

일본의 Atagawa 온천지대에서 분리한 내열성 β -glycosidase 생성균주의 분리 및 동정

남은숙, 최종우, 차성관¹, 안종건*
한국방송통신대학교, ¹한국식품개발연구원

Isolation and Identification of Thermostable β -glycosidase-producing Microorganism from Hot Spring of Volcanic Area at Atagawa in Japan. Nam, Eun-Sook, Jong-Woo Choi, Seong-Kwan Cha¹, and Jong-Kun, Ahn*. Department of agricultural science, Korea National Open University, Seoul 110-792, Korea, ¹Korea Food Research Institute, Seongnam, Kyonggido, 463-420, Korea - This study was performed to obtain the thermostable β -glycosidase producing bacteria from hot spring of volcanic area at Atagawa in Japan. KNOUC 202 was selected because it showed thermostable β -glycosidase activity in sodium phosphate buffer(pH 6.8) at 70°C for 4h, and it was identified. The strain was aerobic, asporogenic bacilli, immobile, gram negative, catalase positive, oxidase positive, and pigment-producing. Optimum growth was at 70~72°C, pH 7.0~7.2, and it could grow in the presence of 3% NaCl. The main fatty acids in cell were iso-15:0 and iso-17:0. 16S rRNA sequence of KNOUC 202 showed 99.9% similarity with that of *Thermus thermophilus* ATCC 27634(HB8). Based on morphological, physiological, biochemical characteristics, cellular fatty acids profile and 16S rRNA sequence analysis, KNOUC 202 was identified as *Thermus thermophilus*.

Key words: Thermostable β -glycosidase, *Thermus thermophilus*, hot spring

고온성미생물은 극한 환경에서 생존 원리의 연구와 내열성 효소 생산원으로서의 가치가 있다. 고온균에서 유래한 고온성 효소는 내열성, 계면활성제 및 유기용매 등에 대한 안정성이 매우 우수하여 소량의 효소로도 장기간 사용이 가능하고, 고온에서 반응시킴으로 기질의 용해도가 낮은 물질의 용해도 증가, 물질화산속도의 증가, 반응속도의 증가, 반응시간의 단축 및 중온성 미생물에 대한 오염방지 등의 장점을 갖고 있다. 특히 내열성효소는 고온에서 높은 반응속도로 인하여 반응시간을 단축할 수 있고 반응과정에서 오염미생물의 번식을 방지할 수 있어 식품산업에서 중요하게 인식되어 왔다. 1970년대 까지 *Bacillus*[18], *Aspergillus*[12]와 *Kluyveromyces*[23]등으로부터 내열성효소의 생산을 시도했으나 1969년에 hot spring에서 *Thermus aquaticus*[3]가 동정되면서 70°C이상에서 서식하는 미생물이 내열성 효소 생산원으로 이용되기 시작하였다. 1970년대 후반에 심해의 hydrothermal vents 주변의 고온에서 생육 가능한 초고온균에 대한 연구가 시작되어 현재 60종류 이상의 hyperthermophiles가 분리되었다. 현재까지 알려진 가장 높은 생육온도를 갖는 초고온균은 *Pyrolobus fumarii*로 최적 생육온도가 103°C, 최고 113°C에서도 생장하며, 90°C 이

하에서는 생장이 멈추는 것으로 알려져 있다[5]. *Thermus*는 Brock 등[3]이 1969년 미국 Yellowstone park와 캘리포니아의 온천에서 분리, 보고한 후 내열성효소의 생산원으로 이용되기 시작하였으며, *Thermus aquaticus*[3], *Thermus thermophilus*[15], *Thermus filiformis*[11], *Thermus scotoductus*[13], *Thermus brockianus*[24]등이 보고되었다.

