

Thermus thermophilus HJ6 유래 내열성 Trehalose Synthase의 유전자 클로닝 및 발현

김현정¹ · 김한우³ · 전승종^{1,2*}

¹동의대학교 바이오품질제어학과, ²동의대학교 생명공학과, ³일본 산업기술종합연구소

Gene Cloning and Expression of Trehalose Synthase from *Thermus thermophilus* HJ6. Kim, Hyun-Jung¹, Han-Woo Kim³, and Sung-Jong Jeon^{1,2*}. ¹Department of Biomaterial Control (Brain Korea 21 program), ²Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ³Research Institute of Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Osaka, 563-8577, Japan – A hyperthermophilic bacteria (strain HJ6) was isolated from a hot springs located in the Arima-cho, Hyogo, Japan. The cells were long-rod type (2-4 μm), about 0.4 μm in diameter. The pH and temperature for optimal growth were 6.5 and 80°C, respectively. Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA sequence and biochemical studies indicated that HJ6 belonged to the genus *Thermus thermophilus* (Tt). The gene encoding the Trehalose synthase (TS) was cloned and sequenced. The open reading frame (ORF) of the *TtTS* gene was composed of 2,898 nucleotides and encoded a protein (975 amino acids) with a predicted molecular weight of 110.56 kDa. The deduced amino acid sequence of TtTS showed 99% and 83% identities to the *Thermus caldophilus* TS and *Meiothermus ruber* TS, respectively. *TtTS* gene was expressed in *Escherichia coli* cells, and the recombinant protein was purified to homogeneity. The optimal temperature and pH for Trehalose synthase activity were found to be 80°C and 7.5, respectively. The half-life of heat inactivation was about 40 min at 90°C. The maximum trehalose conversion rate of maltose into trehalose by the enzyme increased as the substrate concentration increased, and reached 55.7% at the maltose concentration of 500 mM, implying that the enzyme conversion was dependent of the substrate concentration.

Key words: Trehalose, trehalose synthase, *Thermus thermophilus*, thermostability

서 론

트레할로스(D-glucopyranosyl-1,1-D-glucopyranoside)는 세균, 효모, 곰팡이, 식물, 곤충, 동물 등에 널리 존재하며 두 개의 포도당 결합으로 이루어진 세 종류(α - α , α - β , β - β)의 이성질체를 가지는 비 환원성 이당류이다[7, 8]. 초기에 트레할로스는 세포내의 에너지 보존과 탄소원의 역할로만 알려졌지만, 최근에는 건조, 삼투압, 열과 같은 환경 스트레스에 대한 방어기구로서의 기능에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다[5, 6]. 또한 내열성, 내산성, 난흡습성, 결정성, 영양성, 전분노화방지, 단백질변성 방지, 비착색성, 보습성 등의 특성으로 인하여 식품, 화장품, 의약품 등의 다양한 분야에서 폭 넓게 사용 되고 있다[17]. 종래 트레할로스의 일반적인 생산법은 효모 균체에서 추출하는 방법과 아미노산 발효 미생물에 의한 발효법 등이 있다[4, 12]. 이들 방법은 이물질 제거하기 위한 분리정제 공정이 요구되므로 생산가가 너무

높은 단점이 있었다. 그러나 최근, 각종 미생물로부터 트레할로스를 생산하는 효소가 발견되면서 트레할로스 생산 연구가 활발히 진행되어 왔다. 트레할로스를 생산하는 효소들로서는 maltose phosphorylase[24], trehalose phosphorylase [10], maltooligosyl trehalose synthase[1], maltooligosyl trehalose trehalohydrolase[23], glycosyltransferase[11], trehalose synthase[16] 등이 있다. 이중 trehalose synthase는 보호소 없이 맥아당을 분자내 전이 반응을 통해 트레할로스 로 전환시키는 효소로서 간단한 반응성, 높은 기질 특이성, 높은 트레할로스 전환율, 낮은 비용 등을 이유로 산업적으로 매우 유용한 효소라고 할 수 있다. 이 효소를 생산하는 미생물로는 *Thermus caldophilus* GK24[22], *Thermus aquaticus* ATCC33923[16], *Pimelobacter* sp. R48[15], *Grifola frondosa*[19] 등이 알려져 있다. 상기 미생물 중에서 *Thermus* sp.는 높은 온도에서 안정성과 활성을 지니는 산업용 효소생산 숙주로서 매우 적합하다고 할 수 있다[13].

