به نام خالق زیبا ترین خلق جهان

مقایسه تولید اتانول از زایموموناس موبیلیس و ساکارومایسس سرویزیه

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 شده اند. ملاس یکی از فراوان ترین و ارزان ترین منابع کربن در دسترس و قابل استفاده برای تولید اتانول می باشد که با این کاربرد علاوه بر جلو گیری از ورود آن به طبیعت،محصولی به دست می آید که یک سوخت پاک و سازگار با طبیعت است.هدف اصلی این تحقیق مقایسه تولید اتانول از مواد حاوی قند به وسیله زایموموناس موبیلیس و ساکارومایسس سرویزیه می باشد در این تحقیق باکتری زایموموناس موبیلیس از کشت بر محیط MR حاوی 1%نیستاتین در شرایط هوازی و دمای 30درجه سانتی گراد جداسازی و شناسایی شد.و برای بررسی میزان اتانول تولیدی در محیط آب مقطر و ساکاروز استفاده گردید.

نتایج:

میزان اتانول تولیدی میانگین در محیط آب مقطر و ساکاروز،برای زایموموناس موبیلیس وساکارومایسس سرویزیه به ترتیب 1.997375،5.31986111درصد بود.در این تحقیق شرایط متفاوتی برای ساکارومایسس سرویزیه در نظر گرفته شد که نتایج به دست آمده از آن حاکی از آن است که اگر میزان ساکاروز، ملاس مورد استفاده از حد استاندارد خود پایین تر باشد میزان اتانول تولیدی بیشتر خواهد بود.

کلید واژه:

اتانول،ساکارومایسس سرویزیه،زایموموناس موبیلیس،ساکاروز

مقدمه

امروزه در عصری زندگی میکنیم که در آن نیاز روزانه خود را به سوحت های فسیلی احساس میکنیم.حال باتوجه به کاهش منابع سوخت فسیلی،نیاز به منابع انرژی که تجدید پذیر،مؤثر،دارای قیمت مناسب و فاقد آلودگی باشد،حس می شود.اتانول مهم ترین سوخت زیستی است که آن را به عنوان سوخت سبز می شناسند.این الکل به دلیل عدداکتان بالا می تواند به تنهایی به عنوان سوخت یا به جایMTBEدر بنزین و همچنین به عنوان حامل اکسیژن در گازوئیل به کار برود و اکسیژن آن را افزایش دهدکه سبب

اکسیداسیون بهتر هیدرو کربن ها و کاهش مقدار آلودگی گاز های رها شده به اتمسفر شود.اتانول می تواند از ملاس چغندر قند و نیشکر و هیدرولیز اسیدی نشاسته برخی از حبوبات از قبیل ذرت به دست آید.ملاس یکی از فراوان ترین پسماندهای صنایع تولید قند می باشد و در حال حاضر یکی از ارزان ترین منابع قند است.در چند دهه گذشته،تولید اتانول با استفاده از فرایند میکروبی مورد توجه قرار گرفته است. میکروارگانیزم های مختلف شامل«مخمرهای شناخته شده از قبیل ساکارومایسس سرویزیه،گونه های کلستریدیوم و زایموموناس موبیلیس»کاندیدای مناسبی برای تولید اتانول هستند.از بین میکروارگانیسم های موجود،باکتری ها به خاطر اینکه قادر به دستکاری ژنی و تغیر در نوع سوبسترای مورد استفاده و افزایش میزان اتانول،مورد توجه بیشتری قرار میگیرند.زایموموناس موبیلیس یکی از باکتری هایی است که به علت توانایی تولید اتانول بیشتر نسبت به دیگر باکتری های تولید

کننده اتانول،بیشترین کاربرد را در صنعت دارد.زایموموناس موبیلیس یک باکتری گرم منفی بی هوازی اختیاری و میله ای شکل باطول2µmتا6µm وعرض 1µmتا4µm فاقد اسپرو و متحرک بوده و نمی تواند در محیط های نوترینت آگارو نوترینت براث رشد کند.این باکتری از مسیر اینتر-دودروف،در شرایط بی هوازی اتانول تولید می کند.مکانیزم تولید اتانول در این باکتری،به این صورت است که ابتدا گلوکز وارد چرخه گلیکولیز می شود که در آن ابتدا دو گروه فسفات گرفته و به فروکتزفسفاته و سپس به قند سه کربنه تبدیل و با گرفتن یک گروه دیگر فسفات به اسید دو فسفاته و در نهایت با از دست دادن دو گروه فسفات به پیرووات تبدیل میشود.(یعنی از هر مولکول گلوکز دو مولکول پیرووات تولید میشود)در ادامه پیرووات نیز طی دو مرحله،ابتدا به استالدهید بدل شده و استالدهید نیز توسط آنزیم الکل دهیدروژناز به اتانول تبدیل می شود.چون این میکروارگانیزم پروکاریوت می باشد، قابلیت دستکاری ژنتیکی در آن نسبت به ساکارومایسس سرویزیه بالاتر است و تحقیقات زیادی در خصوص دستکاری ژنتیکی بر روی این باکتری و بررسی تولید اتانول در شرایط مختلف جهت تولید اقتصادی اتانول انجام شده است،لذا هدف از این مطالعه مقایسه تولید اتانول به وسیله زایموموناس موبیلیس و ساکارومایسس سرویزیه می باشد.

