

내열성 α -Glucosidase를 생산하는 호열성 *Bacillus* sp. 균주의 분리 및 특성

이용억†

동국대학교 자연과학대학 생화학과

Isolation and Characterization of a Thermophilic *Bacillus* sp. Producing a Thermostable α -Glucosidase

Yong-Eok Lee†

Department of Biochemistry, College of Natural Science, Dongguk University,
Kyongju, Kyongbuk 780-714, Korea

Abstract

A thermophilic bacterium (strain DG0303) producing a thermostable α -glucosidase was isolated from manure and identified as *Bacillus* sp. Strain DG0303 produced high level of α -glucosidase compared with other thermophilic *Bacillus* strains. The cellular protein patterns were also compared with other *Bacillus* strains by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). On the basis of 16S rDNA analysis the *Bacillus* sp. DG0303 was found to be a member of *Bacillus* rDNA group 5. The optimum temperature for growth was 65°C and no growth was obtained at 40°C or 75°C. The optimum pH for growth was 5.5 to 8.5. α -Glucosidase activity was produced during growth and most activity was detected in the culture supernatant. The α -glucosidase production was constitutive in the absence of carbohydrates. High level of enzyme activity was detected when the culture was grown on medium containing starch. Addition of glucose resulted in the repression of the α -glucosidase production. The optimum pH and temperature for enzyme activity were pH 5.0 and 65°C, respectively. When analyzed by zymogram, the culture supernatant showed a single α -glucosidase band with a molecular weight of approximately 60,000.

Key words : Isolation, thermophilic, *Bacillus* sp., α -glucosidase

서 론

전분(starch)은 식물체의 주된 탄수화물이며 자연에 가장 널리 분포되어 있는 재활용이 가능한 폴리머들 중 하나이

다. 전분은 미생물학적인 방법에 의하여 연료, 사료단백질 및 화학물질 등으로 전환될 수 있다^{1,2)}. 전분의 완전한 가수분해를 위해서는 α -amylase, β -amylase, pullulanase 및 α -glucosidase와 같은 여러 가수분해효소들의 협력작용이

† Corresponding author

필요하다^{2,3,4}).

α -Glucosidase(α -D-glucoside glucohydrolase : EC 3.2.1.20)는 올리고당과 다당류의 비환원 말단으로부터 α -D-glucosidic 결합을 가수분해하여 D-glucose를 유리시키는 효소이며, 다당류보다는 올리고당을 더 빠르게 분해한다. α -Glucosidase는 또한 반응혼합물에 높은 농도의 glucose 수용체가 존재할 때 transglucosylation 반응을 촉매 하는 것으로 알려져 있다⁵). α -Glucosidase는 다양한 기질특이성을 가지고 있어 활용범위가 매우 넓다. 예를 들면 α -glucosidase는 단독으로 또는 glucoamylase와 함께 maltose와 maltodextrin을 가수분해하여 무수 결정 포도당이나 high-dextrose syrup의 생산에 사용될 수 있다¹). 이 효소의 transglucosylation 반응에 의해 생성되는 기능성 감미료인 이소말토올리고당은 건강식품과 식품산업에 유용한 많은 특성을 지니고 있다^{6,7}). α -Glucosidase는 식물, 동물 및 미생물에 널리 존재하며 주로 중온성 세균에서 생산되는 α -glucosidase에 대해 연구가 진행되어졌다^{2,5}). α -Glucosidase의 기질특이성과 열에 대한 안정성은 이 효소를 생산하는 미생물에 따라 크게 다르다^{8,9,10}). 그 한 예로 초호열성균인 *Pyrococcus furiosus*로부터 생산되는 α -glucosidase는 105-115°C의 최적 활성온도를 나타낸다¹¹).

