



# Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Tarafından Alfa-Amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu

*Production and Characterization of Alfa-Amylase by Bacillus sp. Isolated from Kahramanmaraş Soils*

Lütfiye Karcıoğlu Batur<sup>1</sup>, Ashabil Aygan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Biruni Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Zeytinburnu, İstanbul

<sup>2</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş

## Öz

*Bacillus* sp. A-3 Kahramanmaraş topraklarından izole edilmiştir. Suş 5.0-7.0 pH aralığında enzim sentezini gerçekleştirirken, maksimum amilolitik aktivite 37°C sıcaklık ve 6.5 pH değerinde gözlenmiştir. SDS-PAGE analizinde enzime ait 53.94 kDa ağırlığında tek bant elde edilmiştir. Enzimin optimum pH'sı 6.0-6.5 olarak belirlenmiştir. Enzimin maksimum rölatif aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 35°C olup ve 25 ile 65°C arasında ortalama %68 bir rölatif aktiviteye sahiptir. Enzim 40°C ye kadar termostabil bir özellik sergilemiştir. Kimyasalların etkisi açısından ise en yüksek kalan aktivite %93 ile KCl ve en düşük ise %0.8 ile EDTA'da gözlenmiştir. Bu özellikleri ile A-3 alfa amilazı unlu mamul sanayiinde, biyoetanol üretiminde ve hurda kâğıt endüstrisinde önemli bir yer teşkil edebilecek potansiyeldedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alfa amilaz, *Bacillus*, Karakterizasyon, Mezofilik, Safaştırma, Stabilité

## Abstract

*Bacillus* sp. A-3 isolated from soils of Kahramanmaraş. The maximum amylolytic activity was obtained at 37°C and pH 6.5 as the strain showed enzyme synthesis in between pH 5.0-7.0. SDS-PAGE analysis of the enzyme showed a single band which was estimated as 53.94 kDa. Optimum pH of the enzyme was determined as 6.0-6.5. Maximum relative activity of the enzyme presented was 35°C and also average 68% of relative activity was observed in between 25-65°C. Enzyme revealed a thermostable properties up to 40°C. In terms of chemicals effect, The highest remaining activity was 93% with KCl as the lowest one was 0.8% in the presence of EDTA. According to these properties of the A-3 alpha amylase has potential to have an important place in baking, bioethanol production and waste paper industries.

**Keywords:** Alpha-amylase, *Bacillus*, Characterization, Mesophilic, Purification, Stability

## 1. Giriş

Amilaz enzimleri, nişasta, glikojen gibi polisakkaritlerin alfa-glikozid bağlarını hidroliz eden enzimlerdir (Reddy vd. 2003). Gıda, tekstil, kağıt, deterjan ve içecek gibi çeşitli endüstri kollarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar ve dünya enzim ticaretinin de %25'lik bir kısmını oluşturlar (Rao vd. 1998). Alfa-amilazlar (E.C. 3.2.1.1.) α-1,4 Glikozidik bağları kopararak glukoz, maltoz ve çeşitli uzunluklarda oligosakkaritler meydana getirirler (Gubta vd. 2003). Substrata etkileri açısından amilazlar endo-amilaz ve ekzo-amilaz şeklinde iki kategoriye ayrılır. Endo-amilazlar,

nişastayı zincir üzerinde rastgele hidroliz ederken, ekzo amilazlar nişastayı indirgen olmayan uca yakın noktalardan kesen enzimlerdir (Ozcan vd. 2010). Endüstriyel ihtiyaçları karşılayacak enzimlerin genel kaynağı kısa sürede ve çok miktarda üretilmelerinden dolayı mikroorganizmalar olmuştur. Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmaların fermentasyonu ile üretilmektedir (Godfrey ve West 1996). Enzim üretimi için mantar ve bakteri gibi mikroorganizmalar geniş bir şekilde taranmış (Ivanova vd. 2001) ve bakterilerden *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, ve *B. amyloliquefaciens* gibi suşların iyi enzim üreticisi olabilecekleri ortaya konmuştur (Mamo ve Gessesse 1999). *Bacillus* cinsi bakteriler genellikle patojen olmamaları, ekstrasellüler sekresyon yapabilmeleri, diğer enzim kaynaklarına göre daha az yan ürün oluşturmaları,

\*Sorumlu yazarın e-posta adresi: [ashabil@ksu.edu.tr](mailto:ashabil@ksu.edu.tr)

daha ucuz işlem gerektirmeleri ve genetik manipülasyonlara imkan tanınması gibi sebeplerden dolayı da özel ilgi ve tercih sebebi olmaktadır (Kıran ve Çömlekçiöğlü 2003, Schallmey vd. 2004). Farklı ortamlarda bulunan bakteriler ya asidofilik, alkalifilik enzim üretir yada mikro-ortamlarındaki pH değişimlerine uyum sağlayabilecek asit veya alkali tolerant nötr enzim üretimi gerçekleştirirler (Bachmeier vd. 2002, Mahdavi vd. 2010). pH tolerant enzimler ise endüstriyel olarak geniş spektrumlu reaksiyon şartlarında kullanım imkânı sağlamaktadır.