مواد و روش ها

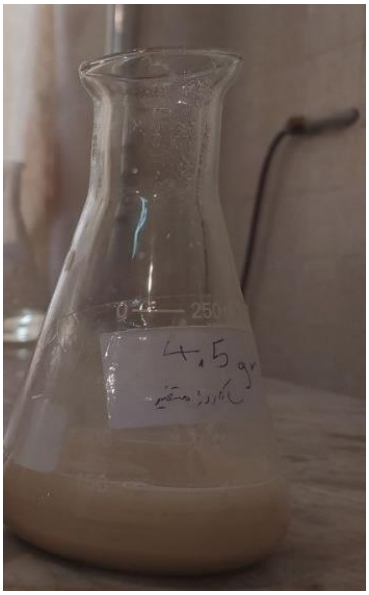
در این پژوهش از دستگاه انکوباتور،ترازو و همزن مغناطیسی،وسایل آزمایشگاهی اعم از:ارلن مایر،بشر،اسپاتول،شیشه ساعت،لوپ،قفل هوا،هیدرومتر،فالکون و پی اچ متر و میکروارگانیزم ها و مواد شامل:ساکاروز،محیط کشت آگارRMA،هیدروکلریک اسید،ساکارومایسس سرویزیه(پودر مخمر نانوایی)وZymomonas mobilis برای مقایسه تولید اتانول تولیدی استفاده شده.

تمامی وسایل و دستگاه های مذکور متعلق به آزمایشگاه پژوهش سرای دانش آموزی بوده و میکرو ارگانیسم از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی(سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران) تهیه شده.

تولید اتانول به وسیله ساکارومایسس سرویزیه

در ابتدا درون سه عدد ارلن 500ml گروه شاهد تهییه شد ،در هریک 270ml آب مقطر ، 67.5gr ساکاروز را با کمک بشر و ترازو اندازه گیری به وسیله همزن مغناطیسی ساکاروز را در آب حل کرده(شکل1).سپس 1.5grساکارومایسس سرویزیه را با کمک شیشه ساعت و ترازو اندازه گیری در 30ml آب مقطر با اسپاتول سوسپانسیون کرده(در اینجا ما در مجموع 4.5gr مخمر را در 90ml آب مخلوط و بعد به هر ظرف 30ml به هر ظرف اضافه شد) و به مدت یک ساعت در دمای 30درجه سانتی گراد قرار داده شد(شکل2).بعد از فعال شدن مخمر PHرا تا 6 به کمک هیدروکلریک اسید تنظیم و با کمک PH متر اندازه گیری و به محلول آب و شکر اضافه شد، وبرای ایجاد محیط بی هوازی برای مخمر ابتدا یک چوب پنبه را به اندازه قطر یک شلنگ سرم با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن سوراخ و شلنگ سرم را وارد چوپ پنبه کرده و با آن درب ظرف را بسته،سپس آن را با چسب حرارتی اندود نموده ایم و سر دیگر شلنگ را درون یک بشر پر از آب قرار دادیم(قفل هوا).

شکل1- حل کردن ساکاروز در آب مقطر



شکل2- فعال کردن ساکارومایسس سرویزیه

حال درون نه عدد ارلن دیگر گروه ساکاروز تهییه شد،این گونه که میزان آب و مخمر مطابق گروه شاهد ولی این بار به جای 67.5gr ساکاروز،در سه ارلن در هر یک 270ml آب مقطر و 27gr شکر را اندازه گیری و با همزن مغناطیسی شکر را در آب حل کرده و 1.5gr ساکارومایسس سرویزیه در 30ml آب مقطر با کمک اسپاتول مخلوط شده و بعد از گذشت یک ساعت به ظرف حاوی محصول آب و شکر اضافه شده(شکل3) و درب ارلن به کمک قفل هوا بسته شد(شکل4).درون سه ارلن دیگر در هر ظرف 270ml آب مقطر و 54gr شکر را اندازه گیری شده و با همزن محلول آب و شکر تولید شد،سپس 1.5gr ساکارو مایسس سرویزیه را مطابق روش مذکور در 30ml آب مقطر به مدت یک ساعت فعال و به ظرف حاوی محلول اضافه شد و درب آن را با قفل هوا پوشاندیم.سپس در سه ظرف دیگر مانند قبل در هر ظرف 270ml آب مقطر را با 81gr شکر حل شده و به نسبت قبل مخمر را در 30ml آب فعال نموده و به ارلن اضافه شد.

شکل3- فعال سازی مخمر های متفاوت

شکل4-ایجاد محیط بی هوازی برای جوانه زدن مخمر به کمک قفل هوا.

درون نه عدد ارلن دیگر(این بار با میزان مخمر متفاوت(شکل5)تهییه شده)؛درون تمامی ارلن ها 270ml آب مقطر و 67.5gr ساکاروز اضافه و مخلوط شده و برای سه ظرف میزان مخمر 2.25gr اندازه گیری و با 30ml آب مقطر سوسپانسیون و بعد از گذشت یک ساعت به ظروف اضافه شد. و در سه ارلن بعدی میزان مخمر 0.75gr را با 30ml آب مقطر سوسپانسیون و به مدت زمان ذکر شده کنار گذاشته تا فعال شده و بعد به ارلن ها افزوده شد.

سپس درون ظروف باقی مانده در هر ارلن مقدار 0.3gr فرض و تهییه شده و به ظروف انتقال یافته است. درب تمامی ظروف با قفل هوا بسته و در دمای30 درجه سانتی گراد به مدت 10 روز نگه داری شد(شکل6).

