زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 7، شماره 1، بهار و تابستان 1395

مقایسه تولید اتانل از ملاس بوسیله زایموموناس موبیلیس و ساکارومایسس سرویزیه

مریم حسنی[1]، مجید مقبلی[2*]

1- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

2- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

* **دامغان، صندوق پستی** 3679639998

Moghbeli552@gmail.com

(دریافت مقاله: 92/11/2 پذیرش مقاله: 93/11/5)

چکیده- میزان تولید ضایعات و پسماند محصولات کشاورزی در ایران بسیار بالا است که با توجه به ترکیب آن‌ها، به منابع مناسبی برای تولید اتانول تبدیل شده‌اند. ملاس یکی از فراوانترین و ارزانترین منابع کربن در دسترس و قابل استفاده برای تولید اتانول می‌باشد که با این کاربرد علاوه بر جلوگیری از ورود آن به طبیعت، محصولی به دست می‌آید که یک سوخت پاک و سازگار با طبیعت است. هدف اصلی این تحقیق مقایسه تولید اتانل از ملاس بوسیله *زایموموناس موبیلیس* و *ساکارومایسس سرویزیه* می‌باشد. در این تحقیق، باکتری *زایموموناس موبیلیس* از کشت عصاره تخمیر شده انگور بر روی محیط RM حاوی 1% نیستاتین در شرایط هوازی و دمای 30°C جداسازی و با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی، تست‌های بیوشیمیایی و رشد در حضور 7% اتانول و نهایتاً ریبوتایپینگ شناسایی شد. برای بررسی میزان اتانول تولیدی از محیط ملاس10% استفاده گردید.

نتایج: میزان اتانول تولیدی در زمان‌های 24، 48، 96، 120 و 144 ساعت در محیط ملاس10%، برای *Zymomonas mobili subsp. mobilis* IRMH52 ، *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* ATCC 10988 و *ساکارومایسیس سرویزیه* به ترتیب برابر 1/45، 3/4 و 5/05 درصد بود. در این تحقیق سویه جدیدی از *زایموموناس موبیلیس* جدا گردید و مقایسه تولید اتانل با شرایط یکسان نشان داد که این سویه نسبت به *ساکارومایسس سرویزیه* اتانل کمتری تولید می‌کند.

کلیدواژگان: اتانول، *زایموموناس موبیلیس*، *ساکارومایسیس سرویزیه*، ملاس نیشکر.

1- مقدمه

با توجه به کاهش منابع سوخت فسیلی، نیاز به منابع انرژی که تجدیدپذیر، مؤثر، دارای قیمت مناسب و فاقد آلودگی باشند، احساس می‌شود [1]. اتانول مهمترین سوخت زیستی است که در برخی از کشورها آن را به عنوان سوخت سبز می‌شناسند. این الکل به دلیل عدد

اکتان بالا می‌تواند به تنهایی به عنوان سوخت و یا به‌جای MTBE در بنزین و همچنین به عنوان حامل اکسیژن در گازوئیل به کار رود و محتوای اکسیژن آن را افزایش دهد که سبب اکسیداسیون بهتر هیدروکربن‌ها و کاهش مقدار آلودگی گازهای رها شده به اتمسفر می‌شود [3،2]. اتانول می‌تواند از ملاس نیشکر و چغندر قند و هیدرولیز اسیدی نشاسته برخی از حبوبات از قبیل ذرت به دست آید [4]. ملاس یکی از فراوانترین پسماندها در صنایع تولید قند می‌باشد و در حال حاضر یکی از ارزان‌ترین منابع قند است [5]. در چند دهه گذشته، تولید اتانول با استفاده از فرایند میکروبی مورد توجه قرار گرفته است. میکروارگانیزم‌های مختلف شامل: مخمرهای شناخته شده از قبیل *ساکارومایسیس سرویزیه* ، *گونه‌های کلستریدیوم* و *زایموموناس موبیلیس*، کاندیدای مناسبی برای تولید اتانول هستند [6].