호열성 미생물이 생산하는 내열성 효소들은 열에 안정한 특성뿐만 아니라, 다른 여러 단백질변성 화학제에 대해서도 높은 안정성을 가지고 있어 생물공학적으로 상당한 관심의 대상이 되고 있다^{12,13,14}). 내열성 효소들은 열에 대한 안정성이 높아서 효소 교환비용을 크게 줄일 수 있으며 높은 온도에서 진행되는 효소반응 공정을 가능케 한다. 내열성 효소는 단백질 구조와 열 안정성과의 관계와 같은 기초연구를 위한 좋은 재료이기도 하다.

본 연구에서는 퇴비로부터 내열성 α -glucosidase를 생산하는 호열성균을 분리하여 이를 동정하고 효소생산과 관련된 일부 특징을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 내열성 α -glucosidase 생산균의 분리

내열성 α -glucosidase를 생산하는 호열성균을 분리하기 위하여 경상북도 울진 일원의 토양 및 퇴비를 채집하여 분리용 시료로 사용하였다. 각각의 시료 1 g을 0.85% NaCl

용액 10 ml에 현탁하고 현탁액의 적당량을 분리용 액체배지(nutrient broth 8 g/l, soluble starch 10 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l, pH 7.0)에 접종하고 진탕배양기에서 55°C에서 2일간 진탕배양 하였다. 농화배양된 균은 희석법에 의하여 평판도말법으로 순수분리 하였다. 1차로 분리된 호열성 미생물을 대상으로 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG)가 함유된 영양한천배지를 사용하여 55°C에서 노란 색을 나타낸 α -glucosidase 생산균주들을 2차로 분리하였다. 최종 균주의 분리는 nutrient broth를 사용하여 55°C, 200 rpm에서 18시간 회전진탕 배양한 후 배양액으로 분리된 효소의 활성과 내열성을 지표로 우수한 균주를 선별하였다.

2. 선별균주의 동정

분리균주를 광학현미경(Zeiss KF2, Germany) 및 위상차현미경(Nikon LABOPHOT-2, Japan)으로 형태학적 특성을 관찰하고 생리 및 생화학적 특성을 조사하여 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"¹⁵)에 준하여 동정하였다. 미생물 자동 동정 시스템인 BIOLOG(Biolog, Inc, U.S.A.)에 의한 동정도 병행하여 실시하였다.

3. 효소활성 측정 및 단백질 정량

α -Glucosidase 활성은 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 2 mM pNPG 및 효소용액이 들어있는 3 ml의 반응혼합물을 60°C에서 10분간 반응시킨 후 2 ml의 1 M Na_2CO_3 를 가하고 유리된 *p*-nitrophenol의 양을 420 nm에서 흡광도로 측정하였다. 효소활성단위는 표준반응계에서 1분에 1 μ mol의 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하였다. 단백질은 표준물질로서 bovine serum albumin을 사용, Lowry 등의 방법¹⁶)에 의해 정량 하였다.

4. 세포내 단백질의 추출

수용성의 세포내 단백질을 분리하기 위하여 각 미생물들을 영양액체배지에서 정지기까지 배양한 후 원심분리로 세포를 모아 증류수에 현탁시켰다. 초음파분쇄기(Ultrasonic Processor VCX400, Sonics & Materials, U.S.A.)를 이용하여 세포를 파괴한 뒤 원심분리하여 세포내 단백질을 회수하였다.

5. 16S rRNA 유전자의 증폭 및 클로닝

분리균의 chromosomal DNA는 Marmur의 방법¹⁷⁾으로 분리하였다. 분리된 DNA로부터 polymerase chain reaction(Perkin-Elmer 2400, The Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, U.S.A.)을 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 Johnson의 방법¹⁸⁾을 따랐으며 이때 이용된 primer 쌍은 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'와 5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3'이다. 증폭된 16S rDNA는 Sambrook 등의 방법¹⁹⁾에 따라 pUC18 vector에 삽입시켜 *E. coli* DH5 α 로 형질전환시켰다. 클로닝된 16S rDNA는 Silver DNA sequencing kit(Promega)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 시발체로는 16S rRNA 유전자 내부의 sequencing primer들¹⁸⁾을 이용하였다.

