

EXTRACTION ET PURIFICATION D'UNE AMYLASE THERMOSTABLE A PARTIR D'UN ARCHAEA HYPERTHERMOPHILE

Reçu le 29/03/2004 – Accepté le 05/04/2005

Résumé

La souche HEB prélevée d'une station thermale : Hammam el Bibane (Bordj Bou Arreridj), qui s'est révélée comme souche d'archaea hyperthermophile cultivée dans le but d'extraire et de purifier une amylase thermostable avec les techniques classiques :

- Précipitation au sulfate d'ammonium ;
- Chromatographie sur colonne sur gel de séphadex G-75 ;
- Electrophorèse sur acétate de cellulose.

Le poids moléculaire de l'amylase a été estimé sur colonne chromatographique à 42134 Da, alors que par électrophorèse sur acétate de cellulose, il a été estimé à 41853 Da. L'étude de l'effet du pH sur l'amylase a révélé que cette enzyme a un pH optimum de 6-6.5. L'étude de l'effet de la température sur l'amylase a révélé que l'activité optimale de cette dernière est de 85°C. L'addition de l'EDTA au mélange réactionnel n'a aucun effet sur l'enzyme, ceci permet de conclure que cette dernière n'est pas une métalloprotéine. L'étude de la thermostabilité a montré les temps de demi-vie suivant : 3.66h à 80°C, 3.16h à 85°C et 30 min à 90°C.

Mots clés : *Archaea, hyperthermophile, thermostable, amylase, purification.*

Abstract

The strain HEB tacked from thermal station (Hammam el Bibane, Bordj Bou Arreridj), which is revealed like hyperthermophilic archeon, is cultivated to extract and of purify a thermostable amylase with the traditional techniques:

- Precipitation with the sulfate of ammonia ;
- Séphadex G-75 Chromatographic column ;
- Cellulose acetate Electrophoresis.

The molecular weight of amylase was estimated on chromatographic column at 42134Da, whereas, with cellulose acetate electrophoresis, it was estimated at 41853Da. The study of the effect of pH on amylase revealed that this enzyme has an optimum pH of 6-6.5. The study of the effect of the temperature on amylase revealed that the optimal activity of the latter is 85°C. The addition of the EDTA to the reaction mixture does not have any effect on the enzyme; this makes it possible to conclude that the enzyme is not a metalloprotein. The study of the thermostability showed following times of half-life: 3.66h at 80°C, 3.16h at 85°C and 30 min at 90°C.

Keywords: *Archaea, hyperthermophile, thermostable, amylase, purification.*

EL/H NABTI,
M. KECHA,
N. BOUCHERBA, S.
BENALLAOUA

Laboratoire de
Microbiologie Appliquée
(L.M.A)/ Biochimie
Microbienne.
Faculté des sciences de la
nature et de la vie.
Université de Béjaïa.
Algérie.

ملخص

(HEB)

Séphadex G75

pH

6-5

42134

41853

EDTA

° 85

° 90

30

° 85

190

° 80

220 :

Les hyperthermophiles constituent un groupe d'*Archaea*, en plus de celui des halophiles extrêmes, des thermophiles et des méthanogènes. Les hyperthermophiles sont connus pour leur température de croissance qui dépasse les 80°C. Par conséquent, de tels micro-organismes possèdent nécessairement des molécules et structures cellulaires stables et fonctionnelles à haute température [1]. Les enzymes synthétisées par les *Archaea* hyperthermophiles se sont révélées thermostables et résistantes à certains agents dénaturants, ceci est en relation avec leurs propriétés intrinsèques et extrinsèques (richesse en ponts disulfures, présence de chapéronines...etc.).

De nombreuses amylases ont été caractérisées comme celle de *Pyrococcus woesei* [13] et l' α -amylase de *Thermococcus profundus*DT5432[19].

Une souche locale d'*Archaea* hyperthermophile, isolée au niveau d'une station thermale de l'Est d'Algérie, est exploitée dans le but d'extraire une amylase thermostable.

