

고도 호열성 *Archaeobacterium Thermococcus profundus*가 생산하는 Amylolytic Enzymes

정영철 · 김경숙* · 노승환**

진주전문대학 식품영양과, *일본국립건강영양연구소 임상영양부, **일본이화학연구소 미생물제어연구실

Amylolytic Emzymes Produced from Hyperthermophilic *Archaeobacterium Thermococcus profundus*

Young-Chul Chung, Kyeong-Sook Kim*, Seong-Hwan Roh**

Department of Food and Nutrition, Chinju Junior College, Chinyang 663-840, Korea

*Division of Clinical Nutrition, The National Institute of Health and Nutrition, Tokyo 162, Japan

**Microbial Toxicology, The Institute of Physical and Chemical Research, Saitama 351-01, Japan

Abstract

The hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus profundus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent system, produced several amylolytic enzymes such as extracellular amylase and pullulanase, intracellular α -1,4-glucosidase in response to the presence of complex carbohydrates in the growth medium. This strain showed high activities on 0.5% maltose than on complex carbohydrates

One of the amylases was partially purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl chromatography. The amylase exhibited maximal activity at pH 5.5 and 80°C, and was stable in the range of pH 5.5 to 9.5 and up to 80°C for 30 min. The enzyme activity was no dependence on Ca^{2+} and not inhibited by detergents.

The amylase hydrolyzed soluble starch, amylose, amylopectin and glycogen to produce maltose and maltotriose with trace amounts of glucose, but not pullulan and α -, β -, γ -cyclodextrin.

Malto-oligosaccharides ranging from maltotetraose to maltoheptaose were hydrolyzed in an endo fashion.

Key words : hyperthermophilic archaeobacterium, *Thermococcus profundus*, extracellular amylase

서 론

호열성 미생물이 생산하는 내열성 amylolytic 효소는 반응속도가 빠르고, 미생물 오염위험이 적으며 그리고 고온에서 전분 가수분해물의 점도가 낮은 특성 때문에 전분 가공 산업에 잇점이 있다. 지금까지 열안정성 amylase 생산은 *Clostridium thermosulfuogenes*¹⁾, *Bacillus stearothermophilus*²⁾, *Thermoanaerobacter finni*³⁾, *Thermotoga maritima*⁴⁾, *Dictyoglomus thermophilum*⁵⁾ 등의 호열성 균주의 유래로서, 이들 균주는 60~75°C에서 최적 생육 온도는 가지는 것으로

보고 되어 있다.

그러나 최근에 80°C 이상에서 생육하는 고도 호열성 미생물인 hyperthermophiles이 화산지대나 심해 분화구 등의 극한 환경에서 부터 *Pyrococcus furiosus*⁶⁻⁹⁾, *P. woesei*¹⁰⁾, *Thermococcus litoralis*⁸⁾, *Desulfurococcus*¹¹⁾ 및 *Pyrodictium*¹²⁾ 등이 분리되었는데 모두 archaeobacteria인 것으로 밝혀졌다. Hyperthermophilic archaeobacteria가 생산하는 고도 호열성 효소의 발견은 극한 환경에서의 미생물의 진화의 중요성 뿐만 아니라 고도의 열안정성에 대한 단백질의 구조와 기능의 규명 그리고 산업적 응용면에 있어서 많은 주목을 받고 있다.

Hyperthermophiles이 전분분해효소를 생산하는

Corresponding author : Young-Chul Chung

보고는 *P. furiosus*⁷⁻⁹⁾, *P. woesei*¹⁰⁾, *T. litoralis*⁸⁾ 등에 제한되어 있으며 특히 *P. furiosus*는 합성배지에 유황과 전분을 동시에 첨가하면 H₂S에 비하여 CO₂생성량이 증가하는데 이것은 전분 분해효소의 존재를 확인해주어, Brown 등^{8, 9)}은 균체의 amylase와 amylopullulanase 그리고 균체내 α -glucosidase의 활성을 밝힌 바 있다.

