

## Pengaruh Tekanan Suhu dan Penambahan Suplemen Metal Ion pada Fermentasi Etanol oleh *Zymomonas mobilis*

### *Effect of Temperature Stress and Metal Ion Supplement on Ethanol Fermentation by Zymomonas mobilis*

Sakunda Anggarini, Maimunah Hindun Pulungan, Wignyanto, Nur Hidayat\*, Imania Nurika, Azzimatul Ihwah

Department of Agro-industrial Technology, Faculty of Agricultural Technology  
University of Brawijaya, Malang, Indonesia

\*nhidayat@ub.ac.id

Received: 28<sup>th</sup> September, 2016; 1<sup>st</sup> Revision: 12<sup>th</sup> November, 2016; 2<sup>nd</sup> Revision: 26<sup>th</sup> November, 2016; Accepted: 28<sup>th</sup> November, 2016

#### Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh suhu fermentasi dan penambahan suplemen metal ion terhadap pertumbuhan *Z. mobilis* serta mengukur kemampuannya dalam menghasilkan etanol. Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan dua faktor, yaitu suhu fermentasi (30, 34, dan 38 °C) dan penambahan ion logam dari senyawa garam (Kalium dikromat, Magnesium klorida, dan Asam borat). Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu saat fermentasi dan penambahan suplemen ion logam memberikan pengaruh signifikan terhadap *pertumbuhan sel*, total gula reduksi, dan kadar etanol. Pertumbuhan sel tertinggi sebesar 0,753 NTU dengan penambahan kalium dikromat pada suhu fermentasi 38 °C. *Total gula reduksi* terendah sebesar 789,97 mg/ml dengan penambahan Asam borat pada suhu fermentasi 34 °C. Kadar etanol tertinggi sebesar 2,234% dengan penambahan kalim dikromat pada suhu fermentasi 34 °C.

**Kata kunci:** gula reduksi, ion logam, kadar etanol, tekanan suhu tinggi, *Zymomonas mobilis*

#### Abstract

*This study was aimed to find out the effect of fermentation temperature and metal ion supplement addition towards the growth of Z. mobilis as well as to measure its capability in producing ethanol. This research was conducted by using the randomized block design with two factors namely fermentation temperature (30, 34, 38 °C) and metal ion supplement addition of Potassium dichromate, Magnesium chloride and Boric acid. The result showed that temperature stress and metal ion supplement addition had significant influence on cell growth, total reducing sugar, and the amount of ethanol production. The highest cell growth was 0,753 NTU with Potassium dichromate addition at fermentation temperature of 38 °C. the lowest total reducing sugar was 789.97 mg/ml with Boric acid addition at fermentation temperature of 34 °C. the highest ethanol production was 2.234% with Potassium dichromate addition at fermentation temperature of 34 °C.*

**Keywords:** reduction sugar, metals ion, amount of ethanol, temperature stress, *Zymomonas mobilis*

## PENDAHULUAN

Telah dipahami secara luas, bahwa bahan bakar fosil merupakan sumber bahan bakar yang bersifat tak terbarukan. Oleh karena itu penyediaan sumber bahan bakar alternatif yang bersifat dapat diperbaharui sangat perlu dilakukan, mengingat tingkat konsumsi manusia terhadap semua kebutuhan tidak terkecuali energi, dari waktu ke waktu semakin meningkat (Gray *et al.*, 2006).

Biofuel adalah jawaban dari isu energi, bahkan diharapkan akan mendukung penyelesaian masalah terkait isu ekonomi. Secara komersial, biofuel terdiri atas bioetanol sebagai pengganti

bensin, biodiesel sebagai pengganti solar dan biogas sebagai pengganti gas alam (LPG).

