فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۷، پاییز ۱۳۹۲، صفحه ۱۵- ۲۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۱۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۱۵

جداسازی، شناسایی و بهینه‌سازی باکتری‌های تولیدکننده اتانول از فرآیند تخمیر با پایه *ساکارومیسس* در صنایع الکل‌سازی ایران

مجتبی محسنی: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، m.mohseni@umz.ac.ir *
هدی ابراهیمی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، h.ebrahimi@stu.umz.ac.ir

چکیده

مقدمه: با توجه به رشد جمعیت جهان، مصرف زیاد انرژی، محدودیت منابع نفتی تامین کننده انرژی و افزایش قیمت سوخت در آینده، جایگزینی منبع انرژی دیگر امری ضروری است. اتانول سوخت تجدیدپذیر و بی‌خطر بوده و تولید جهانی آن بیشتر بر پایه تخمیر میکروبی است. جداسازی باکتری‌ها از تانک‌های تخمیر صنایع الکل‌سازی و بهینه‌سازی شرایط رشد آن‌ها به منظور یافتن جدایه‌هایی با توان بالای تولید اتانول برای معرفی به صنعت، از اهداف این پژوهش بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های جمع‌آوری شده از تانک تخمیر کارخانجات الکل‌سازی در محیط کشت مایع ZSM، غنی‌سازی شد. سپس، برای جداسازی باکتری‌های تولید کننده اتانول، به محیط کشت محتوی آگار RMA منتقل شد. بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه‌ها و تاثیر آن بر تولید اتانول شامل: درجه حرارت رشد، اسیدیته، زمان تخمیر، هوادهی، غلظت اولیه سوبسترا و منابع کربن و نیتروژن بررسی شد. همچنین، برای شناسایی جدایه‌ها، مشخصات ریخت شناسی، فیزیولوژیک و مولکولی مطالعه شد.

نتایج: سه جدایه باکتریایی ZYM7، ZYM8 و ZYM9، از تانک تخمیر اتانول جداسازی شد. هر سه جدایه توانایی تولید اتانول را نشان داد و پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری، به ترتیب ۵/۰۰، ۷/۶۰ و ۴/۰۰ گرم بر لیتر اتانول، اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که هر سه جدایه علاوه بر مصرف بیشتر قندها، توانایی مصرف قند پنج‌کربنه زایلوز را داشتند. جدایه ZYM7 توانست با مصرف زایلوز، بیش‌ترین اتانول به مقدار ۱۳/۰۰ گرم بر لیتر را تولید کند. بررسی مشخصات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک جدایه‌ها نشان داد که جدایه ZYM7 به جنس *لاکتوباسیلوس*[1] و جدایه‌های ZYM8 و ZYM9 به جنس *استوباکتر*[2] متعلق بود. همچنین، بررسی توالی ژن *16S rRNA* و رسم درخت فیلوژنی نشان داد که جدایه ZYM7، دارای ۹۹ درصد هومولوژی با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[3] و جدایه‌های ZYM8 و ZYM9 به ترتیب دارای ۹۹ و ۹۷ درصد هومولوژی با *استوباکتر پاستیوریانوس*[4] بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد باکتری‌های جدا شده، گزینه مناسبی برای تولید اتانول از مواد اولیه غنی از زایلوز هستند و می‌توانند به صنایع تخمیری معرفی شوند.

واژه‌های کلیدی: باکتری، اتانول، تخمیر، *استوباکتر*، *لاکتوباسیلوس*

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

بحران جهانی انرژی و این واقعیت که روزی سوخت‌های فسیلی تمام خواهد شد، از مهم‌ترین دغدغه‌های امروز بشر شده است. با توجه به رشد جمعیت جهان، مصرف زیاد انرژی، محدودیت منابع نفتی تامین کننده انرژی و افزایش قیمت سوخت جایگزینی یک منبع انرژی دیگر امری ضروری به شمار می‌رود (۱).

تولید اتانول از منابع ارزان قیمت به عنوان مکمل و یا حتی جایگزین سوخت‌های فسیلی، ضرورتی انکارناپذیر است (۲ و ۳). بر خلاف سوخت‌های فسیلی، اتانول سوختی پاک و تجدید پذیر بوده و به آن به عنوان یک سوخت سالم، ایمن و جایگزین توجه شده است (۴).

میکروارگانیسم‌ها قادرند با مصرف مواد طبیعی زاید و ارزان قیمت، محصولات با ارزشی نظیر سوخت‌های پاک تولید کنند (۵). بنابراین، جستجوی میکروارگانیسم‌های صنعتی و شناسایی تخمیرگرها با توانایی تولید بیشتر، از اهمیت زیادی برخوردار است. تولید جهانی اتانول بیشتر بر پایه‌ی تخمیر قندها توسط سویه‌های *ساکارومیسس سروزیه*[5] است (۶). مخمرها دارای محدودیت‌هایی هستند که به عنوان بزرگ‌ترین مانع در کاهش بهای تولید الکل به شمار می‌رود. از جمله می‌توان به طیف محدود ماده اولیه، تحمل محدود الکل و عدم توانایی آن‌ها در تخمیر انواع مواد اولیه ارزان قیمت نظیر بیشتر قندهای پنج‌کربنه اشاره کرد (۷). علاوه بر مخمرها، سویه‌های باکتریایی نظیر انواع *زایموموناس*، *باسیلوس*، *کلستریدیوم‌های ترموفیلیک*، *استوباکتر* و *لاکتوباسیلوس* توانایی تولید الکل را دارند (۸، ۹ و ۱۰). امروزه، به باکتری‌ها به علت توانایی تخمیر سریع و مصرف طیف وسیعی از سوبستراها (۱۱)، تحمل بالای اتانول (۱۲)، توانایی تولید زیاد اتانول (۱۳)، تولید کم فرآورده‌های جانبی نظیر اسیدها و گلیسرول (۱۴)، تحمل تغییرات فشار اسمزی و تحمل گرما، بیش‌تر توجه شده است (۱۵).

باکتری‌های متعلق به جنس *زایموموناس* در سال ۱۹۱۲ از فساد ناشی از آب سیب تخمیر یافته، جداسازی شدند. بعدها آن را از شیره سایر گیاهان غنی از قند تخمیر یافته نظیر شیره گیاه گوش‌خر[6] در مکزیک، شیره نخل خرما در نواحی مختلف آفریقا و آسیا و شیره نیشکر در برزیل نیز جداسازی کردند (۱۶). زایموموناس‌ها باکتری‌های میله‌ای شکل به اندازه ۱/۵-۱ میکرون، گرم منفی، بی‌هوازی، تاژه‌دار و فاقد اسپور و کپسول هستند. *زایموموناس موبیلیس*[7] گلوکز را جذب کرده و ۳ تا ۴ برابر سریع‌تر از مخمر، اتانل تولید می‌کند و محصول اتانل تا ۹۷ درصد حداکثر محاسبه تئوریک می‌رسد (۱، ۱۷ و ۱۸).