6. 배양조건에 따른 균주의 성장과 효소생산

분리균의 성장정도는 분광 광도계(Shimadzu Model UV-120, Japan)을 사용하여 660 nm에서의 배양액의 흡광도를 측정하여 결정하였다. 탄소원의 종류에 따른 효소 생산성을 알아보기 위해 액체배양을 실시하였는데, 기본배지로 LB medium(bactotryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)을 사용하였고 각 탄소원을 1% (w/v)가 되게 넣어주었다.

7. 조효소액의 조제와 효소특성

분리균을 LB 배지에 접종하여 55°C에서 18시간 배양한 후, 8,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 ultrafiltration(분자량이 10 kDa 이상) 방법으로 농축하여 세포의 조효소액으로 사용하였다. α -Glucosidase의 pH에 의한 활성변화를 측정하기 위해 pH 4.0-7.5은 50 mM citric acid-Na₂HPO₄(McIlvaine) buffer, pH 4.5-5.5는 sodium acetate buffer를 이용하여 각 pH대 별로 반응시킨 후, 효소활성을 측정하였다. 온도변화에 따른 효소활성의 변화를 보기 위해 기질용액을 최적활성을 갖는 pH로 조정하고 이를 조효소액과 섞어서 40°C에서 80°C까지 온도를 변화시키며 효소의 활성을 측정하였다.

8. 전기영동 및 활성염색(Zymogram)

SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli의 방법²⁰⁾에 따라 12% acrylamide gel을 사용하였으며 단백질 염색

은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 하였다. α -Glucosidase의 활성염색은 Schwarz 등의 방법²¹⁾을 변형하여 수행하였다. 즉, 전기영동 후 gel을 완충용액(50 mM sodium acetate, pH 5.0)으로 30분간 2회 세척한 뒤 그 위에 형광기질인 0.5 mM 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside(α -MUG)가 포함된 0.8% agarose gel을 올려놓고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 자외선 램프 하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. α -Glucosidase 생산 균주의 탐색

분리된 호열성균들 중에서 가장 α -glucosidase 활성이 큰 균주 DG0303을 최종 선발하여 이 후의 실험에 사용하였다. 지금까지 α -glucosidase를 생산하는 *Bacillus*속의 호열성균주로는 *B. stearothermophilus*²²⁾와 *B. thermoglucosidasius*²³⁾ 등이 보고되어 있었다. 선발한 균주 DG0303의 효소 활성은 기존에 보고된 이들 α -glucosidase 생산 균주들의 활성과 비교하여 보았을 때 활성이 우수한 결과를 보였다 (Table 1).

2. 선별균주의 동정

선별된 균주 DG0303은 그람양성의 간균으로 호기성이며 내생포자를 형성하였다(Fig. 1). 생리 및 생화학적 특성은 Table 2와 같으며 최적 배양온도는 65°C였으나 45°C에서 70°C까지 생육이 가능한 전형적인 호열성 세균이었다. 생육이 가능한 pH의 범위는 5.0~9.5이었으나 최적 생육 pH는 7.0인 중성세균이었다. 위의 검사한 결과를 종합하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹⁵⁾와 비교한

Table 1. Comparison of α -glucosidase activity of an isolated strain with reported *Bacillus* strains

Strain	Activity	
	Unit/ml	Unit/mg protein
Isolate DG0303	273.5	75.6
<i>B. stearothermophilus</i>	61.9	17.2
<i>B. thermodenitrificans</i>	32.0	7.4
<i>B. thermoglucosidasius</i>	12.1	3.4

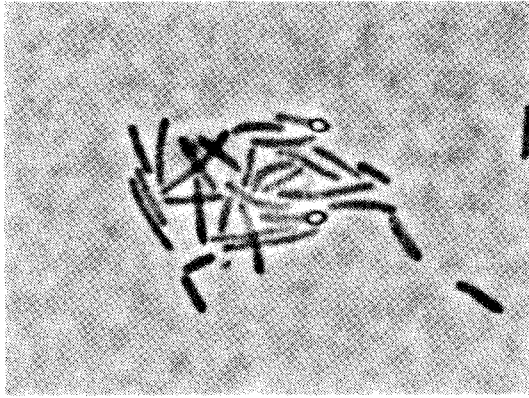


Fig. 1. Phase-contrast photomicrograph of *Bacillus* sp. DG0303 grown on nutrient broth. Magnification, X 1,000.