Bioetanol dibuat melalui proses fermentasi dengan menggunakan berbagai macam material biologis. Pada biofuel generasi pertama, bioetanol dibuat dari tanaman penghasil gula, seperti tebu, sorgum, buah-buahan serta material-material berbasis pati. Adapun pada generasi kedua, bioetanol dibuat dari biomassa lignoselulosa (Sims *et al.*, 2010). Proses produksi bioetanol tidak akan lepas dari peran mikroorganisme sebagai perombak material menjadi produk. Dengan demikian, telah banyak pula penelitian yang telah dilakukan, terkait pemanfaatan berbagai macam mikroorganisme dalam bioproses

untuk menghasilkan etanol. Sebagai organisme model dalam dunia penelitian maupun industri, *Escherichia coli* dan *Sacharomyces cerevisiae* dipilih sebagai platform penting dengan tujuan mendapatkan bioetanol maupun produksi senyawa-senyawa bermanfaat lainnya melalui rekayasa metabolik (Hong and Nielsen, 2012; Chen *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2013). Namun demikian mikroorganisme penghasil bioetanol lainnya, yaitu *Zymomonas mobilis* (*Z. mobilis*) juga menunjukkan potensi yang mirip dengan dua model bakteri sebelumnya. *Z. mobilis* mampu memanfaatkan substrat gula secara optimal untuk memproduksi etanol dengan hasil yang lebih tinggi, dengan tingkat (jumlah) pertumbuhan sel (biomassa) yang relatif rendah, sekaligus tanpa memerlukan kontrol oksigen selama masa fermentasi (Doelle *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 2005, Lin and Tanaka, 2006; Panesar *et al.*, 2006; Sahm *et al.*, 2006; Rogers *et al.*, 2007). Bakteri ini juga sangat sesuai untuk pembuatan etanol berbahan lignoselulosa karena memiliki toleransi yang cukup tinggi terhadap berbagai macam inhibitor yang ada pada hidrolisat lignoselulosa (Shui *et al.*, 2015). Namun demikian, bakteri ini hanya bisa mengasimilasi 3 jenis gula sederhana, yaitu glukosa, fruktosa, dan sukrosa (Murata *et al.*, 2015).

Kemampuan dari mikroorganisme produsen etanol dalam menghasilkan etanol tergantung pada banyak faktor kunci, di antaranya adalah jenis varietas, faktor pertumbuhan, dan kondisi fermentasi (Khongsay *et al.*, 2010; Fakruddin *et al.*, 2012). Toleransi pada stress merupakan sifat penting dari mikroorganisme dalam kaitannya dengan aplikasi di industri (Somda *et al.*, 2011). Stress atau tekanan secara fisik dan kimia yang paling utama dan sering dihadapi oleh mikroorganisme penghasil etanol adalah tekanan suhu dan konsentrasi etanol yang tinggi. Tekanan suhu berakibat pada melambatnya laju pertumbuhan, viabilitas (Michel and Starka, 1986) dan kemampuan fermentatif pada sel mikroorganisme (Osman and Ingram, 1985). Stress/tekanan suhu tersebut juga mengubah fluiditas dari membran plasma (Carey and Ingram, 1983; Moreau *et al.*, 1997) serta menstimulasi respon-respon spesifik pada stress terkait (Michel and Starka, 1986; An *et al.*, 1991; Barbosa *et al.*, 1994). Lebih dari itu, tekanan akibat suhu di atas suhu optimal pertumbuhan, menyebabkan gangguan homeostasis ionik seluler, yang memicu penurunan aktivitas metabolik dan bahkan kematian sel

(Thanonkeo *et al.*, 2007). Produksi etanol akan mengalami peningkatan pada kisaran suhu 25°C - 30°C, dan akan mengalami penurunan pada suhu di atas 30°C (Fakruddin, 2012). *Z. mobilis* sendiri, memiliki pertumbuhan yang optimal pada suhu 30°C. Di atas suhu tersebut bakteri ini sudah sulit tumbuh. Bahkan pada suhu 35°C, beberapa strain sudah tidak bisa tumbuh sama sekali (Swings and De Ley, 1977).

