

# 以重組枯草桿菌生產海藻糖合成酶

李子謙、陳怡仲、江欣儒、林永洋、\*陳柏庭

南臺科技大學生物科技系

\*ptchen@mail.stust.edu.tw

## 摘要

枯草桿菌目前常被運用來將重組蛋白質外泌到胞外，這種優勢特性可以簡化蛋白質下游純化步驟。然枯草桿菌中使用的質體往往產生不穩定問題，且會造成細胞生理的壓力，以致難以穩定和大量分泌生產重組蛋白質。海藻糖 (Trehalose) 屬於非還原性雙糖，在自然界中廣泛的存在於生物體內，以保護生物體生存於環境壓力，如乾旱、冷凍、高溫與高鹽等。近年來，有許多研究對於海藻糖在各種生物體的功能進行探討，進而大幅提昇了海藻糖的應用性。嗜酸性古細菌 *Picrophilus torridus* DSM 9790 擁有海藻糖合成酶 trehalose synthase (PTTS)，該酵素具有高海藻糖轉化效率，極具有工業化的發展潛力。在本計畫中，我們以染色體工程技術，發展一株穩定且高效率生產重組海藻糖合成酶的枯草桿菌生產菌株，並使用 Box-Behnken 回應曲面法來將培養基進行最佳化以量產海藻糖合成酶。以 5 公升醱酵槽進行生產，海藻糖合成酶 PTTS 最大產量可達  $175.89 \pm 6.83$  mg/L。

**關鍵詞：**枯草桿菌、染色體工程、重組蛋白質生產、海藻糖合成酶

## Production of Trehalose Synthase in Recombinant *Bacillus subtilis*

Tzu-Chien Lee, Yi-Chung Chen, Xin-Ru Jiang, Yong-Yang Lin, \*Po Ting Chen

Department of Biotechnology, Southern Taiwan University of Science and Technology

### Abstract

*Bacillus subtilis* is most commonly employed for secretion of recombinant proteins, which could facilitate the downstream processing of proteins. However, plasmids used in *B. subtilis* are usually unstable and increase the metabolic burden in the cells. This makes stable and mass production of secreted recombinant proteins very difficult. Trehalose is a non-reducing disaccharide and is widespread in microorganisms in nature. This sugar confers on living cells the ability to survive in stressed environments such as desiccation, freezing, high temperature and high salt condition. Recently, many studies on biological properties of trehalose have substantially extended its application range. *Picrophilus torridus* DSM 9790, a thermoacidophilic archaea, carries trehalose synthase (PTTS) and exhibits a high activity for trehalose synthesis. Based on genomic engineering technique, a potent recombinant trehalose synthase producer strain will be constructed. Meanwhile, the response surface methodology of Box-Behnken method will be applied to optimize medium for mass-producing trehalose synthase PTTS. The highest production of trehalose synthase PTTS could reach  $175.89 \pm 6.83$  mg/L for fermentation of 5 L fermentor.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, Chromosomal Engineering, Recombinant Protein Production, Trehalose Synthase

Received: Nov. 29, 2013; accepted: May, 2014.

\*Corresponding author: P-T. Chen



## 壹、前言

海藻糖 (Trehalose) 屬於非還原性雙糖，由兩個葡萄糖 (Glucose) 分子以 $\alpha$ -1,1 鍵結而成[1]。海藻糖廣泛的存在於自然界的各種物種之中，在細菌、真菌、酵母菌、昆蟲等均發現有海藻糖存在的紀錄[1-4]。海藻糖本身性質安定，吸濕值低且處在酸的環境中不易水解。除可在生物體中做為能量儲存物質，海藻糖具有保護生物分子與細胞膜結構之功用。因此海藻糖具有保護生物體在惡劣環境中如，脫水 (dehydration)、冰凍 (freezing)、高溫 (high temperature) 與高滲透壓 (high osmotic stress)，避免生物體在這些環境下造成蛋白質或生物膜結構破壞進而失去生命[5-7]。由於海藻糖屬於非還原糖且擁有不同於一般糖類的物理與化學特性，因此應用範圍相當廣泛。目前最新海藻糖生產方式運用酵素生物轉化法來進行生產，此法相較於由生物體中進行萃取具有較佳的優勢。海藻糖酵素生物轉化法，其主要的轉化路徑大約可分成三種方式：(a) phosphorylase 系統：發現於真菌或酵母菌中[8-9]；(b) glycosyltransferase-hydrolase 系統：在適溫菌 *Arthrobacter* sp. 中發現但目前也有一些是高溫菌也具有相關系統[10-11]；(c) trehalose synthase 系統：存在於細菌 (*Pimelobacter* sp. 與 *Thermus* sp. 等) 中，該系統只需單一酵素就能將麥芽糖轉化成海藻糖[12-16]。由於海藻糖合成酶可以一個反應步驟經由轉糖苷反應將麥芽糖轉成海藻糖並具有專一性與轉化效率高之特性，加上目前麥芽糖的市場價格低廉，因此使用海藻糖合成酶來生產海藻糖深具工業化之潛力。許多相關的海藻糖合成酶基因已經被選殖出來並在大腸桿菌中可大量表現[12, 17-18]。*Picrophilus torridus* trehalose synthase (PTTS) 為一種耐熱型海藻糖合成酶選殖於 *Picrophilus torridus* DSM 9790 [12]。PTTS 是目前唯一一種可穩定存在於酸性環境下的海藻糖合成酶。此外，他也具有很高的轉化能力可將麥芽糖轉化成海藻糖且其轉化率在溫度 20-30°C 與 pH6.0 可達到 70%。