Bu çalışmada Kahramanmaraş'ın farklı bölgelerden alınan topraklardan *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilmiş ve suşun ürettiği amilaz enziminin saflaştırılması ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

## 2. Gereç ve Yöntem

### 2.1. Mikroorganizma ve Kültür Şartları

*Bacillus* sp. A-3 bakterisi Kahramanmaraş topraklarından alınan örneklerden izole edilmiştir. Bunun için alınan toprak örnekleri 10 dk süreyle 80°C'ye ayarlanmış su banyosunda pastörize edildikten sonra LB Agar (pH 7.0) üzerine yayılmıştır. Ertesi gün, izole edilen suşlar amilaz aktivite tespiti  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g, NaCl 0.5 g,  $\text{MgSO}_4$  0.24 g,  $\text{CaCl}_2$  0.01 g, peptone 3 g, 1% (w/v) çözünür nişasta (Merck), ve Agar 15 g (Shibuya vd. 1986) şeklinde oluşan besiyerinde test edilmiştir. Amilaz üreten suşlar plakların iyod buharına maruz bırakılması ile belirlenmiş (Hols vd. 1994) ve amilolitik potansiyelleri en yüksek olanları sonraki çalışmalar için eğik agarda stok kültürleri hazırlanarak +4°C'de saklanmıştır (Bernhardsdotter vd. 2005).

Seçilen bakteri suşları cins seviyesinde teşhisi için koloni morfolojisi ve katalaz testlerinin yanı sıra gram boyama, spor boyama, hareketlilik testleri yapılmıştır (Ratanakhanokchai vd. 1999).

### 2.2. Enzim Üretimi

Seçilen *Bacillus* sp. A-3 suşundan enzim üretimi, %1'lik çözünür nişasta içeren M9 besiyerinde kültürü yapılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim üretimi bir gecelik taze kültürden %10'luk oranda enzim üretim besiyerine aşılama yapılarak ve 2 gün 37°C de 250 rpm'de inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonrası bakteri hücreleri +4°C'de Hettich Mikro 22R sentrifüjde 4020 g'de 30 dk sentrifüjlenerek uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant (Hücre dışı sıvı kısmı) enzim saflaştırma işlemleri için kullanılmıştır.

### 2.3. Enzim Saflaştırılması

Önceden soğutulmuş etanol, süpernatanta son hacim %75 olacak şekilde eklenmiş ve ertesi güne kadar -20°C' de bekletilmiştir. Ertesi gün, oluşan presipitatlar +4°C'de 4020 g de 30 dk sentrifüjlenerek toplanmış ve çökelti sodyum fosfat (0.1 M, pH 7.0) tamponunda çözülmüştür.

### 2.4. Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi

Enzimin moleküler ağırlığı %10'luk SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ile belirlenmiştir. Moleküler marker olarak, porcine myozini (200 kDa), *E. coli*  $\beta$ -galaktozidazı (116 kDa), tavşan kası fosforilazı b (97 kDa), sığır albümini (66 kDa), ovalbumin (45 kDa) ve sığır eritrosit karbonik anhidrazı (29 kDa) içeren SDS6H2 (SIGMA) kullanılmıştır. Protein bantları daha sonra Coomassie brilliant blue R-250 ile görünür hale getirilmiştir.

Enzimin zimogram analizleri ise çözünür nişasta (%1 w/v) içeren SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası jel renatürasyon solüsyonları (Saul vd. 1990) ile muamele edilmiş ve plastik saklama kabı içerisinde 35°C'de 4-6 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası enzim aktivite bantları jelin iyot çözeltisi (KI: 5 g/L,  $\text{I}_2$ :0.5 g/L) (Hashim vd. 2004) içerisinde bekletilmesi ile belirlenmiştir.

