



Scan online to view this article

## Optimization of light chain production of human enterokinase enzyme for use in the pharmaceutical industry

Mohammad Ebrahimifard<sup>1</sup>, Mohammad Mahdi Forghanifard<sup>\*1</sup>,  
Ahad Yamchi<sup>2</sup>, Vajihe Zarrinpur<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2. Department of Biotechnology, Golestan University, Gorgan, Iran.

### Abstract

**Aim and Background:** Enterokinase is a gastrointestinal enzyme that acts as a protease with a specific sequence. Due to the ability of enterokinase to enzymatically digest the recombinant protein at its specific site (including the four amino acids Aspartic acid and one amino acid lysine), which is targeted at the protein, as a very useful tool for purification and separation Target protein from the non-target part is used in the pharmaceutical, food and industrial industries.

**Materials and Methods:** Independent variables used included OD (0.6, 1.2 and 1.8) at 600 nm, IPTG concentration (0.2, 0.5 and 0.8 mM) and The type of bacterial strain was (ShuffleT7, BL21, NICO21). The response surface methodology (RSM) in the form of a central composite scheme was used to predict independent variables on the production of enterokinase enzyme.

**Results:** OD equal to 1.8 at 600 nm wavelength, IPTG concentration of 0.71 mM and type of ShuffleT7 bacterial strain, LB culture medium, 2.5 mM lactose concentration and 25 ° C induction temperature, for production Recombinant enterokinase was optimized.

**Discussion and Conclusion:** Drug proteins play an important role in modern molecular medicine therapies. Enterokinase gene expression in the bacterial system facilitates the purification of low concentrations, so large-scale, highly purified recombinant proteins can be produced and optimized in the bacterial system.

**Keywords:** Enterokinase, Promoter inductor, Purification, Cloning, Expression host. Iau Science .

### Corresponding author:

Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.  
Email: forghanifard@gmail.com





برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## بهینه‌سازی تولید زنجیره سبک آنزیم انتروکیناز انسانی به منظور استفاده در صنایع دارویی

محمد ابراهیمی فرد<sup>۱</sup>، محمد مهدی فرقانی فرد<sup>۱\*</sup>، احد یامچی<sup>۲</sup>، وجیهه زرین پور<sup>۱</sup>

۱. گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** انتروکیناز یک آنزیم دستگاه گوارش است که به‌عنوان یک پروتئاز با توالی خاص عمل می‌کند. به‌دلیل توانایی انتروکیناز برای هضم آنزیمی پروتئین نو ترکیب در سایت اختصاصی آن (شامل چهار اسید آمینه آسپارتیک اسد و یک اسید آمینه لیزین است) که در پروتئین هدف قرار داده می‌شود، به‌عنوان یک ابزار بسیار مفید برای امکان خالص‌سازی و جداسازی بخش پروتئین هدف از بخش غیر هدف در صنایع دارویی، غذایی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

**مواد و روش‌ها:** متغیرهای مستقل مورد استفاده شامل میزان OD (۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG (۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میلی‌مولار) و نوع سویه باکتری (ShuffleT7, BL21, NICO21) بود. از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید آنزیم انتروکیناز استفاده شد.

**یافته‌ها:** میزان OD برابر با ۱/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG ۰/۷۱ میلی‌مولار و نوع سویه باکتری ShuffleT7، محیط کشت LB، غلظت لاکتوز ۲/۵ میلی‌مولار و دمای القاء ۲۵ درجه سانتی‌گراد، برای تولید آنزیم انتروکیناز نو ترکیب بهینه‌سازی شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** پروتئین‌های دارویی نقش مهمی در درمان‌های نوین پزشکی مولکولی دارند. بیان ژن انتروکیناز در سیستم باکتریایی، تسهیل در خالص‌سازی غلظت‌هایی که پایین است را فراهم می‌کند، بنابراین پروتئین‌های نو ترکیب در مقیاس وسیع و با خلوص زیاد می‌توانند در سیستم باکتریایی تولید و بهینه‌سازی شوند.

**واژه‌های کلیدی:** انتروکیناز، القاگر پروموتور، خالص‌سازی، کلونینگ، میزبان بیانی، Iau Science.

### مقدمه

می‌کند (۳،۴). انتروکیناز از روده‌خوک، گاو، انسان و دیگر موجودات خالص شده است که به‌نظر می‌رسد در اکثر موارد، هترودایمی مرتبط با پیوند دی‌سولفیدی باشد. این آنزیم از یک زنجیره واحد پیش‌ساز مشتق شده که شامل زنجیره سنگین ۱۴۰-۸۲ کیلو دالتونی و زنجیره سبک ۶۲-۲۸ کیلو دالتونی است. هر دو زنجیره انتروکیناز حاوی ۵۰-۳۰ درصد کربوهیدرات است. انتروکیناز در ابتدا به نام انتروپیتیداز شناخته می‌شد، که برای اولین بار توسط پاولوف روسی در سال ۱۸۹۹ کشف شد (۵). کونیتز در سال ۱۹۳۹ اولین بار انتروکیناز را به‌عنوان فعال کننده در دوندئوم پستانداران معرفی کرد که تبدیل آنزیمی تریپسینوژن به تریپسین با استفاده از انتروکیناز خالص خوکی را انجام می‌داد. انتروکیناز یک کیناز نیست، بنابراین در حال حاضر این آنزیم به نام انتروکیناز که منعکس کننده فعالیت پروتئولیتیک آن است، شناخته می‌شود (۶). بعد از کشف انتروکیناز و شناسایی ویژگی‌های اختصاصی این آنزیم، در اکثر موارد استفاده تجاری

انترو پیتیداز یکی از اعضای خانواده سرین پروتئازهای نوع II گذرنده از غشاء است که در مرز دوازدهه قرار دارد. این آنزیم به‌عنوان یک زیموژن (پروانتروکیناز) که نیاز به فعال‌سازی توسط یک پروتئاز دیگر، تریپسین و یا به-احتمال دودنئاز دارد، سنتز می‌شود (۱،۲). انتروکیناز به-عنوان پروتئاز، به‌طور اختصاصی، پروپیتیدی اسیدی را از تریپسینوژن جدا کرده و آن را به تریپسین فعال تبدیل می‌کند. در واقع انتروکیناز یک سرین پروتئاز متصل به غشاء در دوازدهه است که تریپسینوژن را در جایگاه خاص X LYS-ASP می‌شکند و آن را تبدیل به تریپسین فعال

### نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران  
پست الکترونیکی: forghanifard@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۶

باکتری *E. coli* مولد آنزیم انتروکیناز و شرایط جهت بیان ژن بوده است.

## مواد و روش‌ها

### مواد

در این پژوهش از باکتری *E. coli* سویه‌های BL21، Shuffle T7، Nico21، pET15b استفاده شد. وکتور مورد استفاده در این مطالعه pET15b است. این وکتور دارای مارکر انتخابی آمپی‌سیلین و پروموتور T7 است.