جنس *استوباکتر*، باکتری گرم‌منفی، میله‌ای شکل و هوازی است. در صورت متحرک بودن به وسیله فلاژل‌های پیرامونی حرکت می‌کند. این باکتری در کشت تازه به شکل گرم منفی و در کشت کهنه، بیشتر گرم متغییراند. کاتالاز مثبت بوده و فعالیت اکسیداتیو شدید دارند (۱۹). استوباکترها علاوه بر تولید استیک اسید، اتانول نیز تولید می‌کنند (۸). این ارگانیسم‌ها به دو گروه تقسیم می‌شود: گروه اول شامل استوباکترها با اکسایش شدید که اتانول را به طور موقت به استیک اسید تبدیل می‌کند اما دوباره آن را به اتانول احیا می‌کند. گروه دوم استوباکترها با اکسایش جزیی هستند که استیک اسید تولید شده را دوباره به اتانول تبدیل نمی‌کند و متابولیسم پایان می‌پذیرد. از گروه استوباکترها با اکسایش شدید می‌توان *استوباکتر پراکسیدانس* و

استوباکتر پاستوریانوم و از استوباکترها با اکسایش جزیی می‌توان *گلوکونوباکتر اکسیدانس* را نام برد (۲۰).

جنس *لاکتوباسیلوس* بسیار ناهمگن بوده و از نظر خواص فنوتیپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیار متنوع است. گونه‌های وحشی لاکتوباسیل‌ها از جمله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* توانایی تولید لاکتیک اسید و اتانول را تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی دارد (۱۰). باکتری‌ها از طریق مسیر متابولیکی انتنر- دودروف[۸] و توسط آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و پیروات دکربوکسیلاز، قند را به اتانل احیا می‌کنند (۲۱).

مطالعه تنوع زیستی میکروارگانیسم‌ها و جداسازی سویه‌های جدید باکتریایی با توانایی تولید بیشتر اتانول، جذاب و مهم است. همچنین، جستجوی حضور باکتری‌های تولید کننده اتانول در کنار مخمرها در تانک تخمیر، ضروری است. به این منظور، حضور این باکتری‌ها در تانک تخمیر کارخانجات الکل‌سازی بررسی شد. بررسی تاثیر عوامل مختلف محیطی و رشد نظیر: درجه حرارت، اسیدیته، غلظت اولیه سوبسترا، منبع کربن، منبع نیتروژن، زمان تخمیر و هوادهی بر باکتری‌های جداشده از اهداف دیگر این مطالعه بود.

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی و جداسازی باکتری

برای جداسازی باکتری‌های تولیدکننده اتانول، از محتویات تانک تخمیر کارخانجات الکل‌سازی بیدستان قزوین و فارکو خرمشهر نمونه‌برداری شد و در شرایط سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. دمای محفظه تانک تخمیر ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۰/۵±۶/۰ ثبت شد. برای افزایش جمعیت باکتری‌های تولید کننده اتانول، نمونه‌ها در محیط کشت اختصاصی مایع ZSM[۹] غنی‌سازی شد. این محیط کشت از مخلوط کردن ساکارز دو درصد، عصاره مخمر یک درصد، آمونیوم سولفات ۰/۲ درصد، پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۲ درصد، منیزیم سولفات ۷ آبه ۰/۰۵ درصد در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد (۲۲).

پس از تلقیح ۵ درصد از هر نمونه به محیط کشت مایع ZSM، در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. لوله‌ها از نظر تولید گاز در لوله درهام (به عنوان نشانه اولیه تولید اتانول) بررسی شدند (۲۳). سپس برای جداسازی باکتری‌های تولید کننده اتانول، به محیط کشت محتوی آگار RMA (گلوکز دو درصد، عصاره مخمر یک درصد، آمونیوم سولفات ۰/۲ درصد، پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۲ درصد، منیزیم سولفات ۷ آبه ۰/۰۵ درصد و آگار ۱/۵ درصد در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) منتقل شد (۲۴). پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری و کشت خالص باکتری‌ها برای بررسی بیشتر نگهداری شد.

سنجش تولید اتانول

برای سنجش اولیه تولید اتانول، باکتری‌های جداسازی شده از تانک تخمیر به محیط کشت مایع ZSM تلقیح و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به دو صورت بدون هوادهی و با هوادهی گرماگذاری شدند. سنجش تولید اتانول با دو روش کمی رنگ‌سنجی دی‌کرومات پتاسیم و کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی انجام شد (۲۵ و ۲۶).

در روش رنگ‌سنجی دی‌کرومات پتاسیم، اتانول تولید شده در محیط رشد تقطیر شد. سپس به یک میلی‌لیتر نمونه تقطیر شده، حجم یک میلی‌لیتر محلول دی‌کرومات پتاسیم و یک میلی‌لیتر محلول اشباع دی‌فنیل کاربازید اضافه شد. ترکیب در ۹۰ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه، تا ایجاد رنگ قرمز قهوه‌ای گرما داده شد. برای پایدار کردن رنگ، حجم یک میلی‌لیتر محلول تارتارات سدیم پتاسیم ۴۰ درصد اضافه شد. پس از خنک کردن و رساندن به دمای اتاق به کمک حمام آب سرد، میزان جذب با اسپکتروفتومتر در ۵۷۵ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت اتانول تولید شده به کمک منحنی استاندارد، سنجش شد (۲۵).

همچنین، غلظت اتانول موجود در محیط رشد با استفاده از ریزپردازنده مبتنی بر کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی[۱۰] مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله و ستون DB-5 اندازه‌گیری شد. درجه حرارت انژکتور، آشکارساز و اجاق گاز کروماتوگرافی به ترتیب بر روی ۲۰۰، ۲۱۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد (۱).

بهینه‌سازی منابع غذایی و شرایط رشد باکتری‌های جداشده

برای بهینه‌سازی شرایط مناسب رشد برای تولید اتانول، تاثیر منابع مختلف کربن و نیتروژن بررسی شد. به محیط کشت پایه RM (محیط کشت RMA بدون آگار) مقدار ۲۰ گرم بر لیتر به طور مجزا از منابع مختلف کربن شامل: گلوکز، گزیلوز، فروکتوز، مالتوز، ساکارز، ریبوز، گالاکتوز، مانوز و آرابینوز افزوده شد. همچنین، برای مطالعه تاثیر غلظت گلوکز اولیه در تولید اتانول، از غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم بر لیتر استفاده شد. بهینه‌سازی منبع نیتروژن محیط رشد با افزودن عصاره مخمر، پپتون، سیستئین، سولفات آمونیوم، آلانین، آرژنین و تریپتوفان مطالعه شد. مقدار ۱۰ گرم بر لیتر منبع نیتروژن به شکل مجزا به محیط کشت پایه RM اضافه شد.

همچنین، تاثیر عوامل محیطی شامل: دما (درجه حرارت ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد)، اسیدیته (۲، ۴، ۶ و ۸)، زمان تخمیر (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) و هوادهی (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ دور در دقیقه) بر تولید اتانول، بررسی شد. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد.

شناسایی باکتری‌های جدا شده تولید کننده اتانول

برای شناسایی باکتری‌های جداشده، صفات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی بررسی شد. پس از رنگ‌آمیزی گرم، شکل باکتری‌ها و واکنش گرم آن‌ها مطالعه شد. همچنین، فعالیت کاتالازی و اکسیدازی، تولید اندول، مصرف گلوکز از مسیر تخمیر اسیدهای مخلوط (متیل‌رِد[۱۱] MR) یا مسیر تخمیر بوتاندیول (وژزپروسکوئر[۱۲] VP) و حرکت باکتری مطابق جداول شناسایی کتاب سیستماتیک باکتریولوژی بِرگی، بررسی شد (۲۷). تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند.

