

PAPER DETAILS

TITLE: Isginin Kök Topragindan *Bacillus atrophaeus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması: α -Amilaz'ın Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

AUTHORS: Baris ENEZ

PAGES: 736-743

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/851738>



Işğının Kök Toprağından *Bacillus atrophaeus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması: α -Amilaz'ın Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

Barış Enez^{1*}

¹Bingöl Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Bingöl, Türkiye (ORCID:0000-00003-4730-3458)

(İlk Geliş Tarihi 1 Ekim 2019 ve Kabul Tarihi 10 Kasım 2019)

(DOI: 10.31590/ejosat.640484)

ATIF/REFERENCE: Akın, S. (2019). Işğının Kök Toprağından *Bacillus atrophaeus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması: α -Amilaz'ın Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (17), 736-743.

Öz

Amilazlar; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen nişastayı parçalayan enzimlerdir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen amilazlar; eczacılık, gıda, deterjan, tekstil, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gibi çok çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir. Bununla birlikte, amilaz üreten mikroorganizmaların izolasyonunda hala kısıtlamalar vardır. Işğın bitkisi tıp başta olmak üzere birçok alanda kullanılan önemli bir bitkidir. Bu çalışmanın amacı yararlı ışğın bitkisinden bakterinin izolasyonu gerçekleştirerek biyoteknolojik öneme sahip olan amilazın elde edilmesidir. Bakteri izolasyonu dilüsyon tekniği kullanılarak yapıldı. Bitki kök kısmında bulunan toprak alınarak seyreltme işlemi gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler yapıldı. Mikroorganizmanın tür teşhisi için 16 S rRNA analizi gerçekleştirildi. Bakteri sekans analiz sonucunda 864 baz çiftine sahip *Bacillus atrophaeus* olduğu tespit edildi. Tanımlamada etkili olan biyokimyasal testler sonucunda bakterinin gram pozitif (+), basil ve hareketsiz olduğu belirlendi. Katalaz, hemoliz ve glikoz un pozitif (+) sonuç verdiği; oksidaz, H₂S ve indol gibi biyokimyasal testlerin negatif (-) olduğu tespit edildi. Öncelikle bakteri üremesinin optimizasyonu sağlandı. Zaman, sıcaklık ve pH gibi bakteri üremesine doğrudan etki eden önemli parametreler çalışıldı. Optimum bakteri üretimi sırasıyla 72.saat, 30 °C ve pH 6.0 belirlendi. Güçlü amilaz üretimini belirlemek amacıyla nişastalı katı besi yerinde bakteriler üretildi. İnkübasyon sonrası lügol çözeltisi kullanılarak mikroorganizmanın amilaz ürettiği tespit edildi. Amilaz sentezlendiği belirlenen bakterinin optimal üretim koşulları tespit edildi. *Bacillus atrophaeus*'tan α -amilaz'ın maksimum üretim koşulları 36. saat, 35 °C ve pH 6.0 olduğu görüldü. Optimum şartlarda üretilen bakterinin süpernatant kısmı kullanılarak enzim karakterizasyonu gerçekleştirildi. Enzim sıcaklık ve pH'sı sırasıyla 40 °C ve pH 6.0 da maksimum aktivite gösterdiği tespit edildi. Bu tespitler sonucunda istenilen bakteri elde edildi. Tanımlanan ve amilaz ürettiği tespit edilen bakteri, farklı biyoteknolojik alanlarda kullanılma özelliğine sahip olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: α -Amilaz, *Bacillus atrophaeus*, Biyoteknoloji, Tanımlama

Isolation and Identification of *Bacillus atrophaeus* from Root Soil of the Işğın: Obtaining and Characterization of α -Amylase

Abstract

Amylase; enzymes that break down starch produced by plants, animals and microorganisms. Amylases produced by microorganisms; pharmaceutical, food, detergent, textile, paper and pulp industry. However, there are still limitations in the isolation of amylase-producing microorganisms. Işğın plant is an important plant used in many fields, especially in medicine. The aim of this study was to isolate the bacteria from the useful plant Işğın and to obtain amylase which is of biotechnological importance. Bacterial isolation was performed using dilution technique. Soil in the root part of the plant was removed and dilution was performed. Morphological,

