

細胞代謝工程在農業生技產業的應用

陳裕星

摘要

利用基因工程技術改善微生物、植物及哺乳動物細胞以製備重組蛋白質、疫苗、單株抗體或生產二次代謝物等，是生物科技產業中一大應用領域。然而培養中的細胞在代謝上有往往會產生許多不利生長的特徵，包括過度依賴糖解作用製造能量、高糖條件下容易產生乳酸、醋酸、TCA循環酵素活性低、代謝glutamine作為能量基質而產生氨毒害，使細胞凋亡及不易達成高密度細胞培養，進而限制了細胞生長以及目標物質的產量。研究人員透過基因工程的操作，以期使細胞可以合成自身所需的生長因子、可調控細胞週期，改變關鍵代謝物質流量以及提升細胞活性等。

在調控細胞中間代謝所使用之基因中，透明顫菌之血紅蛋白(*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb)相當受到矚目，此蛋白在雙體構型時對氧氣有高度親和性可截取氧氣以提供代謝所需，在低氧的環境下結合VHb之重組菌株可以顯著提高大腸桿菌之密度、改變生長速率、提高蛋白質產量，提高抗生素產量，促進核糖體之合成，顯著促進有機化合物如benzoic acid, 2,4-DNT(2,4-dinitrotoluene)等之分解。提高ATP、NAD(P)H的利用率，提高細胞呼吸速率，促進氧化酵素之活性，改變氧氣利用性質等。在代謝上之改變則傾向於增加糖解作用(glycolysis)以因應對ATP及其他還原劑如NAD(P)H等增加之需求。表達VHb基因到動物細胞後可發現轉染之細胞生長優於對照，細胞株對FBS依賴度較低、細胞可維持高的生長速率，有效利用培養基並減少乳酸堆積，清除自由基與促進細胞抗凋亡。

研究人員將VHb表現於植物中，發現轉殖VHb基因於菸草植物中增加了將近10%的植物物質(plant material)產量，和控制組的植物相比，植物體中葉綠素含量也增加了30-40%。此外，植物體中尼古丁的合成也增加了，因為尼古丁的合成反應需要更多的氧氣參與，所以可能是VHb加強了氧氣的利用率所造成的結果。VHb也被轉殖到白楊樹，希望在樹木生長作為紙漿材料的過程中，也可以增加其耐淹水特性，並藉本基因增加其根圍氧氣有效性來促進廢汗水的分解處理。轉殖本基因到天仙子(*Hyoscyamus muticus*)則可發現培養中的細胞其培養基養分利用幅度增加，二次代謝物組成改變，本基因在細胞大規模培養的生產系統中相當具有開發應用價值。

關鍵字：透明顫菌血紅蛋白、菸草、代謝工程

Keywords: *Vitreoscilla* hemoglobin(VHb), tobacco, metabolic engineering

前言

利用植物生產重組蛋白質，包括醫療性蛋白質如抗體、疫苗、醫療性酵素被認為是生物技術產業中有極大發展潛力的一環，從1990年開始，在經過十五年的發展之後，第一個利用植物生產的重組蛋白質商品目前已經成功上市，許多治療人類疾病用，以及動物用的植物衍生重組蛋白質或疫苗產品也接近上市階段(Ma *et al.*, 2005)，使植物分子農場的概念由理念邁入實用之階段。

由於基因轉殖作物在田間生產的潛在生態風險，與轉殖植物於田間生產時產量的不穩定性而使基因轉殖植物的發展遭遇瓶頸，因此利用植物懸浮細胞生產重組蛋白質是一相當值得研發的領域。以植物懸浮細胞生產重組蛋白質之優點包括植物為真核生物，所生產之蛋白質可正確摺疊與進行糖基化，所生產之重組蛋白質可以利用適當的啟動子與訊息序列分泌至細胞外，因此可以持續收穫生產。使用基本鹽類培養基與少量維生素及蔗糖、微量元素即可生產，成本低廉，以及無人畜共通疾病或病毒污染之疑慮等(Fisher *et al.*, 1999a, 1999b)。相對的目前產業主流為利用哺乳動物細胞生產重組蛋白質，則有使用之動物血清必須經過嚴密的病毒檢測、血清來源有限使生產成本昂貴，或是必須使用無血清甚至無蛋白質之培養基之限制，使其生產成本十分昂貴。同時由於細胞擴大量產不易，整體動物細胞生產系統產能有限，使許多生技藥品單純因為無法生產足夠的藥物提供給臨床試驗之用，而限制了這些生技藥品進入市場之時機(Daniel *et al.*, 2001；Schillberg *et al.*, 2003)。