Fermentasi etanol adalah merupakan proses yang bersifat eksotermik. Pendinginan pada fermentor sangat diperlukan untuk menstabilkan proses fermentasi oleh mikroba *ethanologenic*. Namun demikian, kondisi dingin alami agak sulit didapatkan, khususnya pada musim panas, terlebih pada beberapa negara tropis seperti Indonesia. Hal ini memicu munculnya biaya tambahan, karena pada produksi skala besar memerlukan penambahan *cooling system* yang membutuhkan investasi yang besar pula. Beberapa penelitian di luar negeri telah memperkenalkan mikroba *thermotolerant* pada fermentasi etanol melalui proses rekayasa genetika (Nonklang *et al.*, 2008; Rodrussamee *et al.*, 2011; Matsushita *et al.*, 2016), termasuk di antaranya dari spesies *Z. mobilis*. Namun di Indonesia, mikroba tersebut masih belum didapatkan, sehingga dengan tetap digunakannya strain asli (*wild type*/WT), perlu dicari dan ditetapkan faktor lain yang bisa mendukung berjalannya proses fermentasi etanol dalam suhu yang lebih tinggi dari suhu normal pertumbuhannya (>30 °C).

Penambahan *metal ion supplement* disebut sebagai salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri *ethanologenic*. Terutama ion kalium pada konsentrasi yang tinggi (50-200 mM) dapat meningkatkan pertumbuhan sel pada suhu yang relatif tinggi (Swings and De Ley, 1977; Fakruddin, 2012). Beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa ion magnesium mengimplikasikan perbaikan pada efek kerusakan yang disebabkan oleh stress dari lingkungan pada *S. cerevisiae* (Dombek and Ingram, 1986; Blackwell *et al.*, 1997; Birch and Walker, 2000). Thanonkeo *et al.*, (2007) membuktikan bahwa ion magnesium yang ditambahkan pada media pertumbuhan *Zymomonas mobilis* memberikan efek protektif pada sel dari kematian serta menstimulasi biosintesis protein terkait stress yang dialami oleh sel. Pada penelitian ini, akan dikaji efek dari kombinasi kondisi pertumbuhan di atas suhu optimal dan konsentrasi penambahan *metal ion supplement* pada pertumbuhan *Z. mobilis* (WT)

dalam menghasilkan etanol secara maksimal di bawah pengaruh *temperature stress*. Adapun substrat yang digunakan adalah substrat sintesis dalam bentuk glukosa. Oleh karena itu, penekanan pada analisis dalam penelitian kali ini adalah analisis perilaku *Z. mobilis* dalam menghasilkan etanol pada suhu fermentasi di atas suhu optimal pertumbuhannya.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah strain *Zymomonas mobilis*, ekstrak ragi, pepton (Oxoid), glukosa, urea (teknis), kalium dikromat (teknis), magnesium klorida (teknis), asam borat (teknis), etanol 70% dan akuades.

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah peralatan gelas, *Laminar Air Flow* (Lokal), autoklaf (Hiclave HVE-50), vortex (Chiltern), *incubator* (Mettler), *rotary vacuum evaporator* (IKA HB 10 digital), dan timbangan digital (Kern-Abj 220-4), mikropipet, dan spektrofotometer (Thermo Scientific).

### Prosedur Penelitian

#### 1. Persiapan Kultur

Strains *Zymomonas mobilis* dikultivasi dalam media YPD yang terdiri atas ekstrak ragi 0,3% (w/v), pepton 0,5% (w/v) dan glukosa 3% (w/v) (Michel *et al.*, 1985) pada suhu 30°C di kondisi statis.

#### 2. Pembuatan Media YPD dengan penambahan Ion Logam

Media yang digunakan untuk proses fermentasi adalah YPD yang terdiri atas ekstrak ragi 0,3% (w/v), pepton 0,5% (w/v), dan glukosa 13%, urea 0,2% dan ditambahkan suplemen ion logam berdasarkan jenisnya (Kalium dikromat, Magnesium klorida, dan Asam borat) sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan, yaitu 20% (v/v).