### روش‌ها

#### استخراج پلاسمید نوترکیب استخراج داده‌های مربوط به ژن موردنظر از بانک ژن و طراحی سازه ژنی

در این مطالعه از روی ژن اصلی انتروکیناز انسانی (EC 3.4.21.9)، سازه ژنی موردنیاز طراحی گردید.

#### تهیه Competent Cell

مراحل تهیه کشت بر اساس روش Zurawa-Janicka و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد. به‌طور خلاصه، پس از تهیه LB broth، به آن سلول میزبان BL21، Nico21 و Shuffle T7 اضافه شد (۷). برای استخراج پلاسمید از تک کلنی‌های کشت داده شده داخل پلیت با استفاده از لوپ برداشته شد و داخل محیط LB broth کشت داده و مقدار ۵ میکرولیتر (۱۰۰ mg/L) آنتی‌بیوتیک آمپی‌سلین نیز اضافه گردید.

پلاسمید pET15b در مقیاس کوچک طبق دستورالعمل با کیت Thermo استخراج گردید.

#### انجام PCR برای تأیید استخراج پلاسمید

واکنش زنجیره پلی‌مرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۷۵ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر دو آغازگر اختصاصی (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مرز (۵ واحد/میکرولیتر) و ۵ میکرولیتر DNA (۵۰ نانو گرم) استفاده گردید. در این تحقیق از یک برنامه چرخه حرارتی به‌طور اختصاصی برای آغازگرها استفاده گردید. برای مرحله واسرشت اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اعمال شد. تکثیر در ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۶ درجه به مدت ۱ دقیقه و دمای

انتروکیناز به منابع جدا شده از بافت دوازدهه حیواناتی مانند گاو و خوک محدود شده بود. اکنون استفاده از فناوری مهندسی پروتئین امکان تولید و بیان ناهمگن انتروکیناز در میزبان پروکاریوتی به شیوه نوترکیب را ایجاد کرده است (۱). این آنزیم نقشی کلیدی در آبشار گوارشی دستگاه گوارش بازی می‌کند و آن شکستن پپتید فعال‌سازی انتهای آمینی تریپسینوژن و تولید تریپسین فعال است، در نتیجه پس از آن تریپسین منجر به فعال سازی دیگر زیموژن‌های پانکراسی (تریپسین، کیموتریپسین، کربوکسی پپتیداز و الاستاز) می‌شود (۷،۸).

در حال حاضر انتروکیناز، ترومبین<sup>۱</sup>، فاکتور<sup>۲</sup> Xa، TEV<sup>۳</sup> و غیره پروتئاز‌هایی هستند که برای برش پروتئین ترکیبی تولید شده در باکتری استفاده می‌شوند. در میان این پروتئازها، انتروکیناز به‌عنوان یک آنزیم ایده‌آل برای خالص‌سازی پروتئین هدف با شکست دنباله خاص از پروتئین ترکیبی به‌شمار می‌رود (۹،۱۰،۱۱). به‌دلیل توانایی انتروکیناز برای شکافتن پروتئین نوترکیب در جایگاهی بسیار خاص در حضور مواد شوینده، داناتوره‌های مختلف، عمل در یک محدوده گسترده pH و درجه حرارت، این آنزیم تبدیل به یک ابزار بسیار جذاب و مفید برای جداسازی نواحی پروتئین نوترکیب در بیوتکنولوژی شده است (۱۲).

در سال‌های گذشته منبع انتروکیناز طبیعی، با توجه به هزینه‌های بالای استخراج و جداسازی آنزیم از حیوانات بوده، که در نهایت منجر به تولید پروتئین آلوده و محدود می‌گردید. بنابراین تلاش‌ها به‌منظور توسعه تولید انتروکیناز با استفاده از روش مهندسی ژنتیک معطوف شده است (۱۳). به‌عنوان مثال، Kim و همکاران در سال ۲۰۲۱ بیان و خالص‌سازی زنجیره سبک انتروکیناز انسانی محلول و فعال در باکتری اشریشیاکلا را مورد مطالعه قرار دادند (۱۴). هم‌چنین Aghaeepoor و همکاران در سال ۲۰۱۹ به بررسی بهینه‌سازی تولید آنزیم استریپتوکیناز نوترکیب در سویه باکتری اشریشیاکلی با روش سطح پاسخ پرداختند (۱۵). با این حال، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه بهینه‌سازی شرایط بیان ژن انتروکیناز انجام نشده است، بنابراین هدف از این مطالعه کلونینگ و بیان ژن آنزیم انتروکیناز انسانی در سویه‌های گوناگون باکتری *E. coli* و دست‌یابی به بهترین سویه

<sup>1</sup> Thrombin

<sup>2</sup> Factor Xa

<sup>3</sup> Tobacco Etch Virus

گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه صورت گرفت. یک سیکل نهایی شامل مرحله گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد TBE و با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در ۸۰ دقیقه الکتروفورز شد (۱۶،۱۷).

### هضم آنزیمی

به منظور درج قطعه نو ترکیب در پلاسمید، ابتدا لازم است که هم قطعه نو ترکیب و هم پلاسمید به وسیله آنزیم‌های محدودگر یکسان، بریده شوند. برای انجام هضم آنزیمی در ابتدا و انتهای قطعه نو ترکیب، جایگاه برش برای آنزیم‌های *BamHI* و *XhoI* تعبیه شد. پلاسمید pET15b هم در

جایگاه کلونینگ خود محل‌های برش برای این دو آنزیم را داشت. مواد مورد نیاز برای انجام واکنش هضم آنزیمی شامل آب استریل (۲ میکرولیتر)، بافر ۱۰X (۴ میکرولیتر)، آنزیم *BamHI* ۱۰ میکرولیتر (۱۰ unit/μl)، آنزیم *XhoI* ۱/۲ میکرولیتر (۱۰ unit/μl)، پلاسمید و قطعه ژن، ۱۲ میکرولیتر (۱ ماکروگرم) بود. به منظور اطمینان از انجام واکنش هضم آنزیمی، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد TBE برده شدند و از هر کدام از نمونه‌ها، یک کنترل نیز گذاشته شد (۱۸).