شکل5-میزان مخمر متغییر برای ارلن های حاوی ساکاروز

شکل6- درب ظروف پوشیده شده با قفل هوا

روش کاشت باکتری و آماده سازی محیط کشت

درون چهار عدد فالکون در هرکدام،1٪نیستاتین اضافه و به مدت یک هفته با استفاده از سوآب استریل،بر روی محیط RMA آگار (20g/l گلوکز،2g/l KH_2PO_4 ،15g/l آگار)کشت داده و در شرایط هوازی درون انکوباتور با دمای 30درجه سانتی گراد قرار داده شد.

تولید اتانول به وسیله زایمومونـاس موبیلیس

اکنون برای ساخت الکل از میکروارگانیسم درون یک ظرف 6000ml،تا حجم2000ml از آن را آب مقطر و به آن500gr ساکاروز اضافه و حل نمودیم(شکل7-8-9).حال درب ظرف را با استفاده از قفل هوا بسته و به مدت دو روز در دمای30 درجه سانتی گراد نگه داری کردیم(شکل10-11).سپس محلولی که در ظرف قرار داشت را بین چهار ارلن500ml تقسیم شده و درون هر ظرف سه لوپ پر از باکتر ی را به آن افزوده و درب آنان با فقل هوا بسته و به مدت 10 روز در دمای 25 درجه سانتی گراد نگه داری شده است.

شکل7-8-9-اندازه گیری و حل نمودن ساکاروز در آب

شکل10-11-ظرف شش لیتری و فقل های آن

بررسی میزان اتانول تولیدی

حال با توجه به تشکیل کلونی در باکتری ومشاهده ی کدورت در ظروف،تمامی نمونه های تهییه شده را از فیلتر عبور داده شده تا سلولی درون ظرف ها باقی نماند،سپس با استفاده از هیدرومتر میزان الکل تولیدی را برسی کرده و با توجه به فرمول های زیر جدول بندی شده است:

1-برای محاسبه درصد حجم الکل تا sg1.080 از فرمول استاندارد$ABA=(og-fg)\times 131.25$

و برای sg های بالاتر 1.080از فرمول:$ABV=(76.08\times (og-fg)/(1.775-og)) \times (fg/0.794)$

2-برای تبدیل وزن مخصوص(SG) به بریکس(Brix)از:

$Brix=(((182.4601\times SG-775.6821)\times(SG+1262.7794)\times SG-669.5622)$

که در آن ها (og) آبسنجی(الکل سنجی) اولیه،(fg)آبسنجی نهایی و وزن مخصوص است.برای محاسبه پتانسیل الکل،وزن مخصوص نهایی 1.000در نظر گرفته شده است.برای محاسبه ی دقیق تر باید ضریب ثابت 131.25به نسبت درصد الکل تولیدی تغییر کند.برای ارلن های کم الکل از ضریب 129و برای پر الکل از 134 می توان استفاده کرد.

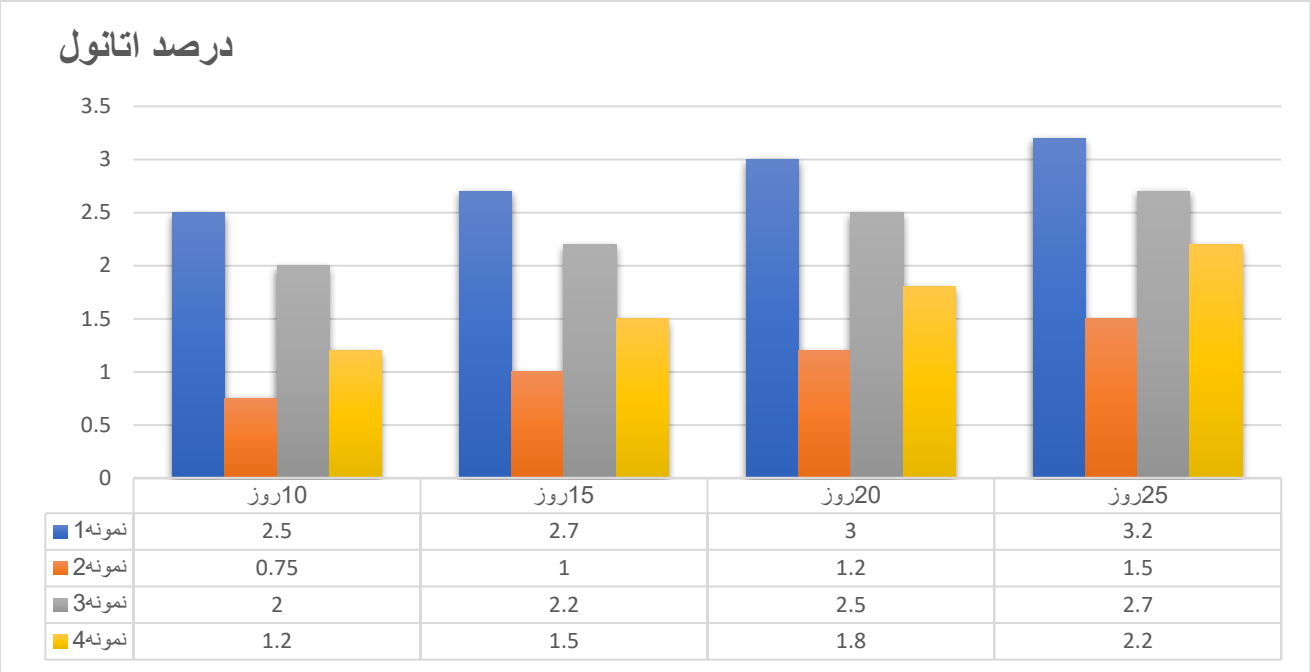
بعد از اندازه گیری میزان الکل تولید شده در نمونه ها در هر گروه نمونه(به جز شاهد و باکتری) بین نمونه های یکسان میانگین گرفته شده است.

