

أمثلة ظروف إنتاج أنزيم السيلولاز من بكتريا *Bacillus cereus* 21 باستخدام طريقة التخمير المغمور

ناريمان نعمة⁽¹⁾ ومحمد محمد⁽²⁾ ولينة الأمير⁽³⁾

تاريخ الإيداع 2013/09/04

قبل للنشر في 2013/12/22

الملخص

جرت أمثلة ظروف إنتاج أنزيم السيلولاز باستخدام قشور السذرة كركيزة والسلالة المحلية *Bacillus cereus* 21 المنتجة للأنزيم وفق طريقة التخمير المغمور، ودُرس فيها تأثير خمسة متغيرات (درجة حرارة الحضانة، ودرجة الحموضة، ومدة الحضانة، وحجم اللقاحة، وتركيز الركيزة) في نمو السلالة المستخدمة وإنتاج الأنزيم، وذلك باستخدام البرنامج الإحصائي Minitab والتصميم الإحصائي Response Surface Methodology (RSM)، وقد أعطت السلالة المدروسة أعلى فعالية للأنزيم عند درجة حرارة الحضانة 25°C، ودرجة الحموضة 9.5، ومدة الحضانة 18 ساعة، وحجم اللقاحة 1 %، وتركيز الركيزة 0.5 %. قدرت الفعالية الأنزيمية الكلية من خلال كمية الغلوكوز المتحرر الناتجة بفعل الأنزيمات المحللة للسيلولوز التي أفرزتها البكتريا المستخدمة إلى خارج الخلية التي يتناسب تركيزها مع الفعالية الأنزيمية الكلية لأنزيمات السيلولاز، إذ بلغت الفعالية الأنزيمية ضمن الشروط المذكورة 0.6 وحدة دولية/مل.

الكلمات المفتاحية: سيلولاز، *Bacillus cereus*، فعالية الأنزيم، التخمير المغمور.

⁽¹⁾ طالبة دكتوراه، ⁽²⁾ الأستاذ المشرف، ⁽³⁾ الأستاذ المشرف المشارك، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Optimization of Cellulase Enzyme Production Conditions from *Bacillus cereus* 21 Using Submerged Fermentation

N. Nema⁽¹⁾, M. Mohammad⁽²⁾ and L. Alamir⁽³⁾

Received 04/09/2013

Accepted 22/12/2013

ABSTRACT

The conditions for producing cellulase enzyme were optimized using corn husks as substrate in submerged fermentation. The effects of five parameters (incubation temperature, pH, substrate concentration, inoculum volume, fermentation time) on the strain growth and enzyme production were studied. For this purpose the statistical program Minitab and the statistical design Response Surface Methodology (RSM) were applied. The highest enzyme activity was obtained at an incubation temperature of 25°C, pH value of 9.5, fermentation time of 18 h, inoculum volume of 1% and substrate concentration of 0.5%. Total enzyme activity was deduced through the amount of reduced sugar produced by extracellular cellulose degrading enzymes, where their concentration is proportional to total activity of cellulase enzymes. Enzyme activity obtained under the above mentioned conditions was 0.6 IU/ml.

Key words: Cellulase, *Bacillus cereus*, Enzyme activity, Submerged fermentation.

⁽¹⁾ Ph.D., Student, ⁽²⁾Supervisor, ⁽³⁾ Associated Supervisor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Damascus University

المقدمة

طوّرت الطبيعة العديد من أنزيمات السيلولاز كي تجري عملية حلمهة السيلولوز بشكل تلقائي، بما فيها أنزيمات الـ *exoglucanase* التي تزيل بلمرة السيلولوز من النهايات المختزلة وغير المختزلة، وأنزيمات الـ *endoglucanase* التي تلتصق على طول سلاسل السيلولوز عشوائياً (Warren 1996؛ Wilson and Irwin 1999).