枯草桿菌為革蘭氏陽性菌，是目前最被熟知的原核生物之一，在基礎科學研究與工業酵素生產上具有相當重要的地位。枯草桿菌能分泌多種蛋白酶、澱粉酶與脂肪酶等，分解外來物質以提供生長所需養分 [19]，目前在工業上有多種菌屬被使用在蛋白酶、澱粉酶與脂肪酶之生產。枯草桿菌也可被當作基因操作與生產重組蛋白質的宿主細胞，目前已有許多的異源蛋白質基因被轉殖入枯草桿菌中進行表達 [20-22]。由於枯草桿菌具有下列特性 (1) 為 Generally Recognized as Safe (GRAS) 安全菌株，菌體本身對人體不具有致病性、(2) 對於密碼子 (codon) 沒有特殊偏好、(3) 菌株本身生長快速，培養相當容易 [23-24]，因此使用枯草桿菌來生產重組蛋白質深具潛力 [25]。

以枯草桿菌做為生產系統具有許多優點，然而作為生產重組蛋白質的宿主細胞會產生幾個主要問題：在枯草桿菌的基因操作上，目前所常用的質體很少是出自於枯草桿菌本身，再加上枯草桿菌的轉形功能效率不如大腸桿菌，因此為了基因操作上的便利，有許多研究便從事構築大腸桿菌-枯草桿菌穿梭質體 (shuttle vector) [26-28]，目前此種穿梭質體已被廣泛的使用在基礎研究上。然而在枯草桿菌中使用這類質體來選殖生產重組蛋白質，極易發生質體不穩定的狀況 [22, 29]，就工業化的生產製程而言，使用質體方式來生產重組蛋白質，仍會因為質體複製數目過量而造成細胞代謝壓力的問題，以致影響重組蛋白質的產量。因此，本研究使用染色體工程技術來建立一株可生產海藻糖合成酶 PTTS 之重組枯草桿菌並將培養基以 Box-Behnken 回應曲面法進行最佳化組成來達到量產海藻糖合成酶之目的。此法所生產之海藻糖合成酶可直接使用細胞粗萃液將麥芽糖轉化成海藻糖以運用於食品加工用途。

## 貳、實驗材料與方法

### 一、菌種與培養基

在本實驗中，所使用的相關菌種、質體與引子被列在表 1 之中。所有的重組枯草桿菌與大腸桿菌進行基因建構時均培養在含有 20 ml Luria-Bertani (LB) 液態培養基中。回應曲面法所設定之醱酵培養基關鍵成份為 yeast extract, tryptone 與 glutamate。細胞密度則使用分光光度計進行分析，波長為 600 nm (OD<sub>600</sub>)。經過徹夜的培養，菌種被轉養至新的培養基中並且初始細胞密度被調整為 0.1 (OD<sub>600</sub>)，其培養條件為轉速 150 rpm 與 30 °C。抗生素使用量為 Ampicillin (50 µg/L; 使用於大腸桿菌中)，Erythromycin (10 µg/L; 使用於枯草桿菌中) 與 Kanamycin (大腸桿菌攜帶質體時，用量為 50 µg/L 以及使用在大腸桿菌染色體重組菌株為 15 µg/L)。



