------مجلة علوم الرافدين، المجلد 24، العدد 4، ص35-46، 2013------

عزل وتشخيص بعض أنواع جنس *Clostridium* من الخشب المتحال ودراسة قابليتها على إنتاج الكحول الاثيلي من أنواع مختلفة من الخشب

أسامة محمد سعيد النعيمي

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

Email: ausama1962@yahoo.com

(تاريخ الاستلام 16/ 10 / 2012 ؛ تاريخ القبول 18 / 2 / 2013**)**

الملخص

تم في هذه الدراسة عزل وتشخيص نوعين من البكتريا المحللة للسليلوز ولأشباه السليلوز وهي *Clostridium cellulovorans* و*Clostridium cellulolyticum* من عينات الخشب المتحال الذي تم الحصول عليه من مناطق مختلفة من مدينة الموصل.

أظهرت الدراسة أن لبكتريا *C. cellulovorans* القدرة على تخمير خشب الزان وإنتاج الكحول خلال 24 ساعة من بدء التحضين في حين جاء بالمرتبة الثانية كل من خشب الصندل، البندق واليوكالبتوس خلال 48 ساعة وجاء بالمرتبة الأخيرة خشب الصنوبر، البلوط، الجوز والتنوب خلال 96 ساعة.

كما بينت الدراسة ان بكتريا *C. cellulolyticum* أنتجت الكحول من خشب الزان، الصندل، البندق و التنوب خلال 24 ساعة من التحضين وجاء بالمرتبة الثانية الاخشاب الصنوبر، البلوط، الجوز واليوكالبتوس بعد 48 ساعة من التحضين.

الكلمات الدالة: *Clostridium*، وأشباه السليلوز، خشب الزان، الكحول، التنوب.

Isolation and Identification of some *Clostridium* spp. from Decaying Wood and Study of their Ability to Produce Ethanol from Different Kinds of Wood

Ausama M. Al-Naemee
Department of Biology
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

In this study we isolated and identified two species of bacteria degrading cellulose and semicellulose; *C. cellulovorans* and *C. cellulolyticum* of decaying wood samples, which were obtained from different parts of Mosul city.

The study showed that *C. cellulovorans* had the ability to ferment Lithocarpus sp.and produce ethanol within 24 hours from the start of incubation, and came in second place each of Santalum sp., Betula sp. and Eucalyptus sp. within 48 hours and finally came Pinus sp., Quercus sp., Populus sp. and Spruce sp. within 96 hours.

The study also demonstrated that the bacteria *C. cellulolyticum* produced ethanol from Lithocarpus sp., Santalum sp., Betula sp. and Spruce sp. within 24 hours of incubation and came in second place Pinus sp., Quercus sp., Populus sp. and Eucalyptus sp. after 48 hours of incubation.

المقدمة

تعد بكتريا *Clostridium cellulovorans* من الأنواع اللاهوائية النمو والسالبة لصبغة كرام وهي عصوية الشكل غير متحركة والمكونة للابواغ، وتكون الأبواغ مركزية أو تحت نهائية الموقع ولها قدرة على تحليل السليلوز في الأوساط الزرعية الحاويه عليه خلال (48) ساعة عبر إنتاجها لأنزيم cellulase الخارج خلوي وهذا الانزيم يتكون من بروتينات مختلفة تسمى cellulosome (Shoseyovo and Doi, 1990; Cavedonk and Canale,1990 ; Shoseyovo *et al*., 1990; Wood and Scorr,1988; Sleat *et al*.,1984).

كما تمتاز هذه البكتريا بقدرتها على تحليل البكتين pectin وأشباه السليلوزات وتخمير الزايلان xylan، سلوبايوز cellobios كلوكوز glucose، مالتوز maltose، كالاكتوز galactose، سكروز sucrose، لاكتوز lactose و مانوز mannose وتنتج غازي H_2 و CO_2 مع اللاكتيت lactate، الفورميت formate، البيوتريت butyrate والخليك acetate (Doi and Kosugi, 2004; Sung *et al*., 2004; Doi *et al*.,1998).

وقد توجهت أنظار الباحثين لاستخدامها ضمن طرائق التقنية الاحيائية لتحويل المكونات النباتية السليلوزية إلى مواد عضوية مذيبه ووقود وهذه العمليات معقدة لأنها تضم تفاعل مجموعات انزيمية مع المواد الأساس السليلوزية لتحليلها (Fierobe *et al*., 2002; Koichiro *et al*., 2002 ; Boisset *et al*., 1998).

