

Araştırma Makalesi

**YEM KATKISI SELÜLAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEN TERMOFİLİK
BACILLUS SUŞLARININ İZOLASYONU VE ENZİMLERİN KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**Harun Reşit KILIÇER¹Bahri Devrim ÖZCAN^{2*}**ÖZET**

Bu çalışmada, Düziçi sınırları içerisinde bulunan Haruniye Kaplıcası'ndan toplanan toprak numunelerinden üç adet termofilik *Bacillus* sp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriler sırasıyla *Bacillus* sp. HG1, HG2 ve HG3 olarak isimlendirilmişlerdir. Selülaaz üretimi, üreme periyodunun başlangıcından itibaren HG1 ve HG2 izolatları için 72. saatte, HG3 izolatu için ise 24. saatte maksimum düzeye çıkmıştır. HG1 ve HG2 selülaazları optimum aktivitelerini 60°C'de gösterirken, HG3 selülaazı 70°C'de göstermiştir. Bununla birlikte HG1 ve HG3 selülaazları optimum aktivitelerini pH 5.0'de gösterirken, HG2 selülaazı pH 4.0'de göstermiştir. Her üç enzim de 60°C'de 30 dakika muhafaza edildiklerinde aktivitelerinin tamamını korurken, daha yüksek sıcaklık değerlerinde 30 dk inkübasyon sonucunda aktivitelerini kaybetmeye başlamışlardır. HG1, HG2 ve HG3 enzimlerine ait spesifik aktiviteler 55°C'de sırasıyla 34.1, 67.8 ve 112.3 U/mg olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus* sp., selülaaz, izolasyon, karakterizasyon

**ISOLATION OF FEED ADDITIVE CELLULASE PRODUCING THERMOPHILIC
BACILLUS STRAINS AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE ENZYMES****ABSTRACT**

In the present study, we isolated three thermophilic *Bacillus* strains from the soil samples collected from the Haruniye Thermal Spring located in Düziçi. The isolates were entitled as *Bacillus* sp. HG1, HG2, and HG3, respectively. The maximum cellulase productions were revealed at 72nd hour of incubation period for HG1 and HG2 strain, and at 24th hour of incubation period for HG3 strain, respectively. The optimum enzyme activity was observed at 70°C for HG3 cellulase, whereas at 60°C for HG1 and HG2 cellulases. On the other hand, optimum pH value for HG2 cellulase was 4.0, whereas 5.0 for HG1 and HG3 cellulases. All enzymes protected their activities after pre-incubation at 60°C for 30 min, but they begin to decrease after pre-incubation at higher temperature values. The specific activities of HG1, HG2, and HG3 cellulases were 34.1, 67.8 and 112.3 U/mg at 55°C, respectively.

Key words: *Bacillus* sp., cellulase, isolation, characterization

GİRİŞ

Selüloz, yeryüzünde en yaygın bulunan organik molekül olup bitki ve alglerin hücre duvarlarının yapısında bulunmakla beraber, bazı hayvanlar ve bakteriler tarafından da üretilmektedir (Lynd ve ark., 2002).

Moleküller düzeyinde düz bir polimer olan selüloz, glikoz ünitelerinin β -1,4-glikozidik bağlarla bağlanması sonucu oluşmaktadır (Sukumaran ve ark., 2005). Selülaazlar ise selüloz moleküllerindeki β -1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek glikoz moleküllerini

serbest bırakan enzimlerdir (Nishida ve ark., 2007). Selülitik organizmalar, endoglukanazlar (β -1,4-D-glukan glukanohidrolaz; EC 3.2.1.4), ekzoglukanazlar (β -1,4-D-glukan sellobiyohidrolaz; EC 3.2.1.91) ve β -1,4-D-glukosidazlar (sellobiaz veya β -D-glikozid glikozil hidrolaz; EC 3.2.1.21) olmak üzere üç temel grup enzim üretirler (Ryu ve Mandels, 1980; Wood, 1985). Bu enzimlerden ilk ikisi selülozu oligosakkaritlere ve sellobiyozu parçalarken, β -glukosidaz sellobiyozu glikoza parçalar (Shimada ve ark., 1994). Genel olarak diğer

¹Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 80000-Osmaniye,

²Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 80000-Osmaniye

*Sorumlu yazar: devrimozcan@osmaniye.edu.tr

selüloolitik bakteriler gibi *Bacillus*'lar da selüloz ve diğer β -glukan substratlara karşı düşük hidrolitik aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler *Bacillus*'ların selüloolitik enzim kaynağı olarak yeniden revaçta olmalarını sağlamıştır.