### 2.5. Enzim Aktivite Tayinleri

Alfa-amilaz aktivitesi Miller (1951) metoduna göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımları 3 birim %1 lik çözünür nişasta ile 2 birim enzim örneğinden oluşmuştur. 35°C de 30 dk inkübe edilen karışım üzerine 5 birim 3,5-dinitrosalisilik asit ilavesi sonrası 5 dk kaynatılarak enzimatik reaksiyon durdurulmuş ve 550nm de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir (Perkin Elmer Lambda EZ 150).

### 2.6. Sıcaklık ve pH'nın Enzim Aktivite-Stabilitesi Üzerine Etkisi

Amilaz aktivitesinin optimum pH ve sıcaklık değerleri farklı pH (3.0-11.5) ve sıcaklık değerlerinde (4-90°C) çalışılarak belirlenmiştir. Bunun için sitrat tamponu (pH 3.0-5.5), Na-fosfat tamponu (pH 6.0-7.5), Tris tamponu (pH: 8.0-9.0) ve borax tamponu (pH 9.0-12.0) kullanılmıştır. Enzimin sıcaklık stabilitesi ise 4-90°C arasında optimum pH'da 15 ve 30 dk'luk ön inkübasyon sonrası belirlenmiştir. Diğer taraftan pH stabilitesi ise enzimin optimum sıcaklıkta ön inkübasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bütün bu işlemlerden sonra kalan aktivite için standart enzim aktivitesi tayini ile olmuştur. Enzime tuzun (NaCl) 0.1 ile 4.0M arasında değişen konstrasyonlarda etkisi de ayrıca test edilmiştir.

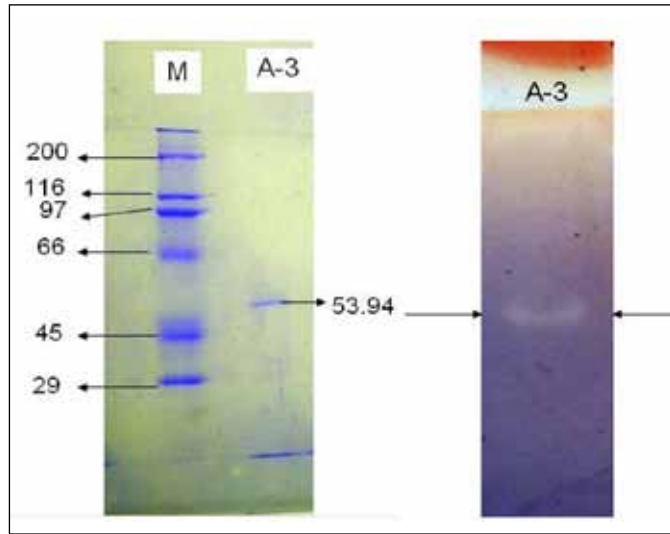
Denemeler 3'er tekrarlar şeklinde yapıp ortalamaları alınmıştır.

### 2.7. Bazı Kimyasal ve İnhibitörlerin Enzim Üzerine Etkisi

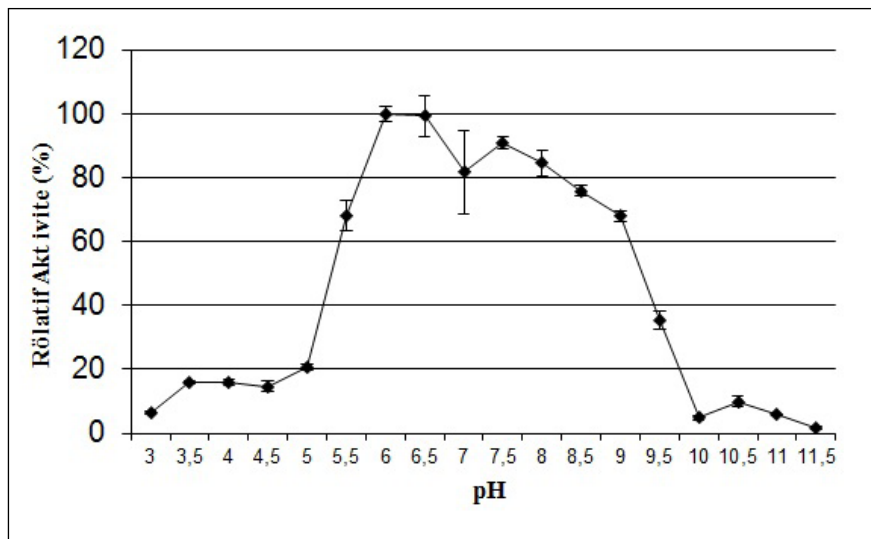
Metaller, şelatör, deterjan ve inhibitör gibi kimyasalların amilaz üzerine etkisi farklı konsantrasyonlarda söz konusu kimyasalların optimum sıcaklık ve pH'daki ön inkübasyonu ile belirlenmiştir.