因此，利用植物懸浮細胞為生產重組蛋白質之宿主具有相當大的產業應用潛力，如果能有效提高植物懸浮生產重組蛋白質之產能，使其等於甚或高於動物細胞產能，以植物懸浮細胞低廉成本且安全之生產方式，當可加速相關應用植物生產重組蛋白質產業之發展。而在現有植物懸浮細胞培養系統中，菸草因為懸浮細胞再生容易、生長迅速，同時已經有相當豐富的研究基礎，是極為理想的生產宿主系統。

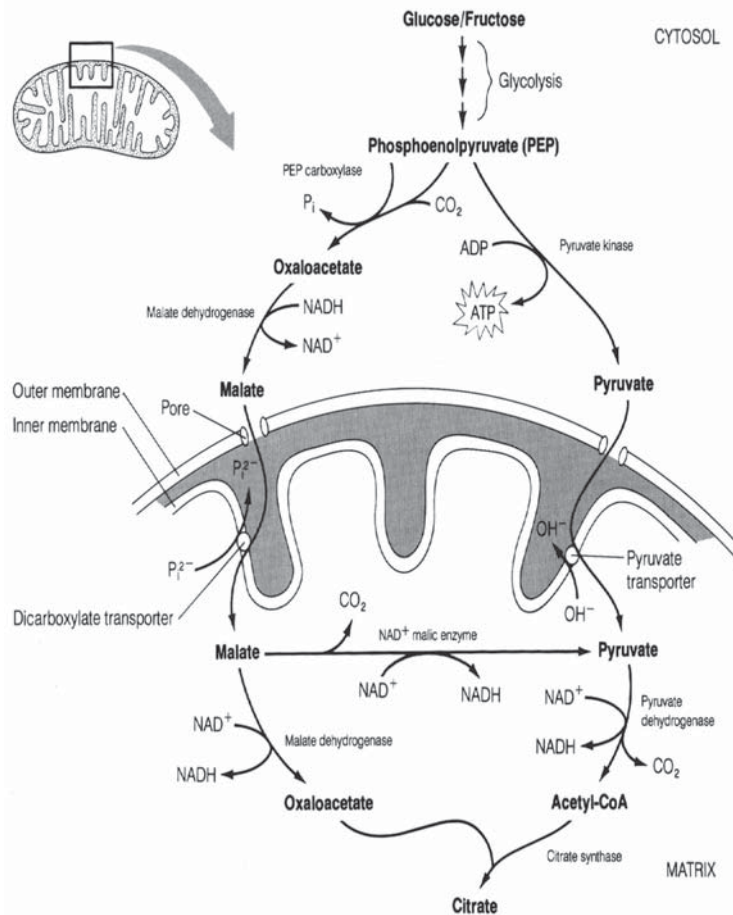
雖然利用作物於田間生產重組蛋白質具有相當多之優點，包括易於擴大生產，生產成本低，生產技術成熟穩定等，以菸草生產重組蛋白質的另一優點為其並非糧食作物，因此不會進入食物鏈。據Larrick氏等(2001)估計，利用作物生產重組蛋白質其成本為利用大腸桿菌系統生產的1/10至1/50，但是田間生產則受到光合作用效率、逆境與不同作物生理狀況影響，影響因素較多。

利用菸草懸浮細胞生產重組蛋白質之優點則為減少田間生產之氣候與病蟲害風險，培養生產技術成熟，然而細胞株之間產量差異頗大，由0.01%-0.3% TSP(total soluble protein)或10-500 $\mu\text{g/g}$ F.W.，仍有改進空間，此外如何使懸浮細胞能在長期培養過程中穩定生產重組蛋白質也是一大挑戰，細胞代謝工程或許是改善細胞株產率穩定性的重要工具。