Ülkemizde tahıl üretiminin yaygın olması, üretilen arpa, yulaf gibi yüksek selüloz içerikli yem hammaddelerinin, sap ve saman gibi bitkisel artıkların tarımsal üretim sonucu büyük miktarlarda ortaya çıkması, bunların ekonomik bir şekilde değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır (Özcan ve ark., 1994). Bu sebeple başta *Bacillus*'lar olmak üzere mikroorganizmalarca üretilen selüloz enzimleri, yüksek düzeyde selüloz içeren yemlere ilave edilerek sindirimlerinin artırılmasına yardımcı olabilir (Gado ve ark., 2007; Azzaz, 2009; Murad ve Azzaz, 2010). Silaja selüloz enzimlerinin ilavesi ile silajın sindirilebilirliğinde kayda değer bir artış sağlandığı da bildirilmiştir (van Vuuren ve ark., 1989; Ridla ve Uchida, 1993). Yine karışık bağı beta-glukanaz enziminin (β -(1,3-1,4)-glukanaz) kanatlı rasyonlarında kullanımı, kanatlılarda yapışkan dışkı adı verilen ve arpa gibi yüksek selüloz içeren yemlerin oluşturduğu sorunun ortadan kalkmasını sağlamaktadır.

Bacillus'lar α -amilaz, proteaz, β -glukanaz, ksilanaz, likenaz ve diğer birçok önemli endüstriyel enzimler ile insektisit ve antibiyotik gibi biyomoleküllerin üretim kaynağıdır (Priest, 1977; Horikoshi, 1996). *Bacillus* cinsine ait termofilik bakterilerin yayılımı sıklıkla tartışılmıştır. İzole edilen termofilik bakterilerden sadece birkaçının genotipik ve fenotipik çeşitliliğine göre tam olarak termofilik *Bacillus* sp. suşlarını karakterize ettiği bildirilmiştir (Mora ve ark., 1998). Termofilik bakterilerin yaşam alanları, sıcak su kaynakları ve kaplıca gibi doğal ve insan yapımı tüm karasal ve denizel sıcak çevrelerdir. Termofilik organizmalar optimum olarak 50-80°C sıcaklık aralıklarında gelişim gösterirler (Vieille ve Zeikus, 2001). Bu mikroorganizmalarca üretilen enzimler, yüksek sıcaklık koşullarında aktivite göstermelerinden dolayı endüstriyel uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedirler (Gaur ve ark., 2012). Bu çalışmada, Osmaniye ili Düziçi ilçesi sınırları içerisinde bulunan Haruniye Kaplıcası'ndan alınan toprak numunelerinden üç adet termofilik *Bacillus* sp. izole edilmiş ve bu izolatlarca üretilen karboksimetil selüloz (CMCaz; β -1,4-

glukanaz) enzimlerinin kısmi karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL ve METOT

