

تولید پروتئین نوترکیب β -NGF در باکتری اشریشیا کلی با استفاده از شیر خرمای

فرشید جابری انصاری¹، زهرا حاجی حسن^{2*}، حسن جلیلی^{2*}

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران

2- استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران

* تهران، صندوق پستی 14395-1561

hajihasan@ut.ac.ir, hjalili@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/3/25 پذیرش مقاله: 94/6/3)

چکیده- تولید پروتئین‌های نوترکیب بطورمثال β -NGF با استفاده از میزبان‌های پروکاریوتی موضوع بسیاری از مطالعات چنددهه اخیر است. با وجود اینکه محیط‌های کشت باکتریایی نسبت به محیط کشت‌های مخصوص سلول‌های یوکاریوتی ارزان‌تر و مقرون به صرفه‌تر می‌باشند، اما وقتی همین محیط‌ها در مقیاس‌های صنعتی استفاده می‌شوند، هزینه گزافی را به شرکت‌های زیست فناوری تحمیل می‌کنند. لذا یافتن محیط کشتی ارزان قیمت و در دسترس که باکتری‌های نوترکیب در آن قادر به رشد و تولید پروتئین‌های نوترکیب باشند، موضوع بسیاری از تحقیقات می‌باشد. در مطالعه حاضر برای اولین بار از مخلوط شیر خرمای و عصاره مخمر به عنوان محیط کشتی ارزان قیمت استفاده شد. در بررسی RSM (Response Surface Methodology) از غلظت‌های مختلف شیر خرمای و عصاره مخمر به عنوان منابع کربن و نیتروژن مورد نیاز برای رشد باکتری‌ها استفاده شد و نشان داده شد که بالاترین میزان رشد در غلظت 20 و 5 g/lit کربن و نیتروژن می‌باشد. همچنین نشان داده شد که باکتری‌ها در این محیط علاوه بر رشد، قادر به تولید پروتئین نوترکیب (بطور مثال β -NGF) نیز می‌باشند.

کلیدواژگان: شیر خرمای، عصاره مخمر، پروتئین نوترکیب، بهینه‌سازی.

1- مقدمه

فاکتور رشد عصبی بتا (β -NGF) برای اولین بار به دلیل نقش حیاتی‌اش در رشد و بقای سلول‌های عصبی مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعات نشان داده‌اند که این فاکتور موجب شاخه‌دار شدن و همچنین طویل شدن آکسون‌ها می‌شود [1]. فاکتور رشد از خانواده نوروتروفین‌ها¹

به‌شمار می‌آید که در رشد²، تمایز³، حفظ⁴، بازتولید⁵ عملکرد انتقال عصبی⁶ سلول‌های عصبی نقش مهمی بازی می‌کند. فاکتور رشد عصبی از 3 زیر واحد آلفا، بتا و گاما تشکیل شده است. هردو زیر واحد آلفا و گامای فاکتور

2. Growth
3. Differentiation
4. Maintenance
5. Regeneration
6. Neurotransmitter function

1. Neurotrophins

می‌شود، اما در مقیاس صنعتی استفاده از چنین محیط‌هایی مقرون به صرفه نیست، چرا که هزینه تولید در مقیاس‌های صنعتی بسیار زیاد خواهد بود و به همین دلیل این مشکل یکی از مسایل موجود در برابر تغییر مقیاس از سطح آزمایشگاهی به سطح صنعتی به حساب می‌آید.