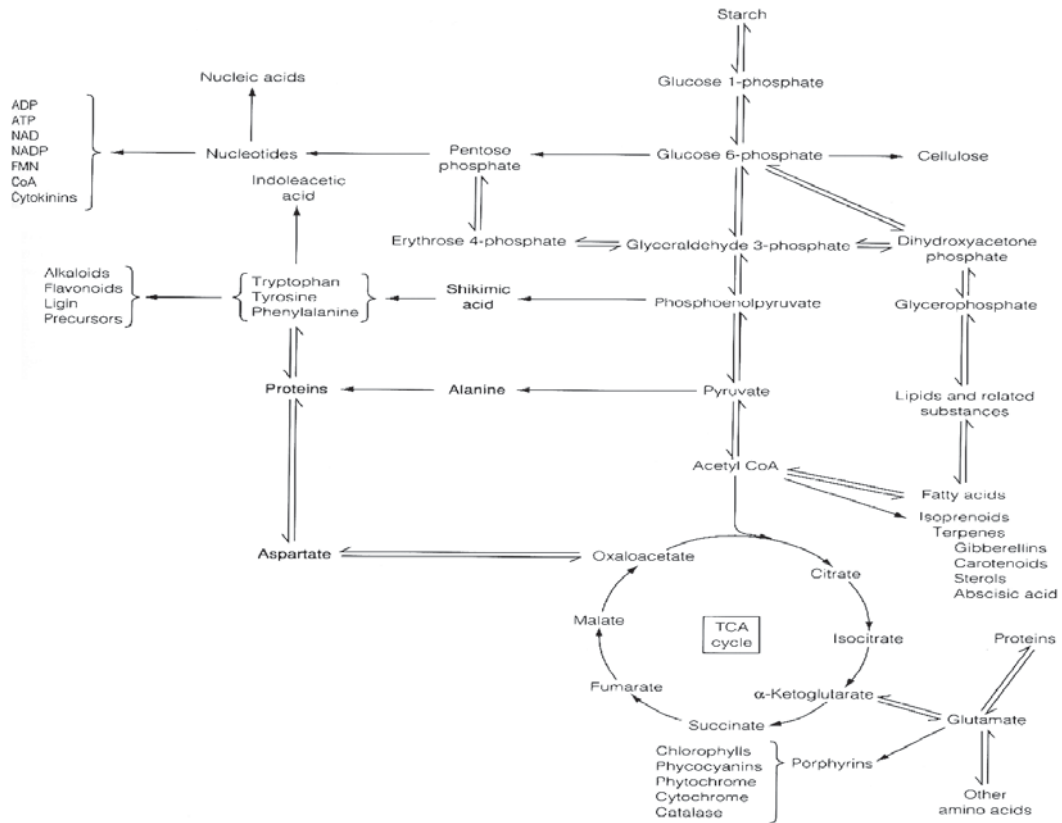
內容

一、影響植物生長主要之代謝活動

影響植物生長的主要代謝活動包括糖解作用以降之TCA循環及光合作用(卡耳文循環)。糖解作用由澱粉的水解生成單醣之葡萄糖，而葡萄糖經由醱解途徑(glycolysis)轉化為pyruvate或malate，兩種代謝物質經由不同代謝路徑進入三羧酸循環(參見圖一)。最後葡萄糖完全氧化成二氧化碳，同時並生成許多前驅代謝物和衍生能量(包括合成氨基酸骨架之 α -ketoglutarate、fumarate和NADH)，其中生成之前驅代謝物可以提供許多植物細胞所需的構造物質例如胺基酸、脂類、二次代謝物等等(參見圖二)。另一方面，累積生成之NADH則可經由粒線體中的呼吸系統(或稱電子傳遞系統)氧化，釋出之游離電子則由氧氣吸收形成水，完成一個氧化還原反應而轉化生成質子驅動力(proton motive force)，這個結合電位能和化學位能之能量可經由細胞膜上的ATP synthase作用轉化為ATP。