Bakteriler ve Kültür Koşulları

Bacillus sp. HG1, HG2 ve HG3 bakterileri Türkiye'nin Osmaniye ili Düziçi ilçesi sınırları içerisinde bulunan Haruniye Kaplıcası'ndan toplanan toprak numunelerinden izole edilmişlerdir. Bakterilerin izolasyonu Lennete ve ark. (1985)'e göre yapılmıştır. Termofilik *Bacillus* sporlarının çimlenmesi LB besiyeri (%10 (w/v) tripton, %5 (w/v) maya özütü, %10 (w/v) NaCl, pH 7.5) kullanılarak 55°C sıcaklık koşullarında yapılmıştır. Katı besiyeri kullanıldığı durumlarda LB besiyerine %1.5 (w/v) agar ilave edilmiştir. Karboksimetil selüloz (CMCaz) aktiviteilerinin belirlenmesi için koloniler tek tek steril kürdanlarla alınmış ve %0.1 (w/v) CMC (karboksimetil selüloz) içeren LB-agar plaklarına aktararak 55°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Koloni gelişimi tamamlandıktan sonra, bakterilerin geliştiği plağa Congo-red solüsyonu (%0.1 (w/v) Congo-red) dökülerek besiyerinin 15 dakika süreyle boyanmaları sağlanmıştır. Süre sonunda boya plaklardan uzaklaştırılarak bu sefer besiyerinin üzerine 1M NaCl solüsyonu ilave edilmiş ve 15 dakika daha beklenerek fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Congo-red CMC'yi kırmızıya boyayacağından, kırmızıya boyanan zeminde sarımtırak zon oluşturan koloniler CMCaz pozitif koloniler olarak belirlenmiştir.

Enzim Üretimi

Termofilik *Bacillus* suşları LB besiyerinde 55°C'de 200 rpm çalkalama hızında 24 saat boyunca üretilmişlerdir. Sıvı kültür ortamı santrifüj edilerek (Hettich Universal EBA12; 5.000 rpm, 10 dk), bakterilerin pelet oluşturması sağlanmış, ekstraselüler enzimleri içeren süpernatant kısım (sıvı faz) ise enzim analizleri için kullanılmıştır (Demirkan, 2010).

Enzimatik Analizler

CMCaz analizleri, 0.5 mL hücre dışı sıvıya 0.1 M fosfat bafır (pH 6.5) ile hazırlanmış 0.5 mL CMC (%2 (w/v)) eklenmesi ile 55°C'de 30 dk inkübe edilerek yapılmıştır. Reaksiyon 2 mL 3,5-dinitrosalisilik asit eklenerek sonlandırılmış ve numuneler 5 dk süreyle kaynatıldıktan sonra spektrofotometre (Pharmacia) ile A₅₄₀ nm dalga boyunda ölçülmüştür (Miller, 1959). Bir enzim ünitesi, 1 dk boyunca 55°C'de substrattan 1 mmol

glikozu serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Enzim Aktiviteleri Üzerine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

Enzim aktiviteleri üzerine sıcaklık ve pH'nın etkisi, enzimlerin substrat ile 30-90°C arasında değişen farklı sıcaklık ve 4.0-10.0 arasında değişen farklı pH koşullarında 30 dk süreyle inkübasyona bırakılması ile ölçülmüştür. pH'nın enzim aktiviteleri üzerine etkisinin araştırılmasında 100 mM sodyum asetat (pH 4.0-6.0), 100 mM sodyum fosfat (pH 6.0-7.0) ve 100 mM tris (pH 7.0-10.0) solüsyonları kullanılmıştır (Burhan ve ark., 2003).

Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Zamana göre enzim aktivitelerinin belirlenmesinde, bakteri inokülasyonunun başlangıcından itibaren her 12 saatte bir olmak üzere 72 saat boyunca bakteri kültüründen enzim numuneleri alınmış ve yukarıda verilen protokol uyarınca DNS yöntemine göre enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

SDS-PAGE Analizleri

SDS-PAGE analizi Laemmli (1970) tarafından belirtilen protokole göre %12 (w/v)'lik jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforezden sonra, jel bir saat süreyle Coomassie blue R 250 boyası (%40 (v/v) metanol, %10 (v/v) glacial asetik asit, %50 (v/v) saf su, %0.1 (w/v) Coomassie blue R 250) ile boyanmış, sonrasında ise boya içermeyen aynı solüsyonda en az bir saat süreyle yıkanarak fazla boyanın uzaklaşması sağlanmış ve protein bantları görünür hale gelmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bacillus sp. HG1, HG2 ve HG3 izolatları gram pozitif, çubuk şeklinde, spor oluşturan ve aerobik mikroorganizmalardır. Her üç izolat da pH 7.5'de ve 55°C'de gelişim göstermişlerdir. İzolatların üreme periyodunun her 12 saatinde bir enzim numunesi alınmış, HG1 ve HG2 izolatlarının en yüksek düzeyde selülaz üretimini, üreme periyodunun 72. saatinde, HG3 izolatının ise 24. saatinde gerçekleştirdiği görülmüştür (Şekil 1A). Selülaz üretiminde ikinci yüksek oransal aktivitelerini HG1 üreme periyodunun

36., HG2 24. ve HG3 ise 60. saatinde göstermişlerdir. Her üç izolatın da zamana göre enzim üretiminde inişli-çıkışlı bir grafik eğrisi ortaya koyduğu gözlenmiştir.

