

Actividad lipolítica de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa LN, aislada de las aguas termales de Las Trincheras, estado Carabobo, Venezuela

Angela Daniele¹, Luis Amaíz², Luis Medina³, Oscar Valbuena^{2,3} *

¹Departamento de Química, ²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT).

³Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas, CIMA, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Recibido: 20-01-10 Aceptado: 11-07-11

Resumen

La finalidad de este trabajo fue detectar la actividad lipolítica de bacterias presentes en las aguas termales de Las Trincheras. *Geobacillus stearothermophilus*, cepa LN, bacteria Gram. +, esporulada, termófila moderada, degradó aceite de oliva en un medio mineral mínimo, a 50 °C, en agitación constante y aerobiosis. La actividad lipasa se detectó en placas de agar/yema de huevo telurito. Cuantitativamente, la actividad lipolítica, presente en sobrenadantes libres de bacterias (SLB), se determinó *in vitro*, con aceite de oliva 1% m/v, por titulación potenciométrica en presencia de diversos surfactantes (bilis bovina 0,4% m/v; SDS 0,22% m/v; Tween 80, 0,37% m/v y un detergente doméstico comercial 0,8% p/v). El efecto lipolítico fue independiente del surfactante utilizado; las condiciones óptimas para la actividad fueron 55 °C y pH 10,5, obteniéndose una actividad específica enzimática de 1,6 U mL⁻¹ min⁻¹. El sistema enzimático bacteriano podría ser un aditivo en la fabricación de detergentes domésticos.

Palabras clave: actividad lipolítica, *Geobacillus*, aguas termales.

Lipolytic activity of *Geobacillus stearothermophilus*, strain LN, isolated from hot springs at Las Trincheras, Carabobo State, Venezuela

Abstract

The aim of this study was to detect lipolytic activity of bacteria present in the hot springs at Las Trincheras. *Geobacillus stearothermophilus*, strain LN, is a Gram + bacterium, sporulated, moderate thermophile, degraded olive oil in a mineral minimal medium at 50 °C, under aerobic conditions and constant agitation. The lipase activity was detected on agar/yolk egg telurite plates. Quantitatively, the enzymatic activity of bacteria-free supernatants was determined *in vitro* on 1% w/v olive oil by potentiometric titration, in presence of several surfactants (0.4% w/v bovine bile, 0.22% w/v SDS, 0.37% w/v Tween 80 and a 0.8% w/v domestic commercial detergent). The lipolytic action was independent from the assayed surfactant; the optimal activity conditions were 55 °C and pH 10.5. The specific enzymatic activity reached 1.6 U mL⁻¹ min⁻¹.

* Autor para la correspondencia: ovalbuena@uc.edu.ve

The bacterial lipase enzymatic system could be used as an additive for the domestic detergent production.

Keywords: lipolytic activity, *Geobacillus*, hot spring.

Introducción

Las lipasas (3.1.1.3) son enzimas presentes en todos los seres vivos y catalizan la hidrólisis de triglicéridos (grasas y aceites) a una mezcla de ácidos grasos o sus sales (jabones), diglicéridos, monoglicéridos y glicerol, en proporciones variables, de acuerdo a la extensión de la reacción (1, 2). Los microorganismos, constituyen herramientas implicadas en los mecanismos de ataque y patogénesis (virulencia) ocasionados a los organismos que ellos invaden (3, 4) y junto a proteasas, amilasas, celulasas y otras enzimas, son excretadas al medio extracelular para obtener moléculas nutritivas al hidrolizar substratos apropiados (5, 6).

Las lipasas son enzimas cuyo modo de acción es influenciado por la naturaleza del medio en que se encuentren y por la condición hidrofílica del mundo biológico. La acción de las lipasas usualmente ocurre por la hidrólisis de enlaces éster produciendo ácidos grasos y alcohol; no obstante, si la disponibilidad de agua se restringe y el ambiente se hace hidrofóbico, las lipasas revierten su acción y sintetizan enlaces éster, mediante la transesterificación y la interesterificación (4, 7, 8, 9). Estos dos últimos procesos, unidos a la caracterización de enzimas termofílicas (10 - 19) han potenciado las posibilidades de sintetizar moléculas con características estructurales definidas, útiles en la resolución de mezclas racémicas (4, 20).

