مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
بهار 1391، دوره چهارم، شماره دوازدهم، صفحه 6-1

جداسازی و شناسایی ملکولی سویه های باسیلوس تولید کننده سلولاز از خاک جنگل

سحر پاست[1]، علی ناظمی [2]، محمد رضا خاتمی نژاد [2]، میر ساعد میری نرگسی [2]، ساناز موسوی[1]، آرزو صالحی [1]

1. گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد واحد تنکابن
2. گروه بیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

نویسنده مسؤول: دکتر علی ناظمی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن. alinazemy@yahoo.com

دریافت: 91/1/15 پذیرش: 91/3/26

چکیده

زمینه و هدف: سلولز پلی ساکاریدی است که به عنوان بهترین ذخیره کربوهیدرات برای تولید انرژی بیولوژیک به شمار می رود. سلولازهای باکتریایی و قارچی نقش مهمی در هیدرولیز سلولز بازی می نمایند. اندوگلوکونازها پیوندهای بتا گلیکوزیدی **(1-4)** را در سلولز هیدرولیز می نمایند. هدف از این مطالعه جدا سازی و شناسایی سویه های جدید از جنس باسیلوس با قابلیت تولید آنزیم سلولاز از خاک بوده است.

روش بررسی: در این تحقیق از خاک **35** ناحیه جنگلی مختلف از غرب مازندران نمونه گیری انجام گردید و تعداد **40** باکتری از خاک این مناطق جدا گردید و از این تعداد **24** باکتری با قابلیت تولید سلولاز در محیط کربوکسی متیل سلولز **(CMC agar)** و با استفاده از آزمایش **Grams iodine** جداسازی شدند. بهینه سازی دمایی و زمانی روی سویه های مثبت انجام گرفت. سپس گونه های باکتریایی از طریق **16S rDNA sequencing**شناسایی گردیدند. وزن مولکولی تقریبی آنزیم بوسیله رسوب دهی پروتئین و **SDS-PAGE** تعیین گردید.

یافته ها: در مجموع این باکتریها به **5** سویه از **5** گونه ***Bacillus Cereus*** ، ***Bacillus Subtilis***، ***Bacillus Thuringiensis***، ***Bacillus megaterium*** و ***Bacillus mycoides*** تعلق داشتند. تمامی این **5** گونه شناسایی شده بیشترین مقدار آنزیم را در دمای **37** درجه سانتی گراد و در مدت **96** ساعت تولید می کردند. بیشترین تولید آنزیم متعلق به سویه ***Bacillus Subtilis*** جدا شده با **3,8 u/ml**بوده و همچنین وزن ملکولی این سویه تقریبا **60** کیلو دالتون تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: مطالعات انجام شده پتانسیل بالای سویه های باسیلوس نواحی جنگلی شمال کشور در تولید آنزیم سلولاز را نشان می دهد بطوریکه می توان از این باکتریها مستقیما در تولید شربت گلوکز از فیبرهای گیاهی کم ارزش و استفاده در سایر صنایع بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: شناسایی ملکولی ، باسیلوس ، سلولازها