결과 *Bacillus*속 균주로 판별되었으므로 이를 *Bacillus* sp. DG0303으로 명명하였다. 이러한 균주동정의 확증을 위해 자동화 균주 동정 기계인 Biolog system을 이용하여 검사를 실시한 결과 *B. thermoglucosidasius*²³⁾와 가장 유사한 것으로 나타났다(자료 미제출).

Bacillus sp. DG0303과 다른 *Bacillus*속 균주들과의 유사성을 밝히기 위해 α -glucosidase를 생산하는 것으로 알려진 여러 *Bacillus* 균주들의 세포내 단백질을 전기영동으로 비교하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 DG0303의 세포내 단백질은 전기영동 상에서 다른 *Bacillus*속 균주들의 세포내 단백질들과는 다른 양상을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 분리한 DG0303은 지금까지 보고된 α -glucosidase 생산균주와는 다른 새로운 균주로 사료된다.

3. 16S rDNA 분석

Bacillus sp. DG0303의 계통발생학적 위치를 확인하기 위해 DG0303의 16S rDNA를 PCR로 클로닝하여 염기서열을 결정하였다(자료 미제출). 그리고 DG0303의 16S rDNA 염기서열과 가장 상동성이 높은 16S rDNA의 미생물을 GenBank의 DNA database에서 찾은 결과 *B. denitrificans*(Genbank No. Z26927)²⁴⁾ 및 *B. stearothermophilus*(Genbank No. X57309)와 가장 상동성이 높은 것으로 나타났다(각각 96% 상동성). *B. thermodenitrificans*²⁴⁾와는 95%의 상동성을 보였으며 *B. thermoglucosidasius*²³⁾와

Table 2. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of strain DG0303

Growth in air	+
Cell shape	Rod
Endospore	+
Gram stain	+
Motility	+
NaCl tolerance(%)	2
Catalase	+
Oxidase	+
Nitrate reduction	+
Hydrolysis of	
casein	-
gelatin	+
starch	+
Citrate utilization	-
Urease	-
Indole formation	-
ONPG	+
VP test	-
KCN	-
Temperature(°C)	
min	45
max	70
optimum	60-65
Acid formation from	
galactose	-
glucose	+
lactose	-
mannitol	+
mannose	+
starch	+
sucrose	+
xylose	+

는 93%의 상동성을 가지는 것으로 분석되었다. 16S rRNA sequence분석에 의한 상동성 비교 결과, 분리균 DG0303은 분자계통학적으로 *Bacillus*의 rDNA group 5²⁵⁾에 속하는 것으로 밝혀졌다. *Bacillus* sp. DG0303과 *Bacillus*

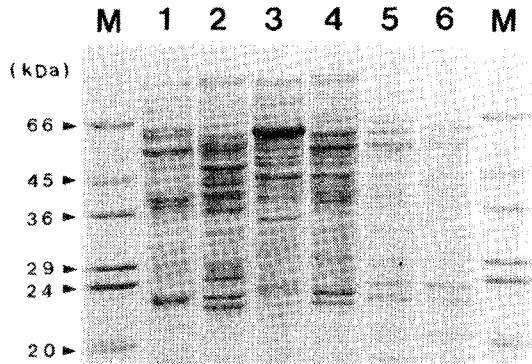


Fig. 2. Electrophoretic comparison of cellular proteins from *Bacillus* strains that have α -glucosidase activity. Lane 1, *Bacillus* sp. DG0303 ; lane 2, *B. thermodenitrificans* ; lane 3, *B. thermoglucosidasius* ; lane 4, *B. stearothersophilus* ; lane 5, *B. subtilis* ; lane 6, *B. cereus*. Molecular weight markers(M) are in the outer lanes.

