

재조합 트레할로스 합성효소에 의한 맥아당으로부터 트레할로스 생산 최적화

조연정·고석훈·¹이대실·†신현재
한국생명공학연구원 바이오벤처센터 (주)엔지뱅크, ¹한국생명공학연구원 미생물유전체 연구실
(접수 : 2002. 10. 20., 게재승인 : 2003. 1. 27.)

Optimization of Production of Trehalose from Maltose using Recombinant Trehalose Synthase from *Thermus caldophilus* GK24

Youn-Jeung Cho, Suk-Hoon Koh, Dae-Sil Lee¹, and Hyun-Jae Shin†
EnzBank, Inc., 309 Bioventure Center (BVC), KRIBB, Yusong, Daejeon 305-333, Korea
¹Microbial Genomics Research Unit,
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB), Yusong, Daejeon 305-333, Korea
(Received : 2002. 10. 20., Accepted : 2003. 1. 27.)

Recombinant trehalose synthase from *Thermus caldophilus* GK24 showed an ability to produce trehalose from maltose. The activity of the partially purified enzyme was not influenced by most metal ions at 1 mM but was inhibited by 10 mM Co²⁺, Mn²⁺, and Fe²⁺. Enzyme activity varied during prolonged reaction due to changes in the environmental conditions. Thus, the reaction was carried out for an extended time with optimized conditions of 45°C and pH 7.0. An yield of 32.9 % was reached at 60°C after reaction for 22 h, and, maximum trehalose conversion (69.2 %) was attained at 25°C. The yields obtained using enzyme dosages of 10, 25, and 50 U/g were 62.3, 62.3 and 59.0 %, respectively, though the initial conversion rate was higher when the higher dose was used. Similar profiles of trehalose production yields were observed with reaction working volumes of 10 ml to 2,000 ml.

Key Words : Trehalose, trehalose synthase, *Thermus caldophilus*, enzyme reaction

서 론

트레할로스(D-glucopyranosyl-1,1-D-glucopyranoside)는 세균, 효모, 곰팡이, 식물, 곤충, 동물 등에 있어 저장탄수화물의 형태로 널리 자연계에 존재하며 그 구조는 두 개의 포도당이 (1,1) 결합으로 이루어진 세 종류(α - α , α - β , β - β)의 이성질체를 갖는 비 환원성 이당류 이다(1-4). 트레할로스의 기능적 특성으로는 설탕의 50 % 정도의 감미도, 내열성 및 내산성, 결정성, 난흡수성, 영양성, 저충치성, 전분노화방지, 단백질변성 방지, 비착색성, 보습성 등이 있다(4-7). 이런 여러 가지 특성들로 인해 식품, 화장품, 의약품 등의 매우 넓은 범위에서 다양

하게 사용 되고 있다(8,9). 종래 트레할로스의 일반적인 생산법은 효모균체에 있는 것을 추출하는 방법과 아미노산 발효 미생물에 의한 발효 생산 등이 있다(10-12). 이는 이물질들을 제거하기 위해 부가적으로 분리정제 공정이 요구되므로 생산성이 낮고 생산가가 너무 높아 각 분야에서 산업체제로 활용하기에는 곤란하였다. 그러나 최근 토양 미생물로부터 트레할로스를 생산하는 효소가 발견되면서 많은 연구자들에 의해 트레할로스 생산 연구가 활발히 진행되어지고 보고 되어져 왔다(13-16). 그러나 효소 조제 및 트레할로스 생산 수율(40 - 60 %)이 문제가 되어 이를 개선할 수 있는 연구는 계속적으로 요구 되어 지고 있다(17,18). 트레할로스를 생산하는 효소들로서는 maltose phosphorylase(18), trehalose phosphorylase(19), maltooligosyl trehalose trehalohydrolase(13), maltooligosyl trehalose synthase(14), glycosyltransferase(15), trehalose synthase(16) 등이 있다. 이번 연구에 사용될 trehalose synthase는 맥아당을 분자내 전이반응을 통해 트레할로스로 전환시키는 효소로서 일명 맥아당 전환효소라고 불린다. 이 반응 중에

† Corresponding Author : EnzBank, Inc., 309 Bioventure Center (BVC), KRIBB, Yusong, Daejeon 305-333, Korea
Phone: +82-42-864-0057
Fax: +82-42-864-0058
E-mail: shinhj@enzbank.com