از بین میکروارگانیسم‌های موجود، باکتری‌ها به علت توانایی در دستکاری ژنی آن و تغییر در نوع سوبسترای مورد استفاده و افزایش میزان اتانل، مورد توجه بیشتری قرار می‌گیرند. *زایموموناس موبیلیس* یکی از باکتری‌هایی است که به علت توانایی تولید اتانول بیشتر نسبت به باکتری‌های تولید کننده اتانول دیگر، بیشترین کاربرد را در صنعت دارد. *زایموموناس موبیلیس* یک باکتری گرم منفی بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل با طول 2 تا 6µm و عرض 1 تا 4µm فاقد اسپور و متحرک بوده و نمی‌تواند در محیط‌های نوترینت آگار و نوترینت براث رشد کند. این باکتری از مسیر اینتر-دودروف، در شرایط بی‌هوازی اتانول تولید می‌کند. مکانیزم تولید اتانول توسط این باکتری، به این صورت است که ابتدا گلوکز وارد چرخه گلیلولیز[1] می‌شود و یک سری واکنش‌ها روی آن انجام می‌گیرد که در نهایت هر مولکول گلوکز به دو مولکول پیروات تبدیل می‌شود. در ادامه پیروات نیز طی دو مرحله، ابتدا به استالدهید تبدیل شده و استالدهید نیز توسط آنزیم الکل دهیدروژناز به اتانول تبدیل می‌شود [7].

چون این میکروارگانیزم پروکاریوت می‌باشد، قابلیت دستکاری ژنتیکی در ان نسبت به *ساکارومایسس* بالاتر است و تحقیقات زیادی در خصوص دستکاری ژنتیکی بر روی این باکتری و بررسی تولید اتانل در شرایط مختلف جهت تولید اقتصادی اتانل انجام شده است، لذا هدف از این مطالعه جداسازی *زایموموناس* از منابع طبیعی و مقایسه تولید اتانل از ملاس توسط این سویه با سویه *زایموموناس* تهیه شده از کلکسیون میکروبی ایران و *ساکارومایسس سرویزیه* می‌باشد [7].

2- مواد و روش‌ها

2-1- میکروارگانیزم‌های مورد استفاده

در این تحقیق از سویه *Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988* تهیه شده از کلکسیون میکروبی ایران ، *ساکارومایسس سرویزیه* که بصورت پودر مخمر نانوایی در دسترس می‌باشد و سویه جدید *زایموموناس موبیلیس* که در این تحقیق جدا گردید، استفاده شد

2-2- جداسازی *زایموموناس موبیلیس*

2-2-1- روش نمونه‌گیری

در این تحقیق، سیب قرمز، سیب زرد، هلو، توت فرنگی، هلو انجیری، گیلاس، انگور دورنگ، پرتغال، خرمای زرد و مشکی، گلابی از بازارچه دامغان- انگور لعل، انگورگلابی، آلبالو، گلابی، زردآلو، آلوچه، عسل از منطقه باباحافظ دامغان- شیره خرما و شیره انگور از خوزستان و بازار دامغان- عسل درختی از اردبیل- توت سفید و توت قرمز از روستای تویه‌دروار دامغان، تهیه شد. آب این میوه‌ها به صورت شسته و نشسته، با تفاله و بدون تفاله، درون فالکون‌های 15 سی‌سی استریل شده انتقال یافت.

1. Glycolysis pathway

برای تهیه غلظت‌های 15%، 40% و 70% خرما به ترتیب 2/5 ، 6 و 10/5 گرم از خرما با 15 سی‌سی آب مقطر مخلوط شد. همچنین برای جداسازی میکروارگانیسم‌های موجود در شیره خرما، انگور و عسل همانند روش قبل، غلظت‌های 15%، 40% و 70%، تهیه شد.

2-2-2- روش کشت و شناسایی باکتری

برای انجام این آزمایش، از دو روش برای کشت انجام شد: روش اول: به تمام فالکون‌های تهیه شده، 1% نیستاتین اضافه و به مدت یک هفته به صورت روزانه، با استفاده از سوآب استریل، بر روی محیط RM آگار [8] (گلوکز 20 g/l، عصاره مخمر 10 g/l، KH_2PO4 2 g/l، آگار 15 g/l) حاوی 1% نیستاتین کشت داده و در شرایط هوازی درون انکوباتور با دمای 30°C قرار داده شد.

روش دوم: فالکون‌های حاوی نمونه را سانتریفوژ کرده و رسوب حاصل در محیط RM براث حاوی 1% نیستاتین تلقیح شده و در شرایط هوازی و دمای 37°C قرار داده شدند. بعد از مشاهده کدورت، 100 میکرولیتر از هر نمونه به محیط RM آگار حاوی 1% نیستاتین انتقال و در دمای 37°C انکوبه شدند. بعد از 48 ساعت بر اساس مشخصات ظاهری کلنی‌ها و رنگ‌آمیزی گرم، نمونه‌های احتمالی جدا و سپس آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، تولید اندول، اوره‌آز، TSI، سیمون سیترات، تولید H_2S، رشد در دمای 30 و 37 درجه سانتی‌گراد، رشد در محیط نوترینت آگار و رشد در حضور 7 درصد اتانول برای شناسایی باکتری استفاده شد [9].

