

# CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA AMILASA DE LA BACTERIA TERMÓFILA *Bacillus licheniformis* BA-3 AISLADA DE LOS GÉISERES DE CANDARAVE (TACNA-PERÚ)

## CHARACTERIZATION OF AMYLASE ENZYME FROM THERMOPHILIC BACTERIA *Bacillus licheniformis* BA-3 ISOLATED OF CANDARAVE GEYSERS (TACNA-PERÚ)

<sup>1</sup>Cristina Isabel Ferrer Villena, <sup>1</sup>Ariadna Zatyuri Zúñiga Llanos, <sup>1</sup>Israel José Salazar Quispe, <sup>1</sup>Ana Julissa Naquiche Calero, <sup>1</sup>Helena Beatriz Zapata Málaga, <sup>2</sup>Roberto Castellanos Cabrera

### RESUMEN

En la presente investigación se aisló una bacteria termófila productora de enzima amilasa, de los géiseres de Calientes, Candarave (Tacna – Perú), la cual por análisis de la secuencia del gen ARNr 16S presentó un 99 % de identidad con *Bacillus licheniformis*. Para determinar la capacidad amilolítica se evaluó en medio sólido presentando un halo de hidrólisis de 29,5 mm de diámetro a las 72 horas. En la evaluación de la producción de amilasa se obtuvo una concentración máxima de 1410,57 µg/mL de azúcares reductores a inicios de la fase estacionaria a 54,6 horas de incubación a 60 °C y pH 7. El extracto amilolítico tuvo un grado de purificación de 2,3 veces con sulfato de amonio, actuando a una temperatura óptima de 58 °C con una actividad de 10,7 U/mL y a un pH óptimo de 6,7 con una actividad de 8,3 U/mL, además la velocidad máxima ( $V_m$ ) fue de 229,5 µg de almidón hidrolizado por ml de enzima por minuto y el valor de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) fue de 8,7 mg de almidón por mL de enzima.

**Palabras clave:** amilasa, *Bacillus licheniformis*, géiser.

### ABSTRACT

In this research was isolated a thermophilic bacteria that producing amylase enzyme of Calientes geysers (Tacna- Peru), which by sequence analysis of 16S rRNA gene it showed 99% identity with *Bacillus licheniformis*. To determine the amyolytic capacity was evaluated on solid medium presenting a halo of hydrolysis of 29,5 mm diameter at 72 hours. In the evaluation of amylase production was obtained maximum concentration of 1410,57 mg/mL of reducing sugars in early stationary phase to 54,6 hours of incubation at 60 °C and pH 7. The amyolytic extract had a purification degree of 2,3 fold with ammonium sulphate, acting at an optimum temperature of 58 °C with an activity of 10,7 U / mL and a optimum pH of 6,7 with an activity of 8,3 U / mL, also the maximum speed ( $V_m$ ) was 229,5 mg of hydrolyzed starch per mL of enzyme per minute and the value of the Michaelis constant ( $K_m$ ) was 8,7 mg of starch per ml of enzyme.

**Keywords:** amylase, *Bacillus licheniformis*, geysers.

### INTRODUCCIÓN

La enzima amilasa ha recibido gran cantidad de atención a nivel mundial. Los microorganismos que pueden producir amilasas tienen aplicación comercial en industrias almidoneras, de alimento, textiles, detergentes, drogas, productos farmacéuticos, elaboración de cerveza y finos productos químicos (Annamalai *et al.*, 2011; Fooladi & Sajjadian, 2010). Las industrias almidoneras requieren enzimas con resistencia a alta temperatura, para la licuefacción del almidón (Asgher *et al.*, 2006, Ponce & Pérez, 2002).

Las amilasas son enzimas intra o extracelulares que promueven la hidrólisis de enlaces glucosídicos presentes en el almidón, glucógeno y otros polisacáridos (Van der Maarel *et al.*, 2002.)