Thermococcus profundus DT5432¹³⁾는 일본 오키나와 해역의 심해 1,400 m의 분화구에서 분리된 혐기성 hyperthermophilic archaeobacteria로서 80 °C에서 최적 생육 온도를 보이면서 유황의 존재시에 전분을 용이하게 대사하는 것이 확인되었다.

따라서 본 연구에서는 심해라는 극한 환경에서의 미생물 진화와 당대사에 대한 정보를 제공하고 궁극적으로는 열안정성 기구의 해명에 필요한 효소원을 공급함과 더불어 산업적 응용에 접근하고자 당분해 효소의 생성능과 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험에 사용된 *Thermococcus profundus*-DT 5432¹³⁾는 일본 오키나와 심해의 분화구(1,395 m)에서 분리된 생육최적온도가 80°C인 고도 호열성 archaeobacteria로서 일본 이화학 연구소 미생물 연구실로부터 분양 받았다.

2. 배지 및 배양조건

생육배지는 DT14가 사용되었다. DT14배지는 1L당 tryptone 5 g, yeast extract 1 g, NaCl 25 g, MgSO₄ · 7H₂O 2 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, KCl 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g, FeSO₄ 0.01 g, elemental sulfur 10 g, Na₂S · 9H₂O 0.4 g, sodium resazurine 10 mg, trace element mixtrue 10 ml, vitamin mixture 5 ml로 구성되어 있으며, trace element mixture는 1L당 CuCl₂ · 2H₂O 10mg, CoSO₄ · 7H₂O 5mg, Na₂MoO₄ · H₂O 100mg, NaBr 50mg, LiCl 50mg, Na₂SeO₄ 5mg, VO₂SO₄ · 2H₂O 5mg, BaCl₂ 5mg, ZnSO₄ · 7H₂O 100mg, MnCl₂ · 4H₂O 200mg, KI 5mg, Na₂B₄O₇ · 10H₂O 200mg,

Na₂WO₄ · 2H₂O 5mg, SrCl₂ · 6H₂O 5mg, NiCl₂ · 6H₂O 10mg를, 그리고 vitamin mixture는 1L당 thiamine · HCl 50mg, pyridoxamine · HCl 30mg, calcium D-pantothenate 50mg, nicotinic acid 100mg, D-biotin 0.1mg, cyanocobalamine 0.1mg, pyridoxine · HCl 100mg, pyridoxal 30mg, riboflavin 20mg, *p*-aminobenzoic acid 100mg, folic acid 1mg, lipoic acid 5mg을 함유하고 있다.

고도 호열성 균의 배양은 상기의 DT14배지를 1L screw cap bottle에 가하여 80°C에서 12시간 혐기적으로 행한 후 현미경으로 생균수를 계산하였다. Amyolytic enzyme을 생산하기 위해서는 DT14배지에 0.5% maltose를 첨가하여 동일한 방법으로 배양하였다.

3. Amyolytic 효소의 생산 및 amylase의 부분정제

0.5% maltose가 함유된 DT14배지에서 80°C, 12시간 배양한 액 10L를 여과(Toyo No. 1)하여 유황분말 등을 제거한 후 80% 유안으로 4°C, 12시간 침전시켜 원심분리 (7,000 × g, 30분)하여 단백질을 용액을 수확하였다. 2.5% NaCl이 함유된 50mM Tris · HCl buffer(pH 7.5)로 용해하여 투석시킨 단백질용액을 조효소액으로 하였고, 이 조효소액에 NaCl 분말을 첨가하여 최종농도를 1M로 조절한 다음 1M NaCl이 함유된 50mM Tris · HCl buffer(pH 7.5)로 세척된 DE-AE-Toyopeal 650M column(4.5 cm × 25 cm)에 가하였다. 이 column을 1M NaCl이 함유된 동일 buffer로 세척된 다음 3.5M Tris · HCl buffer(pH 7.5)로 용출시켰다.

4. 효소활성의 측정

Amylase 활성은 효소액 10 μ l와 50mM sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 용해된 1% soluble starch 0.99 ml를 혼합하여 80°C에서 30분간 반응시킨 다음 유리된 환원당을 Somogyi-Nelson변법¹⁴⁾에 따라 정량하였는데 이때 활성의 1 unit는 μ M D-glucose /ml. min로 표시하였다.

