



Amylase Production of *Bacillus subtilis* Isolated from Soil by SmF Method

Veysi ORTAKAYA ¹, Sema AGÜLOĞLU FİNCAN ^{*2}
ORCID: 0000-0001-5850-3944; 0000-0003-0147-4411

¹ Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Diyarbakır, Turkey

² Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Diyarbakır, Turkey

Abstract

In our study, the isolation, identification and optimization of *Bacillus subtilis* from soil samples were performed and the ability to produce α -amylase of industrial importance was investigated. Bacteria identified as *B. subtilis* by 16S rRNA analysis, morphological and biochemical tests. Maximum growth was determined at 32 hour, 37°C and pH 7.0. Enzyme optimization was performed after determination of bacterial amylase in starchy medium. Optimum conditions for amylase production were determined as 37°C, pH 7.0 and 48 h. When the effect of metals on enzyme activity was examined, it was determined that Cu²⁺ increased enzyme activity, Zn²⁺, Hg²⁺ and Fe²⁺ were partially inhibited the enzyme activity, and Ca²⁺ was showed close activity to the control. It was observed that carbon sources had inhibitory effect on bacterial growth and enzyme production.

Key words: *Bacillus subtilis*, identification, α -, -amylase, production, characterization

----- * -----

SmF yöntemiyle topraktan izole edilen *Bacillus subtilis*'den amilaz üretimi

Özet

Çalışmamızda Ergani Makam Dağı'ndan alınan toprak örneğinden *Bacillus subtilis*'in izolasyonu, tanımlanması ve optimizasyonu gerçekleştirilerek endüstriyel öneme sahip α -amilaz üretme yeteneği araştırıldı. Morfolojik ve biyokimyasal testler ile 16S rRNA analizi yapılarak *B. subtilis* olarak tanımlanan bakterinin 32. saat, 37 oC ve pH 7.0' de maksimum üreme gösterdiği tespit edildi. Nişastalı besiyerinde bakterinin amilaz ürettiği tespit edildikten sonra enzim optimizasyonu yapıldı. Amilaz üretimi için optimum koşullar 37 oC, pH 7.0 ve 48. saat olarak belirlendi. Enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi incelendiğinde Cu²⁺' nın enzim aktivitesini artırdığı, Zn²⁺, Hg²⁺ ve Fe²⁺ enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği, Ca²⁺ ise kontrole yakın bir değer gösterdiği görüldü. Karbon kaynaklarının bakteri gelişimi ve enzim üretimi üzerine inhibisyon etkisi yapıldığı gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: *Bacillus subtilis*, tanımlama, α -, -amilaz, üretim, karakterizasyon

1. Giriş

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimlerin, hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olup geniş endüstriyel uygulamalara sahiptirler. Aynı zamanda birçok biyoteknolojik süreç ve üründe anahtar olarak rol almaktadır [1]. Enzim teknolojisinin hızla gelişmesi, elde edilen ürünlerin uygulama alanlarının genişliği ve ayrıca ekonomik avantajı gibi nedenlerden dolayı bu yöndeki araştırmalar daha fazla önem taşımaktadır [2-4]. Özellikle düşük sıcaklıkta aktif olan enzimler; endüstriyel süreçleri sonunda doğallığını bozmazken aynı zamanda üretim maliyetlerini de düşürdüğü için birçok prosede tercih edilmektedir [5]. Termotabil enzimlere yoğun ilgi olsa da yakın gelecekte amilaz mühendisliğinin odak noktasında değişim olacaktır [6]. α -Nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden amilaz (EC 3.2.1.1), bilinen en eski endüstriyel enzim olup yiyecek, içecek, nişasta, deterjan, tekstil, tıpve analitik alanlarda geniş çapta kullanılmaktadır.

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905322678815; Fax.: +905322678815; E-mail: semaguloğlu@hotmail.com

Endüstriyel enzimlerin %90 civarı mikroorganizmalardan elde edilmektedir [7]. Bunun nedeni; mikrobiyal enzimlerin daha yüksek katalitik aktivite göstermesi, daha kararlı ve ekonomik olması, toksik olmaması ve yüksek miktarlarda üretilmeleridir [8]. Pek çok mikrobiyal enzimin doğada geniş bir yayılış alanına sahip olan *Bacillus* türleri ve alt türleri türler tarafından sentezlendiği bilinmektedir. [9,10]. 1970'lerden itibaren α -amilazların endüstriyel uygulamalarında, *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B.stearothermophilus* ve *B. licheniformis* türleri kullanılmaktadır [11].

Bu çalışmada topraktan izole edilerek *Bacillus subtilis* olarak tanımlanan mikroorganizmanın optimizasyonu ile a-amilazın üretimi ve karakterizasyonu gerçekleştirildi.

2. Materyal ve yöntem

Topraktan izole edilen *B. subtilis* NBA kültür ortamında üretilip, gram boyama, nişasta hidroliz testi, üreaz testi, hareket testi, hemoliz testi gibi morfolojik ve biyokimyasal tanımlamaya yönelik testlere tabi tutuldu.