یافته ها

در این مطالعه،از4نمونه یکسان برای کشت باکتری استفاده گردید،که در میان آنها از دو کلونی بر اساس مشخصات کلونی برای شناسایی؛ و از باکتری مورد نظر استفاده شد؛علاوه بر آن از 21 نمونه مختلف برای جوانه زدن ساکارومایسس سرویزیه استفاده شده است.

مشخص شده است،که میزان اتانول تولید شده در تمام نمونه ها با گذشت زمان افزایش یافته است ولی درصد تولیدی اتانول در برخی از نمونه هایی که به وسیله ساکارومایسس سرویزیه اتانول تولید کرده اند بیشتر از چهار نمونه ای بوده که حاوی باکتری زایمومونا‌س موبیلیس بوده اند(نمودار های 1-2-3-4).

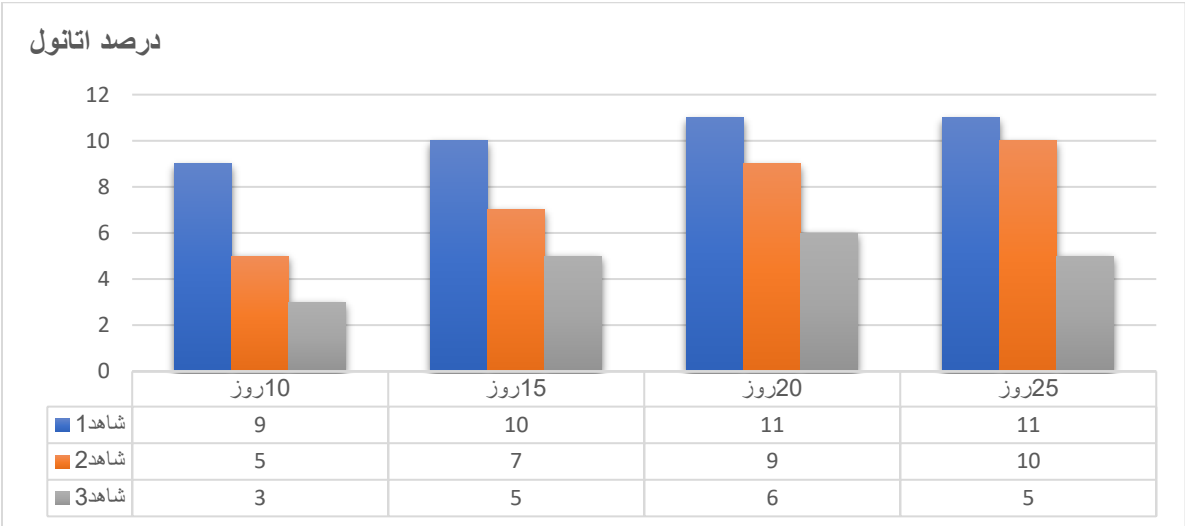
بررسی چهار نمونه از تو لید اتانول به وسیله ی باکتری زایمومونا‌س موبیلیس(نمودار1)



	10روز	15روز	20روز	25روز
نمونه1	2.5	2.7	3	3.2
نمونه2	0.75	1	1.2	1.5
نمونه3	2	2.2	2.5	2.7
نمونه4	1.2	1.5	1.8	2.2

