



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2007-0047092
C12N 15/54 (2006.01) (43) 공개일자 2007년05월04일

(21) 출원번호 10-2005-0103852
(22) 출원일자 2005년11월01일
심사청구일자 2005년11월01일

(71) 출원인 한국해양연구원
경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자 이정현
경기 성남시 분당구 정자동 한솔청구아파트 116-101
강성균
경기 안양시 동안구 평촌동 75-1 대우아파트 112-506
김상진
경기 안산시 상록구 사2동 월드아파트 707-904
현정호
경기 성남시 분당구 수내2동 파크타운 대림아파트 105-2001
권개경
경기 안산시 상록구 일동 579-3 2층
김윤재
경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호
이현숙
경기 안양시 동안구 평촌동 75-1 대우아파트 112-506
배승섭
경기 안산시 상록구 사동 1519-12 402호
임재규
경기 시흥시 정왕동 1575-9- 203호
전정호
경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호
양성현
경기 안산시 단원구 초지동 그린빌 주공아파트 1509-904

(74) 대리인 윤여강
양부현
이문섭

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 고히열성 신규주 K C T C 10859 B P 및 이로부터 생산되는 고히열성 아밀라아제

(57) 요약

본 발명은 고호열성 신균주 KCTC 10859BP 및 이로부터 생산되는 고호열성 아밀라아제에 관한 것으로서, *Thermococcus* sp. NA1으로부터 분리되어진 고호열성 아밀라아제, 이를 암호화 하는 유전자 및 이들을 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도

도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

신균주 *Thermococcus* sp. NA1 (KCTC 10859BP).

청구항 2.

Thermococcus sp. 균주(KCTC 10859BP)로부터 분리되어진 고호열성 α -아밀라아제 효소 및 이의 기능적 동등물.

청구항 3.

서열번호의 3의 아미노산 서열을 가진 단백질.

청구항 4.

서열번호 1 또는 2의 유전자.

청구항 5.

서열번호 3의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자.

청구항 6.

제 2 항에 따른 상기 고호열성 α -아밀라아제 효소를 암호화하는 핵산서열.

청구항 7.

제 6 항에 있어서, 서열번호 1 또는 2의 상기 고호열성 α -아밀라아제 효소를 암호화하는 DNA 핵산서열.

청구항 8.

제 6 항에 있어서, 상기 고호열성 α -아밀라아제 효소를 암호화하는 DNA 핵산서열이 서열번호 1 또는 2와 코돈 축퇴성에 의한 등가인 것을 특징으로 하는 핵산서열.

청구항 9.

제 2 항에 따른 고히열성 α-아밀라아제 효소가 서열번호 3을 가지는 것을 특징으로 하는 α-아밀라아제 효소.

청구항 10.

제 1 항에 따른 고히열성 α-아밀라아제 효소가 서열번호 3와 기능적으로 동등한 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 α-아밀라아제 효소.

청구항 11.

제 6 항 내지 제 8 항의 어느 한 항에 따른, 핵산서열을 포함하는 재조합백터.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 상기 재조합백터가 도 8에 기재된 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

청구항 13.

제 11 항에 따른 재조합 백터로 형질전환된 세포.

청구항 14.

균주 *Thermococcus* sp. NA1 (KCTC 10859BP) 또는 제 13 항에 따른 형질전환된 세포를 배양하고, 상기 배양된 세포로부터 α-아밀라아제 효소를 분리하는 것을 특징으로 하는 고히열성 α-아밀라아제 효소 생산방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

전분을 분해하는 효소는 여러 종류의 미생물에 분포하고 있고, 섬유, 식품, 발효, 제지, 주조 및 증류 산업, 당분의 당화뿐만 아니라 임상, 약학 및 분석화학과 같은 넓은 분야의 산업적 적용에 이용되고 있다(Pandey et al., 2000; Vihinen et al., 1989). 온도, 고농도 전분의 이용, 기질 특이성 및 pH 면에서 공정이 경제적이게 하는 특이한 적용에 있어서 적절한 효소의 높은 요구가 있다. 80~90°C에서 되어지는 전분의 당화 및 액화공정에 있어서, 효소가 고온에서 안정적인 필요성이 있다. 때문에, 호열성 및 열안정성의 효소가 필요하였다. 열안정성뿐만 아니라 고히열성 효소는 변성제, 용매, 단백질 분해 효소에 대한 저항성 때문에 유리해질 수 있다. α-아밀라아제를 포함하는 열안정성 아밀로오스 분해 효소는 중온성의 *Bacillus* sp., 호열성의 고세균 및 진정세균에서 보고되었다(Brown and Kelly 1993; Chung et al., 1995; Dong et al., 1997; Frillingos et al. 2000; Morgan and Priest, 1981; Tachibana et al., 1996). 그들 대부분은 아미노산 상동성에 기초하여, 글리코실 하이드롤라아제 집단 13 (Henrissat, 1991)에 속한다. 이 집단은 비록 전체의 서열 유사성은 낮지만, 4개의 보전되어진 촉매부위 및 공통의 (α/β)₈-배럴 구조를 가지고 있다(van der Maarel et al., 2002). 유용한 효소의 탐색외에도, 상업화에 대한 중요한 기준에 맞추기 위하여 유용한 효소의 조작이 효소의 안정성을 향상시킬 수 있다.

일반적인 유전자 조작 및 계놈의 연구 방법의 조합으로, 고호열성 미생물의 유전자 서열이 열안정적 효소 때문에 생물공학 적 관심을 받고 있고, 많은 매우 열안정적인 효소가 생물공학적으로 개발되고 있다. 최근에, 본 발명자들은 고호열성 고세균 *Thermococcus* sp. NA1을 분리하였고, 많은 유용한 극히 열적으로 안정한 효소를 찾기 위하여 전체 계놈 서열을 결정하였다. 계놈 정보의 분석은 상기 균주가 α -아밀라아제, α -글루코시다아제, 플루란아제(pullanase) 및 시클로렉스트리나아제와 같은 전분-분해활성 효소를 가지고 있음을 보였다. 본 발명자들은 α -아밀라아제 유전자를 클로닝하고, 이를 재조합백터를 이용하여 *E. coli*에서 발현시키고, 정제하여, 효소적 활성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 신규의 고호열성 *Thermococcus* sp. NA1 (KCTC 10859BP)를 제공한다.

본 발명은 신규의 고호열성인 α -아밀라아제를 제공하는 것이다.

본 발명은 신규의 고호열성인 α -아밀라아제를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명은 고호열성 효소를 생산하는 신규주 *Thermococcus* sp. NA1 (KCTC 10859BP)를 제공한다.

본 발명은 α -아밀라아제 및 이들을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 제조방법은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 유전공학적 방법에 의한 제조방법이다.

본 발명은 α -아밀라아제를 암호화하는 분리된 DNA 서열 및 이들을 함유하는 재조합 백터를 제공한다.

제 1 양태로 본 발명은 고호열성 효소를 생산하는 신규주 *Thermococcus* sp. NA1 (KCTC 10859BP)를 제공한다. *Thermococcus* sp. NA1은 이스트 마누스 바신(East Manus Basin)에 있는 파크마누스 지역(3° 14' S, 151° 42' E)에 있는 지역의 심해 열수 분출구로부터 분리되었다. YPS 배지가 DNA 조작을 위해서 *Thermococcus* sp. NA1을 배양하기 위하여 사용되었고, *Thermococcus* sp. NA1의 배양 및 균주 유지는 표준적인 방법에 의하여 행하여졌다. *Thermococcus* sp. NA1 시드(seed) 배양을 준비하기 위하여, 25ml 혈청 병에 있는 YPS 배지에 파타겔 플레이트(phytagel plate) 위에 형성된 단일 콜로니를 접종하였고, 20시간 동안 90°C에서 배양하였다. 시드 배양은 혐기적 단지(jar)에서 YPS 배지 700ml을 접종하는데 사용되었고, 20시간동안 90°C에서 배양되었다. 상기 고호열성 *Thermococcus* sp. NA1는 대한민국 생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2005년 10월 7일 기탁하여, 2005년 10월 20일에 KCTC 10859BP의 기탁번호를 부여받았다. 상기 균주로부터 고호열성 효소인 DNA 중합효소(대한민국 특허출원 10-2005-0094644호), DNA 리가아제(대한민국 특허출원 10-2005-094693호), 카르복시펩티다아제(대한민국 특허출원 10-2005-0103489호), 프로일 올리고펩티다아제(대한민국 특허출원 10-2005-0103487호), 아미노펩티다아제 P(대한민국특허출원 10-2005-0103488호) 및 메티오닐아미노펩티다아제(대한민국특허출원 10-2005-0103493호)가 각각 특허출원되었다.