본 연구에서는 온천수에서 분리한 *Thermus thermophilus* HJ6 균주로부터 trehalose synthase 유전자를 클로닝하고 염기서열을 확인하였다. 또한 온도 감수성 프로모터를 포함하는 pJLA503 벡터시스템[21]을 이용하여 isopropyl- β -D-

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2278, Fax: 82-51-890-2632

E-mail: jeon.sj@deu.ac.kr

thiogalactopyranoside (IPTG)와 같은 고가의 유도기질의 사용 없이 재조합 trehalose synthase를 생산정제하고 이의 활성을 분석하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 동정

본 연구에 사용된 *Thermus thermophilus* HJ6 균주는 일본의 Arima 온천수에서 분리하였다. 분리방법으로는 온천수에 0.1% yeast extract를 첨가하여 80°C에서 2일간 배양한 후, 0.7% Gelrite를 포함하는 ATCC medium 1598 (bactotryptone 2.5 g, yeast extract 2.5 g, nitrilotriacetic acid 100 mg, CaSO₄·2H₂O 4 mg, MgCl₂·6H₂O 200 mg, 0.01M Fe-citrate 0.5 mL, 0.5 mL trace element solution, Na-K phosphate buffer(pH 7.2, 0.16M), per liter) 고체 배지에 접종하고, 80°C에서 1.5일간 배양하여 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 균주는 ATCC medium 697(8 g polypeptone, 4 g yeast extract, 4 g/L NaCl, pH 7.5)를 사용하여 80°C에서 정기적으로 계대배양 하였다. 분리균주 HJ6의 형태는 투과전자현미경(JEM 1200 EX-II electron microscope, JEOL)을 이용하여 음성염색으로 관찰하였다. 생리학적 특징은 Santos 등[20]의 방법을 이용하여 조사하였고 16s rRNA sequence 분석은 Kim 등[9]의 방법에 따라 실시하였다.

유전자 클로닝 및 염기서열 분석

Thermus thermophilus HJ6 균주의 염색체는 GeneAll[®] GENEx Genomic kit(GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. Trehalose synthase(TtTS)의 유전자를 클로닝 하기 위하여 계놈 염기서열이 밝혀진 *Thermus thermophilus* HB8과 HB27의 trehalose synthase 유전자 염기서열을 바탕으로 각각 개시코돈의 상류와 종결코돈의 하류에 해당하는 두가지 primer(Primer 1: 5'-cgaccactagccttaggcc-3', primer 2: 5'-ggctgaaggctaccgggccc-3')를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. PCR은 Taq DNA polymerase를 사용하여 약 3.0 kb의 DNA 단편을 증폭하였고 pGEM-T 벡터에 클로닝한 후, pGEM-TTS라고 명명하였다. 클로닝 된 DNA 단편의 염기서열은 ABI Prism 3700 genetic analyzer(Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA)를 사용하여 분석하였다.

효소 생산 및 정제

온도 감수성 프로모터(PR, PL)를 포함하는 발현 벡터 pJLA503[21]에 trehalose synthase 유전자를 클로닝하기 위하여 pGEM-TTS plasmid를 주형으로 Primer 3(5'-CCTTTAGCATATGGACCCCTCTGG-3', 밑줄은 *Nde* I 부위)과 Primer 4(5'-CGGAATTCCTAGGCTTTTCCGGCCT-3',

밑줄은 *Eco* RI 부위)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 3.0 kb의 DNA 단편은 *Nde* I과 *Eco* RI으로 절단한 후 같은 효소로 절단한 pJLA503 벡터에 연결하고 *E. coli* DH5 α 에 형질전환 하였다. 클로닝 된 plasmid를 pJLA-TS로 명명하고 *E. coli* BL21(DE3) codon plus에 다시 형질전환한 후 2xYTA 배지(tryptone 16 g/L, yeast extract 10 g/L, NaCl 5 g/L, ampicillin 100 μ g/mL)에서 30°C로 20시간 전 배양 하였다. 전배양액의 1%를 새로운 2xYTA 배지에 접종한 후, 흡광도(A₆₀₀)가 0.6이 되었을 때 42°C로 온도를 올려 5시간 동안 유도배양 하였다. 배양된 균체는 원심분리를 통하여 집균하고 buffer A(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM dithiothreitol)에 녹인 다음 초음파로 파쇄하였다. 초음파 파쇄 후 세포추출물은 80°C에서 20분간 열처리한 후 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액은 ÄKTAprime(GE Healthcare)을 이용하여 buffer A로 평형화시킨 Hitrap Q column(GE Healthcare)에 로딩한 후 0~1.0 M의 NaCl로 농도구배를 주어 결합된 단백질을 용출하였다. 용출된 희분은 trehalose synthase 활성을 측정된 후 활성이 있는 희분을 모아 Amicon(Milipore) filter로 농축한 다음 buffer B(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol)로 투석하였다. 투석액은 buffer B로 평형화된 HiPrep Sephacryl S-200 HR 26/60 column(GE Healthcare)에 로딩하고 buffer B를 이용하여 용출 하였다. 용출된 단백질의 정제도는 SDS-PAGE(12% acrylamide gel)를 통하여 확인하였고, 전기영동 밴드는 Coomassie staining으로 확인하였다.