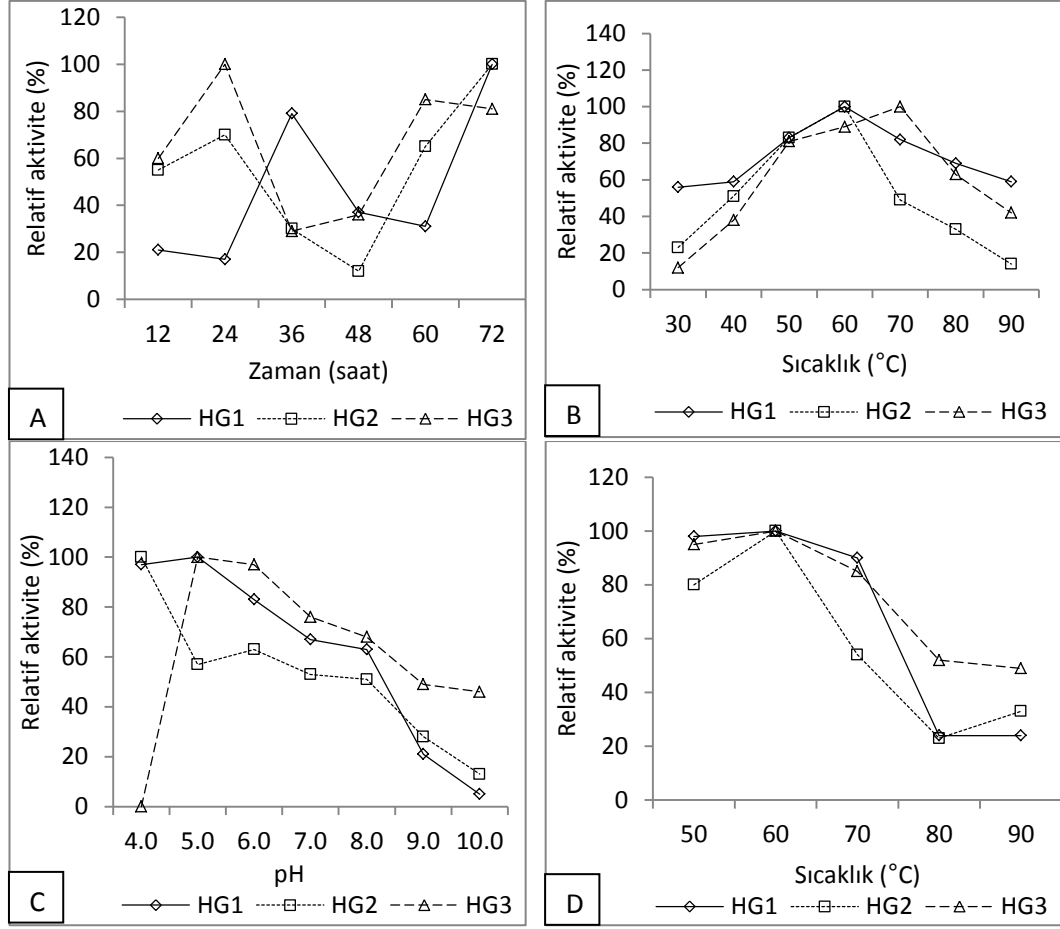
Bakteriler 30-90°C arasında değişen sıcaklık aralıklarında kültüre alınmış ve her bir sıcaklık değerinde CMCaz üretim düzeyleri belirlenmiştir. İzolatlardan *Bacillus* sp. HG1 ve HG2 en yüksek enzim üretimini 60°C'de gösterirken, CT3 70°C'de göstermiştir (Şekil 1B). 70, 80 ve 90°C'lerde ortalama enzim aktiviteleri HG1, HG2 ve HG3 izolatları için sırasıyla %70, 32 ve 68 olarak gerçekleşmiştir. 30, 40 ve 50°C'lerin ortalama aktiviteleri ise yine izolatlar için sırasıyla %66, 52 ve 44 oranlarında gerçekleşmiştir.