يستخدم السيلولاز في الصناعات النسيجية وفي صناعة المنظفات (Kottwitz *et al.*, 2005)، وتبييض الورق (Buchert *et al.*, 1996)، ويستخدم أيضاً في الصناعات الغذائية في ترويق عصائر الفواكه والخضار واستخلاص زيت الزيتون (Galante *et al.*, 1998)، وقد وجد أن إضافة السيلولاز إلى علف الحيوانات قد أدى إلى تحسين هضم هذه الأعلاف (Lewis *et al.*, 1996).

تعدّ البكتريا بسبب تنوعها الكبير ونموها السريع الأكثر ملاءمة لإنتاج السيلولاز ذي الاستقرارية الحرارية العالية، مما يجعل لها أهمية كبيرة في الاستخدامات الصناعية (Ray *et al.*, 2010؛ Yang *et al.*, 2009؛ Liang *et al.*, 2004؛ Camassola *et al.*, 2007)، لذا عُزلت البكتريا *Bacillus sp.* من مصادر طبيعية مختلفة مثل التربة القلوية والخشب المتفسخ والطبقة السطحية من التربة الغنية بالأوراق المتساقطة والأعشاب وروث الحيوانات وبقايا قش القمح والذرة ومن نخالة القمح والذرة وبقايا صناعة الورق (Sharada *et al.*, 2013)، وأكدت النتائج إمكانية نمو بكتريا *Bacillus sp.* في وسط ذي قلوية عالية (pH من 8 إلى 10) ودرجة حرارة متوسطة (45-55°C)، وأن السيلولاز المنتج يتمتع بفعالية عالية عند درجات الحرارة المرتفعة، إذ بقي الأنزيم مستقراً عند درجات الحرارة بين 60°C و90°C مدة 30 دقيقة (Nizamudeen and Bajaj 2009). وفي إحدى الدراسات (Abou-Taleb *et al.*, 2009) عزلت السلالتان *Bacillus amyloliquefaciens* C2 و *Bacillus alcalophilus* S39 Carboxymethyl النباتات، على الترتيب. واستخدم الأجار المغذي مع إضافة الـ Carboxymethyl cellulose (CMC) كمادة محفزة لإنتاج أنزيم السيلولاز (Ray *et al.*, 2007؛ Lee *et al.*, 2008؛ Subramaniyan and Prema 2000؛ Kashima and Udaka 2004). وأكدت هذه الدراسات أن أفضل ظروف لإنتاج أنزيم السيلولاز كانت عند التركيز 1% من (CMC) كمصدر للكربون و0.7% من خلاصة الخميرة كمصدر للأزوت، ودرجة الحموضة 7 pH وحجم لقاحه 3%؛ وكانت الفعالية العظمى للسيلولاز المنتج عند درجة حرارة الحضانة 30°C للسلالة *B. alcalophilus* S39 و45°C للسلالة *B. amyloliquefaciens* C2. وقد اختيرت سرعة الدوران المناسبة لتكون بين 150 دورة/د و200 دورة/د.

هدفت هذه الدراسة إلى أمثلة ظروف إنتاج السيلولاز من *Bacillus cereus* 21 المعزولة من تربة محلية باستخدام مصدر للطاقة متوافر ورخيص الثمن لما لهذا الإنزيم من أهمية كبيرة في الصناعات المختلفة.

مواد البحث وطرقه

بالاعتماد على نتائج بحث سابق (نعمة وزملائها، قيد النشر) تم فيه الحصول على السلالة *Bacillus cereus* 21، استخدمت هذه السلالة في هذا البحث مع قشور الذرة كركيزة من أجل أمثلة ظروف إنتاج الإنزيم باستخدام طريقة التخمير المغمور.

اختيار الركيزة: استخدمت المخلفات الزراعية (قشور بذور القطن - تين الشعير - قشور الذرة) كمصدر وحيد للكربون، مع السلالة *Bacillus cereus* 21، لتحديد الركيزة الفضلى لنمو السلالة وإنتاج الإنزيم، وذلك من خلال تقدير فعالية الإنزيم الناتج.