### 2.8. Enzimatik Reaksiyon Sonucu Açığa Çıkan Son Ürünlerin Saptanması

Enzimatik hidroliz sonucu açığa çıkan ürünler alüminyum oksit 60 F<sub>254</sub> neutral TLC plakalar (Merck) üzerinde belirlenmiştir. Bunun için çözünür nişastadan (%0.5 w/v)



Şekil 1. *Bacillus* sp. A-3'ün alfa amilaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram analizi. M: Marker (Sigma SDS6H2).



Şekil 2. *Bacillus* sp. A-3'ün alfa-amilaz enzimine ait optimum pH grafiği.

oluşan substrat 35°C'de enzim ile bir saat inkübe edildikten sonra plakalar üzerine yüklenmiş ve bütanol-asetik asit- distile su'dan (3:1:1 v/v/v) oluşan çözücü sistemde kromatografi gerçekleştirilmiştir. Ürünlerin görünür hale gelmesi için de etil alkolde hazırlanmış %20'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi plakalara püskürtülmüş ve 120°C'de fırınlanmıştır (Aygan vd. 2008).

### 3. Sonuçlar

Kahramanmaraş'ın farklı bölgelerinden alınan toprak örneklerinden toplamda 241 *Bacillus* sp. izolasyonu yapılmıştır. Bu suşlardan petri kabında en yüksek amilaz zonuna sahip olan A-3 ileri araştırmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Geniş, yaygın, beyaz ve dalgalı kenarlı koloni morfolojisi ile aerobik, gram pozitif, çubuk formunda, sporlu, hareketli, katalaz pozitif bir özellik sergileyen suş *Bacillus* sp. A-3 olarak tanımlanmıştır. *Bacillus* sp. A-3 suşu petride pH 5.0-7.0 arasında enzim sentezi gerçekleştirirken maksimum amilolitik aktivitesini optimum 37°C sıcaklık ve 6.5 pH değerlerinde göstermiştir. pH 8.0 ve üzerinde bakteriyel üreme görülmesine rağmen hidroliz zonu gözlenmemiştir.

#### 3.1. Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi

Saflaştırılan enzim %10'luk SDS-PAGE'de 53.94kDa ağırlığında tek bant vermiştir (Şekil 1). Zimogram analizi ise çözünür nişasta içeren SDS-PAGE jelinin elektroforezden sonra enzimin renatürasyonu (Saul vd. 1990) ile gerçekleştirilmiştir. Jel in iyot çözeltisi (Hashim vd. 2004) ile boyanması neticesinde aktivite zonu gözlenmiştir.

#### 3.2. Alfa-Amilaz A-3'ün Özellikleri

*Bacillus* sp. A-3 suşu petride en yüksek pH 7.0'da enzim

sentezine uygun bir şekilde dört farklı tampon sistemi kullanılarak gerçekleştirilen enzimin optimum pH'sı 6.0-6.5 olarak belirlenmiştir (Şekil 2). A-3 Amilaz pH 5.5 ile 9.0 arasında %50 nin üzerinde bir rölatif aktivite gösterirken ortalama %83.51 aktiviteye sahiptir. Enzimin maksimum rölatif aktivite sergilediği sıcaklık ise 35°C'dir ve 25 ile 65°C arasında ortalama %68 bir rölatif aktivite mevcuttur (Şekil 3).  $\alpha$ -amilaz A-3'ün pH stabilitesi ise enzimin 35°C'de 15, 30 ve 60 dk ön inkübasyonu ile belirlenmiştir. Test edilen tüm sürelerde pH 6.0 ile 10.0 arasında en düşük ortalama kalan aktivite %78.7 olmuştur (Şekil 4). Termal stabilite belirlemeleri için enzim 4-90°C arasında pH 6.0'da 15 ve 60 dk lık bir ön inkübasyona bırakılmış ve kalan aktivite ölçümü yapılmıştır. Enzim 40°C ye kadar oldukça termostabil bir özellik sergilemiştir (Şekil 5). Tuzun etkisi 0.1-4.0 M arasında değişen farklı NaCl konsantrasyonları ile test edilmiş ve en yüksek aktivite 1 M ile elde edilmiştir (Şekil 6).