MATERIELS ET METHODES

La souche bactérienne et milieu de culture

La souche HEB, souche *d'Archaea* hyperthermophile prélevée à partir d'une station thermale appelée "Hammam el Bibane" de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, a été ensemencée dans 4 litres de milieu d'enrichissement 2216S liquide (riche en soufre) répartis en 16 flacons à raison de 250 ml chacun. L'anaérobiose est assurée par barbotage à l'azote. Le milieu est thymdalisé pendant 40 minutes 3 fois successives à intervalle de 12 heures. L'ensemencement se fait à raison de 10% (v/v) d'inoculum (2.10^3 germes/ml). Les flacons sont incubés pendant 12 heures à 80°C [19].

Extraction de l'enzyme

Le milieu de culture obtenu a subi une filtration préliminaire sur papier Wathman n°1 pour éliminer le soufre, le filtrat obtenu est centrifugé à 8000g/30mn (centrifugeuse Laboratory centrifuges Sigma 6K 15) pour se débarrasser totalement du soufre résiduel, le surnageant est centrifugé à 12000g/45mn (centrifugeuse Laboratory centrifuges Sigma 6K 15). Le surnageant ainsi récupéré est concentré, au rotavapor à 45°C (Buchi waterbath B-480) jusqu'à 100ml, suivi d'une précipitation au sulfate d'ammonium.

La Conservation est effectuée à 4°C pendant une nuit, suivie d'une centrifugation à 12000g/30mn, pour récupérer le précipité, ce dernier est resuspendu dans du tampon phosphate (pH6.8), l'échantillon est dialysé contre le même tampon pendant une nuit à 4°C. Enfin, on obtient un produit solubilisé [19].

Test d'activité du dialysat

Avant de passer à la purification, on a jugé utile de tester l'activité du produit solubilisé (dialysat). Afin d'éviter les interactions probables avec les échantillons enzymatiques, le sulfure d'hydrogène (H_2S) est éliminé dans tous les échantillons en réalisant un barbotage à l'azote [8]. L'activité enzymatique est déterminée, par mesure de la quantité de glucose libéré après hydrolyse de l'amidon, par dosage à l'antrone [9] après avoir tracé une courbe d'étalonnage. 10 μ l de dialysât, contenus dans un tube à essai, sont mélangés avec 0.99ml d'une solution d'amidon à 1.5% dans 0.1M du tampon phosphate (pH6), le mélange est incubé à 70°C pendant 30min dans un bain Marie (Gesellschaft für Labortechnik mbH D3006 Burgwedel). La réaction enzymatique est arrêtée par immersion du mélange dans de la glace. Le dosage du glucose libéré se fait par lecture d'absorbance à 625nm (spectrophotomètre Specord 50). Une unité d'activité amylolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 μ M de glucose par minute [8].

Purification de l'extrait enzymatique

Le dialysat a fait l'objet d'une chromatographie d'exclusion sur colonne de gel de séphadex G-75 (colonne Pharmacia, 25cm x 1.5cm), après avoir déterminé le volume mort par injection de 1ml de bleu de dextran (2.10⁶ Da). Cent fractions ont été collectées, avec un débit de 0.5ml/1min, pour subir une lecture d'absorbance à 280nm (spectrophotomètre Specord 50).

Test de confirmation de l'activité de l'extrait enzymatique

Afin de confirmer la présence d'une activité dans les 100 fractions éluées, ces dernières sont regroupées, en 10 pools, en raison de leur nombre élevé. Le test réalisé est celui cité précédemment [8].

Détermination de la masse moléculaire de l'enzyme

Quatre marqueurs sont utilisés, à savoir la BSA (sérum bovine albumine), l'ovalbumine, la pepsine et la trypsine ayant les poids moléculaires respectifs de : 68000, 45000, 34700 et 23300Da. Des suspensions de chacun de ces substrats sont préparées à raison de 1mg/ml et mélangées, 1ml du mélange est prélevé et introduit dans la colonne chromatographique de gel de séphadex G-75 (colonne Pharmacia, 25cm x 1.5cm) [10]. Il faut signaler que la procédure est réalisée à 4°C afin d'éviter les interactions entre les protéines et les enzymes. Après la récupération du volume mort, une centaine de fractions est collectée et destinée à une analyse spectrophotométrique à 280nm. (Spectrophotomètre Specord 50).

Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines après purification sur gel de séphadex est effectué selon la méthode de Bradford [3]. Le dosage a porté sur le lot 05 qui présente une activité amylolytique assez élevée.

Electrophorèse acétate de cellulose

Le gel utilisé est l'acétate de cellulose comme support, il est sous forme de bandelettes qui sont trempées dans le tampon d'électrophorèse (tris-véronal) pendant 10 à 20 min. (les deux compartiments de la cuve (PIERRON), sont remplis avec un même volume de tampon d'électrophorèse. 10 μ l de l'extrait enzymatique et 10 μ l de la solution des marqueurs (BSA, ovalbumine et pepsine) sont déposés sur la bandelette, déjà en place sur son support, au tiers de l'extrémité, côté cathode la migration s'effectue durant 1 heure à 450 V. La bandelette est récupérée et placée dans la solution de rouge Ponceau 10 minutes, puis mise dans un bain d'acide acétique à 5% sous agitation. [7].

Effet du pH et de La température sur l'activité enzymatique

Pour la détermination de la température optimale de l'extrait enzymatique, des flacons, contenant un mélange de 10 μ l d'extrait enzymatique avec 0.99ml d'une solution d'amidon à 1.5% dans 0.1M du tampon phosphate à pH6, sont préparés et incubés pendant 30 min à des températures de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 et 100°C. L'activité est mesurée par dosage du glucose libéré à l'antrone [8]. Pour la détermination du pH optimum, le même protocole réalisé précédemment est suivi, mais cette fois-ci on fixe la température à 70°C et on fait varier le pH du tampon phosphate de 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 à 9 pendant 30min [8].

Effet de l'EDTA sur l'activité enzymatique

L'effet de l'EDTA (éthylène-diaminetétraacétate) sur l'extrait enzymatique est déterminé en ajoutant, au mélange réactionnel, contenant l'extrait enzymatique et la solution d'amidon, 0.1ml de la solution de l'EDTA ayant une concentration allant de 1 à 5mM et on incube à 70°C pendant 30min [12].

Détermination de la thermostabilité

La thermostabilité de l'extrait enzymatique est déterminée en incubant le mélange habituel à des températures allant de 70, 75, 80, 85, 90 à 100°C dans un intervalle du temps variant de 0 à 240 min [19].

RESULTATS ET DISCUSSION

Extraction et purification de l'enzyme

Le milieu 2216S réparti dans des flacons à raison de 250ml par flacon a montré, après 12 heures d'incubation à 80°C, une culture positive caractérisée par l'apparition de l'aspect en chewing-gum suite à l'utilisation d'une partie du soufre. Les étapes d'extraction décrites précédemment nous ont permis d'obtenir un produit solubilisé, de couleur initiale jaunâtre. Après la dialyse l'échantillon est devenu presque transparent.

Test d'activité du dialysât

Le surnageant, concentré, de culture ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium présente des pourcentages de saturation allant de 50 à 80%. Le test d'activité effectué sur les précipités obtenus après centrifugation à 12000g/ 30 mn et resuspendus dans du tampon phosphate, révèle une activité significative à 80%. Le protocole réalisé par Young et al. 1995, pour l'extraction et la purification d'une amylase extracellulaire à partir d'un archaea hyperthermophile *Thermococcus profundus* DT5432, a montré que cet extrait enzymatique précipite à 80% de saturation en sulfate d'ammonium. La présence d'une activité amylolytique dans le dialysât nous permet la présomption de la présence d'au moins une amylase extracellulaire. D'autant plus, les études portant sur les amylases ont permis d'extraire et de purifier qu'un nombre très faible d'amylases extracellulaires chez les archaea hyperthermophiles, dont l'amylase de *Pyrococcus woesei* [13] et l'amylase de *Thermococcus profundus* DT5432 [19].