تحضير المخلفات الزراعية: تركت المخلفات الزراعية (قشور بذور القطن - تين الشعير - قشور الذرة) لتجف في جو المخبر، ثم طحنت في اليوم التالي كل على حدة باستخدام مطحنة كهربائية، واستخدمت كل منها بتركيزين (3% و4%).

تحضير وسط التخمر: حضر وسط التخمر وفق (Li and Gao 1997) المكون من 0.02% من $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، 0.075% من KNO_3 ، 0.05% من K_2HPO_4 ، 0.002% من $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ، 0.004% من $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ، 0.2% من Peptone المذابة في الماء المقطر (pH 7). ووزع في دوارق سعة 250 مل بواقع 50 مل في كل دورق، أضيفت الركائز المذكورة سابقاً بتركيز 3% و4% كل على حدة، وعمقت الدوارق في الصاد الموصد.

عملية الزرع: لفتحت الدوارق السابقة بالسلالة *B. cereus* 21 بعمر 24 ساعة (حجم اللقاحة 1%)، حضنت الدوارق 24 ساعة في الحاضنة الدوارة (DSR، كورية الجنوبية) بدرجة حرارة $37^\circ C$ وسرعة دوران 150 دورة/دقيقة، بعد انتهاء زمن التخمر أجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة/دقيقة، وفصلت الرشاحة المحتوية على محلول الإنزيم لتقدير فعاليته الأنزيمية (Robson and Chambliss 1984).

المتغيرات المدروسة: لتحديد الشروط المثلى لإنتاج أنزيمات السيلولاز، تُدرس تأثير خمسة متغيرات (درجة حرارة الحضانة، ودرجة الحموضة، ومدة الحضانة، وحجم اللقاحة، وتركيز الركيزة) في نمو السلالة المستخدمة، باستخدام البرنامج الإحصائي Minitab والتصميم الإحصائي (RSM) Response Surface Methodology (Muthuvelayudham and Viruthagiri 2010)، الذي وضع ليس فقط لاختصار عدد التجارب المستخدمة في عملية الأمثلة، بل لإعطاء نتائج أكثر منطقية ووضوحاً من

البرامج الإحصائية الأخرى؛ وذلك من خلال دراسة تأثير كل عامل على حدة وتأثير العوامل المتداخلة مع بعضها بعضاً. وتشير الدراسات أنه لتقدير فعالية أنزيمات السيلولاز الناتجة يجب أولاً التوصل إلى معادلة المنحنى القياسي للغلوكوز، ومنها يمكن معرفة كمية الغلوكوز المتحرر التي تتناسب مع الفعالية الأنزيمية.

المنحنى القياسي للغلوكوز: حضر محلول قياسي من الغلوكوز (D-Glucose) بتركيز 1 غ/ل باستخدام الماء المقطر، ثم جهزت عدة تراكيز منه: 0.1، 0.2، 0.3، 0.4، 0.5، 0.6، 0.7، 0.8، 0.9، 1 مغ/مل، أخذ 1 مل من كل تركيز إلى أنبوب اختبار يحوي 1 مل من المحلول الموقى سترات الصوديوم (0.05M) pH 4.8. حضنت الأنابيب عند درجة الحرارة 50°C مدة نصف ساعة، ثم أضيف 3 مل من الكاشف (dinitrosalicylic acid DNS)، وضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة الغليان مدة 5 دقائق، ثم بردت إلى درجة حرارة الغرفة وقيست الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 540 نانومتراً مقابل الشاهد الذي استبدل فيه محلول الغلوكوز بالمحلول الموقى (Bailey and Nevalainen 1981)، ثم رسم المنحنى البياني للعلاقة بين تركيز الغلوكوز والامتصاصية.