圖一、在高等植物細胞中，經由醱分解途徑生成之pyruvate及 malate進入三羧酸循環的相關代謝路徑。(Reprinted from Taiz & Zeiger, 1991)



圖二、在高等植物細胞中，醱解作用和三羧酸循環可提供細胞生長及結構所需的中間代謝物質。(Reprinted from Taiz & Zeiger, 1991)

在Calvin cycle中，一連串複雜的酵素反應可將二氧化碳、水和ribulose 1,5-bisphosphate(RuBP)結合，利用光能合成生成ATP和NADPH，並產生glyceraldehyde 3-phosphate，最後這個含有三個碳原子的中間代謝物(或稱三碳糖)可傳送至葉綠體和細胞質中，分別經由不同的酵素反應路徑而形成澱粉和蔗糖提供生長發育代謝所需。在植物細胞懸浮培養過程中，由於缺乏光合作用之反應，因此，糖解作用、三羧酸循環與呼吸作用成為提供植物成長動力最主要之來源。

很顯然地，營養基質和能量是生物細胞賴以生長的兩大要素，其中碳源可謂是細胞生長所需的最具代表性之營養元素，而碳源經代謝後所衍生出的能量和中间代謝物質(即前驅代謝物)將是支持細胞生長的關鍵因素。綜合上述，植物細胞的基本代謝模式可簡化為：利用光合作用將空氣中的二氧化碳製造出三碳糖和氧氣，三碳糖經由醱生成途徑(gluconeogenesis)合成多糖(如澱粉和蔗糖)儲存，接著分解多糖為六碳糖，經由醱分解途徑分解生成三或四碳糖，再經三羧酸循環反應產生NADH，此NADH經由呼吸作用之電子傳遞鏈將電子傳遞給氧氣形成二氧化碳，同時產生製造植物細胞生命活動所需的ATP。由以上的基本代謝流程中不難

發現，氧氣和碳源的提供對於植物細胞生長發展實具有關鍵性之影響。

二、透明顫菌(*Vitreoscilla* sp)血紅素基因(homodimeric hemoglobin)與大腸桿菌硫氧還原蛋白基因之特性

Vitreoscilla sp. 為好氣性格蘭氏陰性菌(Dikshit and Webster, 1988; Khosla and Bailey, 1988)，研究顯示在氧氣供應受到限制之培養環境下，會產生高量的類血紅素雙體蛋白(VHb, *Vitreoscilla* homodimeric hemoglobin; Chen *et al.*, 1994; Kallio *et al.*, 1994)，此蛋白在雙體構型時對氧氣有高度親和性可截取氧氣以提供代謝所需，反之，當氧氣供應無虞時，此蛋白基因之表達則被抑制。在VHb的兩個單體蛋白之間僅有一個小次單元的蛋白質介面(Tarricone *et al.*, 1997; Giangiacomo *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2002)，顯示此雙體蛋白可以容易地解離成單體，利用膠體過濾層析研究顯示，當總蛋白質含量低時(0.05mg/ml)，約有25-30%為單體，當總蛋白質含量高時(10mg/ml)，則以雙體構形為主。

在利用基因重組大腸桿菌於生物反應器進行蛋白質或其他化合物生產時，氧氣供應不足是限制細胞密度乃至於蛋白質生產之重要因子。而結合VHb之重組菌株可以顯著提高大腸桿菌之密度(Khosravi *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1992; Enayati *et al.*, 1999)、改變生長速率、提高蛋白質產量(Aydin *et al.*, 2001)，提高抗生素產量(Minas *et al.*, 1998)，促進核糖體之合成(Nilsson *et al.*, 1999)，適度添加代謝物或生長所需物質如succinate, yeast extract 等則可顯著促進有機化合物之分解(Nasr *et al.*, 2001)，如benzoic acid, 2,4-DNT(2,4-dinitrotoluene)等。這些促進生長之機制包括了提高ATP、NAD(P)H的利用率，提高細胞呼吸速率，促進氧化酵素之活性，改變氧氣利用性質等(Wei *et al.*, 1998; Frey *et al.*, 2001; Geckil *et al.*, 2001; Youn *et al.*, 2001)。在代謝上之改變則傾向於增加糖解作用(glycolysis)以因應對ATP及其他還原劑如NAD(P)H等增加之需求。