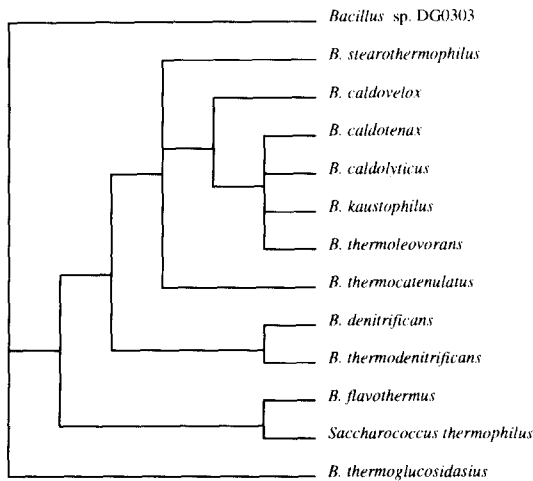


Fig. 3. Phylogenetic relationship of the thermophilic *Bacillus* including isolate DG0303, as determined from 16S rRNA sequence analysis.

rDNA group 5에 속하는 균주들과의 계통발생학적 관계를 알아보기 위하여 computer program PAUP(phylogenetic analysis using parsimony) version 3.1을 사용하여 phy-

logenetic tree를 작성하였다(Fig. 3). 그 결과 분리균 DG0303은 α -glucosidase 생성균으로 알려진 *B. stearothersophilus*나 *B. thermoglucosidasius*와는 별개의 group에 속하는 것으로 나타났다.

4. 효소 생산 조건검토

배양 시간에 따른 영향 : LB 배지에서 배양 시간에 따른 *Bacillus* sp. DG0303 균주의 생육과 α -glucosidase 생산을 분석한 결과 α -glucosidase의 생산성이 미생물의 성장과 일치하여 증가됨을 보이고 생육이 정지기에 이르면 효소의 생산량도 거의 증가되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4).

탄소원의 영향 : 미생물의 다당류 분해효소는 배양액 중의 탄소원에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많으므로 탄소원이 *Bacillus* sp. DG0303의 α -glucosidase 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 LB 배지를 기본 배지로 하여 부가 탄소원으로는 따로 멸균된 glucose, maltose 및 전분을 1% (w/v)가 되도록 각각 또는 함께 첨가하여 55°C에서 16~18시간 배양하여 정지기에 이르렀을 때 배양상등액에 존재하는 α -glucosidase 활성을 조사하였

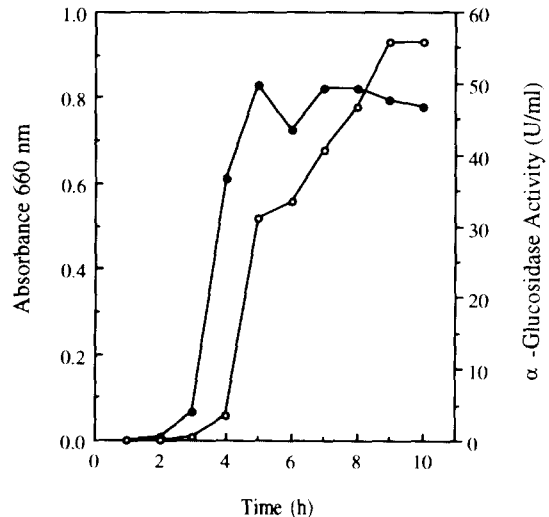


Fig. 4. α -Glucosidase synthesis during growth of *Bacillus* sp. DG0303 on LB broth. ●, O.D. 660 nm ; ○, α -glucosidase activity.