تقدير فعالية الأنزيم الناتج: قدرت فعالية الأنزيم الناتج باستخدام طريقة Robson و Chambliss (1984) التي تتلخص بوضع 1 مل من الركيزة (1% CMC من شركة Sigma) المحضر في 0.05 مولات الصوديوم pH 4.8 في أنبوب اختبار مع 1 مل من الرشاحة الحاوية على الأنزيم، والحضن عند الدرجة 50°C مدة 30 دقيقة، ثم قياس السكاريدات المرجعة باستخدام طريقة Miller التي تعتمد على تفاعل الكاشف (DNS) مع الغلوكوز المتحرر (Miller et al., 1960)، وتحدد فعالية السيلولاز عبر قياس الامتصاصية عند طول الموجة 540 نانومتراً ومقارنتها بالعينة الشاهد المحتوية على المكونات كلها ماعدا محلول الأنزيم الذي يستعاض عنه بالماء المقطر وبالحموم نفسها، وتعرف وحدة الفعالية بأنها كمية السيلولاز التي تحرر 1 ميكرومول من السكاريدات المرجعة في الدقيقة الواحدة ضمن شروط قياس التجربة.

أمثلة ظروف إنتاج أنزيمات السيلولاز: جرت أمثلة ظروف إنتاج الأنزيم باستخدام طريقة التخمر المغمور Submerged Fermentation، ودُرس تأثير خمسة متغيرات (درجة حرارة الحضانة، ودرجة الحموضة، ومدة الحضانة، وحجم اللقاحة، وتركيز الركيزة) في نمو السلالة *B cereus 21* وإنتاج الأنزيم، مع تثبيت سرعة دوران الحاضنة الدوارة عند 150 دورة/دقيقة. إن قيم المتغيرات المدروسة موضحة في الجدول (1) وباستخدام البرنامج الإحصائي Minitab وُضع التصميم الإحصائي المشار إليه في الجدول (2) الذي يعبر عن المتغيرات، ويبين التجارب التي أجريت وعددها 32 تجربة.

الجدول (1) المتغيرات المدروسة ومستوياتها.

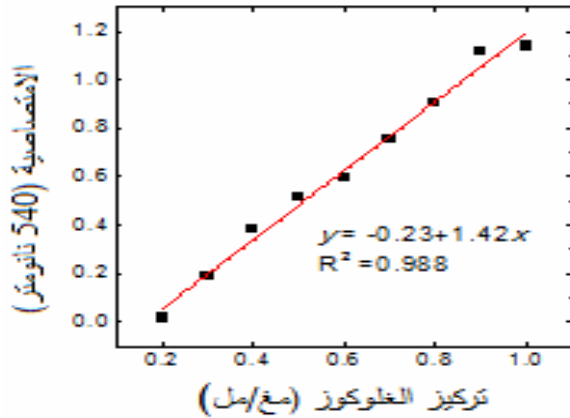
المتغيرات					مستويات المتغيرات بصورة رمز
درجة الحرارة [°C]	درجة الحموضة	زمن التخمر [h]	حجم اللقاحة [%]	تركيز الركيزة [%]	
25	5.5	18	1	0.5	$\alpha = -2$
30	6.5	22	2	1	-1
35	7.5	26	3	1.5	0
40	8.5	30	4	2	+1
45	9.5	34	5	2.5	$\alpha = +2$

الجدول (2) التصميم الإحصائي للتجارب.

درجة الحرارة [°C]	درجة الحموضة	زمن التخمر [h]	حجم اللقاحة [%]	تركيز الركيزة [%]	المتغيرات رقم التجربة
25	7.5	26	3	1.5	1
35	7.5	26	3	1.5	2
35	7.5	26	5	1.5	3
35	7.5	26	3	1.5	4
40	8.5	22	4	1	5
35	7.5	26	3	1.5	6
35	7.5	18	3	1.5	7
35	7.5	26	3	1.5	8
30	6.5	30	4	2	9
35	7.5	26	3	2	10
30	6.5	30	2	1	11
30	8.5	22	4	2	12
30	8.5	30	2	2	13
35	9.5	26	3	1.5	14
40	6.5	30	4	1	15
30	6.5	22	2	1	16
40	6.5	22	2	1	17
35	5.5	26	3	1.5	18
35	7.5	26	1	1.5	19
35	7.5	26	3	0.5	20
40	8.5	30	4	2	21
30	8.5	30	4	1	22
40	8.5	22	2	2	23
30	8.5	22	2	1	24
40	8.5	30	2	1	25
35	7.5	26	3	1.5	26
40	6.5	22	4	2	27
30	6.5	22	4	1	28
35	7.5	26	3	1.5	29
35	7.5	34	3	1.5	30
45	7.5	26	3	1.5	31
40	6.5	30	2	2	32

