



Investigation of Effective Factors on the Optimization of Surface Layer Protein Production in the *Deinococcus radiodurans* R₁ Strain using Response Surface Method

Behruz Ebadi Sharaf abad, Rassoul Khalilzadeh, Mahdi Alijanianzadeh, Maryam Abdolirad

Department of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/03/02

Accepted: 2017/06/14

Available online: 2017/08/08

Article Subject:

Nanotechnology In Medicine

IJMM 2017; 11(3): 59-70

Corresponding author:

Dr. Rassoul Khalilzadeh

Department of Bioscience and
Biotechnology, Malek Ashtar
University of Technology,
Tehran, Iran

Tel: 0982122974606

Email:

rkhilzadeh@mut.ac.ir

Abstract

Background and Aims: Due to its self-assembly properties on variety of surfaces and creating regular functional groups, surface layer protein isolated from bacteria, has significant applications in the field of nanobiotechnology such as biosensor production, targeting drug delivery systems and tissue engineering. In this research, optimization of discontinuous culture medium compositions for the production of HPI surface layer protein from *Deinococcus radiodurans* R₁ strain was performed using the response surface (RSM) method.

Materials and Methods: In 2016, culture medium for 16 designed experiments with fractional factorial analysis (FFA) was prepared and effective factors among six variables of the discontinuous culture medium was investigated for the production of surface layer proteins of *D. radiodurans* R₁. Twenty experiments were then designed for the optimization of effective variables using central composite design (CCD) method. Surface protein purity was assessed using SDS-PAGE analysis and its concentration was calculated via Bradford method.

Results: The optimized medium containing 13.36 g/L glucose, 5 g/L yeast extraction, 5 g/L tryptone, 2 g/L HEPES buffer, 0.55 MgSO₄*7H₂O, 0.0368 g/L MnCl₂*4 H₂O, was determined. Wet cellular mass was found as 16.87 g/L, which is 24% more than TGY basic medium and 74% much more than TYG culture medium including NaCl.

Conclusions: Results of the Bradford method demonstrated that the concentration of surface layer protein HPI isolated from *D. radiodurans* R₁ was 5.6 mg which was more than twice of that using 1liter of basic TGY medium.

KeyWords: *Deinococcus radiodurans* R₁, S-layer protein, Response surface methodology (RSM)

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ebadi Sharaf abad B, Khalilzadeh R, Alijanianzadeh M, Abdolirad M. Investigation of Effective Factors on the Optimization of Surface Layer Protein Production in the *Deinococcus radiodurans* R₁ Strain using Response Surface Method. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (3): 59-70



Farname Inc.

بررسی فاکتورهای مؤثر در بهینه‌سازی تولید پروتئین لایه سطحی HPI در سویه دینوکوکوس رادیودورانس R_1 با روش سطح پاسخ (RSM)

بهروز عبادی شرف‌آباد، رسول خلیل زاده، مهدی علیجانیان زاده، مریم عبدلی راد

پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: پروتئین لایه سطحی جداسازی شده از سطح باکتری‌ها، به دلیل خاصیت خودآرایی بر روی انواع سطوح و ایجاد گروه‌های عاملی منظم کاربردهای قابل‌توجهی در زمینه‌های نانو بیوتکنولوژی، مانند ساخت حسگرهای زیستی، سیستم‌های دارو رسان هوشمند و مهندسی بافت‌دارند. در این تحقیق، بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت ناپیوسته برای تولید پروتئین لایه سطحی HPI از سویه دینوکوکوس رادیودورانس R_1 با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) انجام شد.

مواد و روش کار: در سال ۱۳۹۵ شمسی، ابتدا محیط کشت برای ۱۶ آزمایش طراحی شده توسط طرح فاکتوریل جزئی (FFA) آماده شد و پس از کشت میکروارگانیسم، متغیرهای مؤثر از میان شش متغیر محیط کشت ناپیوسته برای تولید پروتئین لایه سطحی از دینوکوکوس رادیودورانس R_1 بررسی شد. سپس با استفاده از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی، ۲۰ آزمایش برای بهینه‌سازی متغیرهای مؤثر طراحی شد. خلوص پروتئین سطحی با آنالیز SDS-PAGE بررسی و غلظت آن با روش برادفورد محاسبه شد.

یافته‌ها: محیط کشت بهینه: $13/36$ g/L گلوکز، 5 g/L عصاره مخمر، 5 g/L تریپتون، 2 g/L بافر HEPES، $0/55$ g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و $0/368$ g/L $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ تعیین شد. جرم سلولی تر $16/87$ g/L به دست آمد که 24% بیشتر از محیط کشت پایه TGY و 74% بیشتر از محیط کشت TGY حاوی کلرید سدیم است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از روش برادفورد، نشان داد که غلظت پروتئین لایه سطحی HPI جداسازی شده از دینوکوکوس رادیودورانس R_1 که در یک لیتر محیط کشت بهینه رشد نموده، برابر است با: $8/6$ mg که بیش از دو برابر بیشتر از غلظت پروتئین لایه سطحی جداسازی شده از این سویه از یک لیتر محیط کشت پایه TGY است.

کلمات کلیدی: دینوکوکوس رادیودورانس R_1 ، پروتئین لایه سطحی، روش سطح پاسخ (RSM)

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۲
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۴
انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷
موضوع:

نانو بیوتکنولوژی در پزشکی

IJMM 1396; 11(3): 59-70

نویسنده مسئول:

دکتر رسول، خلیل زاده

پژوهشکده علوم و فناوری زیستی،
دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران،
ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۲۲۹۷۴۶۰۶

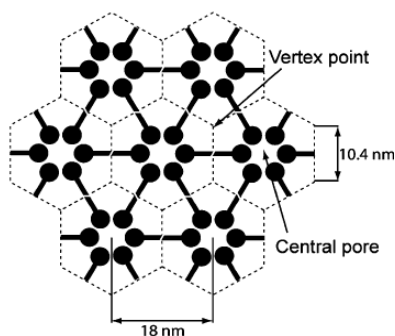
پست الکترونیک:
rkhalilzadeh@mut.ac.ir

مقدمه

نانومتر را توسعه داده‌اند (۳). پروتئین لایه سطحی، ساختارهای متخلخل متصل به دیواره سلولی یا غشاء خارجی باکتری‌ها است که از یک‌گونه پروتئین یا گلیکوپروتئین ساخته شده است. آن‌ها توانایی مجتمع شدن به شکل شبکه‌های بسته در تمامی مراحل رشد و تقسیم سلولی را دارا هستند. پس از جداسازی توانایی ذاتی برای مجتمع شدن به شکل آرایه‌های تک‌مولکولی در سوسپانسیون، در سطح مشترک هوا-مایع، بر روی فیلم‌های چربی، لیپوزوم‌ها و پایه‌های جامد (مانند پلیمرها، فلزات و

بیومیمتیک (Biomimetics) یا زیست‌تقلیدی علم تقلید از موجودات زنده برای طراحی مصالح و سازه‌های هوشمند است (۱). تولید ساختارهایی بر پایه زیست‌تقلیدی، که در آن‌ها جایگاه نانومواد در یک ساختار سه‌بعدی کنترل شده قرار گرفته‌اند، منجر به ایجاد مواد جدیدی با خصوصیات پیشرفته می‌شود (۲). یکی از این سیستم‌های خود چیدمان، پروتئین‌های کریستالی سطحی باکتریایی (پروتئین‌های لایه سطحی) هستند که رویکردهای نوین، برای ایجاد ساختارهای ابر مولکولی و ابزاری با ابعاد چند ده

