

PRODUCCIÓN DE α -AMILASA CON CÉLULAS LIBRES E INMOVILIZADAS DE *Thermus* sp.

Sarmiento VC, Vargas DH, Pedroza AM, Matiz A, Poutou RA.*

Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia. Correspondencia: rp000274@javeriana.edu.co

RESUMEN

Se compara la producción de α -amilasa termoestable a partir de almidón, empleando una cepa autóctona de *Thermus* sp., en cultivo discontinuo con células libres e inmovilizadas en 3% p/v de alginato de sodio. La producción se llevó a cabo en medio PAP2 modificado por la adición de almidón de maíz a 3.024g/l. Los resultados obtenidos en el fermentador, reportaron mayor eficiencia debido a la configuración geométrica; concentración de la fuente de carbono, oxigenación y temperatura; lo que permite mejor aprovechamiento del sustrato. La máxima producción de α amilasa se obtuvo con células inmovilizadas en fermentador con 1l de caldo de cultivo (cultivo fluidizado), a las 24 horas de fermentación (360.97UA/min l y 149.09 de actividad específica), vs., 60.31UA/min l y 18.40 de actividad específica, obtenida en fermentador con 10l de volumen de trabajo a las 14h. Es importante resaltar de este trabajo, que por primera vez en Colombia son utilizadas células inmovilizadas de *Thermus* sp., para la producción de α amilasa termoestable.

Palabras claves: *Thermus* sp., fermentación, amilasas, cultivo de células libres, cultivo de células inmovilizadas.

ABSTRACT

The thermostable α -amylase production is compared, using a native strain of *Thermus* sp., in batch culture and immobilized cells in 3% p/v of sodium alginate. The production was carried out in PAP2 broth modified by the addition of maize starch in a concentration of 3.024g/l. The results obtained in reactor, reported greater efficiency due to the geometric configuration; concentration of the carbon source, oxygenation and temperature; allowing better substrate assimilation. The maximum production of α amylase was obtained with immobilized cells in fermentor with 1l of culture broth (fluidized culture), at 24 hours of fermentation (360.97UA/min l and 149.09 of specific activity), vs., 60.31UA/min l and 18.40 of specific activity, obtained in reactor with 10l working volume at 14h. It is important to remark in this work, which is the first time that immobilized cells of *Thermus* sp., are used for the production of thermostable α -amylase, in Colombia.

Key words: *Thermus* sp., fermentation, amylases, free cell culture, immobilized cell culture.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos termófilos han despertado interés entre los investigadores por las bondades que ofrecen en la realización de procesos biotecnológicos; las enzimas que producen estos microorganismos son capaces de catalizar reacciones bioquímicas a elevadas temperaturas, siendo esto una ventaja frente a microorganismos mesófilos. Incrementar la temperatura de los procesos biotecnológicos repercute disminuyendo la viscosidad y la tensión superficial del sistema, incrementa la velocidad de difusión, la solubilidad de compuestos no gaseosos, lo que disminuyen la contaminación ambiental. Investigaciones realizadas (Brock 1967), demostraron el comportamiento adaptativo de estos microorganismos y algunos procesos metabólicos involucrados en la utilización de diferentes fuentes de carbono como sustrato.

De otro lado, la inmovilización de células con el objetivo de producir metabolitos primarios es un proceso que ofrece ventajas debido que los reactores empleados responden a diseños sencillos, se eliminan los pasos de centrifugación, la posibilidad de establecer sistemas continuos de alimentación de sustrato y extracción de productos, la larga duración de estos procesos, adicionalmente estos sistemas permiten un rápido control de pH y temperatura, permiten altas concentraciones de células y no requiere sistemas de agitación. El objetivo de este trabajo fue el de estudiar la eficiencia en la producción de α -amilasa con células inmovilizadas de *Thermus sp.*, en cultivo discontinuo a partir de almidón como fuente de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa empleada. *Thermus sp.*, aislada de fuentes termales localizadas en el municipio de Iza departamento de Boyacá; caracterizada y conservada en caldo PAP2 (170mg/l $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, 44mg/l CaCO_3 , 1.41g/l CaCl_2 , 528mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15mg/l FeSO_4 , 2mg/l NH_4SO_4 , 74mg/l NaH_2PO_4 , 1.8mg/l K_2PO_4 , 12.5g/l glucosa, 3g/l extracto de levadura, pH 6.9 +/- 0.2 ajustado con H_3PO_4) suplementado con 30% v/v de glicerol a -70°C en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana (Pedroza et al. 1997; Pedroza 2000).