表 1 本研究所使用之菌種、質體與引子

菌種 (Strain)	特性
DH5α	<i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17 supE44 thi1 recA1 lacZM15</i>
PT5	DB428, $\Delta wpr::T7gene 1$
PT5(PTTS)	PT5, $\Delta mpr::P_{T7}/PTTS$
質體(Plasmid)	特性
ploxErm-PTTS	攜帶 loxP-Erm-loxP 與 $P_{T7}/PTTS$
pEK-Cre	枯草桿菌/大腸桿菌穿梭載體, $P_{spac}/Cre$
引子(Primer)	特性
mpr01	catattcgaaaacgatcac
mpr02	catgacaagacctgtcaactctattttaaattagctggt
mpr03	cgtcgacattaatgggggatcccggttggctgtacggctac
mpr04	gtctgtttaccgatctc
T701	gtaatgaattccgatcccgcgaaattaatac
T7T01	catatggatcgcgaaaaaccctcaagacc

備註: PTTS: *P. torridus* 海藻糖合成酶基因;  $P_{T7}$ , T7 啟動子 ;  $P_{spac}$ : spac 啟動子

## 二、菌種建構

以質體 pET-23a(+)-PTTS [30]為模版,使用引子 T701 與 T7T01 分別以 PCR 方式增幅出來並以限制酶切位 *EcoRI/EcoRV* 將該基因片段轉殖入含有枯草桿菌抗 *Erm* 抗生素標記基因且抗 *Erm* 抗生素基因區域兩端帶有 loxP 辨識序列的載體 pLoxErm 中得到質體 pLoxErm-PTTS。依據文獻方法[31],將 N 端與 C 端 *mpr* 片段的大片段引子(大約 500 bp)分別使用引子 mpr01-mpr02 與 mpr03-mpr04 增幅出來,以質體 pLoxErm-PTTS 為模版,將大片段引子與模版 DNA 進行部份重疊 PCR (overlapping PCR)得到 mpr0102-T7-PTTS-T7T-lox-Erm-lox-mpr0304。隨後將該 PCR 片段以電轉型方式插入 PT5 [32]染色體中的 *mpr* 基因中,得到重組枯草桿菌 PT5(PTTS)-Erm,該菌株同時也破壞了蛋白酶 *mpr*,隨後再加可生產 Cre 重組酶的枯草桿菌/大腸桿菌穿梭輔助質體(helper plasmid) pEK-Cre 轉入進行 loxP 端點重組,將抗 *Erm* 抗生素基因剔除得到重組菌株 PT5(PTTS),其菌種建構方法如圖 1 所示。

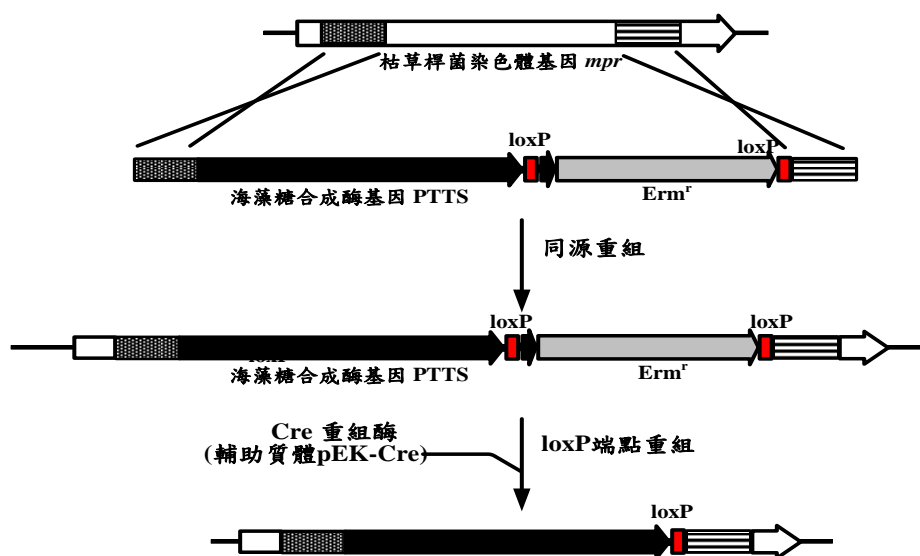


圖 1 以雙同源重組方式將海藻糖合成酶 PTTS 基因片段嵌入枯草桿菌 PT5 染色體



### 三、分析方法

菌種培養後，以低溫離心(4 °C; 9000 g)進行菌體收集，收集後菌體以 0.1M 磷酸緩衝液(pH 6.0)回溶並調整成 1 mL 緩衝液中含有菌體 20 (OD<sub>600</sub>)。經超音破震盪將菌體進行破菌動作，之後再將其進行低溫離心(4 °C; 9000 xg)，取得上清液作為細胞粗萃液(cell-free extract; CFX)。細胞粗萃液中的蛋白質濃度是使用 Braidford 蛋白質分析套組 (Genemark co.)進行分析。蛋白質樣品被定量 20 µg 後以 SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析，之後再使用 Quantity One (Bio-RAD)來進行蛋白質產量判讀。