효소활성 측정

Trehalose synthase의 활성은 정제된 효소(0.1 mg/mL)를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)에서 50 mM 맥아당을 기질로 하여 70°C에서 30분간 반응하고 100°C에서 10분간 끓여서 반응을 정지시킨 후 TLC 및 HPLC 분석법을 이용하였다. TLC plate로는 silica gel 60 TLC(Merck, 20×20 cm aluminium sheet)를 사용하였으며, plate에 효소반응산물 1 μ L를 점적하여 n-butanol : pyridine : water(7 : 3 : 1) 혼합용매로 2번 전개하고 건조한 후 발색제(10% 황산)를 뿌려 100°C에서 가열하여 발색시켰다. 효소 반응산물의 정량화는 Carbohydrate analysis column(Waters, 300 mm×3.9 mm)을 사용하여 25°C에서 410 detector와 HPLC(Waters alliance 2690) system에 의해 분석되었다. 이동상 용매는 acetonitrile : water(75 : 25)의 두 가지 혼합용액으로 분당 1 mL의 유속으로 전개되었다.

결과 및 고찰

고온성 균주의 분리 및 동정

일본 Arima 온천지대에서 채취한 시료의 온도는 92.8°C이고 pH는 6.8이었다. 시료는 재료 및 방법에서 언급한 것

과 같이 배양하여 한 종류의 균주(HJ6)를 얻을 수 있었다. 분리균주 HJ6은 호기성으로 고체배지 상에서의 colony 형태는 원형에 가깝고 색깔은 노란색이었으며 표면은 볼록하고 매끄러운 상태였다. 이 균주는 Fig. 1의 전자현미경 사진에서 제시된 것과 같이 길이 2~4 μm, 직경 0.4 μm의 간균이고, 그람음성, 편모가 없으며 포자를 형성하지 않았다. 분리균주 HJ6의 생리적 특징은 Table 1에서와 같이, 생육가능 pH가 6.0~7.5(최적 pH 6.5)이고 생육가능온도는 80~95°C(최적온도 80°C)이며, galactose, ribose, lactose, raffinose와 같은 당을 이용하지 못하여 *Thermus thermophilus* HB8 균주



Fig. 1. Transmission electron micrographs of cells of *T. thermophilus* HJ6. Bar, 0.5 μm.

[3]과 유사한 특징을 나타내었다. 균주 HJ6을 동정하기 위하여 16s rRNA 염기서열(Genebank accession no. DQ647385)을 분석하고 NCBI의 BLAST program을 이용하여 상동성을 분석한 결과 99.7%의 신뢰도로 *Thermus thermophilus*로 동정되었고, 생리 및 생화학적 성질이 *T. thermophilus*의 유연균으로 분류되어, 최종적으로 본 균주를 *Thermus thermophilus* HJ6으로 동정하였다(Fig. 2).

Trehalose synthase 유전자의 클로닝

T. thermophilus HJ6 균주로부터 trehalose synthase의 유전자를 클로닝 하기 위하여 이미 게놈 염기서열이 밝혀진 *T. thermophilus* HB8과 *T. thermophilus* HB27의 trehalose synthase 유전자 염기서열을 바탕으로 primer를 설계하고, PCR 기법을 이용하여 trehalose synthase를 암호화 하는 것으로 예상되는 유전자를 클로닝 하였다. 클로닝 된 유전자의 open reading frame(ORF)는 2898 bp의 길이로 975 아미노산을 암호화하고 있었다. 예상된 분자량은 110,560

Table 1. Biochemical characteristics of the strain HJ6.

Optimum temperature	80°C	Utilization of glucose	+
Optimum pH	6.5	Fructose	+
Pigmentation	Yellow	Galactose	-
Growth at/in		Xylose	+
80°C	+	Ribose	-
90°C	+	Cellobiose	+
1% NaCl	+	Trehalose	+
3% NaCl	+	Sucrose	+
5% NaCl	-	Lactose	-
Oxidase	+	Raffinose	-
Hydrolysis of Starch	+	Glycerol	+
Hydrolysis of Casein	+	Citrate	+
Hydrolysis of Gelatin	+	Malate	-