제 2 양태로, 본 발명은 고온에서 안정한 α -아밀라아제를 암호화하는 핵산서열 및 상기 서열에 등가의 핵산서열을 제공한다. 상기 핵산서열들은 보다 구체적으로는 서열번호 1 또는 서열번호 2이다.

"등가의 핵산서열"에는 상기 α -아밀라아제 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다.

"코돈 축퇴성 서열"이란 상기 자연 발생의 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 자연 발생의 α -아밀라아제 효소와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 의미한다.

제 3 양태로, 본 발명은 α -아밀라아제를 제공한다. 보다 상세하게는 서열번호 3 으로 표시되는 α -아밀라아제 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 3의 α -아밀라아제 효소 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 α -아밀라아제의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

본 발명은, 제 4 양태로는 상기 α -아밀라아제를 암호화하는 분리된 DNA 분절을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

본 발명에서 사용되는 벡터라는 용어는 또다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 발현벡터란 용어는 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 합성시킬 수 있는 플라스미드, 코스미드 또는 파아지를 포함한다. 바람직한 벡터는 그것이 결합된 핵산을 자기 복제 및 발현시킬 수 있는 벡터이다.

본 발명의 제 5 양태로는, 상기 α -아밀라아제를 암호화하는 분리된 DNA 분절을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

본 발명에서 사용되는 '형질전환'이란 용어는 외래 DNA 또는 RNA가 세포에 흡수되어 세포의 유전형이 변화되는 것을 말한다.

적합한 형질전환세포로는 원핵생물, 곰팡이, 식물, 동물세포 등이 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 대장균을 이용한다.

본 발명의 제 6 양태로는 상기 형질전환 세포, 또는 상기 *Thermococcus* sp.를 이용하여 α -아밀라아제를 생산하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] TNA1_amyl 유전자의 일차적 구조 및 재조합 효소의 발현

(1) 균주 및 성장 조건

Thermococcus sp. NA1은 이스트 마누스 바신(East Manus Basin)에 있는 파크마누스 지역(3° 14' S, 151° 42' E)에 있는 지역의 심해 열수 분출구로부터 분리되었다. YPS 배지가 DNA 조작을 위해서 *Thermococcus* sp. NA1을 배양하기 위하여 사용되었고, *Thermococcus* sp. NA1의 배양 및 균주 유지는 표준적인 방법에 의하여 행하여졌다. *Thermococcus* sp. NA1 시드(seed) 배양을 준비하기 위하여, 25ml 혈청 병에 있는 YPS 배지에 파타겔 플레이트(phytagel plate) 위에 형성된 단일 콜로니를 접종하였고, 20시간 동안 90°C에서 배양하였다. 시드 배양은 혐기적 단지(jar)에서 YPS 배지 700ml을 접종하는데 사용되었고, 20시간동안 90°C에서 배양되었다.

E. coli DH5a가 플라스미드 증식 및 핵산 서열분석을 위해 사용되었다. *E. coli* BL21-Codonplus(DE3)-RIL 세포(스트라타진, 라졸라, 캘리포니아) 및 플라스미드 pET-24a(+)(노바젠, 메이디슨, 위스콘신)이 유전자 발현을 위해 사용되었다. *E. coli* 균주는 37°C에서 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 배지 안에서 배양되었고, 카나마이신이 최종농도 50 μ g/ml이 되도록 배지에 첨가되었다.

(2) DNA 조작 및 서열분석

DNA 조작은 썸브록 및 러셀에 의해 기술된 것처럼 표준적인 방법으로 행하여졌다. *Thermococcus* sp.의 게놈 DNA는 표준적인 방법으로 분리되었다. 제한효소 및 다른 변형시키는 효소는 프로메가(메이디슨, 위스콘신)으로부터 구매하였다. *E. coli* 세포로부터 플라스미드 DNA의 적은 양의 제조는 플라스미드 미니 키트(퀴아젠, 힐덴, 독일)을 이용하여 행하여졌다. DNA 서열분석은 빅다이 터미네이터 키트(PE Applied Biosystems, 포스터 시, 캘리포니아)를 이용하여 자동 서열분석기(AB3100)로 행하여졌다.

(3) α -아밀라아제 암호화 유전자의 클로닝 및 발현

*Nde*I 및 *Xho*I에 의해 플랭크(flank)된 *Thermococcus* sp. NA1(TNA1_amyl)의 α -아밀라아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5'-CG ACC CGG CAT ATG GCC AGA AAA GCA GCC GTT GCA GTT TTG -3'; 서열번호 5] 및 안티센스 [5'-CT CCA CAT CTC GAG GCC AAC ACC ACA GTA GCT CCA GAC-3'; 서열번호 6]; 상기 센스 프라이머 안에 밀줄친 서열이 *Nde*I 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 밀줄친 서열이 *Xho*I이다)을 이용하여 증폭되었고, 성숙한 형태의 α -아밀라아제는 α -아밀라아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5'-CG ACC CGG CAT ATG GCG GAA ACA CTG GAA AAC GGC GGA GTC -3'; 서열번호 7] 및 안티센스 [5'-CT

CCA CAT CTC GAG GCC AAC ACC ACA GTA GCT CCA GAC'; 서열번호 8]; 상기 센스 프라이머 안에 밀줄친 서열이 NdeI 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 밀줄친 서열이 XhoI이다)를 이용하여 증폭되었다. 증폭되어진 서열은 NdeI 및 XhoI로 다이제스트되었고, NdeI/XhoI 다이제스트된 pET-24a(+)에 연결되었다. 연결물(ligate)는 *E. coli* DH5a에 형질 전환되었고, 결과적으로 나온 플라스미드는 pET-amyIf(전장길이) 및 pET-amyIm(성숙된 형태)이고, 서열분석 및 발현을 위해 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 및 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS로 각각 형질전환되었다. 유전자의 과량발현은 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 중간 기하급수적 성장기에 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 항온 배양함으로써 유도되었다. 세포는 원심분리(4°C에서 20분간 6,000 x g)를 통하여 얻어졌고, 0.1M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 재현탁시켰다. 세포는 초음파에 의해서 분쇄되어지고, 원심분리(4°C에서 30분간 20,000 x g)에 의해서 분리되었다. 얻어진 상등액은 TALONTM 금속 친화성 레진(BD Bioscience Clontech, 파우로 알토, 캘리포니아)의 컬럼에 처리되고, 0.1 M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)안의 10mM 이미다졸(시그마, 세이트 루이스, 미주리)로 세척되었고, α-아밀라아제는 완충용액내의 300mM으로 용출되었다. 모아진 분획은, 다음으로, Centricon YM-10(밀리포어, 베드포드, 메사추세츠)을 이용하여 10% 글리세롤이 포함되어 있는 50mM 트리스-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 완충용액교환이 되어졌다.

단백질 농도는 브래드포드(Bradford, 1976)의 방법으로 측정되었다. 단백질의 정제도는 표준 방법으로 수행되어진 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해서 조사되었다(Laemmli, 1970).