B. subtilis pH 7.0, 37 °C' de 48 saatlik inkübasyon sonrası kültür ortamı santrifüjlenerek Bernfeld metoduna göre enzim aktivitesine bakıldı [12]. Protein miktarı Lowry metoduyla tayin edildi [13]. Enzim substrat ile (%0.5' lik nişasta çözeltisi) 37 °C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurucu olarak DNS (Dinitro salisilik asit) ilave edildi. DNS, sıcakta şekerlerin indirgen uçlarıyla reaksiyona girerek reaksiyonu durdurur ve renk oluşumunu sağlayarak spektrofotometrede ölçülmesini sağlar.

2.1 *B. subtilis* ve Amilaz Üretimine Sıcaklık, pH ve İnkübasyon Süresinin Etkisi

B. subtilis ekilerek 25 - 55 °C sıcaklıklarında üremeve amilaz üretimi için optimal değerleri belirlendi. Bakteri gelişimi ve enzim üretimi üzerine pH etkisini belirlemek amacıyla pH4.0 ile 11.0 arasındaki pH' larda bakteri üretildi enzim aktivitesi ölçüldü. Bakterinin gelişimi ve amilaz üretimine inkübasyon süresinin etkisini incelemek için 4-96 saatleri örnek alınarak ölçümleri yapıldı. Aktivite tayini için enzim kaynağı olarak üst sıvı kullanıldı.

2.2 *B. subtilis* ve Amilaz Üretimi Üzerine Karbon (C) ve Azot (N) Kaynakları Etkisi

Nişasta, glukoz, sükroz ve galaktoz, maltoz, laktöz ve fruktoz azot kaynağı olarak tercih edilirken, karbon kaynağı olarak ta pepton, tripton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum nitrat ve sodyum nitrat kullanıldı.

2.3 Amilaz Aktivitesine Sıcaklık ve pH Etkisi

Amilaz aktivitesine sıcaklık ve pH etkisi deneyinde; 20 °C'den 60 °C'ye ve pH 4.0 ile 11.0'e kadar değişen değerlerde çalışıldı. Amilaz aktivitesi ölçülerek rölatif enzim aktivitesi hesaplandı.

2.4 Amilaz Aktivitesi Üzerine Deterjan ve Metal Etkisi

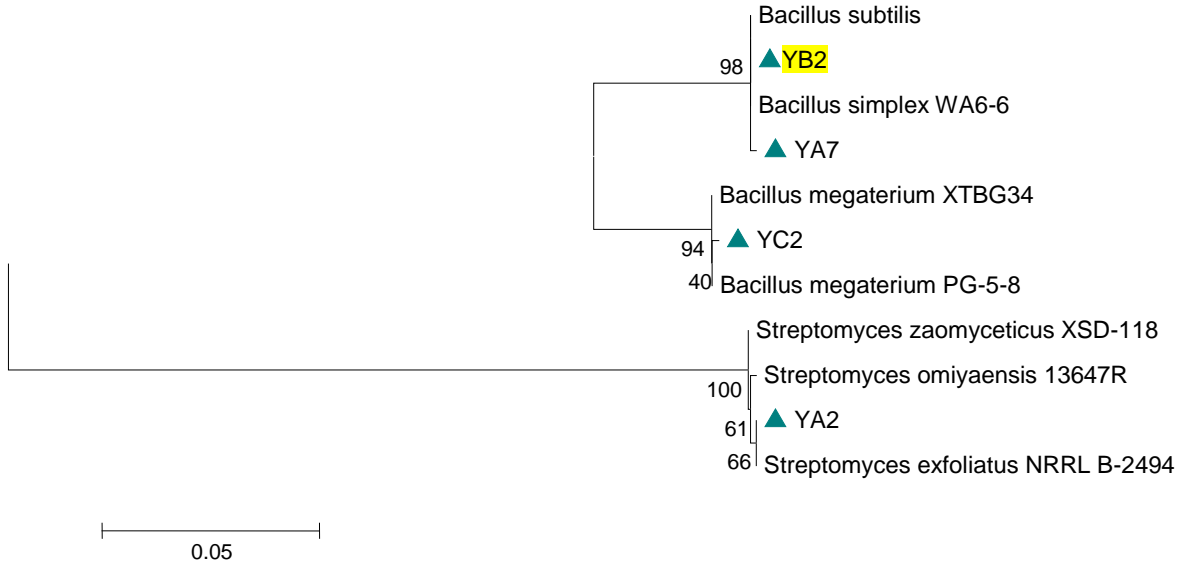
Amilaz aktivitesine CaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, HgCl₂, MnCl₂ ve FeCl₂ etkisini saptamak için 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda, final konsantrasyonu 1.5 mM olacak şekilde metal çözeltileri hazırlandı.

0.1 M pH 7.0Tris-HCl'de hazırlanan %0.5 oranında SDS, Tween-80, Triton X-100 ve Brij kullanılarak enzim aktivitesi üzerine deterjan etkisi deneyi gerçekleştirildi.