Bacillus sp. HG1 ve HG3 CMCazları optimum aktivitelerini pH 5.0'de gösterirken, HG2 CMCazı pH 4.0'de göstermiştir (Şekil 1C). HG1, HG2 ve HG3 CMCazlarının nötral pH'da aktiviteleri ortalama olarak sırasıyla %67, 53 ve 76 düzeyinde gerçekleşmiştir. Her üç enzimin 4.0-6.0 pH aralığında ortalama enzim aktiviteleri sırasıyla %93, 73 ve 66 oranında gerçekleşirken, 8.0-10.0 pH aralığında bu oranlar yine sırasıyla %30, 31 ve 54 olarak gerçekleşmiştir.

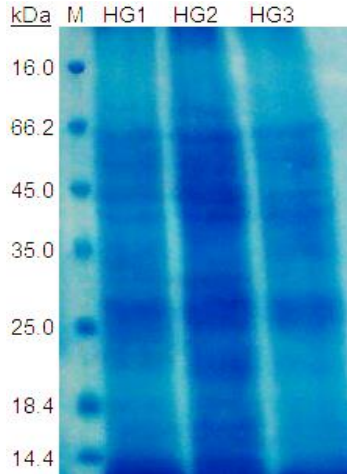
Termal kararlılıklarını ölçmek için enzimler CMC ile reaksiyona sokulmadan önce 50-90°C arasında değişen sıcaklık değerlerinde 30 dk ön inkübasyona bırakılmışlardır. Enzimlerin 60°C'de ön inkübasyonu sonucunda aktivitelerinin tamamı korunurken, bu sıcaklık değerinden sonra termal kararlılıklarını kaybetmeye başladıkları görülmüştür (Şekil 1D). 90°C'de 30 dk ön inkübasyon sonucunda HG1 CMCazı aktivitesinin %76'sını kaybederken, bu değer HG2 ve HG3 CMCazları için sırasıyla %67 ve 51 olmuştur.

Enzimlere ait spesifik aktivite değerleri HG1, HG2 ve HG3 CMCazları için sırasıyla 34.1, 67.8 ve 112.3 U/mg olarak bulunmuştur. Enzimler bu spesifik aktivite değerlerine substrat olarak CMC kullanıldığı durumda ulaşmışlardır.

Her üç bakteriye ait hücre dışı proteinler SDS-PAGE'de karşılaştırılmışlardır. Toplam protein bantları incelendiklerinde, her üç bakterinin de bant profilleri bakımından kısmi farklılıklar gösterdikleri görülmektedir (Şekil 2).



Şekil 1. *Bacillus* sp. HG1, HG2 ve HG3 izolatlarının bazı enzimatik özellikleri. A: Zamana göre enzim üretimi, B: Sıcaklık optimum değerleri, C: pH optimum değerleri, D: Termal kararlılık



Şekil 2. İzolatlara ait hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE'de karşılaştırılması.

TARTIŞMA

Selülozu hidrolize eden birçok mikroorganizma rapor edilmiştir. *Anoxybacillus flavithermus* (Ibrahim ve Ahmed, 2007), *Bacillus subtilis* (Deka ve ark.,

2011), *Bacillus thuringiensis* (Lin ve ark., 2012), *Bacillus cereus* (Lah ve ark., 2012), *Bacillus licheniformis* (Acharya ve Chaudhary, 2012), *Cellulomonas cellulans* (Mishra ve Pandey Lata, 2007), *Clostridium thermocellum* (Zhuang ve ark., 2007),

Cytophaga hutchinsonii (Mishra ve Pandey Lata, 2007) bu mikroorganizmalardan bazılarıdır. Bununla birlikte, bu mikroorganizmalar arasında sadece birkaçı sıcaklığa dirençli selüloz enzimi üretmektedir ve bu özelliklerinden dolayı endüstriyel kullanımda büyük önem taşımaktadırlar. Endüstriyel kullanımlarında sıcaklığa dirençliliğin önemli olması, termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalara sıcaklığa dirençli enzimlerin kaynağı olarak önemli bir rol yüklemiştir (Burhan ve ark., 2003).