جدول ۱. طراحی آزمایش مرحله اول با RSM

سطح	فاکتور		
	OD	Host Cell	IPTG (mM)
۱	۰/۶	BL 21	۰/۲
۲	۱/۲	Shuffle	۰/۵
۳	۱/۸	Nico	۰/۸
RSM با ۳ فاکتور			
Run	Factor 1: OD	Factor 2: Host Cell	Factor 3: IPTG
۱	۰/۶	BL 21 (1)	۰/۲
۲	۰/۶	BL 21 (1)	۰/۸
۳	۱/۲	BL 21 (1)	۰/۵
۴	۱/۸	BL 21 (1)	۰/۲
۵	۱/۸	BL 21 (1)	۰/۸
۶	۰/۶	Shuffle (2)	۰/۵
۷	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۲
۸	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۸
۹	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۵
۱۰	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۵
۱۱	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۵
۱۲	۱/۸	Shuffle (2)	۰/۵
۱۳	۰/۶	Nico (3)	۰/۲
۱۴	۰/۶	Nico (3)	۰/۸
۱۵	۱/۲	Nico (3)	۰/۵
۱۶	۱/۸	Nico (3)	۰/۸
۱۷	۱/۸	Nico (3)	۰/۲

Amp به آن افزوده شد و به صورت overnight داخل شیکر انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ rpm قرار گرفت. سپس پیش کشت به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB دارای آنتی‌بیوتیک Amp اضافه شد و داخل شیکر انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. حال با توجه به OD و IPTG های نوشته شده در جدول ۱ مرحله القاء انجام و پس از اضافه نمودن IPTG، ۴ ساعت دیگر در شیکر انکوباتور با همان دما قرار داده شد. سپس محتویات کشت داده شده داخل یک فالكون استریل ریخته شد و

**بیان ژن انتروکیناز و انتخاب بهترین Host Cell**  
با استفاده از روش آماری RSM، بررسی وضعیت بیان در OD ها و غلظت‌های مختلف IPTG، بهترین Host Cell انتخاب گردید و ادامه کار با این Host Cell انجام شد. همچنین بهترین OD و مقدار IPTG نیز در این مرحله انتخاب گردید (جدول ۱). برای این مرحله استوک Host Cell های مختلف از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد بیرون آورده شد و پس از هم دما شدن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر کدام داخل یک لوله حاوی محیط LB broth ریخته و سپس مقدار ۵ میکرولیتر (۱۰۰ mg/L) آنتی‌بیوتیک

جدول ۲- طراحی آزمایش مرحله دوم با RSM

سطح	فاکتور		
	Medium	Lactose (mM)	<sup>۱</sup> Tm
۱	M9	۰	۱۸
۲	LB	۲/۵	۲۵
۳	TB	۵	۳۲
Response Surface Methodology (RSM) with 3 Factor			
Run	Factor 1: Medium	Factor 2: Lactose	Factor 3: Tm
۱	LB	۲/۵	۱۸
۲	TB	۵	۱۸
۳	TB	۵	۳۲
۴	TB	۰	۳۲
۵	M9	۲/۵	۲۵
۶	TB	۲/۵	۲۵
۷	LB	۰	۲۵
۸	LB	۲/۵	۳۲
۹	M9	۰	۳۲
۱۰	M9	۵	۳۲
۱۱	LB	۵	۲۵
۱۲	M9	۰	۱۸
۱۳	LB	۲/۵	۲۵
۱۴	LB	۲/۵	۲۵
۱۵	LB	۲/۵	۲۵
۱۶	TB	۰	۱۸
۱۷	M9	۵	۱۸

<sup>1</sup> temperature melting

در دور rpm ۶۵۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۱۹،۲۰).

### بهینه سازی بیان بیش تر پروتئین

### بهینه سازی در مرحله القاء پروتئین

به منظور بهینه سازی و گرفتن بیان بالاتر در مرحله القاء، علاوه بر القاگر IPTG از القاگر لاکتوز در غلظت های mM ۱۰-۴۰ نیز استفاده شد.

### بررسی انواع محیط کشت، ترکیب تیمارهای نوع القاگر و دمای القا

در این مرحله برای گرفتن بهترین بیان ممکن، شرایط مختلفی طبق روش آماری RSM و بر پایه نتایج مرحله اول، طراحی شد (جدول ۳). به این صورت که باکتری با شرایط زیر وارد این مرحله شد:

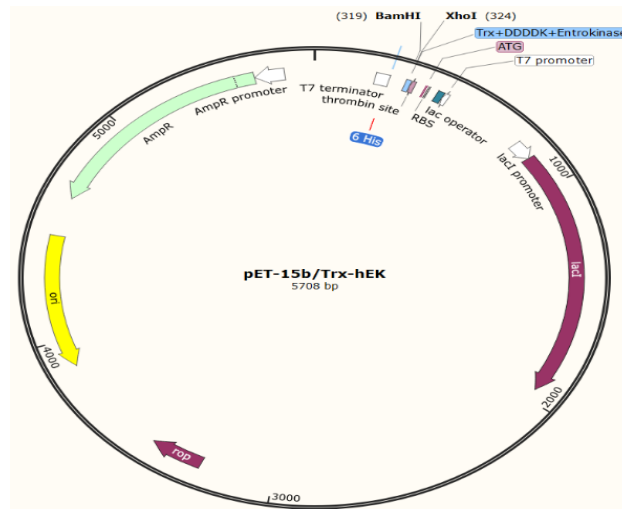
Shuffle T7 , IPTG=0.71mM , OD= 1.8

در تمام تیمارها مقدار OD, IPTG ثابت بود و فاکتورهای مشخص شده طبق جدول ۲ متغیر بودند. محیط های کشت مورد نیاز این مرحله نیز تهیه گردید. (در محیط M9 گلوکز بعد از اتوکلاو و توسط فیلتر به محیط اضافه شد) دمای قبل از القاء نیز برای تمامی تیمارها ۳۵ درجه سانتی گراد دور شیکر نیز rpm ۱۸۰ بود و دماهای ذکر شده در جدول ۲ مربوط به زمان القاء و پس از افزودن ماده القاگر است. در پایان این مرحله مراحل استخراج، غلظت سنجی و الکتروفورز نیز انجام شد.

### نتایج

### سازه ژنی طراحی شده

سازه ژنی طراحی شده برای بهینه سازی متناسب با کدون های *E. coli* و RBS مناسب صورت پذیرفت.

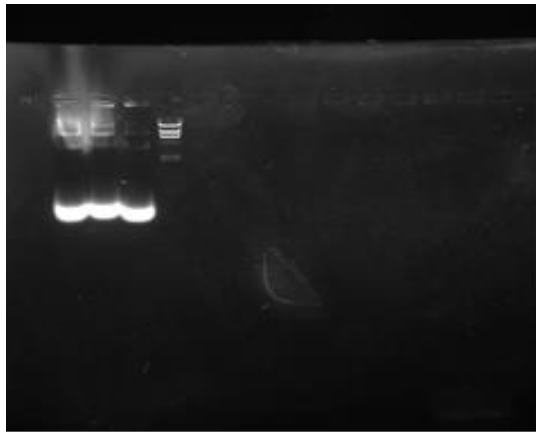


شکل ۱- سازه ژنی طراحی شده به همراه وکتور

### استخراج پلاسمید نو ترکیب

به منظور انجام واکنش الحاق ژن در ناقل، استخراج ناقل با استفاده از کیت استخراج ناقل شرکت Thermo انجام شد و درستی انجام عملیات استخراج با بارگذاری ۷ میکرولیتر

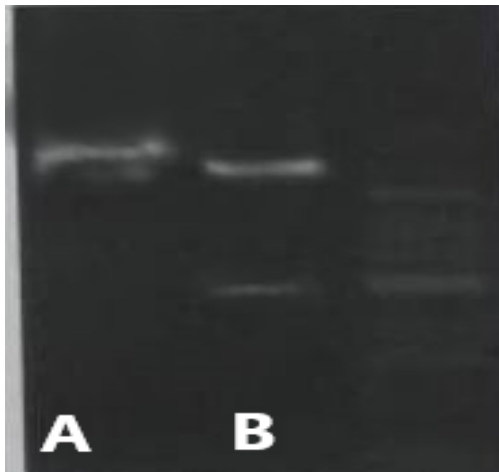
از ناقل استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی و تأیید شد.