3. Bulgular

Tanımlamaya yönelik yapılan *B. subtilis*' e ait morfolojik ve biyokimyasal testler çizelge 1'de gösterilmiştir. Ergani Makam Dağı'ndan izole edilerek tanımlanan *B.subtilis*'in filogenetik ağacı Şekil 1'de verilmiştir.

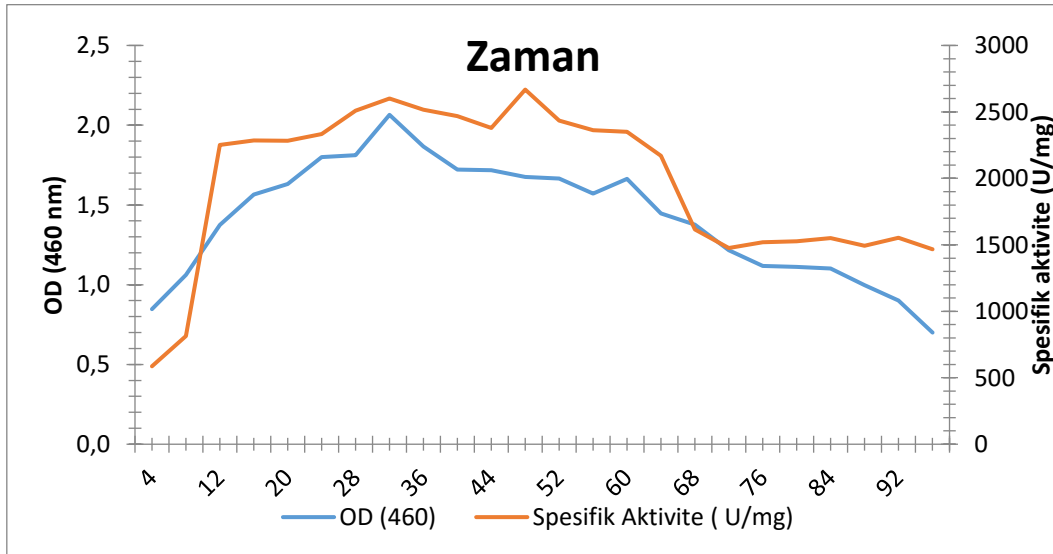
Tablo 1. <i>B. subtilis</i> 'in belirlenmesinde kullanılan morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları		
Özellikleri	A8	Bacillus
Gram boyama	(-)	D
Koloni morfolojisi	Basil	Basil, Kok, virgül
Hareketlilik	Hareketsiz	Hareketli-Hareketsiz
Katalaz	(+)	(+)
Hemoliz	(+)	D
Üreaz	(+)	(+)
Nişasta+NBA	(+)	(+)
Şeker (Glukoz, laktöz Sukroz)	(-)	(-)
Sıcaklık aralığı	20-45	20-75
pH aralığı	10-4	4-10
(+) pozitif sonuç (-) negatif sonuç (D) değişken		



Şekil 1. *B. subtilis*'in filogenetik ağacı

3.1 İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi ve α -amilaz üretimi üzerine etkisi

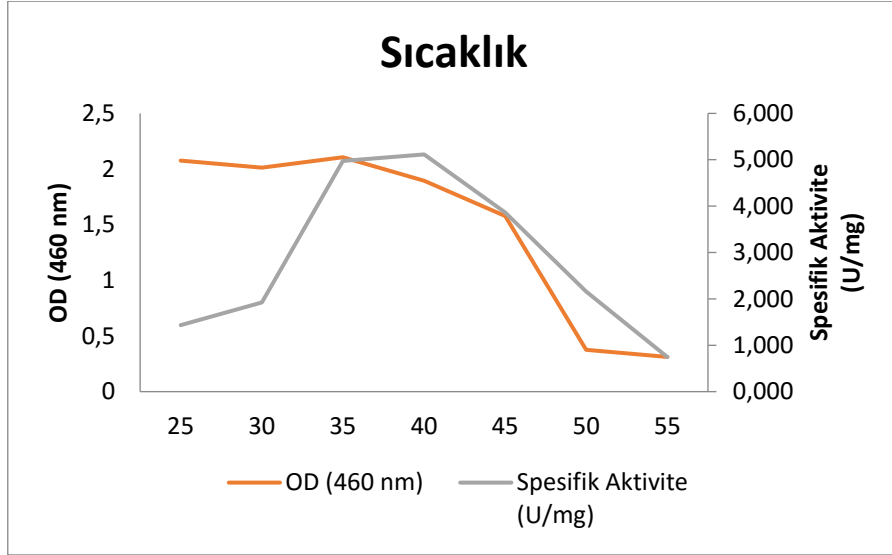
Farklı inkübasyon sürelerinin *B. subtilis*'in üremesi ve enzim üretimine olan etkisini incelemek amacıyla 4-96. saatleri arasında yapılan incelemede en iyibakteri üremesinin 32. saatte, enzim üretiminin ise 48. saat olduğu Şekil 2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi ve α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