3-2-2- شناسایی مولکولی باکتری جدا شده

برای جداسازی DNA ژنومی از باکتری، یک کلنی ازکشت تازه‌ی باکتری به 5ml محیط RM Broth تلقیح و در انکوباتور شیکردار در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت گذاشته شد و سپس استخراج DNA از باکتری تهیه شده همانند روش استاندارد [8] انجام شد. DNA جدا شده بر روی ژل آگارز 1% به مدت 45 دقیقه الکتروفورز گردید. بر روی DNA ژنومی جدا شده با استفاده از پرایمرهای:

F 5'- CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

و:

R 5'- CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

طبق روش استاندارد PCR گذاشته شد [9]. محصول PCR توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) تعیین توالی گردید. نتیجه در سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) بلاست و سپس در بانک ژن:

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF758455)

ثبت گردید.

3-2- آماده‌سازی محیط کشت

ملاس از کارخانه قند شاهرود تهیه و با آب مقطر تا 10% میزان قند رقیق شده و با استفاده از هیدروکلریک اسید، pH تا 6 تنظیم و به مدت 15 دقیقه در دمای 121°C استریل شد.

4-2- تولید اتانل بوسیله *ساکارومایسس سرویزیه*

ابتدا 0/5 گرم پودر مخمر در 10 سی‌سی آب مقطر سوسپانسیون شده و به مدت یک ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از اینکه مخمر فعال شد، داخل لوله آزمایش، 1 سی‌سی از مخمر به 9 سی‌سی محیط کشت مایع RM تلقیح گردید. لوله را به مدت 48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و 120 دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. بعد از اینکه مایه تلقیح آماده شد، محتوای درون لوله به مدت 5 دقیقه در دور 13000rpm سانتریفوژ شد [10]. رسوب حاصل را وزن کرده و به 4 میلی‌لیتر ملاس 10% تلقیح شد. درب لوله و ارلن‌هایی که برای تخمیر استفاده شدند، کاملاً به کمک چوب پنبه و فویل آلومینیومی بسته شد تا شرایط بی‌هوازی بطور کامل

ایجاد شود سپس به مدت 144 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد در شرایط کاملاً بی‌هوازی انکوبه شدند.

2-5- تولید اتانل بوسیله *زایموموناس موبیلیس*

ابتدا یک لوپ پر از باکتری *زایموموناس موبیلیس* جدا شده و *زایموموناس موبیلیس* ATTC 10988 بصورت جداگانه به 9 ml محیط کشت مایع RM به همراه 1% نیستاتین تلقیح گردید. نمونه‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و 120 دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند. نمونه‌ها سانتریفوژ شده و رسوب حاصل پس از وزن کردن به 4 میلی‌لیتر ملاس 10% تلقیح و در شرایطی مانند *ساکارومایسس سرویزیه* قرار داده شدند.

2-6- بررسی میزان اتانول تولیدی

برای تعیین درصد اتانول تولیدی در نمونه‌ها از روش دی‌کرومات‌سدیم استفاده شد [11]. به این صورت که 1 ml از نمونه‌های تخمیر در زمان‌های 24، 48، 72، 96، 120 و 144 ساعت جدا شده و بعد از جدا کردن سلول‌ها از محیط ، 65µl از مایع رویی با 650µl معرف اسیدی دی‌کرومات‌سدیم (0/1 مولار دی‌کرومات‌سدیم در 5 مولار اسید سولفوریک غلیظ) مخلوط و بعد از30 دقیقه نگه داشتن در دمای محیط، به آن 250µl آب مقطر اضافه شد و جذب در طول موج 595 nm خوانده شد. در نهایت مقدار اتانول تولیدی با استفاده از معادله استاندارد تهیه شده محاسبه گردید.

2-7- ترسیم منحنی استاندارد

ابتدا محلول‌های 1 تا 11% اتانول در محیط ملاس 10% تهیه و سپس طبق روش قبلی با استفاده از دی کرومات پتاسیم نمونه ها آماده و جذب در طول موج 595 nm خوانده شد و در نهایت با استفاده از نرم‌افزار اکسل منحنی استاندارد بر اساس رقت‌های اتانل و OD_{595} رسم و معادله زیر منحنی بدست آمد.