قصد این پژوهش پیدا کردن جایگزینی ارزان قیمت بجای محیط تجاری LB به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب مانند NGF می‌باشد. از آنجا که شیر خرمای یک منبع غنی از منابع قندی، عناصر مغذی و تأمین کننده نیازهای رشد میکروارگانیسم‌ها است، لذا می‌تواند انتخاب مناسبی باشد. اندازه‌گیری مواد موجود در شیر خرمای به وسیله جذب اتمی⁴ نشان می‌دهد که شیر خرمای منبع غنی از گلوکز و فروکتوز و مقداری سوکروز بوده که این کربوهیدرات‌ها به عنوان منبع انرژی برای *E. coli* محسوب می‌شوند، به علاوه شیر خرمای سرشار از عناصر مغذی فراوانی مانند روی، آهن، سدیم، منگنز، منیزیم و غیره می‌باشد. همچنین شیر خرمای دارای انواع اسیدهای آمینه است که برای رشد میکروارگانیسم‌های نوترکیب مناسب است، چرا که میکروارگانیسم‌های نوترکیب نیازهای غذایی متفاوت‌تر، پیچیده‌تر و بیشتری نسبت به میکروارگانیسم‌های طبیعی دارند و گاهی توانایی تولید برخی از متابولیت‌ها را ندارند که باید برای رشد، این مواد را به محیط کشت آنها افزود. در این تحقیق برای اولین بار از شیر خرمای به منظور کشت باکتری‌های نوترکیب استفاده شد و نشان داده شد که مخلوط شیر خرمای و عصاره مخمر محیطی ارزان قیمت و جایگزین مناسبی برای تولید فاکتور رشد عصبی نوترکیب می‌باشد.

2- مواد استفاده شده و روش کار

1-2- تهیه محیط کشت

از شیر خرمای واریته کبکاب در این تحقیق استفاده شد.

رشد عصبی عضو خانواده سرین پروتئازها هستند، در حالی که زیرواحد بتا (β NGF) مسئول تمام فعالیت‌های بیولوژیکی آن است [2]. این پروتئین جهت درمان بیماری‌های تخریب عصبی نظیر آلزایمر و بیماری‌های خودایمن مانند مالتی پل اسکلروزیس¹ مورد استفاده قرار می‌گیرد [4,3]. به علاوه دارای عملکردهای حائز اهمیت روی سلول‌های غیر عصبی نیز می‌باشد و به عنوان فاکتور بقای اتوکرونی برای لنفوسیت‌های B خاطره، التیام دهنده زخم‌ها در موش‌های سالم و مبتلا به دیابت و جراحات مربوط به قرنیه نیز بکار می‌رود [5-8].

پروتئین فاکتور رشد عصبی اولین بار از غده بزاقی موش بدست آمد. با وجود این که غدد بزاقی موش نر منبع طبیعی و غنی از فاکتور رشد عصبی بشمار می‌آیند، اما ایمنی‌زایی، هزینه بالا، زمان‌بر بودن تخلیص، استفاده از این منبع را برای اهداف درمانی به گزینه نامناسبی تبدیل کرده است. بنابر اهمیت درمانی این پروتئین، از سال 1989 تاکنون تولید β -NGF انسانی به صورت نوترکیب با استفاده از میزبان‌های مختلف ادامه یافته است [9]. در این راستا، میزبان‌های یوکاریوتی مختلفی از جمله COS، CHO²، سلول‌های حشره، مخمر ساکارومایسز سرویزیه³ مورد استفاده قرار گرفته‌اند [10-16]. سیستم‌های پروکاریوتی به‌ویژه باکتری *E. coli* به خاطر دست ورزی آسان، کشت ارزان و تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب، سیستم بیانی مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از جمله β -NGF می‌باشد [17].

کلید موفقیت در تجارت هر داروی زیستی، توانایی رسیدن به تولید در مقیاس بالا با کمترین هزینه است. امروزه برای تولید محصولات بیولوژیکی مانند پروتئین‌ها و مخصوصاً پروتئین‌های نوترکیبی مانند فاکتور رشد عصبی از محیط‌های کشت آزمایشگاهی مانند LB استفاده

1. Multiple Sclerosis

2. Chinese Hamster Ovary

3. *Saccharomyces cerevisiae*

4. Atomic absorption

درجه سانتی گراد تعدا کلنی ها شمارش شد.