#### 3. Fermentasi Ethanologenic

Kultur *Z. mobilis* diinokulasikan pada medium YPD yang telah ditambahkan ion logam. Proses fermentasi dilakukan pada suhu 30°C, 34°C, dan 38°C pada kondisi statis, selama  $\pm$  48 jam. Setelah proses fermentasi selesai, dilakukan uji kadar glukosa yang tersisa dan jumlah pertumbuhan sel (Murata *et al.*, 2015). Lalu dilakukan juga proses destilasi untuk mendapatkan destilat murni yang selanjutnya diukur kadar etanol yang terbentuk.

### Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial. Pada rancangan ini digunakan 2 faktor yaitu suhu fermentasi (T) dan penambahan metal ion (M).

Faktor T: Suhu Fermentasi

T<sub>1</sub> : 30°C

T<sub>2</sub> : 34°C

T<sub>3</sub> : 38°C

Faktor M: Penambahan Ion Logam

M<sub>P</sub> : Kalium Dikromat

M<sub>M</sub> : Magnesium Klorida

M<sub>B</sub> : Asam Borat

Berdasarkan 2 faktor di atas diperoleh 9 kombinasi perlakuan. Pada masing-masing kombinasi perlakuan, dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, sehingga secara keseluruhan terdapat 27 unit percobaan. Parameter yang diamati pada fermentasi ini adalah *Cell growth* menggunakan Metode Turbidimetri, Total Gula Reduksi menggunakan Metode DNS (Miller, 1959), dan kadar Etanol menggunakan Metode Piknometre (AOAC Official Method 985.19: 2000).

### Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian di analisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) dan dilanjutkan dengan uji Tukey pada selang kepercayaan 5%.

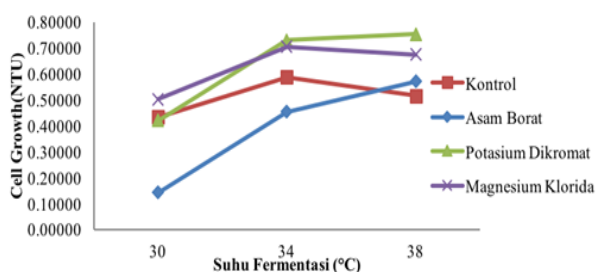
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Cell Growth pada Hasil Fermentasi Etanol oleh *Zymomonas mobilis*

Pengukuran *Cell Growth* pada destilat dilakukan dengan metode turbidimetri sehingga tingkat kekeruhan dari larutan menunjukkan adanya kandungan *total suspended solid* yang berupa zat organik, yaitu bakteri *Zymomonas mobilis* dan metabolit-metabolit yang dihasilkan dalam proses fermentasinya. Berdasarkan uji ANOVA, efek tunggal faktor suhu fermentasi (T), faktor *metal ion supplement* (M) berbeda secara signifikan, serta hasil uji lanjut pada interaksi antar kedua faktor tersebut memberikan pengaruh signifikan terhadap nilai *cell growth*.

Secara keseluruhan sampel yang diinkubasi pada suhu 34°C memberikan nilai *cell growth* yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan suhu 30°C dan 38°C. Nilai *cell growth* tertinggi diperoleh pada perlakuan penambahan Kalium dikromat yang difermentasi pada suhu

38°C, yaitu sebesar 0,753 NTU. Sementara itu, nilai *Cell Growth* terendah diperoleh pada perlakuan penambahan Asam borat yang difermentasi pada suhu 30°C, yaitu sebesar 0,143 NTU. Perbedaan nilai *cell growth* yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Nilai *cell growth* pada fermentasi etanol yang ditambahkan metal ion oleh bakteri *Zymomonas mobilis*

