولید بتا-گالاکتوسیداز

گزارش شد. در این آثار، مولفین بهره وری های ویژه ای را در زیست لایه هایی بدست آوردند که 25% از آنچه

آنها میتوانند از کموستات بدست آید، 25% بالاتر بود. اولین گزارش در مورد تولید سطح بالای یک پروتئین

دگرسان در زیست لایه های ای.کولی بعدها توسط اوکونل و همکارانش منتشر شد که E.GFP را در یک

کموستات دارای سلولهای پلانکتونی و در یک راکتور جریان صفحه ی موازی با سلولهای زیست لایه تولید

کردند. این مولفین، جمعیتهای مختلف سلولهای تولید کننده قوی (قادر به تولید 0.16 g L^{-1} از E.GFP)،

سلولهای تولید کننده متوسط (با تولیدات E.GFP متوسط 0.01 g L^{-1}) و سلولهای غیر تولید کننده را کشف کردند. در شرایط کموستات، جمعیت به طور برابر بین سلولهای غیر تولید کننده و سلولهای تولید کننده ی متوسط تقسیم شد. در زیست لایه ها، پس از بهینه سازی غلظت آنتی بیوتیک، درصد سلولهای تولید کننده ی قوی به ۶۰٪ رسید، در حالیکه سلولهای غیر تولید کننده، کشف نشدند. در اثر ما، تولید E.GFP کلی که کسب شد، در حدود 0.22 g L^{-1} بود، که دو برابر از مورد گزارش شده ی قبلی بالاتر بود. با مقایسه ی این تولید با سایر مقادیر گزارش شده برای HCDC ای.کولی، فهم این مساله امکان پذیر است که مقادیر تولید بالاتر (از g L^{-1}) ۴ تا ۱۰) با پروتئینهای مختلف بدست آمده است، به طور خاص زمانیکه به صورت حجمهای گنجایش تولید میشوند. در عین حال، این مقادیر (از 0.2 تا 1 g L^{-1}) برای HCDC تولید کننده ی پروتئینهای سیتوپلاسمی پوشیده و حل پذیر، بسیار پایین تر هستند همانطور که GFP دارای صفات ارثی متشکل جدید در این مطالعه ترکیب شد. مشاهده ی این مساله جالب توجه بود که بهره وری حجمی بدست آمده در این مطالعه (g L^{-1}) ۰,۲۲) شبیه به بهره وری حاصل در یک HCDC در [E.coli HB10] بکار رفته برای تولید عامل رشد بشره ای انسانی است. در این اثر، تولید E.GFP ویژه در زیست لایه ها در حدود 6 fg cell^{-1} بود. چندین مطالعه در این ادبیات، مقادیر مشابه یا حتی پایین تر بهره وری ویژه در HCDC ای.کولی دارای صفات ارثی متشکل جدید را گزارش میدهند.

نشان داده شده است کشتهای زیست لایه مداوم برای تولید پروتئین دگرسان میتواند برای حفظ سلولهای دارنده ی پلاسمید در مقایسه با کموستات، سودمند باشد. یک دلیلی که سلولها در زیست لایه ها تمایل دارند به طور کندتری نسبت به همتایان پلانکتونی خود رشد کنند، به تقسیمات کمتر و متناظرا تفکیک پلاسمید کمتر منتهی میشود. در این اثر، زیست لایه ها میتوانند با سیستم بیان سلول ساکن (Q-cell) توسعه یافته توسط رو و سامرز مقایسه شود. سیستم Q-cell، سلولهای ای.کولی فعال غیر رشد کننده اما متابولیک را تولید میکند و از آنجاییکه سلولهای ساکن دیگر تقسیم شونده نیستند، منابع متابولیک شان به سوی بیان ژنهای مبتنی بر پلاسمید، منتقل میشوند. اینجا سلولهای زیست لایه در حال رشد کند هم از تولید ویژه بسیار بالاتری نسبت به سلولهای پلانکتونی برخوردارند (در حدود ۳۰ برابر).