3.2 Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi ve α -amilaz üretimi üzerine etkisi

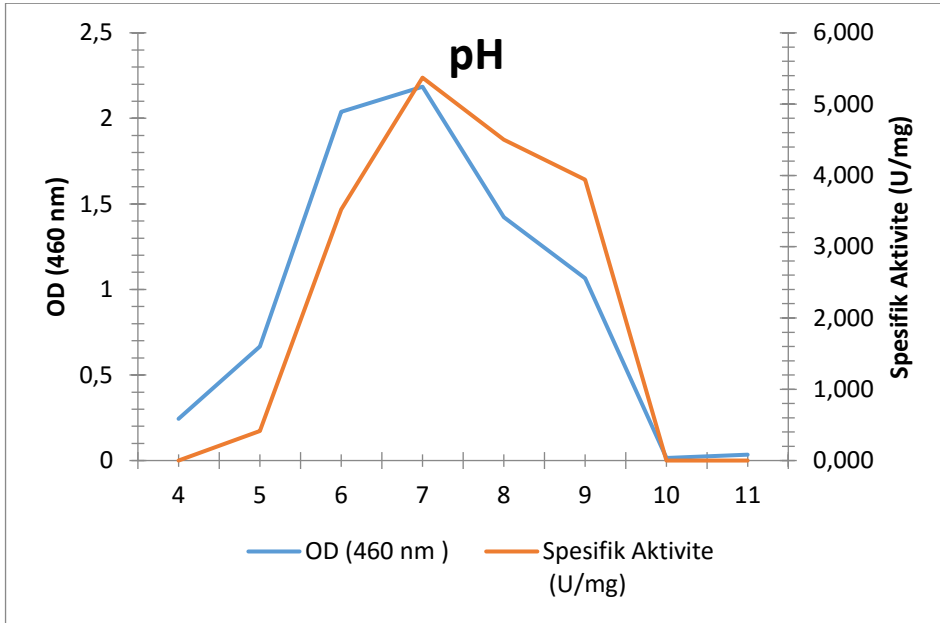
Sıcaklık etkisini araştırmak için; 25 °C 'den 55 °C 'ye kadar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda gerek bakteri üremesi gerekse enzim üretimi için en iyi sıcaklık 37 °C olarak tespit edildi. (Şekil 3.)



Şekil 3. Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi ve α-amilaz üretimi üzerine etkisi

3.3 pH'nın mikroorganizma gelişimi ve α-amilaz üretimi üzerine etkisi

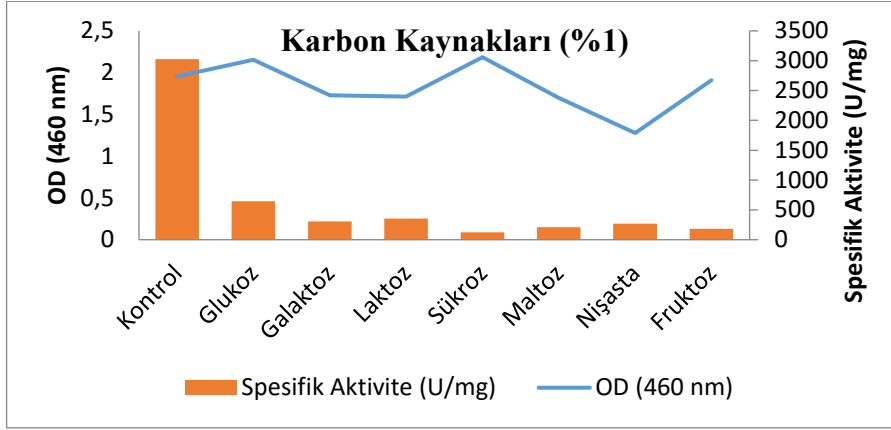
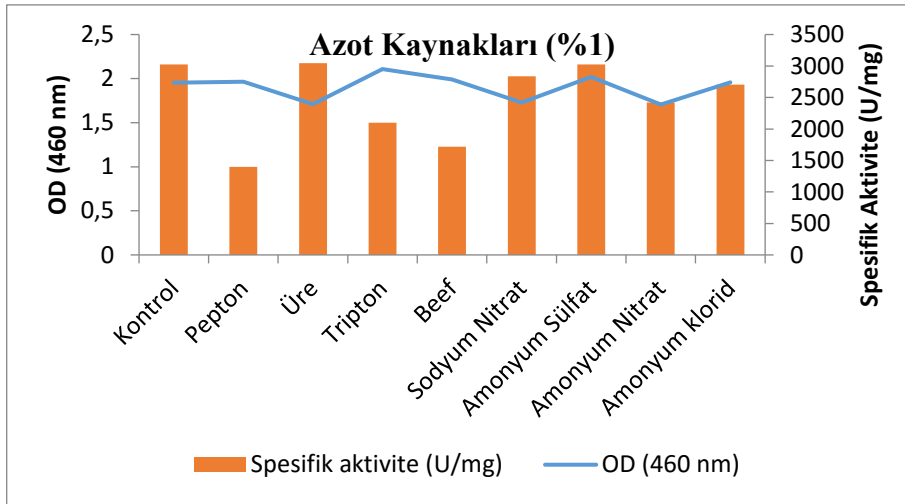
pH 4.0' den pH 11.0'e kadar değişik pH'larda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda şekil 4'te görüldüğü gibi bakteri gelişimi ve enzim için optimum pH'sı 7.0 olarak belirlendi.