맥아당의 일부는 포도당과 α - β 트레할로스로 전환되기도 한다. 분자내 전이반응은 평형반응으로서 기질로써 트레할로스를 넣어서 맥아당이 생성되기도 한다(20,21). 그러나 전반적인 평형은 트레할로스 생산 쪽으로 기울어져 있다. 이 효소를 생산하는 미생물로는 *Thermus caldophilus* GK24 (21), *Thermus aquaticus* ATCC33923 (22), *Pimelobacter* sp. R48 (23), *Pseudomonas putida* H262 (24) 등이 알려져 있다. 미생물 내에 존재하는 trehalose synthase 유전자는 일반적으로 ost 혹은 tre-operon의 형태로 존재하는 것으로 알려져 있으며 해당 유전자는 아밀라제를 비롯한 탄수화물 관련 유전자와 매우 높은 상동성을 나타낸다. 상기한 미생물들 가운데 *Thermus* sp.는 산업용 효소가 요구하는 높은 활성과 안정성(온도, pH)을 지니는 효소의 생산을 위한 모 균주로 매우 적합하다고 할 수 있다(25).

본 연구에서는 맥아당을 기질로써 *T. caldophilus* 유래의 trehalose synthase을 이용한 트레할로스 생산에 있어 효소반응 조건들을 최적화하여 트레할로스 생산을 극대화하기 위한 방법을 제시하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

맥아당과 트레할로스를 비롯한 모든 당들은 Sigma사의 것을 사용하였다. Silica gel resin은 Aldrich chemical사 것을 구입하였다. 그 밖의 칼슘, 구리, 마그네슘, 망간, 아연, 철 등과 같은 화학물질 및 시약은 일급시약을 사용하였다.

효소 생산 및 부분 정제

본 실험에서 사용한 효소는 *Thermus caldophilus* GK24 유래의 trehalose synthase 유전자가 *E. coli* MV1184에서 클로닝되고 발현된 것이다. 트레할로스 합성 유전자는 2895 base pairs로 구성되어 있으며, 965 아미노산 잔기의 polypeptide로 암호화 되어있다. 트레할로스 생산균주는 유도성 프로모터 체계에 의해 trehalose synthase 발현조절이 가능한 pTSTRC를 *E. coli* MV1184에 형질 전환시킨 재조합 대장균을 사용하였다(26). 재조합된 *E. coli*는 100 μ g/ml ampicillin이 포함된 LB배지에서 진탕배양(200 rpm)으로 37 $^{\circ}$ C에서 배양되었다. 세포 성장이 600 nm에서 흡광도 0.5-0.7에 도달하였을 때 배지 내에 유도물질인 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 0.5 mM을 첨가하였고 그 후 21시간 동안 배양하였다. 배양액을 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 배양 상층액은 제거하고 나머지 세포들은 분쇄기에 의해서 파쇄 되었으며 분쇄잔여물들은 원심분리에 의해 제거되었다. 얻어진 crude enzyme를 75 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 30분간 열처리하여 변성된 단백질을 원심분리에 의해 제거하고 그 상층액을 부분 정제된 효소로 실험에 이용하였다.

효소활성 측정

Trehalose synthase의 활성은 1 % 맥아당을 기질로써 63 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응하고 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓여서 반응을 정지시킨 후 Bio-LC(bio-liquid chromatography, Dionex CO., USA) 분석을 통해 확인하였으며, 효소 1 U는 1분당 맥아당

으로부터 전환되는 트레할로스 1.0 μ mol 수로 정하였다.

효소반응

트레할로스 반응은 20 ml screw capped tubes에서 수행하였다. 효소의 초기 반응 pH를 조사하기 위해 1 % 맥아당, 20 mM 완충 용액 pH 4 - 11(Sodium acetate buffer 4-5, Potassium phosphate buffer 6-8, CAPS buffer 9-11), 효소액이 첨가된 반응액을 온도 63 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 효소반응 온도 조사를 위해 1 % 맥아당, 20 mM 인산화칼륨 완충 용액 pH 7.0, 효소액이 첨가된 반응액을 25 - 90 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 미량원소들이 미치는 효과를 조사하기 위해 1 % 맥아당, 20 mM 인산화칼륨 완충 용액(pH 7.0), 10.1 mM metal ions, 효소액이 첨가된 반응액을 63 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 기질농도별 반응을 위해 50 - 0.5 g/l 맥아당, 20 mM 인산화칼륨 완충 용액 pH 7.0, 효소액(21 U/g substrate)이 첨가된 반응액을 45 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 반응시켰다. 온도별 반응을 위해 1 g/l 맥아당, 20 mM 인산화칼륨 완충 용액 pH 7.0, 효소액(18 U/g substrate)이 첨가된 반응액을 저온에서 고온까지 25, 40, 60 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 반응시켰다. 효소양에 따른 반응을 위해 1 g/l 맥아당, 20 mM 인산화칼륨 완충 용액 pH 7.0, 효소액 10, 25, 50 U/g substrate 이 첨가된 반응액을 40 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 반응시켰다. 일정시간 간격으로 반응물을 회수하여 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓임으로써 반응을 정지시킨 후 Bio-LC분석을 통하여 정량화 하였다.