Determinación de azúcares reductores totales (g/l). La concentración de azúcares reductores se determinó a través de la técnica del Acido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS). Esta técnica permitió elaborar una curva de calibración empleando un patrón de glucosa de (5g/l); la reacción fue leída en Multiskan (MCC/340) a 540nm de longitud de onda (Miller 1959).

Determinación de la concentración de almidón (g/l). Se realizó una curva de calibración empleando diluciones de un patrón de almidón 1g/l; 1 ml de cada dilución fue mezclado con 1ml de solución de KI y I. La mezcla fue leída en un Multiskan (MCC/340) a 620nm de longitud de onda. Para la detección del consumo de almidón se emplearon los sobrenadantes de las diferentes horas de fermentación (Paifer et al. 1994).

Determinación de actividad amilolítica (UA/min l). Una unidad de actividad amilolítica es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un mol de glucosa en minuto (UA/min), bajo condiciones constantes de experimentación. La actividad enzimática extracelular fue determinada a lo largo de las cinéticas de fermentación en el extracto crudo después de centrifugación a 10000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. Para esto se preparó una solución 1% p/v de almidón en tampón fosfato 0.1M (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , pH 7.0 +/-0.2) la cual se mezcló a partes iguales con las muestras de extracto crudo; posteriormente se incubaron a 65°C durante 30 minutos. La mezcla fue centrifugada a 10000 r.p.m. 5 minutos a temperatura ambiente; el sobrenadante fue empleado para estimar la concentración de azúcares reductores (AR) por la técnica del DNS. Como blanco en la determinación se empleó tampón fosfato (Berfeld 1995; Sugita et al. 1997).

A la concentración en g/l de glucosa de cada muestra se sustrajo la concentración en g/l de glucosa del blanco (para descartar hidrólisis por temperatura del almidón y/o regiones con carbónos anoméricos) y se sustrajo la concentración en g/l de glucosa residual de cada muestra (para descontar la glucosa que originalmente presentaba la muestra) (Vargas et al. 2001).

A partir de la concentración final en g/l de azúcares reductores (glucosa) se calculó la concentración en g/l de almidón empleando la fórmula: $\text{UA}/\text{min l} = (\text{g/l glucosa} * (1\text{mol de glucosa}/180\text{g}) * 10^6) / 30 \text{ min}$, (Berfeld 1995; Sugita et al. 1997).

Determinación de la concentración de proteínas extracelulares totales. Se empleó el método de Bradford (Bradford 1976).

Determinación de actividad específica. La actividad específica se determinó a partir de la diferencia entre la actividad amilolítica UA/min l y la concentración de proteínas totales mg/ml en el extracto crudo (Egas et al. 1998).

Determinación de peso seco (g/l). Se determinó a partir de la tara entre los pesa-sustancias conteniendo 1ml de cultivo, los cuales fueron secados previamente a 85°C durante 1 hora y posteriormente colocados a igual temperatura con la respectiva muestra. Se realizó una curva de calibración de Dop_{540nm} vs., Peso Seco (g/l); a partir de la cual por regresión lineal se obtuvieron los parámetros que caracterizaron la curva (Matiz A. 1999; Vargas DH, et al. 2001). Todos los extractos crudos fueron ensayados para concentración de azúcares reductores residual (g/l), concentración de proteínas extracelulares totales (mg/ml), concentración de almidón (g/l), actividad amilolítica (UA/min l) y actividad específica. Todos los experimentos cuentan al menos con tres réplicas.