### 3.3. Bazı kimyasal ve inhibitörlerin enzim üzerine etkisi

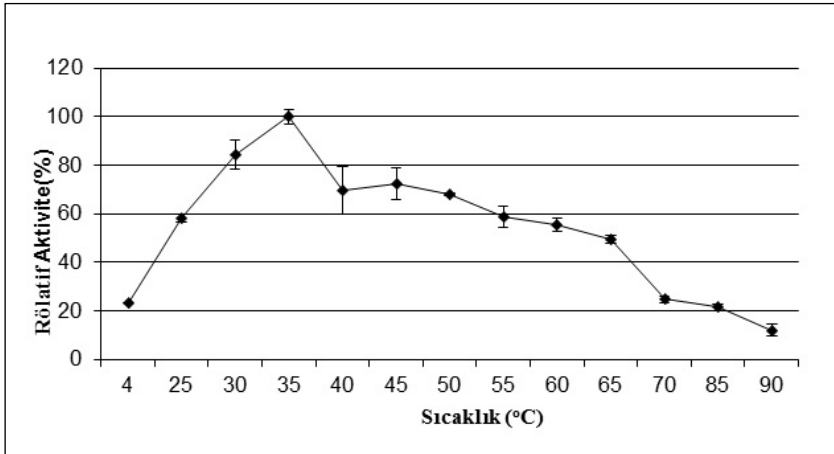
Alfa-amilaz enzimi 5 mM EDTA, %1'lik SDS, 5 mM  $ZnCl_2$ , 5 mM KCl, 5 mM  $Na_2SO_3$ , 5 mM  $CaCl_2$ , %1'lik 2-Merkaptoetanol ve 8 M üre ile pH 6.0'da 30 dk inkübe edilerek kalan aktiviteleri test edilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında en yüksek kalan aktivite %93 ile KCl ve en düşük ise %0.8 ile EDTA'da gözlenmiştir (Şekil 7).

### 3.4. Son Ürünlerin Belirlenmesi

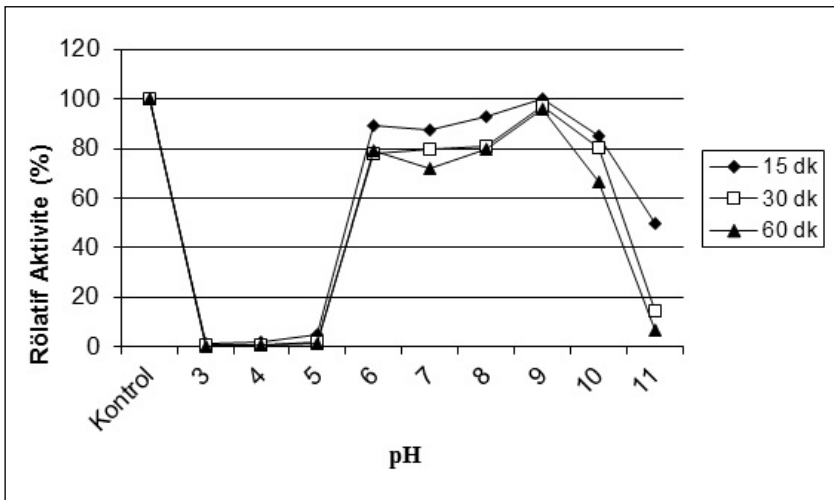
*Bacillus* sp. A-3 amilaz enziminin 35°C sıcaklık ve 6.0 pH koşullarında çözünür nişastayı maltoz ve diğer daha uzun oligosakkaritlere hidroliz ettiği gözlenmiştir (Şekil 8).

## 4. Tartışma

Ekstrasellüler enzim üretmeleri sebebiyle *Bacillus* cinsi bakteriler önemli endüstriyel mikroorganizmalardır. Diğer taraftan amilazlar endüstriyel olarak önemli hidrolitik enzimlerden biridir. Bu çalışmada amilaz üreticisi *Bacillus*