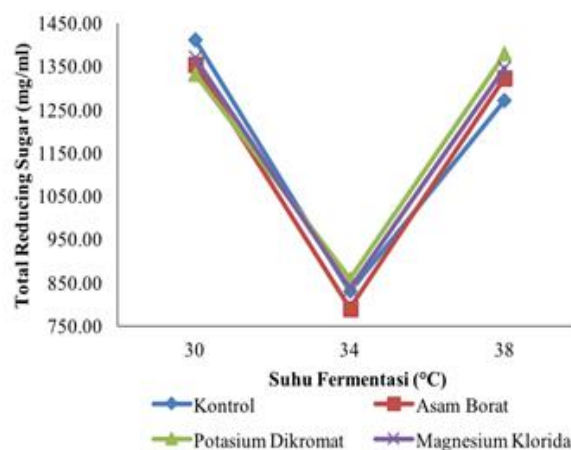
Gambar 1 menunjukkan pola nilai *cell growth* yang cenderung meningkat sampai pada suhu fermentasi 34°C lalu cenderung konstan pada suhu fermentasi 38°C. Sehingga dari ketiga suhu fermentasi tersebut, maka pada suhu fermentasi sebesar 34°C menunjukkan nilai *cell growth* yang tertinggi. *Cell growth* akan semakin menurun ketika suhu inkubasi melebihi 35°C dan menurut Thanonkeo *et al.*, (2007) sampai pada suhu 45°C hampir tidak ada pertumbuhan dari *Z. mobilis*. Hal tersebut diduga karena tingginya suhu fermentasi akan menyebabkan stres sehingga dapat menghambat RNA dan kemampuan sintesis protein pada *Z. mobilis* dan menyebabkan menurunnya pertumbuhan dan massa sel (Osman and Ingram, 1985). Pada faktor penambahan ion logam, perlakuan penambahan Kalium dikromat menunjukkan nilai *Cell Growth* yang tertinggi pada suhu fermentasi 34°C jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

### Total Reducing Sugar pada Hasil Fermentasi Etanol oleh *Zymomonas mobilis*

*Total Reducing Sugar* atau Total gula reduksi (TGR) menunjukkan konsentrasi dari gula reduksi, yang mengindikasikan kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan gula dalam medium selama proses fermentasinya. Dalam penelitian ini gula yang dimaksud adalah glukosa pada sampel yang telah diberi penambahan *metal ion supplement* yang difermentasi oleh bakteri *Zymomonas mobilis*. Uji ANOVA, menunjukkan bahwa efek tunggal faktor suhu fermentasi (T) berbeda signifikan

namun pada faktor *metal ion supplement* (M) tidak berbeda signifikan terhadap nilai TGR. Adapun interaksi antar faktor suhu dan penambahan metal ion menunjukkan adanya pengaruh signifikan terhadap nilai TGR.

Secara keseluruhan, nilai total gula reduksi terendah dihasilkan pada suhu fermentasi 34°C hal tersebut menunjukkan bahwa pada suhu tersebut bakteri *Z. mobilis* dapat menggunakan gula yang ada pada media fermentasi dengan maksimal untuk mendukung pertumbuhan selnya secara optimal. Pada suhu fermentasi 34°C yang ditambahkan dengan Asam borat menunjukkan nilai TGR terendah, yaitu sebesar 789,97 mg/ml namun nilai tersebut tidak berbeda nyata secara statistik jika dibandingkan dengan nilai TGR pada penambahan Magnesium Klorida dan kontrol karena memiliki notasi yang sama. Nilai TGR tertinggi didapat pada perlakuan tanpa penambahan ion logam (kontrol) yang difermentasi pada suhu 30°C, yaitu sebesar 1410,6 mg/mg. Perbedaan nilai TGR yang dihasilkan pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada Gambar 2.