(4) TNA1-amyI 암호화 유전자의 일차 구조 및 재조합 효소의 발현

Thermococcus sp. NA1의 게놈 염기서열 분석에서, 본 발명의 발명자들은 458 아미노산(서열번호 4)으로 구성되며 예측 분자량이 51,948 Da인 단백질을 암호화하는 1,377 bp로 구성된 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 발견하였다.

염기서열 비교분석은 *T. hydrothermalis* (85% 동일성; Leveque et al., 2000a) 및 *T. kodakarensis* KOD1 (82% 상동성; Tachibana et al., 1996), 및 *P. furiosus* 또는 *P. woesei* (82% 상동성; Dong et al., 1997)로부터의 아밀라아제와 높은 유사성을 보였다.

α-아밀라아제를 암호화하는 지역의 유추되어진 아미노산 서열은 25 아미노산의 추정적인 시그널 펩타이드 및 433 아미노산(예상된 분자량이 50,531 Da)의 성숙된 효소를 포함하였다(도 1). 서열분석은 글리코실 하이드롤라아제 집단 13 (Nakajima et al., 1986)의 4개의 활성 사이트 합치 지역이 TNA1_amyI안에 보였다. 아미노산 조성에 관한 데이터는 Asp 및 Gln의 양이 TNA_amyI(47개의 *Bacillus licheniformis* α-아밀라아제에 비하여 31개)에서 낮았고, 이것이 고온에서 단백질의 안정성에 기여할 것이다. TNA_amyI은 낮은 Lys 및 Arg 잔기(35개의 *P. furiosus* α-아밀라아제와 비슷한 32개)를 가지고 있고, 이것이 상기 효소의 등전점(4.61의 등전점)에 대한 설명이 될 것이다. 린덴(Linden et al., 2003)이 *P. woesei*에서 활성부위의 틈 근처에 가까운 Ca²⁺ 결합 중심이라 주장한 아미노산 잔기에 상응하는 잔기가 보전되어 있었다.

TNA1_amyI 유전자의 전장 길이가 PCR에 의하여 pET-23a(+) 벡터에 클론되었고(pET-amyIf) 대장균 BL21-Codonplus(DE3)-RIL에 형질전환되어서 발현되었다. 전분 배지 플레이트에서 배양되어지면, 빈 벡터로 형질전환되어진 대장균은 60°C에서 항온배양 후에 이 기질을 분해할 수 없었으나, pET-amyIf로 형질전환되어진 대장균은 TNA1_amyI 유전자의 효과적인 전분 분해를 나타내는 뚜렷한 할로를 형성하였다(도 2A). α-아밀라아제의 활성은 pET-amyIf를 가지고 있는 재조합 대장균의 세포의 분획에서 관찰되었다. 발명자들은 시그널 펩타이드가 없는 플라스미드 pET-amyIm를 제조하였다. α-아밀라아제의 성숙된 형태가 유도되어진 대장균(pET-amyIm)의 가용성 분획에서 분리되었고, 분리되어진 단백질은 반복적인 얼림과 녹임 후에도 가용성으로 남아 있었다. SDS-PAGE에서, 분리되어진 효소의 밴드는 His₆-태그를 포함하는 성숙된 형태의 아미노산 서열로부터 추정되어진 51 kDa보다 작은 사이즈에서 관찰되었다(도 2B)

[실시예 2] α-아밀라아제 효소의 생화학적 성질

(1) α-아밀라아제 효소 활성 측정방법

Thermococcus sp. NA1 α -아밀라아제(TNA1_amyl)의 활성도는 80°C에서 15분간 50mM의 소듐 아세테이트 완충용액(pH 6.0)dptj 1%의 가용성 전분의 효소적 분해 동안에 유리되어지는 환원당의 양을 측정하여 결정되었다. 환원당의 양은 수정된 디니트로살리실릭산(dinitrosalicylic acid) 방법(Bernfeld, 1955)으로 측정되었다. α -아밀라아제 활성의 1 단위는 상기 분석 조건에서 분당 말토오스와 등가의 1 μ mole의 환원당의 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

(2) 박층 크로마토그래피(TLC) 및 아가 플레이트에서의 α -아밀라아제의 활성의 탐색

열안정성 α -아밀라아제를 발현하는 재조합 *E. coli* 클론이 50 μ g ml⁻¹ 카나마이신, 1% 가용성 전분 및 1mM IPTG가 보충되어진 LB 아가 플레이트 위에서 성장 후 및 12 내지 18시간 동안 60°C에서 연속적으로 항온 배양하여 동정되었다. 포지티브 콜로니는 루골(Lugol) 용액(I₂ 5 g l⁻¹; KI 10 g l⁻¹)으로 뿌린 후에 어두운 바탕에 대한 흰 할로(halo)로서 보이는 전분 분해 지역을 만들었다.

G1 내지 G7의 올리고사카라이드의 분석은 실리카 겔 코팅된 TLC 플레이트(유형 K6F; 와트만, UK; Dong et al., 1997) 위에서 상승 기술로서 수정된 박층 크로마토그래피(TLC)에 의해 수행되었다. 용매 혼합액(이소프로필 알코올:에틸 아세테이트: 물 = 3:1:1, v/v/v)으로 전개한 후에, TLC 플레이트는 완전히 건조되고, 염색 용액(N-(1-나프틸)-에틸렌디아민 3g, 설펜산 50ml, 메탄올로 1 L로 맞춤) 안으로 재빠르게 담가주어 발색시켰다. 상기 TLC 플레이트는 10분 동안 110°C에서 항온보관되었다.

(3) TNA1_amyl의 생화학적 특성 분석

분리되어진 TNA1_amyl의 비활성은 7238 U mg⁻¹ 이었다. 상기 효소는 80°C에서 최적 활성을 보였으며, 40 내지 50°C에서 최대 활성의 20% 보다 작았다(도 3). 상기 효소에 대한 최적 pH는 5.5 내지 6.0(도 3B)이었다. TNA1_amyl의 열안정성은 80 및 90°C에서 50mM 소듐 아세테이트 완충용액(pH 6)안에서 효소를 항온 반응함으로써 측정되었다. TNA1_amyl은 열안정적이었고, 각각 80°C에서 30 분 및 90°C에서 10분의 반감기(t_{1/2})를 가지고 있었다(도 4참조). TNA1_amyl의 열안정성은 0.5mM의 Ca²⁺의 존재 하에서 80°C에서 7,581분 및 90°C에서 153분으로 각각 상당히 의미 있게 증가하여(도 4 참조), Ca²⁺ 결합이 열안정성을 증가시키는데 필요하다는 것을 의미한다. 향상된 열안정성에 대하여 Ca²⁺ 이온의 요구와는 대조되게, 0.5mM의 Ca²⁺의 첨가가 효소활성을 증가시키지는 않았다(도 5). 그러나 TNA1_amyl은 1mM의 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 처리로 처리되었을 때, 활성이 4% 까지 감소하였고, EDTA에 의해 감소되어진 활성은 Ca²⁺의 추가로 회복되었기 때문에, 효소의 활성에 Ca²⁺의 존재에 의존적 이었다. 다른 2가 이온은 TNA1_amyl 활성에 대하여 Ca²⁺를 대체하지 못하였다. Zn²⁺와 Cu²⁺는 TNA_amyl 활성을 상당히 억제하였다.

가용성 전분을 이용하여 동력학적 분석이 행하여졌고, K_m(4.57 mg ml⁻¹) 및 V_{max}(10,000 μ mole min⁻¹ mg⁻¹) 값이 라인 위버-버크 플롯을 이용하여 측정되었다(도 6).