* Sorumlu Yazar: Bingöl Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Bingöl, Türkiye, ORCID:0000-00003-4730-3458, benez@bingol.edu.tr
<http://dergipark.gov.tr/ejosat>

physiological and biochemical tests were performed after isolation. 16 S rRNA analysis was performed for species identification of microorganism. Bacterial sequence analysis result detected *Bacillus atrophaeus* with 864 base pairs. As a result of biochemical tests which were effective in identification, the bacteria were gram positive (+), bacillus and immobile. Catalase, hemolysis and glucose positive (+) results; Biochemical tests such as oxidase, H₂S and indole were found to be negative (-). Firstly, bacterial growth was optimized. Important parameters that directly affect bacterial growth such as time, temperature and pH were studied. Optimum bacterial production was determined at 72 hours, 30 °C and pH 6.0, respectively. In order to determine strong amylase production, bacteria were produced from starch solid media. After incubation, it was determined that microorganism produced amylase by using lugol solution. The optimal production conditions of the bacteria determined to be amylase synthesized were determined. The maximum production conditions of α -amylase from *Bacillus atrophaeus* were 36 hours, 35 °C and pH 6.0. Enzyme characterization was performed using the supernatant portion of the bacteria produced under optimum conditions. Enzyme temperature and pH were found to have maximum activity at 40 °C and pH 6.0, respectively. As a result of these determinations, the desired bacteria were obtained. Bacteria identified and found to produce amylase were determined to be used in different biotechnological areas.

Keywords: α -Amylase, *Bacillus atrophaeus*, Biotechnology, Identification

1. Giriş

α -Amilaz, nişastanın rasgele hidrolizini katalize eden etkili bir enzimdir. Bu enzimler tekstil, kâğıt, yiyecek, biyoyakıt, deterjan ve ilaç endüstrisi gibi çeşitli biyoteknolojik süreçler de kullanılır (Lévêque ve ark., 2000; Ashwini ve ark., 2011; Vijayalakshmi ve ark., 2012; Sanchez ve ark., 2019). Aktif enzimlerin düşük sıcaklıklarda kullanılması yüksek bir potansiyele sahiptir çünkü bu enzimler işlem sırasında ısıtma talebini önler, böylece maliyetleri düşürürler (Feller ve Gerday, 2003).

Amilazlar çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. Onlar tüm canlı organizmalarda bulunur, bunun yanında bu organizmalardan üretilen enzimler türlerden türlere göre aktivite, özgüllük ve gereksinimleri de değişmektedir. Ham nişastayı sindiren amilazlar; mantarlar, mayalar ve bakteriler dahil mikroorganizmalardan bitkilere ve insanlara kadar çeşitli canlı organizmalar tarafından üretilir (Haza, 2018). Mikroorganizmalar, karmaşık moleküllerin hidrolize edilmesinde kilit rol oynayan birçok endüstriyel açıdan önemli enzimlerin üretilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Pandey ve ark., 2000; Schmidt ve ark., 2005). Mikroorganizmalardan bazı enzim üretilmesine rağmen amilaz, endüstriyel olarak üretilen ilk enzimdir. Ekstraselüler hidrolitik enzimler arasında, amilazlar, yüksek endüstriyel değerlerinden dolayı özel bir statüye sahiptir ve enzim pazarının yaklaşık % 30'unu kapsar (Sindhu ve Singh, 1997; Rao ve ark., 1998). *Bacillus* cinsinden üretilen α -amilazlar endüstriyel uygulamalar açısından özel bir konuma sahiptir ve üretim süreçleri için optimizasyon parametrelerine çok önem verilmiştir (Pinjari ve Kotari, 2018). Toprak, nişasta parçalayan bakterilerin olduğu zengin kaynaklarından biridir (Sapkota ve ark., 2019).

Bu çalışmada ışgın kök toprağından bakteri izole edildi. izolasyon sonrası bakteri tür teşhisi ve biyokimyasal testler yapıldı. Bakteri optimum üretim koşulları belirlemek için zaman, sıcaklık ve pH gibi önemli parametreler çalışıldı. Amilaz ürettiği tespit edilen mikroorganizmadan α -amilaz karakterizasyonu gerçekleştirildi.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bakterinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Bu çalışmada, *Bacillus atrophaeus* Işgın kök toprağından alınan örnekten izole edildi. İzolasyon için dilüsyon tekniği kullanıldı. Organizma biyokimyasal testler ve 16S rRNA dizisi ile tanımlandı. Elde edilen izolatın 16S rRNA dizi analizleri Epi-Gen Biyoteknoloji tarafından yapılmıştır. Süpernatant, amilaz aktivitesini ölçmek için kullanıldı. Spektrofotometre de bakteri üremesi 460 nm olarak ölçüldü.

2.2. Mikroorganizmanın Kültür ve Büyüme Şartları

Topraktan izole edilen bakteri saf su ile hazırlanmış Nutrient Agar (NA) besi yerinde 120 rpm 37 °C, pH 7.0 ve 24. saat de üretili.