β -glycosidase는 다양한 기질을 이용할수 있어 탄수화물산업에서 소당류의 생산[7], glycoside 유도체 합성[16]등 여러 가지 종류의 탄수화물의 분해에 이용할 수 있는 효소이다. 내열성 β -glycosidase는 우유의 유당을 고온에서 분해하여 위생적인 유당분해 우유를 생산하여 유당 소화 장애를 해결할 수 있다. Dion 등[9]은 *Thermus*가 내열성 β -glycosidase를 생산한다는 사실과 함께 유전자의 cloning을 보고 한바 있다.

본 연구에서는 내열성이 우수한 β -glycosidase를 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 일본 Atagawa 온천지역의 온천수 및 무기침전물로 부터 미생물을 분리하여 형태학적 및 생리적, 생화학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 배양 및 선발

내열성 β -glycosidase 균주를 분리하기 위해서 일본의 Atagawa 화산지대에서 무기침전물과 온천수를 수집하였다. 수집한 시료를 ATCC medium 1598[1]배지 [bactotryptone 2.5 g, yeast extrat 2.5 g, nitrilotriacetic acid 100.0 mg,

*Corresponding author
Tel. 02-3668-4633, Fax. 02-3668-4187
E-mail: ajk@mail.knou.ac.kr

CaSO₄·2H₂O 4 mg, MgCl₂·6H₂O 200 mg, 0.01 M Fe-citrate 0.5 ml, 0.5 ml trace element soln., Na-K-phosphate buffer (pH 7.2, 0.16 M) 100 ml, per liter]에 접종하여 70°C에서 250 rpm으로 48시간 진탕하여 1차 배양하였다. 1차 배양액을 ATCC medium 1598에 1% lactose, 2.8% agar, 0.02% 5-bromo-4-chloro-3-β-D-galactopyranoside(X-gal)를 첨가한 고체 배지에 도포하여 70°C에서 48시간 2차 배양하여 blue colony를 형성하는 것을 선별하여 사용하였다.

Trace element soln.의 조성은 nitrilotriacetic acid 12.8 g, FeCl₂·4H₂O 1.0 g, MnCl₂·4H₂O 0.5 g, CoCl₂·6H₂O 0.3 g, CuCl₂·5H₂O 50.0 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 50 mg, H₃BO₃ 20 mg, NiCl₂·6H₂O 20 mg, per liter이었다.

효소의 활성 측정

배양액 100 ml를 원심분리(3000 rpm, 20 min)하여 균체를 회수한 후, 20 mM sodium phosphate(pH 6.8) 완충용액 10 ml에 침전물을 현탁시킨 후 sonication(100 Hz, 30초간 3회반복)으로 세포를 파쇄하여 효소활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다. 효소활성은 20 mM sodium phosphate(pH 6.8) 완충용액에 5 mM로 포함된 o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG)의 기질용액 2.5 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 70°C의 water bath에서 10분간 반응 후 ice water에서 냉각하여 Na₂CO₃ 수용액(0.5 M)을 3 ml 첨가한 후 420 nm에서의 흡광도로서 측정하였다. 효소의 내열성은 70°C에서 1시간 간격으로 4시간 동안 잔존 활성을 측정하여 조사하였다. β-glycosidase활성은 A₆₀₀ = 0.1의 세포현탁액 1 ml로 부터 생산된 조효소액이 1분간 ONPG로부터 1 μmole의 ONP를 생산하는 것을 1 unit로 하였다.