4-2- بیان پروتئین نو ترکیب β -NGF انسانی در

سویه باکتریایی BL21(DE3)

میزان 1% از کشت شبانه‌ی سویه‌ی *E. coli* BL21(DE3) دارای وکتور pET39b::hNGF بطور جداگانه در محیط LB و محیط کشت تهیه شده از شیر خرم (مطابق قسمت مواد و روش‌ها) حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین در دمای 37 درجه سانتی گراد تا رسیدن به $OD_{260}^{0.5-0.7}$ در طول موج 600 نانومتر کشت داده شد. بیان در شرایط بهینه با استفاده از غلظت 1 میلی مولار IPTG (شرکت Sigma آمریکا) در دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 4 ساعت انجام شد. پس از اتمام مدت زمان بیان، سلول‌ها به مدت 15 دقیقه در 3500 rpm و دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و جمع‌آوری شدند. سپس کل محتوای پروتئینی تولید شده توسط افزودن اوره 8 مولار (شرکت Merck آلمان) استخراج گردید. به این منظور پس از افزودن اوره به رسوب سلولی، سلول‌ها توسط حمام اولتراسونیک شکسته شده و سوسپانسیون سلولی حاصل در دمای 37 درجه سانتی گراد به صورت شبانه گرما گذاری (انکوبه) شد. پس از سپری شدن مدت زمان گرما گذاری، سوسپانسیون حاصله در 13000 rpm به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی کل محتوای پروتئینی باکتری است که برای آنالیزهای بعدی نگهداری شد.

5-2- بررسی بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از روش

دات بلات

نمونه‌های پروتئینی استخراج شده روی کاغذ نیتروسولوز (شرکت Millipore آمریکا) لکه‌گذاری شدند. سپس نقاط غیر اختصاصی موجود بر روی کاغذ توسط بافر بلوکه

میزان کربوهیدرات‌های موجود با استفاده از تکنیک HPLC اندازه‌گیری شد. ستون استفاده شده Aminex HPX-87H از شرکت Bio-Rad و به ابعاد (7/8mm $\times$ 300) و دمای 55 درجه سانتی گراد بود. سرعت جریان 0/3 میلی‌لیتر در دقیقه و بافر استفاده شده استونیتریل 6%(V/V) و 0/045 نرمال H_2SO_4 بود.

غلظت‌های مختلف شیر خرم با استفاده از آب دیونیزه با غلظت‌های 20، 40، 60، 80 و 100 گرم در لیتر بر اساس قند موجود در شیر خرم (13% w/w) (منبع کربنی) تهیه گردید. به منظور رشد مناسب‌تر میکروارگانیسم‌ها غلظت‌های 2/5، 5، 7/5 و 10 گرم در لیتر عصاره مخمر¹ به عنوان منبع نیتروژن به هریک از غلظت‌ها افزوده شد و هر یک بطور جداگانه اتوکلاو شد. در مرحله بعد به منظور از بین بردن ذرات معلق موجود در شیر خرم و هموژن کردن آن، محیط کشت به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار داده شد.

2-2- سویه باکتری و وکتور pET39b(+)

سویه *E. coli* BL21(DE3) به عنوان میزبان باکتریایی و وکتور pET39b(+) به عنوان ناقل بیانی از شرکت Novagene آمریکا خریداری شدند.

3-2- بررسی رشد

به منظور بررسی میزان رشد و بهینه‌سازی محیط کشت از نقطه نظر میزان کربن و نیتروژن (RSM) از برنامه Minitab 16 استفاده شد. بررسی میزان رشد باکتری‌ها در هر یک از غلظت‌های تهیه شده (قسمت تهیه محیط کشت) با شمارش تعداد کلنی‌ها (CFU) بر روی محیط LB آگار انجام شد. بدین منظور در فواصل زمانی مختلف 1 میلی لیتر از سوسپانسیون کشت بر روی محیط LB آگار کشت داده شد و پس از 12 ساعت انکوباسیون در 37

2. Optical Density

1. Yeast extract

افزایش رشد همراه است. بیشترین میزان رشد در غلظت 5 گرم در لیتر نیتروژن و 20 گرم در لیتر کربن دیده می‌شود. از این غلظت‌ها برای تهیه محیط کشت به منظور کشت باکتری‌های ترنسفورم شده در مرحله بعدی استفاده شد. سویه باکتری BL21(DE3) که با وکتور pET39b::hNGF ترنسفورم شده است، در غلظت 20 گرم در لیتر کربن شیر خرم و 5 گرم در لیتر عصاره مخمر کشت داده شد. از کشت باکتری در محیط LB نیز به عنوان کنترل استفاده گردید. جذب تمام نمونه‌ها تا رسیدن به OD 0/5-0/7 در طول موج 600 نانومتر قرائت شد.