海藻糖生物轉化是在 0.5 mL 反應環境中含有 150 mM 麥芽糖與 200 µL 細胞粗萃液在 0.1M 磷酸緩衝液(pH 6.0)下進行。反應溶液在 40°C 下進行反應一個小時後再放入 100 °C 15 分鐘來終止反應。終止後的反應液則使用高效能液相層析儀 (High performance liquid chromatography; HPLC)中進行海藻糖分析(流速 1.0 ml/min，糖類分析管柱 (SUGAR SZ5532, Shodex)，移動相為 75% acetonitrile 與 25% 二次蒸餾水)。所有的實驗皆進行三重覆實驗。

### 四、培養基之最佳化實驗設計

我們採用Box-Behnken回應曲面實驗設計法來進行各種關鍵營養成分之最佳化組合分析。一般多項式模型可由三個獨立變化量與三個水準因子得到以下方程式 (eq.1):

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{23} X_2 X_3 + \alpha_{11} X_1^2 + \alpha_{22} X_2^2 + \alpha_{33} X_3^2 \quad (1)$$

其中Y為海藻糖合成酶PTTS生產量，X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>與X<sub>3</sub>為三個獨立營養成分因子。α項為各主效果(main effect)、交互作用效果 (interaction effect)與二次效果(quadratic effect)之回歸係數(regression coefficient)。

### 參、結果與討論

#### 一、以染色體工程技術構築高穩定性重組枯草桿菌來生產海藻糖合成酶

為讓重組海藻糖合成酶PTTS可穩定的在枯草桿菌中生產，我們以染色體工程概念搭配Cre-lox系統 [33] 建構可穩定生產海藻糖合成酶的重組枯草桿菌系統來取代傳統使用質體方式。此一方法有別於一般使用質體方式，將基因鑲嵌入染色體中可使基因可隨著染色體複製過程穩定的保留在菌中，不像使用質體可能產生結構上不穩定或當抗生素或選擇壓力消失後就容易產生丟失情形 [32]。首先以雙同源重組方法將T7 啟動子調控 PTTS 基因組以電轉形方式轉殖入枯草桿菌 PT5 [32]中的 *mpr* 基因中，得到重組菌株PT5(PTTS)-Erm，隨後在輔助載體 pEK-Cre 的協助下將抗 Erm 抗生素基因剔除，得到一株"乾淨"的海藻糖生產菌株 PT5(PTTS)。為測試枯草桿菌能否生產出具有活性的PTTS，重組菌株PT5(PTTS)被培養在LB液態培養基中 14 小時來表現海藻糖合成酶PTTS。根據SDS-PAGE (圖2, Lane M: 蛋白質標誌 (marker)，Lane 1: PT5, Lane 2: PT5(PTTS))，海藻糖合成酶PTTS (分子量 66 kDa)可在重組枯草桿菌中進行生產且使用重組菌株之細胞粗萃液進行海藻糖轉化分析，經一小時反應後以HPLC進行海藻糖分析，分析結果發現重組枯草桿菌所生產之海藻糖合成酶PTTS具有轉化活性，其活性大約為 60 ± 5 U/mg，產量為 70 ± 1.79 mg/L。此外，我們也將培養 14 小時的菌液以稀釋 10<sup>6</sup> 倍將菌種塗抹在LB固態培養基上。經 14 小時的培養後，我們挑選 50 株單一菌落使用引子 T701 與 T7T01，以PCR方式來確認PT5(PTTS)上染色體中是否還保留有我們所建構入的T7-PTTS01-T7T片段，經實驗結果確認，所有菌株均擁有T7-PTTS01-T7T片段 (Data not shown)。由此，我們確認重組菌株PT5(PTTS)可穩定生產海藻糖合成酶PTTS。

