

Mise en évidence d'enzymes thermostables chez des micro-organismes thermophiles d'origine hydrothermale

Thermostable enzymes screened on thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents

CHRISTINE LADRAT, LAURENCE CORNEC, ANNE-MARIE ALAYSE-DANET, GEORGES BARBIER

IFREMER, Laboratoire de biotechnologie, DRO EP, BP70, 29280 Plouzané, France.

RÉSUMÉ

Trois campagnes océaniques dans le Pacifique ont permis l'obtention d'échantillons provenant d'écosystèmes hydrothermaux sous-marins à partir desquels ont été purifiés des micro-organismes thermophiles. Quatre activités enzymatiques ont été recherchées à haute température sur 77 isolats chimio-organohétérotrophes thermophiles et hyperthermophiles. L'activité β -glucosidase a été mise en évidence pour 42 isolats tandis que l'activité alcool-déshydrogénase n'a été détectée que chez 7 isolats dont un seul est un archaon croissant à plus de 80 °C. Seulement 6 isolats se sont révélés négatifs pour la présence de protéase. L'activité estérase a été détectée chez 27 isolats ; 3 profils électrophorétiques différents de ces activités ont pu être mis en évidence. Aucun isolat ne possède à la fois les 4 activités enzymatiques. L'étude préliminaire de ces activités révèle que ces enzymes thermoactives sont thermostables et susceptibles de ce fait d'être intéressantes pour des applications biotechnologiques. ▲

Mots clés : alcool-déshydrogénase, estérase, β -glucosidase, protéase, criblage, thermostabilité.

ABSTRACT

During 3 cruises in the Pacific ocean, hydrothermal samples have been collected and some thermophilic bacteria and archaea have been purified. Four enzymatic activities have been screened on 77 chemo-organoheterotrophic thermophilic microorganisms. Forty-two isolates exhibited intracellular β -glucosidase activity whereas only 7 (including only one archaeon) showed alcohol dehydrogenase one. Protease activity was not detected on only 6 isolates over 77. Twenty-seven isolates exhibited esterase activity and 3 different electrophoretic patterns have been revealed. No isolate was found to exhibit the 4 activities. Preliminary characterization of these activities showed high thermophily and thermostability, properties which could be used in potential biotechnological applications. ▲

Key words: alcohol dehydrogenase, esterase, protease, screening, β -glucosidase, thermostability.

Abridged version (see p. 427-8)

Les micro-organismes thermophiles sont connus depuis longtemps mais, depuis quelques années, un nombre toujours croissant de nouveaux micro-organismes

thermophiles a été isolé à partir de diverses niches écologiques où règnent des températures élevées telles que les sources chaudes sulfureuses terrestres ou les sources chaudes littorales. Avec la découverte en 1977 des écosystèmes hydrothermaux sous-marins [1], caractérisés par de forts gradients de température [2], c'est une nouvelle source potentielle de micro-organismes thermophiles qui a été mise en évidence.

D'après les définitions reconnues par la plupart des auteurs, les micro-organismes thermophiles et thermophiles

Note présentée par Lucien Laubier.

Note remise le 26 septembre 1994, acceptée après révision le 9 janvier 1995.

Correspondance : C. Ladrat.

extrêmes se développent entre 55-60 °C et 80-85 °C tandis que les hyperthermophiles se développent au-dessus de 80-85 °C [3].

Ces micro-organismes thermophiles sont intéressants d'un point de vue biotechnologique et scientifique. En effet, la mise en évidence de ces bactéries a ouvert une nouvelle voie de recherche fondamentale sur les formes de vie primitives et leur développement dans des conditions extrêmes. On peut de plus espérer comprendre les subtilités de la structure protéique et déterminer ainsi les bases moléculaires de la thermostabilité. Les enzymes thermostables intéressent de nombreux domaines industriels comme l'agroalimentaire, la détergence, les industries de l'amidon et de la cellulose [4] qui utilisent des procédés enzymatiques à température élevée. Les enzymes thermostables sont généralement plus stables que leurs homologues mésophiles en solvants organiques ou en milieu à activité de l'eau réduite; ces conditions réactionnelles favorisent la synthèse de composés divers par des enzymes hydrolytiques.