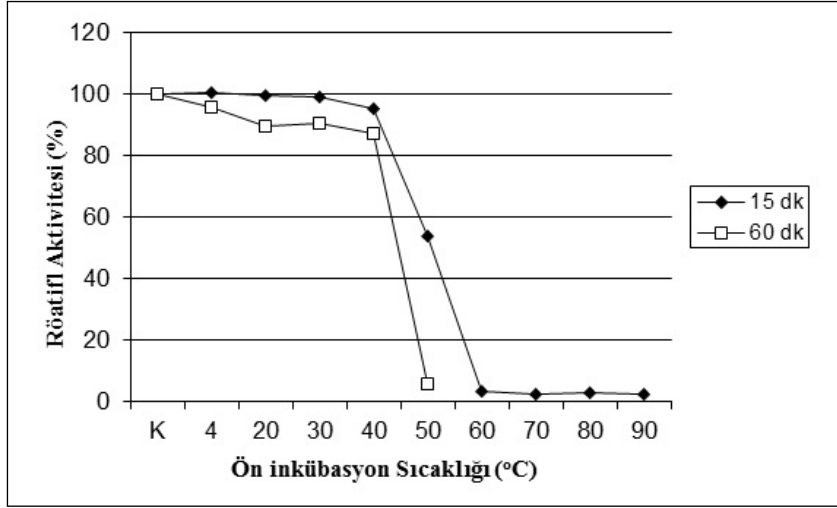
Şekil 3. *Bacillus* sp. A-3'ün alfa-amilaz enzimine ait optimum sıcaklık grafiği.



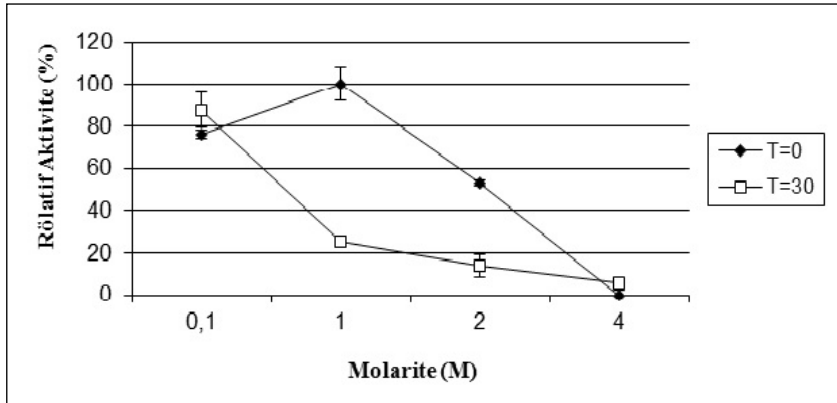
Şekil 4. *Bacillus* sp. A-3'ün alfa-amilaz enzimine ait pH stabilitesi grafiği.

izolasyonu, amilaz üretimi ve enzimin kısmi karakterizasyonu amaçlanmıştır. *Bacillus* sp. A-3 üreme ve enzim sentezi sıcaklığı açısından mezofilik tabiatlı bir suştur. Amilaz üreticisi olarak seçilen en yaygın *Bacillus* suşlarının çoğu *Bacillus* sp. A-3 gibi mezofildir (Syu ve Chen 1997, Vid-

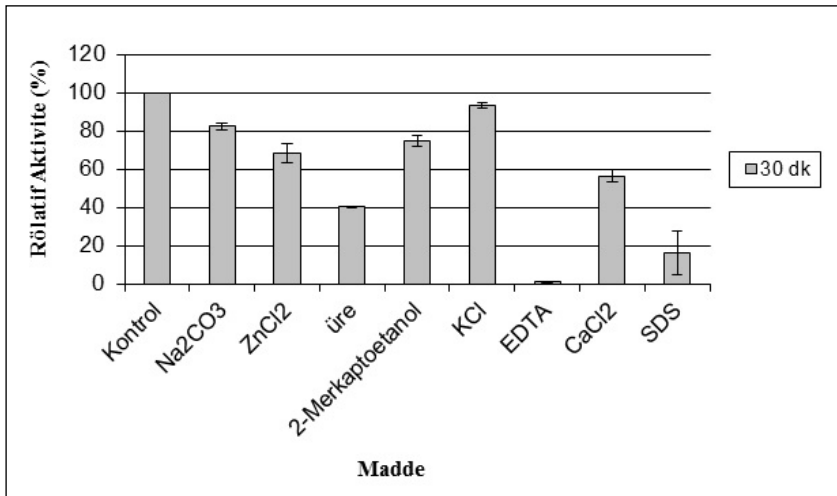
yalakshmi vd. 2009, Sharma ve Satyanarayana 2010). A-3 suşuna ait alfa-amilaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE analizinde 53.94 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 1). *Bacillus*'lardan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin moleküler ağırlıklarının 42-70 kDa aralığında olduğunu bildiren



Şekil 5. *Bacillus* sp. A-3'ün alfa-amilaz enzimine ait sıcaklık stabilitesi grafiği.