Chromatographie sur gel de filtration (CGF)

Le profil d'éluion du produit solubilisé montre que l'enzyme commence à éluer entre les fractions 8 et 57 (figure 01). Les fractions obtenues ont été regroupées en 10 lots (pools), puis ont subi des tests d'activité. Ces derniers ont montré une activité maximale pour le lot 5 constitué de la seule fraction n°37 (figure 02). L'activité enzymatique est 3 fois plus importante par rapport à celle obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium, ce qui démontre l'augmentation de la pureté de l'extrait enzymatique. La présence d'autres activités mineures peut être due éventuellement à la présence d'amylases à moindre activité. L'étalonnage de la colonne chromatographique par les

protéines standards : (Sérum albumine bovin, ovalbumine, pepsine et trypsine) et lecture des absorbances à 280nm ont permis d'estimer le poids moléculaire de l'extrait enzymatique à 42134Da. Le poids moléculaire obtenu est similaire à celui de l'amylase extracellulaire produite par *Thermococcus profundus* DT5432 (soit de 42 kDa) [19], mais nettement inférieur à celui de l'amylase de *Pyrococcus woesei* (72kDa) [13].

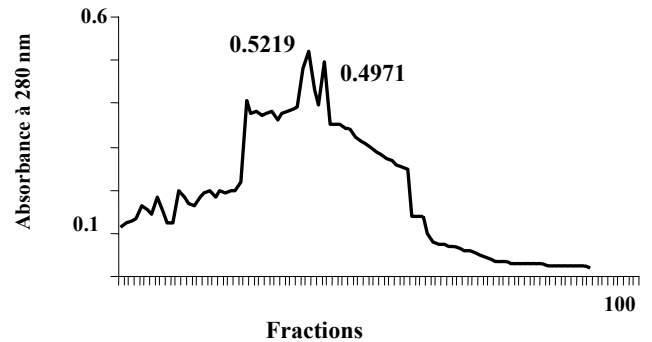


Figure 1 : Profil d'absorption des éluats collectés après chromatographie sur gel de séphadex G-75.

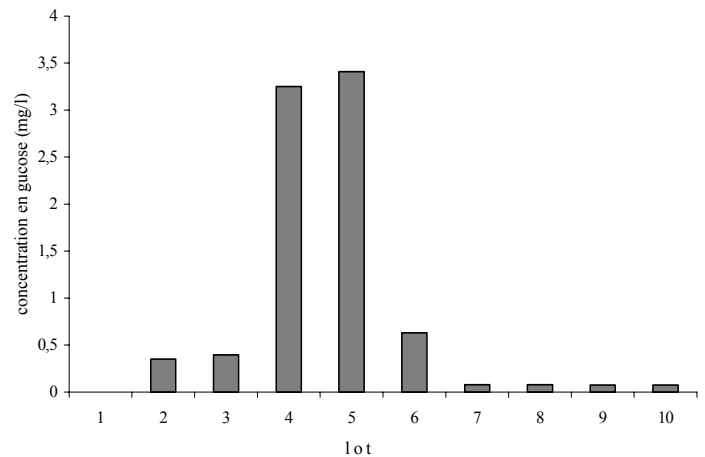


Figure 2 : Activité des fractions enzymatiques exprimée en mg/ldu glucose libéré

Dosage des protéines

La méthode Bradford a permis d'estimer la concentration des protéines obtenue qui est de 109.12µg/ml. A partir de 4 litres du milieu 2216S, on a obtenu une quantité de protéine qui est de 109.169mg, ceci correspond à 27.3mg/l. Cette quantité est appréciable en comparaison aux résultats obtenus avec l'amylase de *Pyrococcus furiosus* (28mg/l) [5].

Electrophorèse sur acétate de cellulose

L'extrait enzymatique ayant subi une l'électrophorèse sur acétate de cellulose. Après migration, coloration et décoloration, le profil électrophorétique a révélé une seule bande (figure 03). L'extrapolation sur la courbe d'étalonnage de logarithme de poids moléculaire des protéines standards en fonction de leur mobilité relative (d/D où d : distance

parcourue et D : longueur de la bandelette) a permis d'estimer le poids moléculaire de l'extrait enzymatique à 41853 Da.