در مرحله بعد تمامی نمونه‌ها در شرایط کاملاً یکسان با غلظت 1 میلی‌مولار القاگر IPTG القا شده و محتوای پروتئینی هریک مطابق قسمت مواد و روش‌ها جمع‌آوری شد. به منظور اطمینان از بیان پروتئین نوترکیب NGF در نمونه‌ها از روش دات بلات با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد his-tag استفاده شد زیرا دنباله هیستیدینی در نمونه‌های پروتئینی تولیدی وجود دارد. همان‌طور که شکل 2 نشان می‌دهد ظهور لکه که نمایانگر میانکنش با آنتی‌بادی است در هر دو نمونه دیده می‌شود که حاکی از بیان پروتئین NGF است. شایان ذکر است که با مقایسه شدت رنگ لکه‌ها چنین نتیجه‌گیری می‌شود که میزان بیان در نمونه‌های کشت داده شده در محیط LB بیشتر از نمونه‌های کشت داده شده در مخلوط شیر خرم و عصاره مخمر است.

4- بحث

امروزه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از محیط کشت‌های سنتتیکی مانند LB استفاده می‌شود. ایرادی که این محیط‌های کشت دارند مربوط به هزینه بالای آنها است؛ زیرا این مواد برای مقیاس آزمایشگاهی طراحی شده‌اند و به دلیل هزینه‌های بسیار گزاف، مقرون به صرفه نیست که از آنها در مقیاس صنعتی استفاده کرد.

کننده TBS-T (Tris-HCl, NaCl, Tween20) حاوی 3% w/v ژلاتین بلوکه شدند. پس از انجام سه مرحله شستشو با بافر TBS-T، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد His-tag متصل به آنزیم ¹HRP (شرکت Sigma آمریکا) با رقت 1:1000 مورد استفاده قرار گرفت. در پایان، کاغذ با سوبسترای رنگی DAB (شرکت Biobasic کانادا) در حضور پر اکسید هیدروژن به عنوان سوبسترای آنزیم در محیط تاریک انکوبه شد.

3- نتایج

شیره خرما منبعی غنی، در دسترس و ارزان قیمت است که می‌تواند به عنوان محیطی مناسب برای کشت سویه‌های نوترکیب به کار گرفته شود. جدول 1 نتیجه آنالیز HPLC را نشان می‌دهد، همان‌طور که ملاحظه می‌شود درصد وزنی سه قند عمده در شیره خرما در این جدول لیست شده است.

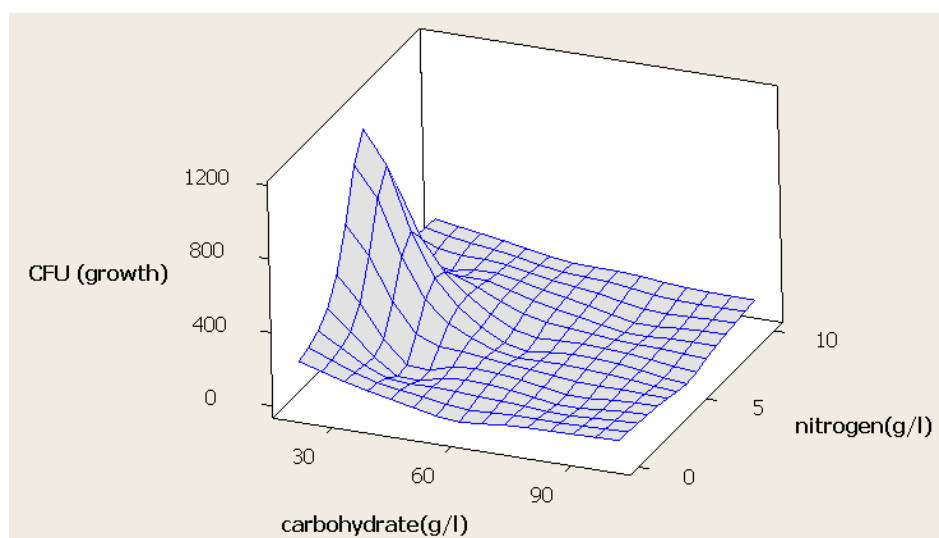
جدول 1 درصد وزنی کربوهیدرات‌های اندازه گیری شده در