A l'heure actuelle, la majorité des enzymes thermostables utilisées dans l'industrie provient de micro-organismes mésophiles; ce sont principalement des hydrolases telles que les protéases et les glycosidases [5].

Cette note porte sur la recherche d'activités enzymatiques thermostables chez des micro-organismes hétérotrophes thermophiles isolés d'écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds. Un protocole de criblage rapide d'une collection bactérienne a été mis au point et utilisé pour les activités enzymatiques suivantes: β -glucosidase, estérase et protéase, 3 activités hydrolases et alcool-déshydrogénase, activité d'oxydoréduction.

Matériel et méthodes

Des échantillons de fluides hydrothermaux, de sédiments, de morceaux de roches et d'animaux ont été prélevés par le submersible *Le Nautilus* au cours de 3 campagnes océaniques: STARMER en 1989 dans le bassin Nord Fidjien [6], BIOLAU en 1989 dans le bassin de Lau [6] et MMT en 1991 sur plusieurs sites de la ride du Pacifique oriental.

Les micro-organismes purifiés à 60, 80, 85 et 95 °C, en conditions anaérobies $N_2/H_2/CO_2$ (90/5/5) sur milieux solides à base de Gelrite [7] ou d'agar ont ensuite été cultivés sur différents milieux liquides: 2216S [8], BHIS milieu contenant 9,25 g/l de BHI (Brain Heart Infusion), 23 g/l de NaCl et 5 g/l de soufre élémentaire.

Les activités enzymatiques ont été recherchées après centrifugation de la culture et cassage du culot aux ultrasons (β -glucosidase, estérase et alcool-déshydrogénase) dans le milieu intracellulaire, ou dans le surnageant de culture (protéases). Les activités β -glucosidases ont été mises en évidence à pH 7,5 par la dégradation suivie à 401 nm du substrat synthétique *para*-nitrophényl- β -D-glucopyranoside à 10 mM. Pour les températures supérieures à 90 °C et l'étude de son évolution en fonction du pH, l'activité a été mesurée en point final après arrêt de la réaction avec Na_2CO_3 1 M. Les activités alcool-déshydrogénases ont été mises en évidence dans divers milieux réactionnels contenant le substrat 50 mM (l'alcool benzylique, l'éthanol ou le benzaldéhyde) et le cofacteur 1 mM (NAD, NADP, NADH ou NADPH) à pH 7,5 ou 9. L'oxydation ou la réduction du

cofacteur ont été enregistrées à 340 nm. Les mesures en routine ont été réalisées avec l'alcool benzylique en présence de NADP. Les activités protéolytiques des surnageants de culture ont été mesurées par la dégradation de l'azocaséine à 5 g/l en présence de 20 mM $CaCl_2$. Après ajout d'acide trichloroacétique 20% et centrifugation, l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 340 nm. Le criblage d'activités estérases a été effectué après électrophorèse en gel de polyacrylamide [9] par visualisation de la dégradation à pH 7,5 des substrats α - ou β -naphthyl-acétate au niveau d'une bande protéique, l' α - et le β -naphthol donnant des couleurs différentes. En routine, ces activités ont été suivies à 410 nm par la dégradation du *para*-nitrophényl-valérate, solubilisé dans 0,09 ml d'isopropanol en présence de Triton X100 à 0,4% et de gomme arabique 0,1% dans le tampon Tris HCl 50 mM à pH 8.

Toutes les incubations pour le criblage enzymatique ont été effectuées à 60 °C pour les isolats obtenus à cette température et 70 °C pour les autres afin de minimiser la dégradation thermique des substrats. L'évolution des activités en fonction de la température et du pH a été étudiée en effectuant les incubations appropriées. Les pH ont été ajustés à température ambiante.

Les tests de thermostabilité ont été effectués en l'absence de substrat par chauffage des préparations enzymatiques en tubes scellés à la température désirée. Chaque incubation était arrêtée dans la glace puis congelée avant la détermination des activités résiduelles.