Ensayo de la concentración de almidón, para la producción de a-amilasa con células libres de *Thermus sp.* Se realizó un pre-cultivo de *Thermus sp.*; se inocularon 5ml de pre-cultivo (10% v/v) en erlenmeyers de 250ml con 50 ml de las siguientes combinaciones: (a) caldo PAP2 modificado con 3.204 g/l de almidón de Maíz; (b) PAP2 modificado con 6.408 g/l de almidón de maíz; (c) PAP2 modificado con 7.369 g/l de almidón de maíz y (d) PAP2 modificado con 9.612 g/l de almidón de maíz. Los cultivos fueron incubados a 65°C, 200 r.p.m., durante 24 horas. Se ensayó el extracto crudo.

Escalado preliminar para la producción de células de *Thermus sp.*, en fermentador de 10l. *Thermus sp.*, fue precultivada, durante 24 horas; se inocularon 20 ml de pre-cultivo (5% v/v) en erlenmeyers de 2l con 400 ml de caldo PAP2 modificado con 3.204 g/l de almidón de maíz y se incubaron a 65°C, 200 r.p.m., durante 50 horas. Verificada la pureza microbiana se añadieron los 400 ml de inóculo (5% v/v) al fermentador de 10l con 7,6l del mismo caldo, para un volumen efectivo de 8l. Las condiciones de fermentación se ajustaron a 65°C, 350 r.p.m., 1v.v.m., pH variable, durante 25

horas. Las células obtenidas se emplearon para el escalado de la producción con células inmovilizadas.

Producción de á-amilasa en columna con células inmovilizadas de *Thermus sp.* Las células obtenidas durante el proceso de fermentación (8l) fueron lavadas con solución salina (0.85% p/v NaCl) estéril y resuspendidas en una solución de Alginato de Sodio al 3% p/v en H₂O destilada estéril a razón de 0,1g de biomasa húmeda/ml de mezcla de inmovilización; mezcla que fue goteada en una solución 0,5M de CaCl₂ (Thonart et al. 1984). Posteriormente fue armada la columna para lograr determinar el tiempo de retención teórico. Se colectaron muestras cada 2 horas durante 24 horas para la detección de la actividad amilolítica. El experimento se realizó a dos temperaturas diferentes 50 y 65°C.

Producción de á-amilasa en fermentador con células inmovilizadas de *Thermus sp.* La biomasa obtenida durante la fermentación fue inmovilizada en condiciones iguales a las expuestas en el experimento de inmovilización en columna (Thonart et al. 1984). Posteriormente se realizó el montaje del fermentador, el cual fue inoculado con 140 ml de perlas en 700 ml de medio PAP2 modificado con 3.204 g/l de almidón de maíz, como una simulación de un sistema fluido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de la concentración de almidón, para la producción de a-amilasa con células libres de *Thermus sp.* Al emplear 3.204g/l de almidón de maíz, se obtuvo 46.48 UA/min l y Act. Esp., de 35.29 a las 22h de fermentación; mientras que al emplear 6.408g/l, se obtuvo 24.90UA/min l y 6.55 de Act. Esp., a las 2h; al utilizar 7.369g/l se logró 43.16UA/min l, 16.70 de Act. Esp., a las 22h, y al suplementar con 9.612g/l de almidón de maíz se obtuvieron 46.48 UA/min l y 8.40 de Act. Esp., demostrando que la menor concentración de almidón de maíz genera mejor actividad específica; siendo 4.98 veces mayor la actividad al comparar estos resultados con los obtenidos por Pedroza (2000), donde se produjeron 9.33UA/min l y 21.74 de Act. Esp., a las 27h en fermentador de 1l a 150 r.p.m., y 1 v.v.m., utilizando como fuente de carbono 1% p/v de almidón hidrosoluble. El aumento en la producción de enzima se debe probablemente a la mayor afinidad de la cepa de *Thermus sp.*, por el

almidón de maíz empleado como fuente de carbono; lo que sugiere que el almidón hidrosoluble 100% puro podría generar inhibición por sustrato; por otra parte el almidón de maíz en forma de maizena que fue empleado contiene CaCl_2 y se conoce que algunas enzimas como la α -amilasa de *Thermus sp.*, requiere como cofactor el Ca^{2+} ; los resultados confirman los hallazgos de Pedroza (2000) quien sugirió mayor afinidad de esta cepa (cepa 8), por el almidón de maíz (presentación maizena) con un consumo del 83% del almidón suministrado (10g/l) y una actividad amilolítica de 8.9 UA/min l vs., actividades de 6.5UA/min l y 1.2UA/min l en almidón de papa y de yuca respectivamente (Pedroza et al. 1997).