شکل ۲. استخراج پلاسمید pET15b هر سه چاهک مربوط به ناقل pET15b استخراج شده است

پس از هضم آنزیمی ژن انتروکیناز، الکتروفورز انجام شد و نتیجه آن نشان داد که ژن انتروکیناز در وکتور بیانی کلون شده است.

### هضم آنزیمی



شکل ۳. الکتروفورز هضم آنزیمی. A. ژن انتروکیناز. B. ژن انتروکیناز کلون شده.

آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی دار نبود؛ مدل بر اساس پارامترهای مختلف برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده توانسته است که تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح دهد، لذا این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه تعیین شده برای متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. نمودارهای سه‌بعدی سطحی و کانتور<sup>۲</sup> برای متغیرها ترسیم شده است. هر شکل اثرات دو متغیر را روی پاسخ نمایش می‌دهند، که در هر نمودار متغیر سوم در میزان بهینه‌اش ثابت نگه‌داشته شده است.

### انتخاب بهترین OD

در این مرحله یکی از متغیرهای مستقل بیان آنزیم انتروکیناز در سه OD مختلف (۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸) با طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد که از روش سطح پاسخ

### بهینه‌سازی فرآیند بیان ژن انتروکیناز و انتخاب بهترین Host Cell

تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیان‌گر پاسخ، با ضرایب مشخص است.  $R^2=0/9653$  مؤید این است که مدل رگرسیون، واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۶/۵۳ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد.  $R^2$  معیاری است برای این که مشخص گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است و در موارد  $R^2$  واقعی و  $R^2$  تعدیل شده<sup>۱</sup> که به ترتیب ۰/۹۶۵۳ و ۰/۹۳۴۰ به دست آمدند، بیان‌گر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بوده‌اند. هم‌چنین مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود ( $P>0/05$ ). از آنجا که فرض

استفاده شد. متغیرهای مستقل مورد استفاده در مرحله اول شامل میزان OD (۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG (۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میلی مولار) و نوع سویه باکتری (ShuffleT7, BL21, NICO21). نقطه مرکزی دارای شرایط میزان OD برابر با ۱/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG ۰/۷۱ میلی مولار و نوع سویه باکتری ShuffleT7 بود.

### بهینه سازی مرحله دوم انتروکیناز

#### انتخاب بهترین محیط کشت

فاکتورهای زیادی بر شرایط تخمیر مؤثر هستند که می توانند بر رشد باکتری ها اثر بگذارند، یکی از آنها نوع محیط کشت مورد استفاده است. که ما در این مرحله از محیط کشت های M9<sup>۵</sup>، TB<sup>۴</sup>، LB<sup>۳</sup> که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده نمودیم و با توجه به شکل ۱ (د) می توان بیان کرد که تغییرات محیط کشت به طور معنی داری بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز تأثیر داشته است.  $P < 0.05$  با توجه به شکل همان گونه که مشخص است، میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم راستا با تغییر محیط کشت روند افزایشی داشته و نمونه های حاوی محیط کشت LB از سبب بیان بیشترین میزان آنزیم انتروکیناز شده هم چنین کمترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز در محیط کشت M9 بوده است.

#### انتخاب بهترین غلظت لاکتوز

در این مرحله یکی از متغیرهای مستقل بیان آنزیم انتروکیناز در سه غلظت لاکتوز مختلف (۰، ۲/۵ و ۵ میلی مولار) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (ه) می توان بیان کرد که تغییرات غلظت لاکتوز به طور معنی داری بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز تأثیر داشته است.  $P < 0.05$  با توجه به شکل همان گونه که مشخص است، میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم راستا با تغییر غلظت لاکتوز روند افزایشی کمی داشته و نمونه های حاوی غلظت لاکتوز ۲/۵ میلی مولار سبب بیان بیشترین میزان آنزیم انتروکیناز شده هم چنین کمترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز در نبود لاکتوز بوده است.

RSM<sup>۱</sup> در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD<sup>۲</sup>) برای پیش بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (الف) می توان بیان کرد که تغییرات غلظت میکروارگانیسم به طور معنی داری بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز تأثیر داشته است ( $P > 0.05$ ). با توجه به شکل همان گونه که مشخص است، میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم راستا با افزایش غلظت میکروارگانیسم روند افزایشی داشته و نمونه های حاوی غلظت ۱/۸ از میکروارگانیسم سبب بیان بیشترین میزان آنزیم انتروکیناز شده هم چنین کمترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز در نمونه های حاوی غلظت ۰/۶ میکروارگانیسم بوده است.

#### انتخاب بهترین غلظت القا کننده (IPTG)

در این مرحله یکی دیگر از متغیرهای مستقل بیان آنزیم انتروکیناز در سه غلظت IPTG مختلف (۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میلی مولار) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (ب) بهترین غلظت IPTG برای بیان آنزیم انتروکیناز برابر با ۰/۷۱ میلی مولار است که این ناحیه با توجه به سطح زیر منحنی پروتئین به دست آمد.

#### انتخاب بهترین سویه

در این مرحله متغیر مستقل سوم بیان آنزیم انتروکیناز در سه سویه مختلف (ShuffleT7, BL21, NICO21) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (ج) بهترین سویه برای بیان آنزیم انتروکیناز ShuffleT7 است که این سویه با توجه به سطح زیر منحنی پروتئین به دست آمد.

### ارزیابی نقطه بهینه برای فرآیند بیان آنزیم انتروکیناز در مرحله اول بهینه سازی

پس از انجام آزمون های اولیه محدوده مناسبه متغیرهای مستقل تولید آنزیم انتروکیناز شامل (میزان OD، غلظت IPTG و نوع سویه باکتری) از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی برای پیش بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید آنزیم انتروکیناز استفاده شد (شکل ۲). در بهینه سازی تولید آنزیم انتروکیناز از ۱۷ تیمار بر اساس طرح مرکب مرکزی، شامل ۳ تکرار در نقطه مرکزی

<sup>3</sup> Lysogeny broth

<sup>4</sup> Terrific Broth

<sup>1</sup> Response Surface Methodology

## انتخاب بهترین دمای القاء

در این مرحله یکی از متغیرهای مستقل بیان آنزیم انتروکیناز در سه دمای مختلف (۱۸، ۲۵ و ۳۲ سانتی-گراد) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (و) می‌توان بیان کرد که تغییرات دما به‌طور معنی‌داری بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز تأثیر داشته است.  $P < 0.05$  با توجه به شکل همان‌گونه که مشخص است، میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم‌راستا با تغییر دما روند افزایشی داشته و نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد سبب بیان بیش‌ترین میزان آنزیم انتروکیناز شده هم‌چنین کم‌ترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد بوده است.