Şekil 4. pH'nın mikroorganizma gelişimi ve α-amilaz üretimi üzerine etkisi

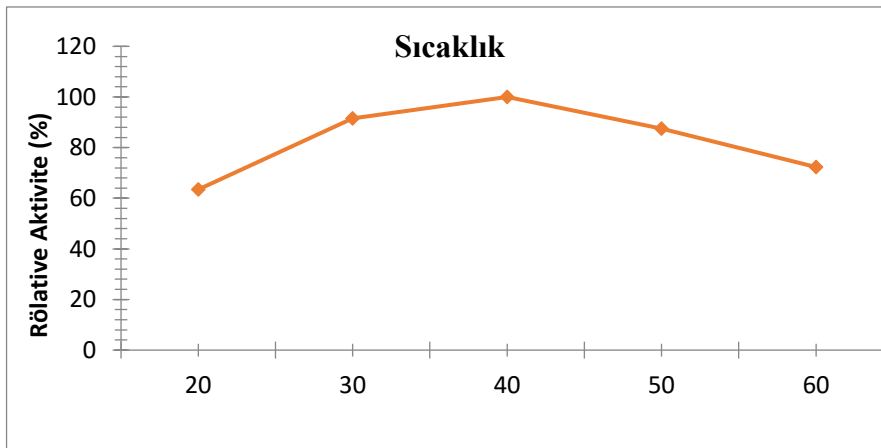
3.4 B. subtilis ve α-amilaz üretimine üzerine c ve n kaynakları etkisi

NB besiyerine %1'lik karbon ve azot kaynakları (Şekil 5); %1'lik azot (Şekil 6) ayrı ayrı eklendi. Bu besiyerlerine ekim yapılarak 48 saat ve 37 °C'de inkübasyona bırakıldı ve enzim aktivite testi yapılarak protein miktarına bakıldı. Bu şekilde spesifik aktivite (U/mg) hesaplandı.

Şekil 5. *B. subtilis* ve α -Amilaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisiŞekil 6. *B. subtilis* ve enzim üretimine azot kaynakları etkisi

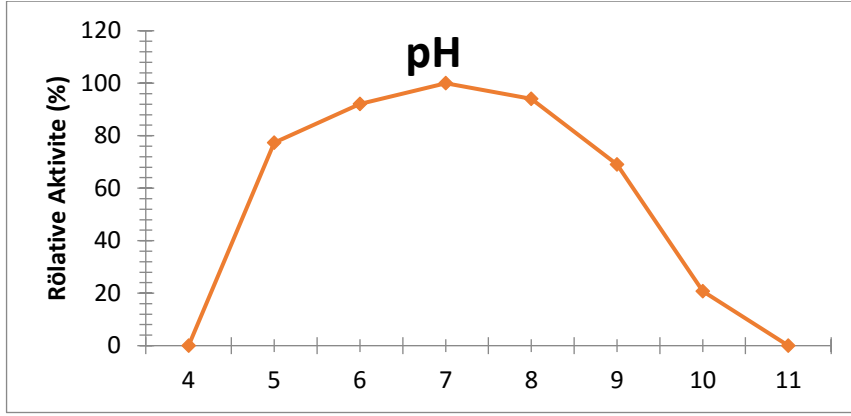
3.5 α -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Optimum koşullarda üretilen mikroorganizmadan elde edilen üst sıvı kullanılarak 20-60 °C aralığında yapılan sıcaklık çalışmasında maksimum enzim aktivitesi için en iyi sıcaklık değeri 40 °C olarak bellirlendi (Şekil 7).

Şekil 7. α -Amilaz aktivitesine sıcaklık etkisi

3.6 Enzim aktivitesine pH etkisi

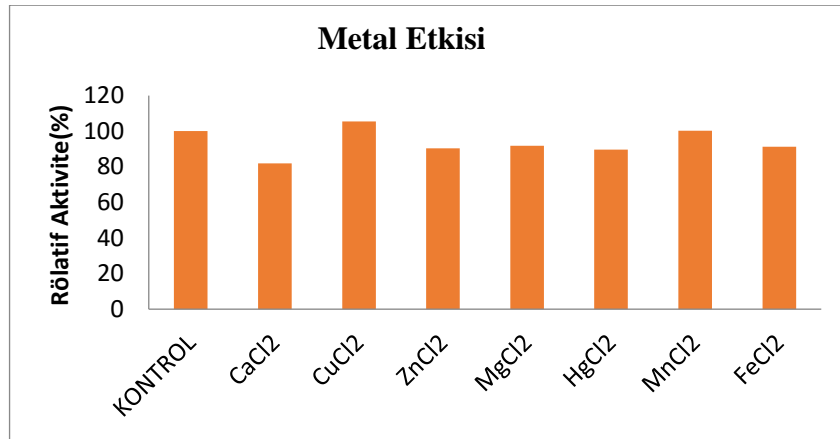
Optimum koşullarda üretilen mikroorganizmanın inkübasyon sonrasında; pH 4.0-11.0 aralığında yapılan pH deneylerinde amilaz aktivitesinin pH 7.0'de en yüksek değerde olduğu tespit edildi Şekil 8.



