# การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสทนร้อนจากแหล่งดิน

# Isolation of Thermostable Amylase-Producing t Bacteria from Soil

**สุรชัย รัตนสุข***
Surachai Rattanasuk
**อานนท์ ผลานาถ****
Anon Planatr

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตอะไมเลสทนร้อนจากดิน โดยเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณพระนาคปรกเมืองไพร อาคารคณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ และทางเข้ามหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด นำตัวอย่างดินแหล่งละ 1 กรัม มาผสมในอาหาร NB นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตอะไมเลสได้โดยนำแบคทีเรียไปเลี้ยงบนอาหาร NA ที่ผสมแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์และทดสอบกิจกรรมของอะไมเลสด้วยสารละลายไอโอดีน ผลการคัดแยกพบแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตอะไมเลส 3 ตัวอย่าง คือ AN01 AN02 และ AN03 นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปทำสอบกิจกรรมของอะไมเลสที่อุณหภูมิ 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียสโดยใช้น้ำแป้ง (pH 7.0) เป็นสารตั้งต้น ผลการศึกษาพบแบคทีเรีย AN02 มีกิจกรรมอะไมเลสสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส (0.183 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากผลการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยลำดับของดีเอนเอของยีน 16SrRNA ด้วยฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่าแบคทีเรีย AN02 คือ *Bacillus aryabhattai* ที่ค่าความเหมือนที่ 99.5%

**คำสำคัญ : แบคทีเรีย / อะไมเลสทนร้อน / ดิน**

*อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด
**นักศึกษาสาขาวิชาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด

**ABSTRACT**

The aim of this research was to isolate thermostable amylase-producing bacteria from soil. Soil samples were collected from Pranakpok, Faculty of Liberal Arts and Science building and entrance to Roi Et Rajabhat University. One gram of each soil samples was added into Nutrient broth (NB) medium containing 1% starch and incubated at 37°C for 24 hours before continued culturing at 60°C for 48 hours. The amylase activity was screened on nutrient agar containing 1% starch using iodine solution. Three isolates were survived and presented the clearing zone of amylase activities were selected and named AN01 AN02 and AN03. Amylase activities of 3 isolated were determined at 50 60 70 80 90 and 100°C using starch solution (pH 7.0) as substrate. The result found that AN02 exhibited the highest amylase activities at 60°C (0.183 U/ml). Result of bacterial identification using partial 16S rRNA indicated that AN02 was *Bacillus aryabhattai* at 99.5% identity using EzBioCloud data base.

**Keywords : Bacteria/ Thermostable Amylase / Soil**

**บทนำ**

อะไมเลส (endo-1, 4-α-D-glucanohydrolases EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยสลายพันธะที่ตำแหน่งอัลฟ่า 1,4-glycosidic (Chakraborty และคนอื่นๆ, 2009) อย่างสุ่มเกิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลที่เล็กกว่า เช่น กลูโคส (glucose) และ มอลโทส (maltose) (Rodríguez, et al., 2006; Tester, et al., 2006) อะไมเลส พบทั่วไปในระบบการย่อยอาหาร (digestive system) ของมนุษย์และสัตว์ ปัจจุบันการผลิตและการใช้อะไมเลสในอุตสาหกรรมมีความสำคัญอย่างมาก เพราะการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมจะช่วยในการลดต้นทุนการผลิต ซึ่งพบว่าการใช้สารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์จะทำให้มีต้นทุนของการผลิตที่สูงและเป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค ทั้งยังทำลายสิ่งแวดล้อมในทางอ้อมอีกด้วย (วิราสิณี และนพพล, 2557)

อะไมเลสมีบทบาทสำคัญมากในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมการทำกระดาษ อุตสาหกรรมเครื่องดื่มและน้ำผลไม้ อุตสาหกรรมการแปรรูปแป้งและผลิต syrups รวมถึงอุตสาหกรรมการผลิตยาด้วย (Sivaramakrishnan, et al., 2006) แหล่งของอะไมเลสโดยทั่วไปพบได้จาก พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Pandey, et al., 2000) แต่พบว่าไม่นิยมใช้การผลิตอะไมเลสจากพืชและสัตว์เนื่องจากต้องใช้วัตถุดิบเป็นจำนวนมากและส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น จึงมีการผลิตอะไมเลสจากจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ได้รับความนิยมนำเอาไปใช้ในอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก ได้แก่ แบคทีเรียซึ่งมีอัตราการเจริญเร็วกว่าเมื่อเทียบกับพืชและสัตว์ อีกทั้งแบคทีเรียยังต้องการอาหารไม่ซับซ้อนมากนัก มีความสะดวกและสามารถเก็บเชื้อได้นานโดยไม่ต้องถ่ายเชื้อบ่อยและมีการแปรผันของเชื้อในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าการผลิตจากเชื้อรา ดังนั้นการผลิตอะไมเลสจากแบคทีเรียจึงมีความน่าสนใจ (สัตถาพร, 2524)