Tal vez el uso más conocido de las lipasas ha sido el de su incorporación a detergentes domésticos dirigidos al lavado de ropa, lencería y textiles en general (4, 8, 21, 22). Adicionalmente, las lipasas tienen aplicaciones en la industria alimentaria, en biomedicina, curtiembre, cosmetología, perfumería, pesticidas, ambiente y como biosensores (23), también están siendo usadas

para descontaminar aguas industriales con elevados niveles de grasa y residuos lipídicos (11, 24).

En este estudio se reporta la actividad lipolítica secretada al medio de cultivo por *Geobacillus stearothermophilus*, cepa LN, bacteria termófila moderada en presencia de surfactantes biológicos (bilis bovina), químicos (SDS, tween 80) y comercial (ACE).

Materiales y métodos

A. Material biológico

Geobacillus stearothermophilus, cepa LN, termófila, Gram positiva, fue previamente aislada del manantial geotermal en Las Trincheras, Edo. Carabobo, Venezuela (25) y posteriormente identificada mediante galerías API 50CHB (bioMirieux) con un porcentaje de confianza del 99,5%.

B. Materiales químicos y bioquímicos

Caldo nutritivo, emulsión medio yema de huevo telurito, agar cuenta estándar y agar-agar (HIMEDIA, Mumbai, India); bilis bovina en polvo y pancreatina porcina en polvo (BIOFARMO, San Diego, Edo. Carabobo, Venezuela); dodecil sulfato de sodio (SDS) (Promega, Madison, WI, USA); Tween 80 y NH_4Cl (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA); CaCl_2 y MgCl_2 (Golf Chemical Co. Dallas, TX, USA); NaCl (Merck, Darmstadt, Alemania); NaOH y KH_2PO_4 (T.J. Baker, Phillipsburg, NJ, USA); aceite de oliva (La Pedregosa).

C. Cultivos bacterianos

El inóculo bacteriano (1 mL) se adicionó a 100 mL de caldo nutritivo, bajo condiciones de aerobiosis, en agitación constante, en un baño de agua (Shark-R-Lab Line) a 55 °C. Alícuotas de 1,0 mL se adicionaron a

100 mL de medio mínimo mineral ($MgCl_2$, 0,028 g/L; $CaCl_2$, 0,06 g/L; KH_2PO_4 , 0,5 g/L; NaCl, 1,0 g/L y NH_4Cl , 1,0 g/L) suplementado con aceite de oliva 1 % m/v (medio MS/aceite), esterilizado a 121 °C, 15 libras de presión por 15 min, ajustándose el pH a 6,5 por adición de NaOH 1 M estéril. Después de incubación bajo las condiciones señaladas, se determinó la viabilidad bacteriana estriando alícuotas en placas de agar cuenta estándar y por absorción a 540 nm, efectuándose lecturas cada 24 h durante 168 h, en un espectrofotómetro UV-VIS, Spectronic Genesys II (Spectronic Instruments). En paralelo, como sistema control, un medio de cultivo sin inóculo bacteriano fue incubado.

D. Determinación de la actividad lipolítica

Luego de diferentes tiempos de incubación (24, 48, 72, 96, 144 y 168 horas), volúmenes apropiados de cultivos bacterianos, en medio MS/aceite, se centrifugaron a $20.000 \times g$ por 15 min en una centrífuga Superspeed (Servall, modelo BS-1, Norwalk, Conn, USA). Los sobrenadantes libres de bacterias (SLB) constituyeron la fuente de actividad enzimática, la cual se determinó cualitativa y cuantitativamente.

1. Actividad lipolítica en placas de agar. Alícuotas provenientes de cultivos bacterianos, en medio MS/aceite, de 96 h de incubación se estriaron en placas de agar yema de huevo telurito y se incubaron en estufa a 40 °C. La aparición de halos de brillo aceitoso e iridiscente, alrededor de las colonias, indicó prueba positiva de actividad lipolítica (5).