Bu çalışmada Osmaniye ili Düziçi ilçesi sınırları içerisinde bulunan Haruniye Kaplıcası'ndan alınan örneklerden üç adet termofilik bakteri, *Bacillus* sp. HG1, HG2 ve HG3 izole edilmişlerdir. Vieille ve Zeikus (2001) termofilik organizmaların optimum olarak 50-80°C'de gelişim gösterdiklerini bildirmiştir. Bu durumda *Bacillus* sp. HG1, HG2 ve HG3 izolatları termofilik olarak tanımlanabilir. Bu izolatlardan HG1 ve HG2 en yüksek CMCaz aktivitesini 60°C'de, HG3 ise 70°C'de göstermişlerdir (Şekil 1A). Termofil ve hipertermofil mikroorganizmalarca üretilen birçok enzimin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerlerinin, bu enzimleri üreten konukçu mikroorganizmanın optimum gelişim gösterdiği sıcaklık değerleri ile benzerlik gösterdikleri bildirilmiştir (Vieille ve Zeikus, 2001). Bu çalışmada izole edilen bakterilerin optimum gelişim gösterdikleri sıcaklık değerleri ile bu bakterilerce üretilen enzimlerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri bu literatür bildirişi ile benzerlik göstermektedir.

Daha önce sıcaklığa dirençli selüloz enzimleri üreten bazı *Bacillus* türleri, *B. halodurans* (Annamalai ve ark., 2013), *B. licheniformis* (Bischoff ve ark., 2006), *B. subtilis* (Li ve ark., 2008) ve *B. amyloliquefaciens* (Lee ve ark., 2008) çalışılmış ve rapor edilmiştir. *Bacillus* kökenli sıcaklığa dirençli selülozların optimum aktivite için ihtiyaç duydukları sıcaklıkların 50-70°C arasında değiştiği bildirilmiştir (Sadhu ve Maiti, 2013). Bu çalışmada izole edilen bakterilerce üretilen selüloz enzimlerinin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerleri bu sınırlar içerisinde yer almıştır. *Bacillus* sp. HG1, HG2 ve HG3 izolatlarının optimum olarak 55°C'de gelişim göstermeleri ve bu bakterilerce üretilen enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerlerinin 60-70°C aralığında olması, bu izolatların *B. stearrowthermophilus* suşları olabileceğini akla getirmektedir. Fakat

bunu kesin olarak söyleyebilmek için, 50 farklı karbon kaynağını içeren API 50 CHB testi ile teyit edilmesi gerekmektedir (Wind ve ark., 1994).

Çalışmada izole edilen enzimlerden HG1 ve HG3 optimum aktivitesini pH 5.0'de gösterirken, HG2 4.0'de göstermiştir (Şekil 1C). Bu sonuçlara göre her üç enzim de oldukça asit dirençli görülmektedir. Bununla birlikte, her üç enzim de bu optimum pH değerlerinin yanı sıra alkali pH değerlerinde de aktivite gösterebilmektedirler. HG1 ve HG2 selülozları pH 8.0'da aktivitelerinin sırasıyla %63 ve 51'ini korurken, pH 9.0'da yine sırasıyla %79 ve 72'lik bir aktivite kaybına uğramışlardır. Buna karşılık HG3 selülozu 8.0, 9.0 ve 10.0 pH değerlerinde sırasıyla aktivitelerinin %68, 49 ve 46'sını korumuştur. Benzer pH optimumuna sahip selüloz enzimleri daha önce *Chaetomium thermophile* (Naim ve Jamil, 2007), *Bacillus* sp. AC-1 (Li ve ark., 2006), *Bacillus thuringiensis* (Lin ve ark., 2012), *Bacillus* sp. (Patel ve ark., 2005), *Bacillus subtilis* (Nakamura ve Kitamura, 1988), *Bacillus* M-9 (Bajaj ve ark., 2009) ve *Clostridium thermocellum* (Ng ve Zeikus, 1988) bakterilerinde rapor edilmiştir. Enzimlerin geniş bir pH aralığında aktivite göstermeleri endüstriyel uygulamalar için arzu edilen bir durumdur.