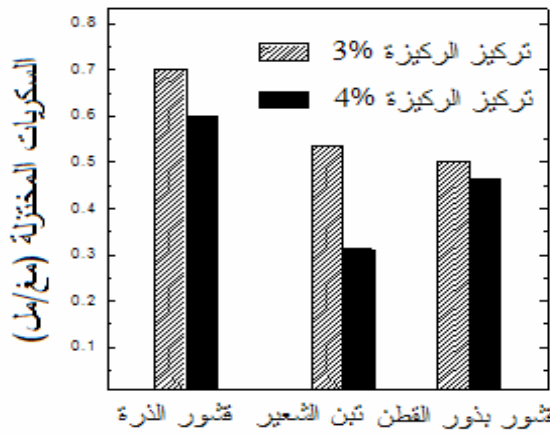
النتائج والمناقشة

حضرت تراكيز متدرجة من الغلوكوز وقيست الامتصاصية عند طول الموجة 540 نانومتراً، ورُسم المنحنى القياسي للغلوكوز كما في الشكل (1).



الشكل (1) المنحنى القياسي للغلوكوز.

استخدمت طريقة التخمير المغمر ضمن الظروف الموضحة أعلاه وبمعدل مكررين لكل تجربة، وتبين أن استخدام قشور الذرة كركيزة مع السلالة *B. cereus* 21 أدى إلى الحصول على كمية مرتفعة من الغلوكوز المتحرر، وهذا يعني أعلى فعالية أنزيمية مقارنة بقشور بذور القطن وتبن الشعير، وقد قدرت الفعالية وفق طريقة Miller المذكورة أعلاه، كما يتضح من الشكل (2).



الشكل (2) كمية الغلوكوز المتحرر عند استخدام قشور بذور القطن، تبن الشعير وقشور الذرة.

قيست الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول الموجة 540 نانومتراً، وبتطبيق معادلة المستقيم المستنتجة من المنحنى القياسي للغلوكوز الموضح في الشكل (1) حُسبت كمية الغلوكوز المتحرر. حسبت فعالية أنزيم السيلولاز باستخدام CMC كركيزة وفق المعادلة الآتية:

فعالية الأنزيم (وحدة دولية/مل) = $0.37 \times$ كمية الغلوكوز المتحرر (Robson and Chambliss 1984). يبيّن الجدول (3) النتائج التي تم الحصول عليها.

الجدول (3) نتائج قياس الفعالية الأنزيمية لأنزيم السيلولاز.

رقم التجربة	فعالية الأنزيم [IU /ml]	رقم التجربة	فعالية الأنزيم [IU /ml]
1	0.429	17	0.428
2	0.426	18	0.437
3	0.422	19	0.396
4	0.344	20	0.343
5	0.464	21	0.259
6	0.424	22	0.436
7	0.517	23	0.503
8	0.321	24	0.432
9	0.574	25	0.269
10	0.413	26	0.356
11	0.423	27	0.543
12	0.486	28	0.247
13	0.182	29	0.400
14	0.334	30	0.387
15	0.488	31	0.486
16	0.407	32	0.514

