



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE AMILASAS PROVENIENTE DE BACTERIAS TERMÓFILAS DEL CENTRO TERMAL LAS TRINCHERAS. VENEZUELA.

Adarelys Andrade, Lellys M. Contreras

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. *valbuenavilchez@gmail.com

Resumen

Geobacillus stearothermophilus, una cepa bacteriana termófila moderada fue aislada de las aguas del manantial geotérmico de Las Trincheras. Su crecimiento en medios de cultivo suplementados con almidón 1% p/v indicó la posible producción de amilasas. El crecimiento bacteriano y la actividad amilolítica máximos ocurrieron a las 40h de cultivo en un medio líquido suplementado con almidón 1% p/v, a 55°C y en aerobiosis. Luego de la preparación de un sobrenadante libre de células y de su precipitación con acetona 50% fría, el precipitado obtenido mostró actividad amilolítica, alcanzando valores de actividad enzimática máximos a 60°C y pH 6,0 en el medio líquido. Los perfiles zimográficos detectaron 3 polipéptidos asociados a la actividad amilolítica con pesos moleculares aparentes de 60-66 kDa y 1 con 22 kDa.

Palabras claves: *G. stearothermophilus*, amilasas, termófilos, aguas termales.

Isolation and characterization of amylases from thermophilic bacteria at Centro Termal Las Trincheras, Venezuela

Abstract

Geobacillus stearothermophilus, a moderate thermophilic bacterial strain was isolated from waters of a geothermal stream localized at Las Trincheras. Its growth in 1% p/v starch supplemented media suggested the possible production of amylases. The bacterial growth and the amylolytic activity achieved maximum values at 40h incubation, 55°C, and aerobiosis in a liquid medium supplemented with 1% p/v starch. After the preparation of a bacterial cell free supernatant and cold 50% v/v acetone precipitation, the precipitate showed amylolytic activity, which exhibited maximum activity at 60°C and pH 6.0. The zymography patterns indicated 3 polypeptides associated to the enzymatic activity, whose apparent molecular weights were 60-66 kDa and 1 of 22kDa.

Key words: *G. stearothermophilus*, amylases, thermophiles, hot springs.

1 Introducción

Las amilasas (E.C.3.2.1.1), endoglucanasas, hidrolizan almidón, glucógeno y polisacáridos relacionados mediante la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1,4 internos (Shaw *et al.*, 1995; Coronado *et al.*,2000; Mielenz, 1983), encontrándose presentes en una amplia variedad de bacterias, hongos, plantas y animales. Su principal función es la de suministrar maltosa y oligosacáridos, generados por su acción catalítica sobre sus sustratos, para satisfacer las necesidades metabólicas del organismo. La degradación enzimática de almidón a nivel industrial por amilasas ha reemplazado sustancialmente los procesos tradicionales de hidrólisis por catálisis ácida (Pandey *et al.*,2000; Underkofler *et al.*,1965). Actualmente las amilasas son utilizadas en una amplia variedad de actividades industriales: en procesos de licuefacción, para la fabricación de maltosa y almibares ricos en fructosa y maltotetrosas, en la fabricación de pan, en procesos fermentativos para la producción de bioetanol, en la eliminación de granos de almidón en textiles, en el tratamiento de aguas residuales conteniendo almidón, en la fabricación de detergentes y como aditivos digestivos en productos para consumo humano y animales (Aiyer, 2005; Inram-Bhokari *et al.*,2016; Gohol *et al.*, 2013; del Moral *et al.*,2015; Lukong, 2014-2015). El uso de enzimas termófilas para procesos industriales biotecnológicos las hace particularmente atractivas debido a que mantienen su actividad catalítica a temperaturas relativamente altas, necesarias usualmente para la producción industrial, lo cual no es una propiedad de las enzimas