Şekil 6. *Bacillus* sp. A-3'ün alfa-amilaz enzimi üzerine NaCl'in etkisi (T: Önkübasyon Süresi, dk).



Şekil 7. Bazı kimyasal maddelerin A-3 alfa-amilazı üzerine etkisi.



**Şekil 8.** *Bacillus* sp. A-3 alfa-amilaz enzimine ait ince tabaka kromatografi bulguları (N: Enzim ilave edilmemiş nişasta çözeltisi, M: Maltoz, G: Glukoz, A-3: Alfa-amilaz enzimi hidroliz ürünleri).

çok sayıda bulgu mevcuttur (Igarashi vd. 1998, Beg vd. 2001, Das vd. 2004).

A-3 alfa-amilazı optimum 6.0-6.5 olmak üzere 5.5 ile 9.0 pH aralığında yüksek bir aktivite göstermiştir. Farklı *Bacillus* suşlarından elde edilen çoğu amilazın 5.0-7.0 arasında optimum aktivite sergilediği bilinmektedir (Vihinen ve Mantsala 1990; Kumar vd, 1990; Wind vd, 1994).

A-3 alfa-amilazının sıcaklık aktivite profili oldukça geniş olup 25 ila 65°C arasında ortalama %68'lik rölatif aktiviteye sahiptir. Bu durum enzimin değişken veya kontrolsüz sıcaklık şartlarında tercih edilebilirliğini artırmaktadır. Ayrıca 70°C ve üzerindeki sıcaklıklarda aktivite kaybı ve 60°C'de 15 dk dahi stabil kalamayarak (Şekil 5) enzimatik aktivitenin sonlanması enzimi unlu mamul endüstrisinde önemli kılmaktadır (Coronado vd. 2000). Literatür verilerine bakıldığında birçok *Bacillus* sp.'den elde edilen enzimlerin optimum sıcaklıklarının 50-90°C arasında olduğu görülmektedir (Sivaramakrishan vd. 2006, Gupta vd. 2003). Bu tür *Bacillus* amilazlarına göre A-3 amilazın düşük sıcaklıklarda (35°C) aktivite göstermesi de birçok diğer endüstriyel uygulamalar için cazip kılar. A-3 amilaz alkali bir enzimi olmamasına rağmen pH 6.0 ila 10.0 arasında oldukça yüksek bir stabilite göstermiş olması, enzime alkalın ortamlarda da kullanım imkanları tanımaktadır (Şekil 2 ve 4).

EDTA ile tam bir inaktivasyon gerçekleşirken enzimin aktivasyonu ve stabilitesi için  $Ca^{+2}$  'a karşı herhangi bir ihtiyaç göstermemiştir (Şekil 7). Amilaz aktivitesinde çinko güçlü bir inhibitör olabildiği gibi etkisiz de olabilmektedir (Kim vd. 1995; Mamo ve Gessesse 1999; Demirkan vd. 2005). Enzimin sodyum sülfitten pek fazla etkilenmemesi ise hurda kâğıt endüstrisi için önem arz eder. Halofilik tabiat göstermeyen A-3 amilaz enzimi ince tabaka kromatografisi analizine göre son ürün olarak maltoz ve daha uzun yapıdaki diğer oligosakkaritleri oluşturmuştur.

Özetle, genel olarak güvenli kabul edilen *Bacillus* cinsi önemli bir mikrobiyal enzim kaynağıdır. *Bacillus* sp. A-3 den üretilen alfa-amilaz enzimi de bu çalışmada ortaya konan özellikleri ile unlu mamul sanayiinde, biyoetanol üretiminde ve kâğıt endüstrisinde önemli bir yer teşkil edebilecek potansiyelindedir.

## 5. Kaynaklar

- Aygan, A., Arıkan, B., Korkmaz, H., Dincer, S., Colak, O. 2008. Highly thermostable and alkaline alpha amylase from Halotolerant- alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Braz. J. Microbiol.*, 39: 547-553.
- Bachmeier, K., Williams, A.E., Warmington, J., Bang, S.S. 2002. Urease Activity in Microbiologically-Induced Calcite Precipitation. *J. Biotechnol.*, 93: 171-181.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 56: 326- 338.
- Bernhardsdotter, ECMJ., Ng, JD., Garriott, OK., Pusey, ML. 2005. Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant  $\alpha$  amylase from alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711. *Process Biochem.*, 40: 2401-2408.
- Coronado, MJ., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., Nieto, J.J. 2000. Production and biochemical characterization of an  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol., Lett.*, 183: 67-71.
- Das, K., Doley, R., Mukherjee, AK. 2004. Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the tradition fermented food of India. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40: 291-298.
- Demirkan, E.S., Bunzo, M., Adachi, M., Higasa, T. Utsumi, S. 2005.  $\alpha$ -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. *Process Biochem.*, 40:2529-2636.
- Godfrey, T., West, S. 1996. Introduction to Industrial Enzymology. (T.Godfrey and S. West editör) Industrial Enzymology, 2nd Edition, Stockton Pres, New York.