به طور جالبی، صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP، غلظتهای ویژه ی بالاتری از پروتئینها و پلی ساکاریدها (قشر زیستی 10^8 mg g^{-1}) را در زیست لایه نسبت به صفت موروثی غیر تولید کننده، ارائه داد. انتظار میرفت سلولهای زیست لایه حاصل از صفت موروثی تولید کننده ی E.GFP، از اکثر منابع درون سلولی مشمول در بیوسنتز (مثل آمینو اسیدها، نوکلئوتیدها و انرژی متابولیک) نسبت به بیان ژن دگر سان استفاده نمایند، به این ترتیب یک مقدار پایین تر از پلی ساکاریدها را تولید میکنند. تولید پروتئین دارای صفات ارثی متشکل جدید میتواند منجر به ترکیب پروتئینهای فشار در سرعتهای بالا شود و امکان دارد برخی از این پروتئینها در چسبندگی و یا تشکیل زیست لایه دخیل باشند. همانطور که توسط هافمن و ریناز مشاهده شد، بیان E.GFP همراه با افزایش در ترکیب پروتئینهای فشار ممکن است برای مصرف گلوکز بالاتر مشاهده شده برای این صفت موروثی توجیه شود زمانیکه با صفت موروثی pet28a مقایسه میشود.

HCDC متداول سلولهای ای.کولی پلانکتونی، مزایای زیادی را بر روی کشت پیوسته یا دسته ای ارائه میدهد. با این وجود، این نوع کشت، چالشهای خود را دارد مثل محدودیتهای در انتقال اکسیژن، تجمع استات و انحلال پذیری و سمیت اجزای محیط کشت. یک کشت پیوسته ی سلولهای زیست لایه ممکن است به صورت یک شکل غیر متداول HCDC در نظر گرفته شود و در واقع توافقی بین راه اندازی یک سیستم پیوسته با سلولهای پلانکتونی و یک HCDC دسته ای تغذیه شده ی مرسوم است. گرچه محدودیتهای انتقال جرم هم در کشتهای زیست لایه وجود دارد، اما قابل توجه ترین مقاومت انتقال جرم، درون زیست لایه روی میدهد همانطور که محدودیتهای انتقال جرم خارجی میتواند به طور موفقیت آمیزی مدیریت شود. نشان داده شده است چگالی سلول و ویژگی های معماری زیست لایه ها (که بر انتقال جرم داخلی مواد مغذی، اکسیژن و متابولیتهای سمی اثر میگذارد) میتواند با بهینه سازی دقیق بار مواد مغذی و فشار تنشی هیدرودینامیکی تعدیل شود. بنابراین احتمال دارد محصولات حجمی که میتوانند در طی تولید پروتئین دگر سان بدست آیند، با بهینه سازی شرایط کشت ارتقا یابند.

۵. نتیجه گیری

استفاده از سلولهای ای.کولی در HCDC یک شیوه ی بسیار جذاب تولید پروتئینهای دگرسان از طریق بهبود بهره وری های حجمی و کاهش سرمایه گذاری پولی و هزینه های عملیات در تاسیسات تولید است. تولید

پروتئینهای دگرسان در سلولهای زیست لایه در بخشی از چالشهای HCDC دخیل است اما برخی مطالعات نشان داده اند سلولهای زیست لایه از یک ظرفیت تولید ویژه عالی برخوردارند زمانیکه با همتهای پلانکتونی خود مقایسه میشوند. این اثر نشان میدهد سلولهای زیست لایه ای.کولی میتوانند یک پروتئین دگرسان الگو را در مقادیر بسیار بالاتر از سلولهای پلانکتونی تولید کنند و چگالی های سلولی و بهره وری های حجمی از قبل در طیف چیزی هستند که میتوانند توسط HCDC بدست آیند حتی بدون بهینه سازی شرایط کشت. اثر آینده، بهینه سازی این شرایط را برای مهار قدرت این زیست لایه های تولید کننده بررسی خواهد کرد.