3- نتایج

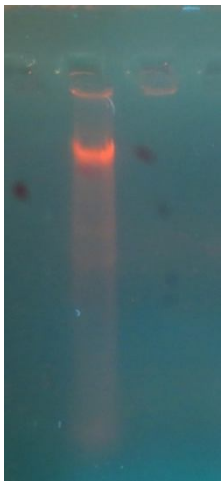
3-1- جداسازی و شناسایی *زایموموناس موبیلیس*

در این مطالعه، از 100 نمونه مختلف و با شرایط متفاوت جداسازی صورت گرفت. مجموعاً تعداد 40 کلونی بر اساس مشخصات ظاهری کلونی و رنگ آمیزی گرم (باسیل‌های گرم منفی با طول بیش از 3 میکرومتر) انتخاب گردید. سپس آزمون‌های بیوشیمیایی مختلفی برای شناسایی باکتری مورد نظر انجام شد. نوع و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری جداشده در جدول 1 آورده شده است.

جدول 1 مشخصات بیوشیمیایی *Zymomonas mobilis*

نوع تست		تعداد باسیل گرم منفی مورد قبول
کاتالاز	+	23 عدد
اکسیداز	-	8 عدد
اوره‌آز	-	8 عدد
سیمون سیترات	-	7 عدد
TSI	عدم رشد	4 عدد
اندول، حرکت و تولید H_2S	-	4 عدد
رشد در محیط نوترینت آگار	عدم رشد	4 عدد
رشد در حضور 7% اتانول	+	1 عدد

برای شناسایی قطعی باکتری جدا شده از روش 16S rRNA sequencing استفاده شد. DNA ژنومی باکتری جدا شده در شکل 1 آمده است. همان‌طور که در شکل مشخص است نمونه DNA جدا شده دارای باند مناسبی از نظر کمیت و کیفیت می‌باشد، البته دو باند کوچک در نمونه DNA مشاهده می‌شود که مربوط به پلاسمیدهای احتمالی باکتری است.

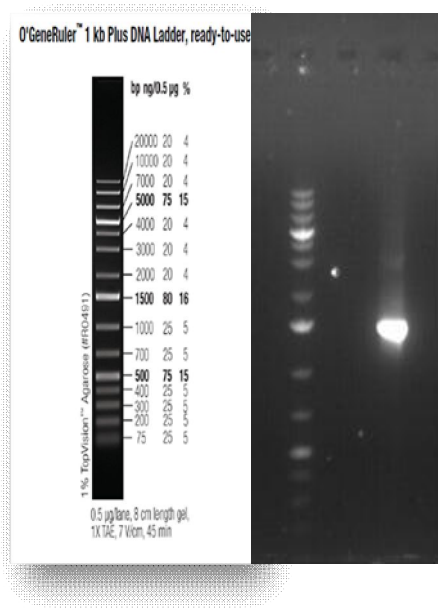


شکل 1 DNA استخراج شده از باکتری جدا شده

ترادف محصول PCR **ژن** 16SrRNA (شکل 2) مورد بلاست قرار گرفت و مشخص گردید باکتری جدا شده 99% شباهت با سویه‌های مختلف *زایموموناس موبیلیس زیر گونه موبیلیس* دارد. با توجه به اینکه این سویه شباهت 100% به هیچکدام از سویه‌های ثبت شده در بانک ژن جهانی ندارد، لذا یک سویه جدید بوده و *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* IRMH52 نامگذاری و با شماره KF758455 در بانک ژن ثبت گردید.

3-2- بررسی و مقایسه میزان اتانل

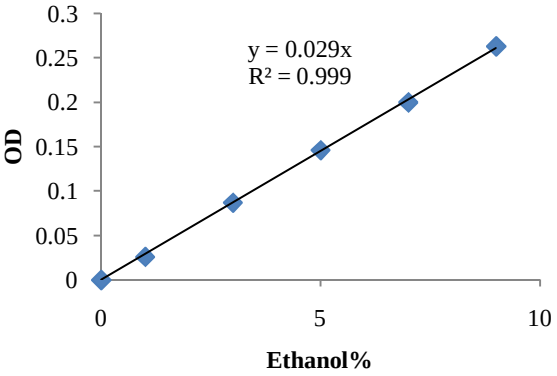
با استفاده از معادله زیر منحنی استاندارد اتانل (شکل3)، میزان تولید اتانل توسط سویه‌های *زایموموناس موبیلیس* و *ساکارومایسس سرویزیه* محاسبه گردید و نتایج در شکل 4 نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص شده است، میزان تولید اتانل در هر سه سویه با گذشت زمان افزایش یافته است ولی درصد تولید اتانل توسط *ساکارومایسس سرویزیه* بیش از دو سویه *زایموموناس موبیلیس* می‌باشد و همان‌طور که در شکل 5 مشخص شده است، میانگین درصد اتانول تولید شده (حجمی/حجمی)، در محیط ملاس 10%، برای میکروارگانیسم‌های *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* IRMH52، *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* ATCC 10988 و *ساکارومایسیس سرویزیه* به ترتیب برابر 1/45، 3/4، 5/05 درصد می‌باشد.