www.SID.ir

مقدمه

باسیلوس ها باکتری های هوازی و بی هوازی های اختیاری هستند که قادرند آنزیمهایشان را به محیط ترشح کنند. آنها آنزیم های هیدرولیتیک خارج سلولی را تولید می نمایند که در اکثر فرایند های صنعتی بکار گرفته می شود. سلولز پلیمری است خطی از واحد های گلوکز که با پیوند های گلیکوزیدی بتا 1-4 به هم متصل شده اند و یکی از فراوان ترین کربوهیدرات های موجود در طبیعت می باشد. سلولاز ها، آنزیمهایی هستند که قادرند پیوند های گلیکوزیدی را بشکنند و می توان آنها را بر اساس مدل عملکردی شان به دو دسته اندوگلوکاناز و اگزوکلوکاناز تقسیم بندی نمود. مهمترین سلولاز ها , بتا 1و4 اندوگلوکاناز می باشند که CMCase نیز نامیده می شوند. هیدرولیز سلولز به دو روش شیمیایی و آنزیمی صورت می گیرد. هیدرولیز شیمیایی توسط اسید ها و هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم های سلولازی می باشد که توسط میکروارگانیسم های مختلف تولید می گردد. با توجه به مشکلات هیدرولیز اسیدی سلولز، محققان توجه بیشتری به هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم های سلولازی نموده اند. این آنزیم ها پیوند های بتا 4-1 گلیکوزیدی را به طور اتفاقی از وسط ملکول های سلولز قطع کرده و تولید قطعات کوتاه الیگوساکاریدی می نماید و با توجه به گستردگی منبع سلولزی، سلولازها از اهمیت ویژه ای در صنایع مختلف برخوردار هستند(۲،۳). هیدرولیز آنزیمی سلولز نسبت به هیدرولیز شیمیایی آسانتر و ارزانتر بوده و محققان در حال حاضر توجه بیشتری به هیدرولیز آنزیمی برای هضم سلولز دارند(3 ،4).

محصول هیدرولیز آنزیمی سلولز معمولا قندهای احیایی به شکل گلوکز می باشند. در هیدرولیز آنزیمی سلولز آلودگی محیط زیست و همینطور عمل خورندگی که در روش های شیمیایی بدلیل استفاده از Ph پایین مشاهده می شود، وجود ندارد(۲،۳). سلولهای باکتریایی و قارچی می توانند برای هیدرولیز مواد لیگنوسلولزی آنزیم های سلولاز تولید کنند. این میکروارگانیسم ها می توانند از نوع هوازی یا بی هوازی، مزوفیل یا ترموفیل باشند(۱،۵،۶،۷). هدف از انجام این مطالعه جداسازی Bacillus تولید کننده سلولاز با قدرت تولید آنزیم بالا (تولید صنعتی) از خاک غرب استان مازندران و شناسایی آنها می باشد.

روش بررسی

جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم ها: 50 گرم خاک از 35 ناحیه جنگلی مختلف از غرب مازندران گرد آوری گردید و پس از تهیه رقت و تیمار حرارتی (در 95 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه)، رقت های10^{-5}, 10^{-6}و 10^{-7}در محیط CMC agar (Hi Media, India) به صورت سفره ای کشت داده شد و پلیت ها در درجه حرارت 37 درجه سانتی گراد به مدت 96 ساعت گرماگذاری شدند.

شناسایی میکروسکوپی : پس از گذشت 4 روز از کلنی هایی رشد یافته بر محیط CMC agar لام تهیه و رنگ آمیزی گرم انجام شد سپس باسیل های گرم مثبت اسپور دار(میله ای شکل و به رنگ بنفش) جدا گردید.

جداسازی باسیلوس های تولید کننده سلولاز: به منظور شناسایی ایزوله های باسیلوس های تولید کننده سلولاز از طریق مشاهده منطقه هیدرولیز شده (هاله)، سطح پلیت ها با معرف Grams iodine (2.0 gr KI,1.0gr Iodine, 300ml distilled water) شستشو شدند. بدین صورت که معرف Grams iodine با سلولز باقیمانده در محیط (نه با سلولز هیدرولیز شده) کمپلکس سیاه رنگی را تشکیل می دهد و نواحی که سلولز توسط آنزیم سلولاز هیدرولیز شده به رنگ معرف (زرد) باقی می ماند و ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی می نماید(8).

شناسایی مولکولی گونه های مختلف باسیلوس ها: DNA تمامی باکتریهای تولید کننده آنزیم سلولاز با استفاده از کیت سینا ژن (Cat.No.DN8115C) طبق دستور العمل شرکت سازنده استخراج گردید. سپس از طریق High Resolution Melting-Real Time PCR با استفاده از پرایمر های همگانی ژن 16 S rDNA، محصول تکثیری ژن 16 S rDNA طبق روش فرقانی و همکاران(8) شناسایی شد و برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. و نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه Blast در سایت NCBI ردیف سازی گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

بهینه سازی تولید آنزیم سلولاز با بررسی عوامل فوق صورت گرفت.