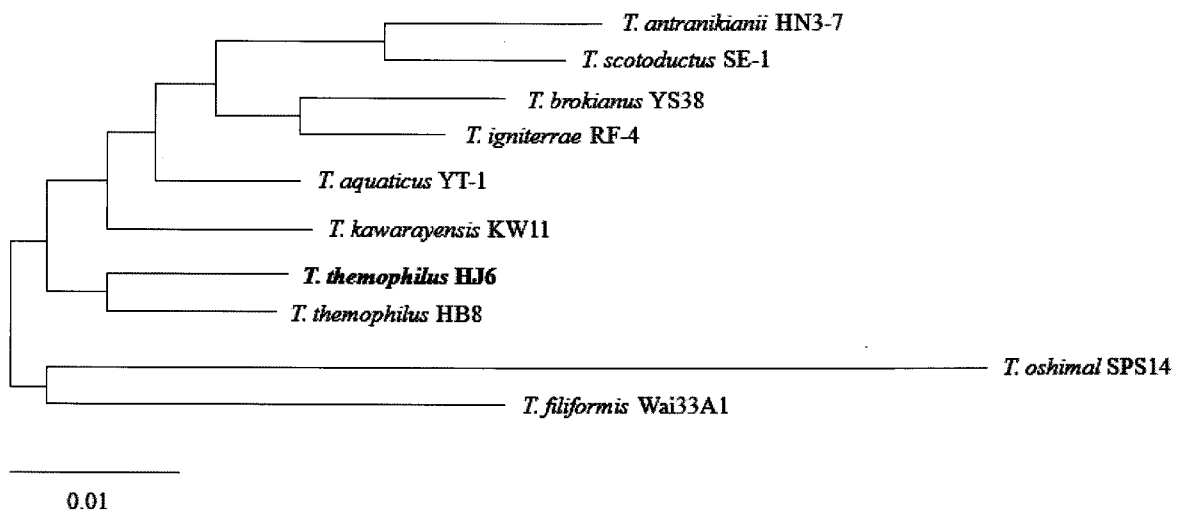


Fig. 2. Phylogenetic position of strain HJ6 in the genus *Thermus* based on the 16s rRNA sequences. The tree was constructed using the neighbor-joining method. The bar represents 0.01% sequence divergence.

Dalton이고, 등전점은 5.68이었다. Fig. 3에서는 클로닝 된 유전자로부터 예상되는 아미노산 서열과 상동성을 가지는 단백질을 대상으로 alignment를 작성하였다. 클로닝 된 유전자는 *Thermus caldophilus* 유래의 trehalose synthase(NCBI accession No. AAD50660)와 높은 상동성(99%)을 나타냈고, *Meiothermus ruber*의 것(No. ACA35051)과는 83%의 비교적 높은 상동성을 나타냈다. 또한, *Salinibacter ruber* DSM 13855 유래의 trehalose synthase(No. ABC44183)와는 72%, *Candidatus Desulforudis audaxviator* MP104C 유래

의 것(No. ACA59364)과는 65%의 상동성을 나타냈다. 이와 같은 생물정보학 분석을 통하여 *T. thermophilus* HJ6의 염색체로부터 클로닝 한 유전자는 trehalose synthase (TtTS)를 암호화하는 것으로 예상되었다.

*E. coli*로부터 trehalose synthase의 생산

온도 감수성 프로모터(Tandem promoter)를 포함하는 pJLA503 벡터시스템을 이용하여 TtTS 유전자를 클로닝 하고 plasmid pJLA-TS로 명명하였다. 여기서 효소 생산을 위