homólogas mesófilas (Niehaus *et al.*,1999; Malhotra *et al.*, 2000). Se ha reportado la producción de amilasas por varios géneros bacterianos termófilos, tal vez el más conocido es *Bacillus*, y las especies *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. caldolyticus*, *B. brevis*, *B. acidocaldarius* y *B. thermoamyloliquefaciens* (Ohdan *et al.*, 1999; Campbell, 1995; Malhotra *et al.*, 2000; Egelseer *et al.*,1995; Mielenz,1983). Srisvastava & Baruah,1986, reportan una actividad amilolítica expresada por *B. stearothermophilus* con actividad máxima a 82°C y pH 6,9. Brown *et al.*, 1990, caracterizan una amilasa aislada de la archaeobacteria *Pyrococcus furiosus* con actividad máxima a 100°C. Shaw *et al.*, 1995, reportan una amilasa a 70°C y pH 5,5-6,5 aislada de *Thermus sp.* Igarashi *et al.*,1998, reportan una amilasa aislada de *B. alcalófilo* trabajando a 55°C y pH 8,0-8,5. Malhotra *et al.*,2000, aíslan una amilasa de *B. thermooleovorans* NP54 con actividad máxima a 100°C y pH 8,0. Najafi *et al.*, 2005 reportan una amilasa de *B. subtilis* trabajando a 55°C y pH 6,0. Dadas estas consideraciones y considerando que en Venezuela, en la población de Las Trincheras, estado Carabobo, existe un manantial geotermal, considerado uno de los más calientes del planeta (Ojeda, 1995), es factible e importante estudiar las actividades enzimáticas termófilas provenientes de la microbiota presente en este microambiente. En este manuscrito se describe una metodología para aislar y caracterizar bacterias termófilas productoras de amilasas.

2 Materiales y Métodos

1-Aislamiento y selección de la cepa bacteriana.

Muestras de agua termal (55°C y 87°C) se colectaron en termos previamente esterilizados y fueron trasladadas al laboratorio para su posterior procesamiento. La población bacteriana total se obtuvo al filtrar 500 mL de agua termal a través de una membrana (0,45µm tamaño de poro), previamente esterilizada, la cual fue transferida a 50 mL de caldo nutritivo (HIMEDIA) e incubadas en un baño de agua termostataado a 55°C, con agitación (70 rpm) y en aerobiosis; el crecimiento bacteriano se evidenció por desarrollo de turbidez en los cultivos. Alícuotas de 1 mL de estos cultivos, sembrados en placas de agar-almidón (AA-Alm), se incubaron por 24h en las condiciones antes descritas. La actividad amilolítica se determinó cualitativamente mediante tinción con lugol, la aparición de zonas transparentes sobre un fondo azul oscuro evidenció la actividad enzimática. El cultivo que presentó la mayor actividad fue el preparado con agua a 55°C, consecuentemente una colonia de tal cultivo fue elegida y denominada Sist1A para efectuar los experimentos descritos a continuación.

2-Optimización de medio de cultivo para la producción de amilasa.

La cepa Sist1A fue crecida inicialmente en caldo nutritivo (HIMEDIA) o en un medio mineral salino, ambos líquidos y suplementados con almidón 1%p/v (Sigma). Posteriormente y por consideraciones que se explicarán en la

sección de resultados, la cepa fue transferida a fiolas de 500 mL conteniendo 150 mL de un medio líquido suplementado con almidón 1% (medio MA) conteniendo: CuSO₄ 0,00001% p/v, FeSO₄ 0,0001% p/v, MgSO₄.7H₂O 0,00002% p/v, ZnSO₄ 0,00005% p/v, NaCl 0,00005% p/v, NH₄SO₄ 0,0001% p/v, CaCl₂.2H₂O 0,00005% p/v, extracto de levadura 0,3% p/v (Difco Laboratories), triptona 0,3% p/v (Sigma) en tampón fosfato 0,2M, pH7,0. Las incubaciones se realizaron a 55°C con agitación constante (70 rpm), aerobiosis. El crecimiento bacteriano se siguió por absorción a 540 nm en función del tiempo de cultivo.

3- Caracterización morfológica e identificación taxonómica de la cepa.

La morfología de las colonias se efectuó visualmente mediante una lupa Konus, por la tinción de Gram (Beveridge & Graham, 1991) y la identificación molecular se realizó por amplificación (PCR) y secuenciación parcial del gen ARN 16S (Colección española de cultivos tipo).

4-Preparación del extracto libre de células y precipitación de la actividad amilolítica.