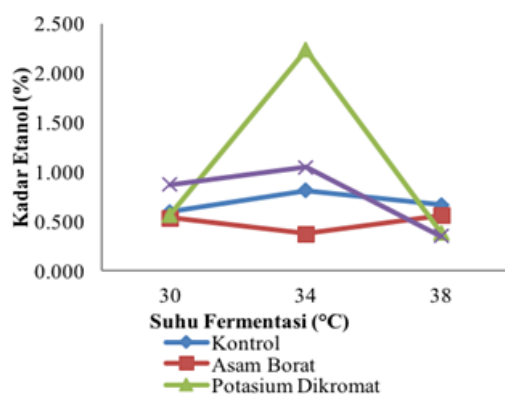
**Gambar 2.** Nilai *total reducing sugar* pada fermentasi etanol dengan penambahan metal ion oleh *Zymomonas mobilis*

Pada Gambar 2 menunjukkan pola penurunan nilai total gula reduksi (TGR) pada sampel yang difermentasikan pada suhu 34 °C sedangkan pada sampel yang difermentasikan pada suhu 30°C dan 38 °C menunjukkan nilai TGR yang tidak jauh berbeda hal tersebut mengindikasikan bahwa pada suhu 34 °C pertumbuhan bakteri *Z. mobilis* optimal sedangkan pada suhu 38 °C pertumbuhannya mulai terhambat karena adanya suhu yang melampaui suhu optimal tumbuh.

### Kadar Etanol yang Dihasilkan

Pengukuran kadar etanol pada distilat dilakukan dengan metode piknometer. Berdasarkan uji ANOVA, efek tunggal faktor suhu fermentasi menunjukkan perbedaan signifikan serta interaksi antara faktor suhu dan suplemen metal ion memberikan pengaruh signifikan terhadap kadar etanol.

Sampel yang difermentasi pada suhu 34°C dan penambahan Kalium dikromat menunjukkan kadar etanol yang tertinggi sebesar 2,234% hal tersebut sejalan dengan parameter sebelumnya, yaitu nilai *cell growth* dan total gula reduksi. Masih pada suhu yang sama, penambahan Magnesium klorida pada medium YPD juga menghasilkan kadar etanol yang hanya sedikit lebih rendah daripada perlakuan penambahan Kalium dikromat, yaitu sebesar 1,047%. Magnesium diketahui memiliki pengaruh terhadap serapan glukosa oleh mikroorganisme (Sue and Horst, 1981) serta pengaruh terhadap pertumbuhan melalui pengendalian siklus selnya (Graeme and John, 1980; Dombek and Ingram, 1986). Nilai kadar etanol terendah terdapat pada sampel yang difermentasi pada suhu 38°C dengan penambahan Kalium dikromat. Hal tersebut diduga karena pada suhu di atas 35°C akan menghambat pertumbuhan bakteri *Z. mobilis* sehingga menyebabkan menurunnya kadar etanol (Thanonkeo *et al.*, 2007). Nilai kadar etanol yang dihasilkan pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Kadar etanol pada fermentasi etanol yang ditambahkan metal ion oleh bakteri *Zymomonas mobilis*

Pada Gambar 3 menunjukkan pola kenaikan kadar etanol yang signifikan pada sampel yang difermentasikan pada suhu 34°C lalu menurun pada sampel yang difermentasikan pada suhu 38°C. Hal tersebut sesuai dengan