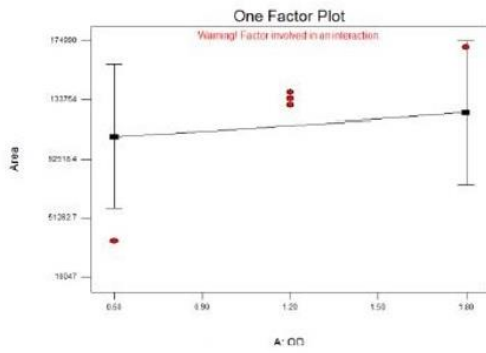
## ارزیابی نقطه بهینه برای فرآیند بیان آنزیم

## انتروکیناز در مرحله دوم بهینه‌سازی

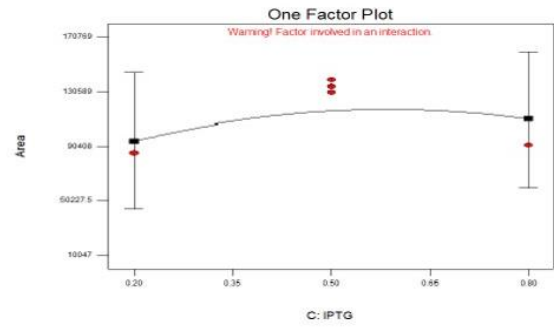
پس از انجام آزمون‌های اولیه محدوده مناسبه متغیرهای مستقل تولید آنزیم انتروکیناز شامل ( نوع محیط کشت، غلظت لاکتوز و دمای القاء) از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید آنزیم انتروکیناز استفاده شد. در بهینه‌سازی تولید آنزیم انتروکیناز از ۱۷ تیمار بر اساس طرح مرکب مرکزی، شامل ۳ تکرار در نقطه مرکزی استفاده شد. متغیرهای مستقل مورد استفاده در مرحله اول شامل نوع محیط کشت (LB, TB, M9)، غلظت لاکتوز (۰، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار) و دمای القاء (۱۸، ۲۵ و ۳۲ سانتی‌گراد). نقطه مرکزی دارای شرایط محیط کشت LB، غلظت لاکتوز ۲/۵ میلی‌مولار و دمای القاء ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. هم‌چنین پاسخ اندازه‌گیری شده شامل غلظت آنزیم انتروکیناز با استفاده از سطح زیر منحنی پیک نمودار کروماتوگرام کروماتوگرافی مایع با فشار بالا بود. در روش سطح پاسخ برای هر پاسخی مدلی تعریف می‌شود که اثر مستقل و متقابل متغیرها را بر روی هر پاسخ بررسی می‌کند. تجزیه واریانس برای ارزیابی اثرات معنی‌دار متغیرهای فرآیند بر روی پاسخ انجام شد. با انجام تجزیه و تحلیل ضریب هم‌بستگی ( $R^2$ ) چند متغیره، مدل‌های مختلف بر اساس  $R^2$  واقعی و  $R^2$  پیش‌بینی شده مقایسه شد. در نهایت تیمار بهینه با توجه به نتایج پیش‌بینی می‌شود (شکل ۳).

## بحث

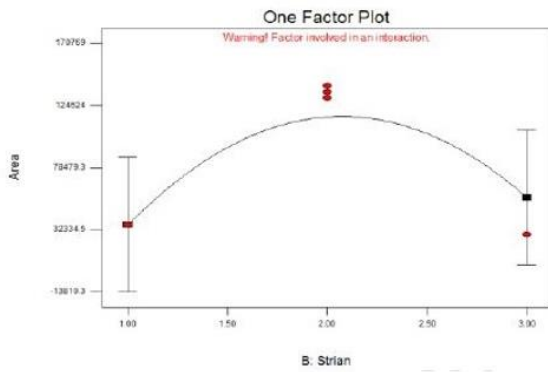
پزشکی به سمت دوران جدیدی در حرکت است که در آن روش‌هایی برای مدیریت بیماری‌ها در سطح اطلاعات ژنتیکی و پروتئینی که همگی بیولوژی هستند، ایجاد شده است و پروتئین‌های دارویی نقش مهمی در درمان‌های نوین پزشکی مولکولی دارند. در حال حاضر، پروتئین‌های انسانی نوترکیب، بخش قابل توجهی از داروهای بیوتکنولوژی تأیید شده توسط FDA را تشکیل می‌دهند. اگرچه دستکاری در سیستم‌های بیان باکتریایی به نسبت آسان و ساده است، اما ایجاد روش‌های مؤثر برای بهبود حلالیت پروتئین‌ها، مانعی است که باید برطرف شود (۲۱). در سال ۲۰۱۷ درویشی به تکثیر، کلون‌سازی و بررسی بیان زنجیره سبک انتروکیناز گاوی در اشیریشیاکلای پرداخت. اما در این مطالعه ما به کلونینگ و بهینه‌سازی شرایط بیان ژن، در سوبه‌های گوناگون باکتری *Escherichia coli* پرداختیم. از دلایل انتخاب این سیستم بیانی پروکاریوتی، قیمت پایین، بهره‌وری و سرعت بالاست که مناسب‌ترین گزینه برای بیان پروتئین‌های نوترکیب است و در این بین اشیریشیاکلای بهترین گزینه است (۲۲، ۲۳). نقطه حائز اهمیت در این مطالعه این است که پروتئین زنجیره سبک انتروکیناز انسانی دارای فعالیت بیولوژیکی بالاتری نسبت به مشابه گاوی است (۲۴). در سال ۲۰۱۵ نصیبی مطالعه‌ای بر روی تولید پروتئین نوترکیب HFBI در باکتری *E. coli* سویه Shuffle T7 انجام داد و به این نتیجه دست یافت که کاهش دما (از ۳۷ به ۲۲ درجه سانتی‌گراد)، میزان بیان پروتئین نوترکیب را افزایش می‌دهد، ایشان دلیل افزایش بیان پروتئین نوترکیب را کاهش نرخ رشد باکتری و افزایش انرژی باکتری برای تولید بیش‌تر می‌دانست (۲۵) در این پژوهش بهینه‌سازی دما با استفاده از روش RSM صورت گرفت که دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بهترین دما برای بالاترین مقدار تولید پروتئین نوترکیب به دست آمد. کاهش دمای القاء منجر به کاهش میزان سنتز پروتئین خواهد شد، چون سنتز پروتئین با سرعت بالا می‌تواند برای تا شدن و حلالیت پروتئین مضر باشد (۲۶). Abdollahzadeh و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ای برای بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز از روش آماری RSM استفاده نمودند و آن‌ها به این نتیجه رسیدند که استفاده از این روش، برای بهینه‌سازی تولید آنزیم مؤثر بوده و تولید آنزیم را کمابیش ۱۲ برابر افزایش داد (۲۷)، ما نیز در این مطالعه از روش RSM که رابطه بین یک یا چند متغیر پاسخ را با چندین متغیر مستقل (مورد مطالعه) تعیین می‌کند (۲۸)، استفاده کردیم که منجر به صرفه‌جویی در وقت و افزایش کارایی بیان شد. (این روش ۸۴