Después de 37h de incubación a las condiciones indicadas en el aparte 2, cultivos idénticos se centrifugaron a 10000 rpm, a 4°C por 15 min en una centrifuga refrigerada (ALC PK121R), obteniéndose 1L de sobrenadante libre de bacterias (muestra SN), el cual fue concentrado por calentamiento a 55°C hasta un volumen final de 100 mL (muestra SNc). Al extracto concentrado se adicionó acetona fría hasta obtener una concentración de 50% v/v. La operación se efectuó a 4°C, obteniéndose

un precipitado el cual se obtuvo por centrifugación a 10000 rpm por 10 min y se resuspendió en 40 mL de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 (muestra P1). Paralelamente, el sobrenadante acetónico obtenido (muestra SNa) se secó a 55°C y el residuo se disolvió en 10 mL de agua desionizada.

5-Determinación de la actividad amilolítica.

La actividad de amilasa se determinó cuantitativamente por el método colorimétrico del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNSA), (Miller, 1995). Las lecturas se efectuaron en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 10uv) a 540 nm y la cantidad de maltosa generada se calculó en base a una curva de calibración de maltosa (0,1 a 0,8 mg), de acuerdo a la ecuación generada por regresión lineal ($y = 1,0059x$; $R^2 = 0,9871$). Se analizaron alícuotas de 10 μ L de cada muestra incubándose por 1h a 55°C y pH 7,0. En las experiencias del efecto de la temperatura, la actividad se determinó a las temperaturas respectivas y pH 6,0. La unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para producir un μ mol de maltosa por minuto bajo las condiciones del ensayo.

6-Crecimiento de la cepa Sist1A y expresión de la actividad amilolítica en medio MA.

Alícuotas de cultivos bacterianos crecidos en medio MA e incubados a 55°C durante 96h y retiradas a diferentes tiempos, suministraron las herramientas para determinar su crecimiento y la actividad amilolítica en dicho medio. La

absorbancia a 540 nm suministró el curso de crecimiento del cultivo y la determinación de azúcares reductores indicó la secreción de amilasa al medio de cultivo.

7-Efecto de pH y temperatura sobre la actividad amilolítica.

La actividad enzimática se determinó en el intervalo de pH comprendido entre 4,0 y 9,0, a 55°C, en muestras provenientes de incubaciones con 37h de crecimiento, utilizando en los medios de ensayo los siguientes tampones: acetato de sodio 50 mM para los pHs 4, 5 y 6; tris-HCl 50 mM para los pHs 7, 8 y 9 y glicinato de sodio 50 mM para pH 10.

El efecto de la temperatura se determinó al incubar previamente la muestra enzimática durante 1h a las diferentes temperaturas (4, 25, 40, 50, 55, 60, 70 y 80°C) a pH 6,0.

Para ambos ensayos se utilizó el sobrenadante libre de células sin ningún tratamiento (SN), luego de las incubaciones indicadas, alícuotas de los medios de reacción se sometieron a análisis de azúcares reductores (aparte 5).

8-Determinación de perfiles polipeptídicos y actividad amilolítica de las muestras.

Alícuotas apropiadas de las muestras SN, SNC, P1 y SNa se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 10% no desnaturizante, aplicando un potencial constante de 100-150 V durante 90 min (Laemmli, 1970). Los geles fueron teñidos con plata (Deutscher, 1990) y las masas moleculares de los polipéptidos separados se calcularon mediante una mezcla patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos (β galactosidasa

116,25 kDa; fosforilasa 97,4 kDa; suero albúmina 66,2 kDa; ovoalbúmina 45,0 kDa; anhidrasa carbónica 31,0 kDa; inhibidor de tripsina 21,5 kDa; lisozima 14,4 kDa y aprotina 6,5kDa). Adicionalmente, la actividad amilolítica de los polipéptidos separados se determinó mediante zimografía en geles de poliacrilamida 10% copolimerizados con almidón 0,1% p/v, en condiciones no desnaturalizantes. Después de la corrida electroforética el gel fue lavado con tritón X-100 1% durante 10 min, luego se practicaron 5-6 lavados con agua destilada y se incubó por 3h en una solución de tris-HCl 50mM/CaCl₂ 1mM, pH 7,0. Finalmente, el gel se tiñó con lugol, la aparición de zonas blancas sobre un fondo azul oscuro indicó actividad amilolítica.

3 Resultados y discusión.

Morfología bacteriana, actividad amilolítica e identificación taxonómica.