وهناك أنواع بكتيرية عديدة لها القدرة على تحليل السليلوز من بينها بكتريا *Clostridium cellulolyticum* وهي من المحبة للحرارة المعتدلة والموجبة لصبغة كرام العصوية والمنحنية قليلا والمتحركة بسوط قطبي مع امتلاكها أهداب محيطيه تساعدها في حركتها، عزلت من الحشائش المتحللة والأخشاب السليلوزية ولها قدرة على تخمير السليلوز في الأوساط الزرعية الحاوية عليه بعملية تسمى acetic –lactic fermentation وباستخدام معقد من انزيمات خارجية cellulosome، وتنتج كل من اللاكتيت، الخليك، فورميت، الايثانول، الهيدروجين وثاني اوكسيد الكاربون، كما تحطم أشباه السليلوزات من الخشب وتخمرها نواشباه السليلوزات تضم كل من الزايلوز، الارابينوز، الفركتوز، الكالاكتوز، المانوز والرايبوز (Giallo *et al*.,1983; Gowen *et al*., 2010; Wendy *et al*., 2011)، ولهذه البكتريا القدرة على تحليل المخلفات النباتية وبذلك فهي تعد من المنظفات البيئية ذات القدرة على انتاج الوقود الحيوي الايثانول الذي زاد الاهتمام في تخليقه بالطرق الاحيائية مع ايجاد البكتريا الملائمة في إنتاجه (Desvaux *et al*., 2001)

استخدمت أخشاب النباتات كمادة أساسية لتنمو عليها أنواع من الكائنات المجهرية كالبكتريا والفطريات والخمائر وتحللها باستخدام انزيماتها الخارجية، والخشب مادة عضوية مسامية لها القدرة على امتصاص الرطوبة ويتكون خشب النباتات بشكل اساسي من سليلوز وأشباه السليلوزات ولكنين و بنسب مكونات مختلفة، وكما موضح بالجدول (1)

الجدول 1: مكونات الخشب لانواع مختلفة من النباتات

نوع الخشب	السليلوز %	اشباه السليلوز %	اللكنين %
1- صنوبر Pinus sp.	31.4	48.9	19.7
2- زان Lithocarpus sp.	33.1	52	14.9
3- بلوط Quercus sp.	33.3	47.5	19.2
4- صندل Santalum sp.	34.3	50.3	15.4
5- جوز Populus sp.	34	49.3	16.7
6- بندق Betula sp.	33.3	51.8	14.9
7- يوكالبتوس Eucalyptus sp.	34.3	50.3	15.4
8- تنوب Spruce sp.	40.7	31.6	27.7

(Diaz-vaz *et al*., 2009 ; Klemn *et al*., 2005 ; Roger, 1984 ; Vian *et al*., 1983)

تهدف الدراسة الحالية إلى إمكانية عزل سلالات بكتيرية محليه محلله للسليلوز وأشباه السليلوز من أنواع مختلفة من الأخشاب المتحلله ودراسة قدرتها على تخمير السليلوزات واشباه السليلوزات في أنواع منتخبة من الأخشاب وإمكانيتها في إنتاج بعض الكحول الاثيلي.

المواد وطرائق العمل

1-جمع العينات:

جمعت عينات من قطع الأخشاب المتحللة من منطقة غابات مدينة الموصل قرب نهر دجلة ومن مواقع مختلفة، الصورة (1)، وزن مقدار (1) غرام من أجزاء قطع الخشب المتحللة ووضعت في أنابيب زجاجية وتحوي المرق المغذي (5 سم^3) والمعقمة بالموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة.

الصورة 1: عينات من الخشب المتحال

2- تشخيص البكتريا:

أخذ حملات لوب من أنابيب المرق المغذي المزروعة من عينات قطع الأخشاب المتحللة المذكورة في الفقرة (1) وزرعت عميقا في الأوساط الزرعية الصلبة التالية:

أ- وسط (أ) *Clostridium cellulovorans* medium ويتكون من المواد التالية:

K_2HPO_4 x 3 H_2O	1.00 g
NH_4Cl	1.00 g
KCl	0.50 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0.50 g
Cysteine-HCl x H_2O	0.15 g
Trypticase peptone	0.50 g
Yeast extract	0.50 g
Cellobiose	5.00 g
Na_2CO_3	1.00 g
Na_2S x 9 H_2O	0.15 g
Trace element solution*	1.00 ml

ثم أكمل الحجم إلى 1000 سم^3 ماء مقطر، وضبطت قيمة الـ pH عند 7.0، ثم وزع الوسط الزرعي على قنانٍ زجاجية بغطاء معدني مقفل بواقع 100 سم^3 وعقم الوسط بالموصدة على درجة 121 °م وضغط 15باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة.