Thioredoxins(硫氧化還原蛋白，trx)是一含雙硫鍵小分子蛋白質，在幾乎所有的生物中皆可以發現，廣泛的作為蛋白質雙硫鍵氧化還原之用，trx藉由可逆的cysteine thiol-disulfide 交換氧化還原機制，將與其接觸的蛋白質還原，本身被氧化之後再由thioredoxin reductase(TR)將之還原(Holmgren, 1989; Broin *et al.*, 2002)。在植物中，硫氧化還原蛋白已知參與相當多的反應過程，包括硫的同化、DNA轉錄、保護光合作用PS II避免氧化傷害(Broin *et al.*, 2002)等。在細菌與酵母菌中，TRX也參與了氧化逆境反應的保護，TRX缺失的酵母菌突變株對於H₂O₂特別敏感(Holmgren and Bjornstedt, 1995)。在動物細胞，TRX被發現可收集來自於磷脂質或脂肪酸的過氧化物如過氧化氫等所產生的free radical(自由基)，避免紅血球或其他細胞遭受攻擊，thioredoxin也被發現關係著癌症細胞成長及保護癌症細胞免於受損和死亡，同時許多轉型細胞都含有高量的thioredoxin，這暗示著即使在不利的生長條件下，thioredoxin仍可以使細胞維持在一個活躍的生長代謝狀況(Arner and Holmgren, 2006)。

三、植物轉殖VHb與TRX基因對植物生長代謝之影響

植物轉殖VHb基因之一主要研究為Holmberg氏等(1997)所揭示，轉殖VHb基因的煙草T₀轉殖植株其葉片葉綠素含量高於對照30-40%，尼古丁含量也增加34%，前述兩者的生合成步驟中都需要氧氣參與，可能原因為VHb基因表達使得與細胞中氧氣有效性較高相關(Bulow *et al.*, 1999)，其他效果包括縮短T₁種子發芽日數以及縮短菸草由種植到開花所需之時間。然而Frey氏等(2004)以該菸草轉殖細胞之T₂種子進行測試則無法獲得相同之效果。筆者檢視此二研究發現，此縮短菸草由種植到開花所需之時間乃與種子較短的發芽日數相關，亦即單獨轉殖VHb基因並無促進轉殖植株生長之效果。Farres與Kallio(2002)進而運用該轉殖菸草之T₂植株葉片誘導懸浮細胞培養後則發現在低氧氣分壓下懸浮培養時，轉殖VHb基因對煙草細胞有促進之效果，在較佳溶氧條件下，轉殖懸浮細胞的生長遲滯期較短。Hägman氏等(2003)則發現轉殖VHb基因的雜交白楊樹其葉片粒線體較對照為大，葉綠體中也累積較多的澱粉，在增加UVB照射下，二次代謝物質如多元酚類化合物也增加，顯示轉殖VHb基因改變了能量代謝。此外，轉殖VHb基因至藥用植物*Hyoscyamus muticus*中發現二次代謝物組成略為改變，但是主成分hyoscyamine含量並不受到影響(Wilhelmson *et al.*, 2006)。

關於轉殖TRX基因對植物之影響方面，Cho氏等(1999)以Hordein啟動子驅動TRX基因於大麥種子中表達，提高了種子中與支鏈澱粉分解的酵素(pullulanase)活性及直鏈澱粉的含量，Wong氏等(2002)則發現TRX在發芽之種子中除了改變上述支鏈澱粉分解酵素之外，也藉由TRX所調節之細胞氧化還原狀態與與胚及糊粉層細胞進行訊息交換。Montrichard氏等(2003)發現TRX基因與發芽中種子積貯養分的代謝與運移利用相關。截至目前為止，TRX在植物中的研究主要仍以與種子發芽及葉片與種子澱粉代謝相關(Balmer *et al.*, 2006)，對於其可能在抗逆境與類似TRX在癌症細胞中的保護作用，以及其他潛在的用途則尚未開發。