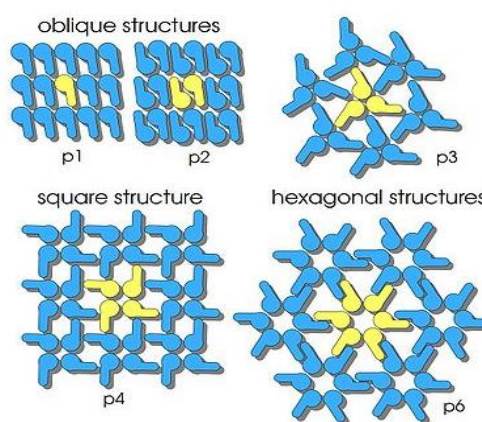
در حال حاضر، کاربردهای بالقوه آن از ساخت غشاهای اولترافیلتراسیون تا حسگرهای زیستی، کیت‌های تشخیص واکسن، ماتریس‌های جذب و سیستم‌های انتقال برای عامل دار کردن سطوح غیر آلی است. استفاده از این لایه‌ها برای خودآرایی مولکول‌های دیگر بر روی سطوح صاف، مبحثی بسیار جدید بوده که امکان ایجاد سطوح هوشمند را فراهم می‌کند (۱۱،۱۲). یکی از کاربردهای مهم این لایه‌ها، ایجاد الگویی برای ساخت لایه‌های خود آرایه از مولکول‌های دیگر زیستی است. به علت اینکه گروه‌های عاملی فعال تکرار شده‌اند، با برقراری لیگاند مولکول‌های زیستی دیگر نیز به شکل خود آرایه ایجاد می‌شوند (۱۳). یکی از سویه‌های دارای لایه سطحی دینوکوکوس رادیودورانس *R1* می‌باشد که یک ساختار منظم سرتاسر لایه خارجی با آرایش شش‌وجهی پوشانده است. این لایه که بانام (HPI) hexagonally packed intermediate شناخته می‌شود، به وسیله میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ نیروی اتمی قابل مشاهده و بررسی است. مشاهدات شکل مورفولوژیکی این لایه نشان می‌دهد که این لایه از مجموع روزنه‌هایی که به شکل شش‌وجهی هستند تشکیل شده است (شکل ۲). این لایه احتمالاً از طریق فعل‌وانفعالات آب‌گریز با سطح داخلی غشاء خارجی و تعدادی پروتئین در ارتباط است (۱۴). این واحد پروتئینی متشکل از ۹۳۱ اسید آمینه بوده و وزن آن در حدود ۹۷/۵۷ دالتون است. این لایه دارای pI در حدود ۴/۸۷ است و عمده اسیدهای آمینه تشکیل دهنده آن ترئونین (Thr) و گلیسین (Gly) است (۱۵).



شکل ۲: نمایی شماتیک از ساختار شش‌وجهی پروتئین لایه سطحی HPI (۱۴)

با توجه به ویژگی‌های خاص پروتئین لایه سطحی، شکل شش‌وجهی منافذ آن و توانایی حفظ ساختار شش‌وجهی بعد از جداسازی در محیط آزمایشگاهی، تحقیقات نوینی در زمینه کاربردی کردن این ویژگی‌ها شکل گرفته است (۱۹-۱۶). در یک مورد، Bergkvist و همکاران موفق به ایجاد سطوح نیمه‌رسانا بر

ورقه‌های سیلیکونی (رادارند (۷-۳). این ویژگی‌های بی‌همتا برای لایه‌های سطحی، کاربردهای وسیعی به‌ویژه در زمینه نانوتکنولوژی ایجاد ساختارهای بیومیمتیک فراهم می‌آورد (۸). شبکه‌های لایه سطحی می‌توانند دارای تقارن مایل، مربعی و یا شش‌گوش باشند. وابسته به نوع شبکه؛ یک واحد مورفولوژیکی شامل یک، دو، سه، چهار و یا شش زیر واحد پروتئینی می‌باشد که به صورت مرکز به مرکز بافاصله‌ای در حدود ۲/۵ تا ۳/۵ نانومتری به هم متصل هستند. اکثر لایه‌های سطحی ضخامتی در حدود ۵ نانومتر دارند و سطح خارجی آن‌ها صاف و سطح داخلی آن‌ها موجدار می‌باشد (شکل ۱) (۸،۹).



شکل ۱: تصویر شماتیک از دسته‌بندی گروه‌های شبکه لایه سطحی مطابق با تقارن دوبعدی ممکن (۹)

ویژگی‌های مهم پروتئین لایه سطحی عبارت‌اند از:

۱. تخلخل‌های موجود در شبکه پروتئین‌های لایه سطحی از نظر اندازه و ریخت‌شناسی یکسان هستند و در گستره غشاهای اولترافیلتراسیون می‌گنجند.
۲. گروه‌های عاملی موجود بر سطح و درون تخلخل‌ها از نظر مکان و جهت در موقعیت‌های مناسبی قرار گرفته‌اند و برای امر پیوند مولکول‌های عاملی به شکل بسیار دقیق در دسترس هستند.
۳. زیر واحدهای پروتئین لایه سطحی جدا شده از بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قابلیت خود چیدمانی مجدد پس از جداسازی از سطح میکروارگانیسم‌ها به شکل تک لایه‌های بسته بر روی سطوح جامد، در سطوح مشترک هوا-آب، بر روی تک لایه‌های چربی و یا روی سطوح لیپوزوم‌ها را دارند (۹،۱۰).

استفاده می‌شود، گزارش داد که بافر فسفات نه تنها از میزان رشد بالا حمایت نمی‌کند بلکه مانع رشد باکتری می‌شود. از این روی بافرهای HEPES و MOPS را برای کشت این سویه مطلوب گزارش شده است. همچنین با بررسی مواد ضد کف، ماده ضد کف KFO 673 بر اساس توانایی بالای ضد کف بودن و عدم تأثیر منفی بر رشد طبیعی باکتری، برای رشد مطلوب گزارش شده است. نتایج به دست آمده از یک طراحی آزمایش نشان داد که گلوکز، منیزیم و منگنز نقش پررنگی در افزایش میزان رشد و همچنین حجم سلول نهایی دارند و دما و pH بهینه برای انجام کشت در مقیاس بزرگ فرمنتور ۲۰ لیتری به ترتیب ۳۷ درجه سلسیوس و ۷ گزارش شد است (۲۵).