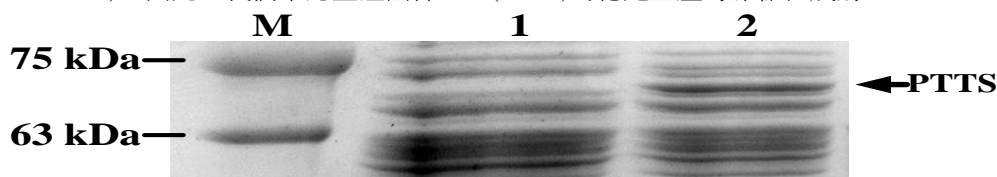


圖 2 重組枯草桿菌 PT5(PTTS)生產海藻糖合成酶 PTTS 細胞萃取液之 SDS-PAGE



## 二、培養基最佳組成

為能大量生產 PTTS，我們使用 Box-Behnken 回應曲面法來找尋最佳培養基組成。我們挑選了 yeast extract、tryptone 與 Glutamate 三種營養成分以 Box-Behnken 實驗設計法設計出 15 組培養基組合來培養重組菌株 PT5(PTTS)。如表 2 所示，每個培養基成份濃度上分別被設計高(+1)，中(0)與低(-1)三個水準因子。此 15 組培養基組成依照此三水準因子進行培養基設計，培養基成份之設計如表 3 所示。將此 15 組培養基組成進行相關菌種培養，培養時間為 14 小時，之後將菌種收集並打破細胞得到細胞上清液來分析海藻糖合成酶產量，其分析結果再帶回表 3 以統計軟體 JMP 5.1 進行因子交互作用運算與二次效果分析得到變異數分析表(the analysis of variance; ANOVA) (表 4)並依此表得到一多項方程式 (eq. 2)

$$Y = 105.77 + 3.51X_1 - 3.15X_2 - 1.78X_3 - 5.51X_1X_2 + 6.18X_1X_3 - 8.33X_2X_3 - 5.44X_1^2 - 12.77X_2^2 - 8.98X_3^2 \quad (2)$$

表 2 用於 Box-Behnken 方法中之營養因子設計基準

營養因子	營養因子設定 (Level)		
	-1	0	+1
Yeast extract ( $X_1$ )	2	3.5	5
Tryptone ( $X_2$ )	0.5	1.25	2
Glutamate( $X_3$ )	0.2	0.3	0.4

表 3 以 Box-Behnken 方法進行培養基最佳化實驗設計

實驗組別 (Trials)	$X_1$	$X_2$	$X_3$	蛋白質產量 (mg/L)
1	0	0	0	103.98
2	-1	0	+1	78.92
3	+1	0	-1	91.40
4	+1	+1	0	80.75
5	0	+1	+1	75.00
6	0	0	0	106.97
7	0	-1	+1	93.00
8	0	0	0	106.35
9	0	-1	-1	76.38
10	-1	0	-1	98.38
11	+1	-1	0	103.01
12	-1	+1	0	83.11
13	0	+1	-1	91.68
14	-1	-1	0	83.34
15	+1	0	+1	96.67





表 4 Box-Behnken 變異數分析(ANOVA)結果

因子 (factor)	估計值 (estimate)	平方和 (sum of squares)	自由度 (degree of freedom)	P 值 (P value)
X <sub>1</sub>	3.51	98.56	1	0.0602
X <sub>2</sub>	-3.15	79.32	1	0.0822
X <sub>3</sub>	-1.78	25.38	1	0.2743
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-5.51	121.33	1	0.0436
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	6.18	152.89	1	0.0297
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-8.33	277.22	1	0.0098
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-5.44	109.40	1	0.0514
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-12.77	602.19	1	0.0019
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-8.98	297.80	1	0.0085

該二次效果模型的適合度(goodness of fit)可從決定係數值(the determination coefficient;  $R^2$ )得到驗證。本次實驗模型的  $R^2$  值為 0.9515，代表只有 4.85% 的回應變化性無法使用此模型解釋。三維空間圖可藉由把一個獨立營養成分設定為中水準因子(0)與其他兩獨立營養成分的不同組成進行繪製。回應曲面圖可以符合回歸分析模型(圖 3，(A)當 Glutamate (X<sub>3</sub>)濃度為 0.3%時，yeast extract (X<sub>1</sub>) 與 tryptone (X<sub>2</sub>)之回應曲面圖；(B)當 yeast extract (X<sub>3</sub>)濃度為 3.5%時，tryptone (X<sub>2</sub>)與 Glutamate (X<sub>3</sub>)之回應曲面圖；(C)當 tryptone (X<sub>2</sub>)濃度為 1.25%時，yeast extract (X<sub>1</sub>) 與 Glutamate (X<sub>3</sub>)之回應曲面圖。)，海藻糖生產量的最高點位於此次實驗範圍之內且結果預測培養基之最佳組成配方為 3.5 % yeast extract, 1.25% tryptone 與 0.3% glutamate，最高海藻糖合成酶 PTTS 預測生產量為 107.28 mg/L。依照此預測數據我們以實驗進行驗證，經三次重複實驗結果可得到海藻糖最大生產量為  $108.37 \pm 3.10$  mg/L 與預測結果相當接近，由此可以證明此實驗模型之合理性與準確性。

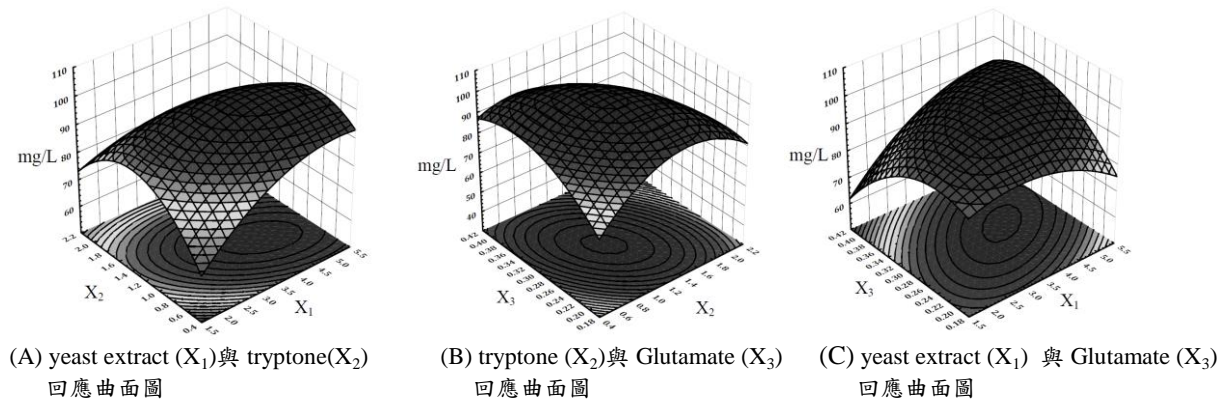


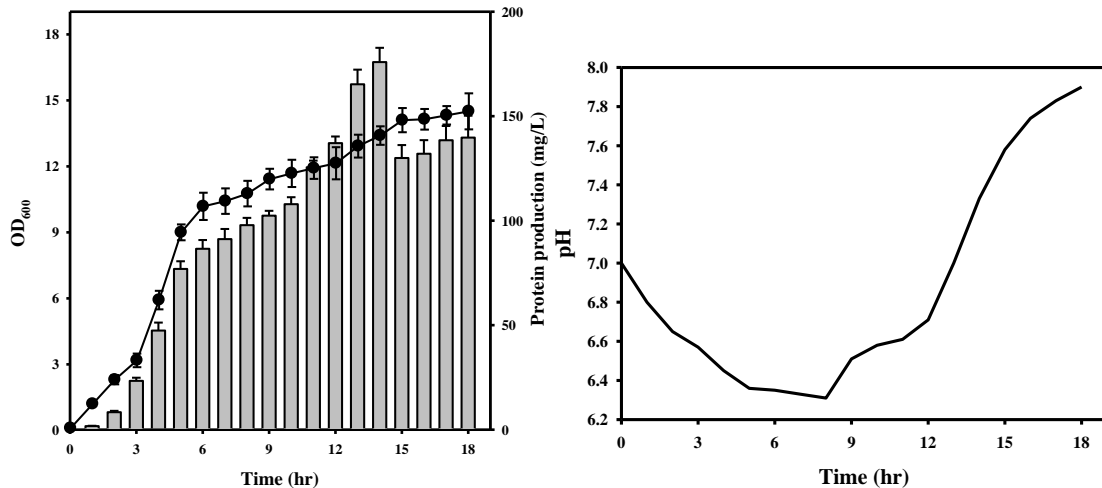
圖 3 兩不同因子對於重組海藻糖合成酶 PTTS 生產之回應曲面圖。

### 三、使用最佳化培養基來進行醱酵槽生產測試

為達到量產之目的，我們使用 3 公升最佳培養基配方搭配 5 公升醱酵槽進行批次醱酵實驗，培養溫度為 30 °C，溶氧度(DO)設定為 20 %。醱酵初始 pH 設定為 6.8，但醱酵過程不調控 pH。從海藻糖的總生產量上看，可以發現海藻糖合成酶的產量隨著培養時間逐漸增加。當培養時間達 14 小時可得到最大總生產量達  $175.89 \pm 6.83$  mg/L，但在 14 小時後，海藻糖合成酶 PTTS 產量開始下降，如圖 4(A) (重組枯草桿菌 PT5(PTTS)之生長曲線)所示。細菌在前 6 小時快速成長，細胞濃度可達到 10.18 (OD<sub>600</sub>)，此時 pH 值也快速下降，但第 6 小時後菌體生長開始放緩，同時 pH 值也開始逐漸升高，雖然菌種在第 7-15 小時還持續成長，在第 15 小時細胞生長達 14.10 (OD<sub>600</sub>)，但菌體成長速度放緩，此一變化代表菌體開始逐步要轉向孢子化時期，而在 15 小時後，細胞生長開始呈現停滯。從醱酵槽實驗結果上 PTTS 達最高產量時為



枯草桿菌進入孢子化前期。但超過孢子化前期後，細胞生長也開始呈現停滯現象，PTTS 產量變開始下降。此情形應為醱酵液中營養源缺乏而產生壓力回饋機制(strigent response)使枯草桿菌進行生理調節所致。此顯示孢子化前期與胞內蛋白生產有相當重要的關鍵。此外，本研究在沒有進行 pH 控制下進行醱酵生產，菌株在醱酵初期會從 pH 6.8 逐步下降至 6.3 然後 pH 值開始逐步回升至 pH 7.9 (圖 4(B) 醱酵過程之 pH 變化曲線)，顯示枯草桿菌在生理環境上的特殊性。



(A) 重組枯草桿菌 PT5(PTTS)之 生長曲

(B) 醱酵過程之 pH 變化曲線

圖 4 重組枯草桿菌使用最佳化培養基與批次醱酵方式進行試量產培養

## 肆、結論

本研究成功運用染色體工程技術來建立一株可穩定生產具有活性海藻糖合成酶 PTTS 的重組枯草桿菌。由於枯草桿菌屬於 GRAS 安全菌株，不具有內毒素等問題，相較使用大腸桿菌作為宿主細胞，使用枯草桿菌生產出的海藻糖合成酶 PTTS 可直接運用在食品工業中，此將有助於降低海藻糖製作成本。此外，本研究也以 Box-Behnken 回應曲面法進行培養基最佳化組成來提高海藻糖合成酶產量並以 5 公升醱酵槽進行試量產測試，由於使用醱酵槽進行菌種培養時，培養環境較使用搖瓶培養佳，因此在不須 pH 調控下經 14 小時醱酵後，海藻糖合成酶最高產量可達  $175.89 \pm 6.83$  mg/L，此結果將有助於未來進行海藻糖工業化生產之建立與評估。

## 參考文獻

- [1] A. D. Elbein, Y. T. Pan, I. Pastuszek, and D. Carroll. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule, *Glycobiology*, 13, 17R-27.
- [2] W. E. Trevelyan, and J. S. Harrison. (1956). Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation, *Biochemical Journal*, 62, 177-182.
- [3] S. Nwaka, and H. Holzer. (1998). Molecular biology of trehalose and trehalases in the yeast, *Saccharomyces cerevesiae*, *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 58, 107-237.
- [4] J. Augier. (1954). The biochemistry of a North American algae, *Tuomeya fluviatilis*, *Comptes Rendus*, 239, 87-89.
- [5] C. Coutinho, E. Bernardes; D. Félix, and A. D. Panek,(1988). Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains, *Journal of Biotechnology*, 7, 23-32.
- [6] P. I. Larsen, L. K. Sydnnes, B. Landfald, and A. R. Strom. (1987). Osmoregulation in *Escherichia coli* by



- accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose, *Archives of Microbiology*, 147, 1-7.
- [7] K. Kobayashi, T. Komeda, Y. Miura, M. Kettoku and M. Kato. (1997). Production of trehalose from starch by novel trehalose-producing enzymes from *Sulfolobus solfataricus* KM1, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 296-298.
- [8] J. Londesborough, and O. E. Vuorio. (1993). Purification of trehalose synthase from baker's yeast, *European Journal of Biochemistry*, 216, 841-848.
- [9] C. Schiraldi, I. Di Lernia, and M. De Rosa. (2002). Trehalose production: exploiting novel approaches, *Trends in Biotechnology*, 20, 420-425.
- [10] K. Maruta, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka. (1995). Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 1829-1834.
- [11] Y. H. Kim; T. K. Kwon; S. Park; H. S. Seo; J.-J. Cheong; C. H. Kim; J.-K. Kim; J. S. Lee; Y. D. Choi,(2000), Trehalose Synthesis by Sequential Reactions of Recombinant Maltooligosyltrehalose Synthase and Maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4620-4624.
- [12] P. Chen, and Y. P. Chao. (2006). Enhanced production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* by the elimination of limiting factors, *Biotechnology Letters*, 28, 1595-1600.
- [13] T. Nishimoto, M. Nakano, S. Ikegami, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto, Y. Tsujisaka. (1995). Existence of a novel enzyme converting maltose into trehalose, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 2189-2190.
- [14] T. Nishimoto, M. Nakano, S. Ikegami, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto, Y. Tsujisaka. (1996). Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60, 835-839.
- [15] J. Liang, R. Huang, Y. Huang, X. Wang, L. Du, Y. Wei. (2013). Cloning, expression, properties, and functional amino acid residues of new trehalose synthase from *Thermomonospora curvata* DSM 43183, *Journal of molecular catalysis. B, Enzymatic*, 90, 26-32.
- [16] J. Yan, Y. Qiao, J. Hu, H. Ding. (2013). Cloning, Expression and Characterization of a Trehalose Synthase Gene From *Rhodococcus opacus*, *The Protein Journal*, 32, 223-229.
- [17] W. Xiuli; D. Hongbiao; Y. Ming; Q. Yu,(2009), Gene cloning, expression, and characterization of a novel trehalose synthase from *Arthrobacter aureescens*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 477-482.
- [18] T.-K. Kim; J.-H. Jang; H.-Y. Cho; H.-S. Lee; Y.-W. Kim,(2010), Gene cloning and characterization of a trehalose synthase from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Food Science and Biotechnology*, 19, 565-569.
- [19] T. Hoffmann; B. Troup; A. Szabo; C. Hungerer; D. Jahn,(1995), The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: Cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system, *FEMS microbiology letters*, 131, 219-225.
- [20] X.-Z. Zhang; Z.-L. Cui; Q. Hong; S.-P. Li,(2005), High-Level Expression and Secretion of Methyl Parathion Hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4101-4103.
- [21] M. Durban; J. Silbersack; T. Schweder; F. Schauer; U. Bornscheuer,(2007), High level expression of a recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 634-639.
- [22] H.-Y. Cho; H. Yukawa; M. Inui; R. H. Doi; S.-L. Wong,(2004), Production of Minicellulosomes from





- Clostridium cellulovorans* in *Bacillus subtilis* WB800, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5704-5707.
- [23] C. R. Harwood,(1992), *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses, *Trends in Biotechnology*, 10, 247-256.
- [24] H. Tjalsma; H. Antelmann; J. D. H. Jongbloed; P. G. Braun; E. Darmon; R. Dorenbos; J.-Y. F. Dubois; H. Westers; G. Zanen; W. J. Quax; O. P. Kuipers; S. Bron; M. Hecker; J. M. van Dijk,(2004), Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "Secrets" of the Secretome, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 207-233.
- [25] R. Ye; J. H. Kim; B. G. Kim; S. Szarka; E. Sihota; S. L. Wong,(1999), High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*, *Biotechnology and bioengineering*, 62, 87-96.
- [26] T. J. Swinfield; L. Janniere; S. D. Ehrlich; N. P. Minton,(1991), Characterization of a region of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAM beta 1 which enhances the segregational stability of pAM beta 1-derived cloning vectors in *Bacillus subtilis*, *Plasmid*, 26, 209-221.
- [27] L. Janniere; C. Bruand; S. D. Ehrlich,(1990), Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors, *Gene*, 87, 53-61.
- [28] S. D. Ehrlich,(1978), DNA cloning in *Bacillus subtilis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 1433-1436.
- [29] P. T. Chen; C.-J. Chiang; Y.-P. Chao,(2007), Strategy To Approach Stable Production of Recombinant Nattokinase in *Bacillus subtilis*, *Biotechnology Progress*, 23, 808-813.
- [30] Y.-S. Chen; G.-C. Lee; J.-F. Shaw,(2006), Gene Cloning, Expression, and Biochemical Characterization of a Recombinant Trehalose Synthase from *Picrophilus torridus* in *Escherichia coli*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7098-7104.
- [31] W. G. Haldenwang,(1995), The sigma factors of *Bacillus subtilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1-30.
- [32] P. T. Chen; J.-F. Shaw; Y.-P. Chao; T.-H. David Ho; S.-M. Yu,(2010), Construction of Chromosomally Located T7 Expression System for Production of Heterologous Secreted Proteins in *Bacillus subtilis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5392-5399.
- [33] X. Yan; H.-J. Yu; Q. Hong; S.-P. Li,(2008), Cre/lox System and PCR-Based Genome Engineering in *Bacillus subtilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5556-5562.