References

- [۱] F.J.M. Mergulhão, G.A. Monteiro, J.M.S. Cabral, M.A. Taipa, Design of bacterial vector systems for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 14 (2004), 1-14.
- [۲] L. Sanchez-Garcia, L. Martín, R. Mangués, N. Ferrer-Miralles, E. Vázquez, A. Villaverde, Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update, *Microb. Cell Fact.* 15 (2016), 1-7.
- [۳] F. Baneyx, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999), 411-421.
- [۴] O. Pines, M. Inouye, Expression and secretion of proteins in *E. coli*, *Mol. Biotechnol.* 12 (1999), 25-34.
- [۵] F.J.M. Mergulhão, D.K. Summers, G.A. Monteiro, Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Adv.* 23 (2005), 177-202.
- [۶] J.H. Choi, K.C. Keum, S.Y. Lee, Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006), 876-885.
- [۷] P.S. Stewart, M.J. Franklin, Physiological heterogeneity in biofilms, *Nat. Rev. Micro.* 6 (2008), 199-210.
- [۸] P.S. Stewart, Diffusion in biofilms, *J. Bacteriol.* 185 (2003), 1485-1491.
- [۹] C.-T. Huang, S.W. Peretti, J.D. Bryers, Plasmid retention and gene expression in suspended and biofilm cultures of recombinant *Escherichia coli* DH5 α (pMJR1750), *Biotechnol. Bioeng.* 41 (1993), 211-220.
- [۱۰] C.-T. Huang, S.W. Peretti, J.D. Bryers, Effects of inducer levels on a recombinant bacterial biofilm formation and gene expression, *Biotechnol. Lett.* 16 (1994), 903-908.
- [۱۱] J.D. Bryers, C.-T. Huang, Recombinant plasmid retention and expression in bacterial biofilm cultures, *Wat. Sci. Tech.* 31 (1995), 105-115.
- [۱۲] H.A. O'Connell, C. Niu, E.S. Gilbert, Enhanced high copy number plasmid maintenance and heterologous protein production in an *Escherichia coli* biofilm, *Biotechnol. Bioeng.* 97 (2007), 439-446.

- [١٣]B.R. Glick, Metabolic load and heterologous gene expression, *Biotechnol. Adv.* 13 ,(١٩٩٥) ٢٤١-٢٤٧
- [١٤]W.E. Bentley, N. Mirjalili, D.C. Andersen, R.H. Davis, D.S. Kompala, Plasmid encoded protein: the principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria, *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990), 668-681.
- [١٥]U.E. Cheah, W.A. Weigand, B.C. Stark, Effects of recombinant plasmid size on cellular processes in *Escherichia coli*, *Plasmid* 18 (1987), 127-134.
- [١٦]S. Flores, R. de Anda-Herrera, G. Gosset, F.G. Bolívar, Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentosephosphate pathway, *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004), 485-494.
- [١٧]D. Ow, P. Nissom, R. Philp, S. Oh, M. Yap, Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006), 391-398.
- [١٨]L. Andersson, S. Yang, P. Neubauer, S.-O. Enfors, Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* ٢٤٣-٢٥٥ ,(١٩٩٦) ٤٦
- [١٩]H.P. Sørensen, K.K. Mortensen, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 115 (2005), 113-128.
- [٢٠]Y.-X. Yang, Z.-G. Qian, J.-J. Zhong, X.-X. Xia, Hyper-production of large proteins of spider dragline silk MaSp2 by *Escherichia coli* via synthetic biology approach, *Process Biochem.* 51 (2016), 484-490.
- [٢١]H. Yu, Y. Shi, X. Sun, H. Luo, Z. Shen, Effect of poly(β -hydroxybutyrate) accumulation on the stability of a recombinant plasmid in *Escherichia coli*, *J. Biosci. Bioeng.* 96 (2003), 179-183.
- [٢٢]F. Haddadin, S. Harcum, Transcriptome profiles for high-cell-density recombinant and wild-type *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* 90 (2005), 127-153.
- [٢٣]S. Birnbaum, J.E. Bailey, Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* 37 (1991), 736-745.
- [٢٤]J.-M. Ghigo, Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development, *Nature* 412 (2001), 442-445.
- [٢٥]A. Reisner, B.M. Höller, S. Molin, E.L. Zechner, Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion, *J. Bacteriol.* 188 (2006), 3582-3588.
- [٢٦]T. May, S. Okabe, *Escherichia coli* harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and curli, *J. Bacteriol.* 190 (2008), 7479-7490.
- [٢٧]X. Yang, Q. Ma, T.K. Wood, The R1 conjugative plasmid increases *Escherichia coli* biofilm formation through an envelope stress response, *Appl. Environ. Microbiol.* ٢٤٩٩-٢٤٩٠ ,(٢٠٠٨) ٧٤
- [٢٨]J.E. Król, H.D. Nguyen, L.M. Rogers, H. Beyenal, S.M. Krone, E.M. Top, Increased transfer of a multidrug resistance plasmid in *Escherichia coli* biofilms at the air-liquid interface, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011), 5079-5088.