2. Actividad enzimática en SLB. La actividad de lipasa se midió por titulación potenciométrica de los ácidos grasos liberados usando como sustrato aceite de oliva (26, 27). Para la preparación del sustrato, constituido por una emulsión de aceite de oliva se procedió de la siguiente manera: 258 mL de tampón fosfato 10 mM, pH 7; 1,2 g de bilis bovina y 30 g de aceite de oliva se

mezclaron y completaron a 300 mL para dar concentraciones finales de 8,6 mM, 0,4% m/v y 1% m/v respectivamente. La mezcla se agitó en una licuadora por intervalos de 5 min, con posterior enfriamiento, aplicando cinco ciclos consecutivos. Inmediatamente, antes de realizar la determinación, el pH se ajustó a pH 9,5 por la adición de NaOH 0,1M y volúmenes de 30 mL de la emulsión se sumergieron en un baño de agua a 50 °C hasta alcanzar el equilibrio térmico; seguidamente, 2 mL de los SLB se adicionaron, con agitación constante, y la liberación de ácidos grasos se determinó por titulación potenciométrica (pH meter OSKTON), a pH 9,5, midiendo los volúmenes totales de NaOH 0,01 M gastados en intervalos de tiempos (1-5 min) por 20 min.

Un sistema blanco, conteniendo agua en lugar de SLB, se tituló bajo idénticas condiciones experimentales. Adicionalmente, un sistema control positivo conteniendo 0,2 mg de pancreatina porcina, como fuente de lipasa, fue ensayado a 37 °C y pH 9,5. Es importante señalar que el método para determinar las lipasas fue originalmente descrito para lipasa pancreática, una enzima mesófila, por lo tanto para la cuantificación de la actividad bacteriana, de carácter termófilo, se procedió a determinar el tiempo de incubación *in vitro* que permitiera sustentar la actividad enzimática bacteriana a 50 °C, bajo condiciones de saturación respecto al sustrato (orden de reacción cero).

La unidad de actividad lipolítica se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1,0 imol de ácidos grasos por minuto (8, 10, 13, 15, 26, 28).

E. Efecto de surfactantes sobre la actividad lipolítica

La actividad lipolítica de los SLB (96 h) se ensayó al sustituir la bilis bovina por SDS 0,22% m/v (7,6 mM); tween 80, 0,37% m/v (2,8 mM); o por un detergente comercial (ACE) al 0,8% m/v. Los sistemas se incubaron a 50 °C y pH 9,5. Las concentraciones elegidas de estos surfactantes fueron aque-

llas que produjeron emulsiones de aceite de oliva estables por 6 horas a 50 °C. La estabilidad se determinó visualmente al no observarse separación de fases en la emulsión en el tiempo indicado.

F. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad lipolítica

Alicuotas de 2mL de SLB, provenientes de cultivos bacterianos de 96h de crecimiento, se incubaron en las condiciones señaladas, pH 9,5 a diferentes temperaturas (40, 50, 55, 60 y 65 °C). Para evaluar el efecto del pH, inmediatamente antes de agregar el SLB, el medio de reacción se ajustó a diferentes valores de pH, usando HCl 0,1 meq/mL para el sistema a pH 6.5 y NaOH 0,1 meq/mL para el resto de los pH (7,5; 8,0; 8,5; 9,5; 10,0; 10,5 y 11,0). La actividad se determinó a 55 °C, a los valores de pH indicados, empleando bilis bovina como agente surfactante. Un sistema blanco a cada valor de pH fue también titulado, en estos casos se adicionaron 2 mL de agua en lugar de SLB.