분석방법

효소활성의 측정 및 반응산물 정량화는 CarboPacTM PA-1 분석용 컬럼(Dionex, 250 \times 4 mm)과 guard 컬럼(Dionex, 50 \times 4 mm)을 사용하여 25 $^{\circ}$ C에서 electrochemical detector (ED40)와 함께 Bio-LC(Dionex) system에 의해 분석되었다. 이동상 용매는 200 mM NaOH, 300 mM NaOAc + 100 mM NaOH, H₂O의 세가지 혼합용액으로 분당 1 ml 유속으로 전개된다. 본 효소반응에 의해 생성된 트레할로스, 맥아당, 글루코오스를 분리하여 분획별 확인을 위하여 TLC분석법을 이용하였다. TLC plate로는 silica gel 60 TLC(Merck, 20 \times 20 cm aluminium sheet)를 사용하였으며, 이 plate에 효소반응산물 1 μ l을 점적하여 propanol : acetone : acetic acid (2 : 2 : 1) 혼합용매로 전개하고 건조한 후 발색제(methanol 용매에 2 % 황산)를 뿌려 100 $^{\circ}$ C에서 가열하여 발색시켰다.

결과 및 고찰

*E. coli*로부터 재조합 Trehalose synthase의 생산

Fig. 1은 1-L shake flask에서 *T. caldophilus* GK24 유래의 trehalose synthase 유전자가 삽입되어 재조합된 *E. coli*로부터 trehalose synthase 생산에 대한 전형적인 시간별 양상을 나타낸 것이다. 세포의 성장은 시간에 따라 증가하였으며 배양 24시간에서 최대를 나타내었고, 세포 내 효소 활성은 배양 11시간, IPTG 유도물질 첨가 후 7시간에서 가장 높은 활성(약 2.7 U/ml)을 나타내었다. 그 후 효소 활성은 감소하기 시작하였다.

초기 효소반응 조건

트레할로스 생산을 위한 효소반응에 영향을 미치는 초기 조건들을 최적화하기 위해 부분 정제(열처리)된 효소액을 사용하여 맥아당으로부터 trehalose synthase 반응을 수행하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 최적 pH는 7.0이고 pH 6.0 - 9.0 까지 안정함을 나타내었다. 이 결과는 Nishimoto 등이 보고한 trehalose synthase의 안정한 pH범위(6.0-9.0)와 같은 양상을 나타내었다(23). 또한 트레할로스 생산에 영향을 미치는 초기 효소 반응에 있어 최적 온도는 45°C 이고 반응 온도 20 - 65°C까지는 안정하였다(Fig. 2). 이 결과는 *T. aquaticus* 유래의 정제된 효소반응 결과인 30 - 40°C보다는 다소 높았다(22). 효소반응에 보조 인자로써 작용하기도 하고 또는 저해제로 작용하기도 하는 미량원소의 영향은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} 는 50% 이상 반응성을 저해하였으며, 1 mM의 농도에서는 대부분의 금속에 의한 영향은 없었다(data not shown). Saito 등은 trehalose synthase는 효소활성에 있어 양이온을 요구하지 않는다는 결과를 보고한 바 있다(27).

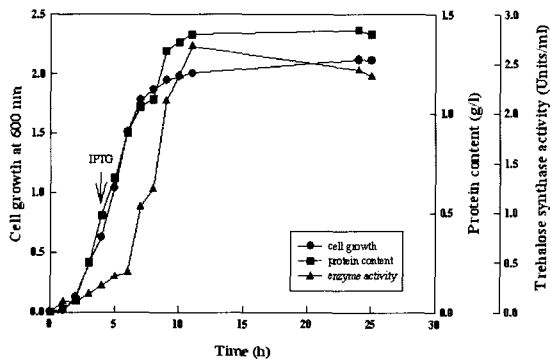


Fig. 1. Typical time profiles of cell growth and intracellular enzyme production from recombinant *E. coli* in shake flask culture.