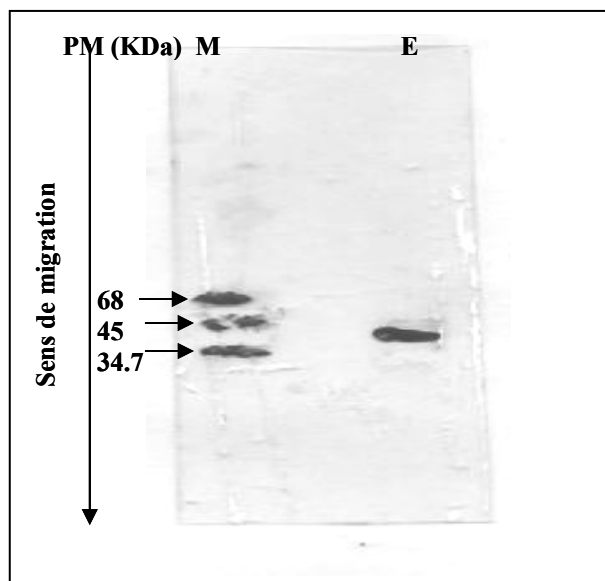


Figure 3 : Electrophorèse sur acétate de cellulose (en conditions natives) de la fraction active obtenue après chromatographie sur gel de filtration. M : Marqueurs (BSA, Ovalbumine et Pepsine). E: Echantillon.

Effet de la température

Après incubation des mélanges réactionnels à des températures variant de 55 à 100°C, les tests d'activité ont montré que la température optimale est de 85°C, ce qui coïncide avec la température optimale de croissance de la souche HEB, et au dessous de 65°C l'activité est nulle et on remarque une diminution brusque à 90°C (**figure 04**).

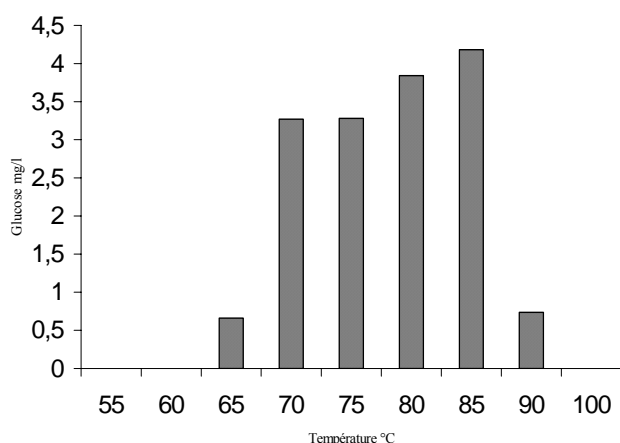


Figure 4 : Action de la température sur l'activité amylolytique.

L'extrait enzymatique présente une gamme d'activité allant de 65 à 90°C, cette gamme est presque la même pour l'amylase de *Thermococcus profundus* DT5432 (50-100°C) mais avec une température optimale inférieure à celle de l'amylase étudiée (80°C) [7]. Les études menées sur l'effet de la température sur les amylases des archaées hyperthermophiles montrent que l'amylase étudiée présente

une gamme de température d'activité assez limitée, ainsi : la cyclomaltoextrine glucanotransférase de *Thermococcus sp.* (40-110°C) atteint une température optimale de 100°C, la pullulanase de *Pyrococcus woesei* (40-130°C), une température optimale de 100°C et l' α -amylase de *Pyrococcus furiosus* (40-100°C) avec une température optimale de 90°C [18, 11, 16].

Effet du pH

La variation du pH de 5 à 9 révèle que l'extrait enzymatique est actif aux pH de 6 à 7. Il atteint son activité maximale à pH6.5, et à partir de cette valeur l'activité diminue brutalement pour s'annuler à pH7.5. Ce qui traduit une activité légèrement acide pour l'extrait enzymatique comparativement au pH du site qui est légèrement alcalin et à celui du milieu utilisé qui est presque neutre, (**figure 05**).