2.3. Bakteri Morfolojisinin Belirlenmesi ve Biyokimyasal Testlerin Uygulanması

Nutrient agar plakasında 37 ° C'de kültürlenmiş *Bacillus atrophaeus* suşu morfolojisi, bir mikroskop altında gözlendi. Gram pozitif ile Gram negatif arasında ayırım yapmak için gram boyama yapıldı. Mikroorganizmanın belirlemek için katalaz, üreaz ve hareket gibi çeşitli biyokimyasal testleri yapıldı.

2.4. Amilaz Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi DNS (Dinitrosalisilik asit) yöntemine göre yapıldı. Bernfeld tarafından % 0.5 nişasta kullanılarak 37 ° C'de 30 dakika boyunca 0.1 M Tris-HCl tampon pH 7.0 içinde çözünen bir yöntem olarak uygulandı. Bir ünite amilaz aktivitesi, 37 ° C'de dakikada 1 μ mol indirgeyici uç gruplarını serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlandı. (Bernfeld, 1955)

2.5. Protein Miktar Tayini

Lowry yöntemine göre protein miktar tayini yapıldı (Lowry ve ark., 1951)

2.6 Mikroorganizma ve Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve pH'nın Etkisi

Sıcaklığın bakteri ve enzim üretimi üzerindeki etkisini belirlemek için 5°C aralıklarla 25°C'den 50°C'ye yükselen sıcaklık değerleri çalışıldı. Elde edilen örnekler spektrofotometrede ölçüldü. Bakteri ve enzim üretimine, pH'nın etkisi araştırıldı. Bunun için çeşitli pH aralığında pH 4.0 ile pH 10.0 arasında deney yapıldı. İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi ve enzim üretimi üzerine etkisi için; bakteri NB'de üretildi. 12- 96. saatler arasında her 12 saatte bir örnekler alındı. Alınan örnekler spektrofotometre de ölçüldü.

2.7. Amilaz Aktivitesine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

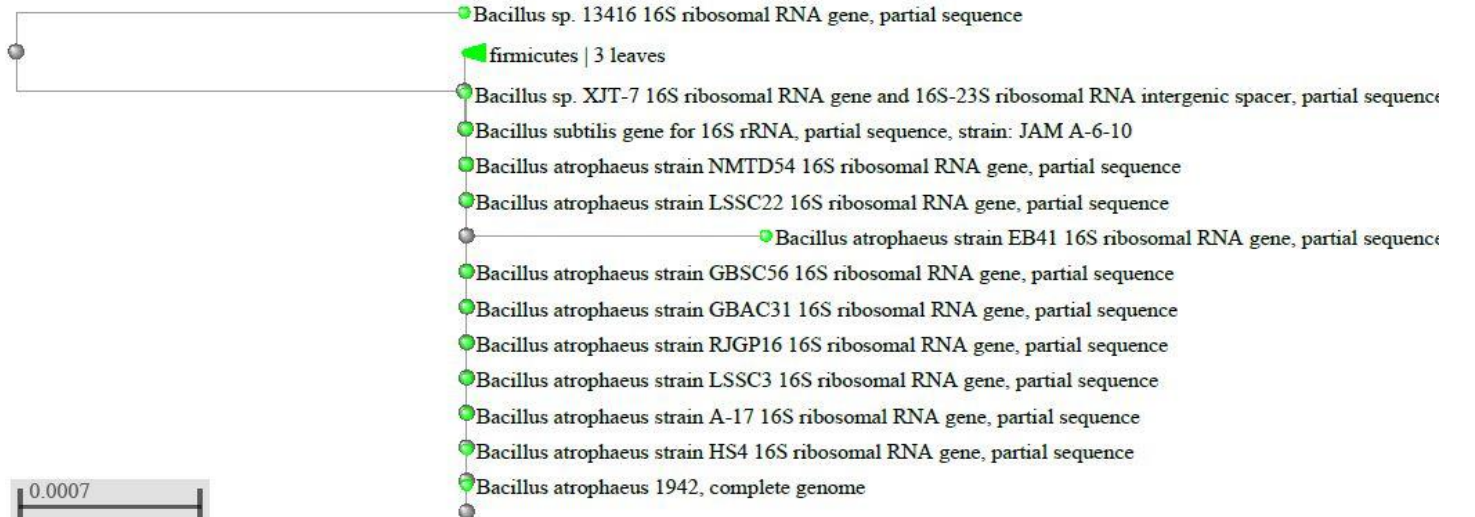
Sıcaklığın α -amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi, 30-50 °C arasındaki çeşitli sıcaklıklarda enzim deneyi yapılarak belirlendi. pH'nın α -amilaz aktivitesi üzerindeki etkisi, Tris-HCl tamponu kullanılarak 4-10 arasında değişen çeşitli pH'lar da enzim deneyi yapılarak belirlendi.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Bakterinin Tanımlanması ve Biyokimyasal Testler