Şekil 8. α-Amilaz aktivitesine pH etkisi

3.7 Amilaz aktivitesine bazı metallerin etkisi

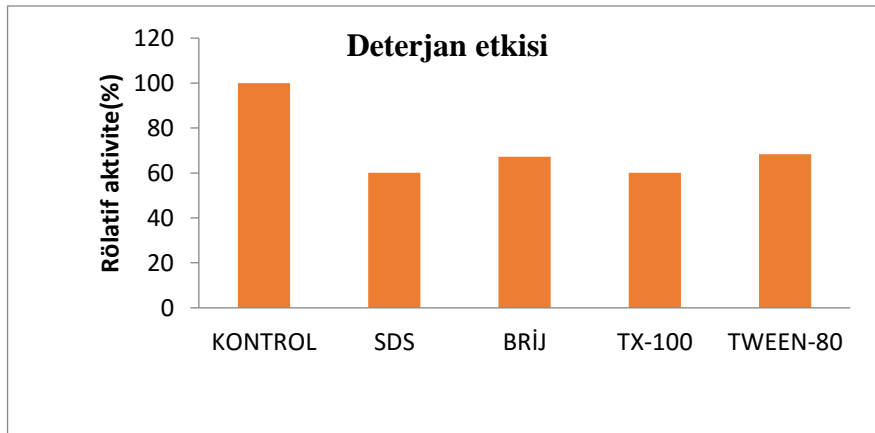
Amilaz aktivitesine metallerin etkisini saptamak için CaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , MgCl_2 , HgCl_2 , MnCl_2 ve FeCl_2 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl'de 1.5 mM konsantrasyonda olacak şekilde 30 dakika bekletildi ve enzim aktivitesini test edildi. Kontrolle kıyaslandığında enzimin tüm metallere direnç gösterdiği tespit edildi Şekil 9.



Şekil 9. α-Amilaz aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisi

3.8 α-Amilaz aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisi

Optimum koşullarda üretilen *B. subtilis*'ten elde edilen enzim aktivitesi üzerine deterjan etkisi incelendiğinde deterjanların % 40 civarında azalmaya neden olduğu görüldü. Enzim aktivitesi üzerine deterjan etkisi Şekil 10.'da verilmiştir.



Şekil 10. α-Amilaz aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisi

4. Sonuçlar ve tartışma

α -Amilaz önemli ve en eski endüstriyel enzimlerden biridir. Doğada çoğu organizma amilaz üretir, fakat bunlardan çok azı doğal nişastayı parçalama yeteneğinde olan amilazları üretebildiğinden doğal nişasta hidrolizi için yeni enzim kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır [14]. Çalışmamızda *B. subtilis*'den α -amilaz üretimi üzerine fiziksel parametrelerin etkisini araştırarak optimum koşulları belirleme yoluna gidildi. Toprakten izole edilen *B. subtilis*'in üremesi üzerine sıcaklığın, pH'nın ve inkübasyon süresinin etkisi çalışıldı. Bakterinin optimal değerleri 37 °C, pH 7.0 ve 32. saat olarak tespit edildi. Bakterilerin enzim üretim kapasiteleri buldukları ortama bağlıdır ve bu ortam şartlarının değiştirilmesi enzim üretimine etki etmektedir. Özellikle besiyerinin sıcaklığı, pH'ı, havalandırılması, inkübasyon miktarı, inkübasyon süresi gibi faktörler oldukça etkilidir [15]. Mikroorganizma, büyüme ortamındaki besin azalınca durağan evreye girerek sekonder metabolit üretir, enzim sentezinde azalış görülür [16]. Ayrıca besi ortamındaki diğer bileşikler ile etkileşir ve enzim denatürasyonundan dolayı aktivitesinde azalış görülür [17].

Al-Johani ve ark. [18] optimuminkübasyon süresini 48 saat, optimum pH 8.5 ve sıcaklığı 45°C belirtmişlerdir. Asgher ve ark. [19]. *B.subtilis JS-2004* için optimal üreme değerlerini 48 saat, 50°C ve pH 7.0 olarak ifade etmişlerdir. Ortamın fiziksel özellikleri enzimlerin aktiviteleri üzerinde büyük ölçüde etki etmektedir. Enzimler optimum sıcaklık ve pH sınırları içinde en iyi aktiviteyi gösterirler. Bu sınırlar arasında aktivitenin en iyi olduğu optimal değer belirlenir. Ayrıca mikroorganizmaların üremeleri için besiyeri pH'sının optimal sınırları içerisinde bulunması gerekmektedir. Mikroorganizmanın gelişme ortamının pH'sı morfolojik değişimlere yol açmakta ve buna paralel olarak enzim sentezini artırıcı etki yapmaktadır.