ومن أجل إجراء التحليل الإحصائي للنتائج أخذت العلاقة التي تربط بين فعالية أنزيم السيلولاز (Y) والمتغيرات الخمسة المدروسة (x_i):

$$Y = a + bx_1 + cx_2 + dx_3 + ex_4 + fx_5 + gx_1^2 + hx_2^2 + ix_3^2 + jx_4^2 + kx_5^2 + lx_1x_2 + mx_1x_3 + nx_1x_4 + ox_1x_5 + px_2x_3 + qx_2x_4 + rx_2x_5 + sx_3x_4 + tx_3x_5 + ux_4x_5$$

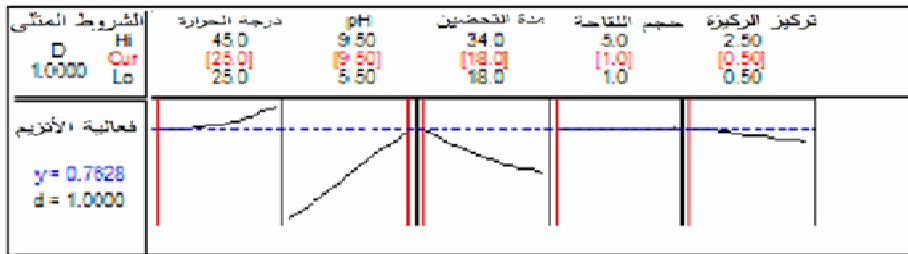
إذ تمثل: a الثابت؛ b، c، d، e، f عوامل المتغيرات؛ g، h، i، j، k عوامل مربع المتغيرات؛ l، m، n، o، p، q، r، s، t، u عوامل المتغيرات المترابطة؛ وجرى التحليل الإحصائي عند المستوى 0.05.

يبين الجدول (4) تأثير المتغيرات المدروسة (كل متغير على حدة، ومربعات المتغيرات، والعلاقة بين المتغيرات) في فعالية الأنزيم. نلاحظ في هذا الجدول أن قيم الاحتمالية P بالنسبة إلى درجة الحموضة ومدة الحضان وتركيز الركيزة أقل من 0.05، ومن ثم فإن هناك تأثيراً معنوياً لكل من هذه المتغيرات في فعالية الأنزيم. كما يظهر من هذا الجدول تأثير مربع المتغيرات في فعالية الأنزيم. وهنا نلاحظ أن قيم P لكل من (درجة حرارة الحضان)²، و(مدة الحضان)² أقل من 0.05، وهذا يعني أنه يوجد تأثير معنوي لهذه المتغيرات في فعالية الأنزيم، ولذلك تأخذ العلاقة بين مربع هذه المتغيرات وفعالية الأنزيم شكل قطع مكافئ؛ كذلك يظهر في الجدول تأثير المتغيرات المترابطة (المتداخلة) في فعالية الأنزيم، ونلاحظ أن علاقة درجة الحموضة معنوية مع كل من درجة حرارة الحضان ومدة الحضان وتركيز الركيزة (قيمة P أقل من 0.05)، كما أن العلاقة معنوية بين مدة الحضان وكل من درجة حرارة الحضان وحجم اللقاحة وتركيز الركيزة. في حين تبقى العلاقات الأخرى جميعها غير معنوية. ويدل معامل الانحدار $R^2=94.9\%$ أن معادلة الانحدار للعوامل المتغيرة تؤثر بنسبة 94.9% في مقدار التغير في فعالية الأنزيم.

الجدول (4) تأثير الوسائط المدروسة في فعالية الأنزيم إحصائياً.