선발균주의 동정

분리 균주의 크기와 형태 및 포자형성여부를 그람염색과 포자염색 후 광학현미경으로 관찰 조사하였다. 분리 균주를 정밀관찰하기 위하여 주사전자현미경(SEM)을 이용하였다. 주사전자현미경 촬영을 위하여 고체배지에 배양한 균체를 pH 7.0의 0.1 M phosphate buffer saline(PBS)을 사용하여 세척하였다. 균체에 2.5% glutaraldehyde solution을 첨가하여 1시간 방치한 후 원심분리하고 PBS로 균체를 세척하여 단백질을 고정하였다. 단백질 고정후 지질을 고정하기 위해 1% osmium tetroxide solution을 첨가한 후 1시간 동안 방치한 다음 원심분리하고, 35%, 50%, 70%, 80%, 96% 및 100% 알코올을 사용하여 단계적으로 사용할 균체를 탈수하였다. Hexamethyl-disila-zane을 첨가 후 20분간 방치하는 건조과정을 2회 반복한 후 도금단계를 거쳐 20,000배로 확대 촬영하였다. 균의 성장특성 및 최적성장온도와 최적 pH를 Degryse[8]의 방법을 이용하여 조사하였다. 생리학적 특징은 Santos 등[22]과 Manaia 등[15]의 방법을 이용하여

catalase반응, oxidase반응, NaCl tolerance test, casein 가수분해, starch 가수분해, gelatin 액화, H₂S 생성시험, citrate 이용성, urease 반응, ONPG 분해, p-NPGal분해, p-NPFuc 분해, p-NPglu 분해, indole 생성, nitrate 환원시험, 탄소원 이용성 등을 조사하였다. 혐기성배양 조사는 Baltimore biological laboratory Gas-pack을 이용하여 조사하였다. 색소 생성능은 carotenoid 색소 생성으로 조사하였고, Brock 등[4]의 방법에 따라 90% acetone으로 추출하여 spectrophotometer(Perkin Elmer 550)로 측정하였다. 모든 생리학적 시험은 70°C에서 2~3일간 배양하여 조사하였다. Gas chromatography(HP 5890, Hewlett Packard Co., USA)를 이용한 KNOUC 202 세포 fatty acid methyl ester(FAMES)분석은 MIS operating manual의 방법으로 실시하였다[14]. ATCC 1598배지에 균주를 70°C에서 3일간 배양하여 3번째 분획에서 백금으로 약 50 mg 정도 취하여 Teflon-lines screw cap tube에 옮긴 후 50% methanol에 15% NaOH를 첨가한 용액 1 ml을 넣고 100°C에서 30분간 가열한 후, 차가운 물에 냉각시켰다. 여기에 methanolic-HCl를 2 ml 첨가하여 80°C에서 10분간 가열한 뒤, 급냉한 후 hexane/methyl-tert-butylether(1:1 v/v)를 1.25 ml 넣고, NaOH를 3 ml 첨가한 후 5분간 교반하였다. NaCl 포화수용액을 2~3방울 떨어뜨린 후 분리된 층의 상등액을 취하여 septum-capped sample vial로 옮겨 capping한 것을 gas chromatography 분석시료로 사용하였다. Gas chromatography의 컬럼온도는 180°C, injector 및 detector (FID)온도는 300°C, 운반가스로 사용한 H₂의 유속은 30 ml/min의 조건하에서 실시하였으며, 지방산조성은 Microbial Identification System Library를 이용하여 분석하였다.

DNA base 조성과 16S rRNA sequence 분석은 Rainey 등[20]의 방법에 따라 실시하였다. 16S rRNA 유전자 분석은 PHYDIT 프로그램을 사용하여 수행하였으며[10], sequence를 rRNA 일차구조를 참고하여 alignment한 후, % similarity값을 구하였다. Neighbor-joining method[21]에 의하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

일본의 Atagawa 온천지대에서 채취한 시료의 온도는 72~90°C이고 pH는 8.5이었다. 채취한 시료를 생리 식염수에 균질하여 ATCC 1598 medium broth에 70°C에서 48시간 진탕배양(250 rpm)하여 1차 증균시켰다. 1차 배양액을 X-gal(0.02%)과 lactose(1%)를 포함하는 ATCC medium 1598 고체배지에 도말 후 70°C에서 48시간 2차 배양하여 청색 colony를 형성하는 것을 선별하여 사용하였는 바, KNOUC 201, 202 두 균주를 얻을 수 있었다. 이들 두균