Pullulanse 활성은 amylase 활성 측정법과 동일하고 단지 starch 대신 1% pullulan을 사용한 것이 상이하하다.

α -1,4-Glucosidase 활성은 *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside(pNPG)를 사용하여 Kohchi 등의 방법¹⁵⁾에 따라 유리된 *p*-nitrophenol을 표준곡선에서 정량하였으며 효소활성단위는 μ M-pNP /ml. min로 나타내었다.

5. 단백질의 측정

단백질량은 BCA protein assay kit (Pierce Chemical Co.)를 사용하여 측정하였으며 bovine serum albumin이 표준물질로 사용되었다.

6. 전기영동

Native 및 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)은 pre-made gel system(TEF Co.)을 사용하였으며 이때 단백질 band는 0.2% comassie brilliant blue R-250과 silver stain kit(Bio-Rad)로 염색하여 확인하였다. Native-PAGE에서 amylase 활성염색은 gel을 1% soluble starch가 함유된 50mM Tris HCl buffer(pH 7.5)에 침지시켜 80°C에서 1시간 반응시킨 후 0.15%(W/V) I₂와 1.5%(W/V)KI가 함유된 용액에서 발색하였다.

7. TLC

조효소에 의한 각종 당의 가수분해 양상은 precoat-ed silica gel plate(Kiesel gel 60 F254, Merck)를 사용하여 TLC로 확인하였으며 이때 전개용매는 1-butanol-methanol-water(4:2:1, v/v/v)를 사용하여 이중 전개시켰으며 발색은 Pastudska¹⁶⁾의 방법으로 행하였다.

8. 시약

Solubel starch는 Kanto Chemical사, amylose A(DP17), amylose B(분자량 16,000), amylopectin, oyster glycogen, pullulan은 Nacalai Tesgusa, cyclodextrin과 maltooligosaccharide는 Nihon Shokuhin kako사, 그리고 pNPG는 Sigma사로 부터 각각 구입하였으며 그외의 각종 시약은 일급 또는 특급시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 고도 호열성 *Thermococcus profundus*의 amyolytic 효소 생성능

Hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus profundus*는 다당류가 함유된 배지에서 세포외 amylase와 pullulanase, 그리고 세포내 α -1,4-glucosidase를 생성하였으며 이중에서 α -1,4-glucosidic linkage를 가진 다당류에 비교적 활성이 높게 나타났다(Table 1). 일반적으로 amyolytic enzyme의 활성은 maltose보다 starch에서 높다고 보고된 고온성 *Clostridium*속¹⁷⁾과 고도 호열성 *Pyrococcus fruio-sus*⁷⁾과는 다르게 *T. profundus*는 maltose가 0.5%가 첨가된 배지에서 amylase와 pullulanase 활성이 가장 높게 나타나는 특성을 보였는데, 이것은 본 균주가 심해라는 극한 환경에서 비교적 쉽게 대사될 수 있는 물질을 선택하는 기능에 기인되는 것으로 추정된다. 탄수화물이 첨가되지 않는 배지에서도 효소 활성이 검출되는 것으로 보아 효소생합성이 구성화되어 있는 것으로 생각되며 그리고 glucose 첨가는 효소활성을 완전히 억제시킬 수 없었다. Amylase와 pullulanase는 균체외로 대부분 분비되었으나 α -glucosidase의 활성은 세포내에서만 검출되었으며 그 활성은 매우 낮았다. Hyperthermophilic archaeobacteria는 변형된 EMP로 당을 대사시키는데 이때 pyruvate는 가장 용이하게 대사되는 기질로 이용되는 것으로 보고된 결과¹⁸⁾와 비슷하게 *T. profundus*도 pyruvate에서 균증식은 가장 양호하였다. 그러나 효소생성을 위한 효율적인 유도물질은 아닌 것으로 밝혀졌다.