Dilüsyon tekniği ile tek koloni düşürülen bakterinin tanımlanması için 16 S rRNA analizi yapıldı. Analiz sonucunda bakterinin 864 baz a sahip *Bacillus atrophaeus* olduğu belirlendi. Aşağıda bakterinin dizi analizi ve filogenetik ağaç çizimi bulunmaktadır.

```
CCCCTTCGGCGGCTGGCTCATAAAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC
CCGGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAC
TGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTCTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA
AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACT
AAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGC
CCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGGTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCAT
GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGC
TGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCC
CACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTAC
ACGTGGAATTCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGAG
```



Şekil 1. *Bacillus atrophaeus*'un filogenetik ağacı

Yapılan biyokimyasal testlerde bakterinin gram (+), basil hareketli oldu belirlendi. Katalaz, hemoliz ve glikoz un pozitif sonuç verdiği oksidaz, H₂S ve indol gibi biyokimyasal testlerin negatif olduğu tespit edildi. Biyokimyasal testlerle ilgili tablo 1 de detaylı sonuçlar verildi.

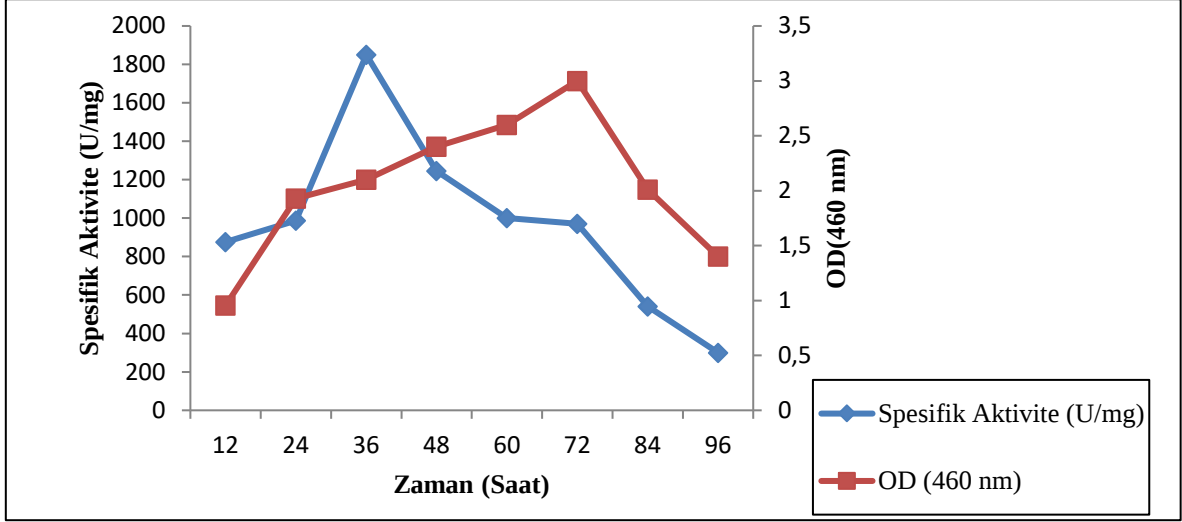
Tablo 1. Mikroorganizmanın Morfolojik ve Biyokimyasal Testleri

Karakterler	<i>Bacillus atrophaeus</i>
Aerobik Büyüme	+
Gram	+
Katalaz	+
Oksidaz	-
Glikoz	+
Laktoz	+
H ₂ S	-
İndol	-
Hareket	-
Üreaz	-
Hemoliz	+
Amilaz	+