TNA1_amyl은 말토스(G2)에서 말토헥타오스(G7)까지의 가용성 전분을 주된 산물로 만들며 아밀로오스, 올리고말토사카라이드, 아밀로펙틴 및 가용성 전분 같은 여러 기질을 가수분해하였다. 플루란(pullulan) 및 시클로덱스트린(cyclodextrin)을 분해하는 활성은 관찰되어지 않다. 결론적으로, TNA1_amyl은 *P. furiosus* 같은 액화하는 효소로 분류되어질 수 있다(도 7).

(4) 특성비교분석

TNA1_amyl의 생화학적 성질은 다른 *T. profundus* 및 *T. hydrothermalis*로부터의 *Thermococal* α -아밀라아제와 pH 최적값, 온도 및 기질 프로파일에서 비교 되었고, 표 1에서 나타내어진 증가된 가수분해 활성은 약간 증가되어진 것으로 보인다(Chung et al., 1995; Lee et al., 1996; Leveque et al., 2000b; Tachibana et al., 1996)

[표 1] TNA1_amyl 및 *Thermococcales*로부터의 α -아밀라아제의 일반적인 생화학적인 성질의 비교

	TNA1 ^a	TK	TH	TP	PF
^c K _m (%)	0.46	0.7	ND ^b	0.23	0.36-0.68
V _{max} (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	10,000	5672	ND	1807	
Optimum Temp (°C)	80	90	75-85	80	100
Optimum pH	5.5-6	6.5	5-5.5	5.5	6.5-7.5
Ion requirement	Ca ²⁺	none	Ca ²⁺	Ca ²⁺ , Cs ²⁺	none
				Mg ²⁺	

^aTNA1_amyI, this study; TK, α-amylase from *Thermococcus kodakarensis* (Tachibana et al., 1996); TH, α-amylase from *T. hydrothermalis* (Leveque et al., 2000a); TP, α-amylase from *T. profundus* (Lee et al., 1996); PF, α-amylase from *Pyrococcus furiosus* (Dong et al., 1997).

^bND, not determined.

^cK_m and V_{max} toward soluble starch.

Ca²⁺가 α-아밀라아제의 아밀로 분해 활성 및 열안정성을 증가시키는 것으로 보고되었다. 그러나, 이들 효소 대부분은 Ca²⁺의 부존재에서도 활성형이었다. *P. furiosus* α-아밀라아제에서는 Ca²⁺ 이온이 효소에 매우 단단히 붙어 있어, EDTA가 이것을 제거하지 못하고, 1mM EDTA에서도 95%의 α-아밀라아제를 유지하였고(11.5ng) 심지어 5mM EDTA에서도 86%의 활성도가 유지되었다(Linden et al., 2003). 그러나 *P. furiosus*에서 칼슘 결합 잔기의 존재에 대한 최근의 보고 및 금속이 없는 완충용액에 대해 많은 투석 후에 고온에서 EDTA의 처리 데이터는 *P. furiosus* α-아밀라아제의 아밀로분해 활성에 칼슘 결합이 필수적인 것이라는 것을 제시한다(Savchenko et al. 2002). *P. furiosus*의 아밀라아제와 비교하여, EDTA으로의 TNA1_amyI의 억제 는 꽤 의미가 있었고, Ca²⁺의 존재에 의해서 가역적이었다. 결론적으로, 칼슘 결합은 TNA1_amyI의 열안정성에 있어서 주요한 인자인 것으로 보인다. 시스테인의 양이 열안정성에 아마 영향을 준다고 보고되었고(Tomazic and Kilbanov, 1988) 사브첸코(Savchenko et al., 2002)는 *P. furiosus*의 α-아밀라아제의 5개의 시스테인(Cys 152, Cys 153, Cys165, Cys387, alc Cys430)중에서 Cys165가 열안정성에 주요한 역할을 한다고 주장하였다.

*Thermococcus*로부터 기원된 세포의 α-아밀라아제의 최적온도는 80°C이었다.

발명의 효과

본 발명에 따른 신규주 *Thermococcus* sp.NA1 (KCTC 10859BP)는 신규의 고평열성 DNA 중합효소, DNA 리가아제, 카복시펩티다아제, 프로틸올리고펩티다아제, 아미노펩티다아제 P, 메티오닐아미노펩티다아제 및 아밀라아제의 유전자를 가지고 있어 이로부터 PCR를 통하여 이들의 유전자를 증폭할 수 있으면, 발현벡터에 이들 유전자를 삽입하여 활성형의 효소들을 발현시킬 수 있다.

본 발명에 따른 α-아밀라아제 효소는 고평열성인 신규한 단백질 분해효소들이다. 세포의 α-아밀라아제의 최적온도가 80°C이고, 0.5mM의 Ca²⁺의 존재하에서 80°C에서 7,581분 및 90°C에서 153분의 반감기로 상당히 열안정적이다. 따라서, 섬유, 식품, 발효, 제지, 주조 및 증류 산업, 당분의 당화뿐만 아니라 임상, 약학 및 분석화학과 같은 넓은 분야의 산업적 적용에 이용될 수 있다.

참고문헌

Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β. Meth. Enzymology 1, 149-158.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brown, S. H., Kelly, R. M., 1993. 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, 2614-2621.

Chung, Y. C., Kobayashi, T., Kanai, H., Akiba, T., Kudo, T., 1995. Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1502-1506.

- Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A., Zeikus, J. G., 1997. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3569-3576.
- Frillingos, S., Linden, A., Niehaus, F., Vargas, C., Nieto, J. J., Ventosa, A., Antranikian, G., Drainas, C., 2000. Cloning and expression of alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 495-503.
- Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 1991 280 (Pt 2), 309-316.
- Jorgensen S., Vorgias, C. E., Antranikian, G., 1997. Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 272, 16335-16342.
- Koch, R., Spreinat, K., Lemke, K., Antranikian, G., 1991. Purification and properties of a hyperthermoactive α -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*. *Arch. Microbiol.* 155, 572-578.
- Laderman, K. A., Davis, B. R., Krutzsch, H. C., Lewis, M. S., Griko, Y. V., Privalov, P. L., Anfinsen, C. B., 1993. The purification and characterization of an extremely thermostable α -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 268, 24394-24401.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, J. T., Kanai, H., Kobayashi, T., Akiba, T., Kudo, T., 1996. Cloning and nucleotide sequence and hyperexpression of α -amylase gene from an archaeon, *Thermococcus profundus*. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 432-438.
- Leveque, E., Janecek, S., Haye, B. and Belarbi, A., 2000a. Cloning and expression of an α -amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiol. Lettes*, 186, 67-71.
- Leveque, E., Janecek, S., Haye, B., Belarbi, A., 2000b. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 3-14.
- Linden A., Mayans, O., Klaucke, W. M., Antanikian, G., Wilmanns, M., 2003. Differential regulation of a hyperthermophilic α -amylase with a novel (Ca,Zn) two-metal center by zinc. *J. Biol. Chem.* 278, 9875-9884.
- Morgan, F. J., Priest, F. G., 1981. Characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB6346. *J. Appl. Bacteriol.* 50, 107-114.
- Nakajima R., Imanaka, T., Aiba, S., 1986. Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 355-360.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 135-152.
- Sambrook, J., Russell, D. W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Savchenko, A., Vieille, C., Kang, S., Zeikus, J. G., 2002. *Pyrococcus furiosus* α -amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry* 41, 6193-6201.

Tachibana, Y., Leclere, M. M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., 1996. Cloning and Expression of the α -amylase gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1, and characterization of the enzyme. J. Ferment. Bioeng. 82, 224-232.

Tomazic, S. J., Klibanov, A. M., 1988. Mechanisms of irreversible thermal inactivation of Bacillus alpha-amylases. J Biol. Chem. 263, 3086-3096.

van der Maarel, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. J. Biotechnol. 94, 137-155.

Vihinen, M., Mantsala, P., 1989. Microbial amylolytic enzymes. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 24, 329-418.