2. Amylase의 부분정제 및 활성 염색

Hyperthermophilic archaeobacteria 유래의 효소는 균체량과 효소활성이 중온성 및 호열성 미생물에 비하여 현저히 낮은 이유때문에 분리 정제에 많은 애로점이 있어 완전히 분리 정제된 균체외 amylase는 *Pyrococcus*속^{8, 9)}에 제한되어 있다. *T. profundus*를 효소활성이 가장 높게 검출된 maltose 배지에서 80°C, 12시간 혐기적으로 배양하여 얻은 10L액을 80% am-

Table 1. Effect of added carbohydrate on amylolytic enzyme production

Carbohydrates (0.5%)	Cell growth ($\times 10^8$ Cell/ml)	Activities(mU/ml)		
		Amylase	Pullulanase	α -Glucosidase
None	2.8	3.5	0.7	0.05
Soluble starch	3.8	6.4	0.9	0.07
Potato starch	2.6	5.8	0.8	0.07
Pullulane	2.4	2.3	0.8	0.01
Xylan	2.2	3.8	0.7	0.02
CMC	3.8	3.9	0.8	0.03
Glucose	4.4	0.04	0.01	- ¹⁾
Maltose	4.1	7.2	3.9	0.02
Sodium pyruvate	9.8	5.6	1.5	0.02

Amylase and pullulanase activities were determined from intra- and extracellular fraction, and α -glucosidase, from intracellular fraction.

¹⁾ not detected

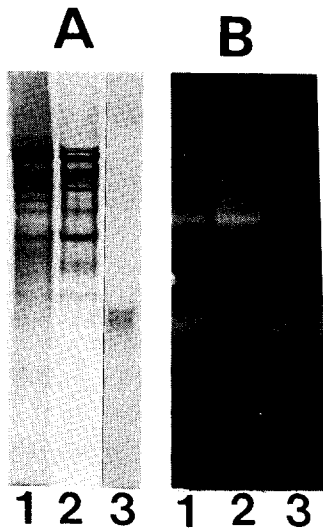


Fig. 1. Native-PAGE(A, lane 1, 2, 3) and activity stain (B, lane 1, 2, 3) of amylases. The amylase was visualized by silver staining(A) and by activity staining(B). Lane 1, crude enzyme; 2, DEAE-Toyopearl (solution washed with 1 M NaCl); 3, DEAE-Toyopearl (solution eluted with 3.5 M Tris HCl).

monium sulfate 분획과 DEAE-Toyopearl column chromatography 에서 부분정제하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 *T. profundus*는 활성염색 시에 2종류의 amylase를 생산하였다. 그러나 10L 배양액에서 얻은 효소량은 매우 작아 minicolumn에 의한 예비실험을 행한 결과를 기초로 DEAE column에서 부분정제를 하였다. 즉 10L 조효소액을 DEAE column에 가한 후 1M NaCl로 세척하였을 때 대부분의 단백질과 함께 upper band amylase(A)는 쉽게 용출되었으나 low band amylase(B)는 강하게 흡착되어 있었다. 그래서 3.5M Tris·HCl(pH 7.5)로 용출시켜 low band amylase를 쉽게 부분정제할 수 있었고 이때 specific activity는 171(U/mg protein)로 나타났다.

3. pH의 영향

조효소액을 사용하여 amylase의 최적 pH를 조사한 결과 pH 5.5에서 활성이 가장 높았고 산성에서 급격한 활성감소가 관찰되었다(Fig. 2). 80°C에서 30분간 반응시킨 amylase는 pH 5.5에서 pH 9.5까지 안정하였으며 이때 알칼리성보다는 산성범위에서 안정성이 급격히 감소되는 경향을 보였다. 즉, pH 3.5에서는 약 80%, pH 11에서는 32%만이 불활성되었다.

Hyperthermophilic archaeobacteria 유래의 세포외 amylase에 대한 정제보고는 *P. woesei*¹⁰⁾에 국한되어 있는데, 이 균주는 최적 활성 pH가 5.5~6.0으로 나타나 본 균주와 비슷하였다.