تاکنون تحقیقی باهدف بهینه‌سازی محیط کشت سویه دینوکوکوس رادیودورانس برای افزایش میزان تولید پروتئین لایه سطحی آن انجام نگرفته است. در این تحقیق برای کاربردی کردن خصوصیات پروتئین لایه سطحی HPI، برای اولین گام، بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت ناپیوسته برای تولید پروتئین لایه سطحی HPI از سویه دینوکوکوس رادیودورانس RI با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) انجام شد.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت

سویه دینوکوکوس رادیودورانس RI از کلکسیون میکروبی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. محیط پیش کشت شامل مواد زیر است: ۱۰ g/L: گلوکز، ۵ g/L: عصاره مخمر، ۱۰ g/L: تریپتون. محیط کشت تخمیر نیز بعد از بهینه‌سازی حاوی: ۱۳/۳۶ g/L: گلوکز، ۵ g/L: عصاره مخمر، ۵ g/L: تریپتون، ۲ g/L: بافر HEPES، ۵۵ g/L: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و ۳۶۸ g/L: $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ تعیین شد. به منظور تنظیم pH = ۷ محیط‌ها، از اسید کلریدریک نیم نرمال و سود یک نرمال استفاده شد و سپس محیط‌ها را برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس در اتوکلاو مدل RT2 شرکت ریحان طب ساخت کشور ایران استریل شدند. با توجه به تحقیقات قبلی، برای دست‌یابی به میزان رشد بالا، باکتری در دمای: ۳۵ °C، pH = ۷، دور همزن ۲۰۰ rpm کشت داده شد (۲۵). میزان رشد سلول‌ها از طریق اندازه‌گیری جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل ۶۳۱۰ شرکت Jenway ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری شد.

پایه شکل شش‌وجهی پروتئین لایه سطحی HPI از جنس ذرات طلا شدند که قابلیت استفاده در ساخت دستگاه‌های نوین برای ضبط اطلاعات را دارا می‌باشند (۱۷). در تحقیق دیگر، با استفاده از پروتئین لایه سطحی HPI، موفق به کریستالوگرافی جذب نانو ذرات طلا و ساخت نانوسیم (Nanowires) نیمه‌رسانا شدند (۲۰). نانوسیم‌های نیمه‌هادی بیشترین کاربرد را در عرصه پزشکی مانند تشخیص نشانه‌های سرطان، رشد سلول‌های بنیادی و غیره را دارا هستند (۲۱). یکی از راه‌های ساخت نانوسیم‌های نیمه‌هادی، سنتز آن‌ها به کمک الگوی زیستی پروتئین‌های لایه سطحی است، این الگوها حاوی حفرات استوانه‌ای بسیار ریز در میان ماده زمینه هستند و فضاهای خالی با ماده مورد نظر پر می‌شود که مورفولوژی حفره را به خود می‌گیرد و نانوسیم تشکیل می‌شود (۲۲، ۲۳).

در مطالعات انجام‌گرفته، با بهینه‌سازی محیط کشت غنی معین بافر شده با Morpholine propanesulfonic acid (MOPS)، به منظور رشد سریع باکتری دینوکوکوس رادیودورانس RI و آنالیز ظرفیت‌های سوخت‌وساز آن، زمان دو برابر شدن این باکتری ۲/۶ ساعت در دمای بهینه ۳۵ درجه سلسیوس گزارش شده است. ثابت شده است که سویه برای رشد در این محیط کشت، نیازمند بیوتین (Biotin) و نیاسین (Niacin) است. همچنین با طراحی یک محیط کشت ساده حداقل بر پایه گلوتامین (Glutamine) و سرین (Serine)، زمان دو برابر شدن باکتری دینوکوکوس رادیودورانس RI ۴ ساعت گزارش شده است. همچنین از این محیط کشت برای بررسی سوخت‌وساز گوگرد و متیونین استفاده شد و نشان داده شد که امکان رشد این باکتری در زمانی که تنها آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن در اختیار این باکتری باشد، تنها با وجود ویتامین B₁₂ میسر می‌شود، ولی برای دست‌یابی به یک رشد منظم و چشمگیر، حداقل یک اسیدآمینه باید در دسترس باکتری باشد. مطالعات نشان داده که امکان رشد دینوکوکوس رادیودورانس RI در یک محیط کشت پایه بافر شده با MOPS، که تنها حاوی یک منبع کربن، نمک و چهار ویتامین و دو اسیدآمینه است، وجود دارد (۲۴).

در تحقیق دیگری، باهدف بهره‌گیری از خاصیت زیست‌پالایی و توانایی رشد باکتری دینوکوکوس رادیودورانس RI در زباله‌های هسته‌ای، از طریق روش یک فاکتور در یک‌زمان، اقدام به بهینه‌سازی محیط کشت پایه TGY شد. محقق با بررسی مواد بافری مرسوم که برای کشت سویه دینوکوکوس رادیودورانس

بهینه‌سازی محیط کشت

طرح فاکتوریل جزئی (FFA) برای غربالگری

طرح فاکتوریل، یکی از روش‌های طراحی تجربی است که برای شناسایی عوامل مغذی مؤثر در محیط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. از این روش می‌توان برای بررسی عوامل مؤثر و تعامل بین آن‌ها در دستیابی به یک پاسخ مطلوب استفاده کرد. زمانی که تعداد متغیرهای مستقل شش یا کمتر از شش مورد باشد، استفاده از این روش در سطح یک-چهارم، نتایج

مطلوب‌تری از روش پلاکت برمان (PBD)، ارائه می‌کند (۲۶). مطابق جدول ۱، بر اساس طرح FFA، شش عامل مغذی (گلوکز، تریپتون، عصاره مخمر، بافر HEPES، منیزیم سولفات و منگنز کلراید) هرکدام در سه سطح در نظر گرفته شد. بر این اساس تعداد ۱۶ آزمایش برای غربالگری شناسایی متغیرهای مستقل مؤثر برافزایش میزان جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌عنوان پاسخ مطلوب، انجام گرفت. مقدار متوسط مشاهدات در جدول ۲ آورده شد.

جدول ۱: اجزای محیط کشت در فاکتوریل جزئی (FFA) و سطوح آن (مقادیر برحسب g/L)

متغیرها	اجزای محیط کشت	-	صفر	+
X1	گلوکز	۵	۷/۵	۱۰
X2	عصاره مخمر	۵	۷/۵	۱۰
X3	تریپتون	۵	۷/۵	۱۰
X4	بافر HEPES	۲	۵	۸
X5	MgSO ₄ *7H ₂ O	صفر	۰/۲۵	۰/۵
X6	MnCl ₂ *4 H ₂ O	صفر	۰/۰۱	۰/۰۲

جدول ۲: آزمایش‌ها و نتایج حاصل به‌وسیله روش فاکتوریل جزئی (FFD)