شیره خرما واریته کبکاب با استفاده از HPLC	
0/5	ساکاروز (درصد وزنی)
6/11	گلوکز (درصد وزنی)
7/20	فروکتوز (درصد وزنی)

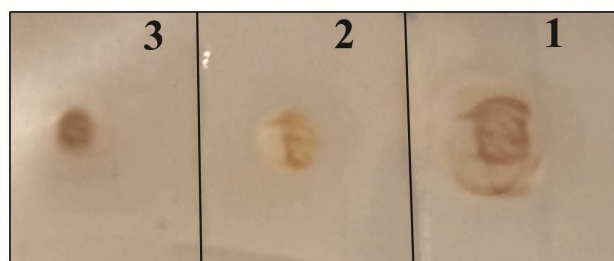
همان‌طور که در قسمت مواد و روش‌ها توضیح داده شد از شیره خرما بر اساس میزان قند، غلظت‌های مختلفی تهیه شد و غلظت‌های مختلف عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن به هریک از نمونه‌ها اضافه شد. جدول 2 و شکل 1 نتایج بررسی RSM و میزان رشد که با نرم‌افزار Minitab 16 ترسیم شده است را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش میزان غلظت کربن رشد باکتری‌ها کمتر می‌شود، اما افزایش غلظت نیتروژن با

جدول 2 نتایج بررسی رشد (CFU) با دو متغیر غلظت کربن و نیتروژن

C5	C4	C3	C2	C1	
تعداد کلنی ها (CFU)	غلظت نیتروژن (g/l)	غلظت کربوهیدرات (g/l)	ترتیب آزمایش ها	ترتیب استاندارد	
12	2/5	40	1	1	1
13	2/5	80	2	2	2
154	7/5	40	3	3	3
33	7/5	80	4	4	4
1108	5/0	20	5	5	5
0	5/0	100	6	6	6
24	0/0	60	7	7	7
123	10/0	60	8	8	8
42	5/0	60	9	9	9
33	5/0	60	10	10	10
44	5/0	60	11	11	11
36	5/0	60	12	12	12
27	5/0	60	13	13	13



شکل 1 منحنی رشد (CFU) علیه غلظت نیتروژن و کربوهیدرات (g/lit) ترسیم شده با برنامه Minitab 16



شکل 2 بررسی دات بلات با استفاده از آنتی بادی ضد His-tag. شماره های 1 الی 3 به ترتیب پروتئین های استخراج شده از باکتری های کشت داده شده در محیط LB برات، پروتئین های استخراج شده از باکتری های کشت داده شده در محیط شیر خرم و عصاره مخمر، نمونه NGF تجاری خریداری شده از شرکت سیگما

شیره خرما یک محیط مرکب است که بسیار ارزان قیمت‌تر از محیط کشت‌های سنتتیک است. امروزه در صنعت از این گونه مواد ارزان قیمت که معمولاً به عنوان مواد زائد دور ریخته می‌شوند، استفاده می‌کنند. برای مثال برای تولید 1 کیلوگرم پنیر 9 کیلوگرم آب پنیر هدر می‌رود که می‌توان از آن در تولید لوآستاتین استفاده کرد [18]؛ یا از مواد مرکب دیگر مانند روغن زیتون، آفتابگردان، کنجد، ذرت، خرما، سویا، سبوس گندم، برنج و روغن خرما نیز در تولید لوآستاتین استفاده می‌شود [19-21].