استخراج نوکلئیک اسید، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *16S rRNA* و رسم درخت فیلوژنی

برای استخراج DNA باکتری‌ها از روش دست‌ورزی شده استخراج DNA پیشنهاد شده توسط استفِنت[۱۳] در سال ۱۹۹۶ استفاده شد (۲۸). ابتدا دیواره سلولی باکتری‌ها با دترجنت هگزادسیل‌تری‌متیل‌آمونیوم بروماید[۱۴] متلاشی شد. سپس از محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) برای حذف پروتئین‌ها و قندها استفاده شد. برای رسوب نوکلئیک اسید از محلول نمکی پلی اتیلن گلیکول و نیز برای شستشو و حذف سایر ناخالصی‌ها از اتانول خالص استفاده شد. درستی استخراج نوکلئیک‌اسید، با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید بررسی شد (۲۹).

برای تکثیر ژن *16S rRNA* از پرایمرهای عمومی (PA 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و (PH 5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′) استفاده شد (۳۰). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با این روش انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر شامل: ۳۵ تکرار با دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای اتصال ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۰/۵ دقیقه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه بود. پس از اتمام چرخه‌ها و به منظور تکمیل نهایی ساختار DNA تکثیر شده، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد تحلیل شد. محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص GeneJetPCR[۱۵] خالص‌سازی شد. سپس توالی ژن *16S rRNA* توسط شرکت GATC آلمان تعیین شد. نتایج توالی نوکلئوتیدها به کمک نرم افزار Chromas Lite (نسخه ۲/۰۱) دوباره بررسی شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن *16S rRNA* جدایه‌های تولیدکننده اتانول به کمک BLAST با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنومی GenBank و EzTaxon-e مقایسه شد (۳۱). به این ترتیب نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف *16S rRNA* جدایه‌ها، تعیین شد. همچنین، توالی بدست آمده در این پژوهش، در بانک ژنی NCBI ثبت شد و شماره ژنی[۱۶] مربوطه دریافت شد.

تحلیل فیلوژنی باکتری‌های تولیدکننده اتانول با باکتری‌های نزدیک به آن‌ها با نرم‌افزار ClustalX (نسخه ۲) انجام شد. درخت فیلوژنی توالی ژن *16S rRNA* جدایه‌های ZYM7، ZYM8 و ZYM9 با توالی حاصل از جستجو در پایگاه اطلاعاتی Genbank و EzTaxon-e، به کمک نرم‌افزار MEGA (نسخه ۵) و با الگوریتم Maximum likelihood و Neighbour joining، رسم شد. بررسی اعتبار شاخه با الگوریتم bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری انجام شد.

نتایج

شمارش باکتری‌های تولید کننده اتانول به روش شمارش سلول‌های زنده انجام شد. نتایج نشان داد که تعداد این باکتری‌ها در تانک تخمیر شرکت فارکو خرمشهر و شرکت بیدستان قزوین به ترتیب $cfu\ mL^{-1}$ $۲/۲\times۱۰^{۳}$ و $۱/۵\times۱۰^{۶}$ بود. از نمونه‌های جمع‌آوری شده از تانک‌های تخمیر، تعداد سه جدایه باکتریایی تولید کننده اتانول، جداسازی و به اسامی جدایه‌های ZYM7، ZYM8 و ZYM9 نام‌گذاری شد. سنجش اولیه تولید اتانول توسط باکتری‌های جداسازی شده از تانک تخمیر در محیط کشت مایع ZSM بررسی و تولید اتانول با دو روش کمی رنگ‌سنجی دی‌کرومات پتاسیم و کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی سنجش شد. اتانول تولید شده توسط جدایه‌های ZYM7، ZYM8 و ZYM9 (پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری) به ترتیب ۵/۰۰، ۷/۶۰ و ۴/۰۰ گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد.

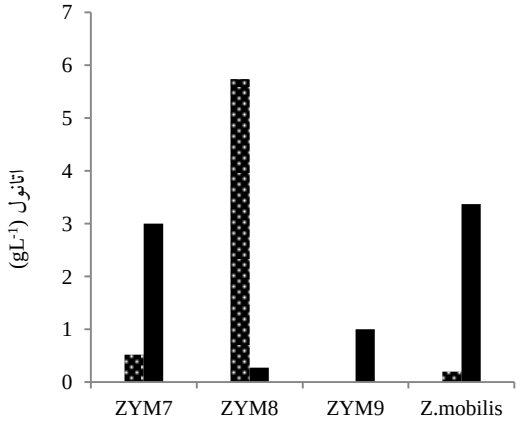
برای تولید بیشتر اتانول، شرایط مناسب رشد جدایه‌ها بهینه‌سازی شد. به این منظور تاثیر منابع مختلف کربن شامل: گلوکز، گزیلوز، فروکتوز، مالتوز، ساکارز، ریبوز، گالاکتوز، مانوز و آرابینوز بر تولید اتانول بررسی شد. نتایج تولید اتانول در جدول ۱ نشان می‌دهد که هر سه جدایه علاوه بر مصرف بیشتر قندها، توانایی مصرف قند پنج کربنه زایلوز را داشتند. جدایه ZYM7 توانست با مصرف زایلوز، بیش‌ترین اتانول به مقدار ۱۳/۰۰ گرم بر لیتر را تولید کند. همچنین، همه جدایه‌ها، توانایی

مصرف مالتوز را نداشتند (داده‌ها نشان داده نشد). تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر تولید اتانول توسط جدایه‌ها نیز مطالعه شد. نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد بهترین منبع نیتروژن برای جدایه ZYM8، آلانین (۹/۰۳ گرم بر لیتر اتانول) بود در حالی که برای جدایه‌های ZYM7 و ZYM9 پپتون (به ترتیب ۷/۹۰ و ۳/۵۵ گرم بر لیتر اتانول) به عنوان مناسب‌ترین منبع نیتروژن بود.