對於一般植物而言，C3或C4植物的葉片較薄，因此氧氣易於擴散而不致於限制呼吸作用，然而在貯存性器官如馬鈴薯塊莖及胡蘿蔔塊根中，經實測發現中心部位氧氣分壓較低，呼吸速率亦較低(Salisbury and Ross, 1992)。相對的，以發酵槽懸浮培養菸草細胞時，在細胞中氧氣有效性也將因氧氣對水的溶解度較低而受到限制，進而影響到細胞呼吸作用活性、養份利用效率乃至於蛋白質產量。由上述關於VHb與TRX基因的研究顯示，VHb基因確定可以增加細胞內氧氣的有效性，對於生長的促進效果可能是藉由提供氧氣作為呼吸作用中電子傳遞鏈最終的電子接受者，使細胞能夠有效的利用NADH產生足夠的ATP供細胞生長代謝所需，使糖解作用與TCA循環所產生之NADH不至於因為堆積而產生回饋抑制限制糖解作用之進行，進而有效促進碳水化合物的降解。而TRX基因則可協助清除自由基，以及進行細胞中數十種蛋白質之氧化還原作用，維持細胞正常之氧化還原狀態，避免過度氧化壓力之傷害。

同時表達VHb與TRX基因，或是融合此二基因表達於植物或大腸桿菌則截至目前為止尚未有文獻報導，為了了解前述問題，筆者於先期研究中陸續以Cambia

1302載體分別插入VHb、TRX以及TRX-VHb fusion gene，並分別轉殖至菸草萬國士品種，觀察癒合組織生長之情形，可發現含VHb基因之擬轉殖培植體具有極旺盛之呼吸率、轉殖TRX之擬轉殖培植體則可在已經褐化之液體培養基中長期培養仍維持正常表現型，轉殖TRX-VHb fusion gene之培植體則顯著提高癒合組織之生長($P < 0.001$)，增加單位鮮重之可溶性蛋白質含量達10%($P = 0.062$)。初步推測為VHb基因可有效促進細胞呼吸代謝產生能量，而當氧氣分子接受電子傳遞鏈之電子時，TRX-VHb融合基因或可協助減緩過渡性氧氣自由基(O_2^-)對細胞其他胞器與分子所造成之傷害。然而受限於時間、經費與人力，對此現象無法進行進一步探討。在未來值得進一步探討轉殖VHb、TRX基因，以及融合此二基因後，對於細胞呼吸作用速率變化及其對生長，維持粒線體之活性與減緩老化可能產生之影響，而由其可促進細胞生長達一倍與增加可溶性蛋白質10%之初步成果觀之，極有可能可有效增進重組蛋白質之產量。

結論

生化工程大量運用細胞代謝工程技術，改善生產細胞的代謝特性，其成果已經悄悄的滲入現代生活各個不同層面，從農業、食品、環保、能源與醫療等，例如在環保方面運用加強微生物之乳酸代謝途徑，可以強化乳酸生產作為生物可分解高分子聚乳酸環保塑料的生產，取代塑膠包裝材料。在醫療方面，加強CHO細胞的抗凋亡與蛋白質分泌功能，可以有效提高醫療用重組蛋白質之生產。在農業，加強胡蘿蔔素與葉酸的代謝途徑，可以提高作物胡蘿蔔素及葉酸等之營養成份密度等，運用代謝工程改善生物特性的例子不勝枚舉，本文僅以其中的細胞中間代謝為主，探討如何透過代謝工程技術改變細胞的呼吸代謝，達到促進細胞生長，生產所需物質的效果，未來類似的研發充滿各種想像與可能性。

參考文獻

1. Arner E.S. and A. Holmgren. 2006. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol.* 16(6):420-6.
2. Aydin S, D. A. Webster and B. C. Stark. 2001. Nitrite inhibition of *Vitreoscilla* hemoglobin(VHb) in recombinant *E. coli*: direct evidence that VHb enhances recombinant protein production. *Biotechnol Prog.* 16(6):917-21.
3. Balmer Y., W. H. Vensel, N. Cai, W. Manieri, P. Schürmann, W. J. Hurkman and B. B. Buchanan. 2006. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(8): 2988-2993
4. Broin M., S. Cuine, F. Eymery, and P. Rey. 2002. The Plastidic 2-Cysteine Peroxiredoxin Is a Target for a Thioredoxin Involved in the Protection of the