Çalışmamızda *B. subtilis*'den elde edilen amilaz için optimum sıcaklık değeri 40 °C, pH değeri ise 7.0 olarak bulunmuştur. 40 °C' nin altında ve üzerinde enzim aktivitesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Diğer yandan pH değerlerine bakıldığında ise pH 7.0' nin altında ve üstünde enzim aktivitesinde azalmalar görülmüştür. Ekstraselüler α – amilaz için optimal pH değerleri 3.0 ile 10.0 arasındadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz ekstraselüler α -amilazın nötral koşullarda maksimum aktivite göstermesi endüstriyel işlemler için uygun olduğunu göstermektedir. Benzer bulgular başka araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir. Rezzukoğlu ve ark. [9] yaptığı çalışmada *Lactococcus sp.* PS-2A α -amilaz üretiminin; optimum 16. saatte, 35 °C ve pH 7.0' de gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir. Ticari öneme sahip *Bacillus* suşlarının üremesive ekstraselüler α -amilaz için optimal pH 6.0- 9.0 olarak rapor edilmiştir. Femi-Ola ve ark. [20] izole ettikleri *Bacillus subtilis* BS5'ten ürettikleri α -amilazın optimal pH 6.0, sıcaklığını ise 50°C olarak belirlemişlerdir. Vidyalakshmi ve ark. [21] submerged fermantasyonla *Bacillus sp.*'den elde ettikleri ekstraselüler amilazı optimize etmişler, en iyi enzim aktivitesini 35 °C ve pH 7.0' de gösterdiğini belirtmişlerdir. Ray ve ark. [22] tuğla toprağından izole edilmiş *Bacillus brevis* MTCC 7521 suşu ile Ca^{+2} bağımsız α -amilaz üretimi çalışmaları yapmışlardır. Enzimin optimal sıcaklık 50°C, pH 6.0 ve inkübasyon süresi 36. saat olarak tespit edilmiştir. Sankaralingam ve ark. [23] yapmış oldukları bir çalışmada SmF yöntemiyle *Bacillus licheniformis*'ten α -amilaz üretimi üzerine inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH'nın etkisini araştırmışlar. Çalışmada α -amilaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin 48. saat, optimum sıcaklığın 30°C ve optimum pH'nın 7.0 olduğu saptanmıştır. Shafiei ve ark. [24] *Nesterenkonio sp.* F suşuna ait ekstraselüler amilazın biyokimyasal karakterizasyonunu yaparak enzimin optimum sıcaklık ve pH'sının 45°C ve pH 7.5 olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada azot kaynaklarının enzim üzerine etkisini belirlemek için besiyerlerine % 1 oranında azot kaynaklarından eklenmiş olup daha sonra hazırlanan besiyerlerine bakteri ekimleri yapılarak inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda yapılan aktivite tayini sonucunda kullanılan azot kaynaklarının amilaz üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Araştırma sonucunda kontrol ile kıyaslandığında, azot kaynaklarında kontrole yakın amilaz aktivitesi elde edildi. Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisine bakıldığında, bütün karbon kaynaklarında kontrole göre daha düşük amilaz aktivitesi elde edildi. Ray ve ark. [22] *B.brevis* MTCC 7521 suşu ile amilaz üretimi çalışmasında azot kaynaklarından et özütünün, pepton, maya özütü ve kazein ile karşılaştırıldığında amilaz üretimini daha çok arttırdığını, asparajın, potasyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve ürenin enzim üretimini azalttığını tespit etmişlerdir.

Enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisi incelendiğinde enzim aktivitesinin metallerden etkilenmediği metallere karşı oldukça dirençli olduğu gözlemlendi. Optimum koşullarda *B. subtilis*'ten üretilen amilaz aktivitesine deterjan etkisi araştırılığında ise deterjanların enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği tespit edildi. Shafiei ve ark. [24] Zn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} ve Al^{+3} iyonları ile amilaz aktivitesinde inhibisyon meydana geldiğini, Ca^{+2} ile enzim aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. %0.5 SDS, %0.2 Triton X-100, Tween 80, Tween 20'ye karşı stabilite gösterdiğini belirlemişlerdir. Ray ve ark. [22] amilaz aktivitesi üzerine Ca^{+2} veya surfaktanların (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, sodyum lauril sülfat % 0.02) enzim aktivitesine etki etmediğini belirtmişlerdir.