اثر دما: به منظور بررسی اثر دما بر تولید آنزیم سلولاز، باکتری های ایزوله شده در محیط CMC agar در دماهای ۲۵،۳۰،۳۵،۴۰ درجه سانتی گراد به مدت 120 ساعت انکوبه شدند و قطر هاله هر یک اندازه گیری شد(10).

اثر مدت زمان انکوباسیون: به منظور بررسی اثر مدت زمان کشت بر روی تولید آنزیم سلولاز باکتری های ایزوله شده با بیشترین قطر هاله، در دمای 37 درجه سانتی گراد، در زمان های ۲۴،۴۸،۷۲،۹۶،۱۲۰ انکوبه شدند و قطر هاله ایجاد شده اندازه گیری شد(۷،۱۰،۱۱).

بررسی فعالیت آنزیم سلولاز(تهیه منحنی استاندارد): ابتدا طبق روش برنفیلد، منحنی استاندارد گلوکز تهیه شد. جهت بدست آوردن منحنی استاندارد آزمایش DNS (دی نیترو سالیسیلیک اسید) برای غلظتهای مختلفی از گلوکز انجام شد. بدین منظور ابتدا غلظت های مختلف (2/5 ،2 ،1/5، 1، 0/5) میلی لیتر از گلوکز50 % را در لوله های آزمایش استریل ریخته و با استفاده از آب مقطر حجم تمامی لوله ها یکسان می شد. سپس به تمامی لوله ها 2 میلی لیتر سیترات فسفات بافر 0/1 مولار با ph = 4,8 اضافه شد. در مرحله بعد 3 میلی لیتر معرف DNS به آنها اضافه گردید و لوله ها به مدت 15 دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند. سپس یک میلی لیتر سدیم پتاسیم تارتارات 40% به هر محلول اضافه شد و در دمای اتاق سرد گردید. سپس جذب نمونه ها در طول موج 540 نانومتر اندازه گیری شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون، از طریق تقسیم میزان جذب بر ضریب زاویه خط منحنی ، غلظت قندهای احیاء شده محاسبه گردید. هر واحد از آنزیم سلولاز مقدار آنزیمی است که می تواند در مدت زمان یک دقیقه یک میکرومول قند احیاء ازسوبسترا گلوکز آزاد نماید.

سنجش فعالیت آنزیم: ابتدا کشت تازه ای از تمامی جدایه ها درمحیط *Bacillus media* مایع تهیه شد. سپس 100 میکرولیتر از سوسپانسیون تازه به 3 میلی لیتر محیط CMC broth تلقیح گردید و در دمای 37 درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکر دار به مدت 5 تا 7 روز قرار داده شد. سوسپانسیون های میکروبی در 14000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ گردید و سوپرناتانت حاوی آنزیم جدا گردید.سپس به یک میلی لیتر سوپرناتانت یک میلی لیتر سیترات فسفات بافر 0/1 مولار ph= 4,8 و یک میلی لیتر (Carboxymethyl cellulose) (CMC Merck) یک درصد اضافه گردید و در دمای 50 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه گرمگذاری شد. در مرحله بعد 3 میلی لیتر معرف DNS به آنها اضافه گردید و لوله ها به مدت 15 دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. سپس یک میلی لیتر سدیم پتاسیم تارتارات 40% به انها اضافه گردید وپس از سرد شدن در دمای اتاق، جذب نوری نمونه ها در طول موج 540 قرائت گردید. شیب خط منحنی استاندارد گلوکز به طریق زیر محاسبه گردید(15).