المتغير	المعامل	الخطأ المعياري للمعامل	الاحتمالية P
الثابت	-4.514	1.029	0.001
درجة الحرارة	0.031	0.025	0.244
درجة الحموضة	0.661	0.129	0.000
مدة الحضان	0.121	0.031	0.002
حجم اللقاحة	-0.185	0.112	0.127
تركيز الركيزة	0.893	0.224	0.002
(درجة الحرارة) ²	0.001	0.000	0.015
(درجة الحموضة) ²	0.000	0.006	0.986
(مدة الحضان) ²	0.001	0.000	0.023
(حجم اللقاحة) ²	0.006	0.006	0.375
(تركيز الركيزة) ²	-0.008	0.025	0.756
درجة الحرارة - درجة الحموضة	-0.005	0.002	0.020
درجة الحرارة - مدة الحضان	-0.001	0.000	0.007
درجة الحرارة - حجم اللقاحة	-0.003	0.002	0.087
درجة الحرارة - تركيز الركيزة	0.002	0.003	0.645
درجة الحموضة - مدة الحضان	-0.017	0.002	0.000
درجة الحموضة - حجم اللقاحة	0.012	0.008	0.200
درجة الحموضة - تركيز الركيزة	-0.077	0.017	0.001
مدة الحضان - حجم اللقاحة	0.006	0.002	0.014
مدة الحضان - تركيز الركيزة	-0.014	0.004	0.006
تركيز الركيزة - حجم اللقاحة	0.021	0.017	0.239

يبين الشكل (3) الشروط المثلى لنمو البكتريا وإنتاج الأنزيم وفق النتائج الإحصائية التي تشير إلى أن درجة حرارة الحضانة 25°C ، ودرجة الحموضة 9.5، ومدة الحضانة 18 ساعة، وحجم اللقحة 1 %، وتركيز الركيزة 0.5 % هي أفضل الظروف لإنتاج الأنزيم، وهذا يتوافق مع Bajaz و Nizamudeen (2009) الذي يؤكد إمكانية نمو البكتريا *Bacillus sp.* في وسط فلوي، وأن السيلولاز المنتج يتمتع بفعالية عالية. لذلك أجريت هذه التجربة وأخذت قراءة الامتصاصية، ثم حسبت كمية الغلوكوز المتحرر من معادلة المنحنى القياسي للغلوكوز، فبلغت 1.538 مغ/مل، كما حسبت فعالية الأنزيم فبلغت 0.6 وحدة دولية/مل، وهي قريبة من فعالية الأنزيم النظرية $y = 0.7628$ (الشكل 3). وتتفق هذه النتيجة مع ما ورد في (Deka et al. 2013)، إذ درس تأثير كل من درجة حرارة الحضانة ودرجة الحموضة وسرعة الدوران في إنتاج أنزيم السيلولاز من السلالة *Bacillus subtilis* والركيزة CMC، وبلغت فعالية الأنزيم 0.56 وحدة دولية/مل، ومع نتائج الباحثين Isaiarasu و Shankar (2012)، إذ أجريا أمثلة إحصائية لإنتاج السيلولاز من السلالة *Bacillus pumilus* EWBCM1، ووجدوا أن الشروط المثلى لإنتاج السيلولاز تكون عند استخدام الـ Galactose بتركيز 1 غ/ل، وخالصة الشعير بتركيز 0.5 غ/ل مدة 72 ساعة، وبلغت فعالية الأنزيم 0.57 وحدة دولية/مل.



الشكل (3) الشروط المثلى لنمو البكتريا وإنتاج الأنزيم.

ممّا تقدم نجد أن أفضل الشروط لإنتاج أنزيمات السيلولاز من بكتريا *B. cereus* 21 باستخدام ركيزة قشور الذرة هي درجة حرارة الحضانة 25°C ، ودرجة الحموضة 9.5، ومدة الحضانة 18 ساعة، وحجم اللقحة 1 %، وتركيز الركيزة 0.5 %، إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 0.6 وحدة دولية/مل.