Résultats

Criblage enzymatique de la collection bactérienne

Les 4 activités enzymatiques β -glucosidase, estérase, alcool-déshydrogénase et protéase, ont été recherchées à haute température sur 77 isolats chimio-organohétérotrophes thermophiles et hyperthermophiles. Ce sont tous des micro-organismes anaérobies stricts. D'après l'analyse lipidique, 6 d'entre eux, en forme de bâtonnets, obtenus à 60 °C, appartiennent au règne des bactéries [10, 11]. Les autres sont tous des archaea, de forme coccoïde, réduisant le soufre [10, 11]. La majorité d'entre eux a été isolée à 80 °C à pH 5,5 ou 7,5 à partir d'échantillons de sulfures polymétalliques ou d'animaux provenant de la campagne MMT. L'analyse taxonomique de cette partie de la collection microbienne de l'IFREMER a été effectuée par des méthodes de biologie moléculaire qui ont mis en évidence la présence de nouvelles espèces de Thermococcales (*Thermococcus sp.* et *Pyrococcus sp.*) ainsi que la première espèce de *Thermosipho* provenant du milieu océanique profond [11]. Les Figures 1, 2, 3 et 4 montrent la répartition des isolats pour lesquels chacune des activités enzymatiques a été détectée, en fonction du pH et de leur température de croissance. L'activité β -glucosidase est largement répandue parmi ces isolats thermophiles puisque plus de la moitié possède cette activité (42 sur les 77 testés). Parmi les 16 isolats croissant à 60 °C, 6 sont des souches bactériennes appartenant au genre *Thermosipho* [11]. L'activité alcool-déshydrogénase n'a été détectée que chez 7 isolats dont les 6 bactéries *Thermosipho* également

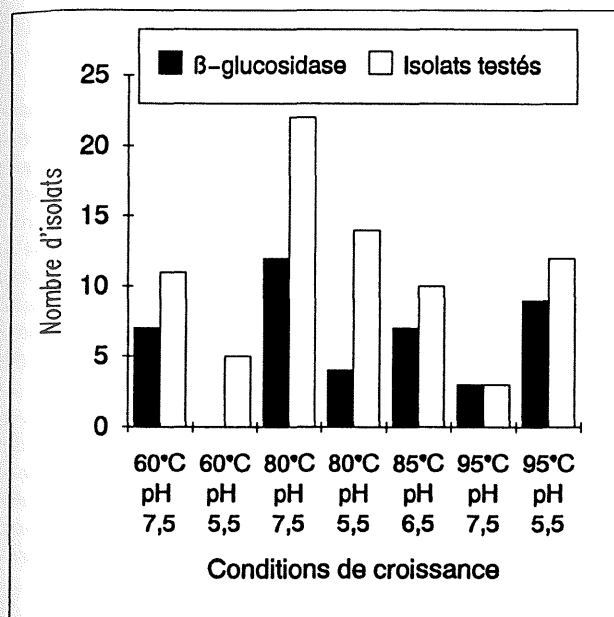


Figure 1. Criblage de l'activité β -glucosidase sur 77 isolats thermophiles provenant d'écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds.

β -glucosidase positives et un seul archaeon isolé à 80°C et pH 5,5. L'activité estérase a été détectée chez 27 isolats. Plus précisément, 10 dégradent le substrat α -naphthyl-acétate ; 13 isolats présentent une seule bande sur gel d'électrophorèse hydrolysant à la fois l' α - et le β -naphthyl-

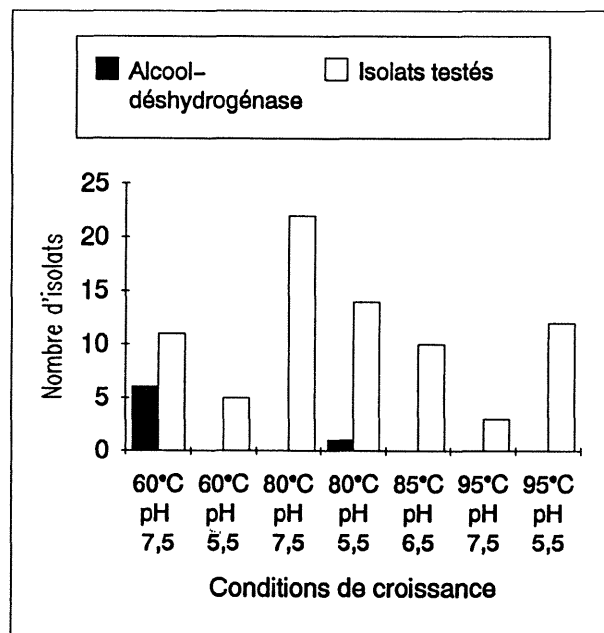


Figure 2. Criblage de l'activité alcool-déshydrogénase sur 77 isolats thermophiles provenant d'écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds.