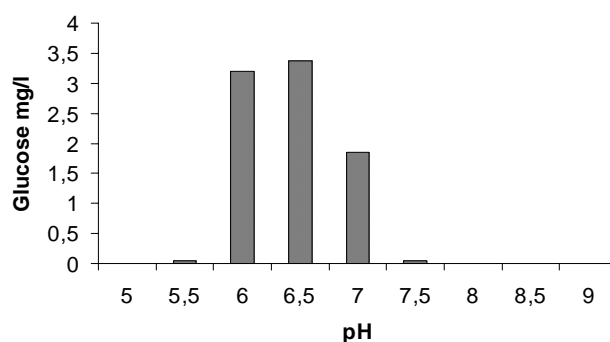


Figure5 : Action du pH sur l'activité amylolytique.

Les études menées sur l'effet du pH sur l' α -amylase de *Sulfolobus solfataricus*, ont montré que cette dernière se caractérise par un pH fortement acide (pH3). La pullulanase de *Pyrococcus woesei* et la cyclomaltoextrine glucanotransférase de *Thermococcus sp.* présentent également un pH optimum respectif légèrement acide 6 et 5 à 5.5 [6, 16, 18].

Effet de L'EDTA

L'addition de l'EDTA à des concentrations de 1 à 5mM au mélange réactionnel n'a aucun effet sur l'enzyme, car les valeurs obtenues sont pratiquement semblables à celles obtenues lors d'une incubation à 70°C en conditions normales. Ceci pourrait permettre de conclure que l'extrait enzymatique n'est pas une métalloprotéine (**Tableau I**).

Détermination de la thermostabilité de l'enzyme

L'extrait enzymatique garde une activité stable à 70°C. Il est caractérisée par des temps de demi-vie de 220min, 190min et 30min respectivement à 80, 85 et 90°C (**fig.6**). L'amylase de *Thermococcus profundus* DT5432 présente un temps de demi-vie relativement court (3h à 80°C et 15min à 90°C) [73], alors que l'amylase de *Thermococcus celer* se caractérise par une demi-vie très long (>6h à 95°C et 3h à 105°C) et l'amylase de *Pyrococcus woesei* est la plus thermostable car elle a un temps de demi-vie de 6h à 100°C, 4h à 110°C, 1.8h à 120°C et 10min à 130°C [2].

L'extrait enzymatique est actif dans un intervalle de température allant de 65°C à 90°C (la température optimale étant de 85°C) et un pH variant de 6 à 7 (le pH optimum est de 6- 6.5). Le pH d'activité de l'extrait enzymatique est comparable à celui des enzymes hydrolysant le pullulane, produites par *Thermococcus litoralis*, *Pyrococcus furiosus*, les souches de *Bacillus* et quelques espèces de *Clostridium* [15, 4, 14]. Notre substance enzymatique et l'amylase de *Thermococcus profundus* DT5432 possèdent une température optimale d'activité relativement faible allant de 80 à 85°C, alors que l' α -amylase de *Pyrococcus woesei* possède une température d'activité optimale très élevée (100°C) [13]. Toutefois, l'extrait enzymatique que nous avons obtenu est thermostable et actif à des températures qui sont dénaturantes pour les enzymes des mésophiles. Cependant, l'amylase actuellement utilisée en industrie amidonnière est celle produite par *Bacillus licheniformis*, elle possède une température optimale de 90°C, mais un temps de demi-vie inférieur à une heure à 90°C. Nous donnons à titre de comparaison les propriétés de quelques enzymes thermostables dans le **tableau II**.