جدول ۱- تاثیر منابع کربن و نیتروژن بر تولید اتانول (گرم بر لیتر)

جدایه‌ها	منبع نیتروژن		منبع کربن	
ZYM7	سیستئین	۱/۶۲	فروکتوز	۶/۰۰
	آلانین	صفر	ساکارز	۴/۰۰
	آرژنین	۵/۰۰	گلوکز	۵/۳۰
	تریپتوفان	صفر	آرابینوز	۱/۴۶
	آمونیوم سولفات	صفر	زایلوز	۱۳/۰۰
	پپتون	۷/۹۰	مانوز	صفر
	عصاره مخمر	صفر	ریبوز	۱/۶۶
ZYM8	منبع نیتروژن	صفر	فروکتوز	۵/۰۴
	سیستئین	۹/۰۳	ساکارز	۷/۰۰
	آلانین	صفر	گلوکز	۷/۶۰
	آرژنین	صفر	آرابینوز	صفر
	تریپتوفان	صفر	زایلوز	۱۱/۶۶
	آمونیوم سولفات	۳/۹۵	مانوز	صفر
	پپتون	صفر	ریبوز	۱/۶۶
ZYM9	منبع نیتروژن	صفر	فروکتوز	۴/۰۵
	سیستئین	صفر	ساکارز	۴/۰۰
	آلانین	صفر	گلوکز	۳/۶۰
	آرژنین	صفر	آرابینوز	۰/۱۵
	تریپتوفان	۲/۳۷	زایلوز	۱۰/۰۰
	آمونیوم سولفات	۳/۵۵	مانوز	۰/۳۴
	پپتون	۲/۶۰	ریبوز	صفر

بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه‌ها با بررسی تاثیر عوامل مختلف محیطی شامل: دما، اسیدیته، زمان تخمیر و هوادهی محیط رشد برتولید اتانول انجام شد. تاثیر دما بر رشد و تولید اتانول جدایه‌ها بررسی و نتایج در جدول۲ خلاصه شد. نتایج نشان داد که بهترین دما برای رشد و تولید اتانول توسط باکتری‌های جداشده، ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است (شکل ۱). بیش‌ترین تولید اتانول توسط جدایه ZYM7 و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۵/۷۴ گرم بر لیتر اتانول سنجش شد. همچنین، هر سه جدایه توانایی تولید اتانول در دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد را نداشتند.



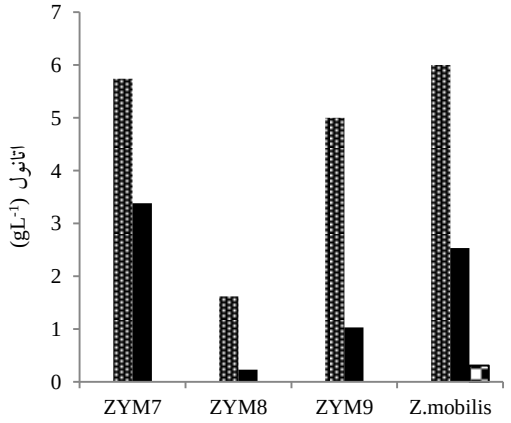
شکل۱- نمودار تاثیر دمای رشد بر تولید اتانول توسط جدایه‌های باکتریایی

▒: ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ ■: ۳۰ درجه سانتی‌گراد

▩: ۳۵ درجه سانتی‌گراد؛ ▦: ۴۰ درجه سانتی‌گراد

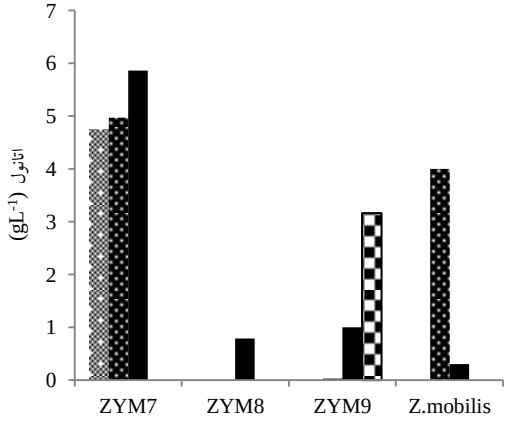
برای بررسی تاثیر زمان بر شرایط بهینه تخمیر، تولید اتانول در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی شد. نتایج در جدول ۲ نشان می‌دهد که بهترین زمان برای رشد و تولید اتانول باکتری‌های جداشده ۴۸ ساعت بود و بیش‌ترین اتانول به مقدار ۵/۷۴ گرم بر لیتر، توسط جدایه ZYM7 تولید شد (شکل ۲).

همچنین، برای بررسی شرایط بهینه اسیدیته، تولید اتانول در اسیدیته مختلف ۲، ۴، ۶ و ۸ سنجش شد. اسیدیته بهینه برای رشد و تولید اتانول باکتری‌های جداشده، ۶ بود و بیش‌ترین اتانول توسط ZYM7 به مقدار ۵/۷۶ گرم بر لیتر تولید شد (شکل ۳).



شکل۲- نمودار تاثیر زمان تخمیر بر تولید اتانول توسط باکتری‌های جداشده

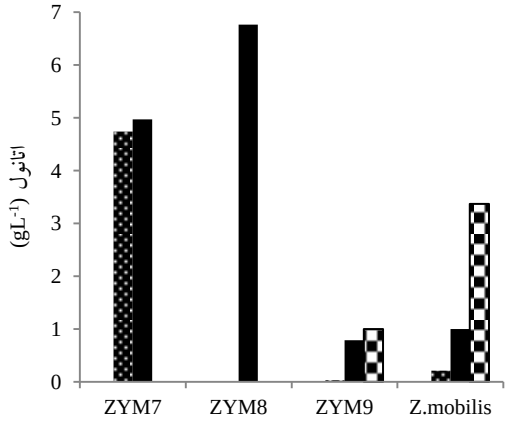
▒: ۲۴ ساعت؛ ■: ۴۸ ساعت؛ ▩: ۷۲ ساعت؛ ▨: ۹۶ ساعت



شکل۳- نمودار تاثیر اسیدیته محیط رشد بر تولید اتانول توسط باکتری‌های جداشده

▒: اسیدیته ۲؛ ■: اسیدیته ۴؛ ▩: اسیدیته ۶؛ ▨: اسیدیته ۸.

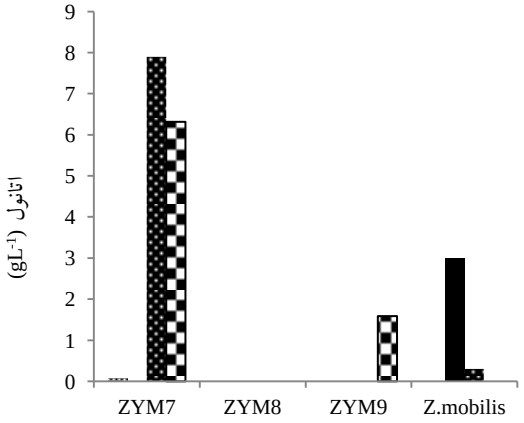
برای بررسی تاثیر غلظت سوبسترا محیط رشد بر فرآیند تولید اتانول، غلظت مختلف قند گلوکز به محیط کشت افزوده و تولید اتانول سنجیده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری‌های جداشده توانایی استفاده از دو درصد قند گلوکز را داشتند (شکل ۴). بیش‌ترین اتانول در غلظت ۱/۵ درصد قند گلوکز و توسط جدایه ZYM8 به مقدار ۶/۶۷ گرم بر لیتر، تولید شد (جدول ۲).