Pozitif:+, Negatif

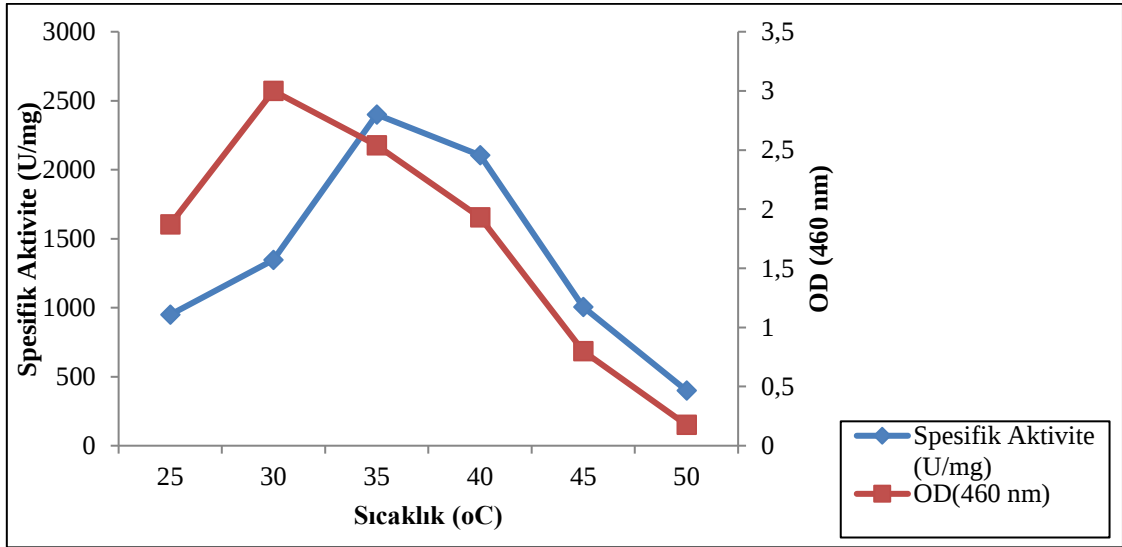
3.2. Mikroorganizma ve Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklık, Zaman ve pH'nın Etkisi

İnkübasyon süresinin bakteri gelişimi ve α -amilaz üretimine etkisi belirlemek amacıyla 12-96.saatler arasında örnekler alınarak ölçümler yapıldı. Bakteri gelişiminin süreye bağlı olarak arttığı en fazla üremenin ise 72. saatte olduğu belirlendi. Bu zaman diliminden sonra ise bakteri üremesinin azaldığı belirlendi. Şekil 2 de görüldüğü gibi bakteri üremesinin 72. saatte maksimum olmasına rağmen α -amilaz üretiminin 36.saatte en fazla olduğu tespit edildi. Bu inkübasyon süresinden sonra amilaz üretimi azalmaktadır. Bunun nedeni, hücrelerin düşüş evresine ulaşması ve düşük α -amilaz sentezi göstermesidir. Bunun yanında enzim üretimindeki azalma, fermantasyon kültüründeki besin maddelerinin tüketiminden veya toksik yan ürünlerin birikmesinden kaynaklanabilir. Fermantasyon endüstrisinde ucuz enzim üretimi için kısa inkübasyon süresinin önemli olduğu bilinmektedir.(Şekil 2)



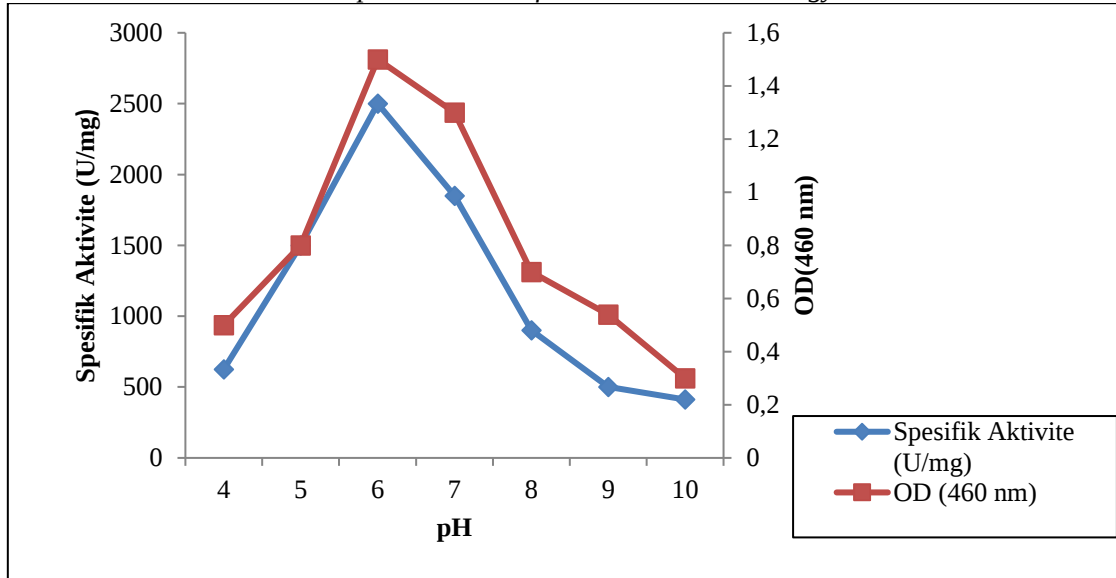
Şekil 2. inkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi ve enzim üretimine etkisi

