

## ***Bacillus subtilis* ORBA97 Suşuna Ait Endüstriyel $\alpha$ -Amilaz Geninin *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* YB886'da Klonlanması ve Ekspresyonu\***

Numan ÖZCAN

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, 01330, Adana - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 06.06.2000

**Özet:** *Bacillus subtilis* ORBA97 suşuna ait  $\alpha$ -amilaz geni pUC18 plazmid vektörü ile *Escherichia coli*'de ve pUB110 vektörünü kullanarak da  $\alpha$ -amilaz negatif *Bacillus subtilis* YB886 suşunda klonlanarak eksprese edilmiştir. Enzime ait spesifik aktivite 5.052  $\mu\text{mol}$  (mg protein min)<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Zymogram analizleri YB886 suşunda herhangi bir proteolitik parçalanma belirtisi göstermemiştir. Enzime ait sıcaklık ve pH optimumları sırasıyla 50°C ve 5 olarak bulunmuştur. Enzimin 90°C'de 15 dakika bırakılması ile relatif aktivite orijinal aktivitesinin %36'sına gerilemiştir. Kalsiyum klorür enzim aktivitesini %23 oranında artırmıştır. Enzimin pH toleransı kanatlı sindirim sistemi için uygun görülürken termostabilitesi enzimin pelet yemlerde kullanımını sınırlayabilir.

**Anahtar Sözcükler:**  $\alpha$ -amilaz, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, gen klonlama

### **Cloning and Expression of the Gene Encoding Industrial $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* ORBA97 in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* YB886**

**Abstract:** The  $\alpha$ -amylase encoding gene from *Bacillus subtilis* ORBA97 strain was cloned and expressed in *Escherichia coli* with the plasmid vector called pUC18 as well as in the  $\alpha$ -amylase negative *Bacillus subtilis* YB886 strain by using the pUB110 vector.

The specific activity of the enzyme was determined to be 5.052  $\mu\text{mol}$  (mg protein min)<sup>-1</sup>. Zymogram analysis revealed no sign of protease degradation in the YB886 strain. The optimum temperature and pH of the enzyme were found to be 50°C and 5 respectively. Relative enzyme activity decreased to 36% of the original activity when it was subjected to a temperature of 90°C for 15 minutes. Calcium chloride stimulated the enzyme activity and resulted in an approximately 23% increase in the activity. The pH tolerance of the enzyme seems to be suitable for the poultry digestive system. However, the thermostability of the enzyme may restrict its application in pelleted feeds.

**Key Words:**  $\alpha$ -Amylase, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, gene cloning

### **Giriş**

*Bacillus subtilis* suşları  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz, ksilanaz, alkalin fosfataz, pullunaz, glukoz izomeraz,  $\beta$ -laktamaz, proteaz ve glükanozlar gibi birçok endüstriyel enzimin gen kaynağıdır (1). Dünyada her yıl üretilen 75 bin ton enzimin yaklaşık % 75'i *Bacillus subtilis*'ce üretilmektedir (2). Bakteriyel  $\alpha$ -amilazlar ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanhydrolase, E.C.3.2.1.1) nişastanın içerdiği  $\alpha$ -1,4 glukosidik bağları hidrolize ederler (3).  $\alpha$ -amilazlar nişastayı glükoamilaz ile birlikte glukozu parçalarken,  $\beta$ -amilaz ile birarada maltoz oluştururlar (4, 5). Doğadan

*Bacillus* türleri tarafından salgılanan multienzim kokteyllinden istenen enzimlerin fiziksel özelliklerinin belirlenmesi bunların çeşitli yöntemlerle saflaştırılmasına bağlıdır (6, 7). Bazı *Bacillus subtilis* suşlarının birbirine çok yakın fiziksel özelliklere sahip enzimler üretmeleri, bunların fiziksel ve kimyasal yöntemlerle saflaştırılmasını önemli ölçüde güçleştirmektedir (8). Bu nedenle  $\alpha$ -amilaz ve diğer enzimlere ait genler, sözkonusu enzimi üretmeyen *E. coli* ve/veya *B. subtilis* suşlarında klonlanarak karakterize edilmektedir (9, 10, 11, 12, 13). Klonlanan bu genler uygun plazmid vektörlere takılarak belirli konakçı bakterilerde eksprese edilmekte ve bu yolla

\* Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1377) tarafından desteklenmiştir.

kodladıkları enzimlerin üretim miktarları arttırılmakta (14) veya bu genler sözkonusu enzimleri üretmeyen farklı mikroorganizmalara aktararak rekombinant suşlar geliştirilmektedir (11, 15, 16). Bu çalışmalarımızda *Bacillus subtilis* ORBA97 suşuna ait endüstriyel bir  $\alpha$ -amilaz geni pUC18 vektörü ile önce *E. coli*'de klonlanmış ve pUB110 vektörü ile de *Bacillus subtilis* YB886 ( $\alpha$ -amilaz-) suşunda eksprese edilmiştir. Bu genlerin kodladığı enzime ait bazı fiziksel özellikler de araştırılmıştır.

## Materyal ve Metot

### *Bacillus subtilis* Suşları, Plazmidler, Restriksiyon Enzimleri ve Kültür Ortamları

*Bacillus subtilis* ORBA97( $\alpha$ -amilaz+) suşu ORBA Biyokimya Sanayi ve Ticaret A. Ş., İstanbul'dan, *Escherichia coli* XL1-Blue MRF suşu Stratagene (USA)'dan, *Bacillus subtilis* YB886 ( $\alpha$ -amilaz-, CMCCase-) suşu Daniel R.Zeigler, Bacillus Genetic Stock Centre, Department of Biochemistry, The Ohio State University, Columbus, OH 432 10, USA'dan temin edilmiştir. pUC18 (BamHI/BAP/DNA ligase) Pharmacia'dan, pUB110 restriksiyon ve modifikasyon enzimleri Sigma'dan satın alınmıştır.

Bakteriler LB besi yerinde (%1 w/v tryptone, %0,5 w/v yeast extract, %1 w/v NaCl) 37°C de bir gece orta düzeyde çalkalanarak (250 rpm) üretilmiş ve stok için kültür ortamına %10 w/v gliserol ilave edilerek -20°C'de muhafaza edilmişlerdir.

### SDS-PAGE Jeller ve Zymogram Analizleri

*Bacillus subtilis* ORBA97 suşunun bakterisiz kültür sıvısındaki (supernatantındaki) total proteinler bir hacim (1 vol.) Trikloroasetik asit (%20 w/v) uygulaması ile çöktürülüp Laemmli (17)'e göre hazırlanan SDS-PAGE jelle ve zymogram analizleri için de %0.2 w/v oranında nişasta (Sigma, S2630) içeren SDS-Nişasta-PAGE jellere uygulandı (18). Jelde mevcut proteinlerin renatürasyonu Saul ve ark. (19)'dan modifiye edilen Özcan ve ark. (9)'na göre gerçekleştirildi. Jelde bulunan total proteinler Coomassie boyaması ile ortaya çıkarılırken  $\alpha$ -amilaz aktif protein pozisyonları iyodin-potasyum iyodid ( $I_2/KI$ ) boyaması ile gösterilmiştir (17, 18).

## Enzim Aktivitesinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi

Rekombinant *Escherichia coli* klonları LB-Agar-Amp-Xgal (%1,5 w/v agar, 50 $\mu$ g/ml amfisisilin, 40 $\mu$ g/ml Xgal) plaklarında beyaz koloni olarak seçilmişlerdir. Rekombinant *E. coli*'ler  $\alpha$ -amilaz aktivite testi için steril kürdanlarla LB-Nişasta-Agar plaklarına aktarılmışlar ve kolonilerin şekillenmesinden sonra iyodin ( $I_2$ ) buharında boyanmışlardır. (13, 15). Rekombinant *Bacillus subtilis* klonları LB-Kanamisin-Nişasta-Agar (20 mg/ml kanamisin) üzerinde iyodin buharıyla doğrudan boyanarak belirlenmişlerdir (11).