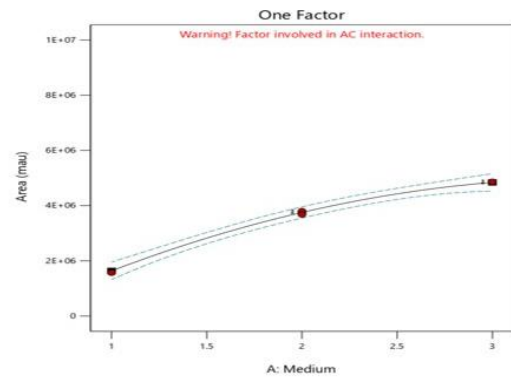
(الف)



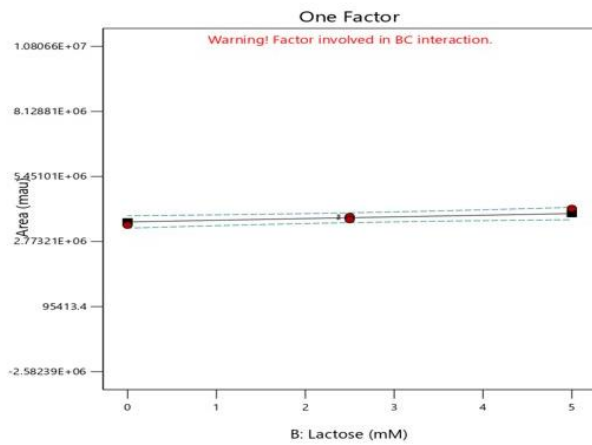
(ب)



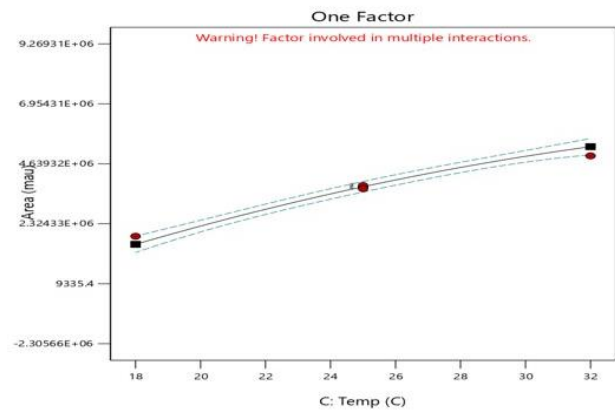
(ج)



(د)



(ه)



(و)

شکل ۴. نمودار تأثیر فاکتورهای مختلف بیان آنزیم نسبت به سطح زیر منحنی پروتئین (الف) دانسیته نوری (OD)

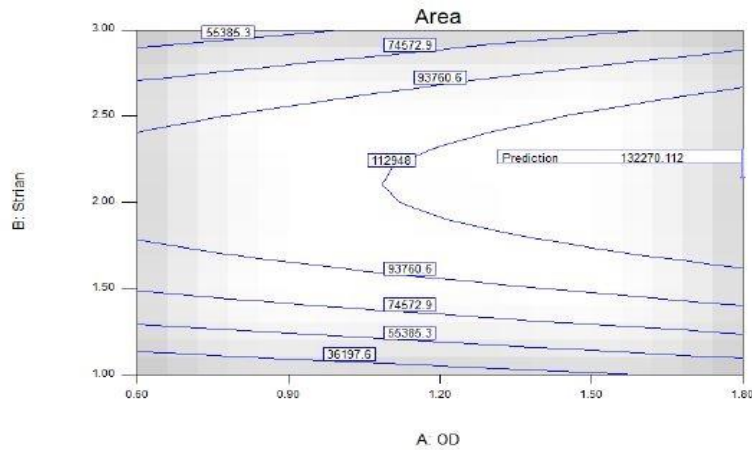
(ب) غلظت IPTG

(ج) سویه

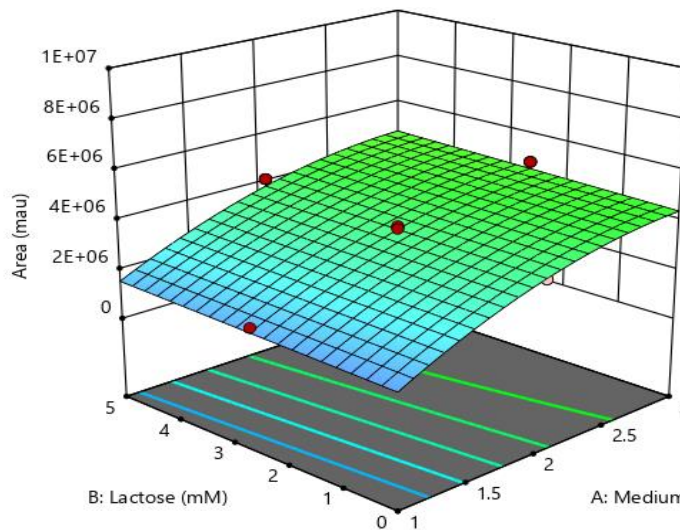
(د) محیط کشت

(ه) غلظت لاکتوز

(و) دما



شکل ۵. بهینه‌سازی بیان آنزیم انتروکیناز با تأثیرات OD برابر ۱/۸، غلظت IPTG برابر ۰/۷۱ میلی‌مولار، سویه باکتری ShuffleT7



شکل ۶. بهینه‌سازی تیمارهای مرحله دوم (سطح سه بعدی). با توجه به Area های به دست آمده بهترین غلظت لاکتوز و بهترین محیط کشت انتخاب گردید.

محیط را فراهم می‌کند. گام بعدی بهینه‌سازی چند متغیره آماری هست که برای شناسایی سطوح بهینه تمام فاکتورهای فرآیندی انتخابی ارجح خواهد بود. در طولانی مدت می‌توان با تجربیات به دست آمده از گام‌های دوم و سوم، ابزارهای محاسباتی مناسب طراحی و اجرا نمود. چنین سیستم پیشرفته‌ای قادر به پیش‌بینی عملکرد پروتئین در اشیریشیاکلاهی نوترکیب بوده و آزمایش‌های آزمایشگاهی را بیش‌تر کاهش خواهد داد (۲۹). Hui و همکاران در سال ۲۰۲۱ طبق مطالعه‌هایی که بر روی پیش‌بینی بیان پروتئین‌های ترش‌چی در باکتری‌های گرم منفی انجام دادند به این نتیجه دست یافتند که تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی در *E. coli* در موقعیت‌های غیرسیستوپلاسمی یعنی پری‌پلاسم انجام می‌شود. در پری-