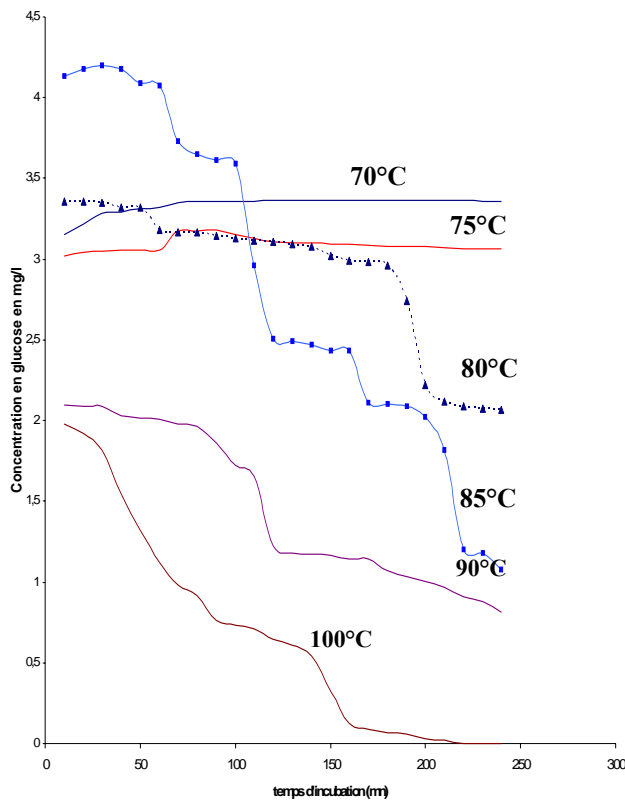


Figure 6 : Courbes de la thermostabilité de l'enzyme.

CONCLUSION

Le travail réalisé sur la souche HEB en vue de l'extraction d'une amylase thermostable a montré que cette dernière est productrice d'amylases en particulier des amylases exocellulaires.

Tableau I : Résultats de l'effet de l'EDTA sur l'amylase.

centration de l'EDTA (mM)	Concentration de glucose libéré (mg/l)
0	3.2
1	3.12
2	3.18
3	3.06
4	3.09
5	3.2

Tableau II : Les amylases des archaea hyperthermophiles [2].

Genre	Espèce	Masse molaire	T° Optimale (pH Optimum)	Thermo-stabilité
Amylase <i>Thermococcus</i>	<i>Profundus DT5432</i>	42kDa	80°C (5.5-6)	3h à 80°C 15min à 90°C
α -amylase <i>Thermococcus</i>	<i>celer</i>	41kDa	90°C (5.5-6)	>6h à 95°C 3h à 105°C
Amylase <i>Pyrococcus</i>	<i>woesei</i>	68kDa	100°C (5.5)	6h à 100°C 4h à 110°C 1.8h à 120°C 10 min à 130°C
Pullulanase <i>Thermococcus</i>	<i>litoralis</i>	119kDa	105°C (5.5)	-
Amylase Souche HEB	-	42.134 kDa * 41.853 kDa**	85°C (6-6.5)	3.66h à 80°C 3.16h à 85°C 30min à 90°C

L'essai d'extraction et de purification d'une amylase thermostable a fait l'objet de différentes techniques à savoir la précipitation au sulfate d'ammonium qui a montré que l'extrait enzymatique précipite à 80% de saturation en sulfate d'ammonium, la chromatographie sur gel de Séphadex G-75 ayant montré que la substance s'élue lentement dans 49 fractions, le poids moléculaire de l'amylase a été estimé à environ 42134Da sur colonne chromatographique, par électrophorèse sur acétate de cellulose, il est à 41853Da. L'électrophorèse sur acétate de cellulose a montré que l'extrait enzymatique migre en une seule bande. Toutefois les conditions d'utilisation de l'électrophorèse n'étant pas dénaturantes, la bande peut représenter une ou plusieurs sous unités. La caractérisation de l'extrait enzymatique montre

qu'il s'agit d'une amylase thermostable avec des temps de demi-vie respectifs 3.66h à 80°C, 3.16h à 85°C et 30min à 90°C. Cette amylase est active dans une gamme de température et de pH relativement restreinte. L'EDTA (éthylène-diaminotétracétate) n'a aucun effet sur l'activité enzymatique. Cette amylase est thermostable, son application biotechnologique peut être prometteuse.