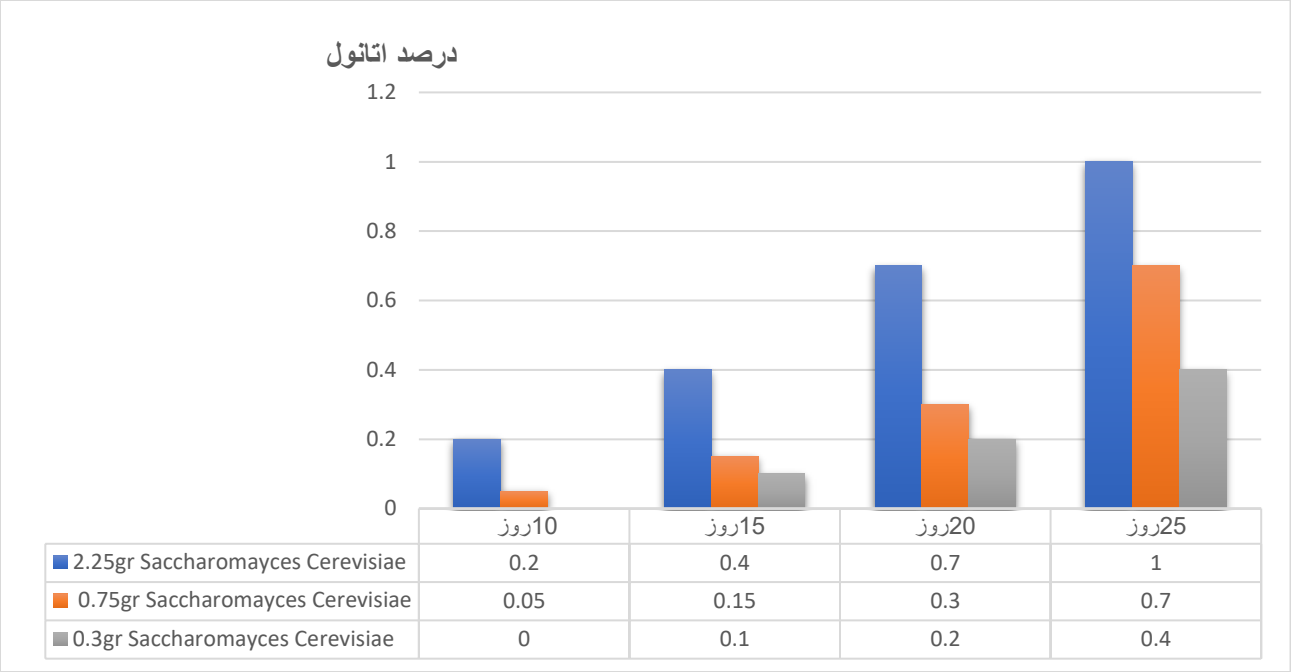
نمودار1-درصد اتانول تولیدی توسط زایمومونا‌س موبیلیس پس از گذشت 10روز و بررسی آن تا 15 روز بعد برای چهار نمونه

بررسی سه نمونه از اتانول تولیدی به وسیله ساکارومایسس سرویزیه



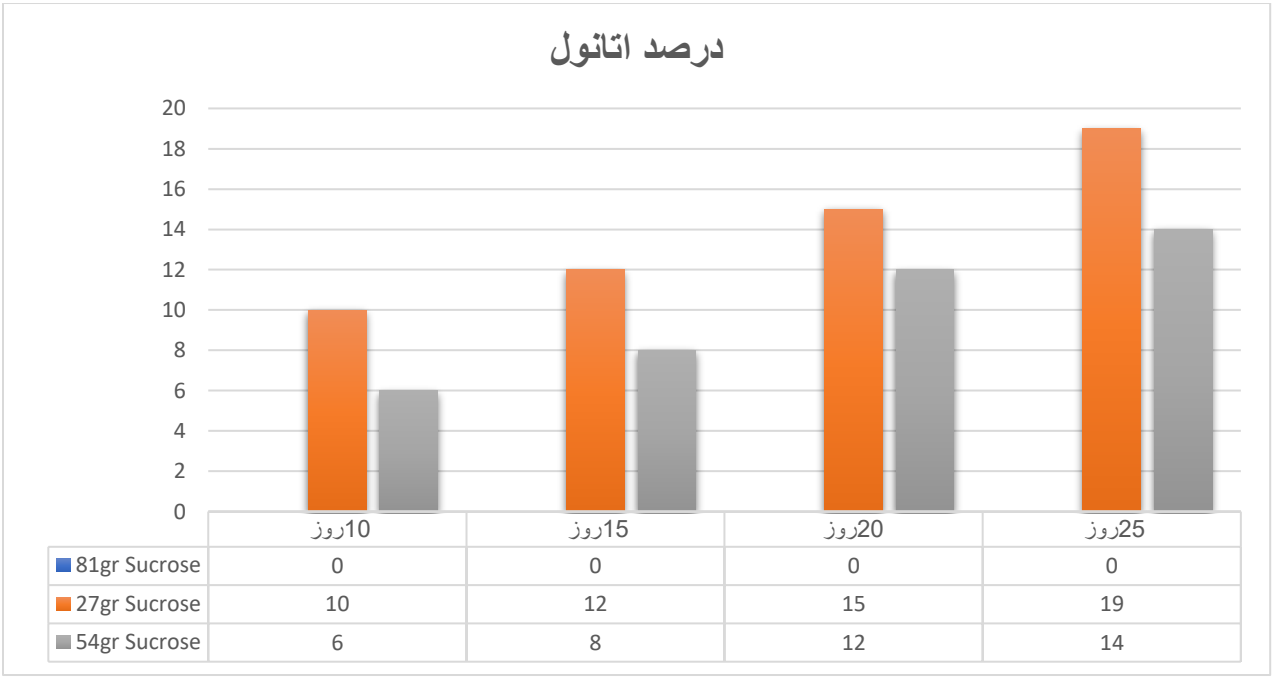
	10روز	15روز	20روز	25روز
شاهد1	9	10	11	11
شاهد2	5	7	9	10
شاهد3	3	5	6	5

نمودار2-بررسی تولید اتانول توسط مخمر پس از 10روز و بررسی آن تا 15روز بعد برای سه نمونه (گروه شاهد)



	روز10	روز15	روز20	روز25
2.25gr Saccharomayces Cerevisiae	0.2	0.4	0.7	1
0.75gr Saccharomayces Cerevisiae	0.05	0.15	0.3	0.7
0.3gr Saccharomayces Cerevisiae	0	0.1	0.2	0.4

نمودار3-بررسی تولید اتانول توسط مخمر پس از 10روز و بررسی آن تا 15روز بعد برای سه نمونه(گروه مخمر)