Las amilasas con resistencia a las temperaturas elevadas son de importancia industrial y biotecnológica, es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo principal caracterizar enzimáticamente la amilasa de la bacteria termófila *Bacillus licheniformis* BA-3 aislada de los géiseres de Calientes-Candarave, Tacna-Perú.

<sup>1</sup> Biólogo Microbiólogo. Laboratorio de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú.

<sup>2</sup> Magister en Bioquímica, Biólogo Pesquero. Jefe del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición, Docente de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento y actividad enzimática en medio sólido

*Bacillus licheniformis* BA-3 pertenece al Cepario del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la UNJBG y fue aislada del campo geotermal de Calientes-Candarave ubicada a 4400 msnm, al occidente de la cordillera de los Andes en el sur de Perú, en las faldas del volcán Yucamane.

*Bacillus licheniformis* BA-3 fue sembrada por puntura en medio sólido (KHPO<sub>4</sub> 0,03 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,07 %, almidón 1 %, extracto de levadura 0,3 %, peptona 0,5 %, Mg SO<sub>4</sub> 0,5 %, Fe SO<sub>4</sub> 0,01 %, NaCl 0,3 %, agar 2 % y pH 7) (Fooladi & Sajjadian, 2010) e incubada a 60 °C por 96 horas; para el revelado del halo de hidrólisis se utilizó lugol al 30 %.

### Evaluación de la concentración de azúcares reductores

En 1,1 L del medio de producción de amilasa (KHPO<sub>4</sub> 0,03 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,07 %, almidón 1 %, extracto de levadura 0,3 %, peptona 0,5 %, Mg SO<sub>4</sub> 0,5 %, Fe SO<sub>4</sub> 0,01 %, NaCl 0,3 % y pH 7) fue inoculado el 10 % de caldo LB con crecimiento bacteriano de *Bacillus licheniformis* BA-3 (10<sup>6</sup> células/mL) e incubado a 60 °C por 96 horas.

El crecimiento de la bacteria y la concentración de azúcares reductores se determinó a partir de alícuotas cada 12 h (Annamalai *et al.*, 2011).

El crecimiento fue estimado por turbidimetría con una densidad óptica de 600 nm en un espectrofotómetro GREETMED, Modelo NV-203 y la concentración de azúcares reductores se determinó por el método descrito por Miller (1959).

El extracto crudo se concentró 50 veces, centrifugando a 6000 rpm durante 30 min, el sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio según la tabla de saturación a 60 y a 80 %, con agitación constante, dejando reposar y centrifugando a 10000 rpm para la purificación parcial de la enzima. El precipitado se guardó a -20 °C para su posterior utilización.

### Caracterización de la actividad enzimática

La actividad enzimática se basa en la reducción de la concentración de almidón por la hidrólisis enzimática (Rath, 2003). El ensayo contenía 20 µL del extracto crudo purificado parcialmente y 500 µL de solución de almidón al 1 %, fue incubado a 60 °C por 5 min. Posteriormente se añadió 50 µL de solución de yodo (0,05 % de yodo en 0,5 % KI).

La densidad óptica se determinó a 640 nm. Una unidad de enzima (U) se define como la cantidad de enzima que permite la hidrólisis de 10 mg de almidón (Aguilar *et al.*, 2000) en 30 min a 60 °C.

### Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática

La temperatura óptima se evaluó mediante la medición de la actividad enzimática a diferentes temperaturas (40-90 °C) en tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0) y almidón soluble 1 %.

El pH óptimo fue determinado mediante la medición de la actividad enzimática a diferentes pH usando los siguientes tampones (0,1 M): acetato de sodio (pH 5,0), fosfato de sodio (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 8), glicina-

tampón de NaOH (pH 9) y 1 % de almidón soluble como sustrato a 60 °C.

### Determinación del K<sub>m</sub> y V<sub>max</sub> de la enzima

Se utilizó siete concentraciones diferentes de almidón soluble (0,5-4 g/mL). La medición de la actividad fue realizada bajo condiciones normales de ensayo.