acétate ; les 4 derniers possèdent 2 types d'estérases de migration électrophorétique différente, la première hydrolysant les 2 types de substrat et la seconde dégradant uniquement le substrat en α . L'activité protéase est la plus commune ; sur les 77 isolats testés, 6 seulement se sont

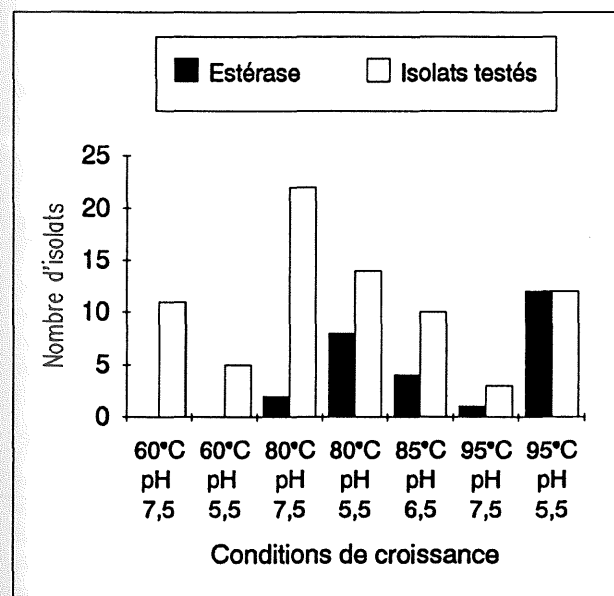


Figure 3. Criblage de l'activité estérase sur 77 isolats thermophiles provenant d'écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds.

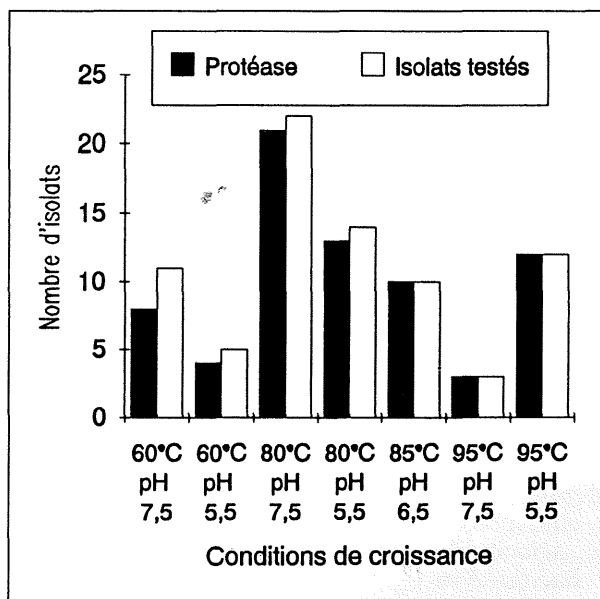


Figure 4. Criblage de l'activité protéase sur 77 isolats thermophiles provenant d'écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds.

révélés négatifs dans nos conditions expérimentales. Aucun des isolats ne possède à la fois les 4 activités enzymatiques étudiées mais 5 possèdent les 3 activités β -glucosidase, alcool-déshydrogénase et protéase. Quinze isolats présentent à la fois l'activité β -glucosidase, protéase et estérase. Le criblage effectué a donc permis de détecter la présence d'enzymes thermoactives. Nous avons ensuite caractérisé de façon préliminaire quelques activités afin d'étudier leurs potentialités biotechnologiques.