แบคทีเรียที่ผลิตอะไมเลสได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มบาซิลัส เช่น *Bacillus licheniformis, B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis, B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. halodurans*, *Bacillus dipsosauri* และ *Bacillus* sp. Ferdowsicous และยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่สามารถผลิตอะไมเลสได้อีกด้วย เช่น *Rhodothermus marinus*, *Corynebacterium gigantea*, *Caldimonas taiwanensis*, *Lactobacillus*

*manihotivorans Chromohalobacter* sp, *Lactobacillus fermentum*, *Geobacillus thermoleovorans* และ *Pseudomonas stutzeri* เป็นต้น (Mojsov, 2012; Hassain et al., 2013; Gopinath et al., 2017; Gupta et al., 2003; Sundarram และ Krishna, 2014; de Souza และ Magalhaes, 2010 และ Kathiresan และ Manivannan, 2006)

จากการใช้อะไมเลสในอุตสาหกรรมข้างต้น เช่น อุตสาหกรรมแป้งซึ่งเป็นกระบวนการการผลิตที่ใช้อุณหภูมิค่อนข้างสูงจึงมีความจำเป็นที่อะไมเลสต้องมีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงตามไปด้วย เพื่อที่สามารถทำงานภายใต้กระบวนการผลิตแป้งได้โดยไม่เกิดการเสียสภาพของอะไมเลสก่อนเสร็จสิ้นกระบวนการ เนื่องจากจังหวัดร้อยเอ็ด เป็นเขตพื้นที่ที่มีสภาพอากาศค่อนข้างร้อนอบอ้าวอุณหภูมิสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 41.5 องศาเซลเซียส สถานีตรวจอากาศร้อยเอ็ด (ม.ป.ป.). ซึ่งเป็นช่วงที่แบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงสามารถเจริญได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะทำการคัดเลือกแบคทีเรียผลิตอะไมเลสทนร้อนที่เพื่อใช้เป็นข้อมูลในด้านความหลากหลายของแบคทีเรียที่ผลิตอะไมเลสและสามารถต่อยอดการวิจัยเพื่อพัฒนาในเชิงอุตสาหกรรมได้

**วิธีดำเนินการวิจัย**

ตัวอย่างแหล่งดิน

เก็บตัวอย่างแหล่งดินจาก บริเวณพระนาคปรกเมืองไพร อาคารคณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์และบริเวณทางเข้ามหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ จากนั้นนำไปทำการบ่มด้วยเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 120 rpm อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทำการบ่มเสร็จแล้วนำมาตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร มาทำการกระจายเชื้อบน อาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ อาหาร NA ที่ประกอบด้วยแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตอะไมเลส

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร NA มาแยกใส่อาหาร NA และอาหาร NA ที่ผสมแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเพลทอาหาร NA ที่ผสมแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ มาเทสารละลายไอโอดีนรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย สังเกตการเกิดวงใส โดยแบคทีเรียที่ผลิตอะไมเลสจะให้ผลเป็นบวกจะพบว่ามีการเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนี และนำแบคทีเรียที่ให้ผลบวกไปทำการศึกษาการติดสีแกรม และบันทึกผล

การทดสอบกิจกรรมของอะไมเลส

นำแบคทีเรียที่ผลิตอะไมเลสได้ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีส่วนประกอบของแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่เครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปทำการทดสอบกิจกรรมของอะไมเลสที่อุณหภูมิ 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้แป้ง (pH 7.0) เป็นสารตั้งต้น จากนั้นนำหลอดผสมสารให้เข้ากันแล้วไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดเติม DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร ผสมสารด้วยเครื่อง vortex นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของ

อะไมเลสกำหนดให้ 1 ยูนิต คือปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ถูกปล่อยออกมา 1 ไมโครโมล (μmol) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