La estimación de K<sub>m</sub> y V<sub>max</sub> se realizó a partir de la linealización de Lineweaver-Burk. La ecuación se representa 1/V<sub>o</sub> contra 1/[S], obteniéndose una línea recta. La pendiente de la recta es K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub> y la intersección sobre el eje "y" es 1/V<sub>max</sub> y sobre el eje "x" es -1/k<sub>m</sub>.

### Extracción de ADN y análisis del secuenciamiento del ARNr 16S

Para la extracción del ADN genómico de las bacterias termófilas proteolíticas seleccionadas, se utilizó el kit Wizard Genomic DNA Purification siguiendo el protocolo del fabricante. A partir del ADN se obtuvo los genes ARNr 16S de cada bacteria seleccionada por Macrogen Inc.

Estas secuencias de nucleótidos fueron comparadas a la base de datos de NCBI GenBank (The National Center for Biotechnology Information) usando BLAST N (Basic Local Alignment Search Tool).

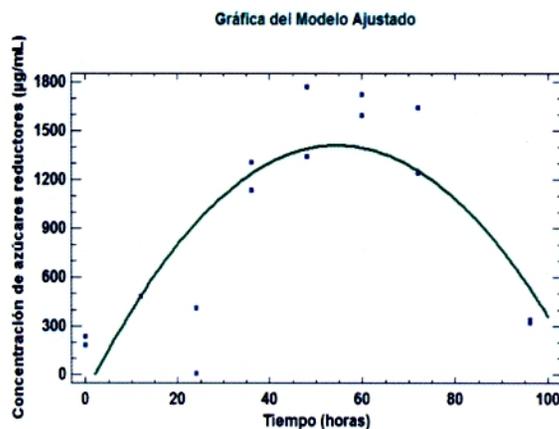
## RESULTADOS

### Aislamiento y actividad enzimática en medio sólido

La actividad cualitativa de la enzima amilasa se evidenció por la presencia de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia con 29,5 mm de diámetro a las 72 horas de incubación a 60 °C, utilizando almidón como sustrato.

### Evaluación de la concentración de azúcares reductores

El crecimiento bacteriano y la actividad enzimática evaluada por la concentración de azúcares reductores de la bacteria termófila, se incrementaron gradualmente a medida que avanza el tiempo de incubación, mostrando la máxima hidrólisis a las 54,6 horas (1410,57 µg/mL de azúcares reductores) (Figura 1), al inicio de la fase estacionaria.



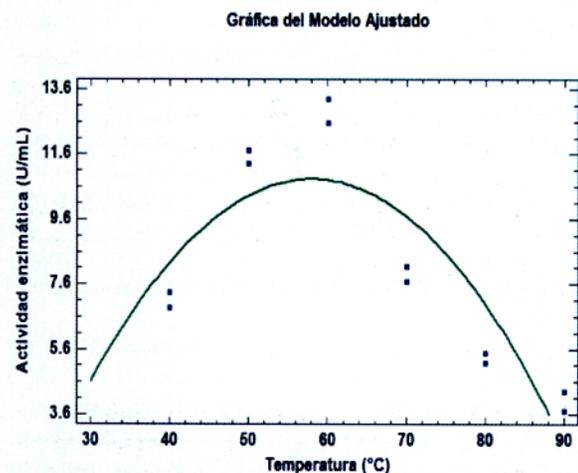
**Figura 1.** Concentración de azúcares reductores en la producción de la amilasa producida por *Bacillus licheniformis* BA-3.

Ferrer, C. *et al.* Caracterización de la enzima amilasa de la bacteria termófila *Bacillus licheniformis* ba-3 aislada de los géiseres de Candarave (Tacna-Perú).

En la purificación parcial la fracción que presentó mejor actividad amilolítica fue la saturada al 60 % con sulfato de amonio. Donde el extracto crudo tuvo una actividad específica media de 7,9 U/mg comparado con la enzima concentrada y purificada parcialmente la cual presentó 18,4 U/mg, presentando un grado de purificación de 2,3 veces.