شکل۴- نمودار تاثیر غلظت گلوکز اولیه (سوبسترا) بر تولید اتانول توسط باکتری‌های جداشده

▒: ۵ گرم؛ ■: ۱۰ گرم؛ ▩: ۱۵ گرم؛ ▨: ۲۰ گرم گلوکز (گرم‌بر لیتر)

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد علیرغم تولید اتانول در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی توسط جدایه‌های ZYM7 و ZYM9، هوادهی تاثیر بسزایی بر تولید اتانول داشت. بیش‌ترین اتانول در هوادهی ۱۵۰ دور در دقیقه و توسط ZYM7 به مقدار ۵/۷۴ گرم بر لیتر، تولید شد (جدول ۲). در مقابل کاهش هوادهی به مقدار ۵۰ دور در دقیقه و یا افزایش آن به مقدار ۲۰۰ دور در دقیقه، کاهش تولید اتانول را نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵- نمودار تاثیر هوادهی بر تولید اتانول توسط باکتری‌های جداشده

▒: ۵۰؛ ■: ۱۰۰؛ ▩: ۱۵۰؛ ▨: ۲۰۰ (دور در دقیقه)

جدول ۲- تاثیر عوامل مختلف محیطی بر تولید اتانول (گرم بر لیتر) جدایه‌ها

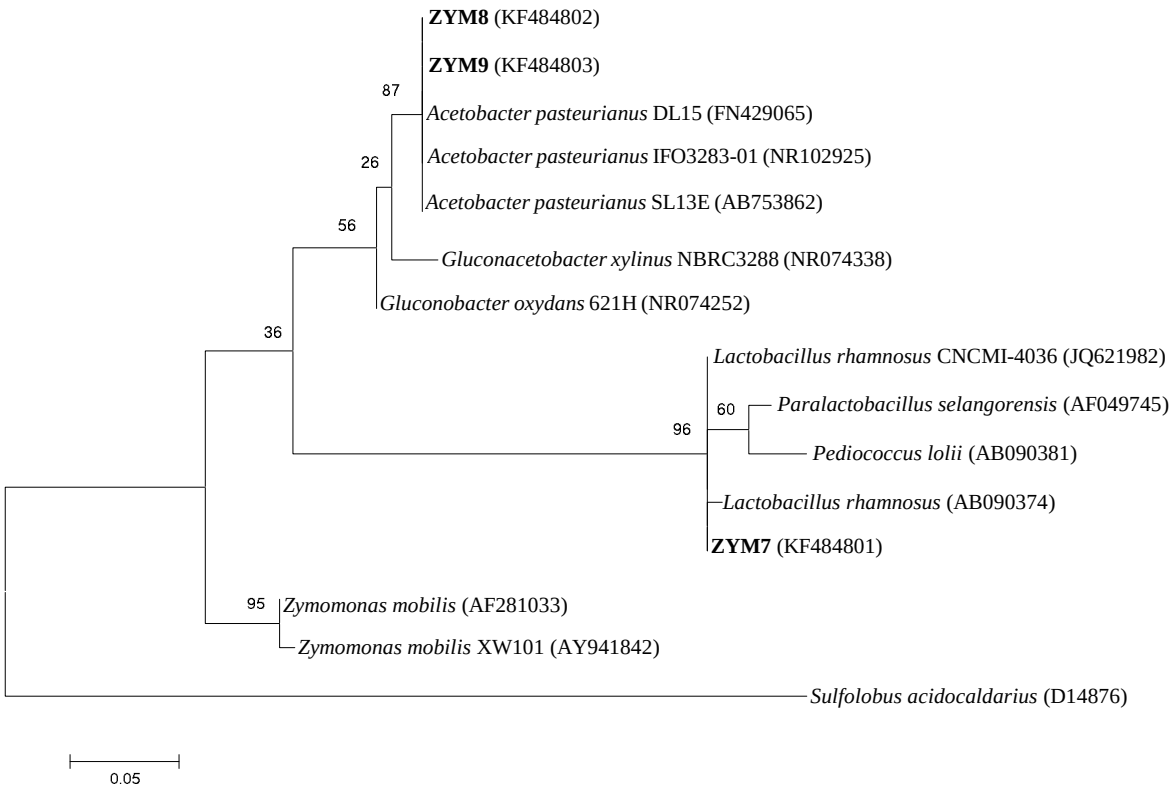
جدایه	هوادهی		غلظت گلوکز		دما		اسیدیته		زمان	
	دور در دقیقه	اتانول	گرم بر لیتر	اتانول	درجه سانتی‌گراد	اتانول	اسیدیته	اتانول	ساعت	اتانول
ZYM7	۵۰	۰/۰۷	۵	صفر	۲۵	صفر	۲	۴/۷۴	۲۴	صفر
	۱۰۰	صفر	۱۰	۴/۷۴	۳۰	۰/۵۲	۴	۴/۹۷	۴۸	۵/۷۴
	۱۵۰	۷/۹۰	۱۵	۴/۹۷	۳۵	۳/۰۰	۶	۵/۸۶	۷۲	۳/۳۸
	۲۰۰	۶/۳۲	۲۰	صفر	۴۰	صفر	۸	صفر	۹۶	صفر
ZYM8	۵۰	صفر	۵	صفر	۲۵	صفر	۲	صفر	۲۴	صفر
	۱۰۰	صفر	۱۰	صفر	۳۰	۵/۷۴	۴	صفر	۴۸	۱/۶۲
	۱۵۰	صفر	۱۵	۶/۷۶	۳۵	۰/۲۷	۶	۰/۷۹	۷۲	۰/۲۳
	۲۰۰	صفر	۲۰	صفر	۴۰	صفر	۸	صفر	۹۶	صفر
ZYM9	۵۰	صفر	۵	صفر	۲۵	صفر	۲	صفر	۲۴	صفر
	۱۰۰	صفر	۱۰	۰/۰۳	۳۰	صفر	۴	۰/۰۳	۴۸	۵/۰۰
	۱۵۰	۱/۵۹	۱۵	۰/۷۹	۳۵	۱/۰۰	۶	۱/۰۰	۷۲	۱/۰۳
	۲۰۰	۱/۵۸	۲۰	۱/۰۰	۴۰	صفر	۸	۳/۱۶	۹۶	صفر
Z. mobilis	۵۰	صفر	۵	صفر	۲۵	صفر	۲	صفر	۲۴	صفر
	۱۰۰	۳/۰۰	۱۰	۰/۲۱	۳۰	۰/۲۰	۴	۴/۰۰	۴۸	۶/۰۰
	۱۵۰	۰/۳۰	۱۵	۱/۰۰	۳۵	۳/۳۷	۶	۰/۳۰	۷۲	۲/۵۳
	۲۰۰	صفر	۲۰	۳/۳۷	۴۰	صفر	۸	صفر	۹۶	۰/۳۱

برای شناسایی جدایه‌های تولیدکننده اتانول، ویژگی‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها از نظر مشخصات کلونی، رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل: تولید کاتالاز، اکسیداز، اندول، حرکت و نیز آزمون‌های متیل رِد و وژزپروسکوئر، بررسی شد. ریخت‌شناسی کلونی جدایه‌های ZYM8 و ZYM9 به شکل کرم، شفاف، براق، نرم و نیز به شکل موکوئیدی بود. برخی نیز دارای کلونی‌های کرم مایل به سفید بودند (ZYM7). ویژگی ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی جدایه‌های تولیدکننده در جدول ۳ خلاصه شده است. نتایج مشخصات ریخت‌شناسی و آزمون‌های بیوشیمیایی بر اساس جداول شناسایی کتاب سیستماتیک باکتریولوژی بِرگی[17] (۲۷) نشان داد که جدایه ZYM7 به جنس *لاکتوباسیلوس* و هر دو جدایه ZYM8 و ZMY9 به جنس *استوباکتر* متعلق اند.