## Kantitatif Enzim Analizleri

Kantitatif enzim analizlerinde *Bacillus subtilis* YB886/pUB110 $\alpha$ -97 klonuna ait kültür supernatantları kullanılmıştır. Standart olarak 50mM Sodyum asetat (pH: 2-6), Sodyum fosfat (pH 6-8) veya Tris (pH 8-12) solusyonlarında %1 w/v oranında çözülmüş nişasta (1 ml) substrat yine 1 ml enzim (kültür sıvısı) ile karıştırılmıştır. Aksi belirtilmedikçe 50mM Sodyum asetat (pH 5) standart olarak kullanılmıştır. Enzim-substrat karışımı 50°C'de 30 dakika tutulmuştur (8, 9). İndirgenen şekerler glukoz baz alınarak Dinitrosalisilik asit (DNS) metoduna göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (20). Sıcaklık ve pH optimumları ile enzimin sıcaklığa olan direnci (thermo-stabilite) deneyleri Özcan ve ark. (9)'da ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Süpernatant proteinlerinin miktarının belirlenmesinde Sığır Serum Albumini standart olarak alınmış ve Lowry (21) metodu uygulanmıştır.

## Moleküler Biyoloji Yöntemleri

*Bacillus subtilis* ORBA97 suşundan kromozomal DNA çıkarılarak (22) BamHI enzimi ile kısmi kesime bırakılmıştır (23). 100 ng kromozomal DNA 50 ng pUC18 (BamHI/BAP+Ligaz) plazmidini önce 11°C'de 1 saat sonra da +4°C'de 12 saat ligasyona bırakılmıştır. *Escherichia coli* hücrelerinin ligasyon sıvısıyla transformasyonunda  $CaCl_2$  yöntemi kullanılmıştır (24, 25). *Bacillus subtilis* hücrelerinin plazmidlerle transformasyonunda ise elektroporasyon tekniğinden yararlanılmıştır (26). Rekombinant *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'lerden plazmid izolasyonu Birnboim ve Doly (27)'ye göre yapılmıştır. DNA'nın kesim sonrası solusyondan saflaştırılmasında Gene-Clean-Kit (Sigma)'dan üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanılmıştır.

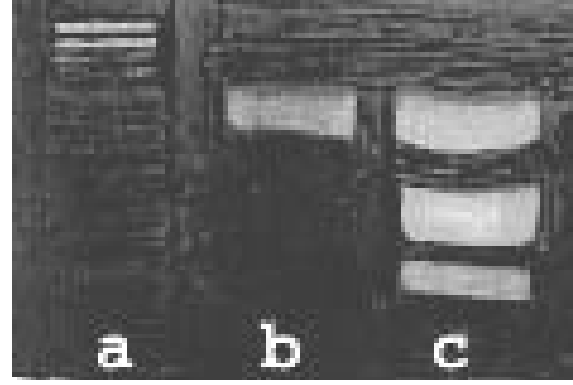
## Sonuçlar ve Tartışma

### $\alpha$ -AmilazORBA97 Geninin *E.coli* ve *B.subtilis*'te Klonlanması

*Bacillus subtilis* ORBA97 suşundan pUC18 (Amp<sup>r</sup>) plazmidi kullanılarak *E.coli* MRF suşu içerisinde oluşturulan gen bankası LB-Amp-Xgal plaklarına ekilerek yaklaşık 2000 adet rekombinant (beyaz renkli) koloni  $\alpha$ -amilaz testi için LB-Nişasta-Agar plaklarına aktarılmış ve bu plakların iyodinle boyanmasından sonra bir adet  $\alpha$ -amilaz pozitif koloni belirlenmiştir. *B. subtilis* 168 genomunun 4175 kb büyüklüğünde olması gen bankasının oluşturulmasında plazmidlerin vektör olarak seçilmesine etken olmuştur (28, 29). Klonlama yöntemi olarak direk (shut-gun) klonlama uygulanmıştır. Bu amaçla BamHI enzimi ile kromozomal DNA tam (full) kesime maruz bırakılmış ve bu enzime ait kesim noktasının gen içerisinde olmaması ümit edilmiştir (30).