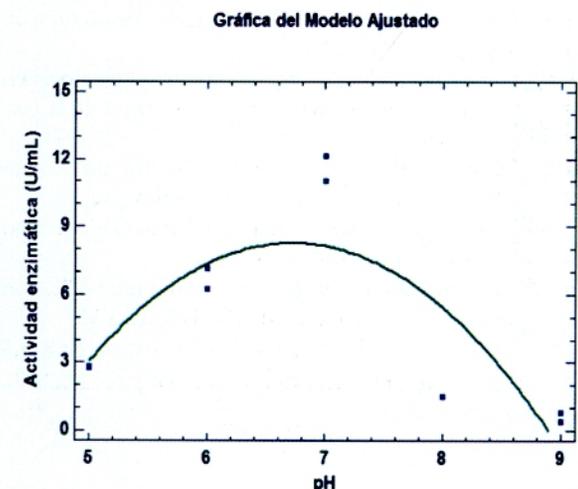
#### Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática

El efecto de la temperatura en la actividad enzimática fue estudiado a un intervalo de 40 a 90 °C; a un pH de 7. La mayor actividad bajo esas condiciones se registró a una temperatura estimada de 58 °C con 10,7 U/mL (Figura 2).



**Figura 2.** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática (U/mL) de la amilasa producida por *Bacillus licheniformis* BA-3.

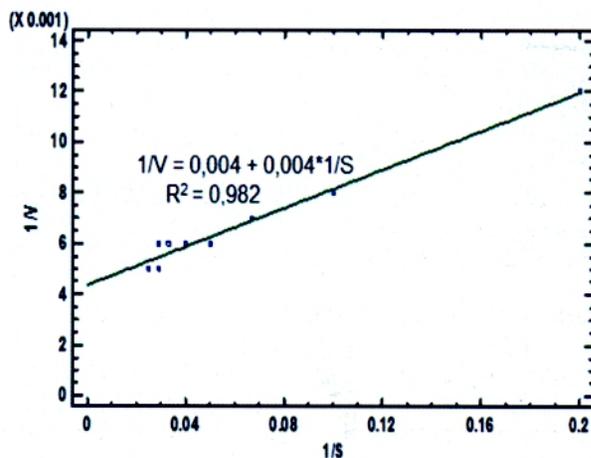
El efecto del pH en la actividad enzimática de la amilasa fue estudiada a un intervalo de pH de 5,0 a 9,0; a 60 °C. La mayor actividad enzimática bajo esas condiciones se registró a un pH estimado de 6,7 con 8,3 U/mL (Figura 3).



**Figura 3.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática (U/mL) de la amilasa producida por *Bacillus licheniformis* BA-3.

#### Determinación del $K_m$ y $V_{max}$ de la enzima

Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  a 60 °C y a pH 7 fueron 8,7 mg/mL y 229,5  $\mu$ g de almidón hidrolizado/ mL/min, respectivamente (Figura 4).



**Figura 4.** Determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  de la amilasa producida por *Bacillus licheniformis* BA-3.

#### Análisis del secuenciamiento del gen ARNr 16S

El resultado del secuenciamiento del gen ARNr 16S informa de la identidad de la bacteria depositada en la base de datos de Genbank de la búsqueda en Blast el cual indicó el porcentaje identidad de la secuencia bacteriana.

**Tabla 1.** Similitud de las secuencias del gen ARNr 16S para el cultivo bacteriano BA-3.

Bacteria	Descripción	Identidad %	Especie	GenBank
BA-3	<i>Bacillus licheniformis</i> strain AIS72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	<i>Bacillus licheniformis</i> .	GU967452.1

## DISCUSIÓN

#### Aislamiento y actividad enzimática en medio sólido

La formación del halo de hidrólisis alrededor de la colonia indica que *Bacillus licheniformis* BA-3 tiene la capacidad de producir una amilasa extracelular que hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 del almidón. (Cavalcante *et al.*, 2013).