جدول ۳- مشخصات ریخت‌شناسی و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی سه جدایه تولیدکننده اتانول

جدایه	Accession No.	ریخت‌شناسی، واکنش گرم	آزمون‌های بیوشیمیایی												
			VP	MR	حرکت	اندول	اکسیداز	کاتالاز	تخمیر قند						
									گلوکز	فروکتوز	آرابینوز	زایلوز	مانوز	ریبوز	ساکارز
ZYM7	KF484801	میله‌ای، گرم مثبت	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−	+	+
ZYM8	KF484802	میله‌ای، گرم منفی	−	−	+	−	−	+	+	+	−	+	−	+	+
ZYM9	KF484803	میله‌ای، گرم منفی	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	+

شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از توالی ژن *16S rRNA* بررسی شد. به این منظور واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *16S rRNA* انجام شد. پس از تعیین توالی، هومولوژی ژن *16S rRNA* باکتری‌های تولید کننده اتانول با سایر توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI و EzTaxon-e، تعیین شد. نتایج BLAST نشان داد که جدایه ZYM7 دارای ۹۹ درصد هومولوژی با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[۱۸] بود. همچنین، جدایه‌های ZYM8 و ZYM9 به ترتیب ۹۹ و ۹۷ درصد هومولوژی با *استویاکتر پاستیوریانوس*[۱۹] را نشان داد. توالی ژن *16S rRNA* باکتری‌های مشابه و جدایه‌ها به کمک نرم‌افزار ClustalX، هم‌ردیف‌سازی شد و درخت فیلوژنی آن به روش Neighbor joining و به کمک نرم افزار Mega5 رسم شد. موقعیت فیلوژنی جدایه‌ها با سایر باکتری‌ها در شکل ۶ نشان داده شد. توالی ژن *16S rRNA* جدایه‌های ZYM7، ZYM8 و ZYM9 نیز در بانک ژنی NCBI به ترتیب به شماره ژنی KF484801، KF484802 و KF484803 ثبت شد.



شکل ۶- دندوگرام توالی ژن *16S rRNA* باکتری‌های تولیدکننده اتانول ZYM7 که به جنس *لاکتوباسیلوس* و ZYM8 و ZYM9 به جنس *استوباکتر* نزدیکی نشان داد. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. باکتری *Sulfolobus acidocaldarius* به عنوان out group قرار داده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

تولید جهانی اتانول بیشتر بر پایه تخمیر قندها توسط مخمرهاست. مخمرها علاوه بر این ویژگی فیزیولوژیکی، به علت رشد سریع در اسیدیته پایین و نیاز غذایی ساده، برای تولید اتانول مناسب اند ولی محدودیت‌هایی نظیر طیف محدود ماده اولیه و تحمل محدود الکل دارند. همچنین، عدم توانایی آن‌ها در تخمیر انواع مواد اولیه ارزان قیمت نظیر بیشتر قندهای پنج کربنه، بزرگ‌ترین مانع در کاهش بهای تولید الکل است. بنابراین، جستجوی میکروارگانیسم‌های صنعتی و شناسایی تخمیرگرها با توانایی تولید بیشتر برای جایگزینی مخمرها در صنعت، از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش، نتایج بررسی تانک‌های تخمیر بر پایه تخمیرگر *ساکارومیسس سرویزیه*، نشان از حضور باکتری‌های تولید کننده اتانول داشت. نتایج شمارش باکتری‌های زنده تولید کننده اتانول دلالت بر فعالیت مشترک باکتری‌ها و مخمرهای تولیدکننده اتانول در تانک تخمیر دارد. مطالعات انجام شده در سال ۱۹۹۶ نشان داد که تولید اتانول توسط کشت مخلوط *س. سرویزیه* و *ز. موبیلیس* نسبت به کشت مجزا این ارگانیسم‌ها، افزایش چشمگیری داشت (۳۲). نمونه‌های جمع‌آوری شده از تانک‌های تخمیر، تعداد سه جدایه باکتریایی تولید کننده اتانول، جداسازی شد. نتایج گویای تولید اتانول توسط باکتری‌های جدا شده از تانک تخمیر در محیط کشت مایع ZSM بود.

برای تولید اتانول بیشتر، شرایط مناسب رشد جدایه‌ها بهینه‌سازی شد. به این منظور تاثیر منابع مختلف کربن شامل: گلوکز، گزیلوز، فروکتوز، مالتوز، ساکارز، ریبوز، گالاکتوز، مانوز و آرابینوز، بر تولید اتانول بررسی شد. نتایج تولید اتانول در جدول ۱ نشان می‌دهد که هر سه جدایه علاوه بر مصرف بیشتر قندها، توانایی مصرف قند پنج کربنه زایلوز را داشتند. مخمرها به ویژه مخمر *س. سرویزیه* به علت فقدان سیستم‌های فیزیولوژیک لازم، قادر به مصرف قندهای پنج‌کربنه از جمله زایلوز نیست (۳۳). اما حمیدی مطلق و همکاران[۲۰] در سال ۱۳۸۸ جدایه‌های مخمر با توانایی مصرف قند دی-زایلوز را گزارش دادند (۲۵). در راستای نتایج حاصل از مطالعه حاضر، در سال ۱۹۷۷ نیز گزارش شد که *ز. موبیلیس* توانایی مصرف قند پنج کربنه برای تولید اتانول را نشان داد (۲۲). توده‌ها و پس‌مانده‌های لیگنوسلولزی و گیاهی، مهم‌ترین، ارزان‌ترین و در دسترس‌ترین منابع برای تولید اتانول با استفاده از تخمیر میکروبی می‌باشند. توده لیگنوسلولزی گیاهان حاوی سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است. بخش همی‌سلولزی که ۳۵ درصد از وزن خشک گیاهان چوبی و نهاندانگان را شامل می‌شود، بیشتر از پلیمر زایلان تشکیل شده که حاوی مونومرهای دی-زایلوز است (۳۴). همچنین، تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر تولید اتانول توسط جدایه‌ها مطالعه شد. نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد بهترین منبع نیتروژن برای جدایه ZYM8، آلانین بود در حالی که برای جدایه‌های ZYM7 و ZYM9، پپتون به عنوان مناسب‌ترین منبع نیتروژن بود. در مطالعات مشابهی توسط سیدصیام‌دوست و همکارانش[۲۱]، تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر تولید اتانول توسط سویه‌های مختلف مخمر انجام شد (۵).

بهینه‌سازی دما به علت تاثیر زیاد آن بر رشد و غیرفعال‌سازی باکتری‌ها، یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تخمیر محسوب می‌شود. غیر فعال شدن باکتری‌ها می‌تواند ناشی از تاثیر دما بر دیواره سلولی باکتری و یا دناتوره شدن آنزیم‌های آن باشد (۳۵). در مطالعه حاضر،

تاثیر دما بر رشد و تولید اتانول جدایه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که بهترین دما برای رشد و تولید اتانول توسط باکتری‌های جداشده، ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۲). اما هر سه جدایه توانایی تولید اتانول در دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد را نداشتند. در راستای نتایج حاصل از مطالعه حاضر، در سال ۲۰۰۱ نیز گزارش شد که بیش‌ترین تولید اتانول و مصرف قند توسط باکتری *ز. موبیلیس*، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود و نیز افزایش دما، تاثیر بسزایی بر کاهش تولید اتانول داشت (۳۶). کاهش فسفولیپیدهای غشایی در دمای بالا (۴۱ درجه سانتی‌گراد)، بر رشد سلول‌ها تاثیر گذاشته و موجب کاهش تولید اتانول می‌شود (۳۷).