SLOP = delta ODs / delta Cs

ODs: میزان جذب محلول استاندارد
Cs: غلظت استاندارد

خالص سازی نسبی پروتئینها: جدایه ای که بیشترین فعالیت آنزیمی را داشت ابتدا در محیط CMC مایع به مدت 96 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد کشت شد. برای تهیه نمونه کنترل منفی همچنین باکتری مورد نظر در محیط M9 (Na_2HPO_4 .$7H_2O$,KH_2PO_4 ,NaCl ,NH_4Cl $MgSO_4$,$CaCl_2$,Glucose) نیز کشت داده شده و تمامی مراحل بطور مشابه روی سوپرناتانت آن نیز اجراء گردید. در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی سانتریفوژ گردید و به 3 میلی لیتر سوپرناتانت جدا شده ، 2/5 میلی لیتر استون به آرامی اضافه شد و پس از سانتریفوژ در 14000 rpm، رسوب در 100 میکرولیتر فسفات بافر حل گردید.

الکتروفورز پروتئینها با روش SDS- PAGE : رنگ آمیزی محلول آنزیمی با استفاده از کیت رنگ آمیزی فرمنتاز Cat.No.R0891 طبق پروتکل کیت انجام گرفت و همچنین به منظور اندازه گیری قطعات پروتئین بر روی ژل، از مارکر وزن مولکولی پروتئین شرکت فرمنتاز Cat.No.SM0431 طبق پروتکل کیت استفاده گردید. سپس به منظور دناتوره کردن پروتئین، نمونه ها به مدت 5 دقیقه در حمام آب جوش (100 درجه سانتی گراد) قرار داده شد. سپس 20 میکرولیتر از محلول آنزیمی و 15 میکرولیتر مارکر وزن مولکولی پروتئین روی ژل پلی اکریل آمید 15% بار گذاری گردید و عمل

Archive of SID
www.SID.ir

الکتروفورز با آمپراژ ثابت 15 میلی‌آمپر و ولتاژ اولیه 80 ولت صورت گرفت(جدول 1).

جدول 1. مواد مورد نیاز برای تهیه ژل SDS 15%

نمد	آمونیوم پر سولفات 10%	تریس 1,5 مولار با ph.8	اکریل آمید 30%	آب دیونیزه
6	0,15	3,8	7,5	3,4
4	/.4	0,5	0,67	2,7

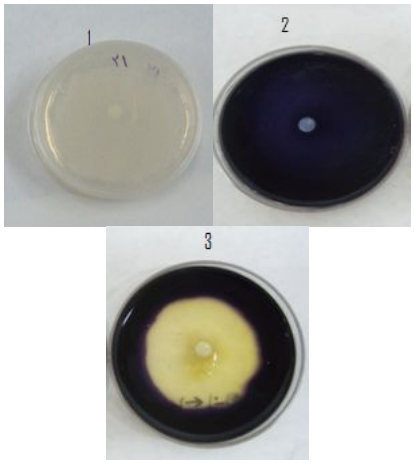
Resolving15%
Stacking8%

پس از اتمام الکتروفورز و تثبیت پروتئین ژل به آرامی در یک ظرف درب دار قرار داده شد و به مدت 60 دقیقه (یا یک شب) در رنگ کماسی برلیانت بلو250 R با تکان آرام قرار داده شد. سپس ژل در یک ظرف حاوی اسید استیک 10 درصد و متانل 50 درصد به مدت 45 دقیقه با تکان آرام به منظور رنگ بری قرار داده شد این عمل تا واضح شدن باند ها چندین بار تکرار گردید.

یافته ها

جداسازی و غربالگری: از 35 ناحیه جنگلی مختلف غرب مازندران 40 جدایه باسیل اسپور دار گرم مثبت غربال گردید.

هیدرولیز سلولز: از میان 40 جدایه باسیل گرم مثبت ، پس اضافه کردن معرف Grams iodine ، تعداد 24 باکتری هاله هیدرولیز کننده سلولز را نشان دادند که محدوده قطر هاله ها ما بین 1 تا 4 سانتی متر بودند (شکل 1).