حضر محاول المعادن الضئيلة *Trace element solution كما موضح أدناه

HCl (25%; 7.7 M)	10.00 ml
$FeCl_2 \times 4\ H_2O$	1.50 g
$ZnCl_2$	70.00 mg
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	100.00 mg
H_3BO_3	6.00 mg
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	190.00 mg
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	2.00 mg
$NiCl_2 \times 6\ H_2O$	24.00 mg
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	36.00 mg
Distilled water	990.00 ml

ب- وسط (ب) *Clostridium cellulolyticum* medium ويتكون من المواد التالية:

$(NH_4)2SO_4$	1.300 g
KH_2PO_4	1.500 g
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	2.900 g
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	0.200 g
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0.075 g
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	1.250 mg
Yeast extract	2.000 g
Cellobiose	6.000 g
Cysteine-HCl x H_2O	0.500 g
Trace element solution	1.00 ml

ثم أكمل الحجم إلى 1000 سم^3 ماء مقطر، وضبطت قيمة الـ pH عند 7.0، ثم وزع الوسط الزرعي على قناني زجاجية بغطاء معدني مقفل في قناني بواقع 100 سم^3 وعقم الوسط بالموصدة على درجة 121 °م وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة.

حضر محاول المعادن الضئيلة Trace element solution كما موضح في الفقرة السابقة (أ). (Hungate,1969)

ج- الأوساط الزرعية المستخدمة في الاختبارات الكيمياحيوية لتشخيص بكتريا *Clostridium cellulovorans* و بكتريا *Clostridium cellulolyticum* :

– وسط إختبار انزيم الليبيز Lipase test medium

حضر 50 سم^3 من وسط الاكار المغذي وأضيف إليه 1 سم^3 من زيت الذرة، ضبطت قيمة pH على 7.4، ثم عقم الوسط بالموصدة على درجة 121 °م وضغط 15باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة (Prescott *et al*.,1996).

– وسط اختبار تميع الجيلاتين Gelatin liquefaction test medium

حضر وسط Nutrient gelatin المجهز من قبل شركة Difco ووزع على قناني زجاجية بواقع 15 سم^3 وعقم بالموصدة على درجة 121 °م وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة.

– وسط اختبار التخمر العاصف Stormy fermentation test medium

حضر وسط الحليب Milk Medium والمجهز من قبل شركة Difco ووزع بواقع 15 سم^3 على أنابيب اختبار ثم عقم بالموصدة على درجة 121 °م وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة.

– وسط تخمر الكاربوهيدرات Carbohydrate fermentation medium

حضر 950 سم^3 من وسط الكشف عن تخمر الكاربوهيدرات والمكون من وسط ماء الببتون المكون من ما يلي :

ببتون Peptone	10 غم
كلوريد الصوديوم	5 غم

أكمل الحجم إلى لتر ماء مقطر ومعقم وضبطت قيمة الـ pH على 7.5 وعقم الوسط بالموصدة على درجة 121 °م لمدة 15 دقيقة، وأضيف إليه 50 سم^3 من دليل الفينول الأحمر Phenol Red تركيز 0.02% والدليل حضر كما يلي :

هيدروكسيد الصوديوم عيارية 0.01	2 سم^3
صبغة الفينول الاحمر	0.2 غم

أكمل الحجم إلى 250 سم^3 ماء مقطر، فحصلنا على تركيز الدليل 0.04%، ثم اضيف حجم مساوٍ من الماء المقطر فحصلنا على تركيز الدليل 0.02%، أضيف السكر المطلوب تحت الاختبار ثم ضبطت قيمة pH الوسط على 7.2، ووزع الوسط على قناني زجاجية بواقع 15 مل مع وضع أنابيب درهام بصورة مقلوبة لجمع الغاز، وعقمت بالموصدة لمدة 5 دقائق وضغط 15 باوند/انج^2 (Cruickshank *et al*., 1975; Sleat *et al*., 1984).

3- تحضير مستخلصات الأخشاب النباتية:

اختيرت (8) أنواع من الخشب الرطب (الصنوبر، الزان، البلوط، الصندل، الجوز، البندق، اليوكالبتوس، التنوب) وتم الحصول عليها من الأسواق المحلية، وأستخلص المحتوى المركز منها وكما يلي:

وزن مقدار (10) غم من كل من النباتات السابقة وأضيف اليها 100 سم^3 ماء مقطر ومعقم ثم سحقت بجهاز Homogenizer نوع Philips ورشح المحلول واخذ الراشح ووضع في حاوية زجاجية معقمة.