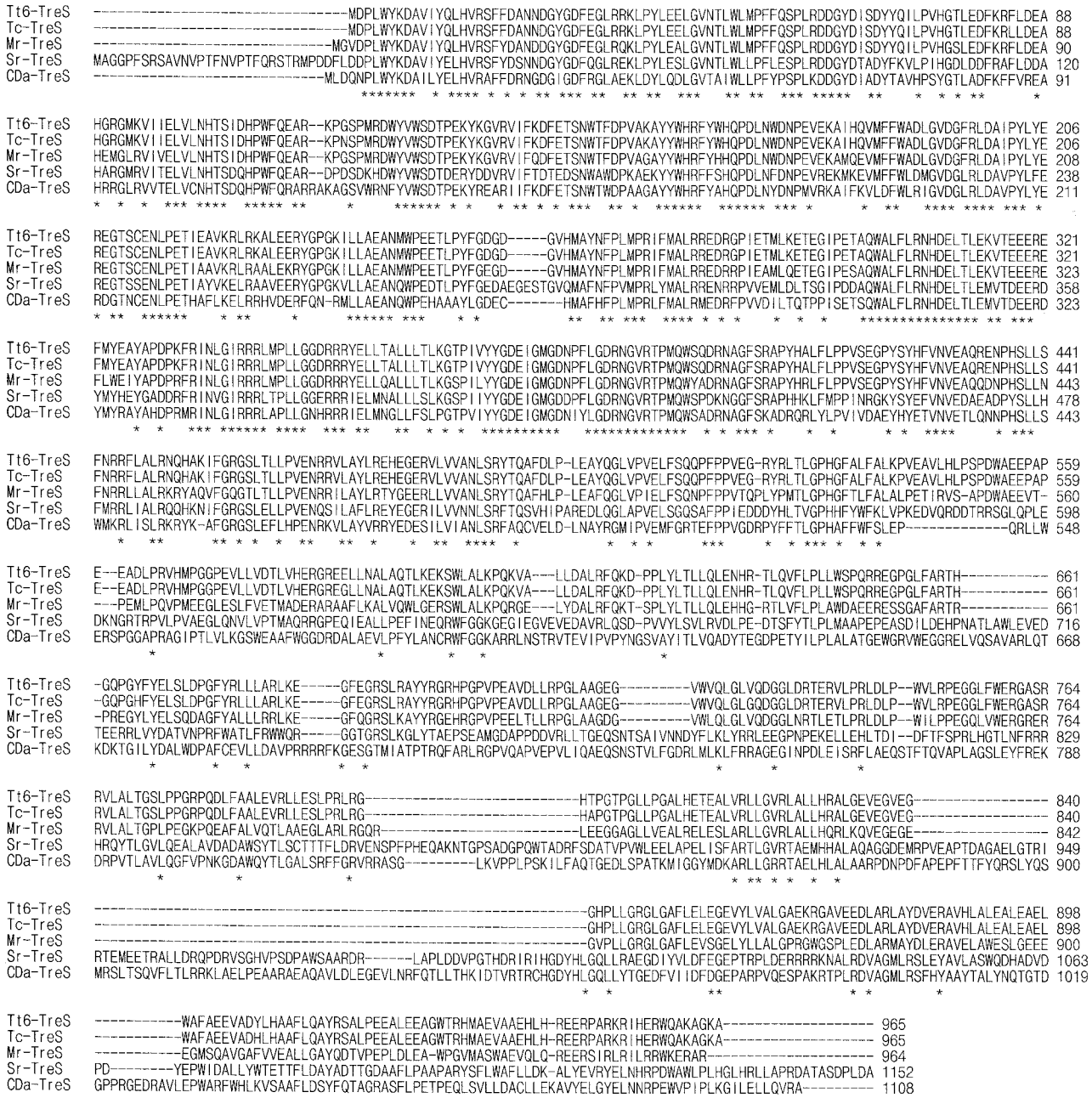


Fig. 3. Schematic drawings of the alignment of *T. thermophilus* HJ6 trehalose synthase (TS) with its homologues. Tt6, *Thermus thermophilus* HJ6 TS; Tc, *Thermus caldophilus* TS; Mr, *Meiothermus ruber* TS; Sr, *Salinibacter ruber* DSM 13855 TS; CDa, *Candidatus Desulforudis audaxviator* MP104C TS.

한 숙주균으로는 *E. coli* BL21(DE3) codon plus 균주를 사용하였다. TtTS 유전자에는 대장균에서 잘 사용되지 않는 rare codon을 다수 가지고 있기 때문에 rare tRNA 합성효소가 보강된 codon plus 균주를 사용하였다. Plasmid pJLA-TS로 *E. coli* BL21(DE3) codon plus를 형질전환하고 30°C에서 배양하여 세포성장이 600 nm에서 흡광도가 0.5~0.6에 도달하였을 때 온도를 42°C로 올려 단백질의 생산을 유도하였다. 배양한 세포를 초음파로 파쇄하고 SDS-PAGE로 분석한 결과, 약 110 kDa 부위에서 trehalose synthase의 밴드가 확인되었다(Fig. 4, lane 2). 이 밴드의 분자량은 trehalose synthase의 아미노산 서열에서 계산된 분자량과도 일치하였다. 초음파 파쇄액은 80°C에서 20분간 열처리한 후, 재료 및 방법에서 서술한 바와 같이 정제하고 SDS-PAGE 상에서 단일 밴드를 확인하였다(Fig. 4, lane 5). 이렇게 정제된 trehalose synthase는 효소의 특성 분석에 사용하였다.

재조합 trehalose synthase의 특징

본 효소의 최적 pH와 온도는 HPLC를 사용하여 조사하였다. 효소반응의 최적 pH는 7.5이고, pH 7.5~8.5 범위에서 90% 이상의 안정된 활성을 유지하여 *T. caldophilus* GK24 유래 trehalose synthase의 pH 범위(6.0~9.0)와 비슷한 양상을 나타내었다[2](Fig. 5A). 트레할로스 생산에 큰 영향을 미치는 본 효소의 최적온도는 80°C이고 70~80°C 범위에서 95% 이상의 높은 활성을 유지하여 *T. thermophilus* HJ6의 생육온도(80°C)와도 유사한 양상을 나타 내었다(Fig. 5B). 또한, 본 효소는 80°C에서 1시간 동안의 열처리에는 안정하