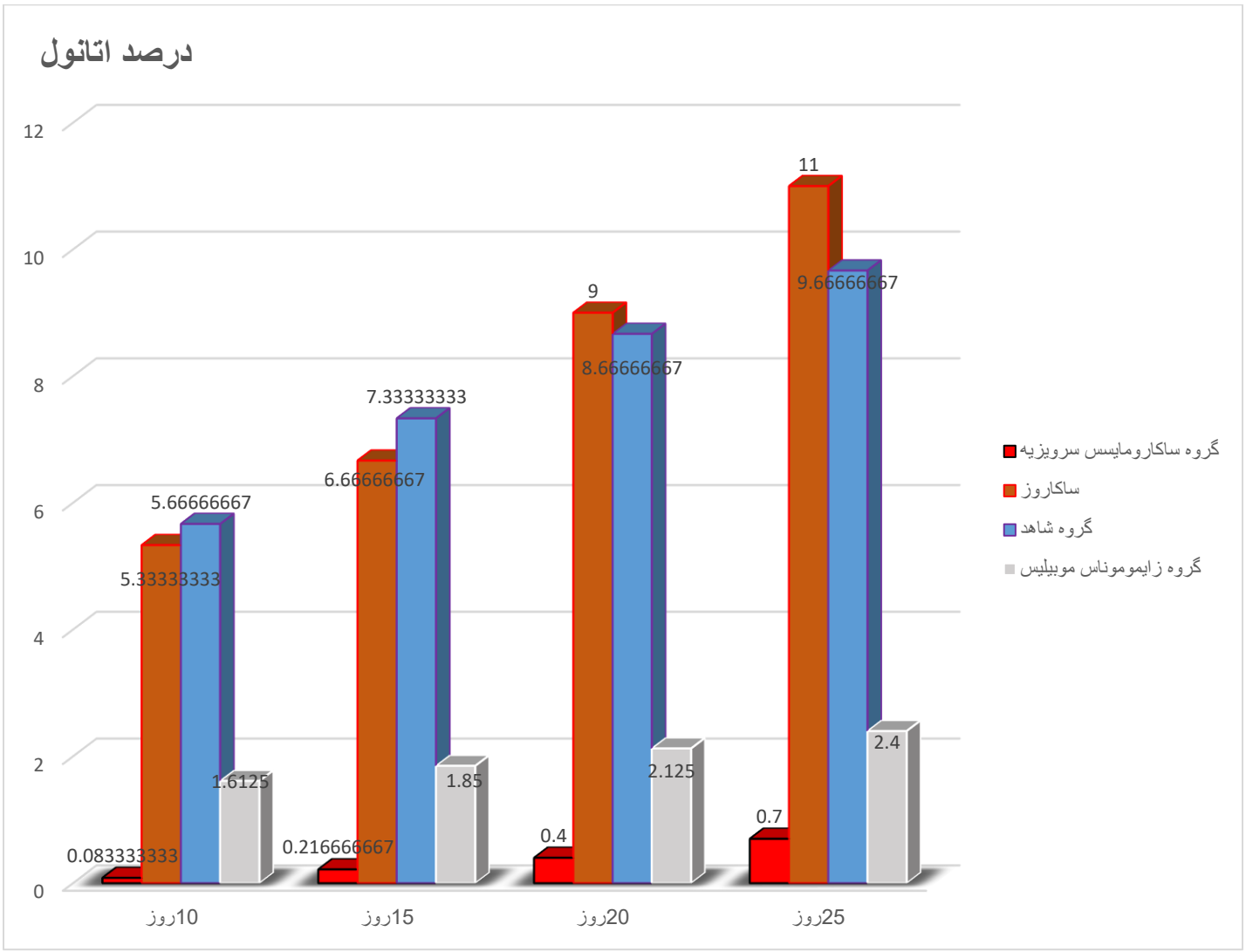


	روز10	روز15	روز20	روز25
81gr Sucrose	0	0	0	0
27gr Sucrose	10	12	15	19
54gr Sucrose	6	8	12	14

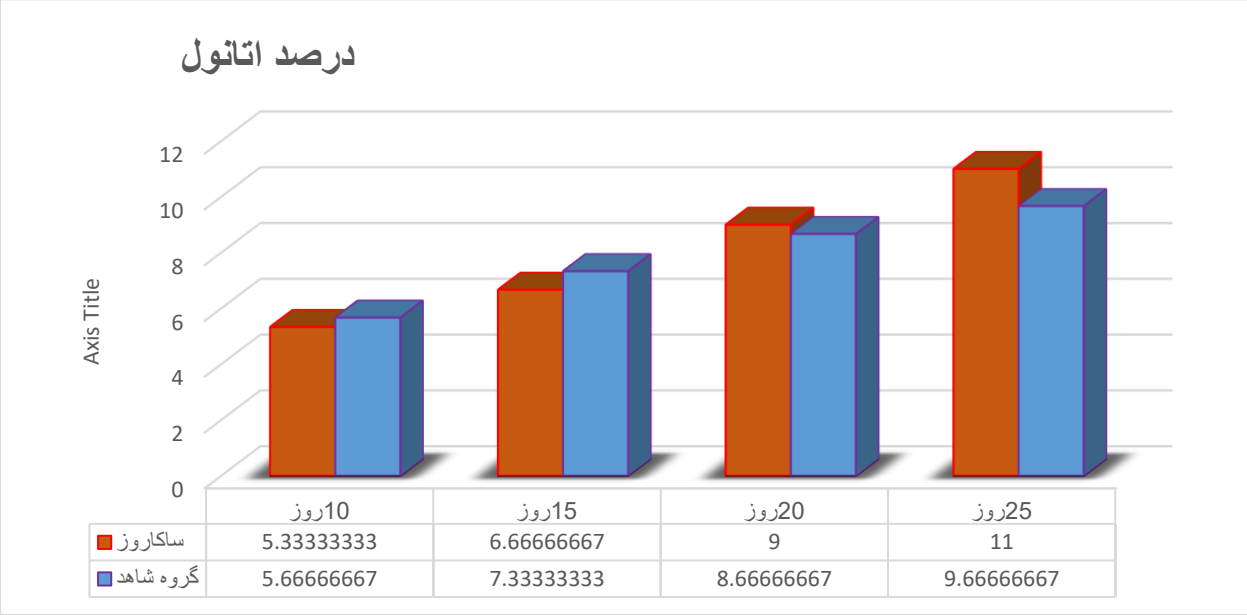
نمودار4-بررسی تولید اتانول توسط مخمر پس از 10روز و بررسی آن تا 15روز بعد برسی سه نمونه (گروه ساکاروز)