جمعت الحاويات المعقمة والمحتوية على مستخلصات النباتات السابقة الذكر ووضعت بالتجميد (4 - °م) ثم جففت المستخلصات بجهاز التجفيد بالتجميد Lyophilizer نوع Emert وبهذا تم الحصول على مسحوق ناعم من النباتات المذكورة سابقاً (السلطان، 1993).

4 - أختبار نمو البكتريا المحللة للأخشاب:

أستبدل الـ Cellobiose في وسطي (أ و ب) المذكورين في الفقرة (2- أ ، ب) بأحد الأنواع الثمانيـة من الخشب المذكور في الفقرة (3) وذلك لتحديد المصدر الكاربوهيدراتي التي ستستخدمه البكتريا كمـصدر للطاقة (Adsul *et al.*, 2007).

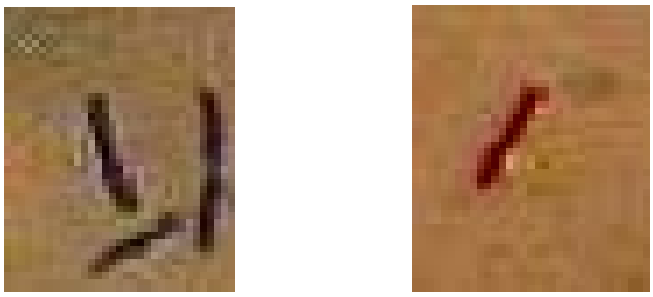
5- الكشف عن إنتاج المذيبات العضوية:

لقحت قنانى الوسط الزرعي (أ و ب) بالبكتريا المشخصة بالطرق الكيمياحيوية المذكورة في الفقرة (2، ج) وحضنت على درجة حرارة 35 م° وتحت الظروف اللاهوائية لمدة 48-72 ساعة، ثم أضيف 5 سم^3 من محلول دايكرومات البوتاسيوم مع 1سم^3 من حامض الكبريتيك المركز، بعد ذلك سخن المزيج وعد تكون اللون الأخضر دليلا على وجود الكحول في الوسط (Cruickshank *et al.*, 1975).

النتائج و المنافشة

يوضح الجدول (2) الاختبارات الكيمياحيوية لبكتريا *C. cellulovorans* مقارنة مع بكتريا *C. cellulolyticum* حيث اختلفتا في بعض الصفات التشخيصية مثل تفاعلها مع صبغة كرام الصورة (2).

كما اختلفتا في قدرتيهما على تخمير السكريات (الزايلوز و سليبايوز) وتعد هذه الـصفات مهمـة فـي تشخيص بكتريا *C. cellulovorans* عن بكتريا *C. cellulolyticum*، كما يعـد التخمـر العاصـف صـفه تشخيصية يمتاز به جنس الكلوستريديوم عن باقي الأجناس البكتيرية الأخرى، فضلا عن ذلـك تعـد بـاقي الاختبارات الكيمياحيوية التشخيصية مهمة في تحديد مواصفات كل مـن بكتريـا *C. cellulovorans* و *C. cellulolyticum*.



B **A**

الصورة 2: بكتريا *C. cellulovorans* (A) والبكتريا *C. cellulolyticum* (B)
تحت قوة تكبير مجهرية 1000 X، وقياس تكبير بالبكسل 384×512

ويبين الجدول (3) نتائج تكون الكحول في الوسط الزرعي بواسطة الفعالية التخميرية لبكتريا *C. cellulovorans* لمكونات أنواع منتخبة من الخشب المضافة للوسط، ونلاحظ من الجدول ان الوسط المضاف اليه خشب الزان كان الأفضل في إنتاج الكحول حيث أنتج بعد 24 ساعة من بدء التحضين وجاء بالمرتبة الثانية الوسط المضاف اليه خشب الصندل، البندق واليوكالبتوس في حين أثبتت التجربة أن الأوساط المضاف اليها خشب الصنوبر، البلوط، الجوز والتنوب هي من الأوساط غير الملائمة في إنتاج الكحول لطول مدة التخمير التي وصلت 96 ساعة من بدء التجربة، وقد تكون الفعاليه الانزيمية التي تمتلكها بكتريا *C. cellulovorans* هي السبب في تحليل السليلوز وأشباه السليلوزات ضمن فترات زمنية مختلفة من التحضين إضافة إلى تباين في نسب محتويات الأخشاب من المادة الكاربوهايدراتية، وهذا يطابق ما أشار اليه الباحثون (Murashim *et al*., 2003 ; Matano *et al*., 1994).