$\alpha$ -amilaz pozitif *E.coli* klonundan çıkarılan rekombinant plazmid (pUC18A) üzerinde yapılan insört analizleri;  $\alpha$ -amilaz geni taşıyan DNA parçasının BamHI iç (internal) kesim bölgesi taşıdığını dolayısı ile bu enzimle tam bir kesimin gerçekleşmediğini göstermiştir. Bu nedenle pUC18A plazmidi BamHI enzimi ile bu iç kesim noktası kestirilmeden kısmi (partial) olarak kesilmeye çalışılmıştır. Açığa çıkan DNA parçaları (pUC18 ve gen insörtü) BamHI ile kesilmiş pUB110 (Kan<sup>r</sup>) plazmidine takılmıştır.  $\alpha$ -amilaz geni taşıyan rekombinant plazmidler (pUB110A), LB-Nişasta-Kanamisin-Agar plaklarında  $\alpha$ -amilaz aktivitesi bakımından iyodin boyaması ile belirlenmişlerdir. pUB110 plazmidi üzerindeki kanamisin direnç geni ürünü protein, iyodin boyaması ile yalancı zonlar oluşturmadığından dolayı tek kademe seleksiyon uygulanmıştır. Halbuki pUC18 plazmidi üzerinde bulunan amfisiilin direnç geni ürünü  $\beta$ -laktamaz enzimi iyodin boyası ile reaksiyona girerek yalancı zon oluşturabilmektedir (31). Bu nedenle  $\alpha$ -amilaz pozitif *E. coli* klonlarının seçiminde genelde iki kademeli bir seleksiyon uygulanmaktadır.  $\alpha$ -Amilaz pozitif *B.subtilis* klonlarından izole edilen rekombinant plazmidler BamHI enzimi ile tam kesim yapılarak insört analizi yapılmıştır (Şekil 1).

Bu analiz, klonlanan genin bu yönü ile laboratuvarımızda *B.subtilis* RSKK246 suşundan daha önce klonlanan  $\alpha$ -amilaz geninden farklı olduğunu göstermiştir (10, 11). *E.coli*'lerin genetik kompetensi (DNA alımına uygunluk) *B. subtilis*'e oranla daha iyi



Şekil 1. pUB110 orijinal ve pUB110  $\alpha$ -amilaz plazmidlerinin BamHI enzimi ile kesimi: (a) markır, b) BamHI ile kesilmiş pUB110, c) BamHI ile kesilmiş pUB110A).

olduğundan dolayı gen izolasyonu öncelikle bu suş üzerinde gerçekleştirilmiştir (32, 33). Bu genin *B.subtilis*'e aktarılmasında ise üretilen proteinlerin hücre dışına salgılanmasında *E. coli*'ye göre daha başarılı olması rol oynamıştır (34, 35).