شماره آزمایش	گلوکز (g/L) X1	عصاره مخمر X2 (g/L)	تریپتون X3 (g/L)	بافر HEPE X4 (g/L)	MgSO ₄ *7H ₂ O X5 (g/L)	MnCl ₂ * H ₂ O X6	جذب نوری OD ₆₀₀
۱	۵	۵	۵	۲	۰	۰	۱۲/۸۲
۲	۱۰	۵	۱۰	۲	۰	۰/۰۲	۲۹/۶۶
۳	۱۰	۱۰	۱۰	۲	۰/۵	۰	۲۳/۶۵
۴	۱۰	۵	۵	۲	۰/۵	۰	۳۰/۶۶
۵	۵	۱۰	۵	۲	۰/۵	۰/۰۲	۳۱/۱۳
۶	۵	۱۰	۱۰	۸	۰	۰	۱۳/۶۰
۷	۱۰	۵	۵	۸	۰/۵	۰/۰۲	۳۰/۱۵
۸	۵	۵	۵	۸	۰	۰/۰۲	۲۶/۰۵
۹	۱۰	۱۰	۵	۸	۰	۰/۰۲	۲۲/۹۷
۱۰	۵	۵	۱۰	۸	۰	۰	۱۹/۵۱
۱۱	۵	۵	۱۰	۸	۰/۵	۰/۰۲	۲۱/۷۴
۱۲	۱۰	۱۰	۵	۸	۰/۵	۰	۱۴/۷۷
۱۳	۵	۱۰	۱۰	۲	۰	۰/۰۲	۱۸/۲۳
۱۴	۱۰	۵	۱۰	۲	۰	۰	۱۶/۵۷
۱۵	۱۰	۱۰	۱۰	۲	۰	۰/۰۲	۲۸/۱۱
۱۶	۵	۱۰	۵	۲	۰/۵	۰	۲۲/۲۷

پاسخ (RSM) با استفاده از طرح مرکب مرکزی به‌منظور ارزیابی کمی و کیفی تأثیر متغیرهای مؤثر بر متغیر وابسته (جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر) استفاده شد. طرح مرکب مرکزی یکی از معروف‌ترین روش‌های طراحی آزمایش برای

طراحی مرکب مرکزی (Central Composite Design (CCP))

در این تحقیق پس از استفاده از روش فاکتوریل جزئی (FFA) برای شناسایی و غربالگری متغیرهای مؤثر، از روش سطح

همچنین کلیه آزمون‌های آماری در سطح معنی $P \leq 0/05$ یا همان احتمال ۹۵٪ انجام شد.

جداسازی پروتئین لایه سطحی HPI

در انتهای فاز رشد، مرحله کشت متوقف شد و سلول‌ها با سانتریفیوژ در 6000g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C جدا شدند. رسوب سلولی با آب دیونیزه دومرتبه شستشو داده شد و همانند مرحله قبل سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به آرامی جدا شده و رسوب سلولی جمع‌آوری شد. رسوب سلولی در سدیم دودسیل سولفات (SDS)، با غلظت ۵٪ معلق شدند. تعلیق سلولی به مدت ۲ ساعت در دمای 60°C در شیکر انکوباتور قرار داده شد. سپس در 6000g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی به آرامی جدا شد و با دور 20000g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب پروتئین سطحی به دست آمده در آب دیونیزه حل شد و در دمای 4°C نگهداری شد (۲۸).

آنالیز SDS-PAGE

برای بررسی خلوص پروتئین سطحی جدا شده، آنالیز SDS-PAGE با سیستم الکتروفورز شرکت BIO-RAD ساخت کشور ایالات متحده آمریکا انجام شد، به این منظور به هر یک از نمونه‌های پروتئین لایه سطحی جدا شده ۵۰ میکرولیتر بافر نمونه اضافه شد (برای شرایط یکسان‌سازی در آزمایش‌ها، مقدار بافر نمونه تغییر می‌کند) و در دمای 100°C به مدت دو دقیقه جوشانده شد، سپس نمونه‌ها در چاهک‌های ژل اکریل آمید-بیس اکریل آمید ۱۲/۵٪ بارگذاری شدند. ولتاژ دستگاه الکتروفورز بر روی ۱۱۵ ولت تنظیم شد، بعد از گذشت ۴ ساعت ژل‌ها با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شده و با محلول رنگ‌بری، رنگ‌بری شد و باندهای پروتئینی مشاهده و بررسی شدند (۲۸).

اندازه‌گیری غلظت پروتئین لایه سطحی HPI

جدا شده با روش برادفورد

برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. به این منظور ابتدا معرف برادفورد از رنگ کوماسی برلیانت بلو G250 تهیه شد. سپس برای رسم منحنی استاندارد غلظت‌های ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از پروتئین استاندارد آلبومین گاوی (BSA) تهیه شد و $20\mu\text{L}$ از عصاره پروتئینی به 1mL از محلول برادفورد اضافه شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. نمودار جذب

بهینه‌سازی و مدل‌سازی است. مزیت آن نسبت به روش‌های فاکتوریل کامل و جزئی، این است که به منظور بهینه‌سازی عوامل و تخمین سطوح پاسخ، با وجود داشتن دقت مناسب، نیازمند آزمایش‌های کمتری است (۲۷). طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ به وسیله طرح مرکب مرکزی برای سه متغیر وابسته مؤثر، هر کدام در ۵ سطح کد شده ($+\alpha$ ، $+1$ ، 0 ، -1 و $-\alpha$) در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳: متغیرها و سطوح آن‌ها برای طرح مرکب مرکزی

متغیر (g/L)	سطح گذشته متغیر				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X1: گلوکز	۶/۶۴	۸	۱۰	۱۲	۱۳/۳۶
X5: منیزیم سولفات	۰/۰۷۹	۰/۲۵	۰/۵۰	۰/۷۵	۰/۹۲
X6: منگنز کلراید	۰/۰۰۳	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۳۷

رابطه بین متغیرهای مستقل کد شده و مقادیر حقیقی آن‌ها در معادله ۱ آمده است.

$$X_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad \text{معادله ۱}$$

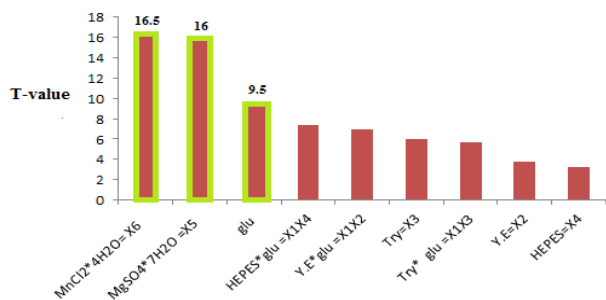
که در این معادله، X_i : مقدار کد شده، X_i : مقدار حقیقی، X_0 : مقدار حقیقی همان متغیر در نقطه مرکزی و ΔX_i : تغییر گام در مقدار متغیر است، داده‌های حاصل از آزمایش‌ها با معادله ۲ که معادله برازش چندجمله‌ای درجه ۲ است، مطابقت داده شده است.

معادله ۲ $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$ که در این معادله Y : پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 : عرض از مبدأ، β_i : ضریب خطی، β_{ii} : ضریب درجه دو، β_{ij} : ضریب برهمکنش تعاملی و $X_i X_j$: متغیرهای مستقل هستند.

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم‌افزار Minitab 17 طراحی شده و توسعه داده شده در دانشگاه ایالتی پنسلوانیا در کشور ایالات متحده آمریکا، به منظور برازش (Regression) داده‌های آزمایش‌ها، ترسیم نمودارهای سطح پاسخ و آنالیز واریانس (ANOVA) برای افزایش میزان جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر به عنوان پاسخ مطلوب، استفاده شد. همچنین به منظور ارزیابی صحت برازش و دقت پیش‌بینی مدل ارائه شده با روش پاسخ سطح، از دو پارامتر آماری: ضریب تعیین (R^2) (Determination Coefficient) و ضریب تعیین اصلاح شده (Adjusted Determination Coefficient)، استفاده شد.