- [29] A. Norman, L.H. Hansen, Q. She, S.J. Sørensen, Nucleotide sequence of pOLA52: A conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux, *Plasmid* 60 (2008), 59-74.
- [30] M. Burmølle, M.I. Bahl, L.B. Jensen, S.J. Sørensen, L.H. Hansen, Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains, *Microbiology* 154 (2008), 187-195.
- [31] C.-T. Huang, S.W. Peretti, J.D. Bryers, Effects of medium carbon-to-nitrogen ratio on biofilm formation and plasmid stability, *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994), 329-336.
- [32] J.Y. Lim, H.J. La, H. Sheng, L.J. Forney, C.J. Hovde, Influence of plasmid pO157 on *Escherichia coli* O157:H7 Sakai biofilm formation, *Appl. Environ. Microbiol.* 76.966-963 (2010)
- [33] J.S. Teodósio, M. Simões, F.J. Mergulhão, The influence of nonconjugative *Escherichia coli* plasmids on biofilm formation and resistance, *J Appl Microbiol* 113 (2012), 373-382.
- [34] K.J. Jeong, S.Y. Lee, High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999), 3027-3032.
- [35] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors, *Gene* 33.(1985) .119-103
- [36] J. Sambrook, D.W. Russell. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001 [37] F.J. Mergulhão, M.A. Taipa, J.M. Cabral, G.A. Monteiro, Evaluation of bottlenecks in proinsulin secretion by *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 109 (2004), 31-43
- [38] Novagen. pET system manual. 2005.
- [39] K.L. Jones, S.-W. Kim, J.D. Keasling, Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria, *Metab. Eng.* 2 .338-328 (2000)
- [40] Z. Zhang, G. Kuipers, Ł. Niemiec, T. Baumgarten, D.J. Slotboom, J.-W. de Gier, A. Hjelm, High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG, *Microb. Cell Fact.* 14 (2015), 1-11.
- [41] L.C. Gomes, D. Carvalho, R. Briandet, F.J. Mergulhão, Temporal variation of recombinant protein expression in *Escherichia coli* biofilms analysed at single-cell level, *Process Biochem.* 51 (2016), 1155-1161.
- [42] J.M.R. Moreira, M. Simões, L.F. Melo, F.J. Mergulhão, The combined effects of shear stress and mass transfer on the balance between biofilm and suspended cell dynamics, *Desal. Water Treat.* 53 (2015), 3348-3354.
- [43] J.S. Teodósio, M. Simões, L.F. Melo, F.J. Mergulhão, Flow cell hydrodynamics and their effects on *E. coli* biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow, *Biofouling* 27 (2011), 1-11.
- [44] L.C. Gomes, L.N. Silva, M. Simões, L.F. Melo, F.J. Mergulhão, *Escherichia coli* adhesion, biofilm development and antibiotic susceptibility on biomedical materials, *J Biomed. Mater. Res. A* 103 (2015), 1414-1423.
- [45] F.J. Mergulhão, G.A. Monteiro, Analysis of factors affecting the periplasmic production of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 17 .1241-1236 (2007)
- [46] M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956), 350-356

- [47] M. Simões, M.O. Pereira, S. Sillankorva, J. Azeredo, M.J. Vieira, The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms, *Biofouling* 23 (2007), 249-258.
- [48] F.C. Neidhardt, *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, ASM Press, Washington, DC, 1996.
- [49] F. Hoffmann, U. Rinas, Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. In: S-O Enfors (Ed.), *Physiological Stress Responses in Bioprocesses*, Springer, Berlin, 2004. pp. 73-92.
- [50] P. Landini, Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*, *Res. Microbiol.* 160,(2009) 259-266.
- [51] D.S. Cunningham, R.R. Koepsel, M.M. Atai, M.M. Domach, Factors affecting plasmid production in *Escherichia coli* from a resource allocation standpoint, *Microb. Cell Fact.* 8 (2009), 1475-2859.
- [52] A. Rozkov, C. Avignone-Rossa, P. Ertl, P. Jones, R. O'Kennedy, J. Smith, J. Dale, M. Bushell, Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence, *Biotechnol. Bioeng.* 88 (2004), 909-915.
- [53] S. Liu, C. Gunawan, N. Barraud, S.A. Rice, E.J. Harry, R. Amal, Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016), 8954-8976.
- [54] M. Simões, M.O. Pereira, M.J. Vieira, Validation of respirometry as a short-term method to assess the efficacy of biocides, *Biofouling* 21 (2005), 9-17.
- [55] L.C. Simões, M. Simões, M.J. Vieira. Drinking water biofilm monitoring by PropellaTM and Flow Cell bioreactors under different operating conditions. In: E.C. Ferreira, M. Mota (Eds.). *Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR*. Braga; 2008.
- [56] J. Shiloach, R. Fass, Growing *E. coli* to high cell density - a historical perspective on method development, *Biotechnol. Adv.* 23 (2005), 345-357.
- [57] E.B. Jensen, S. Carlsen, Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts, *Biotechnol. Bioeng.* 36 (1990), 1-11.
- [58] J.M.R. Moreira, L.C. Gomes, M. Simões, L.F. Melo, F.J. Mergulhão, The impact of material properties, nutrient load and shear stress on biofouling in food industries, *Food Bioprod. Process.* 95 (2015), 228-236.
- [59] M.O. Pereira, M. Kuehn, S. Wuertz, T. Neu, L.F. Melo, Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm, *Biotechnol. Bioeng.* 78,(2002) 1171-1174
- [60] T. Paris, S. Skali-Lami, J.-C. Block, Effect of wall shear rate on biofilm deposition and grazing in drinking water flow chambers, *Biotechnol. Bioeng.* 97 (2007), 1550-1561
- [61] J.M.R. Moreira, J.S. Teodósio, F.C. Silva, M. Simões, L.F. Melo, F.J. Mergulhão, Influence of flow rate variation on the development of *Escherichia coli* biofilms, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36 (2013), 1-10.