Resultados y discusión

El crecimiento bacteriano en medio MS/aceite se presumió por la aparición de turbidez a las 24 h de cultivo, la cual incrementó hasta las 96 h de cultivo y luego a partir de las 120 h decae (figura 1); contrariamente, el sistema blanco permaneció transparente. Bajo tales circunstancias, el crecimiento bacteriano fue enmascarado por la turbidez desarrollada producto de la emulsificación del aceite de oliva, proceso que es potenciado por la actividad lipolítica, que genera moléculas con propiedades surfactantes, tales como las sales de ácidos grasos (jabones) y mono- y diacilglicéridos (10). No obstante, mediante el cultivo de alicuotas del cultivo bacteriano en placas de agar cuenta estándar, se constató el crecimiento y viabilidad de las bacterias (figura 2A). Al contrario, alicuotas del sistema blanco no produjeron colonias en las placas de agar.

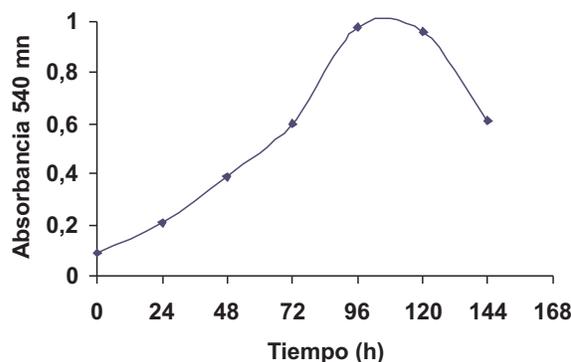


Figura 1. Turbidez del cultivo bacteriano en función del tiempo. Incubación a 50 °C en agitación constante y en aerobiosis.

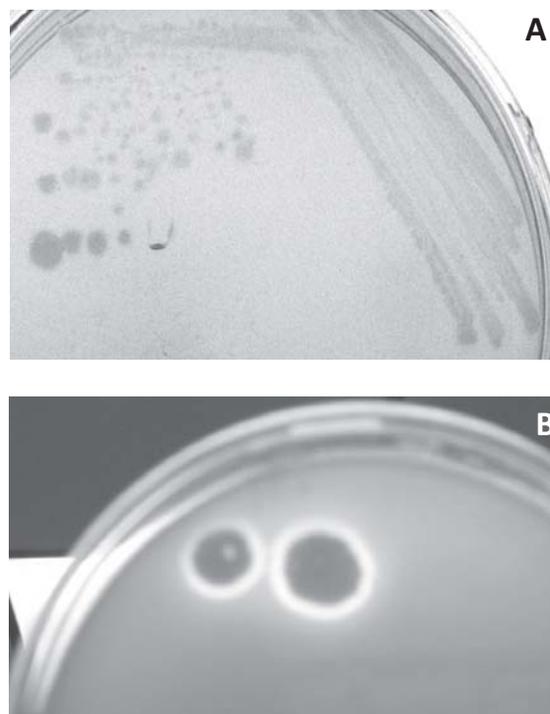


Figura 2. Colonias bacterianas degradadoras de aceite de oliva. A.- Bacterias crecidas en agar nutritivo. B.- Bacterias crecidas en agar yema de huevo telurito.

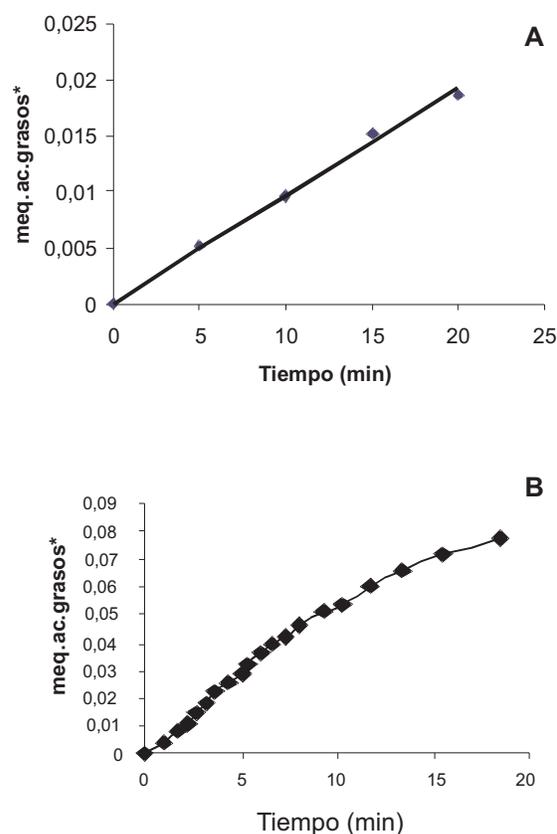
Adicionalmente, alícuotas del cultivo bacteriano, estriadas en placas de agar/yema de huevo telurito presentaron colonias bacterianas rodeadas de halos brillantes e iridiscentes, lo que detectó la presencia de lipasas excretadas al medio sólido (figura 2B).