- Gubta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.*, 38: 1599-1616.
- Hashim, SO., Delgado, O., Hatti-Kaul, R., Mulaa, FJ., Mattiasson, B. 2004. Starch hydrolysing *Bacillus halodurans* isolates from a Kenyan soda lake. *Biotechnol. Lett.*, 26: 823-828.
- Hols, P., Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Delcour, J. 1994. Use of expression secretion signals and vector free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for amylase and levanase expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1401-1403.
- Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Eumura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T., Ito, S. 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid. *J. Microbiol.*, 33:57-61.
- Ivanova, V., Yankov, D., Kabaivanova, L., Pashkoulov, D. 2001. Simultaneous biosynthesis and purification of two extracellular *Bacillus hydrolases* in aqueous two alpha-amylase. *Biochem. Eng. J.*, 8: 61-81.
- Kıran, OE., Comlekcioglu, U. 2003. Zeytinli İlçesi (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretim Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi. *KSU Fen Mub. Derg.* 6: 41-48.
- Kim, TU., Gu, BG., Jeong, JY., Byun, SM., Shin, YC. 1995. Production and characterization of a maltotetraose-forming alkaline  $\alpha$ -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3105-3112.
- Kumar, SU., Rehana, F., Nand, K., 1990. Production of an Extracellular Thermostable Calcium-Inhibited H-amylase by *Bacillus licheniformis* MY 10. *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 714-719.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Mahdavi, A., Sajedi, RH., Rassa, M., Jafarian. V. 2010. Characterization of an  $\alpha$ -amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain. *Iran. J. Biotechnol.*, 8: 103-111.
- Mamo, G., Gessesse, A. 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 25: 433-438.
- Miller, GL. 1951. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 426-428.
- Ozcan, BD., Baylan, M., Ozcan, N., Tekdal, D. 2010. Characterization of thermostable  $\alpha$  -amylase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate DM-15. *Res. J. Biol. Sci.*, 5: 118-124.
- Rao, MB., Tanksale, AM., Gathe, MS., Deshpande, VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 597-635.
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, KL., Tanticharoen, M. 1999. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Appl Environ Microbiol.*, 65: 694-697.
- Reddy, NS., Nimmagadda, A., Sambasiva Rao, KRS. 2003. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. *Afr. J. Biotechnol.*, 2: 645-648.
- Saul, DJ., Williams, LC., Grayling, RA., Chamley, LW., Love, DR., Bergquist, PL. 1990. celB, A gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3117-24.
- Schallmeyer, M., Singh., A., Waerd, OP., 2004. Developments in the Use Of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Can. J. Microbiol.*, 50:1-17.
- Sharma, A., Satyanarayana, T. 2010. High maltose-forming, Ca<sup>2+</sup>-independent and acid stable  $\alpha$ -amylase from a novel acidophilic bacterium, *Bacillus acidicola*. *Biotechnol. Lett.*, 32: 1503-1507.
- Shibuya, I., Imura, Y., Ishikawa, T., Oucki, K., Matsuyama, A., Yamamoto, T., 1986. Isolation and Characterization of Starch Utilizing Mutants of *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 875-882.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, KM., Sccol, CR., Pandey, A. 2006.  $\alpha$ -Amylases from Microbial sources-An Overview on Recent Developments. *Food Technol Biotechnol.*, 44: 173-184.
- Syu, MJ., Chen, YH. 1997. A study on the  $\alpha$ -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chem. Eng. J.*, 65: 237-247.
- Vidyalakshmi, R., Paranthaman R., Indhumathi, J. 2009. Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World J. Chem.*, 4 (1): 89-91.
- Vihinen, M., Mantsala, P., 1990. Characterization of a Thermostable *Bacillus stearothermophilus* -  $\alpha$ -Amylase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12: 427-435.
- Wind, RD., Buitelaar, RM., Eggink, G., Huizing, HJ., Dykhulzen, L., 1994. Characterization of a New *Bacillus stearothermophilus* Isolate : A Highly Thermostable  $\alpha$ - Amylase Producing Strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 155-162