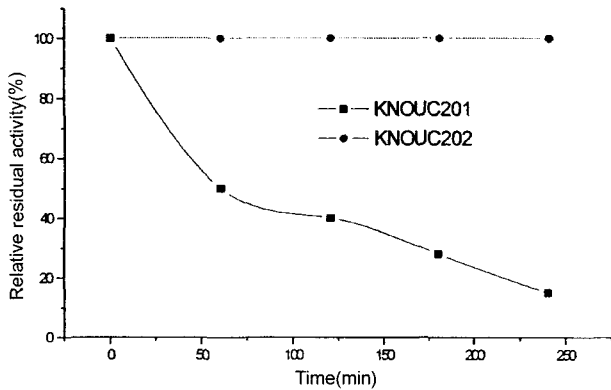


Fig. 1. Stability of crude β-glycosidase at 70°C.

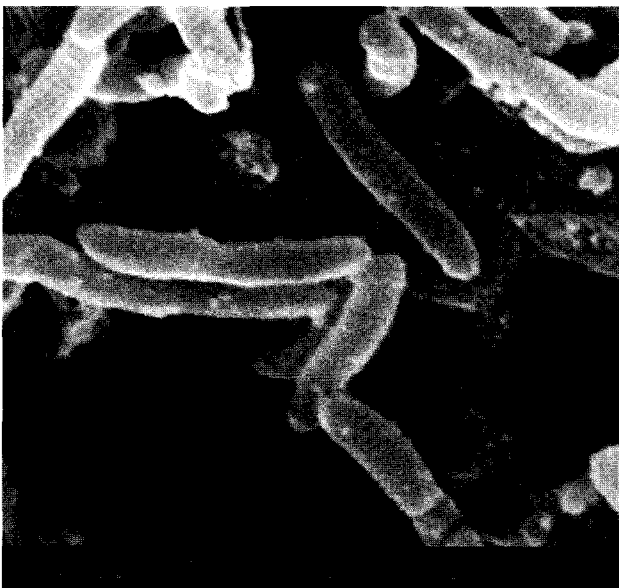


Fig. 2. Scanning electron microscopic photogram of strain KNOUC202(× 20,000).

주의 조효소액을 이용하여 β-glycosidase활성을 측정하였는데 KNOUC 201와 KNOUC 202는 각각 0.10 unit, 0.28 unit이었다. 70°C에서 KNOUC 201 조효소액의 β-glycosidase활성은 1시간 후 50%까지 감소하였으며, KNOUC 202는 70°C에서 4시간 동안 활성이 감소하지 않았다(Fig. 1). KNOUC 202의 조효소액인 β-glycosidase가 70°C에서 내열성이 우수하였으므로 이를 선발하여 분리동정을 실시하였다.

분리균주의 동정

분리균주 KNOUC 202의 고체배지상에서 colony의 형태는 불규칙한 원형에 가까우며, 색깔은 노란색이었으며, 표면은 볼록하고 매끄러운 상태였다. 초기 pH가 7.2인 액체 배지에서 생육이 좋았으며, 호기성이었고 균체의 침전현상이 없었다. 이 균은 Fig. 2의 전자현미경 사진에 제시된 바와같이 간균으로서 크기는 0.2 × 2.5 μm이며, 그람음성이고,

Table 1. Biochemical characteristics of the strain KNOUC 202.

Optimum temperature	70~72°C	Utilization of glucose	+
Optimum pH	7.0~7.2	Mannitol	+
Growth at/in		Inositol	+
80°C	+	Sorbitol	+
85°C	+	Sucrose	+
1% NaCl	+	Mellibiose	+
3% NaCl	+	Amygdalin	+
5% NaCl	-	Arabinose	+
Catalase		Galactose	+
Oxidase	+	Saccharose	+
Nitrate reduction	+	Trehalose	+
Voges-Proskauer reaction		Lactose	+
Indol production	+	Fructose	+
Hydrogen sulfide formation	+	Xylose	-
Citrate utilization		Mannose	+
Hydrolysis of		Ducitol	+
Starch	+	Adonitol	+
Casein	+	Raffinose	+
Urease	+	Glycerol	+
Gelatin liquefaction	+	Erythrol	+
ONPG	+	Malate	+
Degradation of		Propionate	+
p-nitrophenyl substrates;		Pyruvate	+
β-galactopyranoside	+	Formate	+
β-fucopyranoside	+	Glutamate	+
β-glucopyranoside	+	Arginine	+
Oxidation-fermentation	Oxidation	Ornithine	+
Growth on nutrient plate	-	Tryptophane	+