شکل 2 محصول PCR بر روی ژن 16SrRNA باکتری جدا شده

خط عمودی1: سایزمارکر 1kb plus

خط عمودی 2: محصول PCR **(**1500 bp**)**

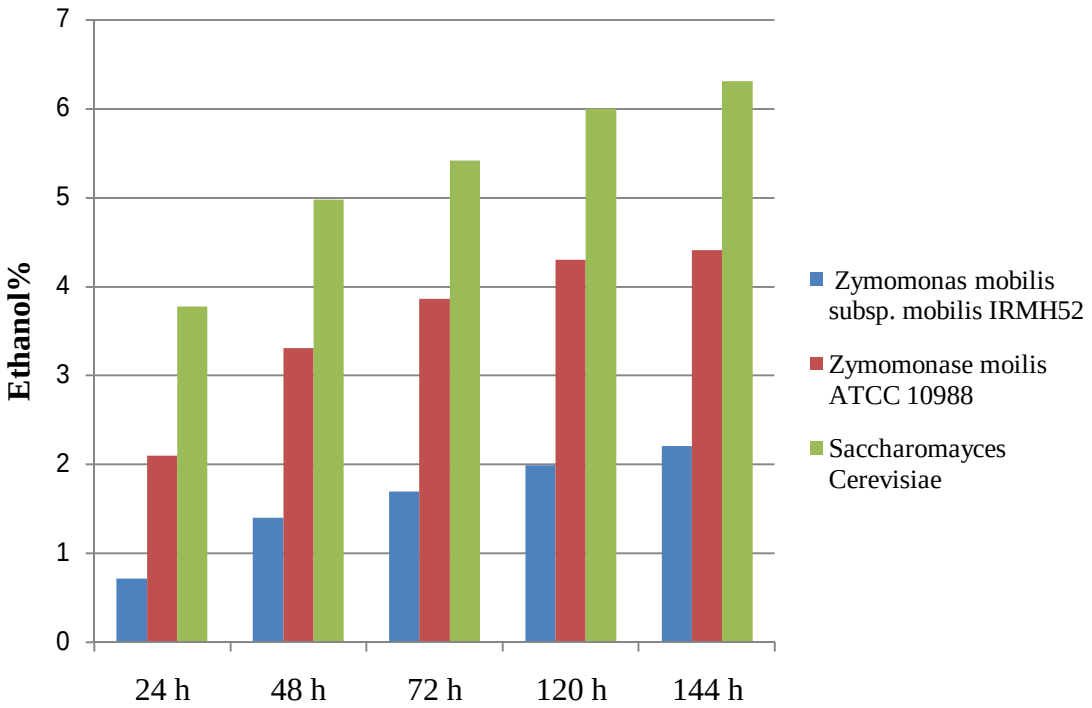


شکل 3 منحنی استاندارد درصدهای مختلف اتانول و معادله زیر منحنی

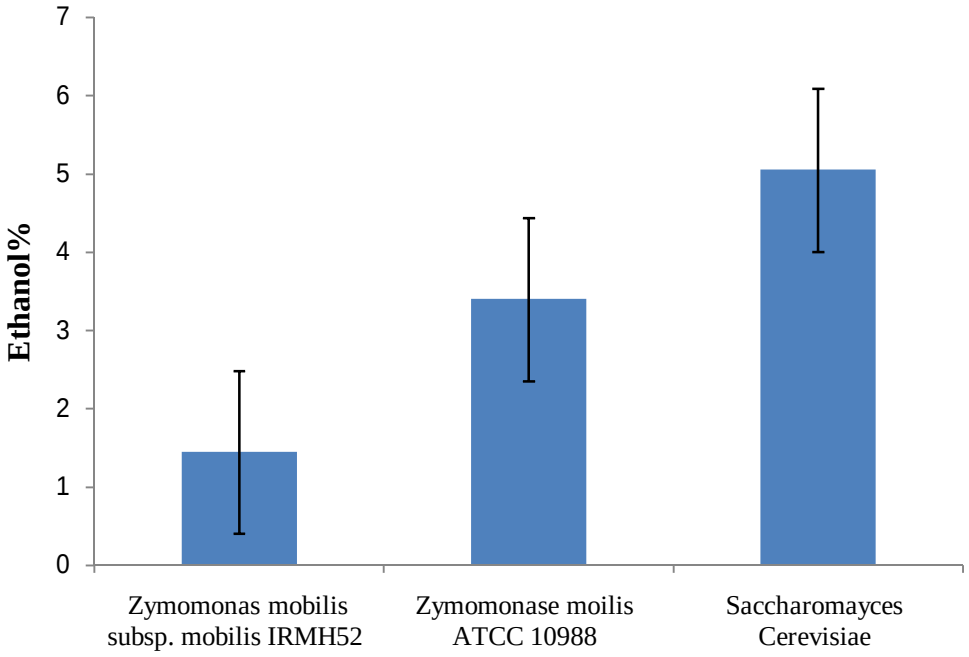
4- بحث

با توجه به کاهش قابل توجه منابع سوخت فسیلی، تحقیقات مختلفی در زمینه معرفی مواد اولیه جایگزین