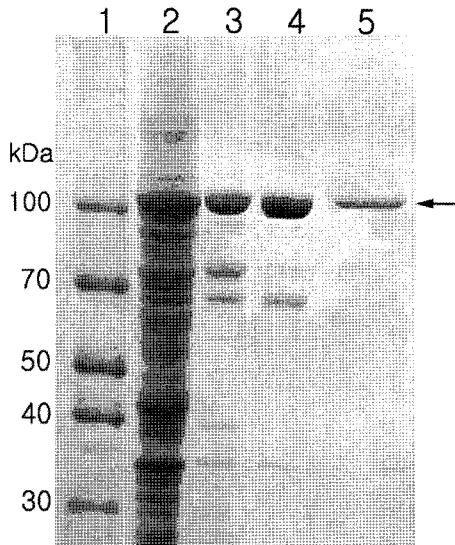


Fig. 4. Purification of recombinant TtTS. Lane 1, molecular mass marker; lane 2, crude extract induced cells; lane 3, supernatant of crude extract after heat treatment at 80°C for 20 min; lane 4, Hitrap Q column peak fractions; lane 5, Sephacryl S-200 HR 26/60 column peak fractions. The gel was stained with coomassie brilliant blue.

게 활성이 유지되지만, 90°C에서 40분 만에 50%로 활성이 감소하였고, 95°C에서는 10분 만에 활성이 17%까지 감소하였다(Fig. 5C). *T. caldophilus* GK24 유래 trehalose synthase[2]는 본 효소와 아미노산 서열상의 상동성이 99%임에도 불구하고, 최적온도는 45°C를 나타내어 본 효소의 최적온도와는 매우 상이함을 나타내었다. 따라서, 본 효소와 *T.*

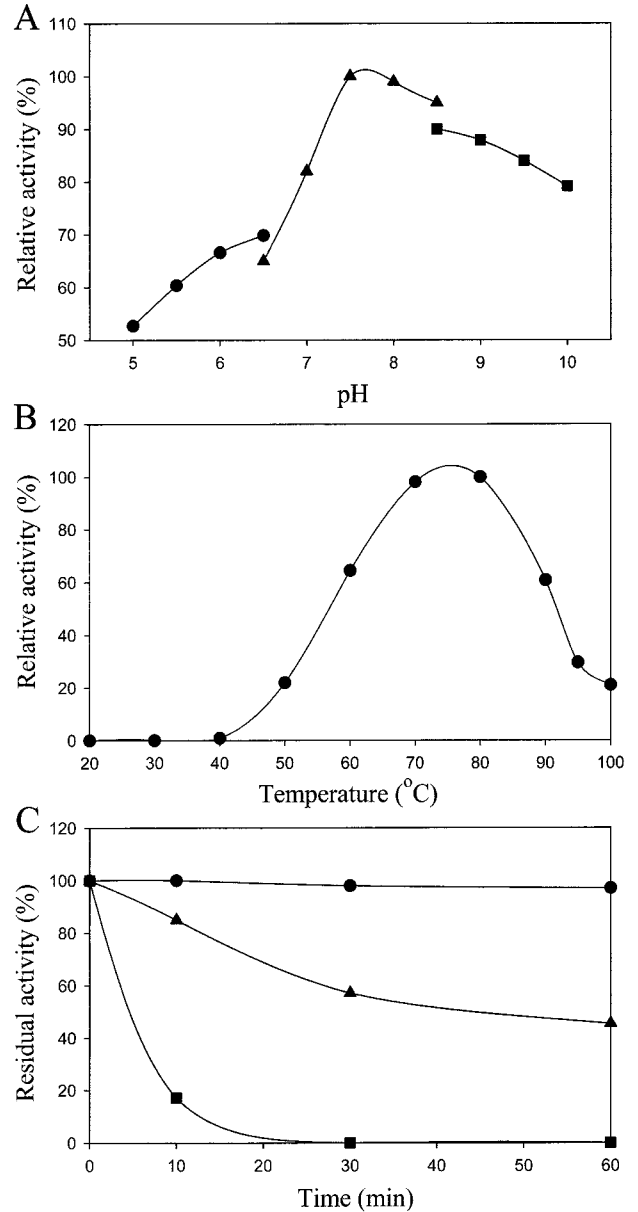


Fig. 5. Effects of pH and temperature on the activity and thermostability of TtTS. A. The enzyme activities were examined at the maltose concentration of 50 mM and 70°C for 30 min, using MES buffer (circles), TES buffer (squares), CHES buffer (triangles) at the indicated pH values. B. Enzyme was assayed at temperature range from 20 to 100°C and pH 7.5. C. Enzyme (1 μM TtTS in 50 mM sodium phosphate, pH 7.5) was incubated for various lengths of time at 80°C (circles), 90°C (triangles), and 95°C (squares), and the residual activity of samples were measured at 70°C and pH 7.5.

caldophilus GK24 유래 trehalose synthase와의 서로 다른 아미노산 잔기(Phe84, Gly118, Glu589, Thy666, Val729, Thr800, Tyr908)는 구조적으로 본 효소의 내열성을 유지하는데 중요한 역할을 수행할 것으로 생각된다. 또한, 내열성 단백질을 대장균에서 발현시키면 native와는 다른 성질과 구조를 가질 수 있고, 이런 단백질은 고온 환경 하에서 구조가 성숙하여 안정화 하는 것으로 보고되고 있으며, 열의존성 구조성숙은 내열성 단백질에서 주로 확인되고 있다[18]. 이와 같은 이유로 본 연구에서 단백질 생산 시에 사용한 pJLA503 벡터 시스템은 42°C에서 유전자의 발현을 유도하기 때문에 기존의 37°C에서 유전자를 발현하는 시스템에 비해 내열성 단백질의 구조성숙에 있어 더욱 유리할 것으로 생각된다.