도면의 간단한 설명

도 1은 *Thermococcus* sp. NA1(TNA1), *T. kodakarensis* KOD1 189(TkKOD1, gi:57641390), *T. hydrothermalis* (PaGE5, gi:14521082) 및 *P. furiosus* (PhOT3, gi14590819)로부터의 α -아밀라아제의 서열 비교를 보인다. 대시는 갭(gap)을 의미하고, 오른쪽에 있는 숫자는 원래 서열에서 마지막 잔기의 위치를 나타낸다. 4개의 효소 사이의 같은 잔기는 *로 나타내었고, 보전된 치환 및 반보전된 치환은 각각 : 및 . 으로 나타내었다. 열안정성에 중요한 Ca^{2+} 에 참여하는 잔기는 굵게 표시되고 밑줄 그어져 표시되었다. 밝혀진 또는 잠정적인 시그널 펩타이드는 밑줄 그어져 표시되었다.

도 2는 대장균(A)에서의 α -아밀라아제의 발현 및 정제된 효소의 SDS-PAGE(B)의 발현을 보인다. A: *E. coli* 형질전환체의 α -아밀라아제 활성의 플레이트 분석. B: 분리되어진 TNA1_amylm의 쿠마시블루 염색. M 레인의 분자량 스탠다드는 포스포릴라제 b(phosphorylase b; 103 kDa), 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; 77 kDa), 오발부민(ovalbumin; 50 kDa), 카보닉 안하이드라제(carbonic anhydrase; 34.3 kDa), 콩 트립신 억제제(soybean trypsin inhibitor; 28.8 kDa) 및 리소자임(lysozyme; 20.7 kDa)이다. 본 발명의 효소에 상응하는 밴드는 화살표로 표시하였다.

도 3은 본 발명에 따른 TNA1_amyl 활성에 대한 온도(A) 및 pH(B)의 효과를 나타낸다. A: 시료온도를 30에서 95°C까지 증가시키며, 표준상태에서 활성분석을 수행하였다. B: 활성 분석이 다음의 완충용액(각각 50mM)을 사용하여 표준 조건에서 실시되었다, pH 4.0-6.0; Tris-HCl, pH 6.5-9.5

도 4는 α -아밀라아제에 대한 열불활성화를 보인다. 항온반응 시간에 대한 잔존 활성도의 세미로그 도표가 보인다. α -아밀라아제(2nM)가 0.5mM Ca^{2+} 의 존재(채워진 도형) 또는 부존재(열린 도형)에서 50mM 소디움 아세테이트 완충용액(pH 6.0) 안에서 80°C(원) 또는 90°C(사각형)에서 항온반응되었다. 표시되어진 시간에, 일부량이 꺼내어져서, 활성도가 80°C에서 기질로 가용성 전분을 이용하여 같은 완충용액에서 측정되었다. 직선은 데이터의 선형분석을 통하여 얻어졌다.

도 5 α -아밀라아제의 활성에 대한 금속이온의 효과를 보인다. 분석은 2가 금속이온이 다르나, 표준조건에서 분석이 수행되었다.

도 6은 라인위버-버크 플롯을 이용하여 동력학적 상수를 측정된 것을 보인다. 분석은 기질 농도가 달라지면서 표준 조건 하에서 수행되었다.

도 7은 여러 기질에서의 TNA_amyl 반응의 산물의 박층 크로마토그래피를 보인다. 메탈로올리고사카라이드로(G2, G3, G4, G5, G6), 전분(S), 아밀로펙틴(A), 플루란(P), 시클로덱스트린(α CD 및 β CD)부터의 반응 산물이 분석되었다. M은 포도당(G1), 엿당(G2), 말토트리오스(G3), 말토테트라오스(G4), 말토펜토오스(G5) 및 말토흐소스(G6)를 나타낸다.

도 8은 본 발명에 따른 재조합 α -아밀라아제 효소를 가지고 있는 재조합플라스미드의 개열지도를 보인다.