### Enzim Karakterizasyonu

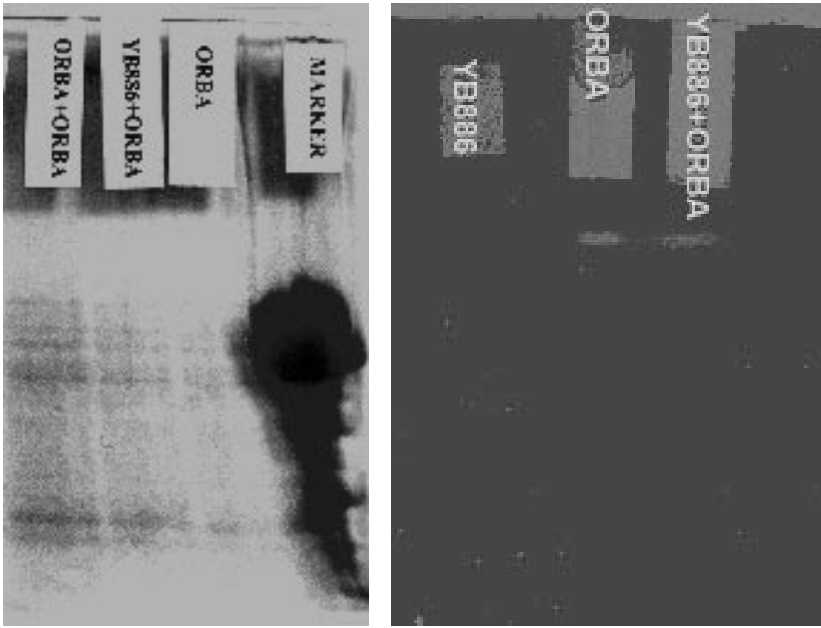
*B.subtilis* YB886/pUB110A bakterisine ait kültür sıvısı (cell-free-culture supernatant) denatüre protein jellerde ve enzimatik analizlerde doğrudan enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzime ait spesifik aktivite 12 saatlik bir üreme periyodu sonrasında 5,052  $\mu\text{mol} \cdot (\text{mg protein dakika})^{-1}$  olarak bulunmuştur. Aynı enzime ait spesifik aktivite 24 saat sonrasında ise 6,186  $\mu\text{mol} \cdot (\text{mg protein dakika})^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, enzimin nisbi olarak bakteri üremesinin durağan (stationary) döneminde hücre dışına daha yoğun olarak salındığına işaret etmektedir. Ayrıca klonlanan genin promotörünün ve üretilen enzimin sinyal peptidinin beklendiği gibi YB886 suşu tarafından tanındığını da göstermektedir (2). *B.subtilis* YB886/pUB110A tarafından üretilen enzimin düzeyi ORBA97 suşuna oranla %20 daha düşük gerçekleşmiştir. Bu durum genelde pUB110 vektörünün hücre içerisinde fazla kararlı (stable) olmaması yada enzimin yeni konakçı hücrede proteolitik parçalanmaya maruz kalmasıyla açıklanabilir (36, 37). Klonlanan gene ait enzim üretimi; konukçu bakteri suşunun genetik olarak değiştirilmesi ve buna bağlı olarak plazmid stabilitesinin düzeltilmesi (14), *B.brevis* gibi proteaz negatif suşların kullanılması (38), yeni vektör sistemlerinin geliştirilmesi (39, 40) veya suşta mevcut katabolit baskılanmanın (catabolite repression) kaldırılması ile iyileştirilebilir (41).

Gerek SDS-PAGE jellerinde yapılan total protein analizleri ve gerekse SDS-Nişasta-PAGE jeller üzerinde yürütülen zymogram analizleri enzimin moleküler ağırlığını tahmin etmede yeterli olamamıştır. Bununla beraber zymogram analizleri bize enzimin moleküler büyüklüğünün konukçu suşta genin ait olduğu *B.subtilis* ORBA97 suşundaki orijinali ile aynı olduğunu ve önemli ölçüde proteolitik bir parçalanmaya maruz kalmadığını göstermiştir (Şekil 2).

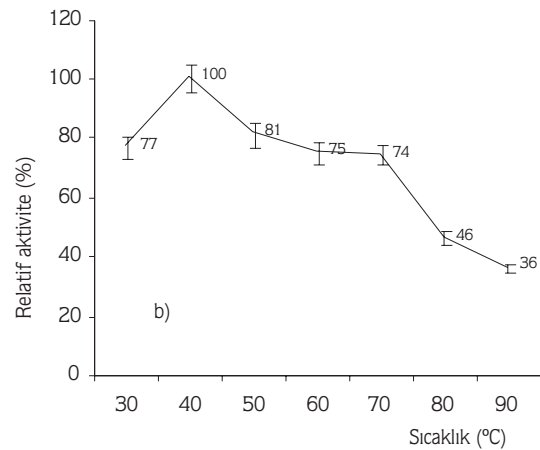
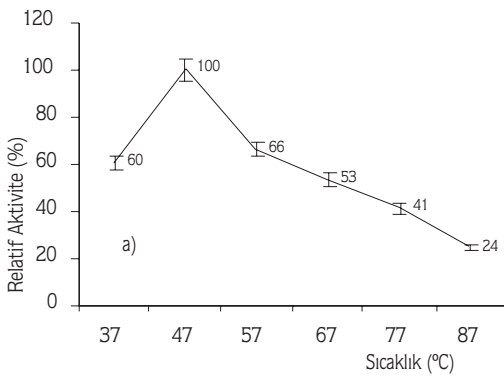
Klonlanan DNA parçası  $\alpha$ -amilaz aktivitesi dışında herhangi bir yan aktivite göstermemiştir. Enzimin sıcaklık ve pH optimumları sırasıyla 50°C ve 5 olarak saptanmıştır