*Bacillus licheniformis* BA3 tuvo un halo de 29,5 mm a las 72 horas, en contraste con la cepa de *Bacillus subtilis* LB5, aislada por Cavalcante *et al.* (2013) que presentó un halo de 12 mm. La alta velocidad de crecimiento de las colonias podría explicarse al hecho de que los carbohidratos son la fuente de carbono preferida para los microorganismos del género *Bacillus* (Barros *et al.*, 2008).

#### Evaluación de la concentración de azúcares reductores

El tiempo de incubación juega un rol importante en la producción enzimática. En el presente trabajo, la máxima concentración de azúcares reductores fue observada a las 54,6 horas de incubación al inicio de la fase estacionaria del

crecimiento bacteriano. Es así que la producción enzimática fue de crecimiento dependiente ya que la producción máxima coincide con la fase estacionaria de la bacteria, así como señala los trabajos realizados por Dohara *et al.* (2011) y Moshfegh *et al.* (2013), en donde señalan que la amilasa es producida en la fase logarítmica y alcanza su máximo en la fase estacionaria. Por otro lado, almidón soluble como sustrato sirve como la mejor fuente de carbono para el crecimiento máximo de la bacteria y para la producción de la enzima, un fenómeno descrito en variedad de bacterias del género *Bacillus* que secretan esta enzima (Lin *et al.*, 1998).

La amilasa se purificó parcialmente por precipitación con sulfato de amonio, debido a que es muy soluble, y actúa haciendo una precipitación salina o salting out de las proteínas, y cuando aumenta mucho la cantidad de iones extraños, la interacción proteína-proteína se hace mayor que la interacción proteína-agua (Tejiñón & Garrido, 2006). La fracción que presentó mejor actividad amilolítica fue la saturada al 60 %, coincidiendo con lo reportado por Montor (2013). El extracto enzimático presentó una actividad específica media de 7,9 U/mg, mientras que la enzima parcialmente purificada fue de 18,4 U/mg, con un grado de purificación de 2,3 veces lo cual se ajusta a las observaciones hechas por El-Safey & Ammar. (2004), en donde purificaron la amilasa de *Aspergillus flavus* var. *Columnaris* y su grado de purificación fue de 5,7 veces.

### Efecto de la temperatura y pH frente a la actividad enzimática

El efecto de la temperatura frente a la actividad enzimática, demuestra que la enzima a 90 °C aún no se ha desnaturado, presentando el 31 % de la actividad, valores similares a los obtenidos por Montor (2013). La actividad a 40 °C disminuye a un 55 % de la actividad y esto puede atribuirse a la reducción de la flexibilidad molecular de la proteína termófila en condiciones mesófilas (Dohara *et al.*, 2011).

Por otro lado, la temperatura óptima estimada fue de 58 °C, la cual está dentro del rango de la temperatura óptima para las amilasas, que va desde 30 a 85 °C según Lin *et al.* (1998), también concuerda con lo reportado en otras investigaciones donde se estudió a las amilasas producidas por bacterias del género *Bacillus*, reportándose así que la temperatura óptima de la amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* P-001 (Deb *et al.*, 2013) y *Bacillus* sp. BBM1 (Quintero *et al.*, 2010) fueron de 60 °C, y la amilasa de *Bacillus* sp., aislada de aguas termales de Iran, tuvo una temperatura óptima de 60 a 80 °C (Fooladi & Sajjadian, 2010). Incluso la enzima parcialmente purificada tiene una temperatura óptima estimada mayor que otras amilasas de *Bacillus licheniformis*, Monteiro *et al.* (2010) reportó una amilasa producida por *Bacillus licheniformis* GCBU8 con una temperatura óptima de 40 °C y Kim *et al.* (1992) reportó una amilasa con temperatura óptima de 50 °C.

En el efecto del pH frente a la actividad enzimática, se observa una reducción a pH básicos (pH 9), bajando su actividad a un 5,3 %. La mayoría de las enzimas que degradan el almidón tienen un pH óptimo en el intervalo de ácido a neutro (Pandey *et al.*, 2000).