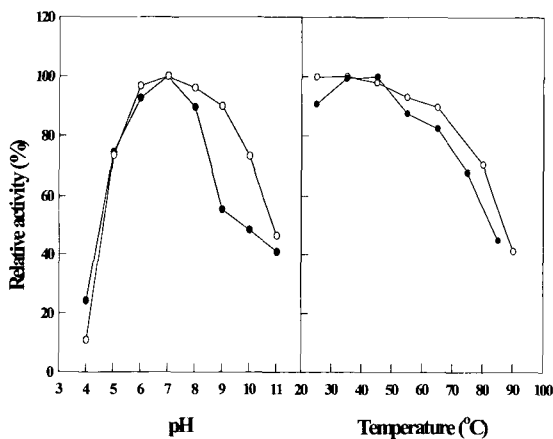


Fig. 2. Effect of pH(●), temperature(●), pH stability(○) and thermal stability (○) on trehalose synthase activity.

기질농도에 따른 효소반응

트레할로스 대량 생산을 위한 효소 반응 최적화를 위해 trehalose synthase의 반응 기질농도의 효과를 조사하여 보았다.

부분 정제된 효소액을 사용하여 맥아당으로부터 트레할로스 생산을 수행하였다. 그 결과 Fig. 4와 Table 1에서와 같이 저농도의 기질에서 트레할로스 생산 전환률이 증가하였다. 1 g/l의 기질농도에서 전환률은 65%로 가장 높았다. 그러나 20 g/l이상의 기질 농도에서는 트레할로스 전환률이 40% 이하로 나타났다(Data not shown). Nishimoto 등이 *Pimelobacter* sp. 유래의 효소반응에 있어 기질반응농도에(2.5 - 40%) 크게 영향을 받지 않는다고 보고한 바와 상이한 결과를 나타냈다(23). 한편 이 결과에서 기질농도와 관계없이 기질인 맥아당이 일정량(30%) 이하로는 더 이상 소비되지 않는 양상을 나타내었으며, 기질농도가 증가할수록 글루코오스 생성량이 증가함을 볼 수 있었다(Table 1).

Table 1. Carbohydrate composition during trehalose production by trehalose synthase from *Thermus caldophilus* GK24 under various concentrations of maltose^b

Carbohydrates	Composition ^a (% w/w)			
	0.5 g/l	1 g/l	3 g/l	5 g/l
Maltose	32.4	33.0	30.8	28.4
Trehalose	63.8	65.2	57.2	48.4
Glucose	3.8	1.8	12	23.2

^a Compositions given refer to the maximum trehalose yield.

^b Initial reaction pH: 6-7

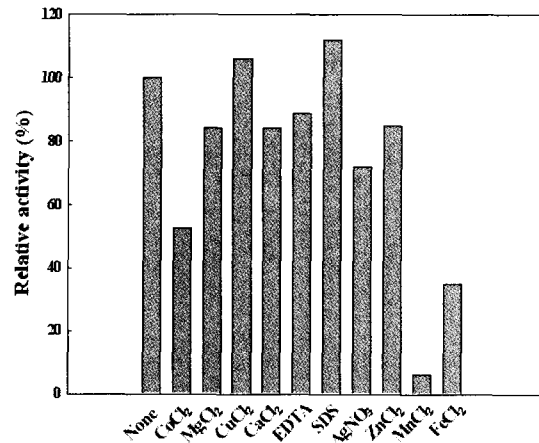


Fig. 3. Effect of metal ions(10 mM) on trehalose synthase activity.

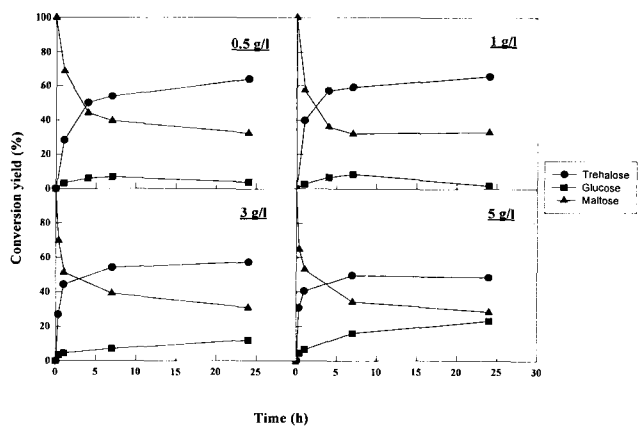


Figure 4. Effect of substrate concentration on the production of trehalose.