ويوضح الجدول (4) قدرة بكتريا *C. cellulolyticum* على انتاج الكحول من الانواع المختلفة من الاوساط الحاوية على اخشاب مختلفة، حيث نلاحظ من الجدول ان الوسط الحاوي خشب الزان، الصندل، البندق و التنوب هم الافضل في قدرة البكتريا على انتاج الكحول خلال 24 ساعة، في حين تم انتاجه خلال 48 ساعة من الصنوبر، البلوط، الجوز واليوكالبتوس وقد يعود السبب الى قدرة هذه البكتريا على تحليل السليلوز عبر انتاجها مركبات انزيمية معقدة من cellulosome، وجميع الاخشاب المنتخبة غنية بالسليلوز فضلا عن التباين في نسب اشباه السليلوزات وكما ذكر في الجدول (1) وهذا ما أشار اليه الباحثين في دراساتهم (Mohand-Oussaid *et al*., 1999 ; Mitikka *et al*.,1995)

الجدول 2: الاختبارات البايوكيميائية لبكتريا *C. cellulovorans* و*C. cellulolyticum*

الاختبارات البايوكيميائية	*C. cellulovorans*	*C. cellulolyticum*
زايلوز	+	-
كلوكوز	+	+
ارابينوز	+	+
رامينوز	+	+
فركتوز	+	+
كالاكتوز	+	+
مالتوز	+	+
رايبوز	-	-
ماليبايوز	-	-
مليزايتوز	-	-
سليبايوز	-	+
لاكتوز	+	+
كليسرول	-	-
نشا	+	+
تميع الجيلاتين	+	+
تخمر عاصف	+	+
صبغة كرام	-	+
انتاج الغاز	+	+

الجدول 3: انتاج الكحول لبكتريا *C. cellulovorans*

أنواع الأخشاب	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد 72 ساعة	بعد 96 ساعة
1- صنوبر	-	-	-	+
2- زان	+	++	+++	++++
3- بلوط	-	-	-	+
4- صندل	-	+	++	+++
5- جوز	-	-	-	+
6- بندق	-	+	++	+++
7- يوكالبتوس	-	+	++	+++
8- تنوب	-	-	-	+

(+) بدء التخمر الكحولي ، (++، +++،++++) استمرار التخمر الكحولي

الجدول 4: انتاج الكحول لبكتريا *C. cellulolyticum*

أنواع الأخشاب	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد 72 ساعة	بعد 96 ساعة
1- صنوبر	-	+	++	+++
2- زان	+	++	+++	++++
3- بلوط	-	+	++	+++
4- صندل	+	++	+++	++++
5- جوز	-	+	++	+++
6- بندق	+	++	+++	++++
7- يوكالبتوس	-	+	++	+++
8- تنوب	+	++	+++	++++

المصادر العربية

السلطان، صبا عبد السلام حامد (1993). التأثير المثبط لبعض المستخلصات النباتية على بكتريا حمى مالطة. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Adsul, M.; Jayant, K.; Kulbhushan, B.; Digambar, G. (2007). Production of Lactic Acid from Cellobiose and Cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* Mutant Uc-3. *Appl. Environ. Microbiol*. **73** (15), 5055-5057.

Boisset, C.; Armand, S.; Drouillard, S.; Chanzy, H.; Driguez, H.; Henrissat, B. (1998). "Structure-Function Relationships in Cellulases: the Enzymatic Degradation of Insoluble Cellulose." Section of Biochemistry, Molecular and Cell Biology, Cornell University, Ithaca, pp. 124–132.

Cavedonk, L.B.; Canale, A. (1990). Cellulase system of a free-living mesophilic Clostridium (Strain C7). *J. Bacter*., **172**, 4222-4230.

Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P.; Swan, R.H.A. (1975). "Medical Microbiology". 12th ed., Longman Group Ltd., New York.

Desvaux, M.; Guedon, E.; Petitdemange, H. (2001). Carbon flux distribution and kinetics of cellulose fermentation insteady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium. *J. Bacteriol*., **183**,119-130.

Diaz-vaz, J.E.; Ananías, R.A.; Rodríguez, S.; Torres, M.; Fernández, A.; Poblete, H. (2009). Compression wood in *Pinus radiata* II: density and chemical composition. *J. Maderas. Ciencia y tecnología*, **11**(2), 139-151.