Endüstriyel alanlarda tercih edilen enzimlerin, ekonomik yönden kısa zamanda ve az maliyetle yüksek verimle üretilmesi, değişik uygulamalarda kullanılabilir özellikte olması gerekir. Yaptığımız çalışmada amilaz aktivitesine kısa sürede ve düşük sıcaklıkta ulaşıldığı görülmüş, bu fiziksel parametrelerin optimum değerlerinin kullanılmasıyla enzim aktivitesinde artış sağlanabileceği belirlenmiştir. □-Amilaz 40°C'de maksimum aktivite göstermesi özelliği ile düşük ısıda yıkama işlemini gerçekleştiren çamaşır ve bulaşık makinesi deterjanlarının içeriğinde kullanılabilir. Bu konuda yapılacak kapsamlı çalışmalar sonucunda enzim verimi daha da artırılabilir ve endüstride yaygın kullanım alanı bulabilir.

Kaynaklar

- [1]. Saha, B.C., Jordan D.B., Bothast R.J. (2009). Enzymes, industrial (Overview), Encyclopedia of Microbiology. Academic Press, Oxford, 281-294.
- [2]. Ortakaya, V., Ağuloğlu Fincan, S., Enez, B. (2017). α -Amylase from *Bacillus simplex* production, characterization and partial purification, Fresenius Environmental Bulletin, 26, 4446-4455.
- [3]. Ağuloğlu, S., Enez, B. (2014). Purification and characterization of α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. Starch/Stärke 66, 182–189.
- [4]. Ağuloğlu Fincan, S., Enez, B. Ozdemir, S., Matman Bekler, F. (2014). Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. Carbohydrate Polymers, 102, 144-150.
- [5]. Ramya, L. N., Pulicherla, K. K.(2014). Molecular insight into cold active polygalacturonase enzyme for its potential application in food processing, Journal of food science and technology, 52 /9, 5484-5496.
- [6]. Nielsen, J. E., & Borchert, T. V. (2000). Protein engineering of bacterial α -amylases, Biochimica et Biophysica Acta, 1543, 253-274.
- [7]. Gupta, R., Giga, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylase: biotechnological perspective. Enzyme and Microbial Technology, 38, 1599-1616.
- [8]. Wiseman, A. (1987) The Application of Enzymes in Industry, Handbook of Enzymes Biotechnology Second Edition. Chapter 3, 274-373.
- [9]. Rezzukoğlu, İ., Ağuloğlu Fincan, S., Enez, B., (2018) Production and characterization of α -amylase from lactic acid bacteria isolated with whey, Biological Diversity and Conservation, 11 /2, 115-122.
- [10]. Wolfgang, A. (2007). Enzyme in industry: Productions and applications. Third Completely Revised Edition. Wiley –VCH Pres., 489 pp.
- [11]. Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., Moradian, F. (2005). A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from *Bacillus sp.* KR-8104. Enzyme and Microb. Technol., 36, 666-671.
- [12]. Bernfeld P. (1955). Enzymes carbohydrate metabolism, In Methods in Enzymology, Academic Press, 17, 149-158.
- [13]. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry, 193, 265- 275.
- [14]. Sasaki H., Kurosawa, K., Takao, S. (1986). Screening of microorganisms for raw starch saccharifying enzyme production. Agricultural Biology and Chemistry, 50, 1661-1664.
- [15]. Sarıkaya, E., Gürgün, V. (2000). Increase of the α -amylase yield by some *Bacillus* strains. *Turkey J. Biol.*, 24:299-308.
- [16]. Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Szakacs, G., Pandey, A. (2002). Synthesis of α -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Journal of Basic Microbiology, 42, 320-326.
- [17]. Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. (1987). Solid state fermentation for production of α - amylase by *Bacillus megaterium* 16M. Biotechnology Letters, 5, 323-328.
- [18]. Al-Johani N.B., Al-seeni M. N., Ahmed Y. M., (2017). Optimization of alkaline α -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*, Afr J Tradit Complement Altern Med. 14/1, 288-301.
- [19]. Asgher, M., Javaid Asad, M., Rahman, S.U., Legge, R.L. (2007). A thermostable α - amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering, 79, 950–955.
- [20]. Femi-Ola, T.O., Olowe, B.M., (2011) Characterization of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from *Amitermes evuncifer silvestri*. Research Journal of Microbiology, 6: 140-146.
- [21]. Vidyalakshmi, R., Paranthaman and J. Indhumathi, 2009. Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus sp.* World Journal of Chemistry, 4: 89-91.
- [22]. Ray R. C., Kar S., Nayak S., Swain M. R. (2008). Extracellular α -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521, Food Biotechnology, Vol. 22, 234–246. No. 3.
- [23]. Sankaralingam, S., Kumar, C., Shankar, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S. 2012. Optimization of culture conditions for the production of amylase from *Bacillus licheniformis* on submerged fermentation. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 12(11): 1507-1513.
- [24]. Shafiei, M., Ziaee, A.A., Amoozegar, M.A. (2010). Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting and halophilic α - amylase from a moderately halophilic bacterium *Nesterenkonia sp strain F*. Process Biochemistry, 45, 694-699

(Received for publication 5 July 2019; The date of publication 15 December 2019)