آزمایش که از این تعداد ۶ آزمایش در نقطه مرکزی بود، استفاده شد. برای سه جزء دیگر که تأثیر کمتری داشتند بر اساس نتایج حاصل، به ترتیب برای عصاره مخمر، تریپتون و بافر HEPES، مقادیر ۵، ۲ و ۵ گرم بر یک لیتر محیط کشت انتخاب گردید. مقدار متوسط نتایج در جدول ۴ گزارش شد.



نمودار ۱: نمودار پرتو (pareto chart) عامل‌های مؤثر در افزایش تولید پروتئین لایه سطحی HPI

نسبت به غلظت رسم شد و سپس جذب پروتئین HPI همانند مرحله قبل به دست آمده و غلظت آن با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (۲۹).

یافته‌ها

یافته‌های حاصل از غربالگری عوامل مؤثر بر میزان

تولید پروتئین لایه سطحی HPI

طرح فاکتوریل جزئی (FFA) به منظور یافتن عوامل مغذی مؤثر در تولید پروتئین لایه سطحی HPI، از میان شش متغیر با ۱۶ آزمایش انجام گرفت و نتایج حاصل با استفاده از Pareto chart ارزیابی گردید (نمودار ۱). مطابق نمودار ۱ متغیرهای منگنز، منیزیم و گلوکز به ترتیب دارای بیشترین تأثیر بر میزان تولید پروتئین لایه سطحی HPI بودند.

به منظور ارزیابی نحوه تأثیر و تعامل سه متغیر مستقل با تأثیر بیشتر (منگنز، منیزیم و گلوکز) از طرح مرکب مرکزی با ۲۰

جدول ۴: میزان جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر (تجربی - پیش‌بینی شده) و وزن توده سلولی حاصل از طرح مرکب مرکزی

آزمایش	متغیرهای کد شده در سطوح کد شده			وزن تر توده سلولی (g/L)	مقدار جذب نوری در ۶۰۰nm	
	X1: گلوکز	X5: منیزیم سولفات	X6: منگنز کلراید		مقدار تجربی	مقدار پیش‌بینی شده
۱	+۱	-۱	+۱	۱۷/۴۷	۳۱/۱۸	۳۱/۰۷
۲	+۱	+۱	+۱	۱۸/۰۲	۳۱/۹۵	۳۲/۱۵
۳	-۱	-۱	-۱	۱۴/۴۶	۲۶/۵۱	۲۶/۲۷
۴	-۱	+۱	-۱	۱۵/۸۶	۲۸/۱۱	۲۸/۱۸
۵	-۱	+۱	+۱	۱۵/۱۴	۲۷/۰۴	۲۷/۱۴
۶	+۱/۶۸	.	.	۱۷/۲۳	۳۰/۶۳	۳۰/۶۱
۷	-۱/۶۸	.	.	۱۳/۷۸	۲۵/۵۸	۲۵/۶۷
۸	+۱	+۱	-۱	۱۶/۴۱	۲۹/۱۸	۲۹/۲۴
۹	.	.	.	۱۶/۸۱	۲۹/۳۶	۲۹/۱۵
۱۰	-۱	-۱	۱	۱۳/۱۱	۲۶/۲۴	۲۶/۱۴
۱۱	.	.	.	۱۶/۳۲	۲۹/۳۶	۲۹/۲۱
۱۲	.	.	.	۱۶/۸۹	۲۹/۳۶	۳۰/۰۱
۱۳	.	.	.	۱۵/۹۱	۲۹/۳۶	۲۹/۳۰
۱۴	.	.	.	۱۶/۶۲	۲۹/۳۶	۲۹/۲۷
۱۵	.	-۱/۶۸	.	۱۵/۱۹	۲۶/۸۴	۲۷/۱۹
۱۶	.	.	.	۱۶/۷۸	۲۹/۳۶	۲۹/۲۱
۱۷	.	+۱/۶۸	.	۱۶/۰۷	۲۸/۸۴	۲۸/۵۶
۱۸	.	.	+۱/۶۸	۱۷/۵۱	۳۰/۶۹	۳۰/۶۲
۱۹	+۱	-۱	-۱	۱۴/۹۱	۲۷/۶۱	۲۷/۴۶
۲۰	.	.	-۱/۶۸	۱۶/۴۵	۲۸/۵۸	۲۸/۷۲

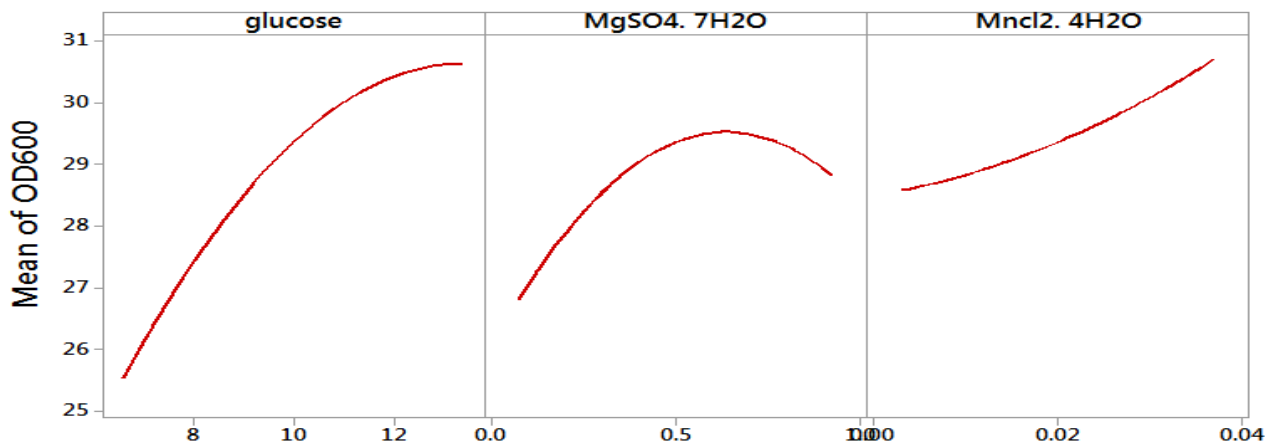
جدول ۵: آنالیز آماری برای انتخاب مدل برازش شده بر داده‌های حاصل از آزمایش‌ها

نوع مدل	انحراف معیار	ضریب تعیین (R ²)	R ² اصلاح شده	ارزش P برای ضعف برازش
خطی	۱/۴	۰/۰۶	-۰/۰۹	>۰/۰۰۰۱
۲ فاکتوریل	۱/۳۲	۰/۳۴	۰/۰۳۲	>۰/۰۰۰۱
درجه ۲	۰/۳۰۳	۰/۹۷	۰/۹۴	۰/۷۵
درجه ۳	۰/۲۹	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۰۳۳۸

معادله ۳

$$Y = 36/29 + 1.5017 X_1 + 0.5919 X_5 + 0.6265 X_6 - 0.4431 X_1 X_1 - 0.5367 X_5 X_5 + 0.960 X_1 X_6$$

میزان جذب نوری حاصل از آزمایش‌های تجربی و پیش‌بینی شده از طریق روش سطح پاسخ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، در جدول ۴ آورده شده است. مشاهدات این جدول، بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده با روش آماری است. همچنین از این مدل برای ارزیابی میزان تأثیرات خطی، تعاملی و درجه دوم متغیرهای مستقل بر متغیر وابسته استفاده شد. نحوه تأثیر سه عامل بر میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر در نمودار ۲ آورده شده است.