REFERENCES

- [1] **Barbier G.** "Micro-organismes thermophiles" Bull. Soc. Fr. microbiol., Vol. 9 (1995), pp. 13-18.
- [2] **Barbier G.** "Les enzymes des micro-organismes "extrémophiles" : une nouvelle source en cours d'exploitation" : In : Les enzymes en agroalimentaire, éd.: tec et Doc, Paris (1997), pp. 324.
- [3] **Bradford M.** "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding" Anal. Biochem., vol. 72 (1976), 248-254.
- [4] **Castro G.R., Santopietro D. and Sinerij F.** "Acid pullulanase from *Bacillus polymyxa* MIR-23" Appl. Biochem. Biotechnol., vol. 37 (1992), pp. 227-233.
- [5] **Cuoquiang D., Veille C., Sarchenko A. and Gregory J.** "Cloning, sequencing and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme" Appl. Environ. Microbiol., vol. 63 (1997), 3569-3576.
- [6] **Cynthia H., Michael R. and Paul B.** "The glucose effect and regulation of α -amylase synthesis in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*" Journal of bacteriology., vol. 178 (1996), 945-950.
- [7] **Dawson R.M.C., Elliot D.C., Elliot W.H. and Jones K.M.** "Colorants et références techniques sur l'électrophorèse de protéines et d'acides nucléiques" Data for biochemical research, Clarendon Press, éd. Oxford (1986), pp. 442-451.
- [8] **Estelle L., Christine L., Anne G., George B. and Francis D.** "Thermstable amylolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents" Accademie des sciences / Elsevier, Paris Animal biology / biologie animale, vol. 320 (1997), pp. 893-898.
- [9] **Hanson R.S. and Philips J.A.** "Chemical composition in : Manual of methodes for general bacteriology" Gerhard P. éd. american society for microbiology Waschington DC. (1984), pp. 264-328.
- [10] **Kamoun P.** "Méthodes chromatographiques, méthodes électrophorétiques et électrochimiques" Appareil et méthodes en biochimie, ed.: médecine-science, Flammarion, (1987), pp. 176-217.
- [11] **Kenneth A., Laderman S., Bardley R., Davis S., Henry C.K., Marc S.L., Grikos Y.V., Peter L., Privalov S. and Christian B.A.** "The purification and characterization of an extremely thermostable α -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*" The journal of biological chemistry, vol. 268 (1993), pp. 24394-24401.
- [12] **Klingeberg M., Hashawa F. and Antranikian G.** "Properties of extremely thermostable proteases from anaerobic hyperthermophilic bacteria" Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 34 (1991), pp. 715-719.
- [13] **Koch R., Lenke K and Antranikian G.** "Purification and properties of a hyperthermoactive α -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*" Arch. Microbiol., vol. 115 (1991), pp. 572-578.
- [14] **Kuriki T., Okadas S. and Imanaka T.** "Purification and characterization of thermostable pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*" Appl. Environ. Microbiol., vol. 54 (1988), pp. 2881-2883.
- [15] **Nakamura N., Sashihara N., Nagayama H. and Horikoshi K.** "Characterization of pullulanase and α -amylase activities of a thermus sp." Starch staerke, vol 41 (1989), pp. 112-117.
- [16] **Rüdiger A., Jorgensen P.L. and Antranikian G.** "Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*" Appl. Environ. Microbiol., vol. 61 (1995), pp. 567-575.
- [17] **Woese C.R., Kandler O. and Wheelis M.** Towards a natural system of organims. Proposal for domains Archaea, Bacteria and Eucarya : Proc. Nalt. Acad. Sci. USA, vol. 87 (1990), pp. 4576-4579.
- [18] **Yoshihisa T., Akiko K., Naoki S., Yuji S., Tomoko Y., Shinsuke F., Masahiro T. and Tadayuki I.** "Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomaltodextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp." Appl. Environ. Microbiol., vol. 65 (1999), pp. 1991-1997.
- [19] **Young C.C., Testsuo K., Haruhiko K., Teruhiko A. and Toshiaki K.** "Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *thermococcus profundus* DT5432" : Appl. Environ. Microbiol., vol. 61 (1995), pp. 1502-1506.