استفاده از ملاس چغندر قند در تولید اسید سیتریک و آب پنیر و ملاس در تولید اسید لاکتیک نیز از دیگر کاربردهای محیط کشت‌های مرکب است [22-24]. به تازگی از آب پنیر، پودر پنیر، ملاس چغندر و مواد زائد برای تولید اتانول در مقیاس بالا با استفاده از باکتری‌های *E.coli* مهندسی شده، استفاده شده است [25]. پروتئینی که در این تحقیق تولید نوترکیب آن در محیط کشت شیره خرما بررسی شد، پروتئین NGF می‌باشد. به دلیل کاربردهای بسیار این پروتئین در سلول درمانی و درمان بیماری‌های تحلیل عصبی مانند آلزایمر، تولید آن حائز اهمیت است [26]. شایان ذکر است که پروتئین NGF تاکنون در میزبان *E.coli* با استفاده از محیط کشت تجاری LB هم بصورت سیتوپلاسمی و هم به صورت پری پلاسمی بیان و تولید شده است [27-29]. در تمام موارد به منظور افزایش بازده از تغییر در پروموتور، بیان همزمان چاپرون‌ها، افزودن توالی‌های نشانه مختلف استفاده شده است، و تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از محیط کشتی به غیر از محیط کشت‌های تجاری وجود ندارد.

در این پژوهش همچنان که ذکر شد برای اولین بار از یک محیط کشت مرکب به علاوه عصاره مخمر، به منظور تولید یک پروتئین نوترکیب استفاده شد. این محیط کشت به خاطر ارزان قیمت بودن، امکان تولید پروتئین‌ها در

مقیاس‌های بزرگتر را نیز فراهم می‌کند. از آنجا که عصاره ی مخمر افزایش دهنده بازده بیان پروتئین است و استفاده هم‌زمان از عصاره مخمر و قند گلوکز موجب افزایش سرعت رشد می‌شود [30]، لذا به منظور تهیه محیط‌های کشت غلظت‌های مختلف عصاره مخمر به هریک اضافه شد. نتایج بررسی‌های RSM در این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت عصاره مخمر تا 5 گرم در لیتر رشد نیز افزایش نشان می‌دهد، اما با افزایش غلظت شیره خرما به عنوان منبع کربنی رشد کاهش چشمگیری دارد و غلظت 20 گرم در لیتر قند می‌تواند مناسبترین غلظت برای تهیه محیط کشت باشد. بررسی حاضر نشان داد که ترکیب شیره خرما و عصاره مخمر نه تنها به عنوان محیط کشت به منظور رشد باکتری‌های نوترکیب قابل استفاده است، بلکه افزون بر آن بیان پروتئین نوترکیب NGF نیز توسط باکتری‌های رشد داده شده در این محیط به اثبات رسید.

5- منابع

- [1] Madduri, S., Papaloizos, M., Gander, B. (2009) Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. *Neurosci. Res.* **65** (1): 88-97.
- [2] Ozer, A. B., Bayar, M. (2012) Nerve Growth Factor and Sepsis. *Intech*. Chapter 4: 105-118
- [3] Althaus, H. H. (2004) Remyelination in multiple sclerosis: a new role for neurotrophins? *Progress in brain research. Europe. PubMed. Central.* **146**: 415-432.
- [4] Heese, K., Low, J. W., Inoue, N. (2006) Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's Disease. *J. Neurosignals.* **15**: 1-12.
- [5] Torcia, M., Bracci-Laudiero, L., Lucibello, M., Nencioni, L., Labardi, D., Rubartelli, A. (1996) Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *J. Cell.* **85**: 345-356.
- [6] Muangman, P., Muffley, L. A., Anthony, J. P., Spenny, M. L., Underwood, R. A., Olerud, J. E., Gibran, N. S. (2004) Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice. *J. Wound. Repair. Regener.* **12**: 44-52.
- [7] Kawamoto, K., Matsuda, H. (2004) Nerve growth factor and wound healing. *Prog. Brain. Res.* **146**: 369-384.