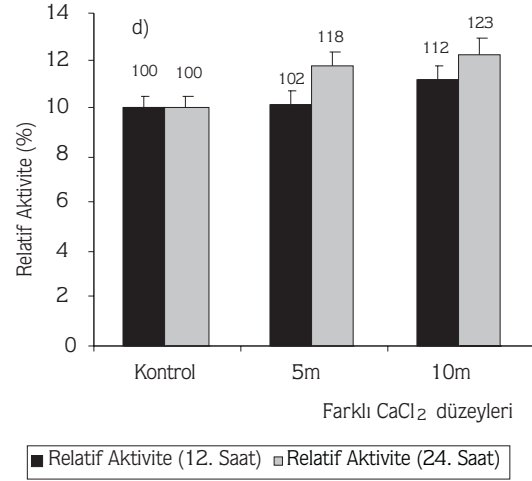
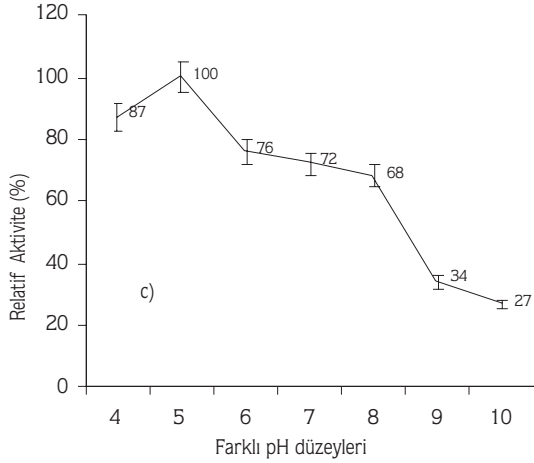
(Şekil 3 a,c). Enzimin nispeten geniş bir pH aralığında (pH 4-8) aktivitesini önemli ölçüde koruduğu gözlenirken; 90°C'de 15 dakika tutulduğunda mevcut aktivitesinin ancak %36'sını koruyabildiği bulunmuştur (Şekil 3b). Ortama 10mM Kalsiyum klorür ilavesi ile enzim aktivitesinde yaklaşık %23 oranında bir artış gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 3d).

Enzime ait bu özellikler, *Bacillus subtilis*'den elde edilen diğer  $\alpha$ -amilaz enzimlerine ait genel özelliklerden pek farklı olmamıştır (42). Kanatlılarda sindirim sisteminin pH'sı mide dışında genelde 5,7 ila 6,5 arasında değişmektedir (midede pH: 2,5-4,8) (43).  $\alpha$ -Amilaz



Şekil 2. *Bacillus subtilis* ORBA97 suşuna ait  $\alpha$ -amilaz enziminin SDS-PAGE ve SDS-Nişasta-PAGE'de incelenmesi.





Şekil 3.  $\alpha$ -Amilaz enzimine ait fiziksel özellikler: a) enzime ait sıcaklık optimumu, b) enzimin sıcaklığa direnci (Thermo-stability), c) pH optimumu, d) enzim üzerine Kalsiyum klorürün etkisi.

ORBA97 enziminin pH'sı bu açıdan kanatlı sindirim sistemine uyum göstermektedir. Fakat enzimin 90°C sıcaklıkta büyük ölçüde aktivitesini kaybetmesi yemlerin peletlenme aşamasında kullanımının mümkün olamayacağını göstermektedir (44).