En la determinación de la actividad enzimática a través de método potenciométrico se puede constatar que a los 20 min de incubación, a pH 9,5, aún la pendiente de la curva de actividad bacteriana permanecía constante (0,00091 meq/min), corroborando la saturación del sistema enzimático y garantizando el cálculo de actividades específicas enzimáticas (29), (figura 3A).

En el sistema con pancreatina (figura 3B), la pendiente de la curva hasta 8 min de incubación *in vitro*, (pH 9,5 y 37 °C), fue de 0,006115 meq/min, decreciendo a un valor de 0,002932 meq/min entre los 9 y 20 min. Consecuentemente, para la determinación de la actividad específica de la pancreatina porcina se empleó el valor de 0,00465 meq de ácidos grasos liberados correspondiente a 8 min de incubación. Una vez establecido el tiempo de la reacción *in vitro*, se procedió a determinar la actividad lipolítica total en los SLB, en función del tiempo de cultivo y del surfactante utilizado.

En la tabla 1 se aprecia que la acidez generada por los diferentes sistemas, en 20 min de incubación, alcanzó valores comprendidos entre 0,0073 y 0,0099 meq a las 96 horas de cultivo. Como dato comparativo, el sistema con pancreatina porcina alcanzó valores de 0,078 meq (pH 9,5 y 37 °C). Estos resultados indican que cualquiera de los agentes surfactantes empleados no ejercieron efectos inhibitorios apreciables sobre la actividad de las lipasas bacterianas.

A diferencia de la actividad lipolítica descrita en este trabajo, efectos inhibitorios del SDS sobre lipasas de *Bacillus* sp DH4 y *Pseudomonas* sp cepa KB700A, han sido reportados (14, 30). Las actividades específicas enzimáticas de los diferentes sistemas,



*Valores corregidos por los sistemas blanco (0,0066 y 0,0045 meq). Las pendientes de las rectas se calcularon por regresión lineal respondiendo la figura A a la ecuación: $Y = 0,0007 + 0,000916X$, ($\sigma_{n-1} = 0,9960$); y para la figura B, la recta corresponde a: $Y = 0,01359 + 0,006115X$, ($\sigma_{n-1} = 0,9976$) para el intervalo de 1-8 min.; $Y = 0,0252 + 0,002932X$, ($\sigma_{n-1} = 0,9880$) para el intervalo de 9-18,5 min.

Figura 3. Hidrólisis *in vitro* de aceite de oliva por lipasas. A: Sobrenadantes libre de bacterias (lipasa bacteriana). B: Pancreatina (lipasa porcina).

expresadas como unidades de actividad (meq/min) por mL de SLB ensayado (8, 10, 28), se calcularon en base a los meq liberados por los SLB en 20 min de incubación, valores de 0,227; 0,182; 0,247 y 0,225 U mL⁻¹ min⁻¹ se obtuvieron para los sistemas bilis bovina, SDS, Tween 80 y ACE respectivamente (tabla 1); para la pancreatina bovina la actividad alcanzó un valor de 29 U mg⁻¹ min⁻¹. Actividades específicas de lipasas bacterianas excretadas a medios de cultivo son similares a las reportadas en este manuscrito (13, 15).