- Photosynthetic Apparatus against Oxidative Damage. *The Plant Cell* 14, 1417-1432.
5. Bulow L, N. Holmberg, G. Lilius, J. E. Bailey. 1999. The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants. *Trends Biotechnol.* 17(1):21-4.
 6. Chen W, D. E. Hughes and J. E. Bailey. 1994. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog.* 10(3):308-13.
 7. Cho M. J., J. H. Wong, C. Marx, W. Jiang, P. G. Lemaux, and B. B. Buchanan. 1999. Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme(pullulanase) in barley grain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25): 14641-14646.
 8. Chung J. W., D. A. Webster, K. R. Pagilla and B. C. Stark. 2001. Chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in Burkholderia and Pseudomonas for the purpose of producing stable engineered strains with enhanced bioremediating ability. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 27(1):27-33.
 9. Daniell, H, S. J. Streatfield, and K. Wycoff. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in plant Science*, 6(5) 219-226.
 10. Dikshit K.L. and D. A. Webster. 1988. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene.* 70(2):377-86.
 11. Enayati N., C. Tari, S. J. Parulekar, B. C. Stark and D. A. Webster. 1999. Production of alpha-amylase in fed-batch cultures of vgb+ and vgb- recombinant *Escherichia coli*: some observations. *Biotechnol Prog.* 15(4):640-5.
 12. Farres J. and P. T. Kallio. 2002. Improved cell growth in tobacco suspension cultures expressing *Vitreoscilla* hemoglobin. *Biotechnol Prog.* 18(2): 229-233.
 13. Fischer R., N. Emans, F. Schuster, S. Hellwig and J. Drossard. 1999a. Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol Appl Biochem.* 30(2):109-12.
 14. Fischer R., C. Vaquero-Martin, S. M., J. Drossard, E. N. and U. Commandeur. 1999b. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol Appl Biochem.* 1999 30(2):113-6.
 15. Frey A. D., J. E. Bailey and P. T. Kallio. 2001. Expression of *Alcaligenes eutrophus* flavohemoprotein and engineered *Vitreoscilla* hemoglobin-reductase fusion protein for improved hypoxic growth of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 66(1):98-104.
 16. Frey A. D., J. Fiaux, T. Szyperski, K. Wuthrich, J. E. Bailey and P. T. Kallio. 2001. Dissection of central carbon metabolism of hemoglobin-expressing *Escherichia coli* by ¹³C nuclear magnetic resonance flux distribution analysis in microaerobic bioprocesses. *Appl Environ Microbiol.* 67(2):680-7.

17. Frey A. D., B. T. Oberle, J. Farres and P.T. Kallio. 2004. Expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in tobacco cell cultures relieves nitrosative stress in vivo and protects from NO *in vitro*. *Plant Biotechnol. J.* 2(3):221-31.
18. Geckil H, B. C. Stark and Webster. 2001. Cell growth and oxygen uptake of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* are differently effected by the genetically engineered *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *J Biotechnol.* 85(1):57-66.
19. Giangiacomo L, M. Mattu, A. Arcovito, G. Bellenchi, M. Bolognesi, P. Ascenzi and A. Boffi. 2001. Monomer-dimer equilibrium and oxygen binding properties of ferrous *Vitreoscilla* hemoglobin. *Biochemistry.* 40(31):9311-6.
20. Häggman H., A. D. Frey, L. Ryyananen, T. Aronen, R. Julkunen-Tiitto R, H. Tiimonen, K. Pihakaski-Maunsbach, S. Jokipii, S. Chen and P. T. Kallio. 2003. Expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in hybrid aspen(*Populus tremula* × *tremuloides*). *Plant Biotechnology Journal*, 1(4): 287-300.
21. Holmberg N., G. Lilius, J. E. Bailey and L. Bulow. 1997. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nat Biotechnol.* 15(3):244-7.
22. Holmgren, A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. Minireview. *J. Biol. Chem.* 264, 13963-13966.
23. Holmgren, A. and M. Bjornstedt. 1995. Thioredoxin and Thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 252, 199-208.
24. Kallio P. T., D. J. Kim, P. S. Tsai and J.E. Bailey. 1994. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur J Biochem.* 219(1-2):201-8.
25. Kaur R, R. Pathania, V. Sharma, S. C. Mande and K. L. Dikshit. 2002. Chimeric *Vitreoscilla* hemoglobin(VHb) carrying a flavoreductase domain relieves nitrosative stress in *Escherichia coli*: new insight into the functional role of VHb. *Appl Environ Microbiol.* 68(1):152-60.
26. Khosla C and J. E. Bailey. 1988. The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 214(1):158-61.
27. Khosravi M, D. A. Webster and B. C. Stark. 1990. Presence of the bacterial hemoglobin gene improves alpha-amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Plasmid.* 24(3):190-4.
28. Larrick, J.W., L. Yu, C. Naftzger, S. Jaiswal and K. Wycoff, 2001. Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomol Eng* 18, 87-94.
29. Liu S. C., B. Ogretmen, Y. Y. Chuang, B. C. Stark. 1992. Selection and characterization of alpha-amylase-overproducing recombinant *Escherichia coli*