몇몇 연구자들에 의해서 trehalose synthase는 맥아당으로부터 트레할로스를 생산하거나 맥아당, 트레할로스로부터 소량의 글루코오스를 생성하기도 한다고 보고 되어져 왔다 (16,23). 대량생산에 있어서는 기질농도가 낮을 때 전환율이 높긴 하지만 생산수율이나 오염의 위험을 고려하여 기질농도를 좀더 높여 효소반응에 이용하여야 한다고 사료된다. 그리고 요구되어지는 트레할로스 생산 수율에 따라 기질농도를 변화하여 알맞은 공정을 수립하는 것에 본 자료는 활용되어 질 수 있을 것이다.

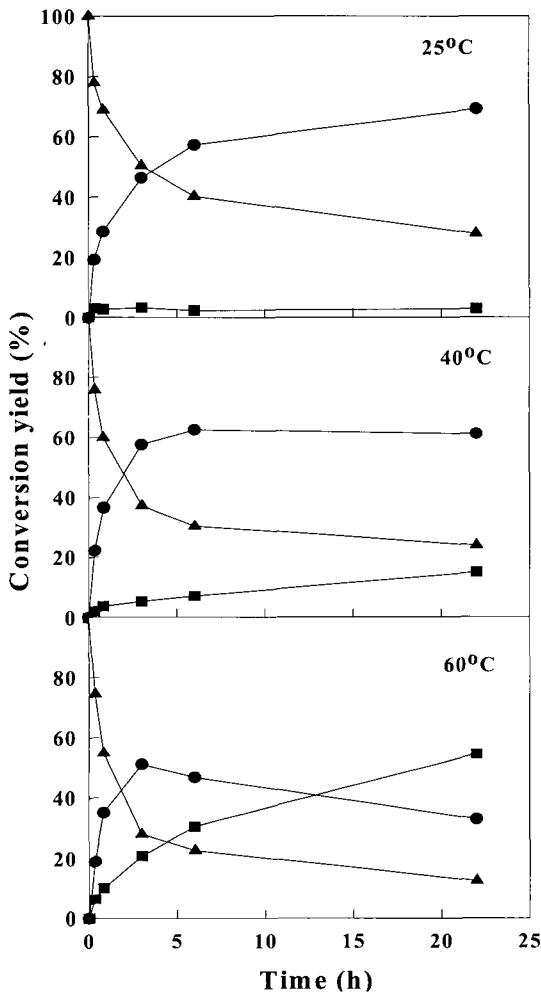


Figure 5. Effect of reaction temperature on the production of trehalose. symbol: trehalose(●), maltose(▲), glucose(■)

온도에 따른 효소반응

트레할로스 생산에 있어서 효소반응 조건 최적화를 위해 trehalose synthase의 반응 온도의 효과를 조사하여 보았다. 부분 정제된 효소액을 사용하여 맥아당으로부터 트레할로스 생산을 수행하였다. 그 결과 본 효소 반응의 가장 중요한 인자 중 하나는 온도임을 재차 검증 할 수 있었다. Fig. 5 와 Table 2에서 나타내는 바와 같이 저온인 25°C에서 반응 안정성 및 트레할로스로의 전환율이 증가함을 알 수 있으며 고온의 경우 초기 반응 속도는 좋으나 시간이 지날수록 트레할로

스로의 전환보다 글루코오스로의 생성률이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5). 반응 온도 25°C와 40°C에서 최종 트레할로스의 양은 69.2 와 61.1 %로 다소 유사하나 60°C에서 32.9 %로 많은 차이를 나타내었다(Table 2). 초기 효소 반응에서는 65°C까지는 트레할로스 생성량에 차이가 없었으나 장시간 고온에서 반응 할 경우 글루코오스 생성량이 증가하게 되어 트레할로스의 양이 상대적으로 감소하게 됨을 알 수 있었다. 트레할로스 생산에 있어 산업적으로 이용하기 위해서는 비교적 안정하고 오염 우려를 고려해 중온인 40°C에서의 반응이 효율적인 것으로 사료된다.

Table 2. Carbohydrate composition during trehalose production by recombinant trehalose synthase at different temperatures^{b,c}

Carbohydrates	Composition ^a (% , w/w)		
	25°C	40°C	60°C
Maltose	27.9	23.9	12.6
Trehalose	69.2	61.1	32.9
Glucose	2.9	15	54.5

^a Compositions of carbohydrates after enzyme reaction
^b Initial reaction pH: 6-7
^c Initial substrate concentration: 1g/l

효소 양에 따른 효소반응

효소 반응조건 최적화를 위해 trehalose synthase의 양에 따른 효과를 조사하여 보았다. 부분 정제된 효소액을 사용하여 맥아당으로부터 트레할로스 생산을 수행하였다. 그 결과 Fig. 6 와 Table 3에서 나타내는 바와 같이 효소 양이 증가할수록 초기 반응 속도는 증가하나 최종 생산수율은 10, 25, 50 U/g의 효소 양에 따라 각각 62.3, 62.3, 59 %로 유사하게 나타났다. 10 U/g 과 50 U/g의 효소 양으로 반응한 결과를 비교하여 볼 때 최종 트레할로스 생산수율에 이르는 시간이 6배나 앞당겨 짐을 알 수 있었다(Fig. 6). 이는 트레할로스 생산을 산업적으로 적용시킬 때 앞에서 최적화한 조건들과 각각 고려하여 시간 및 생성량을 조절할 수 있으리라 사료된다.