편모가 없고, 운동성이 없으며, 포자를 형성하지 않았다.

분리균주 KNOUC 202의 생리적 특성은 Table 1과 같다. 생육가능온도는 50~85°C이었으며, 최적온도는 70~72°C이었다. 생육가능 pH는 pH 5~8.5이며, 최적 pH는 7.0~7.2이었다. NaCl 농도 1~3%에서는 성장이 가능하나 5%에서는 성장하지 못했다. Catalase양성, oxidase양성이었고 starch, casein, ONPG, p-NPGal, p-NPFuc, p-NPglu 등을 분해하였다. 반면 nitrate 환원성, indole 생성, citrate 이용성 등은 음성이었다. 당이용성에 있어 KNOUC 202는 glucose, mannitol, inositol, sorbitol, sucrose, mellibiose, amygdalin, galactose, saccharose, trehalose, lactose, fructose, mannose, ducitol, adonitol, raffinose, glycerol, erythrol, malate, formate, glutamate, arginine, lysine, ornithine등을 이용하였으며 xylose는 이용하지 않는 것으로 나타났다. Brock [2] 와 Brock 등[4]에 의하면 대부분의 *Thermus* 균주들은 호기성으로 70°C에서 생육하며, yellow pigment를 생성하는 그람 음성, 간균으로 포자를 형성하지 않으며 catalase와 oxidase 양성이라고 보고하였으며, 1% NaCl 농도에서 생육이 가능하다고 하였다. Degryse 등[8]은 *Thermus* 균주중에서 *Thermus thermophilus*만이 3% NaCl

Table 2. Major cellular fatty acids of the strain KNOUC202.

Fatty acid	%
15:0 iso	31.67
15:0 anteiso	11.35
16:0 iso	6.96
16:0	9.41
17:0 iso	29.48
17:0 anteiso	5.78

```

GGTGAACGCTGGGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGGGGCCGCGGGTTTTACTCC 60
GTGGTCAGCGGGCGGACGGGTGAGTAAACGCGTGGGTGACCTACCCGGAAGAGGGGACAAC
CCGGGAAACTCGGGCTAATCCCCATGTGGACCCGCCCTTGGGGTGTGTCAAAGGGC
TTTGCCCGCTTCCGGATGGGCCCGCTCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCACC
AAGCGCAGCAGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCACTGAGACACGG
GCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTCCGCAATGGCCGCAAGCCGTGACGG
AGCGACGCCGCTTGGAGGAAGAACCCCTTCGGGGTGTAAACTCCTGAACCCGGGACGAAA
CCCCGAGGAGGGACTGACGGTACCGGGTAAATAGCGCCGCAACTCCGTGCCAGCAG
CCGCGTAATACGGAGGGCGGAGCGTTACCGGATTCAGTGGCGTAAAGGGCGTGTAG
GCGGCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGGGAGCGTGGGATACG 600
CTCAGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGAATTCGCGAGTAGCGGTGAAATGCGCAGA
TACCGGGAGGAACCGCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGTCCACCGTGACGCTGAGGCGC
GAAAGCGTGGGGAGCAACCGGATTAGATACCGGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGC
GCTAGGCTCTGGGTCTCTGGGGCCGAAGCTAACCGGTTAAGCGCGCCGCTGGGGAG
TACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCAT
GTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATGCTAGGGAACCGG
GGTGAAAGCCTGGGGTCCCGCGAGGGGAGCCCTAGCACAGGTGCTGCTAGGCCGTCGT
CAGCTCGTCCCGTGAAGTGTGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGCCGTTAGT
TGCCAGCGGTTTCGGCCGGGCACTCTAACGGGATGCCCGGAAAGCGGGAGGAAGGAGGG
GACGACGCTGCTGGTACGATGGCCCTTACGGCTGGGCGACACAGCTGCTACAATGCCAC 1200
TACAAAGCGATGCCACCCGCAACGGGGAGCTAATCGCAAAAAGGTGGGCCGAGTTCGGA
TTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCCCGCTCAGCCATGGGAGCGGGCT
CTACCCGAAGTCCCGGGAGCCTACGGGCAGGCGCCGAGGGTAGGCCCGTACTGGGGC
G 1441
    
```