도면

도면1

```

TO_amy1  --MARKAAVAVLMAILISMSL---FAVPARAETLENGGVIMQAFYWDVPMGGIWWDTIRA 55
TK_amy1  --MKKRVALLITMFFVVSMAVAQPASAAKYSELEEGGVIMQAFYWDVPMGGIWWDTIRS 58
TH_amy1  --MARKVLA-LLVFLVLSV---SAVPAKAETLENGGVIMQAFYWDVPMGGIWWDTIAQ 54
PW_amy1  MNKKLTPLLTLLEFFIVLAS---PVSAAKYLELEEGGVIMQAFYWDVPMGGIWWDHIRS 57
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

TO_amy1  KVPWESQAGIAAIWLPPASKGMSGNYSMGYDYPDYFDLGEYDQKGTVEITRFGSKDELISL 115
TK_amy1  KIPWEYAGISAIWIIPPASKGMGGAYSMSGYDYPDYFDLGEYDQKGTVEITRFGSKQELINM 118
TH_amy1  KIPDWASAGISAIWIIPPASKGMSGGYSMSGYDYPDYFDLGEYDQKGSVETRFGSKEELVNM 114
PW_amy1  KIPWEYAGISAIWLPPPSKGMSSGYSMSGYDYPDYFDLGEYDQKGTVEITRFGSKEELVRL 117
          *:*:* * :***:***:* * :***:* * :***:***:***:***:***:***:***: * :
          *:*:* * :***:***:* * :***:* * :***:***:***:***:***:***:***: * :
          *:*:* * :***:***:* * :***:* * :***:***:***:***:***:***:***: * :
          *:*:* * :***:***:* * :***:* * :***:***:***:***:***:***:***: * :

          Region I
TO_amy1  INTAHAYNMKVVAIDIVINHRAGGDLEWNPFFVNDYTWDFSGVASGKYTACYLDHFHPNVS 175
TK_amy1  INTAHAYGIKVIADIVINHRAGGDLEWNPFFVGDYTWDFSKVASGKYTANYLDFHPNEVK 178
TH_amy1  INTAHAHNMKVIAIDIVINHRAGGDLEWNPFTNSYTWDFSKVASGKYTANYLDFHPNELH 174
PW_amy1  IQTAHAYGIKVIADIVINHRAGGDLEWNPFFVGDYTWDFSKVASGKYTANYLDFHPNELH 177
          *:*:*:* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          *:*:*:* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          *:*:*:* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          *:*:*:* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

          Region II
TO_amy1  YADEGTFGGFFDIDHDKWQYWLWKSNEVYAAAYLRSIGLIIAWRFDYVKGIYAPWVNSWL 235
TK_amy1  CCDEGTFGGFFDIAHEKEWDQHNLWASDESVAAYLRSIGVIAWRFDYVKGIGYAGVVKDWL 238
TH_amy1  AGDSGTFGGFFDICHDKSWDQHNLWASNEVYAAAYLRSIGLIIAWRFDYVKGIGYAPWVKNWL 234
PW_amy1  CCDEGTFGGFFDICHDKWQYWLWKSNEVYAAAYLRSIGLIIAWRFDYVKGIGYAGVVKDWL 237
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

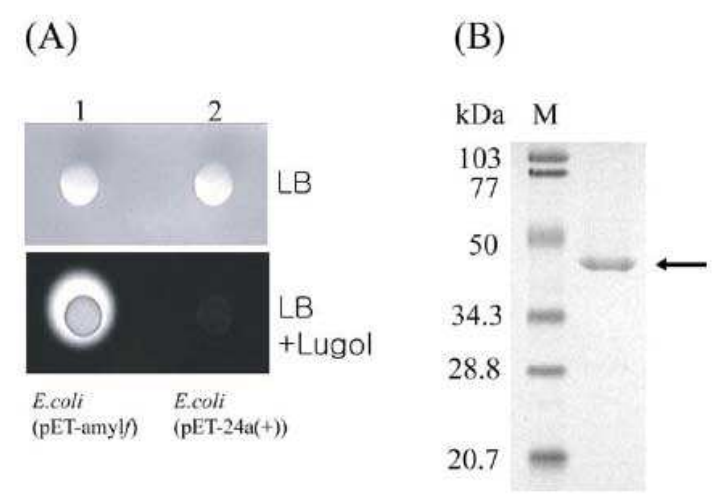
          Region III
TO_amy1  SYWGGWAVGEYWIINVDALLNWAYSSGAKVFDFPLYKMDAEAFDNNNIPALVDALRYGQT 295
TK_amy1  NWWGGWAVGEYWIINVDALLNWAYSSGAKVFDFPLYKMDAEAFDNTNIPALVDALQNGGT 298
TH_amy1  NRWGGWAVGEYWIINVDALLSWAYDSGAKVFDFPLYKMDAEAFDNNNIPALVDALKNGGT 294
PW_amy1  NWWGGWAVGEYWIINVDALLSWAYSSGAKVFDFPLYKMDAEAFDNNNIPALVYALQNGQT 297
          . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

          Region IV
TO_amy1  VVSRDPFKAVIFVANHHTDIWNKYPAYAFILTYEGQPMIFYRDYEEWLNKDKLINLIWI 355
TK_amy1  VVSRDPFKAVIFVANHHTDIWNKYPAYAFILTYEGQPVIFYRDYEEWLNKDKLNNLIWI 358
TH_amy1  VVSRDPFKAVIFVANHHTDIWNKYPAYAFILTYEGQPAIFYRDYEEWLNKDKLRLNLIWI 354
PW_amy1  VVSRDPFKAVIFVANHHTDIWNKYPAYAFILTYEGQPVIFYRDFEEWLNKDKLINLIWI 357
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

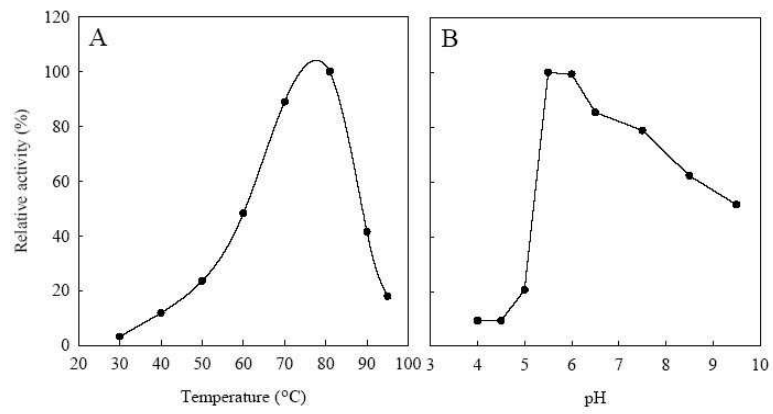
TO_amy1  HDNLAGGSTDIVYDSDDELIFVRSYGSKPGLITYINLGSSKAGRWWYVVPKFAGSCIHEY 415
TK_amy1  HDHLAGGSTIVYDSDDELIFVRNGDSKRPGLITYINLGSSKVRGRWYVVPKFAGACIHEY 418
TH_amy1  HDHLAGGSTDIVYDSDDELIFVRNGYGDKPGGLITYINLGSSKAGRWWYVVPKFAGSCIHEY 414
PW_amy1  HDHLAGGSTIVYDSDDELIFVRNGDSRRPGLITYINLSPNWRWYVVPKFAGACIHEY 417
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

TO_amy1  TGNLGGWIDKWVDSGGWVYLEAPAHDPANGQYGYVSVVSYCGVG 458
TK_amy1  TGNLGGWVDKYVESGGWVYLEAPAYDPASGQYGYTVVSYCGVG 461
TH_amy1  TGNLGGWIDKWVDSGGWVYLEAPAHDPANGQYGYVSVVSYCGVG 457
PW_amy1  TGNLGGWIDKRVVDSGGWVYLEAPHPDPANGYGYVSVVSYCGVG 460
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
    
```