효소반응의 최적조건

트레할로스 대량생산을 위한 효소반응 조건의 최적화를 위해 본 효소의 반응시간 경과에 따른 트레할로스 생산 전환율을 조사하였다. 50 mM의 기질농도에서 트레할로스 생산 전환율은 30분 만에 42.1%의 최고치를 나타냈고 1시간 까지 유지하다가 그 이후, 시간이 경과 할수록 감소하여 24 시간 후에는 33.6%로 줄어들고 상대적으로 글루코오스 생산량은 40.9%로 증가하였다(Fig. 6). 따라서 트레할로스 생산 전환율은 42.1%를 기점으로 생성된 트레할로스가 글루코오스로 다시 전환된다는 것을 알 수 있었다. 몇몇 연구자들은 trehalose synthase가 맥아당과, 트레할로스로부터 글루코오스를 생성한다고 보고 한바 있다[14, 15]. 또한, 100, 250, 500 mM의 기질농도에서 트레할로스 전환율을 실험한 결과, Table 2에서와 같이 고농도의 기질에서 트레할로스 생산 전환율이 증가하였다. 500 mM의 기질농도에서 전환율은 55.7%로 가장 높았다. 이것은 Nishimoto 등이 *Pimelobacter* sp. 유래 trehalose synthase의 효소반응에 있어서 기질반응 농도는 트레할로스 전환율에 크게 영향을 주지 않는다고 보

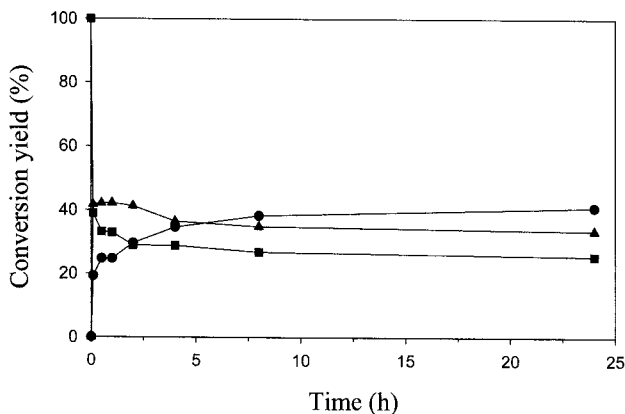


Fig. 6. Time profiles on the formation of trehalose (triangles) and glucose (circles) from maltose (squares) by TtTS. Purified enzyme was incubated with 50 mM maltose in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) at 70°C for 24 h. Samples were collected at various intervals and analyzed by HPLC.

Table 2. Carbohydrate composition during trehalose production by TtTS under various concentration of maltose.

Carbohydrate	Composition ^a (% w/w)			
	50 mM	100 mM	250 mM	500 mM
Maltose	33.0	32.1	31.9	28.7
Trehalose	42.1	48.4	54.4	55.7
Glucose	24.7	19.5	13.7	15.6

^a Composition given refer to the maximum trehalose yield.

고한 것과 상이한 결과를 나타냈다[15]. 본 효소의 트레할로스 생산 전환율(55.7%)은 *T. caldophilus* GK24 유래 trehalose synthase[2]의 69.2%와 비교하면 낮은 편이지만 고농도의 기질에서 트레할로스의 전환율이 높기 때문에 산업적인 생산수율 측면에서 더욱 유리할 것으로 생각된다. 또한, 기존의 다른 효소들과는 달리 높은 내열성을 가지고 있기 때문에 오염 우려가 없는 고온 하에서 산업적으로 적용할 때 매우 유용할 것으로 생각된다.