Table 3. Effect of carbon source on α -glucosidase production by strain DGO303

Carbohydrate(1%)	α -Glucosidase activity (U/mg of protein)
None	224
Glucose	33
Maltose	139
Starch	1169
Starch + glucose	22

다(Table 3). Glucose가 첨가된 배지에서는 α -glucosidase의 생산이 현저히 줄어들었다. Maltose가 첨가된 배지에서는 효소의 생산이 다소 감소하였으며 starch를 포함하는 배지에서는 효소 생산성이 크게 증가되었다. Starch와 glucose를 함께 첨가한 배지에서는 glucose만 첨가한 배지와 마찬가지로 α -glucosidase의 생산이 억제되는 것으로 보아 *Bacillus* sp. DGO303에서 α -glucosidase의 생산은 catabolite repression을 받는 것으로 사료된다.

5. 조효소의 최적반응 조건 및 분자량

재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 조효소액을 조제하여 효소반응의 최적활성 pH와 온도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보인바와 같이 60°C와 pH 5.0에서 최고의 α -glucosidase 활성을 보였다. 이 효소는 55-65°C 사이에서 70% 이상의 활성을 보여 고온에서 안정성이 있는 효소로 나타났다. 65°C 이상에서는 효소활성이 급격히 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 유사균주인 *B. stearothermophilus* ATCC 12016와 *B. thermoglucosidasius*가 생산하는 α -glucosidase의 경우 최적 pH와 온도는 각각 6.3, 70°C와 6.8, 70°C이므로 본 균주의 α -glucosidase와는 특성의 차이를 보였다. 실제 *Bacillus* sp. DGO303이 생산하는 α -glucosidase를 완전히 정제하지 않았기 때문에 몇 종류의 효소가 존재하는지는 알 수 없으나 반응에 사용하였던 조효소액에 의해 *p*-nitrophenol- β -glucosidase가 전혀 분해되지 않는 것으로 확인되어 조효소액에는 β -glucosidase의 활성은 없는 것으로 판단된다.

Bacillus sp. DGO303이 생산하는 α -glucosidase의 대략적인 분자량을 알아보기 위해 조효소액을 전기영동한 후 활성염색을 실시하였다. 그 결과 약 60 kDa 크기의 단백

질에서 활성이 나타났다(Fig. 6). 따라서 DGO303에서 생산되는 α -glucosidase는 분자량이 60 kDa인 단백질이거나 동일한 60 kDa의 여러 소단위로 구성된 단백질일 것으로 사료된다.

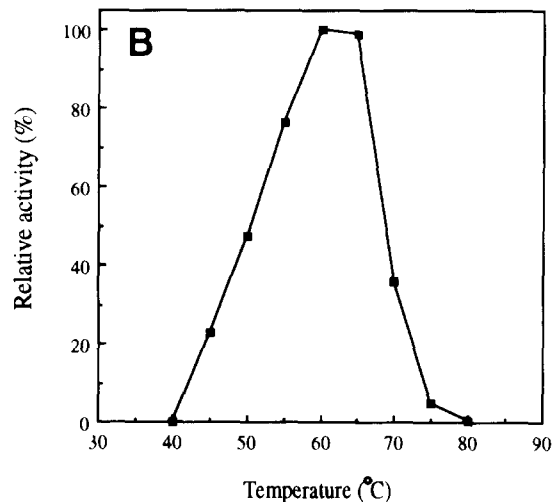
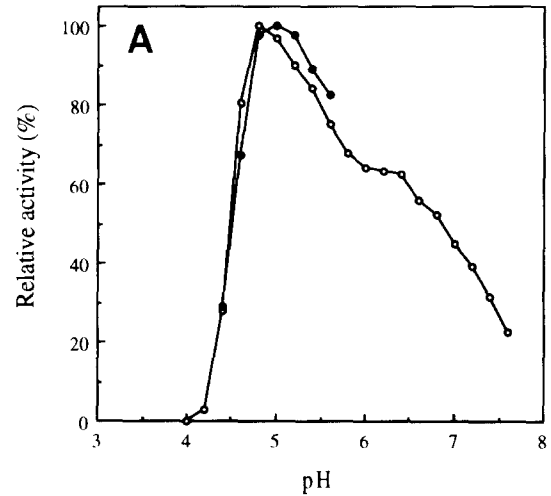


Fig. 5. Effect of pH(A) and temperature(B) on the α -glucosidase activity. The relative α -glucosidase activity of the culture supernatant was determined at various pHs and temperatures. The buffers used were: ○, citric acid- Na_2HPO_4 (McIlvaine) buffer; ●, sodium acetate buffer.