Fermantasyon sıcaklığı ve pH ayrıca enzim üretimini açıkça etkileyen önemli parametrelerdir. Sıcaklığın bakteri gelişimi ve enzim üretimine etkisi belirlemek için farklı sıcaklıklarda üretim gerçekleştirildi. Bakteri üretiminin 30 °C de en fazla üreme gösterdiği artan sıcaklıklara bağlı olarak sıcaklığın azaldığı tespit edildi. 50 °C de ise üremenin nerdeyse bittiği belirlendi. Amilaz üretimine bakıldığında maksimum üretimin 35 °C de olduğu artan sıcaklığa bağlı olarak spesifik aktivitenin düştüğü gözlemlendi. (Şekil 3)



Şekil 3. Sıcaklığın bakteri gelişimi ve enzim üretimine etkisi

Mikroorganizma gelişimini ve enzim üretimini etkileyen diğer bir önemli parametre pH'dır. pH 4.0-10.0 arasında üretim gerçekleştirilerek hem 460 nm de ölçüm alındı hem de amilaz aktivite tayini yapıldı. Bakteri remesi ve enzim üretiminin pH 5.0-8.0 arasında olduğu tespit edildi. Maksimum enzim üretimi ve bakteri gelişimi pH 6.00 gerçekleştiği belirlendi. Asidik ortamda enzim üretim yapabilmesi enzim teknolojisi bakımından önemli bir yere sahiptir. (Şekil 4)



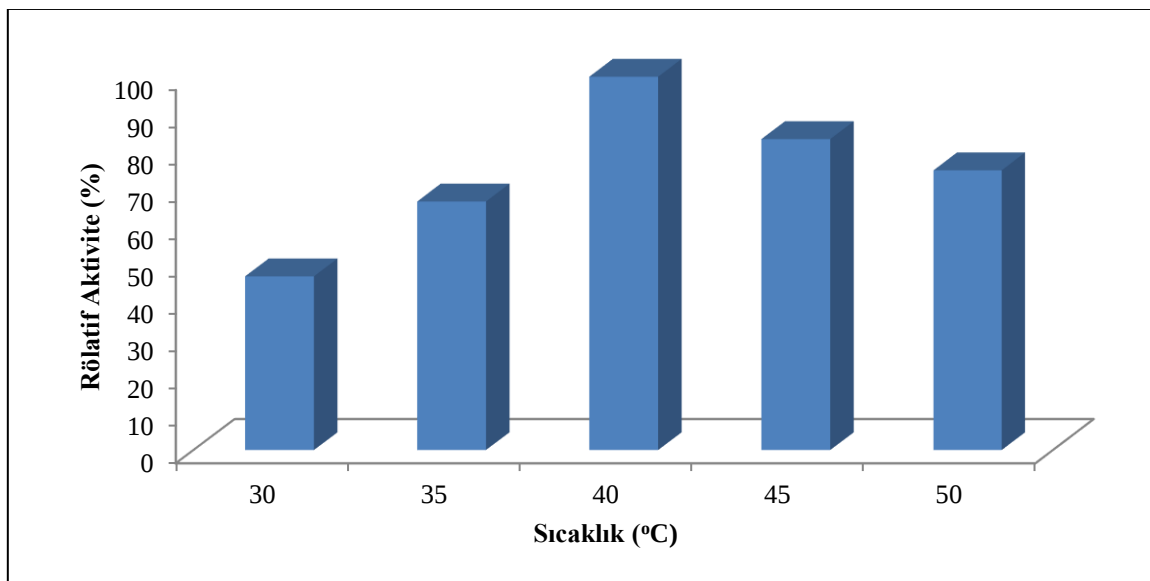
Şekil 4. pH'nın bakteri gelişimi ve enzim üretimine etkisi

Mikroorganizma gelişimi ve enzim üretim sonuçlarına göre diğer araştırmacıların çalışmalarına bakıldığında bir paralellik olduğu görüldü. Bazı parametrelerde avantajlı bir durumun ortaya çıktığı tespit edildi.

Ozdemir ve ark. (2018)'de yaptıkları çalışmada *Bacillus mojavensis* SO-10'un maksimum α -amilaz üretim koşullarını 36. saat, 35 ° C ve pH 7.0'da tespit etmişlerdir. Mahdavi ve ark. (2010) *Bacillus cereus* 'ta ve Demirkan, 2011 de *Bacillus subtilis* te bu enzimin pH 6.0 da optimal olarak aktif olduğunu gösterdiler. Hamilton ve ark. (1999) da *Bacillus* sp. IMD 43'ten optimum inkübasyon süresini 41. saatte ve sıcaklığı ise 40 °C de olduğunu buldular. Asgher ve ark. (2007) yayınladıkları çalışmada *Bacillus subtilis* JS-2004'ten elde ettikleri amilazı optimum koşullarını 48.saat 50 °C ve pH 7.0 de olduğu tespit ettiler. Behal ve ark. *Bacillus* sp. AB 04'ten amilaz üretimi gerçekleştirdiler.Enzim üretimin optimum koşullarını sırasıyla 36 saat ve 40 °C de belirlediler. Saxena ve ark. (2007) de *Bacillus* sp. PN5'ten optimum amilaz üretimini 60 saat, 60 °C ve pH 7.0 da tespit ettiler.