Caractérisations des enzymes choisies

Une étude préliminaire de la thermostabilité des enzymes en extrait brut nous a permis de choisir des isolats modèles: ST549 pour la β -glucosidase, AL662 pour l'alcool-déshydrogénase et ST855 pour l'estérase.

L'isolat ST549, producteur de l'activité β -glucosidase étudiée, est une nouvelle souche de *Pyrococcus abyssi* [11, 12]. L'enzyme non purifiée est active dans une large gamme de pH (4,5 à 9,5) et de température (40 °C à 110 °C). L'activité est maximale à pH 6 (tampon citrate

phosphate) et 100 °C. Cette enzyme est thermostable puisqu'à 90 °C, elle a une demi-vie de 70 min et 500 min à pH 7,5 et pH 6, respectivement.

L'isolat AL662, producteur de l'activité alcool-déshydrogénase étudiée, représente une nouvelle espèce du genre *Thermococcus* [11]. Cette alcool-déshydrogénase est spécifique du coenzyme NADP⁺. En effet, l'activité obtenue en présence de NAD⁺ représente moins de 5% de l'activité mesurée en présence de NADP⁺. L'enzyme est active entre les pH 6 et 9 avec une activité maximale à pH 8 dans le tampon Tris HCl (à 75 °C). L'évolution de l'activité en fonction de la température a été étudiée à pH 7,5, le maximum a été obtenu à 75 °C. La demi-vie de cette enzyme non purifiée est de 87, 56 et 36 min à 52, 62 et 69 °C respectivement.

L'isolat ST855, producteur de l'activité estérase étudiée, a été décrit récemment comme une nouvelle espèce de *Pyrococcus*: *Pyrococcus abyssi* [12]. L'hydrolyse du *para*-nitrophényl-valérate est maximale à 65-75 °C (testée à pH 7,5) et pH 6-8 (étudiée à 65 °C). Cette enzyme est très thermostable puisque aucune perte d'activité n'a été observée après 5 h à 99 °C.

Tableau I
 β -glucosidases, alcool-déshydrogénases et estérases décrites

Micro-organisme producteur	Température optimale	pH optimal	Thermostabilité	Référence
β-glucosidases				
<i>Pyrococcus furiosus</i>	102-105 °C	5,0	t1/2 de 85 h à 100 °C et 13 h à 110 °C	[13]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	> 90 °C	6,5	t1/2 de 24 h à 75 °C, 10 h à 80 °C et 3 h à 85 °C	[14]
<i>Thermus sp.</i>	80-85 °C	4,5-6,5	t1/2 de 5 jours à 75 °C	[15]
<i>Thermotoga maritima</i>	90 °C	6,0-6,2	Après 6 h à 95 °C, il reste 62 % d'activité et 93 % à 90 °C	[16]
ST549	100 °C	6	t1/2 de 500 min à 90 °C	Cette étude
Alcool-déshydrogénases				
<i>Sulfolobus solfataricus</i> (NAD ⁺ dépendante)	> 95 °C	8,5	t1/2 de 20 h à 60 °C et 5 h à 70 °C	[17]
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	?	7,8-9,0	t1/2 de 25 min à 91 °C et 2 min à 98 °C (environ)	[18]
(NADP ⁺ dépendante) <i>Thermococcus litoralis</i>	80 °C	8,8	t1/2 de 2 h à 85 °C et 15 min à 96 °C	[19]
(NADP ⁺ dépendante) AL662	75 °C	8	t1/2 de 56 min à 62 °C	Cette étude
(NADP ⁺ dépendante)				
Estérases				
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	?	7,5-8,5	t1/2 de 1 h à 100 °C	[20]
<i>Bacillus A30-1</i>	60 °C	9,0	t1/2 de 28 h à 50 °C, 20 h à 60 °C et 16 h à 65 °C	[21]

t1/2 : temps de demi-vie de l'enzyme.

Discussion

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent une fois de plus que les micro-organismes thermophiles extrêmes sont une bonne source potentielle d'enzymes thermoactives et thermostables. Des hydrolases (β -glycosidases, protéases, amylases, estérases, xylanases, pullulanases...) et des oxydoréductases (alcool, glutamate-déshydrogénases) thermoactives et thermostables ont été décrites dans la littérature. Elles ont été mises en évidence chez des archaea ou des bactéries isolées d'habitats terrestres (solfatares) ou littoraux. L'étude présente est la première qui porte sur un grand nombre de micro-organismes isolés des grands fonds sous-marins.