HG1, HG2 ve HG3 selülozları için spesifik aktivite değerleri sırasıyla 34.1, 67.8 ve 112.3 U/mg olarak hesaplanmıştır. Genellikle selülozların spesifik aktivite değerleri değişkenlik göstermektedir. Hakamada ve ark. (1997) çalışmaları *Bacillus* sp. KSM-S237 suşuna ait selüloz enziminin spesifik aktivitesini 49.4 U/mg olarak bildirirken, Irshad ve ark. (2013) *Trichoderma viride* selülozünün spesifik aktivitesini 498 U/mg olarak bildirmiştir. Bu çalışmada izole edilen selüloz enzimlerine ait spesifik aktivite değerleri normal sınırlar içerisinde görülmektedir. Mutagenesis veya klonlama yöntemleriyle bu değerler artırıldığı takdirde, enzimler endüstriyel kullanım için daha uygun hale getirilebilirler.

Sıcaklığa dirençli HG1, HG2 ve HG3 selülozlarının hücre dışı toplam proteinleri SDS-PAGE'de karşılaştırılmış ve benzer bant profilleri yanı sıra, farklı bant profilleri de sergiledikleri gözlenmiştir. Bu bulgu, her üç izolatın da birbirinden farklı olduklarını ortaya koymaktadır.