Los cultivos iniciales con bacterias aisladas de aguas a 55 y 87°C (sistemas 1

y 2 respectivamente) mostraron crecimiento bacteriano y actividad amilolítica evidente, pero el cultivo a 55°C superó considerablemente la actividad mostrada en el cultivo a 87°C, consecuentemente se decidió aislar colonias bacterianas del cultivo 1. Esta cepa denominada Sist1A, cultivada en placas AA-Alm, presentó colonias redondeadas, color amarillo pálido, poco brillo, bordes lisos y elevación moderada; la tinción de Gram la identificó como un bacilo Gram+ (figura1).

La secuenciación de un fragmento del gen ARN 16S la asignó, con una semejanza de 99,7%, a la especie *Bacillus stearothermophilus*. La presencia de bacterias con actividad de amilasas en las aguas termales de Las Trincheras fue demostrada por Armado, 1997, al identificar 26 morfotipos bacterianos capaces de degradar almidón.

Crecimiento bacteriano asociado a la actividad amilolítica en medio líquido AM.

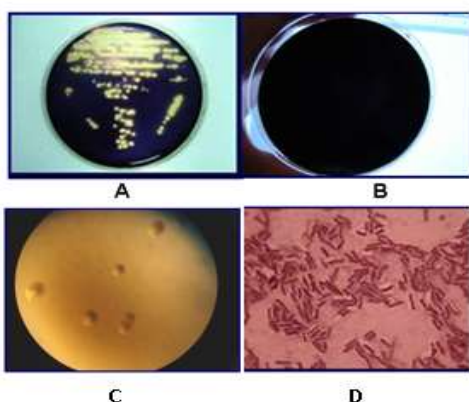


Fig.1. Morfología de la cepa SistA1. A: Placa con inóculo y actividad amilolítica en medio con almidón 1%. Lugol. B: placa sin inóculo bacteriano y con almidón. Lugol. C: Colonias de SistA1. D: Tinción de Gram.

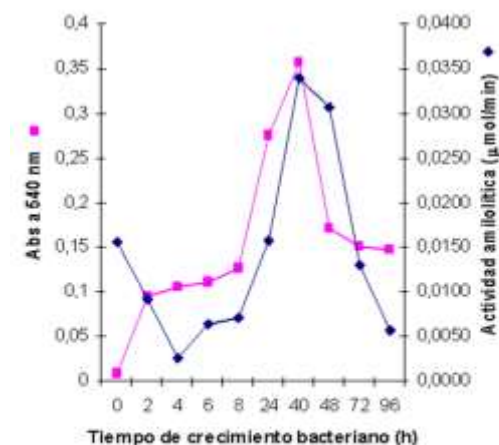


Fig.2. Crecimiento bacteriano y actividad amilolítica de la cepa Sist1A a 55°C en función del tiempo de cultivo

En la figura 2 se muestra el crecimiento de la cepa Sist1A y la actividad amilolítica en función del tiempo de incubación en medio MA. El crecimiento, determinado por absorción a 540 nm, se inició a las 2h de cultivo incrementando considerablemente desde las 24h hasta las 40h, alcanzando valores máximos de 0,35 unidades de absorbancia (Uabs), a las 48h comenzó un ligero descenso que a las 72 y 96h se ubicó en 0,11 y 0,05 Uabs, lo cual indicó la fase de muerte del cultivo.

La actividad enzimática, mínima a las 3h, incrementó paralelamente al crecimiento bacteriano alcanzando valores máximos de 0,035 y 0,030 $\mu\text{mol}/\text{min}$ a las 40 y 48h respectivamente, e iniciar su descenso a valores cercanos a 0,01 y 0,005 $\mu\text{mol}/\text{min}$ a las 72 y 96h de incubación respectivamente.

Parece lógico la sincronización de la división bacteriana con la actividad amilolítica. A tiempos iniciales de cultivo, dextrinas lineales y ramificadas, moléculas no inmediatamente metabolizables, son los productos principales provenientes de la degradación de almidón por una cantidad reducida de amilasas, lo cual provoca una baja tasa de división bacteriana. A tiempos mayores de incubación, las dextrinas son convertidas a maltosa, isomaltosa y glucosa, moléculas rápidamente metabolizadas por las bacterias y adicionalmente es factible el incremento en la cantidad de amilasas presentes, ambos factores podrían sustentar una adecuada velocidad de duplicación. Al agotarse los azúcares metabolizables se instaura la fase de

muerte, la cual también podría estar influenciada por la presencia de proteasas excretadas por las bacterias en respuesta a un empobrecimiento de nutrientes en el medio de cultivo (Armado, 1997).