- Saraphanchotiwiththaya, A. (2011) Utilisation of vegetable oils in the production of lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in submerged cultivation. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 5(2): 231–240.
- [20] Subhagar, S., Aravindan, R., Viruthagiri, T. (2009) Response surface optimization of mixed substrate solid state fermentation for the production of lovastatin by *Monascus purpureus*. *Eng. Life. Sci* 4: 303–310.
- [21] Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., Ho, Y. W., Mohamad, R., Goh, Y. M., Shokryazdan, P. (2012) Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. *J. Biomed. Biotechnol.* 11 pages
- [22] Max, B., Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A., Domínguez, J. M. (2010) Biotechnological production of citric acid. *Braz. J. Microbiol.* 41: 862–75.
- [23] Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J., Kosseva, M. (2010) Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. *Brazilian. Arch. Biol. Technol.* 53(February): 219–226.
- [24] Korawit, C., Charles, A. L., Guu, Y. K., Yen, T. B., Chiu, C. H. (2014) Optimization Lactic Acid Production from Molasses Renewable Raw Material through Response Surface Methodology with *Lactobacillus Casei* M-15. *APCBEE procedia*. 8: 194 – 198.
- [25] Akbas, M. Y., Sar, T., Ozcelik, B. (2014) Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by “Vitreoscilla hemoglobin expressing” *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 78. Issue 4.
- [26] Manni, L., Rocco, M. L., Bianchi, P., Soligo, M., Guaragna, M., Barbaro, SP., Aloe, L. (2013) Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. *Growth Factors*. 31(4): 115-122.
- [27] Kurokawa, Y., Yanagi, H., Yura, T. Overproduction of Bacterial Protein Disulfide Isomerase (DsbC) and Its Modulator (DsbD) Markedly Enhances Periplasmic Production of Human Nerve Growth Factor in *Escherichia coli*. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:14393-14399.
- [28] Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E., Rudolph, R. (2001) The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* 268:3296-3303.
- [29] Vigentini, I., Merico, A., Tutino, M.L., Compagno, C., Marino, G. (2006)
- [8] Lambiase, A., Sacchetti, M., Bonini, S. (2012) Nerve growth factor therapy for corneal disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 23: 296-302.
- [9] Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E., Rudolph, R. (2001) The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* 268: 3296-3303.
- [10] Bruce, G., Heinrich, G. (1989) Production and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor. *Neurobiol. Aging* 10: 89-94.
- [11] Iwane, M., Kitamura, Y., Kaisho, Y., Yoshimura, K., Shintani, A., Sasada, R., Kakinuma, A. (1990) Production, purification and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 116-122.
- [12] Barnett, J., Baecker, P., Routledge-Ward, C., Bursztyn-Pettegrew, H., Chow, J., Nguyen, B., Gage, F. H. (1990) Human β nerve growth factor obtained from a baculovirus expression system has potent in vitro and in vivo neurotrophic activity. *Exp. Neurol.* 110: 11-24.
- [13] Schmelzer, C.H., Burton, L.E., Chan, W.P., Martin, E., Gorman, C., Canova-Davis, E., Polastri, G. (1992) Biochemical characterization of recombinant human nerve growth factor. *J. Neurochem.* 59: 1675-1683.
- [14] Nguyen, B., Jarnagin, K., Williams, S., Chan, H., Barnett, J. (1993) Fed-batch culture of insect cells: a method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. *J. Biotechnol.* 31: 205-217.
- [15] Nishizawa, M., Ozawa, F., Higashizaki, T., Hirai, K., Hishinuma, F. (1993). Biologically active human and mouse nerve growth factors secreted by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 624-630.
- [16] Fan, B.S., Lou, J.Y. (2010) Recombinant expression of human nerve growth factor beta in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol. Biol. Rep.* 37: 4083-4090.
- [17] Khaw, O., Suntrarachun, S. (2012) Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2: 159–162
- [18] Karthika, C., Sharmila, G., Muthukumaran, C., Manikandan, K. (2013) Utilization of Whey Powder as an Alternate Carbon Source for Production of Hypocholesterolemic Drug by *Aspergillus terreus* MTCC 1281. *Journal of Science and Technology*. 22(5): 1335–1341.
- [19] Sripalakit, P., Riunkesorn, J.,

- [30] Tripathi, N. K., Sathyaseelan, K., Jana, A. M., Rao, P. V. L. (2009) High Yield Production of Heterologous Proteins with Escherichia coli. *Defence. Science. Journal.* **59**(2): 137–146.

Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J. Biotechnol.* **127**(1):141-50.