Escalado preliminar para la producción de células de *Thermus sp.*, en fermentador de 10l. Las condiciones de temperatura, pH, agitación y fuente de carbono, beneficiaron el proceso de fermentación, logrando una producción de α -amilasa de 60.31 UA/min l y actividad específica de 18.4 a la hora 14. Asimismo, la alta afinidad por el sustrato permitió incrementar la producción de biomasa (1.8 g/l), la cual fue utilizada en el escalado de la inmovilización (Tabla 1).

Tabla 1 Resultados obtenidos en la fermentación de 10L para producción de biomasa de *Thermus sp.*

H	pH	Az. g/l	Prot mg/ml	UA/min l	Act. Espec.	Almidón g/l	Biom. g/l
0	6.5	0.31	0.27	15.68	58.55	3.126	0.000
1	6.0	0.30	0.32	28.77	90.26	3.126	0.000
2	6.5	0.34	4.43	26.93	6.08	3.126	0.000
14	6.0	0.62	3.28	60.31	18.40	1.357	0.090
15	6.0	0.58	3.01	44.26	14.70	1.252	0.221
16	6.0	0.62	2.51	51.64	20.55	1.468	0.489
17	5.5	0.53	2.28	42.60	15.11	1.494	0.896
18	5.5	0.48	2.78	38.55	13.86	1.127	1.303
19	5.5	0.47	2.78	47.95	17.24	0.919	1.571
20	5.5	0.44	2.36	46.48	19.69	0.706	1.702
21	5.9	0.36	2.36	40.94	17.35	0.566	1.757
22	6.3	0.40	2.17	47.03	21.68	0.417	1.779
23	5.9	0.31	2.22	37.81	16.84	0.305	1.787
24	5.9	0.30	2.17	44.45	20.49	0.175	1.790
25	5.7	0.29	2.23	31.91	14.29	0.137	1.791

Biom g/l: $\text{LN}(\text{Biomasa g/l} / \text{Biomasa}^*0\text{g/l})$, Az: azúcares reductores totales g/l.

Se demuestra que el crecimiento celular es lento, con una fase de adaptación (lag) de 14h, lo que sugiere que el consumo de almidón es empleado prioritariamente en la producción de la enzima. Las oscilaciones en la actividad amilolítica y en la actividad específica se deben a la producción de proteasas, aspecto característico de este tipo de microorganismos; las UP/min l oscilaron entre 1.45 y 1.525 (datos no mostrados) (Vargas et al. 2001).

En cuanto a la producción de la α -amilasa, a la hora 22 se obtuvo la mayor actividad específica (21.68) con una actividad amilolítica de 47.03UA/min l. Por otra parte, el almidón por su rápido consumo se agotó en el medio de cultivo a las 19h, obligando a las células a utilizar como fuente de carbono la glucosa, producto de la hidrólisis del almidón, lo que pudo contribuir a las oscilaciones la actividad amilolítica.

Tabla 2. Producción de α -amilasa con células inmovilizadas de *Thermus sp*, en columna a 50 y 65°C.

50°C					
H	Glucosa g/l	Proteínas mg/ml	UA/min l	Act. Especifica	Almidón g/l
0	0.148	8.498	1.63	0.19	3.313
4	0.420	5.212	36.32	6.97	3.397
8	0.478	2.141	32.88	15.36	1.622
12	0.676	2.801	63.69	22.74	2.788
16	1.029	5.069	86.75	17.11	1.723
20	1.314	4.664	126.62	27.15	1.729
24	1.234	3.235	86.32	26.68	1.690
28	1.179	3.330	1.63	0.49	0.020
65°C					
H	Glucosa g/l	Proteínas mg/ml	UA/min l	Act. Especifica	Almidón g/l
0	0.012	0.916	2.28	2.48	3.261
4	0.048	1.534	8.96	5.84	2.232
8	0.101	3.082	18.65	6.05	2.001
12	0.509	1.594	94.29	59.16	1.587
15	1.277	1.903	236.52	124.27	0.585