شکل 1. قبل از اضافه کردن معرف، 2. بعد از اضافه کردن معرف و عدم هیدرولیز سلولز، 3 . بعد از اضافه کردن معرف

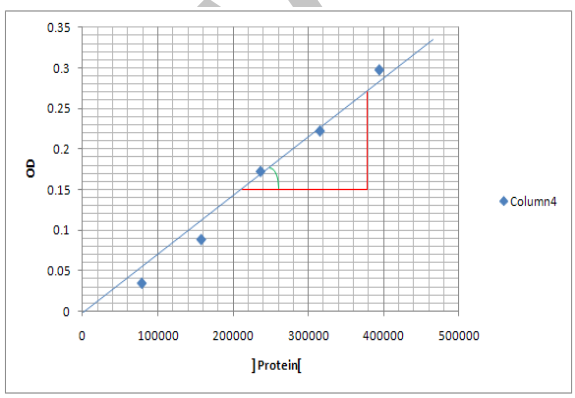
نتیجه شناسایی مولکولی: نتایج High Resolution Melting-Real Time PCR نشان دادند که 24 ایزوله در 5 گونه مختلف قرار گرفتند. نتیجه تعیین توالی و ردیف سازی حداقل 2 ایزوله انتخاب شده بطور تصادفی از هر گروه فوق را تایید نمود(جدول 2).

جدول2. نتایج ردیف سازی توالی یک بخش 380 جفت بازی از ژن S rDNA 16در 24 جدایه تولید کننده سلولاز

نام گونه شناسایی شده	درصد همولوژی
Bacillus subtilis	%100
Bacillus cereus	%100
Bacillus thuringiensis	%99
Bacillus megaterium	%99
Bacillus mycoides	%97

نتایج بهینه سازی حرارتی: نتایج بهینه سازی حرارتی و مدت زمان انکوباسیون روی هر 5 گونه نشان داد که باکتری های ایزوله شده دارای بیشترین قطر هاله در دمای 37 درجه سانتی گراد و در مدت زمان 96 ساعت بودند و با افزایش دما باکتری قادر به رشد بود ولی قطر هاله افزایش نمی یافت.

نمودار محلول استاندارد گلوکز در آزمایشDNS : جذب نوری غلظتهای مختلف گلوکز به دست آمده برای منحنی استاندارد گلوکز در نمودار زیر نمایش داده شده است(نمودار1).



نمودار1. شیب خط منحنی استاندارد گلوکز

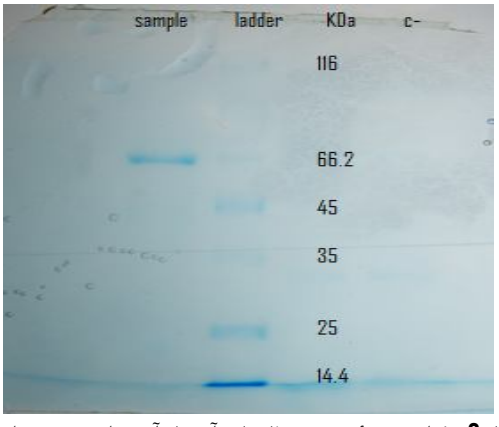
www.SID.ir
Archive of SID

نتایج فعالیت آنزیمی نمونه ها: در جدول زیر نتایج فعالیت آنزیمی 5 گونه *Bacillus* مورد بررسی در جدول 3 ارائه شده است.

جدول3. فعالیت آنزیمی 5 گونه *باسیلوس*

Code	Name	U/ml
Cu_1	*Bacillus cereus*	2,85 u/ml
Cu_2	*Bacillus subtilis*	3,77 u/ml
Cu_3	*Bacillus megaterium*	2,36 u/ml
Cu_4	*Bacillus thurngiensis*	1,88 u/ml
Cu_5	*Bacillus mycoides*	2,98 u/ml