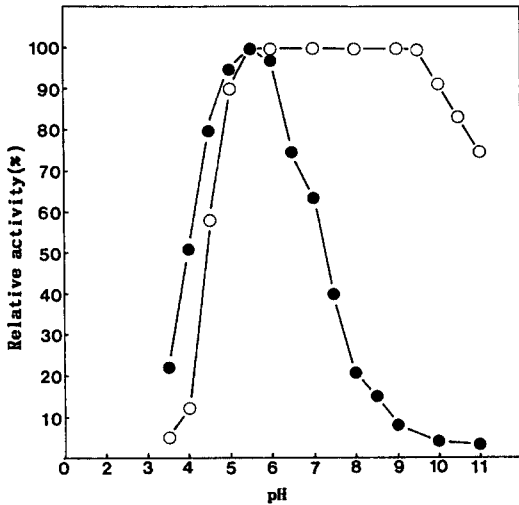


Fig. 2. Effect of pH on the amylase activity and stability. Closed circles represent the activity at each pH value. For determining the stability, the amylase was incubated for 30min at 80°C in buffers of various pH values. The remaining activity was measured in 50mM sodium phosphate buffer (pH 5.5) containing 1% soluble starch. The following buffers(50mM) were used : acetate(pH 3.5~5.8), sodium phosphate(pH 5.5~6.9), imidazole-HCl (pH 6.0~7.3). Tris · HCl(pH 6.9~8.4) and glycine · NaOH(pH 7.8~10.3).

4. 온도의 영향

조효소액을 각 온도에서 30분간 반응시켰을 때 amylase는 *T. profundus*의 최적생육온도인 80°C에서 최대활성을 나타내었다(Fig. 3). 또한 amylase는 80°C까지는 30분간 열안정성이 확인되었고 90°C에서는 30분까지 94%의 활성을 유지하고 있었다. Hyperthermophilic archaeobacteria 유래의 amylase의 최적온도 및 열안정성은 그 미생물의 최적생육온도와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되어 있다⁸⁻¹⁰⁾.

5. 화학물질과 Ca²⁺ 이온의 영향

1mM EDTA가 함유된 50mM Tris · HCl buffer (pH 7.5)로 투석한 조효소액을 사용하여 각종 물질에 대한 효소활성을 측정하였다(Table 2). 대부분 중온성 미생물 유래의 amylase에서 나타나는 Ca²⁺ 의존성

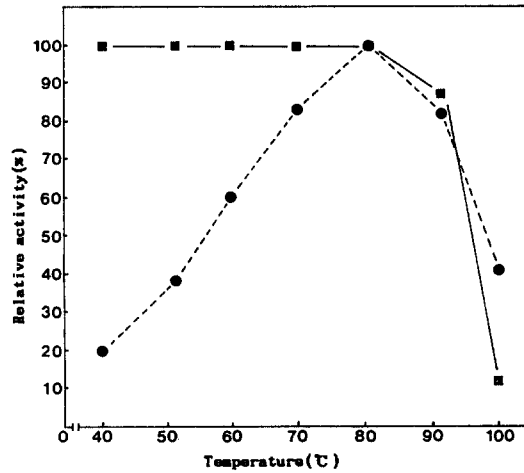


Fig. 3. Effect of temperature on the amylase activity (dotted line) and stability (solid line). For determining the thermostability, the amylase was incubated at each temperature for 30min and compared with a non-incubated sample using standard activity assay.

효소활성이 *T. profundus*에서는 관찰되지 않았는데 이런 결과는 대부분의 고온성 미생물 amylase의 특성으로 보고된 바 있다²⁰⁾. *T. profundus*는 심해에서 분리되었기 때문에 생육을 위해 2.5% NaCl이 반드시 요구되는데, 활성을 위해서는 NaCl에 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 고온성 미생물 효소의 특징인 계면활성제에 대한 내성이 *T. profundus* amylase에서는 EDTA, SDS, Triton X-100, Tween 60, CHARPS 등에 높은 안정성을 보였다²⁰⁾.

6. 당 가수분해물의 양상

Amylase는 starch, amylose, amylopectin, glycogen을 분해시켜 주생성물로 maltose와 maltotriose를, 그리고 극미량의 glucose와 소량의 maltotetraose 이상의 당을 생산하였으나 pullulan과 α-, β-, γ-cyclodextrin은 분해시킬 수 없었다(Fig. 4).