Tabla 1
Actividad lipolítica *in vitro* presente en sobrenadantes libres de bacterias (SLB)
en función del surfactante y tiempo de cultivo

Tiempo de cultivo (horas)	Bilis bovina 0,4% m/v	SDS 0,22% m/v	Tween 80 0,37% m/v	ACE 0,8% m/v
Actividad lipolítica total (miliequivalentes de ácido generados*)				
24	0,0057	0,0036	0,0049	NE
48	0,0088	0,0063	0,0068	NE
96	0,0091	0,0073	0,0099	0,0090
	(±0,000907)	(±0,000152)	(±0,000230)	(±0,000513)
Actividad específica (U min ⁻¹ mL ⁻¹) ⁺				
	0,227	0,182	0,247	0,225

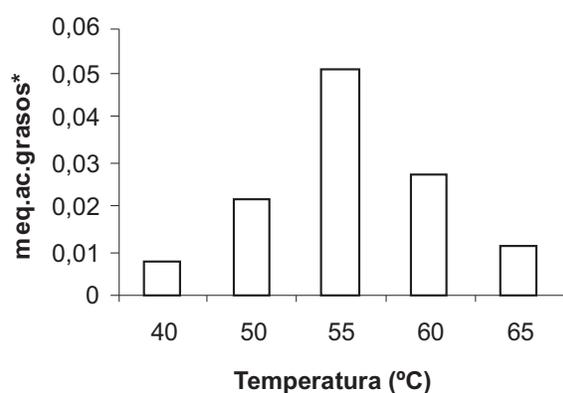
*Los valores representan los meq de ácidos grasos liberados (y en paréntesis la desviación estándar correspondientes a 96 horas de cultivo) en 20 min de incubación a 50 °C y pH 9,5; corregidos por los sistemas blancos respectivos (bilis bovina: 0,0053 meq; SDS: 0,0048 meq; Tween 80: 0,0079 meq; ACE: 0,0145 meq). Las cifras corresponden a promedios de 3 experimentos independientes. NE: no ensayado.

⁺ Actividades calculadas para SLB de 96 h de cultivo.

Posteriormente, se procedió a determinar la actividad lipolítica bacteriana a diferentes temperaturas y valores de pH comprendidos entre 6,5 y 11,0. El efecto de estos parámetros sobre la actividad lipolítica de SLB provenientes de cultivos de 96h de incubación, en presencia de bilis bovina, se detalla en las figuras 4 y 5. El óptimo de actividad (0,0507 meq) respecto a la temperatura se obtuvo a 55 °C; a 40 °C y 65 °C la actividad decayó considerablemente a valores de 0,0076 meq (15%) y 0,0111 meq (22%) respectivamente.

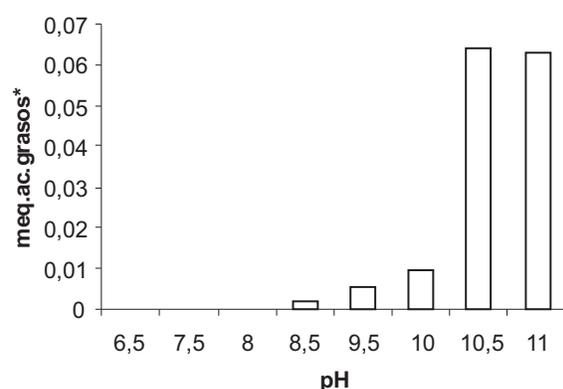
El valor de pH óptimo se ubicó en 10,5, liberándose 0,0634 meq, detectándose actividad lipolítica a partir de pH 8,5 hasta pH 11, e inactividad total a valores de pH débilmente ácidos o alcalinos (6,5-8,0). Podría aducirse que los elevados valores de ácidos grasos liberados a pH 10,5 y 11 corresponden principalmente a hidrólisis alcalina, no enzimática. No obstante, los sistemas blancos analizados (0,0078 y 0,0068 meq respectivamente) descartan tal posibilidad.