SONUÇ

Bu çalışmada sıcaklığa dirençli selüloz enzimleri üreten üç adet *Bacillus* sp. izole edilerek enzimlerin kısmi karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Her üç enzim de geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktivite göstermişlerdir. Enzimlerin sıcaklığa dirençli olmaları yanı sıra asidik karakter göstermeleri endüstriyel kullanım açısından önem taşıyabilir. Bu enzimlerin üretimlerinin moleküler genetik yöntemleriyle artırılarak optimize edilmeleri sonucunda ticari kullanım olanakları araştırılabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından OKÜBAP-2013-PT3-0012 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Acharya, S., Chaudhary, A. 2012. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4): 497-503.
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Elayaraja, S., Balasubramanian, T. 2013. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate Polymers*, 94: 409-415.
- Azzaz, H.H. 2009. Effect of cellulytic enzymes addition to diets on the productive performance of lactating goats. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt.
- Bajaj, B.K., Pangotra, H., Wani, A.M., Sharma, P., Sharma, A. 2009. Partial purification and characterization of a highly thermo-stable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9. *Indian Journal of Chemical Technology*, 16: 382-387.
- Bischoff, K.M., Rooney, A.P., Li, X., Liu, S., Hughes, S.R. 2006. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 28: 1761-1765.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38: 1397-1403.
- Deka, D., Bhargavi, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M., Goyal, A. 2011. Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. *Enzyme Research*, Volume 2011: Article ID: 151656, DOI: 10.4061/2011/151656.
- Demirkan, E. 2010. Production, purification, and characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives. *Turkish Journal of Biology*, 35: 705-712.
- Gado, H.M., Metwally, H.M., Soliman, H., Basiony, A.Z.L., El-Galil, E.R. 2007. Enzymatic treatments of bagasse by different sources of cellulase enzymes. In: The 11th World Conference on Animal Nutrition, 10: 607-613.
- Gaur, D., Jain, P.K., Bajpai, V. 2012. Production of extracellular α -amylase by thermophilic *Bacillus* sp. isolated from arid and semi-arid region of Rajasthan, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(5): 675-684.
- Hakamada, Y., Koike, K., Yoshimatsu, T., Mori, H., Kobayashi, T., Ito, S. 1997. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. *Extremophiles*, 1: 151-156.
- Horikoshi, K. 1996. Alkaliphiles – from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 1407-1414.
- Ibrahim, A.S.S., Ahmed, I.E.D. 2007. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4): 473-478.
- Irshad, M., Anwar, Z., But, H.I., Afroz, A., Ikram, N. 2013. The industrial applicability of purified cellulose complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-industrial and municipal paper wastes. *BioResources*, 8(1): 145-157.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- Lah, N.T., Rahman, N.B., Nama, M.B. 2012. Cellulase activity and glucose production by *Bacillus cereus* monoculture and co-culture utilizing palm kernel cake (PKC) under solid state fermentation. International Conference on Environment, Energy and Biotechnology IPCBEE, Singapore, 33: 172-177.
- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, K.I., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C., Lee, J.W. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, 99: 378-386.
- Lenette, E.H., Ballows, A., Hausler, J.W.J.R., Shadomy, J.H. 1985. *Manuel of Clinical Microbiology*, Vol: 4, USA, pp. 1149.
- Li, W., Zhang, W.W., Yang, M.M., Chen, Y.L. 2008. Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 40: 195-201.
- Li, Y.H., Ding, M., Wang, J., Xu, G.J., Zhao, F. 2006. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp. AC-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70: 430-436.
- Lin, L., Kan, X., Yan, H., Wang, D. 2012. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, ISSN: 0717-3458, DOI: 10.2225/vol15-issue3-fulltext-1.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 506-577.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Mishra, B.K., Pandey Lata, A.K. 2007. Lignocellulolytic enzyme production from submerged fermentation of paddy straw. *Indian Journal of Microbiology*, 47(2): 176-179.
- Mora, D., Fortina, M.G., Nicastro, G., Parini, C., Manachini, P.L. 1998. Genotypic characterization of thermophilic bacilli: A study on new soil isolates and several reference strains. *Research in Microbiology*, 149: 711-722.
- Murad, H.A., Azzaz, H.H. 2010. Cellulase and dairy animal feeding. *Biotechnology*, 9: 238-256.
- Naim, S., Jamil, A. 2007. Production of endoglucanase from a thermophilic fungus. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 44(1): 59-63.
- Nakamura, K., Kitamura, K. 1988. Cellulases of *Cellulomonas uda*. *Methods in Enzymology*, 160: 211-216.
- Ng, T.K., Zeikus, J.G. 1988. Endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Methods in Enzymology*, 160: 351-355.
- Nishida, Y., Suzuki, K.I., Kumagai, Y., Tanaka, H., Inoue, A., Ojima, T. 2007. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie*, 89(8):1002-1011.
- Özcan, N., Demir, E., Pekel, E. 1994. Yüksek selülozlu yem hammaddelerinin hayvan beslemede kullanımında biyoteknolojik uygulamalar. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(2): 113-126.
- Patel, M.A., Ou, M.S., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T. 2005. Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by a thermo-tolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Progress*, 21: 1453-1460.
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriology Reviews*, 41: 711-753.
- Ridla, M., Uchida, S. 1993. The effect of cellulase addition on nutritional and fermentation quality of barley straw silage. *Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences*, 6(3): 383-388.
- Ryu, D.D., Mandels, M. 1980. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2(2): 91-102.
- Sadhu, S., Maiti, T.K. 2013. Cellulase production by bacteria: A review. *British Microbiology Research Journal*, 3(3): 235-258.
- Shimada, K., Karita, S., Sakka, K., Ohimiya, K. 1994. Cellulases, xylanases, and their genes from bacteria. In: *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*.

- Murooka, Y., Imanaka, T. (Eds.), pp. 395-429.
- Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., Pandey, A. 2005. Microbial cellulases-Production, application and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64: 832-844.
- Van Vuuren, A.M., Bergsma, K., Frol-Kramer, F., van Beers, J.A.C. 1989. Effect of addition of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the in sacco degradation of grass silage. *Grass and Forage Science*, 44: 223-230.
- Vieille, C., Zeikus, G.J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65: 1-43.
- Wind, R.D., Buitelaar, R.M., Eggink, G., Huizing, H.J., Dijkhuizen, L. 1994. Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: A highly thermostable α -amylase producing strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41: 155-162.
- Wood, T.M. 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochemical Society Transactions*, 13: 407-410.
- Zhuang, J., Marchant, M.A., Nokes, S.E., Strobel, H.J. 2007. Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. *Applied Engineering in Agriculture*, 23(5): 679-687.