مقایسه و بررسی میزان اتانول میان دو گونه

میزان تولید اتانول توسط نمونه ها طی مدت زمان بررسی شده محاسبه و بین داده های موجود در هر نمونه میانگین گرفته شده و مقایسه دو گونه در نمودار5نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشخص شده است، میزان اتانول تولیدی در هر دو گونه افزایش یافته است ولی درصد تولید اتانول در گونه دارای مخمر بیش از گونه دارای باکتری می باشد و همان طور که در نمودار 6 مشخص شده است، میانگین درصد اتانول تولید شده در نمونه های دارای ساکاروز کمتر بیشترین میزان تولید اتانول را به خود اختصاص داده که نشان می دهد که میزان ساکاروز اگر از حد استاندارد کمتر باشد یعنی به جای 25٪ساکاروز از 10٪ یا 20٪ساکاروز استفاده شود میزان اتانول تولیدی افزایش خواهد داشت.



نمودار5 -مقایسه میزان اتانول تولیدی توسط دو گونه ساکارومایسس سرویزیه و زایمومونـاس موبیلیس



نمودار6-مقایسه گروه شاهد با گروه ساکاروز-همانطور که می بینید داده ها نشان می دهد که تولید اتانول به وسیله ساکارومایسس سرویزیه در مقادر ساکاروز کمتر بیشترین میزان تولید را به خود اختصاص داده است.

بحث

با توجه به کاهش قابل توجه منابع سوخت فسیلی ، تحقیقات مختلفی در زمینه معرفی مواد اولیه جایگزین برای سوخت فسیلی و تولید به صرفه آن به عمل آمده است که تانول در صورت مناسب بودن هزینه تولید آن می تواند یکی از سوخت های جایگزین باشد.علاوه بر با توجه به گسترش روز افزون بیماری های عفونی تولید اتانول به مقدار بیشتر با مقدار هزینه کمتر میتواند کمک شایانی به علم پزشکی کند؛وحتی باعث کارآفرینی شود.

میکروارگانیسم های مختلفی از جمله باکتری ها،مخمرها و قارچ ها قادر به تولید اتانول هستند که مهمترین میکروارگانیزم مورد استفاده ساکارومایسس سرویزیه می باشد.زایمومونا‌س موبیلیس نیز از باکتری هایی است که می تواند برای تولید اتانول مورد استفاده قرار گیرد و بر اساس بعضی از منابع علمی میزان اتانول تولیدی توسط این باکتری بالاتر از ساکارومایسس سرویزیه است که در این صورت قیمت تمام شده اتانول تولیدی می تواند کاهش یابد لذا هدف از این تحقیق مقایسه تولید اتانول توسط ساکارومایسس سرویزیه (در شرایط گوناگون) و زایمومونا‌س موبیلیس است.

بارکر و هیلیر در سال 1912،بعد از گذشت 11 روز،در دمای 22درجه سانتی گراد،باکتری زایمومونا‌س موبیلیس را از شراب سیب فاسد جدا کردند.شیمول در سال1937،زایمومونا‌س موبیلیس را از آب جو جدا کرد(1).لیندنر در سال1928،توانست زایمومونا‌س