Fig. 3. 16S rRNA sequence of strain KNOUC 202.

농도에서 성장한다고 하였고, Chung 등[6]도 *Thermus thermophilus* ATCC 27634(HB8)가 3% NaCl 농도에서 생육한다고 보고하였다. KNOUC 202는 Brock[2] 와 Brock 등[4], Degryse 등[8], Chung 등[6]의 결과에 일치하므로 *Thermus thermophilus*로 추측되었다. *Thermus thermophilus* ATCC 27634(HB8)는 galactose, lactose, inositol, mellibios를 이용하지 못하였으나, KNOUC 202는 이들 당을 이용하여 당이용성에서 차이가 있었다. KNOUC 202는 ONPG, p-NPgal, p-NPFuc, p-NPGlu를 분해하였으므로 β-glycosidase를 생산하며(Table 1), 조효소액에서의 활성이 70°C에서 4시간 동안 유지되었으므로(Fig. 1) 이 효소는 내열성이 있는 것으로 추정된다.

분리균주의 세포지방산과 16s rRNA 배열을 분석하였으며, 세포의 지방산 분석결과는 Table 2와 같다. 지방산의 주성분은 iso-15:0 (31.67%)와 iso-17:0 (29.48%)로 이들은 총 지방산의 61.15%를 차지하고 있으며, 그외 anteiso-15:0, 16:0, iso-16:0, anteiso-17:0 등이 존재하였다. 이는 Nobre 등[17]이 *Thermus* 균주들은 대부분 iso-15:0와 iso-17:0이 지방산의 주성분이라는 보고와 동일한 결과이다

KNOUC 202의 유전자는 1,441 bp이며, 염기서열은 Fig. 3과 같다. 16s rRNA sequence를 이용하여 유사군종과의 % similarity를 조사한 결과 본 균주는 *Thermus* 속에 속하는 세균으로 판명되었으며, *Thermus thermophilus* ATCC 27634(HB8) 표준균주와 99.9%의 유사도를 나타내었다(Table 3). 16S rRNA 구조에 근거하여 Neighbor-joining method[21]에 의하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었는바, tree의 scale bar는 0.01 substitution per site를 의미한다. 이상과 같이 형태학적 생리 및 생화학적 특성을 조사한 결과 KNOUC 202균주는

Table 3. Levels of 16S rRNA similarity for strains KNOUC 202, the type strains of *Thermus* species and the representatives of some related taxa.