Efectos del pH y temperatura sobre la actividad amilolítica.

La figura 3 muestra el comportamiento de la actividad de amilasas al variar el pH del

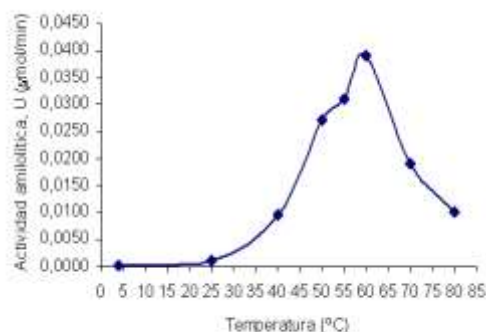


Fig.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad amilolítica expresada por la cepa Sist1A a pH 6,0



Fig.3. Efecto del pH sobre la actividad amilolítica expresada por la cepa Sist1A a 55°C

medio de reacción. La actividad máxima (0,014 $\mu\text{mol}/\text{min}$) se detectó a pH 6,0, siendo también apreciable a pH 7,0 (0,01 $\mu\text{mol}/\text{min}$). Valores de pH ácidos (3-5) y alcalinos (8-10) ejercen efectos inhibitorios/desnaturalizantes sobre la actividad enzimática, valores que se ubicaron entre 0,002 y 0,006 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Efectos similares han sido reportados por Srivastava *et al.*, 1986; Free, (1993); Shaw *et al.*, 1995; Najafi *et al.*, 2005.

El efecto de la temperatura, mostrado en la figura 4, indicó la actividad máxima (0,04 $\mu\text{mol}/\text{min}$) a 60°C, mostrando actividad apreciable en el intervalo de temperaturas

de 50-55°C; a los 70 y 80°C la actividad descendió a niveles de 0,01-0,02 μmol/min. El aumento de la actividad en el intervalo de 25 a 60°C se debe al

desprotonación (pHs alcalinos) de grupos R de los aminoácidos, constituyentes del sitio activo de las enzimas, induce desplazamientos de grupos esenciales para

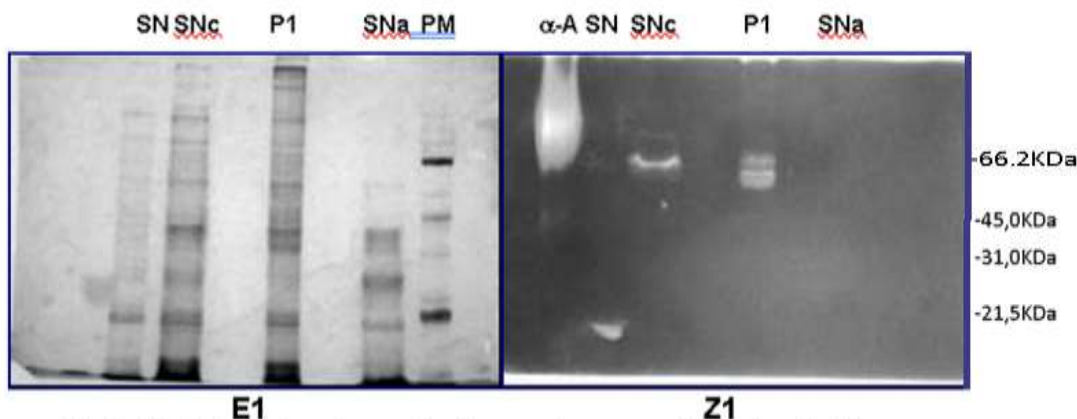


Fig.5. Electroforesis y zimografía de muestras con actividad amilolítica.
 α-A: amilasa comercial. SN: sobrenadante libre de células. SNc: sobrenadante concentrado a 50°C. P1: precipitado obtenido por precipitación con acetona. SNa: Sobrenadante de la precipitación con acetona. PM: patrones de peso molecular. **E1:** electroforesis, perfil polipeptídico. **Z1:** zimografía, zonas claras indican la hidrólisis de almidón.

incremento de la energía cinética de las moléculas con el consiguiente aumento del número de choques eficaces entre la enzima y el sustrato, a temperaturas mayores comienzan a aparecer los efectos negativos de la temperatura sobre la estabilidad de proteínas. Efectos similares sobre la actividad amilolítica han sido reportados por Hatman *et al.*, 1995; Igarashi *et al.*, 1998; Najafi *et al.*, 2005, con enzimas aisladas de *B. stearothermophilus*, *Bacillus sp* y *B. subtilis* respectivamente.