Las amilasas producidas por bacterias termófilas son

activas a un pH que varía del intervalo de 6,0 a 8,0 (Liebl *et al.*, 1997) o de 5,0 a 7,0 (El-Safey & Ammar, 2004). El pH óptimo de la enzima parcialmente purificada concuerda con el pH óptimo de la amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* que fue de 7 (Al-Qodah, 2006), con el de *Bacillus licheniformis* GCBU8 que tuvo un rango de 6 a 8 (Kim *et al.*, 1992), y con el de *Bacillus licheniformis* que fue de 7,5 (Monteiro *et al.*, 2010). Lo cual demuestra que el pH óptimo de la amilasa se inclina hacia un valor neutral.

### Determinación del $K_m$ y $V_{max}$

Aunque es difícil comparar los valores cinéticos entre amilasas obtenidas en otras investigaciones, en vista de los diferentes sustratos de almidón utilizados y las condiciones de ensayo. El valor de  $K_m$  de la amilasa con almidón como sustrato (8,7 mg/mL) indica que en comparación con la amilasa de *Pyrococcus furiosus* (Laderman *et al.*, 1993), la enzima tiene una afinidad menor (mayor  $K_m$ ) para el almidón; pero una afinidad mayor comparando con la amilasa de *Bacillus alcalophilus* (Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, el valor de  $K_m$  está dentro del rango de las amilasas (0,35 a 11,7 mg/mL) (Najafi & Kumbhavi, 2005).

### Extracción de ADN y análisis del secuenciamiento del ARNr 16S

La identificación de la bacteria termófila BA-3 fue realizada mediante el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S. La identidad de las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos de *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) a través del BLAST N, resultando con un 99 % de identidad con *Bacillus licheniformis*, reportándose dicha especie en otras fuentes termales (Armaini *et al.*, 2015; Tarik *et al.*, 2015), así mismo es mencionada como una buena productora de amilasa termoestable (Monteiro *et al.*, 2010; Naidu & Saranraj, 2013; Pandey *et al.*, 2000).