Des activités β -glucosidases thermoactives et thermostables ont déjà été étudiées et décrites à partir d'archaea ou de bactéries thermophiles (Tableau I): *Pyrococcus furiosus* [13], *Sulfolobus solfataricus* [14], *Thermus sp.* Z1 [15], *Thermotoga maritima* [16]. Le pH optimal pour l'activité β -glucosidase de l'isolat ST549 *Pyrococcus sp.* se situe dans le domaine généralement rencontré (5,5-7,0). Cette enzyme semble être parmi les plus thermophiles et se rapproche ainsi de la β -glucosidase de *P. furiosus* [13]. Cependant, elle semble moins thermostable que cette dernière mais plus que celle de *S. solfataricus* [14]. Nous devons cependant noter que les comparaisons de thermostabilités sont limitées par la diversité des conditions expérimentales (tampon, pH d'incubation, niveau de pureté de l'enzyme et donc présence probable de protéases, additifs, concentration en enzyme...). Il semblerait que les propriétés de l'enzyme soient relativement proches de celles de *P. furiosus*, ce qui n'est pas surprenant si l'on considère que ST549 appartient au genre *Pyrococcus* [11].

A notre connaissance, 3 alcool-déshydrogénases actives à haute température ont été décrites à ce jour (Tableau I) [17-19]. C'est l'enzyme de *Sulfolobus solfataricus*, NAD⁺

dépendante, qui semble la plus thermophile [17] mais c'est celle de *Thermococcus litoralis* [19] qui est la plus thermostable. Bien que cette enzyme semble beaucoup moins thermostable, certaines des propriétés de l'alcool-déshydrogénase de AL662 se rapprochent de celles de *T. litoralis* (dépendance vis-à-vis du NADP⁺, température et pH optimum pour l'activité), ce qui n'est pas surprenant puisque AL662 serait une nouvelle espèce de *Thermococcus* [11]. Mais rappelons que, comme dans le cas de la β -glucosidase de ST549, l'enzyme n'a pas été purifiée et la présence de protéases pourrait expliquer une thermostabilité apparente plus faible.

Peu d'estérases thermophiles ont été décrites dans la littérature (Tableau I); une seule provient d'un archaeon: *Sulfolobus acidocaldarius* [20], les quelques autres ont été isolées de souches de *Bacillus* et apparaissent beaucoup moins thermophiles [21, 22]. La thermophilie d'une estérase est difficilement caractérisable avec les substrats synthétiques dérivés du *para*-nitrophénol et c'est sans doute pour cela que la température optimale d'activité de l'estérase de *Sulfolobus acidocaldarius* n'a pas été déterminée. Cependant, l'estérase de *Pyrococcus abyssi* semble la plus thermostable des estérases décrites à l'heure actuelle.

L'étude approfondie après purification des propriétés enzymatiques, notamment la stabilité vis-à-vis de différents agents dénaturants, la température optimale d'activité et la spécificité de substrat, permettra d'envisager des applications industrielles potentielles pour chacune de ces enzymes. Les applications suivantes ont été décrites: production de composés chiraux par l'alcool-déshydrogénase (avec des applications directes pour les herbicides, les insecticides, en thérapeutique, en synthèse d'arômes [23]), synthèse de dérivés glucosés [24] et dégradation de la cellulose [25] par la β -glucosidase, utilisation d'une protéase thermostable dans les industries de la détergence, de tannerie, et pour la synthèse de liaisons peptidiques [26], synthèse ou hydrolyse stéréosélective des liaisons ester par l'estérase. ▼

ABRIDGED VERSION

For some years, very diverse environmental niches have been explored and an increasing number of new genera and species of thermophilic, extreme thermophilic and hyperthermophilic bacteria have been isolated from various hot springs and geothermal areas. Thermophilic and extreme thermophilic microorganisms refer to microorganisms growing between 55-60°C to 80-85°C and hyperthermophilic to those growing above 85°C. Thermophilic microorganisms are considered for biotechnological – in particular for the production of thermostable enzymes – and fundamental prospects since the discovery of hyperthermophilic archaea has provided a valuable tool for the analysis of origin of life, thermophily and protein stability.