نمونه را به ۱۷ نمونه مورد بررسی کاهش داد). Packiam و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب در اشیریشیاکلاهی با استفاده از رویکردهای محاسباتی و تجربی پرداختند. آن‌ها معتقد بودند که کاربرد همه روش‌های بهینه‌سازی به ترتیب برای همه فاکتورهای حیاتی در سطح بیان و فرآیند می‌تواند منجر به بازده بالای پروتئین نوترکیب شود. اولین گام در تولید پروتئین‌های نوترکیب در اشیریشیاکلاهی، استفاده از ابزارهای محاسباتی مناسب برای تولید مدلی با استفاده از ویژگی‌های تأثیرگذار است که بهینه‌سازی عوامل مبتنی بر ژن و پروتئین را تسهیل می‌کند. گام بعدی استفاده از بهینه‌سازی یک فاکتور در یک زمان و انتخاب براساس دانش روز است، که امکان انتخاب بهینه میزبان، ناقل و

پلاسم *E. coli* دی سولفیدی اکسیدوردوکتازها و ایزومرازاها قرار گرفته اند که تشکیل پیوندهای دی سولفیدی را کاتالیز می کند و تجمع پروتئین های دارای تاخوردگی صحیح را امکان پذیر می کند، از این رو ایجاد پروتئین محلول، پری-پلاسم را به قسمت ایده آلی برای بیان پروتئین های درمانی خاص تبدیل نموده است (۳۰). اما با توجه به این که بیان پروتئین در پری پلاسم *E. coli* بسیار اکسید کننده است، ما برای کسب پروتئین دارای پیوند دی سولفیدی مطلوب (انتروکیناز) و در نتیجه تاخوردگی صحیح، استفاده از بیان سیتوپلاسمی را در سویه Shuffle T7 انتخاب نمودیم. سویه Shuffle T7 به علت تشکیل پیوندهای دی سولفیدی و اختصاصی بودن RNA پلی مراز فاز T7 به کار رفته در سیستم بیانی pET برای توالی پروموتری مربوط به خود، برای بیان سیتوپلاسمی پروتئین نو ترکیب در اشرشیاکلی حائز اهمیت است، از دیگر مزایای این سویه، اصلاح پیوندهای نادرست اکسید شده است (۳۴-۳۱). Abtahi و Molace در سال ۲۰۱۱ به بررسی بهینه سازی تولید آنزیم استریپتوکیناز نو ترکیب در باکتری اشریشیاکلاهی پرداختند. آن ها دریافتند تغییر شرایط محیط کشت می تواند باعث افزایش میزان تولید پروتئین های نو ترکیب در باکتری میزبان گردد. وجود برخی عوامل غذایی از جمله گلوکز به تنهایی باعث افزایش محصول نمی شود بلکه امکان دارد کاهش محصول را نیز در پی داشته باشد (۳۵) در این مطالعه میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم راستا با تغییر محیط کشت (M9, TB, LB) روند افزایشی داشته و نمونه های حاوی محیط کشت LB و M9 به ترتیب بیشترین و کمترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز را نشان داد، در ادامه در مرحله القاء علاوه بر IPTG از لاکتوز هم استفاده نمودیم که پایین ترین غلظت لاکتوز (۲/۵ میلی مولار) سبب بیشترین بیان پروتئین نو ترکیب گردید. Babakan و همکاران در سال ۲۰۱۹ با بررسی بهینه سازی بیان و تخلیص آنزیم گلوکات اندوپیتیداز از باکتری هالوترمولرانت، به صورت پری-پلاسمی در غلظت های ۰/۴، ۱ و ۲ میلی مولار القاگر، بهینه سازی نمودند، آن ها دریافتند که بهترین نتیجه برای بیان پری پلاسمیک پروتئین نو ترکیب با غلظت ۲ میلی-مولار IPTG است (۳۶). از جمله متغیرهای این پژوهش، بیان آنزیم انتروکیناز در سه غلظت IPTG (۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میلی مولار) به روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی بود که غلظت ۰/۷۱ میلی مولار IPTG بهترین غلظت برای بیان آنزیم انتروکیناز انتخاب گردید. از آنجا که تولید انبوه انتروکیناز محلول در باکتری ها هنوز یک چالش حل نشده است، ما در این پژوهش فقط بیان آنزیم

انتروکیناز انسانی را بهینه سازی نمودیم، برای تولید انبوه این آنزیم باید بهینه سازی تخلیص آن نیز مورد بررسی قرار گیرد. هم اکنون آنزیم انتروکیناز تجاری در هر دو میزبان باکتریایی (شرکت Gen Script) و یوکاریوتی (شرکت Sigma) تولید و به بازار عرضه می شود.

## نتیجه گیری

در این تحقیق کلونینگ و بهینه سازی شرایط بیان ژن آنزیم انتروکیناز انسانی در سویه های SHuffle T7، BL21 و NICO21 باکتری *Escherichia coli* صورت گرفت، که بیان بهتر ژن آنزیم انتروکیناز در سویه SHuffle T7 با نقطه مرکزی دارای شرایط میزان OD برابر با ۱/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر و غلظت IPTG ۰/۷۱ میلی مولار همراه بود. ارزیابی نقطه بهینه برای فرآیند بیان آنزیم انتروکیناز در مرحله دوم بهینه سازی با نقطه مرکزی دارای شرایط محیط کشت LB، غلظت لاکتوز ۲/۵ میلی مولار و دمای القاء ۲۵ درجه سانتی گراد صورت پذیرفت. بیان ژن انتروکیناز در سیستم باکتریایی، سبب تسهیل در خالص سازی پروتئین با غلظت های پایین، می شود، بنابراین با استفاده از نتایج چنین تحقیقاتی، پروتئین های نو ترکیب در مقیاس وسیع و با خلوص زیاد (تولید صنعتی)، تولید خواهند شد که می تواند منجر به خودکفایی در صنعت داروسازی نو ترکیب شود.