برای سوخت فسیلی به عمل آمده است که اتانل در صورت مناسب بودن هزینه تولید آن می‌تواند یکی از سوخت‌های جانشین باشد.



شکل 4 بررسی میزان اتانول بعد از زمان تلقیح



شکل 5 نمودارمیانگین تولید اتانول در محیط ملاس

میکروارگانیسم‌های مختلفی از جمله مخمرها، باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تولید اتانول هستند که مهمترین میکروارگانیزم مورد استفاده *ساکارومایسیس سرویزیه* می‌باشد. *زایموموناس موبیلیس* نیز از باکتری‌هایی است که می‌تواند برای تولید اتانول مورد استفاده قرار گیرد و بر اساس بعضی از منابع علمی میزان اتانل تولیدی توسط این باکتری بالاتر از *ساکارومایسس سرویزیه* است که در این صورت قیمت تمام شده اتانل تولیدی می‌تواند کاهش یابد لذا هدف از این تحقیق جداسازی *زایموموناس موبیلیس* و مقایسه تولید اتانل توسط آن و *ساکارومایسس سرویزیه* است.

بارکر و هیلیر در سال 1912، بعد از 11 روز، در دمای 22°C، *زایموموناس موبیلیس* را از شراب سیب فاسد جدا کردند. شیمول در سال 1937، *زایموموناس موبیلیس* را از آبجو جدا کرد [12]. لیندنر در سال 1928، توانست در مکزیک، *زایموموناس موبیلیس* را از عصاره گیاه آگاو جدا کند [13]. میلیس در سال‌های 1950 و 1951، با استفاده از محیط آب سیب در شرایط بی‌هوازی و دمای 25°C توانست این باکتری را جدا کند [14]. سوبینگز و دلی در سال 1977، توانستند در آفریقای مرکزی این باکتری را از شراب خرما جدا کنند [12]. کوربی و ریچارد در سال 1974، از آبجوی فاسد در محیط حاوی 4% گلوکز و 3% عصاره مخمر در دمای 30°C و pH برابر 4 و از انگور لعل، در pH برابر 6، دمای 30°C و 37°C، شرایط هوازی و در حضور 1% نیستاتین جدا کردند [15]. سوبینگز و دلی در سال 1977، از محیط کشت حاوی 0/03 % عصاره مالت، 0/03 % عصاره مخمر، 2% گلوکز، 0/5 % پپتون و 0/002 % سیکلوهگزامید و با pH 4 استفاده کردند [12]. فین و همکارانش در سال 1983، از محیط کشت حاوی گلوکز، KH_2PO_4، $(NH_4)_2SO_4$، $MgSO_4$ 7 H_2O، $0H_2O$ 7 • $FeSO_4$ و MES و کلسیم پنتوتنات با pH 5/5 استفاده کردند [16]. مایر و همکارانش در سال 1985، از محیط کشت حاوی گلوکز، KH_2PO_4، $(NH_4)_2SO_4$، $MgSO_4$ 7 H_2O و عصاره مخمر استفاده کردند [17]. در این تحقیق، از کشت دادن عصاره تخمیر شده انگور در محیط RM (براث و آگار) به همراه 1% نیستاتین با pH برابر6 استفاده شد.