- [۶۲] E. Syron, E. Casey, Model-based comparative performance analysis of membrane aerated biofilm reactor configurations, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008), 1361-1373.
- [۶۳] L.F. Vallejo, M. Brokelmann, S. Marten, S. Trappe, J. Cabrera-Crespo, A. Hoffmann, G. Gross, H.A. Weich, U. Rinas, Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 94 (2002), 185-194.
- [۶۴] S.Y. Hu, J.L. Wu, J.H. Huang, Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 107,(۲۰۰۴) .۱۷۱-۱۶۱
- [۶۵] K.R. Babu, S. Swaminathan, S. Marten, N. Khanna, U. Rinas, Production of interferon- α in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53 .۶۶۰-۶۵۵ ,(۲۰۰۰)
- [۶۶] Y.L. Shen, Y. Zhang, A.Y. Sun, X.X. Xia, D.Z. Wei, S.L. Yang, High-level production of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL) in high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli* using a combined feeding strategy, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004), 981-984.
- [۶۷] W.Y. Tong, S.J. Yao, Z.Q. Zhu, J. Yu, An improved procedure for production of human epidermal growth factor from recombinant *E. coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* ۶۷۴ ,(۲۰۰۱) ۵۷ .۶۷۹
- [۶۸] S. Sivakesava, Z.N. Xu, Y.H. Chen, J. Hackett, R.C. Huang, E. Lam, T.L. Lam, K.L. Siu, R.S.C. Wong, W.K.R. Wong, Production of excreted human epidermal growth factor (hEGF) by an efficient recombinant *Escherichia coli* system, *Process Chem.* 34 (1999), 893-900.
- [۶۹] P. Pack, M. Kujau, U. Schroeckh, R. Knüpfer, R. Wenderoth, D. Riesenberger, A. Plückthun, Improved bivalent miniantibodies with identical avidity as whole antibodies produced by high cell density fermentation of *Escherichia coli*, *Biotechnology.*(۱۹۹۳) .۱۲۷۷-۱۲۷۱
- [۷۰] D.J. Seo, B.H. Chung, Y.D. Hwang, Y.H. Park, Glucose-limited fed-batch culture of *Escherichia coli* for production of recombinant human interleukin-2 with the DO-stat method, *J. Ferment. Bioeng.* 74 (1992), 196-198.
- [۷۱] K. Hellmuth, D.J. Korz, E.A. Sanders, W.D. Deckwer, Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1, *J. Biotechnol.* 32 (1994), 289-298.
- [۷۲] L. Yee, H.W. Blanch, Recombinant trypsin production in high cell density fedbatch cultures in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* 41 (1993), 781-790.
- [۷۳] I. Williams, W.A. Venables, D. Lloyd, F. Paul, I. Critchley, The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*, *Microbiology* 143 (1997), 2407-2413.
- [۷۴] D.C. Rowe, D.K. Summers, The quiescent-cell expression system for protein synthesis in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999), 2710-2715.
- [۷۵] C.-C. Chen, R. Walia, K.J. Mukherjee, S. Mahalik, D.K. Summers, Indole generates quiescent and metabolically active *Escherichia coli* cultures, *Biotechnol. J.* 10 (2015), 636-646.



این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی