

MTSase 和 MTHase 在 *Brevibacillus brevis* 中的克隆表达及应用研究

吴世雄^{1,2}, 宿玲恰^{1,2}, 姚锴琳^{1,2}, 吴敬^{1,2}, 吴丹^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为实现将来源于嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*) ATCC 33909 的麦芽寡糖基海藻糖合成酶 (MTSase) 和麦芽寡糖基海藻糖水解脱酶 (MTHase) 在短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*) 中的重组表达, 分别以重组质粒 pET-24a(+)-*treY* 和 pET-24a(+)-*treZ* 为模板 PCR 扩增得到 MTSase 和 MTHase 基因片段, 通过与表达载体 pSVN 连接得到重组质粒, 电转化表达宿主 *Brevibacillus brevis*, 成功构建重组菌 *Brevibacillus brevis*/pSVN-*treY* 和 *Brevibacillus brevis*/pSVN-*treZ*。重组菌在 TM 培养基中发酵 48 h, 胞内酶活力分别达到 MTSase 630.0 U/g(wet cell)、MTHase 170.0 U/g(wet cell)。对重组 MTSase 和 MTHase 进行酶转化实验, 结果表明, 当以质量浓度为 100 g/L 马铃薯淀粉为底物, 酶转化温度为 60 °C, pH 为 5.5, 加酶量为 MTSase 80 U/g 淀粉、MTHase 20 U/g 淀粉, 普鲁兰酶 5 U/g 淀粉和环糊精葡萄糖基转移酶 (CGTase) 15 U/g 淀粉, 反应 48 h, 海藻糖转化率达到 80.2%。

关键词: 麦芽寡糖基海藻糖合成酶; 麦芽寡糖基海藻糖水解脱酶; 短短芽孢杆菌; 酶活力; 海藻糖
中图分类号: Q 814.9 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)08-0838-07

Heterologous Expression of MTSase and MTHase in *Brevibacillus brevis* and Its Application

WU Shixiong^{1,2}, SU Lingqia^{1,2}, YAO Kailin^{1,2}, WU Jing^{1,2}, WU Dan^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to achieve efficient production of the MTSase and MTHase from (*Sulfolobus acidocaldarius*) ATCC 33909, gene sequence encoding MTSase and MTHase were PCR-amplified using recombinant plasmid pET-24a(+)-*treY* and pET-24a(+)-*treZ* which were fused to expressional vector pSVN. The recombinant plasmid was transferred into expression host *Brevibacillus brevis* by electroporation. The enzyme activity of MTSase and MTHase expression in *Brevibacillus brevis*

收稿日期: 2015-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31425020)。

* 通信作者: 吴丹(1976—), 男, 湖北黄冈人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物发酵过程优化与控制的研究。
E-mail: wudan@jiangnan.edu.cn

引用本文: 吴世雄, 宿玲恰, 姚凯琳, 等. MTSase 和 MTHase 在 *Brevibacillus Brevis* 中的克隆表达及应用研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(08): 838-844.

were 630.0 U/g (wet cell) and 170.0 U/g (wet cell) after cultivated in shake flasks for 48 h. Also presented are the preliminary studies on the reaction conditions of conversion by the enzymes. The optimal conditions for the conversion are as following; the initial pH was 5.5, the reaction temperature was 60 °C, initial potato starch concentration was 100 g/L, enzymes concentration were MTSase 80 U per gram of substrate, MTHase 20 U per gram of substrate, Pullulanase 5 U per gram of substrate and CGTase 15 U per gram of substrate, incubated for 48 h. Under this conditions, the yield of trehalose reached approximately 80.2%.

Keywords: maltooligosyl trehalose synthase, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, *Brevibacillus brevis*, enzyme activity, trehalose

麦芽寡糖基海藻糖合成酶 (maltooligosyl trehalose synthase, MTSase, EC5.4.99.15) 和麦芽寡糖基海藻糖水解酶 (maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, MTHase, EC3.2.1.141) 分别由基因 *treY* 和 *treZ* 编码, 是双酶法生产海藻糖的关键酶^[1-4]。在用麦芽寡糖或直链淀粉合成海藻糖的过程中, MTSase 首先作用于底物还原性末端的 Cl-OH, 产生 α -1,4-糖苷键到 α , α -1,1-糖苷键的分子内转糖基作用, 形成中间产物麦芽寡糖基海藻糖; MTHase 则专一地内切该中间产物中麦芽寡糖基与海藻糖相连的 α -1,4-糖苷键, 释放出海藻糖^[5]。

海藻糖是一种非还原性二糖, 广泛存在于自然界中, 多种生物体内都含有该糖^[6-7]。海藻糖通过保护生物膜和蛋白质等大分子不被变性失活, 来维持生命体的生物特征和生命过程^[8-9]。外源性的海藻糖对蛋白质、生物膜等大分子同样具有良好的保护作用, 使得海藻糖可作为生物以及医学领域的活性大分子的保护剂, 代替血浆蛋白作为蛋白质、疫苗药物等生物活性物质的稳定剂^[10-15]。同时海藻糖的功能特性在食品加工领域也具有优越表现, 如对酸和热的高度稳定性、抑制脂肪酸败等^[6-7]。正是因为海藻糖具有特殊的理化性质和功能, 因此被广泛用于医药业、食品、化妆品等行业。

海藻糖的制备方法主要有天然生物提取法^[16]、化学合成法^[6]、微生物发酵法^[17]、基因工程法^[18]和酶转化法^[19], 而酶转化法以其低成本和高转化率的特点成为目前制备海藻糖的主要方法^[20]。酶转化法又分为磷酸化酶法、海藻糖合成酶法、麦芽寡糖基海藻糖合成酶和麦芽寡糖基海藻糖水解酶双酶法^[21]。

本研究首次将 (*Sulfolobus acidocaldarius*) ATCC 33909 来源的麦芽寡糖基海藻糖合成酶和麦芽寡糖

基海藻糖水解酶在 *Brevibacillus brevis* 中进行了克隆表达, 在此基础上探究了双酶法制备海藻糖的工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 菌株 *E. coli* JM109 和 *Brevibacillus brevis* 由本实验室保藏; 质粒 pSVN、pET-24a(+)-*treY* 和 pET-24a(+)-*treZ* 由本实验室保藏。

1.1.2 酶及主要试剂 *EcoR* I、*Hind* III 限制性内切酶, T4 DNA ligase, PrimerStar *Taq* DNA 聚合酶, dNTPs, 新霉素均购自上海宝生物; DNA 纯化试剂盒购自上海生工; 普鲁兰酶、CGTase 为本实验室所有; 蛋白胨、酵母粉、多聚蛋白胨、牛肉浸膏购自 Oxoid (英国) 公司; 其他试剂均为国产分析纯, 购自国药集团。

1.1.3 培养基 SOB 培养基 (g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母粉 5.0, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.0, NaCl 0.5, KCl 0.19, pH 7.0。

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0 (固体培养基加 1.5%~2.0% 的琼脂粉)。

TM 液体培养基 (g/L): 多聚蛋白胨 10.0, 牛肉粉 5.0, 酵母粉 2.0, 无水葡萄糖 10.0, 微量元素液 10 mL, pH 7.2。

TM 固体培养基 (g/L): 多聚蛋白胨 10.0, 牛肉浸膏 5.0, 酵母粉 2.0, 无水葡萄糖 10.0, 微量元素液 10 mL, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.1, 琼脂粉 20.0, pH 7.2。

微量元素液 (g/L): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10.0, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.25, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 3.0, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.5, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 0.23, $CaCl_2$ 2.0, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 0.1。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 按照 *treY* 和 *treZ* 基因序列,按照引物设计原则用引物设计软件 DNAMAN 设计了以下引物(下划线部分分别为 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点)。

treY(*EcoR* I,*Hind* III)

F1: 5'- CGGAATTCATGATTAGCGCGACCTATCG-3' 28 bp

R1: 5'- CCAAGCTTACATACGCACCAGGATAC-3' 26 bp

treZ(*EcoR* I,*Hind* III)

F2: 5'- CGGAATTCATGTTTAGCTTTGGCGGCA-3' 28 bp

R2: 5'- CCAAGCTTATTCCAGTTGATACAGCC-3' 26 bp

1.2.2 PCR 获得 *treZ* 基因片段 分别以 pET-24a(+)-*treY* 和 pET-24a(+)-*treZ* 为模板,F1/F2、R1/R2 为正反向引物扩增 *treY* 和 *treZ* 基因片段。PCR 参数:94 °C 预变性 4 min;进入 PCR 循环:98 °C 变性 10 s,55 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 2 min 20 s 或 2 min, 30 个循环;最后 72 °C 10 min,4 °C 保温。

1.2.3 目的基因的克隆及鉴定 将 1.2.2 节所得到的基因片段与经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切纯化后的载体 pSVN,用 T4 DNA ligase 4 °C 连接 16 h。连接产物转化克隆宿主 *E.coli* JM109 涂布 LB 固体培养基(含 10 μg/mL 新霉素),30 °C 培养箱培养 10 h,挑取单菌落,经 LB 液体培养基(含 10 μg/mL 新霉素)30 °C 培养 8 h 后,收集菌体抽提质粒,送测序公司测序。测序正确的质粒电转化表达宿主 *Brevibacillus brevis*,涂布 TM 固体培养基(含 10 μg/mL 新霉素),30 °C 培养箱培养 12 h,挑取单菌落,经 TM 液体培养基(含 10 μg/mL 新霉素)30 °C 培养 10 h 后保甘油菌。

1.2.4 重组菌的摇瓶发酵及重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

(1)重组菌的摇瓶发酵:分别取 20 μL 甘油管保存的重组菌 *Brevibacillus brevis*/pSVN-*treY* 和 *Brevibacillus brevis*/pSVN-*treZ* 接种于 10 mL TM 液体培养基(含 10 μg/mL 新霉素)中,30 °C,200 r/min 振荡培养过夜,取 0.5 mL 培养液转接到 50 mL TM 液体培养基(含 10 μg/mL 新霉素)中 30 °C,200 r/min 振荡培养 48 h。发酵结束后,8 000 r/min

离心 15 min 收集菌体。

(2)高压匀浆破碎细胞:将菌体沉淀中加入一定量的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液重悬菌体,用高压匀浆细胞破碎仪破碎细胞,8 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。

(3)重组蛋白的 SDS-PAGE 分析:细胞破壁上清液经 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 重组蛋白酶活力测定 将麦芽五糖溶解于 20 mmol/L pH 6.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液中,配成 1% 的麦芽五糖溶液,取 0.49 mL 该溶液,加入 10 μL MTSase 粗酶液,60 °C 反应 2 h,100 °C 沸水中煮 10 min 终止反应,DNS 法^[2,22]测酶活。MTSase 的酶活单位定义为每 1 min 水解 1 μmol 麦芽五糖生成麦芽三糖基海藻糖所需的酶量^[2]。

将麦芽五糖溶解于 20 mmol/L pH 6.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液中,配成 1% 的麦芽五糖溶液,取 0.48 mL 该溶液,加入 10 μL 浓缩的 MTSase 酶液,60 °C 反应 2 h,100 °C 沸水中煮 10 min 终止反应,得到麦芽三糖基海藻糖的水溶液,待溶液冷却后,加入 10 μL MTHase 粗酶液,60 °C 反应 10 min,100 °C 沸水中煮 10 min 终止反应,DNS 法^[2,22]测酶活。MTHase 的酶活单位定义为每 1 min 水解麦芽三糖基海藻糖生成 1 μmol 海藻糖所需的酶量^[2]。

1.2.6 双酶法制备海藻糖的条件优化 本研究以马铃薯淀粉为底物,经液化处理后于恒温水浴摇床进行酶转化实验。

(1)普鲁兰酶对海藻糖制备的影响。用质量浓度为 200 g/L 马铃薯淀粉经液化,加入 MTSase 80 U/g 淀粉和 MTHase 20 U/g 淀粉,分别加入 5 U/g 淀粉的普鲁兰酶和不加普鲁兰酶,pH 5.5,60 °C 恒温水浴摇床,150 r/min,反应 48 h。HPLC 检测酶转化产物。

(2)MTSase 和 MTHase 加酶量对海藻糖制备的影响。用质量浓度为 200 g/L 马铃薯淀粉经液化,分别加入①MTSase 40 U/g 淀粉、MTHase 10、20、40、60 U/g 淀粉;②MTSase 60 U/g 淀粉、MTHase 10、20、40、60 U/g 淀粉;③MTSase 80 U/g 淀粉、MTHase 10、20、40、60 U/g 淀粉;④MTSase 100 U/g 淀粉、MTHase 10、20、40、60 U/g 淀粉;加入普鲁兰酶 5 U/g 淀粉,pH 5.5,55 °C 恒温水浴摇床,150 r/min,反应 48 h。HPLC 检测酶转化产物。

(3)温度对海藻糖制备的影响。用质量浓度为

200 g/L 马铃薯淀粉经液化,加入 MTSase 80 U/g 淀粉, MTHase 20 U/g 淀粉, 普鲁兰酶 5 U/g 淀粉, pH 5.5, 50、55、60、65 °C 恒温水浴摇床, 150 r/min, 反应 48 h。HPLC 检测酶转化产物。

(4) pH 对海藻糖制备的影响。用质量浓度为 200 g/L 马铃薯淀粉经液化, 加入 MTSase 80 U/g 淀粉, MTHase 20 U/g 淀粉, 普鲁兰酶 5 U/g 淀粉, pH 5.0、5.5、6.0, 60 °C 恒温水浴摇床, 150 r/min, 反应 48 h。HPLC 检测酶转化产物。

(5) 底物浓度对海藻糖制备的影响。用质量浓度为 100、150、200、250、300 g/L 马铃薯淀粉经液化, 加入 MTSase 80 U/g 淀粉, MTHase 20 U/g 淀粉, 普鲁兰酶 5 U/g 淀粉, pH 5.5, 60 °C 恒温水浴摇床, 150 r/min, 反应 48 h。HPLC 检测酶转化产物。

(6) 环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)对海藻糖制备的影响。用质量浓度为 200 g/L 马铃薯淀粉经液化, 加入 MTSase 80 U/g 淀粉, MTHase 20 U/g 淀粉, 普鲁兰酶 5 U/g 淀粉, 分别在 0、12、24 h 加入 15 U/g 淀粉的 CGTase 和不加 CGTase, pH 5.5, 60 °C 恒温水浴摇床, 150 r/min, 反应 48 h。HPLC 检测酶转化产物。

1.2.7 酶转化产物的检测 用 HPLC 检测酶转化产物。HPLC 检测条件为: 流动相(乙腈:水=80:20), 流速: 0.8 mL/min, 柱温 40 °C, NH₂ 柱 (APS-2 HYPERSIL, Thermo Scientific), 示差折光检测器^[23]。

2 结果与讨论

2.1 目的基因的扩增

以 pET-24a(+)-*treY* 和 pET-24a(+)-*treZ* 为模板, 扩增 *treY*、*treZ* 基因片段, PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段大小分别约为 2 200 bp 和 1 700 bp, 与理论值一致。

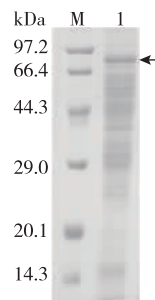
2.2 重组表达质粒的构建

PCR 扩增的 *treY*、*treZ* 基因片段分别与表达载体 pSVN 连接。连接产物转化克隆宿主 *E. coli* JM109, LB 固体培养基培养, 挑取单菌落, 经 LB 液体培养基培养 8 h 后, 收集菌体抽提质粒, 送测序公司测序, 测序结果完全正确, 重组表达质粒构建完成。重组表达质粒电转化表达宿主 *Brevibacillus brevis* 构建重组菌。

2.3 重组菌的摇瓶发酵

重组菌经摇瓶 30 °C 发酵, 用高压匀浆破碎菌

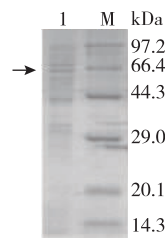
体, 上清液通过 15% 分离胶进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 1 和图 2 所示, 在 MTSase 和 MTHase 理论分子量附近出现明显的可溶性蛋白条带。酶活测定结果显示重组菌胞内酶活力分别达到 MTSase 630.0 U/g(wet cell)、MTHase 170.0 U/g(wet cell), 明显高于 NakaDa 等^[3-4]报道的 MTSase 1.2 U/g(wet cell) 和 MTHase 3.4 U/g(wet cell)。



1-MTSase / *Brevibacillus brevis* 细胞破壁上清; M-标准蛋白质 Marker

图 1 重组 MTSase 蛋白电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant MTSase



1-MTHase / *Brevibacillus brevis* 细胞破壁上清; M-标准蛋白质 Marker

图 2 重组 MTHase 蛋白电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant MTHase

2.4 双酶法制备海藻糖的条件优化

2.4.1 普鲁兰酶对海藻糖制备的影响 马铃薯淀粉含大量支链淀粉, 然而 MTHase 和 MTSase 均不能作用于支链淀粉中的 α -1,6-糖苷键, 导致底物利用率降低。普鲁兰酶可水解 α -1,6-糖苷键, 从而产生包含 α -1,4-糖苷键的直连多聚糖^[24]。因此, 本研究首先探究了添加普鲁兰酶复配对制备海藻糖的影响。结果如图 3 所示, 添加普鲁兰酶后海藻糖转化率为 74.2%, 而不添加普鲁兰酶的海藻糖转化率仅为 46.4%, 并且研究还发现在添加普鲁兰酶的一组中, 除目的产物海藻糖、副产物葡萄糖和麦芽糖之外, 麦芽三糖、四糖等其他组分比例较高, 为 38.6%, 而添加普鲁兰酶时该组分含量明显下降, 仅

为 10.0%。因此,添加普鲁兰酶能够有效改善底物利用率,从而提高海藻糖转化率。

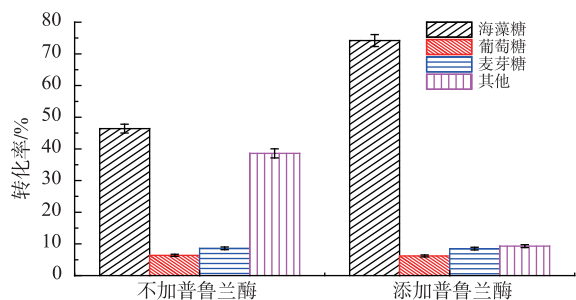


图 3 普鲁兰酶对海藻糖转化率的影响

Fig. 3 Effects of pullulanase on the production of trehalose

2.4.2 加酶量、温度、pH 和底物浓度对海藻糖制备的影响 本研究对酶法制备海藻糖的条件进行了优化,主要优化 MTSase 和 MTHase 的加量、酶转化的温度、pH 以及底物质量浓度。结果如图 4 所示。

加酶量是影响酶反应产物产率的重要因素,并且还和成本有关。此外,由于 MTSase 和 MTHase 分别催化底物还原性末端的转糖苷反应和麦芽寡糖基海藻糖的水解反应,两者的使用比例对于产物组分组成具有重要影响。为了探究不同加酶量对海藻糖制备的影响,本研究在 pH 5.5 和 55 °C 条件下考察了 MTSase 和 MTHase 不同的浓度和比例时的海藻糖转化率。结果表明,当 MTSase 和 MTHase 的比

例为 4:1, 加酶量分别为 80.0 U/g 淀粉和 20.0 U/g 淀粉时海藻糖转化率最高。

温度也会影响酶转化的结果,为了研究温度对 MTSase 和 MTHase 双酶法制备海藻糖的影响,本研究在 4 个不同温度下进行酶转化反应。当温度分别为 50、55、60、65 °C 时,海藻糖转化率分别为: 61.2%、74.4%、75.9%、65.1%。由数据可知,当在一定温度范围内,随温度的升高,海藻糖的转化率也会相应提高,但是在达到最适温度 60 °C 后,海藻糖的转化率随温度的升高而呈现下降趋势。

不同的初始 pH 会对酶的活力及稳定性产生不同程度的影响,也会影响到酶转化的效果,因此探究了不同初始 pH 对转化率的影响。结果显示当 pH 为 5.5 时,海藻糖对麦芽糊精的转化率最高,能达到 76.0%。因此,酶转化反应最适 pH 为 5.5。

另外,底物质量浓度对酶转化结果也有一定的影响,本研究考察了 4 种不同的底物质量浓度下海藻糖的转化率。当底物质量浓度分别为 100、150、200、250、300 g/L 时,海藻糖转化率分别为 78.8%、78.6%、76.4%、74.2%、70.4%,随着底物质量浓度的升高,海藻糖转化率逐渐降低。

因此,海藻糖制备的最佳条件为:100 g/L 马铃薯淀粉为底物,酶转化温度为 60 °C,pH 为 5.5,加酶量为 MTSase 80 U/g 淀粉、MTHase 20 U/g 淀粉。

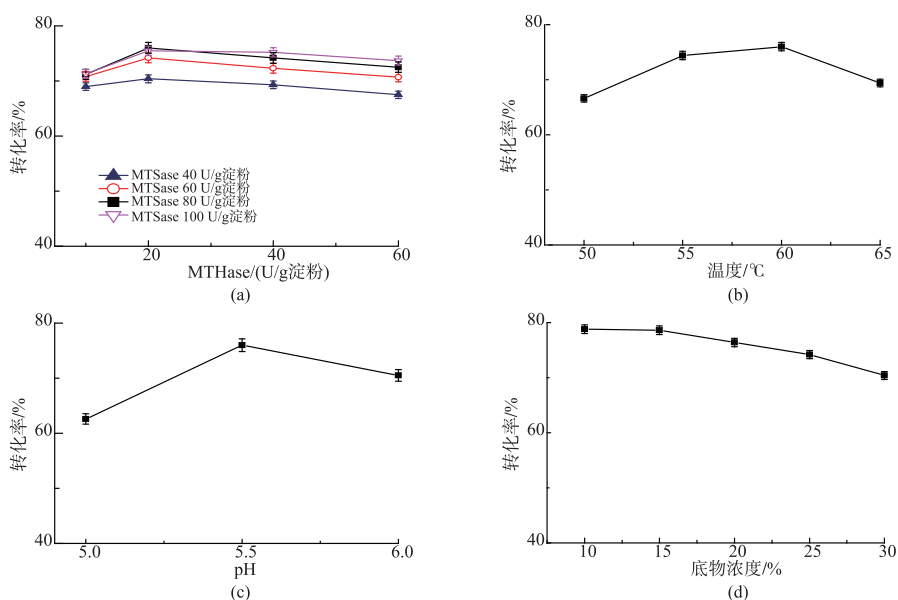


图 4 不同反应条件对海藻糖转化率的影响

Fig. 4 Effects of different reaction conditions on the production of trehalose

2.4.3 CGTase 对海藻糖制备的影响 从上述研究结果可以看出,反应产物中含有较多的葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖等小分子糖,研究表明,MTSase 对 DP 值较高的麦芽寡糖或糊精等底物的亲和力较高,而不能有效利用本研究中反应副产物小分子糖,造成底物浪费。CGTase 是一种多功能糖基转移酶,能催化糖分子之间的转糖基作用,使此类小分子糖转化生成糖链长度加长的产物^[25]。由此推测 CGTase 能催化产物中无法利用的二糖以及三糖发生转糖基反应生成 MTSase 酶反应底物,从而提高海藻糖的转化率。因此,继续探究了添加 CGTase 对海藻糖转化率的影响,并考察了不同添加时间的酶转化情况。如图 5 所示,不加 CGTase 时,海藻糖转化率为 76.2%;反应初始加入 CGTase 时,海藻糖转化率为 80.2%;12 h 和 24 h 时加入 CGTase 均下降,分别为 78.7%和 77.5%,说明添加 CGTase 能提高海藻糖产量,并且加入时间越早,转化率提高越明显。此外,与预期一致,反应产物中的麦芽糖及其他组分的含量均明显下降,但葡萄糖的含量有所增加,这可能与 CGTase 的水解活性有关。

3 结 语

本研究首次将(*Sulfolobus acidocaldarius*)ATCC

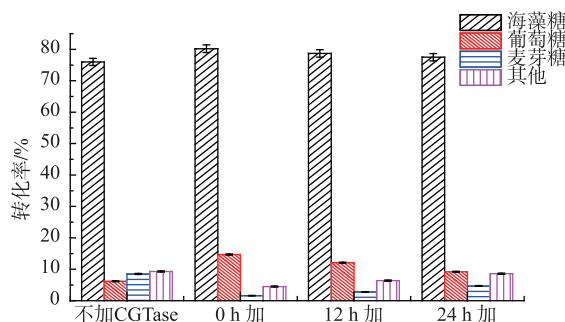


图 5 CGTase 对海藻糖转化率的影响

Fig. 5 Effects of CGTase on the production of trehalose

33909 来源的麦芽寡糖基海藻糖合成酶和麦芽寡糖基海藻糖水解酶在 *Brevibacillus brevis* 中进行了克隆表达,重组菌在 TM 培养基中发酵 48 h,胞内酶活力分别达到 MTSase 630.0 U/g (wet cell)、MTHase 170.0 U/g(wet cell)。在此基础上探究了双酶法制备海藻糖的工艺。对重组 MTSase 和 MTHase 进行酶转化实验,结果表明,当以 150 g/L 马铃薯淀粉为底物,酶转化温度为 60 °C,pH 为 5.5,加酶量为 MTSase 80 U/g 淀粉、MTHase 20 U/g 淀粉,普鲁兰酶 5 U/g 淀粉和环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase) 15 U/g 淀粉,反应 48 h,海藻糖转化率达到 80.2%。

参考文献:

- [1] MARUTA K, MITSUZUMI H, NAKADA T, et al. Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1996, 1291(3): 177-181.
- [2] FANG T Y, TSENG W C, GUO M S, et al. Expression, purification, and characterization of the maltooligosyl trehalose trehalohydrolase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(19): 7105-7112.
- [3] NAKADA T, IKEGAMI S, CHAEN H, et al. Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose synthase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60(2): 263-266.
- [4] NAKADA T, IKEGAMI S, CHAEN H, et al. Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose trehalohydrolase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60(2): 267-270.
- [5] NAKADA T, MARUTA K, TSUSAKI K, et al. Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q36 [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(12): 2210-2214.
- [6] ZHANG Yuhua, LING Peixue, JI Baoping. Current status of research for trehalose and its prospective applications [J]. *Food and Drug*, 2005(3): 8-13. (in Chinese)
- [7] CHENG Chi. A natural biological preservative—characteristics and application of trehalose [J]. *Food and Fermentation Industries*, 1996(1): 59-64. (in Chinese)

- [8] CROWE J, CROWE L, CHAPMAN D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose [J]. **Science**, 1984, 223(4637): 701-703.
- [9] BANAROUDJ N, LEE D H, GOLDBERG A L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals[J]. **J Biol Chem**, 2001, 276(26): 24261-24267.
- [10] THEVELEIN J M. Regulation of trehalose mobilization in fungi[J]. **Microbiol Mol Biol R**, 1984, 48(1): 42-45.
- [11] 张丽杰. 高产海藻糖菌株的诱变育种, 培养基优化及提取纯化的研究[D]. 天津: 河北工业大学, 2004.
- [12] REN Xiaoqin, ZHUANG Gui. Production, research situation and development of trehalose [J]. **Journal of Zhengzhou Institute of Technology**, 2001, 22(1): 82-85. (in Chinese)
- [13] CROWE J H, CROWE L M, CHAPMAN D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose [J]. **Science**, 1984, 223(4637): 701-703.
- [14] MADIN K, CROWE J H. Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration [J]. **Journal of Experimental Zoology**, 1975, 193(3): 335-342.
- [15] HOTTIGER T, BOLLER T, WIEMKEN A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts[J]. **FEBS Letters**, 1987, 220(1): 113-115.
- [16] HAN Shaoqing, ZHAO Qin, PENG Qijun. Trehalose extraction by the technology of membrane separation [J]. **Journal of Food and Science and Biotechnology**, 2005, 24(2): 93-96. (in Chinese)
- [17] ZHU Yueming, ZHANG Jun, XING Laijun, et al. Progress on molecular biology of trehalose synthase—a review [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2009, 49(1): 6-12. (in Chinese)
- [18] MIAO Jing. Preparation methods of trehalose[J]. **Yantai Teachers University Journal (Natural Science)**, 2000, 16(1): 60-63. (in Chinese)
- [19] 黄日波, 蒙健宗, 陈宇. 海藻糖—21世纪的新型糖类[M]. Translator 译. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [20] GOMES F C, PATARO C, GUERRA J B, et al. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal *Brazilian cachaca* [J]. **Can J Microbiol**, 2002, 38(5): 399-406.
- [21] DE S K A L, WESTON A, BROWN I N, et al. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria [J]. **Microbiology**, 2000, 146(1): 199-208.
- [22] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. **Analytical Chemistry**, 1959, 31(3): 426-428.
- [23] LUO Feng, DUAN Xuguo, SU Linqia, et al. Cloning, expression and fermentation optimization of *Thermobifida fusca* trehalose synthase gene in *E. coli*[J]. **China Biotechnology**, 2013, 8: 18. (in Chinese)
- [24] ZOU C, DUAN X, WU J. Enhanced extracellular production of recombinant *Bacillus deramificans* pullulanase in *Escherichia coli* through induction mode optimization and a glycine feeding strategy[J]. **Bioresource Technology**, 2014, 172: 174-179.
- [25] LI Zhaofeng, GU Zhengbiao, DU Guochen, et al. Structure characteristic and catalytic mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase[J]. **China Biotechnology**, 2010, 30(6): 144-150. (in Chinese)