Table 3. Carbohydrate composition during trehalose production by recombinant trehalose synthase with different enzyme dosage

Carbohydrat	Composition ^a (% , w/w)			
	es	10 Units/g substrate	25 Units/g	50 Units/g
Maltose		29.2	28.7	26
Trehalose		62.3	62.3	59
Glucose		8.5	9.0	15

^a Compositions of carbohydrates after enzyme reaction
^b Initial reaction pH: 6-7
^c Initial substrate concentration: 1g/l

트레할로스 대량 생산

앞서서 효소반응의 최적화된 조건 아래 효소반응의 크기를 증대시키기 위해 기질의 농도, 온도, 효소의 양을 고려하여 온도 40°C, 효소 양은 26 U/g, 맥아당의 초기농도는 2.5, 10 g/l로 5-L bioreactor에서 2-L 반응액으로 수행하였다. 그 결과 시간에 따른 반응산물 조성을 보면 트레할로스의 생산수율은 기질농도 2.5, 10 g/l일 때 각각 62, 58 %로 소규모 반응(10 ml 미만)의 경우와 큰 차이가 없음을 알 수 있으며(Fig. 7), Maruta 등에 의하면 *Arthrobacter* sp. 유래 효소에 의해 총

당의 40 %의 트레할로스 생산을 보고한 바에 비해 향상된 생산 수율을 나타내었다(17).

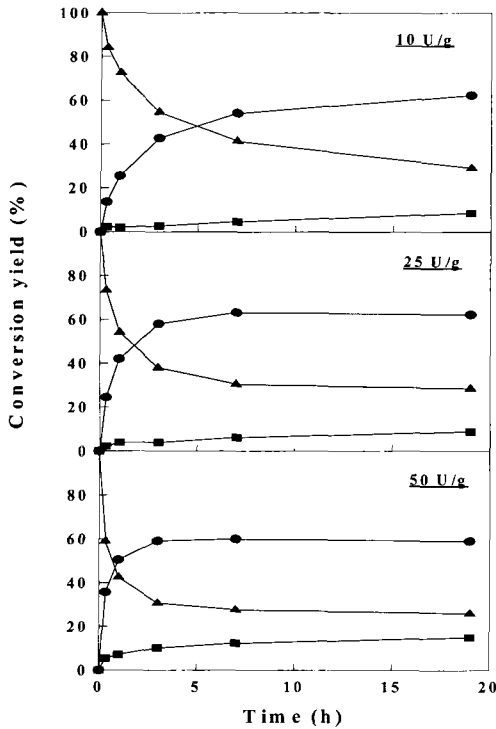


Figure 6. Effect of enzyme dosage on the production of trehalose. symbol: trehalose(●), maltose(▲), glucose(■)

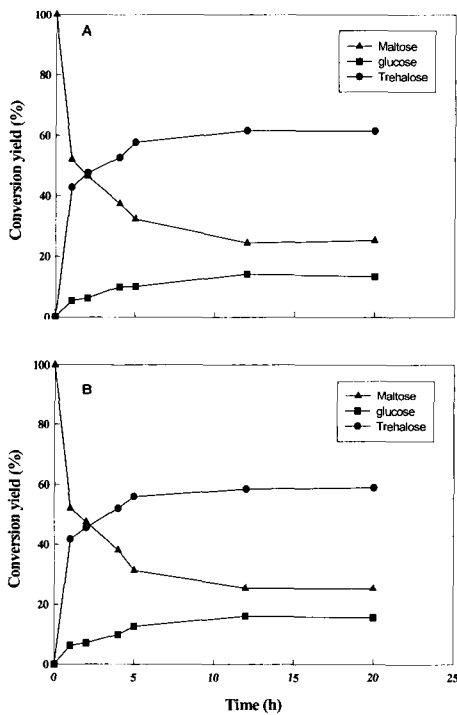


Figure 7. Time profile of carbohydrate composition on enzyme reaction at 5-L bioreactor under optimized condition. Substrate concentration: (A) 2.5 g/l, (B) 10 g/l