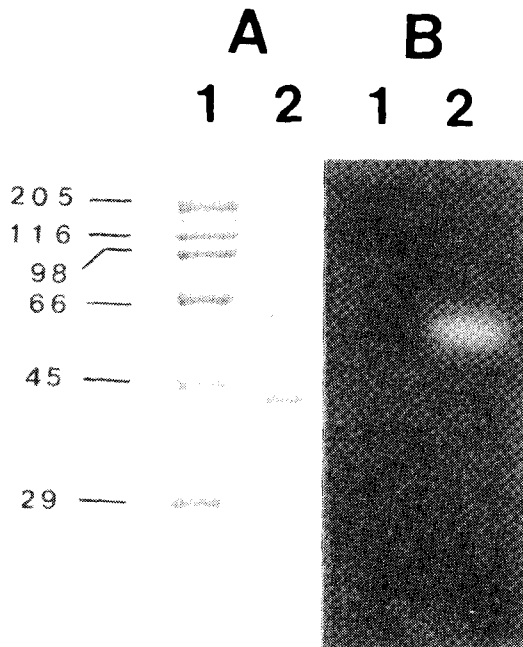


Fig. 6. SDS-PAGE(A) and zymogram(B) of concentrated culture supernatant of *Bacillus* sp. DG0303. Lanes 1, size marker ; lanes 2, extracellular proteins of the culture.

요 약

내열성 α -glucosidase를 생산하는 호열성세균(균주 DG 0303)을 퇴비로부터 분리하여 *Bacillus*속임을 확인하였다. 균주 DG0303은 다른 호열성 *Bacillus* 균주들과 비교하였을 때 높은 α -glucosidase 생산성을 나타내었다. SDS-PAGE로 세포내 단백질의 전기영동 양상을 다른 *Bacillus* 균주들과 비교하였다. 16S rDNA 분석을 근거로 *Bacillus* sp. DG0303은 *Bacillus* rDNA group 5에 속하는 것을 확인하였다. 이 균주의 성장을 위한 최적온도는 65°C 이었으며 40°C와 75°C에서는 성장하지 않았다. 성장을 위한 최적 pH는 5.5-8.5이었다. α -glucosidase 활성은 세포가 성장하는 동안에 생산되었으며 대부분의 활성이 배양액에서 발견되었다. α -glucosidase는 탄수화물이 포함되지 않은 배지에서도 생산되었다. 전분을 함유한 배지에서 배양하였을 때 높은 수준의 효소활성이 관찰되었다. 포도당의 첨가는 α -