Doi, R.H.; Kosugi, A. (2004). Cellulosome: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *J. Nat. Rev. Microbiol*. **2**, 541–551.

Doi, R.H.; Park, J.S.; Liu, C.C.; Malburg, L.M.; Tamaru, Y.; Ichi-ishi, A.; Ibrahim, A. (1998). Cellulosome and noncellulosomal cellulase of *Clostridium cellulovorans*. Extremophiles. *J. Nat. Rev. Microbiol*. **2**, 53–60.

Fierobe, H.P.; Bayer, E.A.; Tardif, C.; Czjzek, M.; Mechaly, A.; Belaich, A.; Lamed, R.; Shoham, Y.; Belaich, J.P. (2002). Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. *J. Biol. Chem.* **277**, 49621–49630.

Hungate, R.E. (1969). "A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes": In J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology. Vol. 3B. Academic Press, Inc., New York. pp. 117-132.

Giallo, J.; C. Gaudin, J.P.; Belaich, E.P.; Caillet-Mangin, F. (1983). Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic Clostridium sp. strain H10. *Appl. Environ. Microbiol*. **45**, 843-849

Gowen, C.M.; Fong, S.S. (2010). Exploring biodiversity for cellulosic biofuel production. *Chem. Biodivers*, **7**,1086–1097.

Klemn, D.; Heublein, B.; Fink, H.P.; Bohn, A.(2005). Cellulose fascinating biopolymer and sustainable raw material. *J. Angew. Chem. Int.* **44**, 3358-3393.

Koichiro, M.; Akihiko, K.; Roy, H.D. (2002). Determination of subunit composition of *Clostridium cellulovorans* cellulosomes that degrade plant cell walls. *Appl. Environ. Microbiol*. **68**, 41610-1615.

Matano, Y.; Park, J.S.; Goldstein, M.A.; Doi, R.H. (1994). Cellulose promotes extracellular assembly of *Clostridium cellulovorans* cellulosomes. *J. Bacteriol.* **176**, 6952–6956.

Mohand-Oussaid, O.; Payot, S.; Guedon, E.; Gelhaye, E.; Youyou, A. (1999). The extracellular xylan degradative system in *Clostridium cellulolyticum* cultivated on xylan: evidence for cell-free cellulosome production. *J. Bacteriol*. **181**,4035–4040.

Mitikka, M.; Teeaar, R.; Tenkanene, M.; Laine, J.; Vuorinene, T. (1995). "Sorption of Xylans on Cellulose Fibers, in 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry". Helsinki, Finland. pp. 231-236.

Murashim, K.; Kosugi, A.; Doi, R.H. (2003). Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. *J. Bacteriol*., **185**, 1518-1524.

Prescott, L.M. ; Harley, T.P.; Klein, D.A. (1996). "Microbiology". 3rd ed., WMC. Brown communication, Inc., Lowa, USA., pp. 449-177.

Roger, C.P. (1984)." The Chemical Composition of Wood". U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, American Chemical Society, pp.54-126

Shoseyovo, S.; Doi, R.H. (1990). Essential 170-kDa subunit fordegradation of crystalline cellulose by *Clostridium cellulovorans* cellulase. *J. Nat. Acad. Scie*. **87**, 2192-2195.

Shoseyovo, S.; Hamamotto, S.; Foong, F.; Doi, R.H. (1990). Cloning of *Clostridium cellulovorans* endo- 1,4-beta-gIucanase genes. *J. Biochem. Biophy*., **169**, 667472.

Sleat, R.; Mah, R.A.; Robinsom, R. (1984). Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **48**,88-93.

Sung, O.k.; Han, H.Y.; Cho, H.; Yukawa, M.I.; Roy, H.D. (2004). Regulation of expression of cellulosomes and noncellulosomal (Hemi) Cellulolytic Enzymes in *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources. *J. Bacteriol.* **186** (13) 4218-4227.

Vian, B.; Brillouet, J.; Satiat-Jeunemaitre, B. (1983). Ultrastructural visualization of xylans in cell walls of hardwood by means of xylanase-gold complex. *J. Biol. Cell*. **49**,179–182.

Wendy, H.; Yongchao, L.; Yunfeng, Y.; James, C.L. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**(8), 2727–2733

Wood, W.A.; Scorr, T.K. (1988). Methods for measuring cellulose activities. *J. Enzy*., **160**, 87-112.