En ambos casos, pH y temperatura, los efectos que ejercen estos factores están relacionados a las modificaciones que sufre el sitio activo de la enzima o por la desnaturalización de las mismas. En el caso del pH, la protonación (pHs ácidos) o

el proceso catalítico o la desnaturalización de la molécula al destruir las estructuras secundarias y terciaria de las proteínas (Nelson *et al.*, 2008). Situación similar se produce por el aumento de la temperatura, en este caso vibraciones, rotaciones y desplazamientos de regiones importantes para el proceso catalítico o para la estabilidad de la enzima inducen un descenso o eliminación de la capacidad catalítica.

Perfiles polipeptídicos y amilolíticos mediante electroforesis y zimografía.

En la figura 5 se muestra el perfil polipeptídico y la actividad amilolítica de las 4 muestras descritas en el aparte 4, adicionalmente se analizó una amilasa comercial como control positivo. Al comparar los carriles correspondientes a

SN y SNc se puede concluir que el tratamiento de concentración del sobrenadante libre de células a 55°C fue efectivo en concentrar las proteínas, lo cual es evidente por la cantidad de polipéptidos detectados en el carril SNc (figura 5E1). Adicionalmente, en la figura 5Z1 (zimografía) se detectaron señales de actividad amilolítica ubicadas en la zona de masas moleculares equivalente a 66 kDa correspondientes a SNc y una señal de aproximadamente 22 kDa en el carril SN. Estos resultados constatan el carácter termofílico de la actividad amilolítica y que el tratamiento con acetona y posterior calentamiento no desnaturalizaron, al menos, los polipéptidos ubicados en las zonas señaladas. La muestra P1, al igual que la SNc, mostró un perfil polipeptídico complejo, detectándose 3 señales con actividad amilolítica en la zona de 60-66 kDa (figura 5Z1). La muestra SNa exhibió un perfil polipeptídico complejo, pero ausencia de polipéptidos con masas moleculares superiores a 45kDa, lo cual la diferencia de lo observado en la muestra SNc; en zimografía SNa no mostró señales de actividad enzimática. La presencia del polipéptido de 22 kDa en la muestra SN, pero su ausencia en P1 podría indicar una muy baja resistencia del polipéptido a 55°C y al tiempo de calentamiento. No fue posible establecer una correspondencia entre polipéptidos detectados en la electroforesis y la zimografía, lo que podría indicar una baja cantidad de amilasas excretadas al medio de cultivo, pero suficiente para degradar el almidón ubicado en las zonas correspondientes del gel. Las masas moleculares reportados por

los 3 polipéptidos detectados son similares a los señalados por Shaw *et al.*,1995, en *Thermus sp*; Igarashi *et al.*,1998, en *B. alcalofilo*; Pfueller & Elliot, 1969, en *B. stearothermophilus*; Freer, 1993, reporta una actividad de 70 KDa en *Streptococcus boris*.

4 Conclusión

La cepa SistA1 asignada a la especie *Geobacillus stearothermophilus*, bacilo Gram+, aislada de las aguas termales de Las Trincheras, excretó al medio de cultivo suplementado con almidón 1%p/v, una actividad amilolítica, la cual fue parcialmente purificada mediante precipitación con acetona 50% fría y calentamiento a 55°C. La actividad amilolítica mostró actividad máxima a 60°C y pH 6,0. Mediante zimografía, la actividad amilolítica estuvo asociada a 3 polipéptidos con masas moleculares en el intervalo de 60-66 kDa y 1 polipéptido de 22kDa solo detectado en el sobrenadante libre de células (sin tratamiento previo).

5 Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Proyecto Pem 2001002268 del Fondo Nacional Venezolano de Ciencias, Tecnología e Innovación.

Al TSU Darío Valbuena por la diagramación del manuscrito.