نمودار ۲: منحنی تأثیر سه عامل اثرگذار بر میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر

دلیل تولید پیوسته آمونیاک هم‌زمان با افزایش توده سلولی، این سویه تمایل به استفاده از منابع کربنی موجود در تریپتون و عصاره مخمر دارد و زمانی از گلوکز به عنوان منبع کربن استفاده می‌کند که منابع کربنی دیگر به اتمام رسیده باشد. گزارش‌های زیادی از وابستگی این سویه به فلز منگنز، به عنوان یک فلز انتقالی موجود است. همان‌طور که در نمودار بالا نیز مشهود است،

گزینش مدل مناسب برای برازش داده‌ها با روش سطح پاسخ

به منظور تعیین مدل تجربی برای پیش‌بینی پاسخ (جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر)، معادلات چندجمله‌ای شامل معادلات خطی، دو فاکتوریلی (تعاملی)، درجه دو و درجه سه بر داده‌های به دست آمده از روش سطح پاسخ، برازش شدند. سپس این مدل‌ها مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. لازم به ذکر است که از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون ضعف برازش (Lack of fit) آن، معنی‌دار نبوده و دارای بالاترین مقدار R² و R² اصلاح شده باشد. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، آزمون ضعف برازش مربوط به مدل چندجمله‌ای درجه دو برازش یافته بر داده‌های پاسخ سطح، معنی‌دار نیست که بیانگر برازش موفق داده‌ها می‌باشد. همچنین با توجه به مقادیر R² و R² اصلاح شده که به ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۹۴ می‌باشند، مدل چندجمله‌ای درجه دو انتخاب شد. با به کارگیری روش سطح پاسخ، معادله ۳ که نشان‌دهنده ارتباط تجربی میان مقادیر جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر و سه متغیر مستقل مؤثر (بر اساس مقادیر حقیقی) به دست آمد.

بحث

همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، افزایش میزان گلوکز به عنوان اصلی‌ترین منبع کربن برای سویه دینوکوکوس رادبودورانس RI، باعث افزایش میزان جذب نوری شده و در نتیجه جرم توده سلولی را بالا می‌برد. با بررسی متابولیت‌های تولید شده در محیط کشت در طول فرایند کشت، گزارش شده است که به

شد که گلوکز بیشترین اثر را برافزایش میزان جذب نوری می‌باشند و بعدازآن دو عامل منگنز و منیزیم دارای تأثیری تقریباً مساوی برافزایش میزان جذب نوری دارند. همچنین از بین اثرات تعاملی، تنها اثرات بین گلوکز و منگنز بر میزان جذب نوری اثرگذار است.

افزایش میزان منگنز باعث افزایش مقدار جذب نوری به‌عنوان پاسخ مطلوب، شده است. منیزیم نیز به‌عنوان یک فلز مهم و بسیار اثرگذار در بیوسنتز DNA و RNA تمام میکروارگانیسم‌ها مطرح است. نتایج نشان داد که میزان بهینه برای منیزیم تقریباً برابر است با ۰/۵ گرم در هر لیتر از محیط کشت، که با نتایج گزارش شده دیگر مطابقت دارد (۲۵). مطابق جدول ۶، مشخص

جدول ۶: نتایج آنالیز آماری مدل درجه‌دو برازش یافته بر داده‌های پاسخ

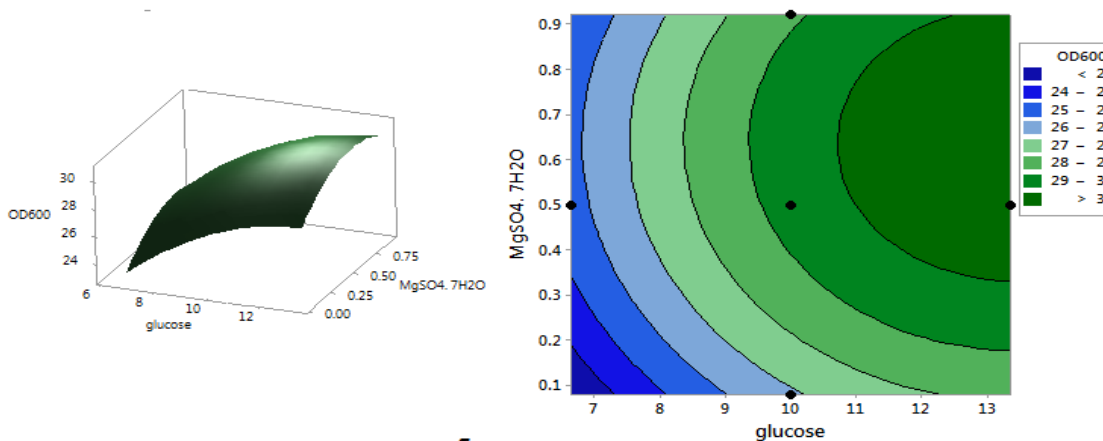
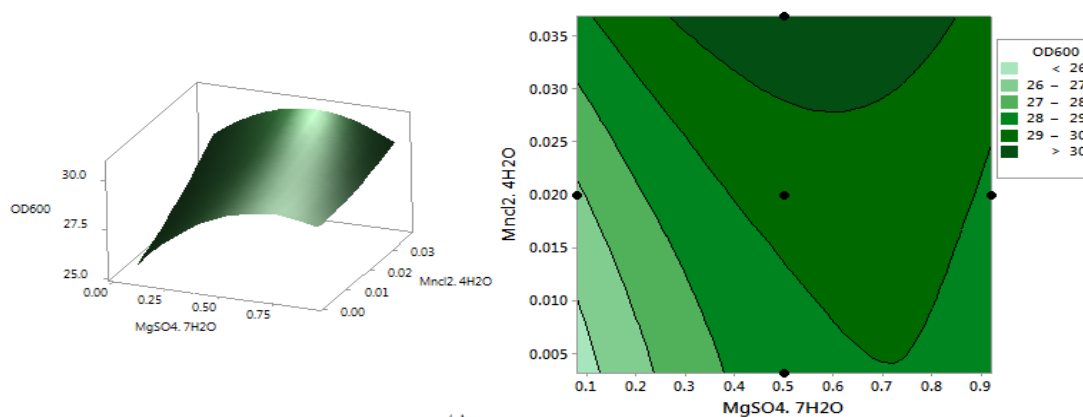
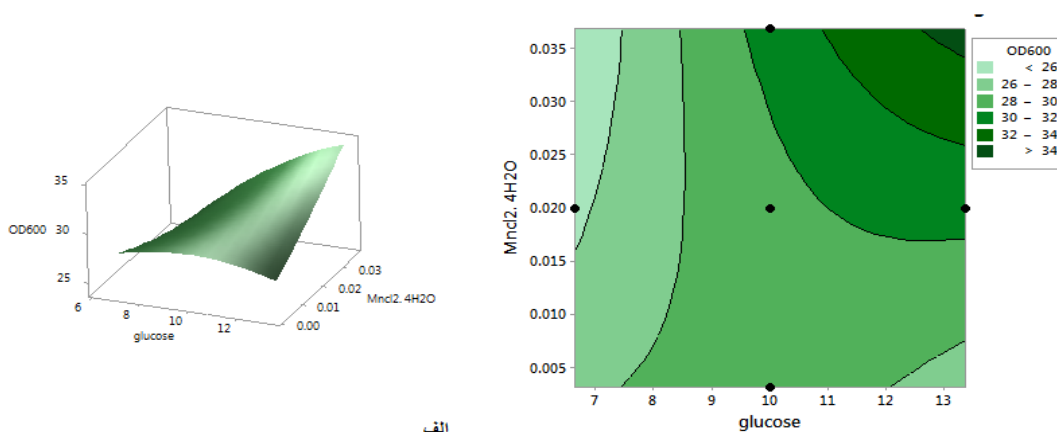
ارزش P	ارزش F	متوسط مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	منبع تغییرات
>0.0001	۶۷/۳۰	۶/۱۷	۹	۵۵/۵۱	مدل
تأثیر خطی					
>0.0001	۳۳۶	۳۰/۸۰	۱	۳۰/۸۰	X ₁ : گلوکز
>0.0001	۵۲/۲۱	۴/۷۸	۱	۴/۷۸	X ₅ : منیزیم سولفات
>0.0001	۵۸/۴۸	۵/۳۶	۱	۵/۳۶	X ₆ : منگنز کلراید
تأثیر تعاملی					
۰/۹۴۶	۰	۰/۰۰۰۵	۱	۰/۰۰۰۵	X ₁ *X ₅
>0.0001	۸۰/۴۴	۷/۳۷	۱	۷/۳۷	X ₁ *X ₆
۰/۰۸۸	۳/۵۸	۰/۳۳	۱	۰/۳۳	X ₅ *X ₆
تأثیر درجه‌دو					
>0.0001	۳۰/۸۶	۲/۸۳	۱	۲/۸۳	X ₁ *X ₁
>0.0001	۴۵/۳۰	۴/۱۵	۱	۴/۱۵	X ₅ *X ₅
۰/۲۴۸	۱/۵۱	۰/۱۴	۱	۰/۱۴	X ₆ *X ₆
		۰/۰۹۲	۱۰	۰/۹۲	باقیمانده
۰/۶۱۹	۰/۷۵	۰/۰۸	۵	۰/۳۹	عدم برازش
		۰/۱۰۵	۵	۰/۵۲	خطای خالص