عامل مهم دیگر در فرآیند تولید اتانول، غلظت قند استفاده شده به عنوان سوبسترا در محیط رشد است. بر اساس مطالعات انجام شده، تولید بالای اتانول به علت مهار شدن رشد میکروارگانیسم‌ها توسط غلظت بالای قند، محدود می‌شود (۳۸). در این گزارش علت مهار رشد مخمر، ایجاد فشار اسمزی بالا و متعاقب آن خروج آب از داخل سلول‌ها، بیان شد. همچنین، در تحقیقی مشابه اثر مهارکنندگی سوبسترا بر توانایی تخمیر مخمرها نشان داد که این پدیده بیشتر در غلظت ۱۵ درصد قند و بالاتر رخ می‌دهد (۳۹). از این‌رو می‌توان اظهار کرد که بین افزایش مقاومت به قند محیط رشد و افزایش تولید اتانول، ارتباط مستقیم وجود دارد. در پژوهش حاضر، باکتری‌های جداشده توانایی استفاده از دو درصد قند را داشت اما بیش‌ترین اتانول در حضور ۱/۵ درصد قند، تولید شد (شکل ۴). همچنین، هوادهی از دیگر عوامل تنظیم و کنترل تولید اتانول در باکتری‌هاست. اتانول محصول اصلی و نهایی مسیر گلیکولیز در شرایط بی‌هوازی و در اکثر مخمرهاست (۲۵). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که باکتری‌های جداشده از تانک‌های تخمیر توانایی تولید اتانول را در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی دارا بودند. البته نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که هوادهی تاثیر بسزایی بر تولید اتانول توسط جدایه‌ها داشت به طوری که بیش‌ترین اتانول در هوادهی ۱۵۰ دور در دقیقه و توسط ZYM7، تولید شد. در مقابل کاهش هوادهی به مقدار ۵۰ دور در دقیقه و یا افزایش آن به مقدار ۲۰۰ دور در دقیقه، موجب کاهش تولید اتانول شد (شکل ۵). در هوادهی ۵۰ دور در دقیقه ، توده سلولی نیز کاهش می‌یابد که گویای کاهش توانایی رشد است و به همین دلیل اتانول کمتری تولید می‌شود. بعلاوه هوادهی بالا با دور ۲۰۰،گرچه توده سلولی را افزایش می‌دهد اما در حضور اکسیژن بالا، سلول‌ها به سمت مسیر اکسیداتیو تمایل داشته و در نتیجه توانایی تخمیر کاهش می‌یابد (۴۰).

بررسی مشخصات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و نیز تحلیل توالی ژن *16S rRNA* باکتری‌های جداشده این تحقیق نشان داد که جدایه‌ها متعلق به جنس‌های *استوباکتر* و *لاکتوباسیلوس* بودند. استوباکترها علاوه بر تولید استیک اسید، اتانول نیز تولید می‌کنند (۸). این ارگانیسم‌ها به دو گروه شامل: استوباکترها با اکسایش شدید که اتانول را به طور موقت به استیک اسید تبدیل می‌کند اما مجددا آنرا به اتانول احیا می‌کند و گروه دوم استوباکترها با اکسایش جزیی که قادر به تبدیل مجدد استیک اسید تولید شده به اتانول نبوده و متابولیسم پایان می‌پذیرد. به نظر می‌رسد جدایه‌های ZYM8 و ZYM9 متعلق به گروه استوباکترها با اکسایش شدید باشد (۲۰). همچنین، جنس *لاکتوباسیلوس* بسیار ناهمگن و متنوع بوده و گونه‌های وحشی از جمله *لاکتوباسیلوس*

پلانتاروم، توانایی تولید لاکتیک اسید و اتانول را تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی داراست (۱۰).

میکروارگانیسم‌ها قادرند با مصرف مواد طبیعی زاید و ارزان قیمت، محصولات با ارزشی نظیر سوخت‌های پاک از جمله اتانول تولید کنند. بنابراین، جستجوی میکروارگانیسم‌های صنعتی و شناسایی تخمیرگرها با توانایی تولید بیشتر، اهمیت زیادی دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که همه جدایه‌ها توانایی تولید اتانول را داشتند. همچنین، توانایی مصرف قند پنج‌کربنه زایلوز و تولید اتانول بالا توسط این جدایه‌ها، از جمله مزیت این باکتری‌ها برای تولید اتانول از منابع ارزان قیمت گیاهی به شمار می‌آید. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد باکتری‌های جدا شده از تانک تخمیر، گزینه مناسبی برای تولید اتانول است. بنابراین، مطالعه بیشتر برای استفاده از این جدایه‌های باکتریایی به طور مجزا و یا به شکل کشت مخلوط با مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* در تانک تخمیر صنایع الکل‌سازی، پیشنهاد می‌شود.

References

(1) Panesar PS, Marwaha SS, Kennedy JF. Comparison of ethanol and temperature tolerance of *Zymomonas mobilis* strain in glucose and molasses medium. *Indian Journal of Biotechnology* 2006; 6 (1): 74-7.

(2) Kim S, Dale BE. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 2004; 26 (4): 361-75.

(3) Demirbas A. Biofuels securing the planets future energy needs. *Energy Conversion and Management* 2009; 50 (9): 2239-49.

(4) Onsoy T, Thanonkeo P, Thanonkeo S, Yamada M. Ethanol production from Jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. *Science Technology Journal* 2007; 7 (1): 55-60.

(5) Seyed Siamdost E. Malekzadeh F. Falahian F. Mozafari N. Razavi M. Isolation and physiological characteristics of yeasts and selection of superior strains for the production of ethanol for fuel. *Journal of Sciences, Islamic Azad University* 2010; 78 (1): 75-86.

(6) Osman YA, Ingram LO. *Zymomonas mobilis* mutants with an increased rate of alcohol production. *Applied and Environmental Microbiology* 1987; 53 (7): 1425-32.

(7) Sedlak M, Ho NW. Production of ethanol from cellulosic biomass hydrolysates using genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of cofermenting glucose and xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2004; 114 (13): 403-16.

(8) Prieto C, Jara C, Mas A, Romero J. Application of molecular methods for analyzing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 115 (3): 345-55.

(9) Skotnicki ML, Lee KJ, Tribe DE, Rogers PL. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 1981; 41 (4): 889-93.

(10) Smetankova J, Hladikova Z, Valach F, Zimanova M. Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of *Lactobacillus plantarum*. *Acta Chimica Slovaca* 2012; 5 (2): 204-10.

(11) Gunasekaran P, Krunakaran T, Kamini NR, Mukundan AG. Current status and prospects of an ethanol producer, *Zymomonas mobilis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1990; 30 (1): 107-33.

(12) Rogers PL, Lee KJ, Skotnicki ML, Tribe DE. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 1982; 23 (2): 37-84.