- containing the bacterial hemoglobin gene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 38(2):239-42.
30. Ma, J. K-C., E. Barros, R. Bock, P. Christou, P. J. Dale, P. J. Dix, R. Fisher. J. Irwin., R. Mahoney, M. Pezzoti, S. Schillberg, P. Sparrow, E. Stoger. and R. M. Twyman. 2005. Molecular farming for new drugs and vaccines. *EMBO reports* 6(7):593-599.
31. McGrath P. 2006. Molecular farming - Tobacco's future? [<http://www.molecularfarming.com/tobacco.html>]
32. Minas, W. P. Brunker, P. T. Kallio, J. E. Bailey. 1998. Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea*. *Biotechnol. Prog.* 14, 561-566
33. Montrichard F., M. Renard, F. Alkhalifioui, F. D. Duval, D. Macherel. 2003. Identification and Differential Expression of Two Thioredoxin h Isoforms in Germinating Seeds from Pea. *Plant Physiol.* 132(3): 1707-1715.
34. Nasr M. A., K. W. Hwang, M. Akbas, D. A. Webster and B. C. Stark. 2001. Effects of culture conditions on enhancement of 2,4-dinitrotoluene degradation by *Burkholderia* engineered with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Biotechnol Prog.* 17(2):359-61.
35. Nilsson M., P. T. Kallio, J. E. Bailey, L. Bulow and K. G. Wahlund. 1999. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli* enhances ribosome and tRNA levels: a flow field-flow fractionation study. *Biotechnol Prog.* 1999 Mar-Apr;15(2):158-63.
36. Schillberg S., R. Fischer and N. Emans. 2003. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Mar;60(3):433-45.
37. Tarricone C, A. Galizzi, A. Coda, P. Ascenzi, M. Bolognesi. 1997. Unusual structure of the oxygen-binding site in the dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* sp. *Structure.* 5(4):497-507.
38. Wei M.L., D. A. Webster and B. C. Stark. 1998. Metabolic engineering of *Serratia marcescens* with the bacterial hemoglobin gene: alterations in fermentation pathways. *Biotechnol Bioeng.* 59(5):640-6.
39. Wilhelmson, A., S. T. Haikkinen, P. T. Kallio, K.-M. Oksman-Caldentey, and A. M. Nuutila. 2006. Heterologous Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin (VHb) and Cultivation Conditions Affect the Alkaloid Profile of *Hyoscyamus muticus* Hairy Roots.
40. Wong J. H., Y. B. Kim, P. H. Ren, N. Cai, M. J. Cho, P. Hedden, P. G. Lemaux and B. B. Buchanan. 2002. Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(25):16325-30.
41. Youn M. J., Y. Y. Choi, K. I. Park. 2001. Characterization of an inducible oxidative stress response in *Vitreoscilla* C1. *Mol Cells.* 11(2):204-12.