Most of industrial enzymatic processes are carried out at elevated temperatures and thermostable enzymes are widely used in food, detergent, starch and cellulose industries. Until now, most of them are produced by mesophilic microorganisms although the existence of thermophilic microorganisms has been known for a long time.

During 3 cruises in the South West Pacific ocean (Lau Basin and North Fiji Basin) and on East Pacific Rise (different sites at 11°N, 13°N and 21°N), samples of fluids, hydrothermal chimneys, sediments and animals were collected. Seventy-seven thermophilic to hyperthermophilic chemo-organoheterotrophic and anaerobic bacteria and archaea have been isolated from these samples. β -glucosidase (on *para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside at pH 7.5) and alcohol dehydrogenase (on ethanol, benzylic alcohol, benzaldehyde as substrates at pH 7.5 and 9) activities have been detected by continuous kinetics monitored spectrophotometrically using intracellular preparations. Esterase activities have been detected on intracellular preparations by gel electrophoresis visualizing bands of synthetic substrates degradation. Extracellular protease activities were studied on culture supernatant using azocasein as substrate. Preliminary characterizations of enzymes have been carried out with a spectrophotometer equipped with a thermostated 12-cells holder.

Forty-two over 77 tested isolates exhibited β -glucosidase activity; only 7 of them showed the alcohol dehydrogenase one and proteolytic activities have been detected on 71 isolates in the assay condi-

tions. Concerning esterase activity, 27 isolates hydrolysed α - and/or β -naphthyl-acetate. More precisely, on gel electrophoresis, 10 of them showed one band degrading only α -naphthyl-acetate, 13 exhibited one proteic band degrading both substrates and the other 4 isolates exhibited 2 types of esterase activities with different electrophoretic migration; one of these bands degraded both substrates and the second one hydrolysed only α -naphthyl-acetate. No isolate among the 77 tested was found to exhibit the 4 activities. To our best knowledge, this is the first work reported on enzymatic screening on a large number of extremely thermophilic microorganisms isolated from deep-sea hydrothermal vents. Preliminary characterization of each not purified enzymes has been focused on 3 different isolates: ST549 (*Pyrococcus sp.*) for β -glucosidase, AL662 (*Thermococcus sp.*) for alcohol dehydrogenase and ST855 recently described as *Pyrococcus abyssi* for esterase production.

Remerciements : ce travail a reçu le soutien financier d'IFREMER et de la Région Bretagne (Programme BRITTA). Nous remercions IFREMER (France), l'Agence scientifique et technique (STA, Japon), et la Fondation nationale pour la science (NSF, États-Unis) ainsi que les chefs des missions à la mer qui nous ont permis d'obtenir des échantillons des écosystèmes hydrothermaux marins. La purification des souches a été effectuée par les microbiologistes du laboratoire.

RÉFÉRENCES

1. Corliss J.B., Ballard R.D. 1977. Oases of life in the cold abyss. *Natl. Geograph. Magazine* 152 : 441-53.
2. Desbruyères D., Crassous P., Grassle J., Khripounoff A., Reyss D., Rio M., Van Praet M. 1982. Données écologiques sur un nouveau site d'hydrothermalisme actif de la ride du Pacifique oriental. *C. R. Acad. Sci. Paris* 295 : 489-94.
3. Kristjansson J.K. 1992. *Thermophilic Bacteria*. Ed. par CRC Press Inc., 194 p.
4. Cowan D.A. 1992. Enzymes from thermophilic archaeobacteria: current and future applications in biotechnology. *Biochem. Soc. Symp.* 58 : 149-69.
5. Sundaram T.K. 1988. Thermostable enzymes for biotechnology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 42 : 308-11.
6. Desbruyères G., Alayse-Danet A.M., Ohta S. 1994. Deep-sea hydrothermal communities in Southwestern Pacific back-arc basins (the North Fiji and Lau Basins): composition, microdistribution and food web. *Marine Geol.* 11 : 227-42.
7. Deming J.W., Baross J.A. 1986. Solid medium for culturing black smoker bacteria at temperatures to 120°C. *Appl. Env. Microbiol.* 51(2) : 238-43.
8. Belkin S., Jannasch H.W. 1985. A new extremely thermophilic sulfur-reducing heterotrophic marine bacterium. *Arch. Microbiol.* 141 : 181-6.
9. Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J. 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse de protéines. Ed. par Techniques et Documentation (Lavoisier), 217 p.
10. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 4576-9.
11. Meunier J.R. 1994. Biodiversité et systématique des populations de micro-organismes thermophiles isolés d'écosystèmes hydrothermaux