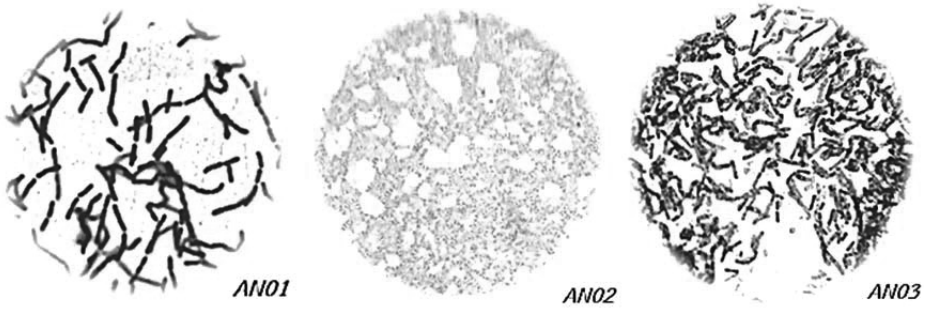
การหาลำดับของ 16S rRNA

เลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตอะไมเลสได้ในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนแบคทีเรียไปสกัดดีเอนเอด้วยชุดสกัดดีเอนเอ (THANG GENE®) แล้วนำดีเอ็นที่สกัดได้ไปเป็นดีเอนเอแม่แบบในการเพิ่มปริมานของ 16S rRNA ด้วยไพร์เมอร์ fD1 และ rP2 ด้วยเทคนิค พีซีอาร์โดยใช้สภาวะ คือ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ และ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และรอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจดูดีขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminator และส่งตัวอย่างผลผลิตจากพีซีอาร์ไปหาลำดับดีเอนเอ ที่บริษัท Macrogen ที่ประเทศเกาหลี แล้วนำลำดับดีเอนเอ ที่ได้ไปตรวจสอบความเหมือนกับลำดับดีเอนเอของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานจากฐานข้อมูล EzBioCloud

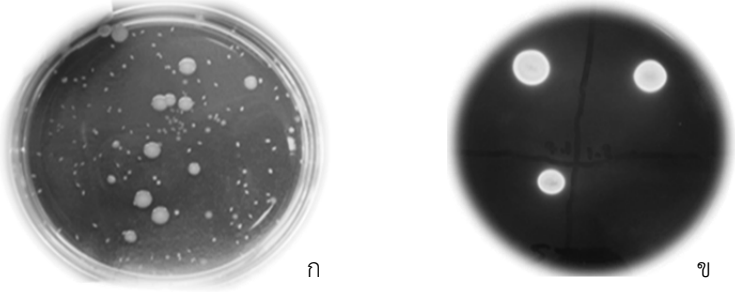
**ผลการวิจัย**

การคัดแยกแบคทีเรีย

จากการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณพระนาคปรกเมืองไพร ตึกคณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ และบริเวณทางเข้ามหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด นำตัวอย่างดินที่เก็บมาแหล่งของแบคทีเรียที่ผลิตอะไสเลส พบว่ามีแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่ทนร้อน ได้ 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1 ข) จากการศึกษาการย้อมสีแกรมแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่าแบคทีเรีย AN01, AN02 และ AN03 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกย้อมติดสีม่วง มีรูปร่างท่อน (ภาพที่ 2)




**ภาพที่ 1** การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตอะไมเลส



ก ข

**ภาพที่ 2** แสดงลักษณะการติดสีแกรมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (กำลังขยาย 1000 เท่า)
ก) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ข) วงใสที่เกิดขึ้นพบว่ามีแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่ทนร้อน

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

นำเชื้อ AN01, AN02 และ AN03 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ประกอบด้วยแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปเลี้ยงด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงแล้วนำส่วนใสไปทดสอบค่ากิจกรรมอะไมเลสที่อุณหภูมิ 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบพบว่า AN02 มีค่ากิจกรรมได้สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส (0.183 ยูนิตต่อนาที) และยังพบค่ากิจกรรมได้ในอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (0.083 ยูนิตต่อนาที) ในขณะที่ AN01 และ AN03 มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

**ตารางที่ 1** ตารางแสดงค่ากิจกรรมของอะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ

| **อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)** | **50** | **60** | **70** | **80** | **90** | **100** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **AN01** | 0.110 | 0.075 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| **AN02** | 0.133 | **0.183** | 0.093 | 0.068 | 0.040 | **0.083** |
| **AN03** | 0.118 | 0.118 | 0.048 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

ผลการหาลำดับของ 16s rRNA

นำดีเอนเอที่สกัดได้จากแบคทีเรีย AN02 มาเป็นแม่แบบในการเพิ่มส่วนของยีน *16S rRNA* โดยใช้องค์ประกอบและขั้นตอนดังกล่าวมาข้างต้น นำไปตรวจดูดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminator พบว่าขนาดของ PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 1500 เบส ส่งตัวอย่าง PCR product ไปหาลำดับ DNA ที่บริษัท Macrogen ที่ประเทศเกาหลี ได้ผลของการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับเบสของยีน *16s rRNA* พบว่าเชื้อ AN02 คือ *Bacillus aryabhattai* ที่ identity 99.5% โดยใช้ www.ezbiocloud.com