ضریب تعیین (R²) = ۰/۹۷ ضریب تعیین اصلاح شده (Adjusted - R²) = ۰/۹۴

منگنز باعث افزایش میزان جذب نوری می‌شود و میزان منیزیم تا مقداری تقریباً برابر با مقدار میانه باعث افزایش میزان جذب نوری می‌شود. همچنین بیشترین جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر برای محیط کشت مورد آزمایش، توسط نرم‌افزار ۳۴/۷۰ پیش‌بینی می‌شود که در آن سطوح بهینه برای گلوکز: ۱۳/۳۶ گرم بر لیتر محیط کشت، منیزیم سولفات: ۰/۵۵ گرم بر هر لیتر محیط کشت و منگنز کلراید: ۰/۰۳۶۸ گرم در هر لیتر از محیط کشت، می‌باشد.

نمودارهای سه‌بعدی پاسخ سطح و نمودار کنتور برای سه عامل اثرگذار در نمودار ۳ آورده شده است. همچنین در بین اثرات درجه‌دو، اثرات درجه دوم منگنز اثرگذار نبوده و دو عامل گلوکز و منیزیم اثرگذار هستند.

همان‌طور که در نمودارهای کانتور تعاملی سه‌بعدی نمودار ۳ مشخص است، زمانی که میزان منیزیم در مقدار میانه ثابت فرض شود، با افزایش میزان گلوکز و منگنز، میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌عنوان پاسخ مطلوب، بالا می‌رود. زمانی که میزان گلوکز در محیط کشت ثابت فرض شود، افزایش میزان



نمودار ۳: تأثیر تعاملی متغیرهای مؤثر در میزان جذب نوری، با استفاده از نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی، نمودارهای کانتور (سمت راست) و نمودارهای تعاملی (سمت چپ).

با توجه به شکل، الگوی پروتئینی به‌دست‌آمده دارای ۴ باند مشخص در وزن‌های مولکولی ۱۰۴، ۹۱، ۸۴ و ۵۸ کیلودالتون و چهار باند ضعیف در وزن مولکولی ۱۴، ۳۱، ۴۹ و ۶۵ کیلودالتون می‌باشد، الگوی به‌دست‌آمده در این تحقیق با نتایجی که گزارش شده مطابقت دارد، با تغییر شیوه جداسازی پروتئین لایه

مقدار پروتئین لایه سطحی HPI تولیدشده توسط دینوکوکوس رادیودورانس *RI* که در محیط کشت بهینه‌شده، با محیط کشت پایه TGY رشد کرده مقایسه شد و آنالیز SDS-PAGE پروتئین لایه سطحی جداسازی شد در شکل ۳ آورده شده است.

۵ g/L عصاره مخمر، ۵ g/L تریپتون، ۲ g/L HEPES، ۰/۰۳۶۸ g/L $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ و ۰/۵۵ g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ تعیین شد. همچنین جرم سلولی تر برای حالت بهینه ۱۶/۸۷ گرم در هر لیتر محیط کشت به دست آمد که ۲۴٪ بیشتر از محیط کشت پایه TGY و ۷۴٪ بیشتر از محیط کشت TGY حاوی کلرید سدیم است. نتایج حاصل از روش برادفورد، نشان داد که غلظت پروتئین لایه سطحی HPI جدا شده از دینوکوکوس رادیودورانس R_I که در یک لیتر محیط کشت بهینه رشد نموده، برابر است با: ۵/۶mg که بیش از دو برابر بیشتر از غلظت پروتئین لایه سطحی جدا شده از این سویه است که در یک لیتر محیط کشت پایه TGY رشد کرده است.

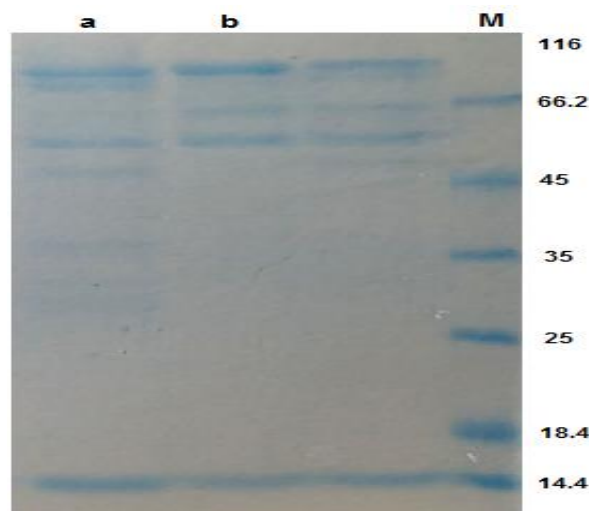
تقدیر و تشکر

از کلیه همکاران در پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر، که در طول این پژوهش با ما همکاری نمودند و یاری رسان ما در اتمام این پژوهش بودند و همچنین از مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران که ما را در تهیه میکروارگانسیم یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد

سطحی HPI، بازم این الگو تکرار می شود که می تواند ناشی از پروتئولیز پروتئین لایه سطحی HPI باشد (۳۰).