6 Bibliografía

- Aiyer, PV. (2005). Amylases and their applications. *Afr J Biotechnol* 4(13):1525-1529.
- Armado, A. (1997). Caracterización de actividades enzimáticas de bacterias termófilas provenientes de aguas termales de Venezuela. Tesis de Licenciatura, Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela
- Beveridge, TJ; Graham, LL: (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev* 55(4):684-705.
- Brown, S; Constantino, H; Kelly, R. (1990). Characterization of amylolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium. *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* 56(7):1985-1991.
- Campbell, LL. (1995). Purification and properties of an α -amylase from facultative thermophilic bacteria. *Arch Biochem and Biophys* 54:42-45.
- Coronado, MJ; Vargas, C; Mellado, E; Tegos, G; Drainas, C; Nieto, J; Ventosa, A. (2000). The α -amylase gene amyH of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization. *Microbiology* 146:861-868.
- del Moral, S; Ramírez-Coutiño, LP; García-Gómez, MJ. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *RelbCi* 2(3):87-102.
- Deutscher, MP. (1990). Guide protein purification. *Methods in Enzimology* 182:438, 484-486
- Egelseer, E; Shocher, I; Sára, M; Sleytr, UB. (1995). The S-Layer from *Bacillus stearothermophilus* DSM 2358 functions as an adhesion site for a high molecular weight amylase. *J Bacteriol* 177(6):1444-1451.
- Freer, SN. (1993). Purification and characterization of the extracellular α -amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl Environ Microbiol*.59(5):1398-1402.
- Gohol, V; Duan; G; Maisuria, V. (2013). Industrial enzyme applications in biorefining for starchy materials. En: *Advances in Enzyme Technology*. P. Shukla; BI. Pletschke editors. Springer.
- Hatman, P; Wellerson, R; Tetrault, PA. (1995). *Bacillus stearothermophilus*.I. Thermal and pH stability of amylase. *Appl. Microbiol* 3:7-10.
- Inram-Bokhari, M; Sarwar-Khan, N; Rashid, N. (2016). Industrial technology. Its applications in food and chemical industries. En: *Applied Molecular Biotechnology*; Chapter 22, pp518-527. M. Sarwar-Khan, I. Ahmed-Khan, D Barh editors. CRC Press.
- Igarashi, K; Hatada, Y; Hagihara,H; Saeki, K; Takaiwa, M; Uemura, T; Ara, K; Ozaki, K; Kawai,S; Kobayashi, T; Ito, S. (1998). Properties of a novel liquefying α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* isolated and entire nucleotide and amino acid sequences. *Appl Environ Microbiol* 64(9):3282-3289.

- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lukong, CB. (2014-2015). BCH: 301, Applications of enzymes. pages 1-13.
- Malhotra, R; Noorwez, SM; Satyanarayana, T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett Appl Microbiol* 31: 378-384.
- Mielenz, JR: (1983). *Bacillus stearothermophilus* contains a plasmid-borne gene for α -amylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5975-5979.
- Miller, GL: (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Najafi, MF; Deobagkar, D; Deobagkar, D. (2005). Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expr and Purif* 41:349-354.
- Nelson, DL; Cox, MM; Hoskins, AA. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. p798. 8th edition. Macmillan learning. USA.
- Niehaus, F; Bertoldo, C; Kahler, M; Antranikian, G. (1999). Extremophiles as sources of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:711-729.
- Ohdan, K; Kurik, T; Kaneko, H; Shimada, J; Takada, T; Fujimoto, Z; Mizuno, H; Okada, S. (1999). Characteristics of two forms of α -amylases and structural implication. *Appl Environ Microbiol* 65(10): 4652-4658.
- Ojeda, R. (1995). Aguas termales Las Trincheras. Gráficas Hidalgo C.A. Valencia. Venezuela.
- Pandey, A; Nigam, P; Soccol, CR; Soccol, VT; Singh, D; Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135-152.
- Pfueller, SL; Elliot, WH. (1969). The extracellular α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 244:48-54.
- Shaw, JF; Lin, FP; Chen, SCh; Chen, HCh. (1995). Purification and properties of an extracellular α -amylase from *Thermus* sp. *Bot Bull of Acad Sin* 36:195-200.
- Srivastava, RAK; Baruah, JN. (1986). Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environl Microbiol* 52:179-184.
- Underkofler, LA; Danault, LJ; Hou, EF. (1995). Enzymes in starch industry. *Die Starke* 17:179-184.