Si se comparan los resultados de Pedroza (2000) quien trabajó con la misma cepa en fermentador de 1l a 1v.v.m., pH variable, 150 r.p.m. 65°C y 1% de almidón hidrosoluble y obtuvo 9.33UA/min/l y 21.7448 de Act. Esp., a las 27h, y los resultados obtenidos en fermentador de 8l, 1v.v.m., pH variable, 350 r.p.m. y 65°C donde se lograron 60.31UA/min l a las 14h, se aprecia que un aumento de 7 veces en el volumen generó un incremento en la producción de enzima de 6.46 veces, como consecuencias del cambio de geometría y de las condiciones de aireación y concentración de almidón, de manera tal que podría considerarse un escalado.

Producción de α -amilasa en columna con células inmovilizadas de *Thermus sp.* La producción de la enzima a fue comparada a dos temperaturas 50°C y 65°C. El experimento a 65°C mostró actividad específica 4 veces mayor en 5 horas menos de fermentación lo cual indicó un consumo más rápido del almidón, ya que a la hora 15 a 65°C el sustrato había disminuido en un 82.3% (Tabla 2).

A temperatura de 65°C, se presenta la mayor producción de la enzima y actividad específica; resultados que corroboran los hallazgos de Pedroza (2000) donde la temperatura óptima fue también de 65°C. Estos resultados pueden ser útiles para sugerir el flujo de comienzo del sistema continuo, dividiendo el volumen total de fermentación trabajado entre el tiempo en minutos donde se obtuvo la mayor actividad amilolítica; siendo este 0.15 ml de medio/minutos, después de 15 horas de retenido el medio en la columna.

Producción de α -amilasa en fermentador con células inmovilizadas de *Thermus sp.*

Los cambios fuertes de temperatura a los cuales son sometidas las células, desde la temperatura de conservación a 4°C hasta la temperatura del proceso de fermentación a 65°C, lo que probablemente causan un grado de estrés considerable ocasiona una disminución en la producción de la enzima (Tabla 3).

Tabla 3: Producción de α -amilasa con células inmovilizadas de *Thermus sp* en fermentador a 65°C.

H	DNS	Prot.	UA/min l	Act. Esp.	Alm.
0	0.052	6.241	2.71	1.46	3.566
2	0.030	3.163	5.23	1.53	4.978
4	0.185	4.210	18.76	5.66	2.921
6	0.301	4.424	25.34	5.83	2.560
8	0.308	3.882	31.21	7.45	2.028
10	0.496	4.602	45.59	11.11	1.958
12	0.943	2.775	100.87	39.02	1.781
14	1.650	3.034	178.12	75.02	0.992
16	2.196	2.374	245.57	122.35	0.664
18	2.373	2.481	238.89	113.70	0.605
20	2.687	2.207	320.45	152.34	0.501
22	2.999	3.382	266.47	74.65	0.587
24	0.295	3.213	360.97	149.09	0.286

H: Hora de fermentación; DNS: Glucosa g/l; Prot.: Proteína mg/ml; Alm.: Almidón g/l; Act. Esp.: Actividad Específica

Al Comparar los resultados obtenidos en columna y fermentador con células inmovilizadas, se demuestra que el cambio de geometría es determinante para la producción de la enzima aún cuando las condiciones de fermentación fueron homogéneas en cada uno de los experimentos.

El fermentador mostró una producción máxima de enzima a la hora 24 cuyo valor fue de 360.97 UA/min l y 149.09 de actividad específica; producción mayor en comparación con la columna a las 15 horas donde se obtuvo 236.52 UA/min l y actividad específica de 124.27, sugiriendo que la producción de enzima se debe probablemente a la combinación de geometría, concentración de sustrato, la inmovilización de células, temperatura y condiciones de oxigenación.