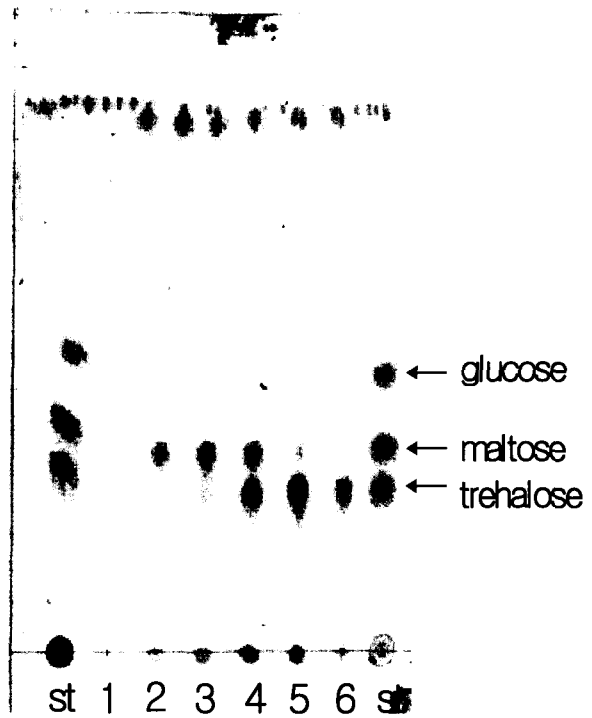


Figure 8. Thin layer chromatogram of isolated fractions by silica gel column chromatography with the production after enzyme reaction(st: standard marker, Numbers: fraction numbers).

트레할로스의 분리 정제

Silica gel column을 이용하여 trehalose synthase 반응산물의 분리를 시도하였다. 분리에 사용한 silica gel resin은 200 - 400 mesh, pore volume 0.75 cm³/g (Aldrich chemical사 제조)였으며 조업은 상온에서 실행하였다. 유속은 1-2 ml/min이었으며 이동상은 혼합 유기용매(propanol: acetone: acetic acid = 4:4:1)를 사용하였다. 시료는 컬럼 총 부피의 1 %를 loading하였으며 당 농도는 최고 30 % (w/v)까지 이용하였다. 분획된 시료의 분석은 총당의 분석에 phenol-sulfuric acid법과 분리능의 확인에 박막크로마토그래프(propanol: acetone: acetic acid = 2:2:1)를 이용하였다. 분리에 사용된 당 혼합물은 트레할로스 43 %, 맥아당 42 %, 글루코오스 15 %의 합성 혼합물을 사용하였다. 분리 유속은 분당 2 ml 이하는 적합함을 알 수 있었다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 글루코오스, 맥아당, 트레할로스 순으로 분리됨을 TLC에 의해 확인하였다(Fig. 8). 효소반응에 의한 반응산물 중에 트레할로스는 이상과 같이 비교적 간단한 방법으로 분리가 가능하여 산업적으로 적용할 때 유용할 것으로 사료된다.

요약

재조합 trehalose synthase 반응을 통하여 트레할로스를 생산하였고, 그 반응조건의 특성들을 조사하고 트레할로스를 정제하였다. 초기 효소반응 조건으로 최적화된 45°C, pH 7.0 를 기본으로 하여 트레할로스 생산을 극대화하기 위해 반응 조건들을 장시간 동안 수행하여 조사하였다. 기질농도는 저농도인 1 g/l에서 가장 높은 65.2 % 트레할로스 생산수율을

나타내었다. 초기 효소 반응에서는 65℃까지는 트레할로스 생성량에 차이가 없었으나 장시간 60℃에서 반응할 경우 트레할로스 생성률은 32.9 %로 상당히 낮은 생성률을 나타내었다. 반면 25℃에서 반응할 경우 최대 69.2 %의 트레할로스 생성량을 보였다. 효소 양에 따른 트레할로스 최종 생산 수율은 10, 25, 50 U/g의 효소 양에 따라 각각 62.3, 62.3, 59 %로 유사하였으나 최종 트레할로스 생산수율에 이르는 시간이 최대 6시간 앞당겨 짐을 알 수 있었다. 효소반응 크기를 2-L로 증가 시켜 반응하였을 때 그 양상을 조사한 결과 소규모 반응(10 ml 미만)의 경우와 큰 차이가 없이 트레할로스 생성량은 60 % 내외였다. 따라서 이 결과들을 통하여 본 효소를 이용한 트레할로스 생산은 비교적 산업적으로 적용이 용이 할 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 산업자원부 한국기술평가원에서 시행한 2002년도 신기술창업보육(TBI)사업의 기술 개발 과제 연구비로 집행되었으며, 이에 감사합니다.