### CONCLUSIONES

- La actividad cualitativa amilolítica de la cepa termófila BA-3 (99 % de identidad con *Bacillus licheniformis*) se obtuvo midiendo los halos formados por la degradación del almidón en medio sólido, teniendo un halo de 29,5 mm a las 72 horas.
- La máxima concentración de azúcares reductores en la producción enzimática fue al principio de la fase estacionaria, a las 54,6 horas.
- La enzima purificada con Sulfato de amonio tuvo un fraccionamiento de 2,3 veces la purificación.
- El pH óptimo de la enzima fue 6,7 con una actividad enzimática de 8,3 U/mL a 60 °C.
- La temperatura óptima de la enzima fue 58 °C con una actividad enzimática de 10,7 U/mL a pH 7.
- La  $V_{max}$  y el  $K_m$  de la enzima amilasa fueron de 229,5 µg de almidón hidrolizado/mL/min y 8,7 mg/mL, respectivamente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, G., Morlon, J., Trejo, B. & Guyot, J. (2000). Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*. 406–413p.
- Al-Qodah, Z. (2006). Production and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnologu J*. 1: 850-857
- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S. & Balasubramanian, T. (2011). Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant  $\alpha$ - Amylase from *Bacillus cereus*. *Indian J Microbiol*, 51(4): 424-429.
- Armaini, Dharma A., Suyukur, S., Jamsari, A. & Djon, T. (2015). Identification and phylogenetic diversity based on 16S rRNA gene sequence analysis of thermophilic bacteria from rimbo panti hot spring. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 6(3): 465-470.
- Asgher, M. Javaid, A., Rahman, S. & Legge, R. (2006). JFE.
- Barros, C., Ponezi, N., and Pastore, G. (2008). "Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35(9):1071–1078.
- Bradford 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.
- Cavalcante, F., Resende, A., Andrade, C., & Pastore, G. (2013). Production of enzymes from agroindustrial wastes by biosurfactant-producing strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Research International*. 1-9.
- Deb, P., Ahmad, S., Moshina, K., Kumar, P., & Abu, S. (2013). Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Open Journal*, 2-12.
- Dobara, M., Sayed, A., Fallal, A. & Omar, N. (2011). Production and partial characterization of high molecular weight extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* Isolated from Egyptian Soil. *Polish Journal of Microbiology*. 60(1): 65–71.
- El Safey, E. & Ammar, M. (2004). Purification and characteraization of  $\alpha$ -amylase isolated from *Aspergillus flavus* var. *columnaris*. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res*. 7(1): 93-100.
- Fooladi, J. & Sajjadian, A. (2010). Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable  $\alpha$ - amylase producing strain. *Iran Jurnal of Microbiology*, 2(1): 46-50.
- Kim, I., Cha, J., Kim, J., Jang, S., Seo, B., Cheong, T. & Lee, D. (1992). Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem*. 267, 22108–22114.
- Laderman, K., Davis, B., Krutzsch, H., Lewis, M., Griko, Y., Privalov, P. & Anfinsen, C. (1993). The purification and characterization of an extremely thermostable  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *The journal of Biological Chemistry*. 268(32): 24394-24401.
- Liebl, W., Stempling, I. & Ruile, P. (1997). Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium. *J Bacteriol*. 179:941–8.
- Lin, L., Chyau, C. & Hsu, W. (1998) Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus K*. TS-23. *Biotechnol Appl Biochem* 28:61–68.
- Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–429.
- Monteiro, P., Oliveira, P. & Magalhães. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry- A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 850-861.
- Montor, J. (2013). Caracterización de amilasas producidas por bacterias de suelos cultivados con caña de azúcar. Tesis para grado de Ingeniero en Biotecnología. Universidad de Papaloapan-México. 87h.
- Moshfegh, M., Reza, A., Zarrini, G. & Famarzi, M. (2013). Biochemical characterization of an extracellular polyextremophilic  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Halorubrum xinjiangense*. *Extremophiles*. 17: 677-687.
- Naidu, M. & Saranraj, P. (2013). Bacterial Amylase: A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(2): 274-287.
- Najafi, M. & Kembhavi, A. (2005) One step purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from marine *Vibrio* sp. *Enzyme Microb Technol* 36:535–539
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D. & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. App. Biochem*. 31: 135-152.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D. & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. App. Biochem*. 31: 135-152.
- Ponce, N. & Pérez, A. (2002). Celulasas y Xilanasas en la Industria Avance y Perspectiva. México. Pág 273-277.
- Quintero, M., Montoya, O. & Gutiérrez, P. (2010). Purificación y caracterización de una  $\alpha$ - amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus* sp. *BBM1*. *Dyan* 162: 31-38.
- Rath, C. (2003). Thermophiles: A novel group of microorganisms for 21 st centur, 2003, OUAT, Bhubanewswar, 751003.
- Tarik, A., Mouna, O., Marouane, M., Jean, S., Elmostafa, E., Jamal, I., Mohamed, I. & Mohamed, A. (2015). Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Braz. J. Microbiol*. 46(2):

Ferrer, C. *et al.* Caracterización de la enzima amilasa de la bacteria termófila *Bacillus licheniformis* ba-3 aislada de los géiseres de Candarave (Tacna-Perú).

1678-4405.

Teijón, J. & Garrido, A. (2006). Fundamentos de bioquímica estructura. Editorial Tébar. 443pp.77-78.

Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, H., Leemhuis, H. & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal Biotechnol.* 94: 137-55.

West, E., Tood W., Mason H. & Van Burggen J. (1967). *Text Book of Biochemistry* 4th ed. MacMillan Co., N. Y. Collier MacMillan Ltd. London.

Xiao, Z., Storms, R. & Tsang, A. (2007). A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Centre for Structural and Functional Genomics.* 1-3.

Yang, H., Liu, L., Li, J., Du, G. & Chen, J. (2011). Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. *Microbial cell factories.* 10: 1-9.

**Correspondencia:**

Cristina Isabel Ferrer Villena: cferrerv@unjbg.edu.pe

Fecha de Recepción: 09/04/2015

Fecha de Aceptación: 01/12/2015