کیم بوییینگ جی در سال 1984، اتانول را از گلوکز توسط سلولهای تثبیت شده *زایموموناس موبیلیس* در ماتریکس کلسیم-آلژینات تولید نمودند. اتانول تولید شده از (w/v) 20% گلوکز، بیشتر از 33 g/l.hr بود [18]. مارتین ربروز و همکارانش در سال 2009، میزان اتانول تولیدی را با *زایموموناس موبیلیس* تثبیت نشده، $3/5\ gL^{-1}h^{-1}$ گزارش کردند [19]. مونیکا بی دوئل و همکارانش در سال 1989، توانستند از ملاس توسط *زایموموناس موبیلیس* اتانول تولید کنند. آن‌ها طی 12 ساعت، از 0/17g وزن خشک ملاس، $32gl^{-1}$ اتانول، از 0/35 g وزن خشک، $38\ gl^{-1}$، از 0/52g وزن خشک ،$42\ gl^{-1}$، از 0/7 g وزن خشک، gl^{-1} 45 و از 0/87g وزن خشک $50\ gl^{-1}$ اتانول تولید کنند [20]. لیندا داویس و همکارانش در سال 2006، از محیط کشت RM استفاده کردند. بعد از قرار دادن این محیط در دسترس *زایموموناس موبیلیس* و *ساکارومایسیس سرویزیه*، *زایموموناس موبیلیس* توانست از $80gl^{-1}$ گلوکز در طی 9 h، $39\ gl^{-1}$ اتانول و *ساکارومایسیس سرویزیه* در طی 11h، $36\ gl^{-1}$ اتانول تولید کند (میزان تولید اتانل توسط زایموموناس بیشتر از ساکارومایسس گزارش گردید) [21]. اینگرام و همکارانش در سال 1984، میزان تحمل اتانول 3 میکروارگانیسم *E.coli*، *L.heterohiochi*، *Z.mobilis* را مورد بررسی قرار دادند. از بین 3 میکرارگانیسم به ترتیب مقاومت *L.heterohiochi* ، *E.coli*،*Z.mobilis* در برابر افزایش اتانول کاهش می‌یابد [22]. شوواشیش بهرا در سال 2010، اتانول را از ماهولا (نوعی گل با برگ‌های پهن که غنی از کربوهیدرات است) توسط میکروارگانیسم‌های *زایموموناس موبیلیس* و

ساکارومایسیس سرویزیه تولید نمود. و برای تولید اتانول با استفاده از این دو سویه بسیار مناسب می‌باشد. میزان اتانول تولیدی از باکتری $122/9g\ kg^{-1}$ و از مخمر $149\ g\ kg^{-1}$گزارش شد [23]. در سال 2012، داوود مظاهری و همکارانش تولید بیواتانول را از میوه گیاه کروب پاد به وسیله *زایموموناس موبیلیس* در فرایند تخمیر حالت جامد و تخمیر غوطه‌ور مورد مقایسه قرار دادند. نتایج حاصل در کشت غوطه‌ور 0/34 گرم اتانول برگرم قند اولیه و کشت جامد غوطه‌ور 0/42 گرم اتانول برگرم قند اولیه بود [24]. در این تحقیق به بررسی میزان اتانول تولیدی توسط 1 گرم وزن تر باکتری‌های *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* IRMH52، *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* ATCC 10988 و مخمر *ساکارومایسیس سرویزیه* در محیط ملاس مورد مقایسه قرار گرفت. غلظت ملاس در این مطالعه 10% در نظر گرفته شد. برای باکتری *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* IRMH52، میزان اتانول تولیدی برای بازه زمانی 48، 72، 96، 120 و 144 ساعت پس از تلقیح به ترتیب برابر با 0/72، 1/4، 1/7، 1/99 و 2/21 می‌باشد. برای باکتری *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* ATCC 10988 به ترتیب برابر 2/1، 3/31، 3/86، 4/3 و 4/41 و مخمر *ساکارومایسیس سرویزیه* به میزان 3/78، 4/98، 5/42، 6 و 6/31 اتانول تولید شده است. میانگین اتانول تولیدی به ترتیب برای باکتری و مخمر فوق برابر 1/45%، 3/4% و 5/05% می‌باشد.

5- نتیجه‌گیری

در این تحقیق سویه جدیدی از *زایموموناس موبیلیس* جدا گردید و مقایسه تولید اتانل بین این باکتری ، *زایموموناس موبیلیس* تهیه شده از بانک میکروبی ایران و *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط ملاس 10% با شرایط یکسان نشان داد که باکتری‌های *زایموموناس موبیلیس* نسبت به *ساکارومایسس سرویزیه* اتانل کمتری تولید می‌کند. از طرف دیگر در حین انجام این مطالعه مشخص شد که نگه‌داری این باکتری نسبت به ساکارومایسس سرویزیه مشکل تر می‌باشد، لذا استفاده از این باکتری برای تولید اتانل توصیه نمی‌شود.

6- منابع

[1] Najafpour, G., Younesi, H. and Ku Syahidah Ku Ismail, K. U. (2004). "Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*." Biores. Technol. 92(3): 251-260.

[2] Montesinos, T. and J. M. Navarro (2000) Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb. Technol. 27(6): 362-370.

[3] Cardona Alzate C. A., Sánchez Toro O. J. (2006) Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. Energy 31(13): 2447-2459.