Frillingos et al. (2000) expresaron la α -amilasa de *Pyrococcus woesei* en la bacteria halófila moderada *Halomonas elongata* obteniendo valores de actividad entre 0.65 y 2.5, UA/min l entre 3.9 y 15, y un máximo de proteínas totales de 6mg/ml, la fermentación se desarrolló en cultivo discontinuo a 37°C, aeróbicamente, en medio salino SW-3 con 3% p/v de sales totales y 0.5% p/v de extracto de levadura. Comparando con los resultados arrojados en el presente trabajo superó en 4.02 veces las UA/

min l en fermentador de 8l con células libres, en 15.768 veces las UA/min l en columna con células inmovilizadas y en 24.06 veces las UA/min l en fermentador con células inmovilizadas (Frillingos et al. 2000).

Por ser la α -amilasa la segunda enzima en comercializarse a nivel industrial, se ha recurrido a diferentes clases de microorganismos con el fin de lograr una producción mayor y a bajo costo, por requerir condiciones simples de nutrición, por poseer habilidad para crecer rápidamente en condiciones extremas ya sea de temperatura o salinidad lo cual permite proteger a los microorganismos utilizados para dicho fin contra agentes contaminantes (Paifer et al. 1994).

Finalmente, después de revisar la literatura en el campo de la biotecnología se destaca por primera vez la utilización de células inmovilizadas para la producción de α -amilasa termoestable, en lo que respecta a la investigación en Colombia. Con estos resultados satisfactorios en cuanto a la alta producción de la enzima en relación a datos obtenidos con células libres, permite abrir un nuevo camino para el avance en futuras investigaciones biotecnológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Berfeld P. Amylases a and b. *Methods Enzimology*. 1995; 1: 149-158.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dre binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- Egas M, Milton C, Cowan D, Stracellular α -amylase from *Thermus filiformis*. *Ork a2: purification and biochemical characterization. Extremophyles*. 1998; 2: 23-32.
- Frillingos S, Linden A, Niehaus F, Vargas C, Nieto JJ, Ventosa A, Antranikian G, Drainas C, Cloning and expression of α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *J Appl Microbiol* 2000; 88.3:495-502.
- Matiz A. Aislamiento, identificación y caracterización fenotípica de *Zymomonas mobilis* spp. Autóctonas. Producción de etanol con células libres en cultivo discontinuo. Tesis Maestría Depto de Microbiología. 1999. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Miller G. Use of dinitrosalicilic acid-reagent for determinations of reduncing sugar. *Anal Chem* 1959; 31:426-428.
- Paifer E, Margoller E, Cremata J, Montesino R, Herrera L, Delgado J. Expressions and secretions of recombinante alfa amylase in *Pichia pastoris* using two different signal secuencia. *Yeast*. 1994; 10:1415-1419.

8. Pedroza AM. Aislamiento y caracterización de bacterias termófilas autóctonas para la producción de amilasa termoestable. Tesis Maestría. Depto de Microbiología Facultad de ciencias Básicas 2000. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
9. Pedroza AM, Alvarez NC, Poutou RA. Diseño de un medio definido para el cultivo discontinuo de cepas autóctonas de *Thermus* spp. *Univ Scient* 1997; 4, 2: 130-134.
10. Sugita H, Kuruma A, Deguchi Y. Purification and some properties of an α amylase from an anaerobic bacterium isolate from coastal sediment. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 10: 1757-1759.
11. Thomas B. Life at high temperatures. *Science*. 1967; 158, 2: 1012-1019.
12. Thonart Ph, Paquot M, Baihot B, Delemans D. Las células inmovilizadas: Técnica de la Ingeniería Bioquímica. *Inter Biotecnol*. 1984; 1: 11-24.
13. Vargas DH, Sarmiento V. Producción de α -amilasa con células inmovilizadas de *Thermus* sp. Tesis Pregrado. Depto de Biología 2001. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia.
14. Wind D, Buiteiaar M, Eggink G. Characterization of the new *Bacillus stearothermophilus* isolates: a highly thermoestable α amylase -producing strain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1994; 41: 155-162.