**อภิปรายผล**

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียทนร้อนที่สามารถผลิตอะไมเลสจากแหล่งดินได้จำนวน 3 isolates คือ AN01 AN02 และ AN03 พบว่า AN02 มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียสเท่ากับ 0.183 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และได้จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย AN02 จากลำดับของยีน *16s rRNA* พบว่า AN02 คือ *Bacillus aryabhattai* ที่ identity 99.5% ซึ่งการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการวิจัยของศิวพร และวรรณา, (2552) ที่ได้ตรวจกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสชนิดทนอุณหภูมิสูงจากดินในเขตจังหวัดสุพรรณบุรี และนครศรีธรรมราช พบว่า อะไมเลสจากแบคทีเรีย A22-2 สามารถคงตัวอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fooladi & Sajjadian (2010) ที่พบว่าแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตอะไมเลสที่คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนเป็นแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ซึ่งงานวิจัยนี้ไม่สอดคล้องกลับกับชนิดา (2549) โดยพบว่าอะไมเลสจะทำงานได้ดีเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจนถึง 50 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะเริ่มลดลงซึ่งในงานวิจัยนี้พบค่ากิจกรรมอะไมเลสของ AN02 ที่ 60 องศาเซลเซียสมีค่ามากกว่าค่ากิจกรรมที่ 50 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังพบกิจกรรมอะไมเลสเล็กน้อยที่ 100 องศาเซลเซียสอีกด้วย ในการศึกษาครั้งต่อไปผู้วิจัยจะทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสและปัจจัยใจต่างๆ ที่ส่งผลต่อการทำงานของอะไมเลสเป็นลำดับต่อไป

**กิตติกรรมประกาศ**

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือห้องปฏิบัติการชีววิทยา

**เอกสารอ้างอิง**

ชนิดา โตบุญ. (2549). **การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำเสียโรงงานแป้ง**. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสยาม.

วิราสิณี จันทร์เป็ง และนพพล เล็กสวัสดิ์. (ม.ป.ป.). **อะไมเลส (Amylase).** [Online]. Available : www.agro.cmu.ac.th/absc/data/57/57-025.pdf [2559, สิงหาคม 2].

ศิวพร เงินถาวร และวรรณา ชูศรีจนทร์. (2552). **การผลิตเอนไซม์อะไมเลสชนิดทนอุณหภูมิสูงโดยแบคทีเรียจากแหล่งดิน.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยรังสิต.

สัตถาพร ศรีมหาสงคราม. (2524). **การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากบักเตรีเพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลัง**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถานีตรวจอากาศร้อยเอ็ด. (ม.ป.ป.). **ภูมิอากาศร้อยเอ็ด.** [Online]. Available : http://climate.tmd.go.th/data/province. [2559, สิงหาคม 2].

Chakraborty S, Khopade A, Kokare C, Mahadik K, Chopade B. (2009). Isolation and characterization of novel α-amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58**(1-4), 17-23.

de Souza, P. & M., Magalhaes, P. O. E. (2010). Application of microbial-amylase in industry—a review. **Brazilian Journal of Microbiology, 41,** 850-861.

Fooladi, J. ฿ Sajjadian, A. (2010). Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable α-amylase producing strain. **Iranian Journal of Microbiology, 2**(1), 46-50.

Gopinath, S. C. B., et al. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **BioMed Research International,** 1272193. [Online]. Available : http://doi.org/10.1155/2017/1272193. [2016, August 2].

Gupta R., et al. (2003). Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry, 38**(11), 1599-1616.

Hussain I., Siddique F., Mahmood M. S., & Ahmed S. I. (2013). A review of the microbiological aspect of α-amylase production. **International Journal of Agriculture and Biology, 15**(5), 1029-1034.

Kathiresan K. & Manivannan S. (2006). α-Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. **African Journal of Biotechnology, 5**(10), 829-832.

Mojsov K. (2012). Microbial α-amylases and their industrial applications : a review. **International Journal of Management, IT and Engineering, 2,** 583-609.

Pandey A., et al. (2000). Advences in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem, 31**(2) 135-152.

Rodríguez, V.B., et al. (2006). Enzymatic Hydrolysis of Soluble Starch with an α-Amylase from *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Progress, 22,** 718-722.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R. & Pandey, A. (2006). α-Amylases from microbial sources–an overview on recent developments. **Food Technol Biotechnol, 44**(2), 173-184.

Sundarram A. & Krishna Murthy T. P. (2014). α-amylase production and applications : a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2**(4), 166-175.

Tester, R.F., Qi, X., & Karkalas, J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. **Animal Feed Science and Technology, 130,** 39-54.