(13) Yamashita Y, Kurosumi A, Sasaki C, Nakamura Y. Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Engineering Journal* 2008; 42 (3): 314-19.

(14) Rogers PL, Lee KJ, Tribe DE. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. *Biotechnology Letters* 1979; 1 (4): 165-70.

(15) Rogers PL, Joachimsthal EL, Haggett KD. Ethanol from lignocellulosics: potential for a *Zymomonas*-based process. *Australasian Biotechnology* 1997; 7 (4): 304-09.

(16) Claassen PAM, Van Lier JB, Lopez Contreras AM, Van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999; 52 (6): 741-55.

(17) Remize F, Roustan JL, Sablayrolles JM, Barre P, Dequin S. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Applied and Environmental M*icrobiology 1999; 65 (1):143-9.

(18) Saigal D. Yeast strain development for ethanol production. *Indian Journal Microbial* 1993; 33 (4): 159-68.

(19) Kanchanarach W, Theeragool G. Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and their quinoportein alcohol dehydrogenase. *Applied Microbial Biotechnology* 2010; 85 (3): 741-51.

(20) Kadere TT, Miyamoto T, Oniang RK, Kutima PM, Njoroge SM. Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7 (16): 2963-71.

(21) Conway T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Letters* 1992; 103 (1): 1-27.

(22) Swings J, De Ley J. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews* 1977; 41 (1): 1-46.

(23) Dung NTP, Thanonkeo P, Phong HX. Screening Useful Isolated Yeasts for Ethanol Fermentation at High Temperature. *International Journal of Applied Science and Technology* 2012; 2 (4): 65-71.

(24) Dennis R, Young T. A simple rapid method for the detection of subspecies of *Z. mobilis*. *Journal of Bacteriology* 1982; 88 (1): 25-9.

(25) Hamidi Motlagh R, Nahvi I, Emtiazi G, Ghezelbash GH. Isolation and Identification of Ethanol Producer Yeasts from D-Xylose. *Iranian Journal of Biology* 2009; 22 (1): 1-17.

(26) Grootjen DRJ, Meijlink LHM, Van derlans RGJM, Luyben KChAM. Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipites* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 1990; 12 (11): 860-64.

(27) Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed., volume 2, USA: Springer; 2004.

(28) Stephen JR, McCaig AE, Smith Z, Prosser JI, Embley TM. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62 (11): 4147–54.

(29) Sambrook J, Russell DW. The condensed protocols from molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.

(30) Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 1989; 17 (19): 7843-53.

(31) Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, *et al.* Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic *16S rRNA* gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2012; 62 (3): 716-21.

(32) Kunduru MR, Pometto AL. Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *Journal Industry Microbial* 1996; 16 (4): 249-56.

(33) Torbjon L, Babel H. Fermentation of lignocellulose hydrolysates with yeast and xylose isomerase. *Enzyme and Microbial Technology* 1989; 11 (9): 583-9.

(34) Taherzadeh MJ, Karimi K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials. *BioResources* 2007; 2 (4): 707-38.

(35) Panesar PS, Marwaha SS, Rai R. Evaluation of ethanol production potential of *Zymomonas mobilis* strains, *Asian Journal Microbial Biotechnology Environment Science* 2000; 2 (2): 15-19.

(36) Panesar PS, Marwaha SS, Gill SS, Rai R. Screening of *Zymomonas mobilis* strains for ethanol production from molasses medium. *Indian Journal of Microbiology* 2001; 41 (3): 187-9.

(37) Lee KJ, Scotinicki ML, Tribe DE, Rogers PL. The effects of temperature on the kinetics of ethanol production by strains of *Zymomonas mobilis*, *Biotechnology Letter* 1981; 3 (6): 291-6.

(38) Cazetta ML, Celligoi MAPC, Buzato JB, Scarmino IS. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effect of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology* 2007; 98 (15): 2824-28.

(39) Hahn-Hagerdal B, Linden T, Senac T, Skoog K. Ethanolic fermentation of pentoses in lignocellulos hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1991; 28 (1): 131-44.

(40) Carlsen HN, Degn H, Lloyd D. Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspension of baker's yeast. *Journal of General Microbiology* 1991; 137 (12): 2839-83.

---

[1]. *Lactobacillus* sp.
[2]. *Acetobacter* sp.
[3]. *Lactobacillus rhamnosus*
[4]. *Acetobacter pasteurianus*
[5]. *Saccharomyces cerevisiae*
[6]. Agave
[7]. *Zymomonas mobilis*
[8]. Entner- Doudoroff pathway
[9]. Zymomonas Sucrose Medium
[10]. GC-Mass
[11]. Methyl Red
[12]. Voges-Proskauer
[13]. Stephenet
[14]. CTAB
[15]. Thermo Scientific, Lithuania
[16]. Accession Number
[17]. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
[18]. *Lactobacillus rhamnosus*
[19]. *Acetobacter pasteurianus*
[20]. Hamidi Motlagh *et al*
[21]. Seyed Siamdost

Isolation, identification and optimization of ethanol producing bacteria from *Saccharomyces*-based fermentation process of alcohol industries in Iran

Mojtaba Mohseni *
Assistant Professor of Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran, m.mohseni@umz.ac.ir
Hoda Ebrahimi
M.Sc. of Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran, h.ebrahimi@stu.umz.ac.ir

Abstract

Introduction: Due to the vast growth of world population, consumption of a lot of energy, limited energy supply and rising prices of fuel oil in the future, other alternative energy source is essential. Ethanol is renewable and a safe fuel and it is mainly based on microbial fermentation. The purpose of this study was isolation of high ethanol producing bacteria from the fermentation process of alcohol industries and optimization of growth conditions to be introduced to the industries.

Materials and methods: The samples that were collected from fermentation tanks of alcohol industries were enriched in ZSM medium. To isolate the ethanol producing bacteria, the enriched culture was transferred on RMA agar. Bacterial growth conditions and their effects on ethanol production were optimized based on pH, growth temperature, agitation, fermentation time, initial substrate concentration and carbon and nitrogen sources. In addition, the morphological, physiological and molecular characterizations were investigated for identification of the isolates.

Results: Three bacterial isolates ZYM7, ZYM8 and ZYM9 were isolated from fermentation tank. All isolates were able to produce ethanol 5.00, 7.60 and 4.00 gL^{-1} after 48 hours, respectively. The results demonstrated that all isolates were able to consume most sugars sources specially pentose carbon xylose. The isolate ZYM7 produced 13.00 gL^{-1} ethanol by consumption of xylose. The results of morphological and physiological characteristics showed that ZYM7 belonged to *Lactobacillus* sp. and ZYM8 and ZYM9 belonged to *Acetobacter* sp. Moreover, *16S rRNA* sequencing and phylogenetic analyses exhibited that ZYM7 was similar to *Lactobacillus rhamnosus* with 99% homology and ZYM8 and ZYM9 were similar to *Acetobacter pasteurianus* with 99 and 98% homology, respectively.

Discussion and conclusion: The results showed that that the isolated bacteria were suitable candidates to produce ethanol from raw material enriched with xylose. These bacteria could be introduced to fermentation industries.

Key words: Bacteria, Ethanol, Fermentation, *Acetobacter*, *Lactobacillus*

* Corresponding Author
Received: August 7, 2013 / **Accepted** September 6, 2013