شکل ۳: آنالیز SDS-PAGE از رسوب سلولی و پروتئین سطحی جدا شده دینوکوکوس رادیودورانس R_I (M- مارکر وزن مولکولی، a- پروتئین جدا شده از محیط کشت بهینه، b- پروتئین جدا شده از محیط کشت پایه TGY)

با استفاده از روش برادفورد، غلظت پروتئین لایه سطحی HPI جدا شده از دینوکوکوس رادیودورانس R_I که در یک لیتر محیط کشت بهینه رشد نموده، ۵/۶mg و جدا شده از این سویه در یک لیتر محیط کشت پایه TGY، ۳/۳ mg تعیین شد.

نتایج نشان داد از میان شش فاکتوری که مورد غربالگری قرار گرفت، گلوکز، منیزیم و منگنز تأثیر بیشتری بر رشد سویه دارند. محیط کشت پیچیده اصلاح شده حاوی: ۱۳/۳۶ g/L گلوکز،

References

- Vincent JF, Bogatyreva OA, Bogatyrev NR, Bowyer A, Pahl AK. Biomimetics: its practice and theory. J R Soc. Interface 2006; 3(9):471-82.
- Xiao S, Liu F, Rosen AE, Hainfeld JF, Seeman NC, Musier-Forsyth K, et al. Selfassembly of metallic nanoparticle arrays by DNA scaffolding. J Nanopart Res 2002; 4(4):313-7.
- Toca-Herrera JL, Krastev R, Bosio V, Küpcü S, Pum D, Fery A, et al. Recrystallization of Bacterial S-Layers on Flat Polyelectrolyte Surfaces and Hollow Polyelectrolyte Capsules. Small 2005; 1(3):339-48.
- Pastorino L, Soumetz FC, Giacomini M, Ruggiero C. Development of a piezoelectric immunosensor for the measurement of paclitaxel. J Immunol Methods 2006; 313(1):191-8.
- Habibi N, Pastorino L, Soumetz FC, Sbrana F, Raiteri R, Ruggiero C. Nanoengineered polymeric S-layers based capsules with targeting activity. Colloids Surf., B 2011; 88(1):366-72.
- Tschiggerl H, Casey JL, Parisi K, Foley M, Sleytr UB. Display of a peptide mimotope on a crystalline bacterial cell surface layer (S-layer) lattice for diagnosis of Epstein-Barr virus infection. Bioconjugate Chem 2008; 19(4):860-5.

7. Weigert S, Sára M. Surface modification of an ultrafiltration membrane with crystalline structure and studies on interactions with selected protein molecules. *J Membr Sci* 1995; 106(1-2):147-59.
8. Habibi N, Zohrabi T. Isolation of S-Layer from *Caulobacter* and re-crystallization on planar supports. *Biological Journal Of Microorganism* 2015; 4(13).
9. Sleytr UB, Bayley H, Sára M, Breitwieser A, Küpcü S, Mader C. Applications of S-layers. *FEMS Microbiol Rev* 1997; 20(1-2):151-75.
10. Debabov VG. Bacterial and archaeal S-layers as a subject of nanobiotechnology. *Mol Biol* 2004; 38(4):482-93.
11. Nakamura H, Karube I. Current research activity in biosensors. *Anal Bioanal Chem* 2003; 377(3):446-68.
12. Lu B, Smyth MR, O'Kennedy R. Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst* 1996; 121(3):29R-32R.
13. Abdolirad M, Khalilzadeh R, Alijanianzadeh M. Isolation and Study of S-layer Nanostructure of *Deinococcus Radiodurans* R1. *Biomacromolecular Journal*, 2016; 2(2): 126-134
14. Rothfuss H, Lara JC, Schmid AK, Lidstrom ME. Involvement of the S-layer proteins Hpi and SlpA in the maintenance of cell envelope integrity in *Deinococcus radiodurans* R1. *Microbiology* 2006; 152(9):2779-87.
15. Farci D, Bowler MW, Esposito F, McSweeney S, Tramontano E, Piano D. Purification and characterization of DR_2577 (SlpA) a major S-layer protein from *Deinococcus radiodurans*. *Front Microbiol* 2015; 6:414.
16. Hall SR, Shenton W, Engelhardt H, Mann S. Site-Specific Organization of Gold Nanoparticles by Biomolecular Templating. *Chem Phys Chem* 2001; 2(3):184-6.
17. Bergkvist M, Mark SS, Yang X, Angert ER, Batt CA. Bionanofabrication of ordered nanoparticle arrays: effect of particle properties and adsorption conditions. *J Phys Chem B* 2004; 108(24):8241-8.
18. Allred DB, Sarikaya M, Baneyx F, Schwartz DT. Electrochemical nanofabrication using crystalline protein masks. *Nano Lett.* 2005; 5(4):609-13.
19. Mark SS, Bergkvist M, Yang X, Teixeira LM, Bhatnagar P, Angert ER and et al. Bionanofabrication of metallic and semiconductor nanoparticle arrays using S-layer protein lattices with different lateral spacing and geometries. *Langmuir* 2006; 22(8):3763-74.
20. Sierra-Sastre Y, Dayeh SA, Picraux ST, Batt CA. Epitaxy of Ge nanowires grown from biotemplated Au nanoparticle catalysts. *ACS nano* 2010; 4(2):1209-17.
21. Nosonovsky M, Bhushan B. Wetting of rough three-dimensional superhydrophobic surfaces. *Microsys Technol* 2006; 12(3):273-81.
22. Ohring M. *Materials science of thin films.* Academic press; 2001 Oct 20.
23. Peteu SF, Szunerits S, Vasilescu A, Knoll W. *Nanoscale Architectures for Smart Bio-Interfaces: Advances and Challenges.* Nanofabrication Intech, Yoshitake Masuda (Ed.) 2011. P. 63-98.
24. Holland AD, Rothfuss HM, Lidstrom ME. Development of a defined medium supporting rapid growth for *Deinococcus radiodurans* and analysis of metabolic capacities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 72(5):1074-82.
25. He Y. High cell density production of *Deinococcus radiodurans* under optimized conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2009; 36(4):539-46.
26. Li C, Bai J, Cai Z, Ouyang F. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *J Biotechnol.* 2002; 93(1):27-34.
27. Box GE, Wilson KB. On the experimental attainment of optimum conditions. In *Break throughs in Statistics.* Springer New York; 1992, p. 270-310.
28. Farci D, Bowler MW, Esposito F, McSweeney S, Tramontano E, Piano D. Purification and characterization of DR_2577 (SlpA) a major S-layer protein from *Deinococcus radiodurans*. *Front Microbiol.* 2015; 6:414.
29. Zeinoddini M. *Theoretical and practical guide to protein analysis methods.* 1st. Tehran: Malek Ashtar University of Technology Press. 2011. [in Persian]
30. Misra CS, Basu B, Apte SK. Surface (S)-layer proteins of *Deinococcus radiodurans* and their utility as vehicles for surface localization of functional proteins. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1848(12):3181-7.