요약

내열성 Trehalose synthase를 생산하는 초고온성 균주 HJ6은 일본 Arima 온천수에서 분리하였다. 세포의 길이는 2~4 μm, 직경 0.4 μm의 간균으로 생육최적 pH와 온도는 각각 6.5와 80°C이었다. 분리된 균주의 16s rRNA 염기서열을 분석하고 계통학적으로 분류한 결과, HJ6 균주는 *Thermus thermophilus*에 속하는 것으로 동정되었다. PCR법을 이용하여 trehalose synthase(TS) 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석한 결과, ORF는 2,898개의 뉴클레오타이드로 구성되고 975개의 아미노산을 암호화하였다. 아미노산 서열을 바탕으로 상동성을 분석한 결과, *Thermus caldophilus* GK24 유래 TS와 99%, *Meiothermus ruber* 유래 TS와 83%의 identity를 나타내었다. 이 유전자를 온도감수성 프로모터를 포함하는 pJLA503 벡터를 이용하여 대장균에서 발현하고 정제하여 약 110 kDa의 단백질을 얻을 수 있었다. 정제된 효소는 트레할로스 전환율에 대한 최적 pH가 7.5이고, 최적온도는 80°C이며, 활성의 반감기는 90°C에서 40분으로 확인되어 높은 내열성을 가지는 것으로 확인되었다. 본 효소의 트레할로스 최대 전환율은 기질농도 500 mM에서 55.7%를 나타내었고, 기질 농도가 증가함에 따라 더불어 증가하였기 때문에 본 효소의 트레할로스 전환율은 기질농도에 의존적인 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 국토해양부의 해양극한생물 분자유전체연구단 사업의 지원으로 수행되었으며, 이 연구에 참여한 김현정은 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다.

REFERENCES

1. Chaen, H., 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.
2. Cho, Y. J., S. H. Koh, D. S. Lee, and H. J. Shin. 2003. Optimization of production of trehalose from maltose using recombinant trehalose synthase from *Thermus caldophilus* GK24. *K. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**: 8-13.
3. Chung, A. P., F. A. Rainey, M. Valente, M. F. Nobre, and M. S. da Costa. 2000. *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 209-217.
4. 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.
5. Crowe, J. H. and L. M. Crowe. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: The role of trehalose. *Science.* **223**: 701-703.
6. Gadd, G. M., K. Chalmers, and R. H. Reed. 1987. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**: 249-254.
7. Elbein, A. D. 1974. The metabolism of α , α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**: 227-256.
8. Elbein, A. D. 2003. New insights on trehalose: a multi-functional molecule. *Glycobiology.* **13**: 17-27.
9. Kim, D. J., M. Morikawa, M. Takagi, and T. Imanaka. 1995. Gene cloning and characterization of thermostable peptidyl prolyl cis-trans isomerase (PPIase) from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 87-94.
10. Klimacek, M., C. Eis, and B. Nidetzky. 1999. Continuous production of α , α -trehalose by immobilized fungal trehalose phosphorylase. *Biotechnol. Tech.* **13**: 243-248.
11. Kobayashi, K., M. Kettoku, Y. Miura, M. Kato, T. Komeda, and A. Iwamatsu. 1996. Production of trehalose by new trehalose-producing enzymes from archaea. *J. Appl. Glycosci.* **43**: 203-211.
12. Miyazaki, J., K. Miyagawa, and Y. Sugitama. 1993. November, Process for production of trehalose, Japan Kokai Tokyo Koho (Japan patent) JP05292986.
13. Nihaus, F., C. Bertoldo, M. Kahler, and G. Antranikian. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 711-729.
14. Nishimoto, T., 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.
15. Nishimoto, T., M. Nakano, T. Nakano, 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.
16. Nishimoto, T., 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.
17. Paiva, C. L. A. and A. D. Panek. 1999. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Ann. Rev.* **2**: 293-314.
18. Rahman, R. N., S. Fujiwara, M. Takagi, and T. Imanaka. 1998. Sequence analysis of glutamate dehydrogenase (GDH) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1 and comparison of the enzymatic characteristics of native and recombinant GDHs. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 338-347.
19. Saito, K., H. Yamazaki, Y. Ohnishi, S. Fujimoto, E. Takahashi, and S. Horinouchi. 1998. Production of trehalose synthase from a basidiomycete, *Grifola frondosa*, in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 193-198.
20. Santos, M. A., R. A. D. Williams, and M. S. da Costa. 1989. Numerical taxonomy of *Thermus* isolated from hot springs in Portugal. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**: 310-315.
21. Schauder, B., H. Blocker, R. Frank, and J. E. McCarthy. 1987. Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli* atpE translational initiation region. *Gene.* **52**: 279-283.
22. Shin, H. J., S. H. Koh, D. S. Lee, and S. Y. Lee. 1998. Trehalose synthase from maltose by a thermostable trehalose synthase from *Thermus caldophilus*. *Biotechnol. Lett.* **20**: 757-761.
23. Tabuchi, A., T. Mandai, T. Shibuta, M. Kubota, S. Fukuda, T. Sugimoto, and M. Kurimoto. 1995. Formation of trehalose from starch by novel enzymes, *J. Appl. Glycosci.* **42**: 401-406.
24. Yoshida, M., N. Nakamura, and K. Horikoshii. 1998. Production of trehalose by a dual enzyme system of immobilized maltose phosphorylase and trehalose phosphorylase, *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 71-75.

(Received Aug. 2, 2008/Accepted Sep. 3, 2008)