REFERENCES المراجع

- نعمة، ناريمان، ومحمد محمد، ولينة الأمير. 2013. الكشف عن إنتاج أنزيمات السيلولاز من بكتريا *Bacillus* sp. المعزولة من الترب المحلية والتعرف على بعض صفاتها الجزيئية، بحث مقبول للنشر في المجلة العربية للبيانات الجافة، كانون الأول، 2013.
- Abou-Taleb, K. A., W. A. Mashhoor, A. Sohair, M.S. Sharaf, and H. M. Hoda. 2009. Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacilli, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3): 2429-2436.
- Bailey, M. J. and K. M. H. Nevalainen. 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants, *Enzyme Microb. Technology* 3: 153-157.
- Buchert J., Suurnakki A., Tenkanen M. and Viikari L. 1996. Enzymatic characterization of pulps, in enzymes for pulp and paper processing, Edited by T. W. Jeffries, L Viikari, ACS Symp Ser 655. 38-43.
- Camassola, M., L. R. De Bittencourt, N. T. Shenem, J. Andreus and D. A. J. Pinheiro. 2004. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*, *Biocatal. Biotransform.* 22: 391-396.
- Deka, D., S. P. Das, N. Sahoo, D. Das, M. Jawed, D. Goyal and A. Goyal, .2013. Enhanced cellulase production from *Bacillus subtilis* by optimizing physical parameters for bioethanol production, *ISRN Biotechnology*, Article ID 965310, 11 pages, 2013. doi:10.5402/2013/965310
- Galante, Y. M., De Conti A. and Monteverdi R. 1998. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries, in *Trichoderma and Gliocladium-Enzymes*, Biological Control and Commercial Applications, vol 2, edited by G F Harman and C P Kubicek (Taylor and Francis, London). 327-342.
- Kashima, Y. and S. Udaka. 2004. High-level production of hyperthermophilic cellulase in the *Bacillus brevis* expression and secretion system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(1): 235-237.
- Kottwitz, B. and Schambil, F. 2005. Cellulase and cellulose containing detergent, *Us Pat.* 20050020472, 27 January,
- Lee, Y. J, B. K. Kim, B. H. Lee, N. K. Lee, C. H. Chung, Y. C. Lee and J. W. Lee. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloqueliciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour. Technol.* 99(2): 378-386.
- Lewis, G. E., Hunt C. W., Sanchez W. K., Treacher R., Pritchard G. T. and Peng P. 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet to beef steers, *J. Animal Sci*, 74. 3020-3028.
- Li, X. and P. Gao. 1997. CMC-liquefying enzyme, a low molecular mass initial cellulose-decomposing cellulase responsible for fragmentation from *Streptomyces* sp. LX. *J. Appl. Microbiol.* 83: 59-66.
- Liang, Y., J. Yesuf, S. Schmitt, K. Bender and J. Bozzola. 2009. Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. Strain JXL. *J. Ind. Microbial. Biotechnol.* 36: 961- 970.
- Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal Biochem.* 2: 127-32.

- Muthuvelayudham, R. and T. Viruthagiri. 2010. Application of central composite design based response surface methodology in parameter optimization and on cellulase production using agricultural waste, *International Journal of Chemical and Biological Engineering* 3(2): 97-104.
- Nizamudeen, S. and B. K. Bajaj. 2009. Thermo-alkalitolerant endoglucanase from *Bacillus*. *Food Technol. Biotechnol.* 47 (4) 435–440.
- Ray, A. K., A. Bairagi, K. S. Ghosh and S. K. Sen. 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica ET Piscatoria*, 37(1): 47-53.
- Robson, L. M. and G. H. Chambliss. 1984. Characterisation of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(5): 1039- 1046.
- Shankar, T. and L. Isaiarasu. 2012. Statistical optimization for cellulase production by *bacillus pumilus* EWBCM1 using response surface methodology, *Global journal of biotechnology & biochemistry* 7 (1): 01-06,
- Sharada, R., G. Venkateswarlu, S. Venkateshwar and M. Anand Rao. 2013. Production of cellulase – a review. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological science* 3(4): 1070-1090.
- Subramanian, S. and P. Prema. 2000. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 183(1): 1-7.
- Warren R. A. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev. Microbiol.* 50. 183-212.
- Wilson, D. B. and D. Irwin. 1999. Genetics and properties of cellulases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Recent Progress in Bioconversion*, 65: 1-21.
- Yang, D., H. Wang, M. Wang, Y. Li and H. Yang. 2010. Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain 115. *Mol. Biol. Rep.* 37: 1923-1929.