다당류 중에 amylopectin에 대해서 기질 특이성이 가장 높았고 그 다음이 starch, glycogen으로 나타났으며 중합도가 낮은 amylose B에 대해서는 낮은 활성을 나타내었다.

Table 2. Effect of chemical reagents and Ca^{2+} ion on the amylase activity

Compounds	Conc.	Relative activity(%)
CaCl ₂	1mM	100
	5mM	110
NaCl	1.0%	87
	2.0%	100
	3.0%	100
	4.0%	100
	5.0%	100
EDTA	1mM	100
	5mM	89
SDS	0.1%	100
	0.5%	100
	1.0%	95
Triton X-100	0.1%	100
	0.5%	100
	1.0%	100
Tween 60	0.1%	100
	0.5%	100
	1.0%	94
CHARPS	0.1%	100
	0.5%	100
	1.0%	100

The crude amylase was dialyzed against a buffer containing 50 mM Tris · HCl buffer (pH 7.5) and 1mM EDTA, and then dialyzed against 50 mM Tris · HCl buffer (pH 7.5). The amylase did not lose any activity by this dialysis. The amylase was incubated at 40°C for 24h in each reagents solution and the remaining activity was then determined

그리고 amylase는 maltose와 maltotriose를 가수분해시킬 수 없으나 DP가 4이상인 maltotetraose부터는 용이하게 분해시켰으며, 이때 중합도가 높을수록 분해율은 증가하였다.

상기 결과로부터 심해에 존재하는 다당류를 *T. profundus*가 이용하는 과정은 먼저 균체의 amylase에

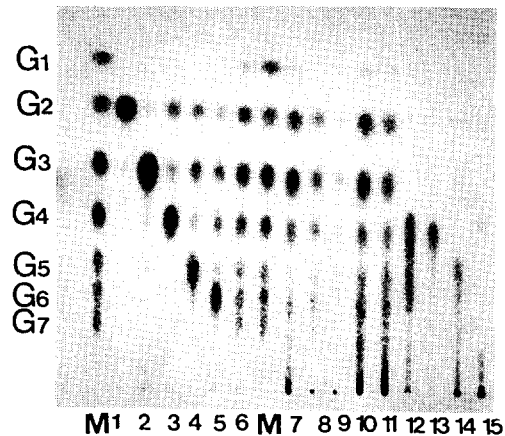


Fig. 4. Action patterns of the crude amylase on various substrates(2%). Lane 1 to 6 are the products from malto-oligosaccharides ranging from maltose to maltoheptaose(left to right). Lane 7 to 15 ; soluble starch(7), amylose A(8), amylose B(9), amylopectin(10), glycogen(11), α -(12), β -(13), γ -(14)-cyclo-dextrin and pullulan(15). Lane M represents a standard mixture of malto-oligosaccharides ranging from glucose(G₁) to maltoheptaose (G₇).

의해서 다당류가 maltose, maltotriose로 분해되고, 이 물질은 미확인 기작으로 세포내로 들어가면 세포내 α -glucosidase에 의해 glucose로 전환되어 대사되는 것으로 추정할 수 있다.

이상의 결과, 즉 고온(80°C)에서의 최적 활성 및 열안정성, Ca 비의존성, 계면활성제에 대한 내성 그리고 당분해 pattern 등으로 미루어 보아 *T. profundus*가 생산하는 amylase는 전분가공 분야에 많은 잇점이 있으나, 효소생성이 어렵고 활성이 낮은 단점이 있다.

따라서 효소정제에 의한 열안정성 기구해명 그리고 산업적 응용에 필요한 다량의 효소생산 방법의 일환으로 유전자 분리에 의한 고수율 발현 실험을 진행 중에 있다.

요 약

심해 분화구에서 분리된 초고온성 archaebacterium 인 *Pyrococcus furiosus* DT5432는 α -1,4 또는 α -1,

6-glucoside 결합을 가진 탄수화물 함유 배지에서 균체의 amylase과 pullulanase, 균체내 α -glucosidase를 생성하였는데 0.5% maltose첨가시에 균체의 amylolytic 효소의 생성능이 가장 우수하였다.