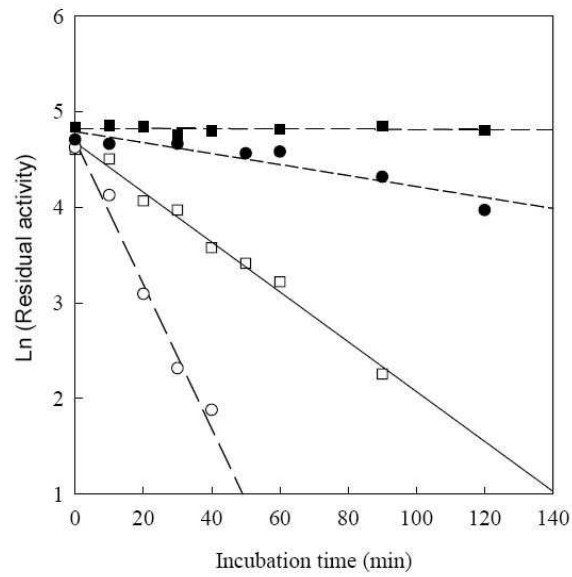
도면2



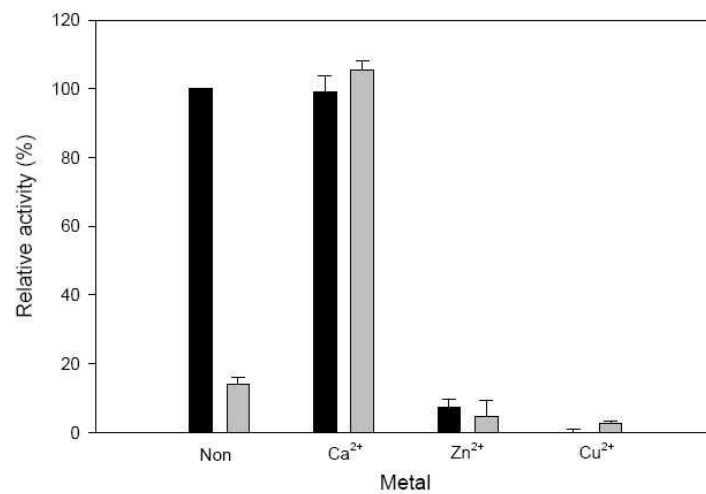
도면3



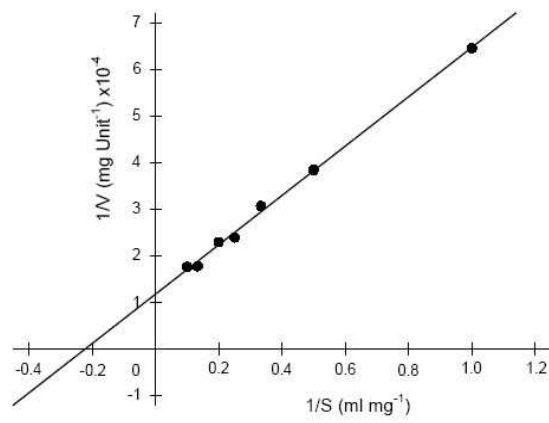
도면4



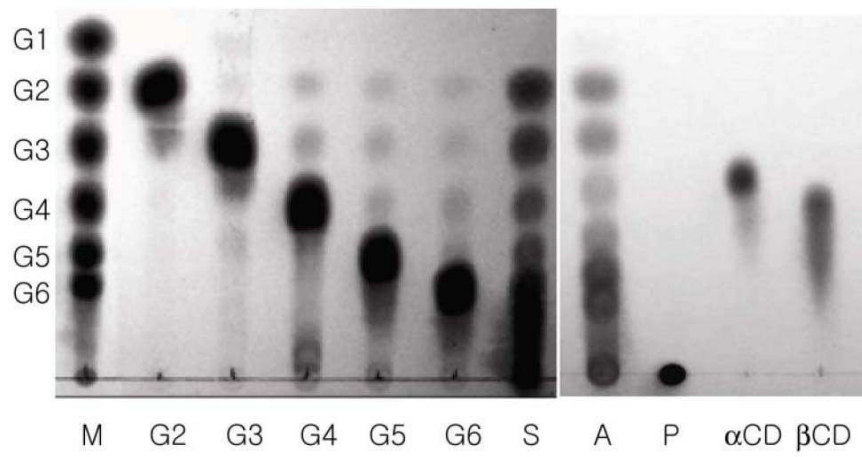
도면5



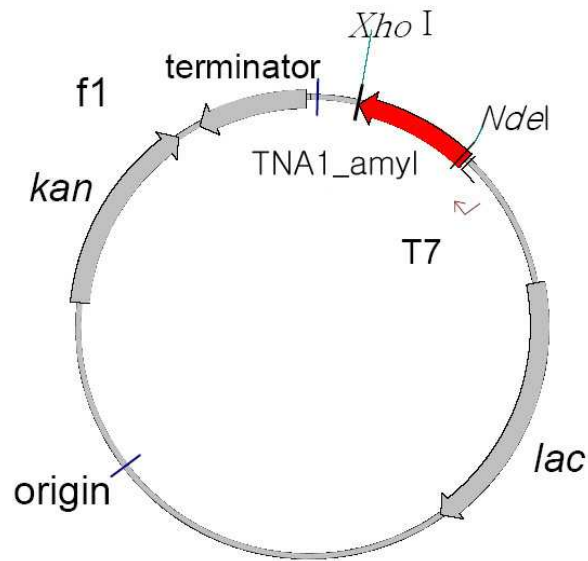
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110> KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE

<120> New Hyperthermophilic KCTC 10589BP Strain and Hyperthermophilic Amylase Produced Therefrom

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1377

<212> DNA

<213> Thermococcus sp.

<400> 1

atggccagaa aagcagccgt tgcagttttg atggccattc tgatttccat gagcctgttt	60
gcagttccag ccagggcgga aacactggaa aacggcggag tcataatgca ggccttctac	120
tgggatgtgc caatgggtgg aatttgggtgg gatacaataa gagccaaggt gccggagtgg	180
tcacaagcgg gcatagccgc aatatggcta cctccggcga gtaaaggcat gagcggcaac	240
tactccatgg gctacgatcc atacgactac ttogacctcg gcgagtatga ccagaagggg	300
acggtagaaa cgaggttcgg ctcaaaggac gagctcatat ccctaataa cacggcacac	360
gcctacaaca tgaaggtggt agcggacata gtcataaacc acagggcggg cggcgattta	420

gagtggaacc ccttcgtcaa cgactacacc tggacggact tttctggtgt tgcctcaggc 480
 aaatacaccg cctgctacct cgacttccat cccaatgacg tcagctacgc cgatgaaggc 540
 accttcggag gtttccccga catagaccac gacaaagagt ggaaccagta ctggctgtgg 600
 aagagcaacg agagctacgc tgcttacctc aggagcattg gaattgacgc ctggcgcttt 660
 gactacgtca agggctaccc ggcgtgggtg gttaactcgt ggctgagcta ctggggaggc 720
 tgggccgttg gagaatactg ggacactaac gtogacgccc ttctcaactg ggcttactcc 780
 agtggtgcca aagtctttga cttcccgctc tactacaaga tggacgaggc cttcgataac 840
 aacaacatcc ccgccctcgt cgatgcctc agatacggcc agaccgtagt tagccgcgac 900
 ccgttcaagg cagtgcctt cgtcgccaac cacgacacgg acataatctg gaacaagtat 960
 ccagcttatg cgttcatcct cacctacgag ggtcagccca tgatattcta ccgcgactac 1020
 gaggagtggc tcaacaagga caagctgata aacctcatct ggatacacga caacctcggc 1080
 ggggggagca ccgacatagt ctactacgac agcgcagagc tgatattcgt cagaagcggc 1140
 tacggaagca aaccgggact gataacctat atcaacctcg gctcaagcaa agccggaagg 1200
 tgggtctacg ttccgaagtt tgccgggtcg tgcatacacg agtacaccgg caacctcggc 1260
 ggctggattg acaagtgggt ggactcaagc ggctgggtct accttgaagc cccggcccac 1320
 gaccggcca acggccagta cggctactcc gtctggagct actgtggtgt tggctga 1377

<210> 2
 <211> 1302
 <212> DNA
 <213> Thermococcus sp.

<400> 2
 gcgaaaacac tggaaaacgg cggagtcata atgcaggcct tctactggga tgtgccaatg 60
 ggtggaattt ggtgggatac aataagagcc aaggtgccgg agtggtcaca agcgggcata 120
 gccgcaatat ggctacctcc ggcgagtaaa ggcgatgagcg gcaactactc catgggctac 180
 gatccatacg actacttcga cctcggcgag tatgaccaga agggaacggg agaaacgagg 240
 ttcggctcaa aggacgagct catatcccta atcaacacgg cacacgccta caacatgaag 300
 gtggtagcgg acatagtcac aaaccacagg gcggggcggc atttagagtg gaacccttc 360
 gtcaacgact acacctggac ggacttttct ggtgttgctt caggcaaata caccgcctgc 420

tacctcgact tccatcccaa tgacgtcagc tacgccgatg aaggcacctt cggaggtttc 480
 cccgacatag accacgacaa agagtggaac cagtactggc tgtggaagag caacgagagc 540
 tacgctgctt acctcaggag cattggaatt gacgcctggc gctttgacta cgtcaagggc 600
 taccggcgt ggggtggttaa ctcggtgctg agctactggg gaggctgggc cgttgagaa 660
 tactgggaca ctaacgtcga cgcccttctc aactgggctt actccagtgg tgccaaagtc 720
 tttgacttcc cgcttacta caagatggac gaggccttcg ataacaaca catccccgcc 780
 ctcgtcgatg ccctcagata cggccagacc gtagttagcc gcgaccggtt caaggcagtg 840
 accttcgtcg ccaaccacga cacggacata atctggaaca agtatccagc ttatgcgttc 900
 atcctcacct acgaggggtca gcccatgata ttctaccgcg actacgagga gtggctcaac 960
 aaggacaagc tgataaacct catctggata cacgacaacc tcgcgggggg gagcaccgac 1020
 atagtctact acgacagcga cgagctgata ttcgtcagaa gcggctacgg aagcaaaccg 1080
 ggactgataa cctatatcaa cctcggctca agcaaagccg gaaggtgggt ctacgttccg 1140
 aagtttgccg ggtcgtgcat acacgagtac accggcaacc tcggcggctg gattgacaag 1200
 tgggtggact caagcggctg ggtctacctt gaagccccgg cccacgaccc ggccaacggc 1260
 cagtacggct actccgtctg gagctactgt ggtgttggct ga 1302

<210> 3
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Thermococcus sp.