وزن مولکولی سلولاز *Bacillus subtilis*: پس از تغلیظ پروتئین های سوپرناتانت حاصل از کشت جدایه (*Bacillus subtilis*) در محیط CMC مایع و M9 مایع و الکتروفورز روی ژل پلی اکریل آمید تنها یک نوار پروتئین در سوپرناتانت محیط CMC مایع مشاهده گردیدکه در سوپرناتانت محیط M9 مایع حضور نداشت. این مشاهده نشان می دهد که این نوار احتمالا مربوط به پروتئین سلولاز می باشد. با مقایسه این نوار با مارکر اندازه پروتئین، وزن تقریبی پروتئین در محدوده 60 تا 65 کیلودالتون تعیین گردید. در شکل 8 نوار های پروتئین نمایش داده شده است.



شکل 2. نوار پروتئین روی ژل پلی آکریل آمید، از چپ به راست ، نشانگر اندازه CMنمونه تغلیظ شده سوپرناتانت محیط M9پروتئین و نمونه تغلیظ شده سوپرناتانت محیط

بحث

بطور کلی آنزیم های سلولاز به دو صورت اندو و اگزو پلی مر سلولز را برش می زنند. تمامی سلولازها پیوند های گلیکوزیدی بتا 1-4 را برش می زنند. اندوگلوکونازها بر روی نواحی بی شکل پلیمر سلولزی فعالیت نموده و در نتیجه می توان آنها را از طریق سوبستراهای سلولزی محلول همچون کربوکسی متیل سلولز سنجش نمود(13). در مطالعه ای که توسط Krootdilaganandh و همکاران در سال 2002 بر روی 125 باکتری که از خاک ها و کودهای آلی نواحی شمال تایلند جدا شدند انجام گرفته بود نشان داده شد که از این 125 باکتری که در محیط کربوکسی متیل سلولاز کشت داده شده بودند حدود 62 باکتری تولید سلولاز کردند و نتیجه مثبت نشان دادند در این تحقیق بر روی 40 باکتری که از خاک نواحی مازندران جدا شد کار شد که از این تعداد 24 باکتری درمحیط کربوکسی متیل سلولاز آنزیم سلولاز را تولید کردند (14). Mawadza در مطالعه ای که در سال 2000 انجام داد گزارش کرد که 43% از باکتری هایی که جدا شده اند متعلق به جنس باسیلوس ها هستند و*Bacillus PFH N7* دارای بیشترین فعالیت آنزیم با قطر هاله ی 33 میلی متر می باشد این در حالی است که در تحقیق ما 80% نمونه ها متعلق به جنس باسیلوس ها بود و*Bacillus Subtilis* بیشترین فعالیت آنزیم با قطر 45 میلی متر را دارد (7). در ایران نیز در این زمینه توسط نفیسه سادات نقوی درسال 78 تحقیقاتی انجام شده است. دراین تحقیق ، تولید آنزیم‌های سلولاز (اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز) در برخی میکروارگانیسم ها شامل قارچ صنعتی *فانئورک کریزسپوریوم*، قارچ ناقص *آسپرژیلوس ترئوس*، مخمر و *میکروکوکوس* تجزیه کننده سلولز مقایسه شده است. این مطالعات نشان داد که قارچ‌های مورد بررسی، نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها تولید آنزیم بالاتری را نشان می‌دهند و قارچ *اسپرژیلوس ترئوس* که از محیط طبیعی (چوب پوسیده) جداسازی شده است نیز نسبت به سوش صنعتی *فانئورکت کریزسپوریوم* قادر است آنزیم‌های سلولاز را به میزان بیشتری تولید نماید. با توجه به عاری بودن از ناخالصی های پروتئینی در سوپرناتانت سویه *باسیلوس سوبتلیس* جدا شده و ترشحی بودن آنزیم، خالص سازی آنزیم نیازمند بکارگیری از روشهای پر هزینه کروماتوگرافی نبوده و رسوب دهی از طریق دناتوراسیون نسبی آنزیم با استون و سپس بازسازی ساختار پروتئینی روش کارآمد و کم هزینه ای می باشد. مطالعه ما

Archive of SID
www.SID.ir

نشان داد که همچنان طبیعت بهترین مکان برای جداسازی سویه های اقتصادی میکروبی بخصوص گونه های باسیلوس می باشد.