3.3. Amilaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

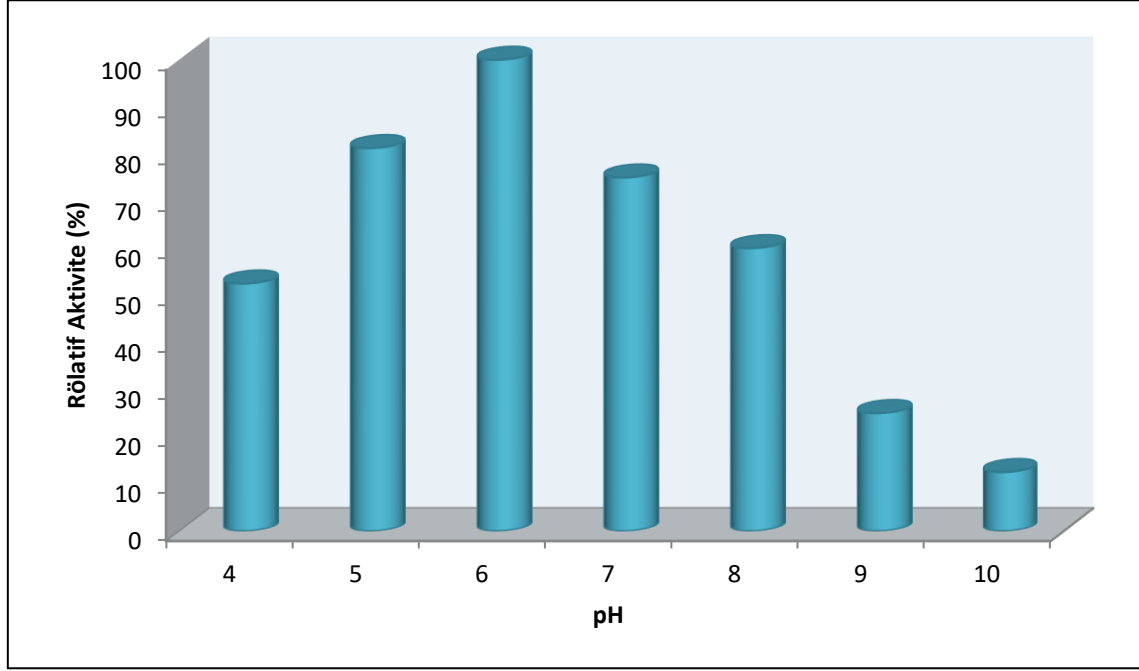
Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisini araştırıldı. Bunu n için aktivite deneyinde inkübe sürelerinde farklı sıcaklık ortamları kullanıldı. Böylece enzimin hangi sıcaklık değerinde daha fazla aktivite gösterdiği tespit edildi. Şekil 5'te görüldüğü gibi yapılan analiz sonucunda 35-45 °C arasında enzim aktivitesinin yüksek olduğu belirlendi. Maksimum enzim aktivitesinin 40 °C de tespit edildi. Artan sıcaklığa bağlı olarak enzim aktivitesinin düştüğü görüldü. 50 °C enzim aktivitesinin % 75'lere düştüğü belirlendi. Geniş bir sıcaklık aralığında aktivite göstermelerine rağmen, birçok *Bacillus* türlerinden elde edilen amilazın aktivitesi 40 ° C olarak gözlemlenmiştir (Ashwini ve ark., 2011; Vaseekaran ve ark., 2010).



Şekil 5. Sıcaklığın amilaz aktivitesine etkisi

3.4. Amilaz Aktivitesine pH'nın Etkisi

Optimum koşullarda üretilen bakterilerden elde edilen enzim, pH 4.0 ile pH 10.0 arasında aktif olduğu tespit edildi. Enzim aktivitesinde artış pH 5.0'dan başlayarak gözlemlenirken, enzim aktivitesinde pH 6.0'dan sonra olduğu belirlendi. Maksimum aktivitenin pH 6.0 da olduğu tespit edildi. Enzimin asidik pH'larda çalışması enzim biyoteknolojisi açısından önemlidir. Amilaz üreten *Bacillus* suşlarının çoğu, amilaz enzim aktiviteleri için pH 6-9 aralığında optimum pH sergilemektedir. (Swain ve ark., 2006; Malhotra ve ark., 2000; Alkando ve İbrahim, 2011)



Şekil 6. Sıcaklığın amilaz aktivitesine etkisi

4. Sonuç

Bu çalışmada ışgın kök toprağından *Bacillus atrophaeus* izolasyonu gerçekleştirildi. Bakterinin gram (+) ,basil ve hareketsiz olduğu tespit edildi. Bakterinin maksimum amilaz üretimini ni24. saate, 35 °C ve pH 6.0 da gerçekleştiği belirlendi. Bu amilazın spesifik özellikleri çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılmasına olanak tanımaktadır. Kısa sürede bakteri üremesi ve düşük sıcaklıkta büyüme sağlanması, kısa süre ve elektrik tasarrufu gibi endüstriyel açıdan önemli avantajdır.