موبیلیس را از عصاره گیاه آگاو جدا کند(2).میلیس در سال های 1950،با استفاده محیط آب سیب در شرایط بی هوازی و دمای25درجه سانتی گراد توانست این باکتری را جدا کند.کوربی و ریچارد در سال1974،از آبجوی فاسد در محیط حاوی4٪گلوکز و 3٪عصاره مخمر در دمای 30درجه سانتی گراد و PHبرار4واز انگور لعل،درPHبرابر6،دمای30و37درجه سانتی گراد ،در شرایط بی هوازی و در حضور1٪تیستاتین جدا کردند(3).سوبینگر و دلی در سال1977،توانستند این باکتری را از شراب خرما جدا کنند،آنها از محیط کشت حاوی0.03٪عصاره مالت،0.03٪عصاره مخمر،2٪گلوکز،0.5٪پپتون و 0.002٪ سیکلو هگزامید و با 4PH استفاده کردند(1).فین و همکارانش در سال1983،از محیط کشت حاوی گلوکز،$(NH_4)_2SO_4$،$MgSO_4$،$FeSO_4$و MESوکلسیم پنتونات با 5/5٪ استفاده کردند.کیم بوبینگ جی در سال1984،اتانول را از گلوکز توسط سلول های تثبیت شده زایموموناس موبیلیس در ماتریکس کلسیم-آلژینات تولید نمودند.اتانول تولید شده از 20٪گلوکز،بیشتر از 33g/l.hrبود(10).مایر و خمکارانش در سال 1985،از محیط کشت حاوی گلوکز،KH_2PO_4،$(NH_4)_2SO_4$،$MgSO_4$وعصاره مخمر استفاده کردند(4).مونیکا بی دوئل و همکارانش در سال1989،توانستند از ملاس توسط زایموموناس موبیلیس اتانول تولید کنند.آن ها طی 12ساعت،از0.17g وزن خشک،$45gl^{-1}$و0.87g وزن خشک $50gl^{-1}$ اتانول تولید کنند(5).لیندا داویس و همکارانش درسال 2006،از محیط کشت RMاستفاده کردند. بعد از قرار دادن این محیط در دسترس زایموموناس موبیلیس و ساکارومایسس سرویزیه ،زایموموناس موبیلیس توانست از $80gl^{-1}$ گلوکز در طی9 ساعت، $39\ gl^{-1}$ و ساکارومایسس سرویزیه در طی 11ساعت، $36gl^{-1}$ اتانول تولید کند که این به این معنی بود که میزان اتانول تولیدی توسط زایموموناس موبیلیس بیشتر از ساکارومایسس سرویزیه بوده است(6).مارتین ربروز وهمکارانش در سال2009میزان اتانول تولیدی را با زایموموناس موبیلیس تثبیت نشده، $3.5gl^{-1}h^{-1}$ گزارش کردند(7).شوواشیش بهرا در سال2010،اتانول را از ماهولا(نوعی گل با برگ های پهن که غنی از کربوهیدرات است)توسط میکروارگانیسم های زایموموناس موبیلیس و ساکارومایسس سرویزیه تولید نمود؛میزان اتانول تولیدی از باکتری $122kg^{-1}$و از و از مخمر $149kg^{-1}$ گزارش شد(8).در سال 2012،داوود مظاهری و همکارانش تولید اتانول را از میوه گیاه کروب پاد به وسیله زایموموناس موبیلیس در فرایند تخمیر حالت جامد وتخمیر غوطه ور مورد مقایسه قرار دادند.نتایج حاصل در کشت غوطه ور 0.34 گرم اتانول برگرم قند اولیه و کشت جامد غوطه ور0.42 اتانول بر گرم قند اولیه بود(9).در سال2016،مجید مقبلی و میرم حسنی، میزان اتانول تولیدی را در سه گونه ساکارومایسس سرویزیه و زایموموناس موبیلیس و سویه جدیدی را مورد مقایسه قرار دادند و نتایج حاصل از تولید اتانول توسط ساکارومایسس سرویزیه برابر5.05٪وبرای باکتری ها 3.4%،1.4% گزارش شده است.در این تحقیق به بررسی میزان اتانول تولیدی توسط باکتری زایموموناس موبیلیس و ساکارومایسس سرویزیه در محیط مخلوط آب مقطر و ساکاروز مورد مقایسه قرار داده شد.برای باکتری میزان اتانول تولیدی در بازه زمانی 10،15،20،25روز پس از تلقیح به ترتیب برابر1.6125،1.85،2.125،2.4و برای ساکارومایسس سرویزیه در همان بازه زمانی به ترتیب برابر3.69444443،4.7388889،6.61055557،7.12222223 می باشد.

نتیجه گیری

در این تحقیق مقایسه تولید اتانول بین دو گونه باکتری زایموموناس موبیلیس(تهیه شده از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران)و مخمر ساکارومایسس سرویزیه در محیط های متفاوت برای ساکارومایسس سرویزیه و یک محیط استاندارد از آب مقطر و ساکاروز نشان داد که باکتری زایموموناس موبیلیس اتانول کمتری نسبت به ساکارومایسس سرویزیه تولید می کند.از طرف دیگر در این پژوهش مشخص شد که شرایط کشت و نگه داری این باکتری بسیار سخت است و از دیگر نتایج به دست آمده آن بود که اگر میزان ساکاروز در هر نمونه برای ساکارومایسس سرویزیه کمتر از حد استاندارد25٪باشد میزان اتانول تولیدی در آن بیشتر خواهد بود.بنابراین استفاده از باکتری مذکور برای تولید اتانول صرفه اقتصادی نداشته و توصیه نمی شود.

منابع

1-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.

2-Lindner.p.(1928).”Garungsstudien uber pulque in Mexiko.”Bericht des Westpreussischen Botan-Zoolog.Vere.50:253-255.

3-Aldrich.H.Aldrich H.McDowell LBarbosa M.F.Yomano L.P.Scopes R.K.Ingram L.O.(1992).”Immunocytochemical localization of glycolytic and fermentative enzymes in Zymomobas mobilis.”J.bacteriol. 174(13):4504-8054

4-Dworkin M Falkow S.(2006).the Prokaryotes.Springer.pp.102

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

6-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.

7-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.

8-Behera, S., Behera S., Kar S., Mohanty R. C., Ray R. C. (2010). "Comparative study of bioethanol 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.

9-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. A

10-[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.