penelitian yang menyebutkan bahwa semakin tinggi suhu fermentasi dapat menyebabkan menurunnya kadar etanol yang dihasilkan. Hal tersebut diduga karena, suhu fermentasi yang terlalu tinggi dapat menurunkan efektivitas dari membrane plasma sebagai pembatas semipermeabel yang diikuti dengan terlepasnya kofaktor esensial dan koenzim yang bertugas dalam katabolisme glukosa dan produksi alkohol (Osman and Ingram, 1985). Pada berbagai jenis *metal ion supplement* yang ditambahkan, nilai kadar etanol tertinggi diperoleh pada perlakuan Kalium dikromat dan berikutnya diikuti oleh perlakuan penambahan Magnesium klorida. Crane (1975) menyebutkan bahwa Kalium dan Magnesium merupakan ion yang dibutuhkan sebagai kofaktor selama proses glikolisis yang mengubah glukosa menjadi asam piruvat untuk selanjutnya dengan terlepasnya CO<sub>2</sub> dan katalisasi oleh enzim alkohol dehydrogenase, terjadi pembentukan etil alkohol (etanol). Adapun nilai kadar etanol terendah diperoleh pada perlakuan Asam borat. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Fakrudin *et al.* (2012) yang menunjukkan bahwa penambahan ion logam yang menghasilkan kadar etanol dari yang tertinggi hingga terendah adalah Kalium dikromat, Magnesium klorida, Asam borat, dan Tembaga sulfat.

### KESIMPULAN

1. Tekanan suhu (*temperature stress*) dan penambahan suplemen ion logam memberikan pengaruh signifikan terhadap *Cell Growth*, *Total Reducing Sugar*, dan Kadar Etanol.
2. *Pertumbuhan sel (Cell Growth)* dari *Z. mobilis* yang tertinggi sebesar 0,753 NTU, yaitu yang ditumbuhkan pada media YPD dengan penambahan Kalium dikromat, pada suhu 38°C.
3. *Total Reducing Sugar* terendah sebesar 789,97 mg/ml pada perlakuan suhu fermentasi 34°C.
4. Kadar etanol tertinggi sebesar 2,234%, yaitu pada media dengan penambahan Kalium dikromat yang difermentasi pada suhu 34 °C.

### Daftar Pustaka

- Akira, M., Luciano, F., Laonardo, F., Vittorio, G., Giacamo, R. (1997). Object Representation in the Ventral Premo-tor Cortex (Area F5) of the