DEAE-Toyopearl column chromatography와 활성염색의 결과가 2종류의 amylase가 생성되었는데, 이 효소들은 pH 5.5, 80°C에서 최적활성을 보였고, pH 5.5~9.5, 80°C에서 30분간 안정하였다.

중온성 미생물 유래의 amylase와 다르게 효소활성을 위해 Ca^{2+} 이온을 요구하지 않았으며 또한 SDS, Triton X-100과 같은 계면활성제에 1.0% 농도까지 안정성이 확인되었다.

Amylase는 soluble starch, amylose, amylopectin 및 glycogen 등을 분해시켜 주생성물인 maltose와 maltotriose외에 미량의 glucose를 생성시켰으며 그리고 maltotetraose 이상의 oligosaccharide도 용이하게 분해시켰다.

참고문헌

- Hyun, H. H. and Zeikus, J. G. : General biochemical characterization of thermostable extracellular β -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1162(1985)
- Ogasahara, K., Imanis, K. and Isemura, T. : Studies on thermophilic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *J. Biochem.*, **67**, 65 (1970)
- Plant, A. R., Patel, B. K. C., Morgan, H. W. and Daniel, R. M. : Starch degradation by thermophilic anaerobic fermenters, *System. Appl. Microbiol.*, **9**, 158(1987)
- Schumann, J., Wrba, A., Jeenicke, R. and Stetter, K. O. : Topographical and enzymatic characterization of amylases from the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*, *FEBS Lett.*, **282**, 122(1991)
- Kobatashi, Y., Motoike, M., Fukuzumi, S., Ohshima, T., Saiki, T. and Beppu, T. : Heat stable amylase complex produced by a strictly anaerobic and extremely thermophilic bacterium, *Dictyoglomus thermophilum*, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 615(1988)
- Koch, R., Zablowski, P., Spreinat, A. and Antranikian, G. : Extremely thermostable amylolytic enzyme from the archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **71**, 21(1990)
- Brown, S. H., Costantino, H. R. and Kelly, R. M. : Characterization of amylolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1985(1991)
- Brown, S. H. and Kelly, R. M. : Characterization of amylolytic enzymes, having both α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2614(1993)
- Costantino, H. R., Brown, S. H. and Kelly, R. M. : Purification and characterization of an α -glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115°C, *J. Bacteriol.*, **172**, 3654(1990)
- Koch, R., Spreinat, A., Lemke, K. and Antranikian, G. : Purification and properties of a hyperthermoactive α -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*, *Arch. Microbiol.*, **155**, 572(1991)
- Jannasch, H. W., Wirsén, C. O., Molyneux, S. J. and Langworthy, T. A. : Extremely thermophilic fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vent, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1203(1988)
- Stetter, K. O., König, H. and Stackebrandt, E. : *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulfur reducing

- archaeobacteria growing optimally at 105°C, *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 535(1983)
13. Kobayashi, T., Kwak, Y. S., Akiba, T., Kudo, T. and Horikoshi, K. : *Thermococcus profundus* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeum isolated from a deep-sea hydrothermal vent, *System. Appl. Microbiol.*, in press
 14. Nelson, N. : A photomeric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375(1994)
 15. Kohchi, C. and Tohe, A. : Cloning of *Candida pelliculosa* β -glucosidase gene and its expression in *S. cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.*, **203**, 89(1986)
 16. Pastuska, G. : Untersuchungen über die qualitative and quantitative Bestimmung der Zucker mit Hilfe der Kieselgelschicht-Chromatographie, *Z. Anal. Chem.*, **179**, 427 (1961)
 17. Hyun, H. H., Shen, G. J. and Zeikus, J. G. : Differential amylosaccharide methabolism of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *J. Bacteriol.* **164**, 1153 (1985)
 18. Schafer, t. and Schonheit, P. : Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*, *Arch. Microbiol.*, **159**, 354(1993)
 19. Lowe, S., Jain, M. K. and Zeikus, J. G. : Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates, *Microbiol. Rev.* **57**, 451 (1993)

(1994년 10월 14일 수리)