REFERENCES

- Elbein, A. D. (1974), The metabolism of α,α -trehalose, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**, 227-256.
- Maraught, A. D. (1997), Nomenclature of carbohydrates, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **52**, 43-177.
- Singer, M. A. and S. Lindquist (1998), Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose, *TIBTECH* **16**, 460-468.
- Birch G. G. (1963), Trehaloses, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **18**, 201-225.
- Paiva, C. L. A. and A. D. Panek (1996), Biotechnological applications of the disaccharide trehalose, *Biotechnol. Ann. Rev.* **2**, 293-314.
- Carpenter, J. F. and J. H. Crowe (1988), Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation, *Cryobiology* **25**, 459-470.
- Rudolph, A. S. and J. H. Crowe (1985), Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline, *Cryobiology* **22**, 367-377.
- Colaco, C., S. Sen, M. Thangavelu, S. Pinder, and B. Roser (1992), Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology, *BioTechnology* **10**, 1007-1011.
- Roser, B. (1991), Trehalose, a new approach to premium dried foods, *Trends Food Sci. Technol.* **2**, 166-169.
- Coutinho, C. C., E. Bernardes, D. Felix, and A. D. Panek (1988), Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains, *J. Biotechnol.* **7**, 23-32.
- Miyazaki, J., K. Miyagawa, and Y. Sugiyama (1993) November, Process for production of trehalose, Japan Kokai Tokkyo Koho (Japan patent) JP05292986.
- Tsuchida, T., Y. Murakami, and Y. Nishimoto (1993) August, Process for production of trehalose by *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, and *Arthrobacterium*. Japan Kokai Tokkyo Koho (Japan patent) JP05211882.
- A. Tabuchi, T. Mandai, T. Shibuya, M. Kubota, S. Fukuda, T. Sugimoto, and M. Kurimoto (1995), Formation of trehalose from starch by novel enzymes, *J. Appl. Glycosci.* **42**, 401-406.
- H. Chaen, K. Maruta, T. Nakada, T. Nishimoto, T. Shibuya, M. Kubota, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka (1996), Two novel pathways for the enzymatic synthesis of trehalose in bacteria, *J. Appl. Glycosci.* **43**, 213-221.
- K. Kobayashi, M. Kettoku, Y. Miura, M. Kato, T. Komeda, and A. Iwamatsu (1996), Production of trehalose by new trehalose-producing enzymes from Archae, *J. Appl. Glycosci.* **43**, 203-211.
- T. Nishimoto, M. Nakano, S. Ikegami, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka (1995), Existence of a novel Enzyme converting maltose into trehalose, *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 2189-2190.
- 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, *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1829-1834.
- M. Yoshida, N. Nakamura, and K. Horikoshi (1998), Production of trehalose by a dual enzyme system of immobilized maltose phosphorylase and trehalose phosphorylase, *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 71-75.
- Klimacek, M., C. Eis, and B. Nidetzky (1999), Continuous production of α,α -trehalose by immobilized fungal trehalose phosphorylase, *Biotechnol. Tech.* **13**, 243-248.
- H. J. Shin, S. H. Koh, and D. S. Lee (1999), Production of trehalose using *Thermus* enzyme, *Korean Institute of Chemical Engineers/Division of Biochemical Engineering and Biotechnology* **13**, 25-31.
- H. J. Shin, S. H. Koh, and D. S. Lee, and S. Y. Lee (1998), Trehalose synthesis from maltose by a thermostable trehalose synthase from *Thermus caldophilus*, *Biotechnol. Lett.* **20**, 757-761.
- T. Nishimoto, T. Nakano, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka (1996), Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*, *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 835-839.
- T. Nishimoto, M. Nakano, T. Nakada, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka (1996), Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48, *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 640-644.
- T. Sugimoto, (1995), Production of trehalose by enzymatic conversion from starch, *Bioscience and Bioindustry* **53**, 25-27.
- F. Nihaus, C. Bertoldo, M. Kahler, and G. Antranikian (1999), Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 711-729.
- Koh, S. (1998), Studies on Trehalose Synthase from *Thermus caldophilus* GK24, Ph.D. Thesis, Dept. Agric. Chem., Korea University, Seoul.
- K. Saito, T. Kase, E. Takahashi, E. Takahashi, and S. Horinouchi (1998), Purification and characterization of a trehalose synthase from the *Basidiomycete* *Grifola frondosa*, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4340-4345.