ST549 β -glucosidase is optimally active at pH 6 and 100°C and is thermostable: its half life is 500 min at pH 6 and 90°C. AL662 thermostable alcohol dehydrogenase which is NADP⁺-dependent is optimally active at pH 8 and 75°C. Esterase from *Pyrococcus abyssi* is highly thermostable since no loss of activity has been observed after a 5 h incubation at 99°C and its activity is maximum between 65 and 75°C and pH 6-8. These properties can be compared to those of others described thermostable enzymes from thermophilic microorganisms.

Further investigations on the enzymes found in this study concerning substrate specificity, enantioselectivity, resistance to chemical or physico-chemical denaturation, resistance to protease attack, ability to catalyse non-conventional reactions... are under progress after purification in order to characterize these enzymes and to study the opportunity of biotechnological applications. ▲

océaniques abyssaux. Thèse de l'Institut national agronomique de Paris Grignon, 316 p.

12. Erauso G., Reysenbach A.L., Godfroy A., Meunier J.R., Crump B., Partensky F., Baross J.A., Marteinsson V., Barbier G., Pace N.R., Prieur D. 1993. *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 160 : 338-49.
13. Kengen S.W.M., Luesink E.J., Stams A.J.M., Zehnder A.J.B. 1993. Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* 213 : 305-12.
14. Pisani F.M., Rella R., Rozzo C., Raia C.A., Nucci R., Gambacorta A., De Rosa M., Rossi M. 1990. Thermostable β -galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 734 : 1-8.
15. Takase M., Horikoshi K. 1988. A thermostable beta-glucosidase isolated from a bacterial species of the genus *Thermus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29 : 55-60.
16. Gabelsberger J., Liebl W., Schleifer K.H. 1993. Cloning and characterization of β -galactosidase and β -glucosidase hydrolysing enzymes of *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiol. Lett.* 109 : 131-8.
17. Rella R., Raia C.A., Pensa M., Pisani F.M., Gambacorta A., De Rosa M., Rossi M. 1987. A novel archaeobacterial NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 167 : 475-9.
18. Lamed R.J., Zeikus J.G. 1981. Novel NADP-linked alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase in thermophilic ethanologenic bacteria. *Biochem. J.* 195(2) : 183-90.
19. Ma K., Robb F.T., Adams M.W.W. 1994. Purification and characterization of NADP-specific alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Appl. Env. Microbiol.* 60(2) : 562-8.
20. Sobek H., Gorisch H. 1988. Purification and characterization of a heat stable esterase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochem. J.* 250 : 453-8.

21. Owusu R.K., Cowan D.A. 1991. Isolation and partial characterization of a novel thermostable carboxylesterase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 158-63.
22. Wang Y., Saha B.C. 1993. Purification and characterization of thermophilic and alkalophilic tributyrin esterase from *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841). *JAOCS* 70(11): 1135-8.
23. Hummel W., Kula M.-R. 1989. Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur. J. Biochem.* 184: 1-13.
24. Vulfson E.N., Patel R., Beecher J.E., Andrews A.T., Law B.A. 1990. Glucosidases in organic solvents. 1-Alkyl- β -glucosides synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 950-4.
25. Sternberg M., Vijayakumar P., Reese E.T. 1977. β -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can. J. Microbiol.* 23: 139-47.
26. Cowan D.A., Daniel R., Morgan H. 1985. Thermophilic proteases: properties and potential applications. *Trends Biotechnol.* 3(3): 68-72.