### Teşekkür

Bu projeye (VHAG-1377) maddi destek sağlayan TÜBİTAK Veteriner Hayvancılık Grubu ve bu projede laboratuvar analizlerinde yardımcı olan Ziraat Mühendisi Abdullah Uyarlar'a teşekkür ederim.

### Kaynaklar

- Priest, G.F., Isolation and identification of aerobic endospore forming bacteria. *Bacillus*, Ed. C.R. Harwood, Plenum Press New York, 1989; 27-51.
- Harwood, C.R., *Bacillus subtilis* and its relatives: Molecular Biological and Industrial Workhorses. Elsevier Science Publishers Ltd. (UK), 1992; 10: 247-256.
- Rothstein, D.M., Devlin, P.E. and Cate, R.L., Expression of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*. 1986; 168:839-842.
- Yamagata, H. and Udaka, S., Extremely efficient protein secretion system in *Bacillus brevis*. Recombinant microbes for industrial and agricultural application (Ed. T. Murooka and T. Imanaka) Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, pp. 71-80.
- Yamashita, I., Starch-processing enzymes produced by recombinant bacteria. Recombinant microbes for industrial and agricultural application (Ed. T. Murooka and T. Imanaka) Marcel Dekker, Inc., New York, 1994; pp. 325-340.
- Schmidt, A.S., Vantom, A.M. and Asenjo, J.A., Partitioning and purification of  $\alpha$ -amylase in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994; 16: 131-142.
- Freer, S.N., Purification and characterization of the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Streptococcus bovis* JB 1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993; 59 (5): 1398-1402.
- Satoh, E., Nimura, Y., Uchimura, T., Kozaki, M. and Komagata, K., Molecular cloning and expression of two  $\alpha$ -amylase genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993; 59 (11): 3669-3673.
- Özcan, N., Uyarlar, A., *Bacillus subtilis* alfa-amilaz geninin *Escherichia coli* de klonlanarak rekombinant alfa-amilaz enziminin üretimi. *Ç.Ü., Ziraat Fak. Dergisi* 1996; 11 (4): 175-182.
- Özcan, N., Uyarlar, A., Transferring of alpha-amylase genes of *Bacillus* spp. to *Bacillus subtilis* chromosome and isolation of these genes in *Escherichia coli* by gene cloning. *Proceeding of 13<sup>th</sup> National Biology Congress*, İstanbul, 1997; 2:393-402.
- Altınalan, A. and Özcan, N., Construction of novel *Bacillus subtilis* strain for probiotic application by transferring alpha-amylase gene *Proceeding of Animal Science Congress II, Bursa-TURKEY*, 1998; 393-402.
- Itkor, P., Tsukagoshi, N. and Udaka, S., Nucleotide sequence of the raw starch digesting amylase gene from *Bacillus* sp. B1018 and its strong homology to the cyclodextrin glucanotransferase genes. *Biochemic. And Biophy. Res. Commun.*, 1990; 166 (2): 630-636.
- Comelis, P., Gigneffe, C. and Willemet, K., Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *E. coli*. *Mol. Gen Genet*. 1982; 186: 507-511.