<400> 3
 Ala Glu Thr Leu Glu Asn Gly Gly Val Ile Met Gln Ala Phe Tyr Trp
 1 5 10 15
 Asp Val Pro Met Gly Gly Ile Trp Trp Asp Thr Ile Arg Ala Lys Val
 20 25 30
 Pro Glu Trp Ser Gln Ala Gly Ile Ala Ala Ile Trp Leu Pro Pro Ala
 35 40 45
 Ser Lys Gly Met Ser Gly Asn Tyr Ser Met Gly Tyr Asp Pro Tyr Asp
 50 55 60
 Tyr Phe Asp Leu Gly Glu Tyr Asp Gln Lys Gly Thr Val Glu Thr Arg
 65 70 75 80
 Phe Gly Ser Lys Asp Glu Leu Ile Ser Leu Ile Asn Thr Ala His Ala

				85						90						95
Tyr	Asn	Met	Lys	Val	Val	Ala	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	His	Arg	Ala	Gly	
			100					105					110			
Gly	Asp	Leu	Glu	Trp	Asn	Pro	Phe	Val	Asn	Asp	Tyr	Thr	Trp	Thr	Asp	
		115					120					125				
Phe	Ser	Gly	Val	Ala	Ser	Gly	Lys	Tyr	Thr	Ala	Cys	Tyr	Leu	Asp	Phe	
	130					135					140					
His	Pro	Asn	Asp	Val	Ser	Tyr	Ala	Asp	Glu	Gly	Thr	Phe	Gly	Gly	Phe	
145					150					155					160	
Pro	Asp	Ile	Asp	His	Asp	Lys	Glu	Trp	Asn	Gln	Tyr	Trp	Leu	Trp	Lys	
				165					170					175		
Ser	Asn	Glu	Ser	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ser	Ile	Gly	Ile	Asp	Ala	
		180						185					190			
Trp	Arg	Phe	Asp	Tyr	Val	Lys	Gly	Tyr	Pro	Ala	Trp	Val	Val	Asn	Ser	
		195					200					205				
Trp	Leu	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gly	Trp	Ala	Val	Gly	Glu	Tyr	Trp	Asp	Thr	
	210					215					220					
Asn	Val	Asp	Ala	Leu	Leu	Asn	Trp	Ala	Tyr	Ser	Ser	Gly	Ala	Lys	Val	
225					230					235					240	
Phe	Asp	Phe	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Lys	Met	Asp	Glu	Ala	Phe	Asp	Asn	Asn	
				245					250					255		
Asn	Ile	Pro	Ala	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Arg	Tyr	Gly	Gln	Thr	Val	Val	
			260					265					270			
Ser	Arg	Asp	Pro	Phe	Lys	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Ala	Asn	His	Asp	Thr	
		275					280						285			
Asp	Ile	Ile	Trp	Asn	Lys	Tyr	Pro	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu	Thr	Tyr	
	290					295					300					
Glu	Gly	Gln	Pro	Met	Ile	Phe	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Glu	Glu	Trp	Leu	Asn	
305					310					315					320	
Lys	Asp	Lys	Leu	Ile	Asn	Leu	Ile	Trp	Ile	His	Asp	Asn	Leu	Ala	Gly	
			325						330					335		
Gly	Ser	Thr	Asp	Ile	Val	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Asp	Glu	Leu	Ile	Phe	Val	
			340					345					350			
Arg	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ser	Lys	Pro	Gly	Leu	Ile	Thr	Tyr	Ile	Asn	Leu	
		355					360						365			

Gly Ser Ser Lys Ala Gly Arg Trp Val Tyr Val Pro Lys Phe Ala Gly
 370 375 380

Ser Cys Ile His Glu Tyr Thr Gly Asn Leu Gly Gly Trp Ile Asp Lys
 385 390 395 400

Trp Val Asp Ser Ser Gly Trp Val Tyr Leu Glu Ala Pro Ala His Asp
 405 410 415

Pro Ala Asn Gly Gln Tyr Gly Tyr Ser Val Trp Ser Tyr Cys Gly Val
 420 425 430

Gly

- <210> 4
- <211> 458
- <212> PRT
- <213> Thermococcus sp.

<400> 4
 Met Ala Arg Lys Ala Ala Val Ala Val Leu Met Ala Ile Leu Ile Ser
 1 5 10 15

Met Ser Leu Phe Ala Val Pro Ala Arg Ala Glu Thr Leu Glu Asn Gly
 20 25 30

Gly Val Ile Met Gln Ala Phe Tyr Trp Asp Val Pro Met Gly Gly Ile
 35 40 45

Trp Trp Asp Thr Ile Arg Ala Lys Val Pro Glu Trp Ser Gln Ala Gly
 50 55 60

Ile Ala Ala Ile Trp Leu Pro Pro Ala Ser Lys Gly Met Ser Gly Asn
 65 70 75 80

Tyr Ser Met Gly Tyr Asp Pro Tyr Asp Tyr Phe Asp Leu Gly Glu Tyr
 85 90 95

Asp Gln Lys Gly Thr Val Glu Thr Arg Phe Gly Ser Lys Asp Glu Leu
 100 105 110

Ile Ser Leu Ile Asn Thr Ala His Ala Tyr Asn Met Lys Val Val Ala
 115 120 125

Asp Ile Val Ile Asn His Arg Ala Gly Gly Asp Leu Glu Trp Asn Pro
 130 135 140

Phe Val Asn Asp Tyr Thr Trp Thr Asp Phe Ser Gly Val Ala Ser Gly
 145 150 155 160

Lys Tyr Thr Ala Cys Tyr Leu Asp Phe His Pro Asn Asp Val Ser Tyr
 165 170 175
 Ala Asp Glu Gly Thr Phe Gly Gly Phe Pro Asp Ile Asp His Asp Lys
 180 185 190
 Glu Trp Asn Gln Tyr Trp Leu Trp Lys Ser Asn Glu Ser Tyr Ala Ala
 195 200 205
 Tyr Leu Arg Ser Ile Gly Ile Asp Ala Trp Arg Phe Asp Tyr Val Lys
 210 215 220
 Gly Tyr Pro Ala Trp Val Val Asn Ser Trp Leu Ser Tyr Trp Gly Gly
 225 230 235 240
 Trp Ala Val Gly Glu Tyr Trp Asp Thr Asn Val Asp Ala Leu Leu Asn
 245 250 255
 Trp Ala Tyr Ser Ser Gly Ala Lys Val Phe Asp Phe Pro Leu Tyr Tyr
 260 265 270
 Lys Met Asp Glu Ala Phe Asp Asn Asn Asn Ile Pro Ala Leu Val Asp
 275 280 285
 Ala Leu Arg Tyr Gly Gln Thr Val Val Ser Arg Asp Pro Phe Lys Ala
 290 295 300
 Val Thr Phe Val Ala Asn His Asp Thr Asp Ile Ile Trp Asn Lys Tyr
 305 310 315 320
 Pro Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Tyr Glu Gly Gln Pro Met Ile Phe
 325 330 335
 Tyr Arg Asp Tyr Glu Glu Trp Leu Asn Lys Asp Lys Leu Ile Asn Leu
 340 345 350
 Ile Trp Ile His Asp Asn Leu Ala Gly Gly Ser Thr Asp Ile Val Tyr
 355 360 365
 Tyr Asp Ser Asp Glu Leu Ile Phe Val Arg Ser Gly Tyr Gly Ser Lys
 370 375 380
 Pro Gly Leu Ile Thr Tyr Ile Asn Leu Gly Ser Ser Lys Ala Gly Arg
 385 390 395 400
 Trp Val Tyr Val Pro Lys Phe Ala Gly Ser Cys Ile His Glu Tyr Thr
 405 410 415
 Gly Asn Leu Gly Gly Trp Ile Asp Lys Trp Val Asp Ser Ser Gly Trp
 420 425 430
 Val Tyr Leu Glu Ala Pro Ala His Asp Pro Ala Asn Gly Gln Tyr Gly

435

440

445

Tyr Ser Val Trp Ser Tyr Cys Gly Val Gly
 450 455

<210> 5

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amylase full size forward primer

<400> 5

cgaccggca tatggccaga aaagcagccg ttgcagtttt g 41

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amylase full size reverse primer

<400> 6

ctccacatct cgaggccaac accacagtag ctccagac 38

<210> 7

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amylase mature form forward primer

<400> 7

cgaccggca tatggcgaa aactggaaa acggcggagt c 41

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amylase mature form reverse primer

<400> 8
ctccacatct cgaggccaac accacagtag ctccagac

38