نتیجه گیری

در این تحقیق توانسته شد پنج سویه از پنج گونه مختلف باسیلوس از خاکهای جنگلی شمال کشور با قابلیت تولید اندوگلوکوناز بطور ترشحی شناسایی شود. روش غربالگری بکار گرفته شده در این تحقیق بخوبی توانست سویه های تولید کننده اندوگلوکوناز را مشخص نماید. همچنین در این روش بواسطه قطر هاله تولید شده، قابلیت نسبی تولید آنزیم توسط هر گونه نیز قابل اندازه گیری می باشد. همچنین اندازه گیری فعالیت آنزیم به روش اسپکتروفوتومتری نشان داد که سویه *Bacillus subtilis* جدا شده بالاترین فعالیت آنزیمی در دمای 37 درجه سانتی گراد و به مدت تقریبی 96 ساعت برابر با 3,8 u/ml از سوپرناتانت بود. هر چند روش اسپکتروفوتومتری DNS روش دقیقی برای تعیین فعالیت اگزوگلوکونازها می باشد میتوان ادعا نمود که فعالیت آنزیم بیشتر از آن چیزی است که گزارش شده است. بهرحال برای تولید 1000 یونیت از این نوع آنزیم تنها به 265 میلی لیتر محیط با منبع کربن سلولزی نیاز می باشد. پس از سویه *باسیلوس سوبتلیس*، سویه *باسیلوس* میکویدس با 3 u/ml بالاترین فعالیت آنزیمی را نشان داد.

References

1. Beguin P. *Molecular Biology of Cellulose Degradation.* Journal Annual Review of Microbiology. 1990; 44: 219-248.
2. Bhat MK. *Cellulase and related enzymes in biotechnology*. Biotechnology Advances.2000; 18: 355- 383.
3. Bayer EA, Lamed R, Himmel ME. *The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management.* Journal of Environmental biotechnology. 2007; 18:237–245.
4. Schulein M. *Protein engineering of cellulose*. Biochemica et Biophysica Acta .2000;239-252.
5. Criquet S. *Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter*. Journal of Microbiological Methods.2002; 50:165-173.
6. Sun Y, Cheng J. *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production*. Journal of Bioresource Technology.2001; 38:1-11.
7. Mawadza C, Hatti-Kaul R, Zvauya R, Mattiasson B. *Purification and characterization of cellulases produced by two Bacillus strains*. Journal of Biochemistry.2000; 83: 177-187.
8. Wood TM, Bhat M. *Methods for measuring cellulase activities.* Methods Enzymology.1998; 160: 87-112.
9. Forghani F, Nazemi A, Sharifi SH, Eskandari M. *Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Milks of Central Alborz Heights, by High Resolution Melting Real Time PCR & 16SrDNA PCR Sequencing.* Zist Fanavari Microbie. 2010; 2(5):21-28.
10. Samuel S, Muthukkaruppan SM, Gayathri Shanbhag N, Senthil Kumar PK. *Cellulase production by bacillus spp and Aspergillus niger using coir waste and saw dust and partial purification.* International Journal of Current Research.2010; x: 31-34.
11. Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. *Microbial cellulose utilization Fundamentals and biotechnology*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2002; 66: 506-577.
12. Bernfield P. In *Amylases α and β. Methods in Enzymology*.1959; pp:149-151.
13. Maki M, Leung KT, Qin W. *The prospects of cellulose-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass.* International Journal of Biological Sciences.2009; 5(5):500-516.
14. Krootdilaganandh J. *Isolation and selection of thermotolerant bacteria capable of producing Cellulase.Chiang Mai*: Chiang Mai University. 2000; 20-27.
15. F H White. *Spectrophotometric determination of malt colour*. Journal of the Insti-tute of Brewers. 1995;101:431–433.

Archive of SID

www.SID.ir