Kaynakça

- Ahmed, A. & Alkando, H.M. I. (2011). A potential new isolate for the production of a thermostable extracellular- α -amylase. *African Journal of Bacteriology Research*, 3: 129–37.
- Asgher, M., Asad, M.J., 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.
- Ashwini, K., Gaurav, K., Karthik, L. & Bhaskara Rao, K.V. 2011. Optimization, production and partial purification of extracellular α -amylase from *Bacillus* sp. Marini. *Archives of Applied Science Research*, 3:33–42.
- Behal, A., Sharma, M.K., Puri, P., Singh, J. & Batra, N. (2006). Characterization of alkaline α -amylase from *Bacillus* sp. AB 04. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8: 80–83.
- Bernfeld, P. (1955). Enzymes Carbohydrate Metabolism. In *Methods In Enzymol. Acad. Press*, 17: 149-158.
- Demirkan, E. (2011). Production, purification, and characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives. *Turkish Journal of Biology*, 35: 705–712.
- Feller, G. & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 1: 200–208, <https://doi.org/10.1038/nrmicro773>.
- Hazaa, M.M., Sabae, S.Z., Areej Ibrahim, F. T., Eldourghamy, A.S. & Sayed, H. (2018). Production, Purification and Characterization of Alfa-amylase produced by Bacteria from Pharaonic Lake. *Journal of Basic and Environmental Sciences*, 5:162–173
- Lévêque, E., Janeček, Š., Haye, B. & Belarbi, A. (2000). Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 3–14.
- Mahdavi, A., Sajedi, R.H., Rassa, M. & Jafarian, V. (2010). Characterization of an α -amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain. *Iranian journal of biotechnology*, 8: 103–111.
- Malhotra, R., Noorwez, S.M. & Satyanarayana, T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett Appl Microbiol*, 31:378–84.

- Ozdemir, S., Aguloglu Fincan, S., Karakaya, A. & Enez, B. (2018). A Novel Raw Starch Hydrolyzing Thermostable α -Amylase Produced by Newly Isolated *Bacillus mojavensis* SO-10: Purification, Characterization and Usage in Starch Industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61:e18160399.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Socco, V.T., Singh, D. & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31: 135–52.
- Pinjari, A. B. & Kotari, V. (2018). Characterization of extracellular amylase from *Bacillus* sp. strain RU1. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 6 (3): 29-34.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. & Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 597–635.
- Sanchez, A.C., Ravanal, M. C. , Andrews, B. A. & Asenjo, J. A. (2019). Heterologous expression and biochemical characterization of a novel cold active α -amylase from the Antarctic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 2-3. *Protein Expression and Purification*, 155: 78–85.
- Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L. & Nayyar, P.A. (2007). Highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98:260–265
- Schmidt, S., Martin, A., Schadt, C., Lipson, D., Meyer, A. & Costello, E. (2005). *Profound Seasonal Changes in Microbial Diversity and Function in an Alpine Environment*. New York: Mc-Graw Hill.
- Sindhu, M.K., Singh, B.K. & Prased, T. (1997). Changes in starch content of anhar seed due to fungal attack. *Phytopathology*, 34: 269–71.
- Susmita, S., S, K., Aava, G., Rojina, M., Ruby, S., Sandhya, D., Om Prakash, P., Santosh, K., Pramod, P. (2019). Screening and Optimization of Thermo-Tolerant *Bacillus* sp. for Amylase Production and Antifungal Activity. *Journal of Institute of Science and Technology*, 24(1): 47–56.
- Swain, M.R., Kar, S., Padmaja, G. & Ray, R.C. (2006). Partial characterization and optimization of production of extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung microflora. *Polish Journal of Microbiology*, 55: 289–96.
- Vaseekaran, S., Balakumar, S. & Arasaratnam, V. (2010). Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable α -amylase. *Tropical Agricultural Research*, 22:1–11.
- Vijayalakshmi, K., Sushma, S.A. & Chander, P. (2012). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KC3 for amylolytic activity. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2: 336.