El pH de 10,5 a 11,0 para alcanzar la actividad máxima es uno de los más altos reportados en la bibliografía (22), valores de pH entre 7,0 y 10,0 son los más usualmente citados (13, 14, 22, 31). Para evaluar la estabilidad de la enzima a pH alcalinos, dos alícuotas de un mismo SLB, se sometieron a calentamiento a 50 °C por 30 min, una de ellas a pH 11 y la otra a pH 10,5. Luego, se determinó la actividad lipolítica *in vitro*, bajo condiciones óptimas, es decir a pH 10,5 y 55 °C por 20 min. El tratamiento a pH 11 redujo a un 50% (0,025 meq) la actividad obtenida respecto al sistema calentado a pH 10,5. Estos datos indicaron cierta inestabilidad del sistema enzimático lipolítico bacteriano a pH 11. Es importante señalar el efecto estimulador obtenido en la actividad enzimática después del proceso de optimización de las condiciones de reacción; de valores iniciales cercanos a 0,01 meq (50 °C y pH 9,5; ver tabla 1), la liberación de ácidos grasos incrementó a 0,0634 meq (55 °C y pH 10,5, ver figura 5), lo que representa un factor estimulador superior a 6 y un aumento de la actividad específica a 1,597 U mL⁻¹min⁻¹.



*meq liberados en 20 min por SLB (96 h) en presencia de bilis bovina y pH 9,5. Valores corregidos por el sistema blanco (0,0178 meq.).

Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad lipolítica *in vitro* de sobrenadantes libre de bacterias (SLB).



*meq liberados en 20 min por SLB (96 h) a 55°C en presencia de bilis bovina. Valores corregidos por los sistemas blanco respectivos.

Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad lipolítica *in vitro* de sobrenadantes libres de bacterias (SLB).

Los resultados obtenidos, constataron una variabilidad en las actividades lipolíticas determinadas en experimentos independientes; valores comprendidos entre 0,0091 y 0,0252 meq (promedio $0,0186 \pm 0,0068$) se obtuvieron para SLB de 96 h de cultivo, empleando bilis bovina como surfactante, a 50 °C y pH 9,5. Esta variabilidad podría adscribirse a que a los inóculos bacterianos usados en experimentos independientes no se les determinó la carga bacte-

riana (absorbancia o UFC/mL) debido a la turbidez de los cultivos (10) y/o a que las emulsiones de aceite utilizadas, aunque macroscópicamente estables, no serían estrictamente similares en todas las instancias en que se prepararon. Es conocido que la actividad de lipasas es dependiente de la interfase entre el aceite y la fase acuosa, y no de la concentración del aceite (4, 8).

Conclusión

Los resultados obtenidos demostraron que una cepa termófila *Geobacillus stearothermophilus* aislada de las aguas termales de Las Trincheras, Edo. Carabobo, hidrolizó en un medio químicamente definido, aceite de oliva como única fuente de carbono. *In vitro*, la degradación del aceite ocurrió en presencia de surfactantes biológicos y químicos (bilis bovina, SDS y Tween 80) y de un detergente comercial doméstico (ACE). Las condiciones óptimas de la lipólisis *in vitro* fueron: 55 °C, pH 10,5. Por su actividad entre los 40-60 °C, a valores de pH alcalinos 9,5-11, este sistema enzimático califica como una alternativa válida a ser incorporado a detergentes para uso doméstico.

Agradecimiento

Los autores agradecen a la Lcda. Noja Izzeddin (CIMA, FCS-UC) y a la Lcda. Esther Torquati (Departamento de Biología, FACYT-UC) por su valiosa colaboración en la identificación y mantenimiento de la cepa bacteriana.

Referencias bibliográficas

1. NELSON, DL., COX, MM. **Lehninger principles of Biochemistry**. Worth Publishers. New York. USA. pp 366, 599, 874, 2000.
2. HOUDE, A., KADEM, A., LEBLANC, D. **Appl Biochem Biotechnol** 118:115-170, 2004.
3. MADIGAN, MT., MARTINKO, JM., PARKER, J. **Brock Biología de los Microorganismos**. Pearson Educación S. A. Ma-