14. Vehmaanpera, J., Nybergh, P.M.A., Tanner, R., Pohjonen, E., Bergelin, R. and Korhola, M., Industrial production of  $\alpha$ -amylase by genetically engineered *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technology*, 1987; 9: 546-548.
15. Hols, P., Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N. and Delcour, J., Use of expression-secretion signals and vector free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for alpha-amylase and levanase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994; 60 (5): 1401-1413.
16. Özcan, N., Heterologous expressing of genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2000. (Basimda).
17. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)*, 1970; 227:680-685.
18. Lee, S., Morikawa, M., Takagi, M. and Imanaka, T., Cloning of aapt gene and characterization of its product, alpha-amylase, pullulanase (aapT), from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. strain XAL60I. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994; 60:3761-3773.
19. Saul, D.J., Williams, L.C., Grayling, R.A., Chambley, L.W., Love, D.R. and Bergquist, P.L., celB, a gen coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". *Applied and Environmental Microbiology*, 1990; 56:3117-3124.
20. Miller, G.L., Brum, R., Glennon, W.E. and Burton A.L., Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Ana. Biochem.*, 1960; 2:127-132.
21. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-275.
22. Cutting, S.M. and Van der Horn, P.B., Genetic Analysis in Molecular Biology Methods for *Bacillus* (Ed. by C.R. Harwood and S.M. Cutting), 1990; pp. 27-74.
23. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982; pp. 455.
24. Barat-Guierida, M., Docherty, R. and Rickwood, R., DNA replication and transcription. *Mitochondria: A practical approach*, IRL Press Inc. Oxford, 1987; pp. 247-250.
25. Hanahan, D., Techniques for transformation of *Escherichia coli* DNA cloning. A practical approach (Ed. Br D.M. Glover IIRL Press Oxford), 1985; 1:121-127.
26. Brigidi, H., Rossi, E.D., Bertarini, M.L., Riccardi, G. and Matteuzzi, D., Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Letters*, 1990; 67:135-138.
27. Birnboim, H.C. and Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 1979; 7:1513-1523.
28. Harwood, C.R., *Bacillus*. Plenum Press New York and London, 1989; pp. 414.
29. Brown, T.A., *Gene Cloning*. Chapman&Hall, London, 1996; pp. 334.
30. Harwood, C.R. and Cutting, S.M., *Molecular biology methods for Bacillus*. John Wiley&Sons Ltd., 1990; pp. 320.
31. Old, R.W. and Promise, S.B., *Principle of gene manipulation*. Blackwell Scientific Publications, London, 1989; pp. 49.
32. Dubnau, D., Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.*, 1991; 55 (3): 395-424.
33. Hardy, K.G., *Bacillus cloning methods*. DNA Cloning. Vol: II, A practical approaches. Ed. Glover, D.M., IRL Press., Oxford, 1985; pp. 1-17.
34. Oliver, D., Protein secretion in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1985; 39:615-648.
35. Simonen, M. and Palva, I., Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbial reviews*, 1993; 57:109-137.
36. Mautain, A., Gene expression systems for *Bacillus subtilis*. *Bacillus*, (Ed. C.R. Harwood) Plenum Press New York, 1989; pp. 73-107.
37. Leonhard, H., Identification of low-copy number mutation within the pUB110 replicon and its effect on plasmid stability in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 1990; 94:121-124.
38. Tsukagoshi, N., Sasaki, S.I.T., Takemura, T., Ihara, H., Idota, Y., Yamagata, H. and Uda, S., Efficient synthesis and secretion of a thermophilic  $\alpha$ -amylase by protein-producing *Bacillus brevis* 47 carrying the *Bacillus stearothermophilus* amylase gene. *Journal of Bacteriol.*, 1985; 1182-1187.
39. Leonhart, H. and Alonso, J.C., Construction of a shuttle vector for inducible gene expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiol.*, 1988; 134:605-630.
40. Ikuta, N., Souza, M.B.N., Valencia, F.F., Castro, M.E.B., Schenberg, A.C.G., Kleiner, A.P. and Astolfi-Filho, S., The  $\alpha$ -amylase gene as a marker for gene cloning: Direct screening of recombinant clones. *Biotechnology*, 1990; 8:24 1-242.
41. Henkin, M.T., Grundy, F.J., Nicholson, W.L. and Chambliss, G.H., Catabolite repression of a-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* lacI and galR repressors. *Molecular Microbiol.* 1991; 5(3), 575-584.
42. Godfrey, T. and West, S., *Industrial Enzymology*. Macmillian Press Ltd., London, 1996; pp. 609.
43. Sturkie, D.D., *Avian Physiology*, Springer-Verlag, New York, USA, 1986; pp. 295.
44. Wallace, R.J., and Newbold, C.J., Probiotics for ruminants. In: *Probiotics: the Scientific Basis* (Ed. R. Fuller) Chapman and Hall, London, 1992; 315-353.