1. Sugama, J., Y. Katayama, Y. Moritoh and M. Watanabe., 2021, Enteropeptidase inhibition improves kidney function in a rat model of diabetic kidney disease, *Diabetes, Obesity and Metabolism* 23(1): 86-96.
2. Wang, J.-H., M.-Z. Tang, X.-T. Yu, C.-M. Xu, H.-M. Yang and J.-B. Tang., 2019, Site-specific, covalent immobilization of an engineered enterokinase onto magnetic nanoparticles through transglutaminase-catalyzed bioconjugation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177: 506-511.
3. Simeonov, P., R. Berger-Hoffmann, R. Hoffmann, N. Sträter and T. Zuchner., 2011, Surface supercharged human enteropeptidase light chain shows improved solubility and refolding yield, *Protein Engineering, Design & Selection*, 24(3): 261-268.
4. Zhang, X.-h., S.-h. Tan and T.-m. Li., 2005, Characterization of Enterokinase and Its Research Advances in Genetic Engineering, *pharmaceutical biotechnology-beijing-* 12(5): 347.
5. Qin, X., 2016, Inactivation of pancreatic digestive proteases by deconjugated bilirubin from the liver: A critical mechanism for gut protection, *J Gastroenterol Pancreatol Liver Disord*, 3(4): 1-2.
6. Pepeliaev, S., J. Krahulec, Z. Černý, J. Jilková, M. Tlustá and J. Dostálová., 2011, High level expression of human enteropeptidase light chain in *Pichia pastoris*, *Journal of biotechnology* 15 (1):67-75.
7. Zurawa-Janicka, D., T. Wenta, M. Jarzab, J. Skorko-Glonek, P. Glaza, A. Geldon, J. Ciarkowski and B. Lipinska., 2017, Structural insights into the activation mechanisms of human HtrA serine proteases, *Archives of biochemistry and biophysics*, 621: 6-23.
8. Krahulec, J. and M. Šafránek ., 2021. Impact of media components from different suppliers on enterokinase productivity in *Pichia pastoris*, *BMC biotechnology*, 21(1): 1-9.
9. Nemestóthy, N., G. Megyeri, P. Bakonyi, P. Lakatos, L. Koók, M. Polakovic, L. Gubicza and K. Bélafi-Bakó., 2017, Enzyme kinetics approach to assess biocatalyst inhibition and deactivation caused by [bmim][Cl] ionic liquid during cellulose hydrolysis, *Bioresource technology*, 229: 190-195.
10. Melicherová, K., J. Krahulec, M. Šafránek ,V. Lišková, D. Hopková, D. Széliová and J. Turňa., 2017, Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*, *Applied microbiology and biotechnology*, 101(5): 1927-1934.
11. Marangoni, A. G. 2003, Enzyme kinetics: a modern approach, John Wiley & Sons.
12. Kaur, J., A. Kumar and J. Kaur., 2018. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements, *International Journal of Biological Macromolecules*, 106: 803-822.
13. Mikhailova, A. G. and L .D. Rumsh., 2000, Enteropeptidase, *Applied biochemistry and biotechnology*, 88(1): 159-174.
14. Kim, Y. S., H.-J. Lee, S.-h. Park, Y.-c. Kim and J. Ahn., 2021, Expression and purification of soluble and active human enterokinase light chain in *Escherichia coli*, *Biotechnology Reports*, 30: e00626.
15. Aghaeepoor, M., A. Akbarzadeh, F. Kobarfard, A. A. Shabani, E. Dehnavi, S. J. Aval and M. R. A. Eidgahi, 2019. Optimization and high level production of recombinant synthetic Streptokinase in *E. coli* using Response Surface Methodology. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 18(2): 961.
16. Tariq, F., M. A. U. Khan, S. Shahzad, W. B. Chaudhary, A. Arif and G. Gharib., 2018, Production of Remedial Proteins through Genetically Modified Bacteria, *Advancements in Life Sciences* 5(2): 37-45.

17. Zoued, A., Y. R. Brunet, E. Durand, M.-S. Aschtgen, L. Logger, B. Douzi, L. Journet, C. Cambillau and E. Cascales., 2014, Architecture and assembly of the Type VI secretion system, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1843(8): 1664-1673.
18. Lim, J., Destabilizing single chain major histocompatibility complex class I protein for repurposed enterokinase proteolysis, 2020, *Scientific reports*, 10(1): 1-10.
19. Odonkor, S. T. and K. K. Addo., 2018, Prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water source, *International journal of microbiology*, 45 (2): 2018-2021.
20. Melicherová, K., J. Krahulec, M. Šafránek, V. Lišková, D. Hopková, D. Széliová and J. Turňa., 2017, Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*, *Applied microbiology and biotechnology*, 101(5): 1927-1934.
21. Kwon, J., Cho, H., Kim, S., Ryu, Y. and Lee, J.J., 2021. A combination strategy of solubility enhancers for effective production of soluble and bioactive human enterokinase. *Journal of Biotechnology*, 340, pp.57-63.
22. Burnett, M.J. and Burnett, A.C., 2020. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*, 2(2), pp.121-132.
23. Bagno, F.F., Godói, L.C., Figueiredo, M.M., Sérgio, S.A.R., Moraes, T.D.F.S., Salazar, N.D.C., Kim, Y.C., Reyes-Sandoval, A. and da Fonseca, F.G., 2020. Chikungunya E2 Protein Produced in *E. coli* and HEK293-T Cells—Comparison of Their Performances in ELISA. *Viruses*, 12(9), p.939.
24. Eliot T. Smith and David A. Johnson: Human enteropeptidase light chain: Bioengineering of recombinants and kinetic investigations of structure and function. *Protein Science* 2013, 22(5):577–585.
25. Nasibi Nahid, Turkzadeh Mahani Massoud, Mortazavi Morteza. Production of recombinant HFBI protein in *E. coli*. Thesis from Kerman University. 2015.
26. Ahmad I, Nawaz N, Darwesh NM, ur Rahman S, Mustafa MZ, Khan SB, Patching SG. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 2018 Apr 1;144:12-8.
27. Abdollahzadeh, R., Pazhang, M., Najavand, S., Fallahzadeh-Mamaghani, V. and Amani-Ghadim, A.R., 2020. Screening of pectinase-producing bacteria from farmlands and optimization of enzyme production from selected strain by RSM. *Folia microbiologica*, pp.1-15.
28. Hussain, S., Khan, H., Gul, S., Steter, J.R. and Motheo, A.J., 2021. Modeling of photolytic degradation of sulfamethoxazole using boosted regression tree (BRT), artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM); energy consumption and intermediates study. *Chemosphere*, 276, p.130151.
29. Packiam KA, Ramanan RN, Ooi CW, Krishnaswamy L, Tey BT. Stepwise optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* utilizing computational and experimental approaches. *Applied microbiology and biotechnology*. 2020 Apr;104(8):3253-66.
30. Hui, X., Chen, Z., Zhang, J., Lu, M., Cai, X., Deng, Y., Hu, Y. and Wang, Y., 2021. Computational prediction of secreted proteins in gram-negative bacteria. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.
31. Shoaie M, Safarpour H, Khorashadizadeh M. Recombinant Production of Bovine Enteropeptidase Light Chain in SHuffle® T7 Express and Optimization of Induction Parameters. *The Protein Journal*. 2021 Sep 29:1-0.
32. De Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*. 2009 Dec;8(1):1-8.
33. Dawn, A. and Deep, S., 2021. An improved strategy of TGFβ3 expression in *Escherichia coli*: Exploiting folding modulators for a switch from misfolded to folded form. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, pp.787-795.

34. Ahmadzadeh, M., Farshdari, F., Nematollahi, L., Behdani, M. and Mohit, E., 2020. Anti-HER2 scFv expression in Escherichia coli SHuffle® T7 express cells: effects on solubility and biological activity. *Molecular biotechnology*, 62(1), pp.18-30.
35. Molaee N and Abtahi H. (2011). Improvement of recombinant streptokinase production in E.coli. *Arak Medical University Journal*. 14. 7 . 97 – 103.
36. Babakan., S., Safari., A., Moniri., R., Hamzeh miveh roud., M and Dastmalchi., S. (2019). Optimization of expression and purification of glutathione endopeptidase enzyme from halotermolar bacterium. *Cellular and Molecular innovation in biotechnology Journal* 344. 9. 23-30.