- drid. España. pp 596-97, 735, 753, 886, 2004.
4. JAEGER, KE., RANSAC, S., DIJKSTRA, BW., COLSON, C., VAN HEUVEL, M., MISSET, O. **FEMS Microbiol Re.** 15:29-63. 1994.
 5. MC FADDIN, J. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** Médica Panamericana S. A. Buenos Aires. Argentina. pp 267-274, 2004.
 6. BLACK, JG. **Microbiology: Principles and Explorations.** John Wiley and Sons. USA. pp 207, 2005.
 7. CARDENAS, F., DE CASTRO, MS., SANCHEZ, JM., SINESTERRA, JV., VALMAS-EDA, M., ELSON, SW., ALVAREZ, E. **Enzyme Microbiol Technol** 28:145-154, 2001.
 8. GUPTA, R., RATHI, P., GUPTA, N., BARDO, S. **Biotechnol Appl Biochem** 37:63-71, 2003.
 9. VERMA, ML., AZMI, W., KANWAR, SS. **Acta Microbiol Immunol Hung** 55:265-294, 2008.
 10. BECKER, P., ABU-REESH, I., MARKOSIAN, S., ANTRANIKIAN, G., 11. MÄRKL, H. **Appl Microbiol Biotechnol** 48:184-190, 1997.
 11. BECKER, P., MÄRKL, H. **Biotechnol Bioeng** 70:630-637, 2000.
 12. GOMES, J., STEINER, W. **Food Technol Biotechnol.** 42:223-235, 2004.
 13. SALAMEH, MA., WIEGEL, **J Appl Environ Microbiol** 73:7725-7731, 2007
 14. BORA, L., KALITA, MC. **J Chem Technol Biotechnol.** 83: 688-693, 2008.
 15. RAHMAN, RN., LEOW, TH., SALLEH, AB, BASRI, M. **BMC Microbiol** 7:77-86, 2007.
 16. SUGIURA, M., ISOBE, M. **Biochem Biophysic Acta.** 341:195-200, 1974.
 17. SUGIURA, M., OIKAWA, T., HIRANO, K., IMUKAI, T. **Biochem Biophysic Acta** 488:353-358, 1977.
 18. KUMARS, S., KIKON, K., UPADHYAY, A., KANWAR, SS., GUPTA, R. **Protein Express Purif.** 41:38-44, 2005.
 19. EHRAHIMPOUR, A., ABD RAHMAN, RN., EAN CH'NG, DH., BASRI, M., SALLEH, AB. **BMC Biotechnol.** 8(96): 1-15, 2008.
 20. KADEMI, A., AÏT-ABDELKADER, N., FAKHREDDINE, L., BARATTI, J. **Appl. Microbiol Biotechnol** 54:173-179, 2000.
 21. HORIKOSHI, K. **Microbiol Mol Biol Rev.** 63:735-750. 1999.
 22. HASSAN, F., SHAH, AA., HAMEED, A. **Biotechnol Adv** 27:782-798, 2009.
 23. PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, CR., NIGAM, P., KRIEGER, N., SOCCOL, VT. **Biotechnol App Biochem** 29: 119-131, 1999.
 24. DHARMSTHITI, S., KUHASUNTISUK, B. **J Industr Microbiol Biotechnol.** 21:75-80, 1998.
 25. NIETO, L. Estudio de las actividades enzimáticas tipo glucanasa y amilasa en termófilos provenientes del Centro Termal Las Trincheras del estado Carabobo. Trabajo Especial de Grado para obtener el título de Lic. en Química. Departamento de Química. Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela. 60 pp., 2003.
 26. RUYSSSEN, R., LAUWERS, A. EDITORES. **Pharmaceutical Enzymes.** Gent. Bélgica. pp 72-84, 1978.
 27. KIM, HK., PARK, SY., LEE, JK., OH, TK. **Biosci Biotechnol Biochem** 62: 66-71, 1998.
 28. ANDERSSON, RE. **Environ Microbiol** 39:36-40, 1980.
 29. LEHNINGER, A. **Biochemistry.** Worth Publishers. New York. USA. pp 207, 1977.
 30. RASHID, N., SHIMADA, Y., EZAKI, S., ATOMI, H., IMANAKA, T. **Appl Environ Microbiol** 67:4064-4069, 2001.
 31. SABRI, S., RAHMAN, RM., LEOW, TC., BASRI, M., SALLEH, AB. **Protein Express and Purif** 68:161-166, 2009.