[4] Baptista C. M. S. G., Coias J. M. A., Oliveria A. C. M., Oliveria N. M. C., Rocha J. M. S., Dempsey M. J., Lannigan K. C., Benson P. S. (2006) Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production." Enzyme Microb. Technol. 40(1): 127-131.

[5] Göksungur Y., Zorlu N. (2001) Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor." Turk. J. Biol 25: 265-275.

[6] Wang R., Espinosa R. M. D. (2002). "The application of a generic feedstock from wheat for microbial fermentations." Biotechnol. prog. 18(5): 1033-1038.

[7] de Oliveira M. R., da Silva R. S. S. F., Buzato J. B., Celligoi M. A. P. C. (2007) Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources." Biochem. Engin. J. 37(2): 177-183.

[8] Garrity G., Breener D. J., Staley J. T., Krieg N. R., Boone D. R., Vos P. D., Goodfellow M., Rainey F. A., Schleifer K. H. (2012). Bergey's manual® of systematic bacteriology, Springer.

[9] de Souza L. G. M., Oliveria S. L. I., Bomura R. Y., Magali A. J. (2011). "Detection of

bacteriocins in *Zymomonas mobilis* and RAPD fingerprinting of the producer strains." African J. Pharm. Pharmacol. 5(19): 2132-2139.

[10] Abolhassani, V., Abolhassani V., Seghatol Eslami N., Maskoki A., Sargolzaei G (2010). "Production of ethanol from date by *Saccharomyces cerevisiae*." Azad University Branch Eslamshahr. p 3.

[11] Ait-Abdelkader, N., Ait-Abdelkader N., Pencreach G., Joset F., Baratti J. C. (1996). "Isolation and Properties of Mutants of *Zymomonas mobilis* Deficient in Sugar Assimilation." App. envi. microbiol. **62**(3): 1096-1098.

[12] Shimwell, J. (1937). "Study of a new type of beer disease bacterium (*Achromobacter anaerobium sp. nov*.) producing alcoholic fermentation of glucose." J. Inst. Brew. **43**(6): 507-509.

[13] Lindner, P. (1928). "Gärungsstudien über Pulque in Mexiko." Bericht des Westpreussischen Botan.-Zoolog. Vere. **50**: 253-255.

[14] Dworkin M, Falkow S. (2006). The Prokaryotes, Springer.pp. 201.

[15] Aldrich, H., Aldrich H., McDowell L., Barbosa M. F., Yomano L. P., Scopes R. K., Ingram L. O. (1992). "Immunocytochemical localization of glycolytic and fermentative enzymes in *Zymomonas mobilis*." J. bacteriol. **174**(13): 4504-4508.

[16] Fein, J. E., Fein J. E., Charley R. C., Hopkins K. A., Lavers B., Lawford H. G. (1983). "Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*." Biotechnol. Let. **5**(1): 1-5.

[17] Bringer-Meyer, S., Bringer-Meyer S., Scollar M., Sahm H. (1985). "*Zymomonas mobilis* mutants blocked in fructose utilization." App. microbiol. biotechnol. **23**(2): 134-139.

[18] Gee, K. B. and C. Y. Choi (1984). "A study on the ethanol production by immobilized cells of *Zymomonas mobilis*." Kore. J. Chem.l Eng. **1**(1): 13-19.

[19] Rebroš, M., Rebroš M., Rosenberg M., Grosova Z., Kristofikova L., Paluch M., Sipocz M. (2009). "Ethanol production from starch hydrolyzates using *Zymomonas mobilis* and glucoamylase entrapped in polyvinylalcohol hydrogel." App. biochem. biotechno. **158**(3): 561-570.

[20] Doelle M. B., Doelle H. W. (1989). "Ethanol production from sugar cane syrup using *Zymomonas mobilis*." J. biotechno. **11**(1): 25-36.

[21] Davis, L., Davis L., Rogers P., Pearce J., Peiris P. (2006). "Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream." Biomass bioene. **30**(8): 809-814.

[22] Ingram, L., Ingram L., Carey V. C., Dombek K. M., Holt A. S., Holt W. A., Osman Y. A., Walia S. K. (1984). "Biochemical and genetic improvement of *Zymomonas mobilis*." Biomass **6**(1): 131-143.

[23] Behera, S., Behera S., Kar S., Mohanty R. C., Ray R. C. (2010). "Comparative study of bio-ethanol production from mahula (Madhuca latifolia L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices." Applied Energy **87**(1): 96-100.

[24] Mazaheri, D., Mazaheri D., Shojaosadati S. A., Mousavi S. M., Hejazi P., Saharkhiz S. (2012). "Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*." Applied Energy.