glucosidase의 생산을 감소시키는 것으로 나타났다. 효소활성을 위한 최적 pH와 온도는 각각 pH 5.0과 65°C이었다. 활성염색에 의해 세포배양액을 분석한 결과 분자량이 약 60,000인 α -glucosidase band가 나타났다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 전문학술지 논문게재연구비 지원으로 수행되었습니다. 16S rDNA의 분석을 도와주신 포항공대 생명과학과 김 양식 박사에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Kennedy, J. F., Cabalda, W. M. and White, C. A. : Enzymatic starch utilization and genetic engineering, *Trends in Biotechnol.*, 6, 184(1988).
- Nigam, P. and Singh, D. : Enzyme and microbial systems involved in starch processing, *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 770(1995).
- Ramesh, M. V., Saha, B. C., Mathupala, S. P., Podkovyrov, S. and Zeikus, J. G. : Biodegradation of starch and α -glycan polymers. *Biochemistry of microbial degradation*, Rattledge, C. ed. pp. 313, Kluwer Academic Publishers, Netherlands (1994).
- Sun, Z. and Henson, C. A. : A quantitative assessment of the importance of barley seed α -amylase, β -amylase, debranching enzyme, and α -glucosidase in starch degradation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 284, 298 (1991).
- Kelly, C. T. and Fogarty, W. M. : Microbial α -glucosidases, *Process Biochem.*, 18, 6(1983).
- Minetoki, T., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C. and Tamura, G. : Nucleotide sequence and expression of α -glucosidase-encoding gene(*agdA*) from *Aspergillus oryzae*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1516 (1995).
- Shimokawa, H., Takeda, Y., Wada, K. and Shimizu, T. : In vitro digestion and utilization of theanderose by various intestinal bacteria, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food. Sci.*, 46, 69(1993).
- Suzuki, Y., Oishi, K., Nakano, H. and Nagayama, T. : A strong correlation between the increase in number of proline residues and the rise in thermostability of five *Bacillus* oligo-1,6-glucosidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 546(1987).
- Takii, Y., Takahashi, K., Yamamoto, K., Sogabe, Y.

- and Suzuki, Y. : *Bacillus stearothermophilus* ATCC12016 α -glucosidase specific for α -1,4 bonds of maltosaccharides and α -glucans shows high amino acid sequence similarities to seven α -D-glucohydrolases with different substrate specificity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 629(1996).
10. Yoshikawa, K., Yamamoto, K. and Okada, S. : Classification of some α -glucosidases and α -xylosidase on the basis of substrate specificity, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1392(1994).
 11. 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).
 12. Adams, M. W. W., Perler, F. B. and Kelly, R. M. : Extremozymes : expanding the limits of biocatalysis, *Bio/Technol.*, **13**, 662(1995).
 13. Horikoshi, K. : Discovering novel bacteria, with an eye to biotechnological applications, *Curr. Opinion in Biotechnol.*, **6**, 292(1995).
 14. Russell, R. J. M. and Taylor, G. L. : Engineering thermostability : lessons from thermophilic proteins, *Curr. Opinion in Biotechnol.*, **6**, 370(1995).
 15. Claus, D. and Berkeley, R. C. W. : Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2., Sneath, P. H. A. ed., pp. 1105, Williams & Wilkins, Baltimore (1986).
 16. Lowry, O. H., Rosebrough, N., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
 17. Marmur, J. : A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J. Mol. Biol.*, **3**, 208(1961).
 18. Johnson, J. L. : Similarity analysis of rRNAs. *Methods for general and molecular bacteriology*, Gerhardt, P. ed., pp. 683, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994).
 19. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990).
 20. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature(London)*, **227**, 680(1970).
 21. Schwarz, W. K., Bronnenmeier, K., Grabnitz, F. and Staudenbauer, W. L. : Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage β -glycans, *Anal. Biochem.*, **164**, 72(1987).
 22. Suzuki, Y., Shinji, M. and Eto, N. U. : Assignment of a p-nitrophenyl, α -D-glucopyranosidase of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12016 to a novel exo- α -1,4-glycosidase active for oligomaltosaccharides and α -glucans, *Biochim. Biophys. ACTA*, **787**, 281(1984).
 23. Watanabe, K., Iha, H., Ohashi, A. and Suzuki, Y. : Cloning and expression in *Escherichia coli* of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase gene from *Bacillus thermoglucosidasius*, *J. Bacteriol.* **171**, 1219 (1989).
 24. Rainey, F. A., Fritze, D. and Stackebrandt, E. : The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis, *FEMS Microbiol. Lett.*, **115**, 205(1994).
 25. Ash, C., Farrow, J. A. F., Walibanks, S. and Collins, M. D. : Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of the small-subunit ribosomal RNA, *Lett. Appl. Microbiol.* **13**, 202(1991).