Strain	% similarityt in:											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 Strain KNOUC 202												
2 <i>Thermus thermophilus</i> ATCC27634(HB8) ^T	99.9											
3 <i>Thermus antranikianii</i> DSM12462 ^T	95.1	95.1										
4 <i>Thermus aquaticus</i> ATCC25104 ^T	96.4	96.4	96.5									
5 <i>Thermus brockianus</i> NCIMB12676 ^T	95.0	95.0	95.1	95.6								
6 <i>Thermus filiformis</i> ATCC43280 ^T	94.4	94.4	94.6	93.6	94.6							
7 <i>Thermus igniterrae</i> DSM12459 ^T	95.0	95.0	95.1	95.5	97.1	97.3						
8 <i>Thermus oshimai</i> NCIMB13400 ^T	93.4	93.4	93.6	92.3	92.5	92.2	91.8					
9 <i>Thermus scotductus</i> DSM8553 ^T	94.7	94.7	94.8	97.8	96.1	95.9	94.0	96.2				
10 <i>Meiothermus ruber</i> DSM1279 ^T	87.2	87.2	87.6	87.4	87.2	87.0	86.8	87.7	85.2			
11 <i>Meiothermus silvanus</i> DSM9946 ^T	86.1	86.1	86.3	86.7	86.7	87.3	85.9	86.8	86.0	85.9		
12 <i>Meiothermus chliarophilus</i> DSM9957 ^T	86.7	86.7	87.1	86.5	86.3	86.2	86.2	86.7	85.6	86.3	90.7	
13 <i>Deinococcus radiodurans</i> DSM20539 ^T	80.4	80.4	80.8	80.6	80.6	81.3	81.3	80.7	80.8	80.5	81.3	82.3

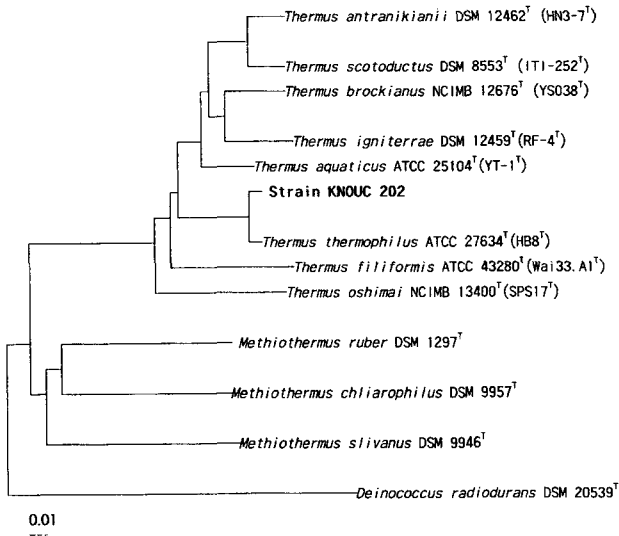


Fig. 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences showing the positions of strain KNOUC 202, the type strains of *Thermus* species and the representatives of some other related taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

*Thermus thermophilus*의 유연군으로 분류되었으며, 최종적으로 *Thermus thermophilus* KNOUC 202로 동정하였다.

요 약

내열성 β-glycosidase 효소를 생성하는 균주를 분리하기 위해서 일본의 Atagawa 온천지역에서 시료를 채취하였다. 조효소액이 70°C에서 4시간 동안 β-glycosidase활성을 유지하는 KNOUC 202를 선발하여 분리, 동정하였다. 선발된 KNOUC 202는 호기성으로 그람음성 간균이며, 포자를 형성하지 않으며, 운동성이 없으며, carotenoid를 생성하고, catalase, oxidase 양성으로 나타났으며, 최적 성장온도는 70~72°C이고, 최적 pH는 7.0~7.2이었으며, NaCl 3% 농도에서 성장하였다. 세포내 지방산의 주성분은 iso-15:0과 iso-17:0이었다. KNOUC 202의 16S rRNA sequence는 *Thermus thermophilus* ATCC 27635(HB8)와 유사도가 99.9% 이었다. 따라서 형태학적, 이화학적, 생화학적 특성, 지방산조성 및 16S rRNA sequence 분석결과에 근거하여 KNOUC 202를 *Thermus thermophilus*로 동정하였다.

감사의 말

본 연구는 농림기술센터 (1998-2002년) 농림기술연구과제 연구비에 의해 수행된 연구로 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Alfredsson, G. A., S. Baldursson, and J. K. Krjstjansson. 1985. Nutritional diversity among *Thermus* spp. isolated from Icelandic hot spring. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 308-311.
2. Brock, T. D. 1984. Genus *Thermus* Brock and Freeze. In N. R. Kriegand J.G. Holt (ed.)Bergey's manual of systematics bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins. Baltimore. pp 233-237.
3. Brock, T. D. and H. Freeze. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **98**: 289-297.
4. Brock, T. D. and M. L. Brock. 1967. The measurement chlorophyll, primary productivity, photophosphorylation, and macromolecules in benthicalgal mats. *Limnology and Oceanography.* **12**: 600-605.
5. Bl chl, E., R. Rachel, S. Burffraf, D. Hafenbra, H .W. Jannasch, and K. O. Stetter. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles.* **1**: 14-21.
6. 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.
7. Cote, G. and B. Y. Tao. 1990. Oligosaccharide synthesis by enzymatic transglycosidation. *Glycoconjugate J.* **7**: 145-149.
8. Degryse, E., N. Glansdorff, and A. Pierard. 1978. A comparative analysis of extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus*. *Arch. Microbiol.* **117**: 189-196.
9. Dion, M., L. Fourage, J. N. Hallet, and B. Colas. 1999. Cloning and expression of β-glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of encoded enzyme. *Glycoconjugate J.* **16**: 27-37.
10. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP(phylogenetic inference package) version 3.5.1. Department of Genetics, University of Washington, seattle, WA, USA.
11. Hudson, J. A., H. W. Morgan, and R. M. Daniel, 1987. *Thermus filiformis* sp. nov., a filamentous caldoactive bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 431-436.
12. Hust, P. L., J. Nielsen, P. A. Sullivan, and M. G. Shepherd. 1977. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* **165**: 33-39.
13. Kristjansson, J. K., S. Hj rleifsdottir, V. T. Marteinson, and G. A. Alfredsson. 1994. *Thermus scotoductus* sp. nov., a pigment-producing themophilic bacterium from hot tap water in iceland and including *Thermus* sp. X-1. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**: 44-50.
14. Kuykendall, L. D., M. A. Roy, J. J. O'Neil, and T. E. Devine. 1988. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 358-361.
15. Manaia, C. M. and M. S. da Costa. 1991. Characterization of halotolerant *Thermus* isolates from shallow marine hot springs on S. Miguel, Azores. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2643-2648.
16. Nilson, K. G. I. 1991. Enzymatic synthesis of complex carbohydrates and their glycosides. In Applied Biocatalysis(H.W. Blanch and D.S. Clark, eds). Vol. 1. pp 117-177. Dekker, New York.

17. Nobre, M. E., L. Carreto, R. Wait, S. Tenreiro, O. Fernandes, R. J. Sharp, and M. S. da Costa. 1996. Fatty acid composition of the species of the genera *Thermus* and *Metiothermus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 303-311.
18. Ogasahara, K., A. Imanishi, and T. Isemura. 1970. Studies on thermophilic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biochem.* **67**: 77-87.
19. Ohtsu, N., H. Motoshima, K. Goto., F. Tsukasaki, and H. Matsuzawa. 1998. Thermostable β -galactosidase from an extreme thermophilic, *Thermus* sp. A4: Enzyme purification and characterization, and gene cloning and sequenceing. *Bio-sci. Biotechnol. Biochem.* **6298**: 1539-1545.
20. Rainey, F. A., N. Ward-Rainey, R. M. Kroppenstedt, and E. Stackebrandt. 1996. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardiopsaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 1088-1092.
21. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425
22. 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.
23. Wendroff, W. L. and C. H. Amundson, 1971. Characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.* **34**: 300-310.
24. Williams, R. A. D., K. E. Smith, S. G. Welch, J. Micallefand, and R. J. Sharp 1995. DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus*(Oshiam and Imahori). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 495-499.

(Recieved Dec. 28, 2001/Accepted Mar. 15, 2002)