- Monkey. *Journal of Neurophysiology*. 78(4): 2226-2230.
- An, H., Scopes, R.K., Rodriguez, M., Keshav, K.F and Ingram, L.O. (1991). Gel Electrophoresis Analysis of *Zymomonas mobilis* Glycolytic and Fermentative Enzymes: Identification of Alcohol Dehydrogenase II as A Stress Protein. *Bacteriology*. 173(19): 5975-5982.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official Methods of Analysis 17th ed.* USA: AOAC International.
- Barbosa, M. de F.S., Yomano, L.P. and Ingram, I.O. (1994). Cloning, Sequencing and Expression of Stress Gene from the Ethanol-Producing Bacterium *Zymomonas mobilis*: The Groesl Operon. *Gene*. 148(1): 51–57.
- Carey, V.C and Ingram, L. O. (1983). Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: Effects of Ethanol and Glucose. *Bacteriology*. 154(3): 1291-1300.
- Chen, X.Z., Zhou, L., Kangming, T., Kumar, A., Singh, S., Prior B.A., and Wang Z.X., (2013). Metabolic Engineering of Escherichia Coli: A Sustainable Industrial Platform for Bio-Based Chemical Production. *Biotechnology Advances*. 31(8): 1200-1223.
- Crane, E. (1975). *Honey: Wines from the Fermentation of Honey*. London: Heneimann.
- Doelle, H., Kirk, L., Crittenden, R., Toh, H., and Doelle, M. (1993). *Zymomonas mobilis*: science and industrial application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 13(1): 57–98.
- Dombek, K.M. and Ingram, L.O. (1986). Magnesium Limitation and Its Role in Apparent Toxicity of Ethanol during Yeast Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(5): 975-981.
- Fakruddin, M., Quayum, M.A., Ahmed, M.M., and Choudhury, N. (2012). Analysis of Key Factors Affecting Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* IFST-072011. *Biotechnology*. 11(4): 248-252.
- Graeme, M.W. and John, H.D. (1980). Magnesium Ions and the Control of the Cell Cycle in Yeast. *Cell Science*. 42: 329-356.
- Gray, K.A., Zhao, L., and Emptage, M. (2006). Bioethanol. *Current Opinion on Chemical Biology*. 10(2): 141-146.
- Hong K-K, and Nielsen, J. (2012). Metabolic Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae*: A Key Cell Factory for Future Biorefineries. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 69(16): 2671-2690.
- Khongsay, N., Laopaiboon, L., and Laopaiboon P. (2010). Growth and Batch Fermentation of *Saccharomyces Cerevisiae* on Sweet Sorghum Stem Juice under Normal and Very High Gravity Conditions. *Biotechnology*. 9(1): 9-16.
- Lin, Y., and Tanaka, S. (2006). Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69(6): 627–642.
- Matsushita, K., Azuma, Y., Kosaka, T., Toshiharu, Y., Hoshida, H., Akada, R. and Yamada, M. (2016). Genomic analysis of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 80 (4): 655-668
- Michel G., Azoulay T. and Starka J. (1985). Ethanol Effect on the Membrane Protein Pattern of *Zymomonas mobilis*. *Microbiologie*. 136: 173-179
- Michel, G.P.F. and Starka. J. (1987). Preferential Synthesis of Stress Protein in Stationary *Zymomonas mobilis* Cells. *FEMS Microbiology Letters*. 43: 361-365.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.
- Moreau, R.A., Powell, M.J., Fett and Whitaker, B.D. (1997). The Effect of Ethanol and Oxygen on the Growth Of *Zymomonas mobilis* and the Levels of Hopanoids and Other Membrane Lipids. *Current Microbiology*. 35(2): 124-128.
- Murata, M., Nitiyon, S., Lertwattanasakul, N., Sootsuwan, K., Kosaka, T., Thanonkeo, P., Limtong, S. and Yamada, M. (2015). High-temperature Fermentation Technology for Low-cost Bioethanol. *Journal of the Japan Institute of Energy*. 94: 1154-1162.
- Nonklang S, Abdel-Banat BM, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S. (2008). High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3–1042. *Applied Environmental Microbiology*. 74(24): 7514-7521.

- Nielsen, J., Larsson, C., Van Maris, A., and Pronk, J. (2013). Metabolic Engineering of Yeast for Production of Fuels and Chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. 24(3): 398-404.
- Osman, Y.A. and Ingram, L. O. (1985). Mechanism of Ethanol Inhibition of Fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *Bacteriology*. 164(1): 173-180.
- Panesar, P.S., Marwaha, S.S., and Kennedy, J.F. (2006). *Zymomonas mobilis*: an Alternative Ethanol Producer. *Chemical Technology and Biotechnology*. 81(4). Pp. 623-635.
- Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K., Suprayogi, Limtong, S., Kosaka, T., Yamada, M. (2011). Growth and Ethanol Fermentation Ability on Hexose and Pentose Sugars and Glucose Effect under Various Conditions in Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces Marxianus*. *Applied Environmental Microbiology*. 90(4): 1573-1586.
- Rogers, P.L., Jeon, Y.J., Lee, K.J, and Lawford, H.G. (2007). *Zymomonas mobilis* for Fuel Ethanol and Higher Value Products. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 108: 263-288.
- Sahm, H., Bringer-Meyer, S., and Sprenger, G. (2006). The Genus *Zymomonas*. *Prokaryotes*. 5: 201-221.
- Seo, J.S., Chong, H., Park, H.S., Yoon K.O., Jung C., Kim, J.J., Hong, J.H., Kim, H., Kim, J.H., Kil, J.I., Park, C.J., Oh, H.M., Lee, J.S., Jin, S.J, Um, H.W., Lee H.J., Oh. S.J., Kim J.Y., Kang H.L., Lee, S.Y., Lee, K.J., Kang H.S. (2005). The Genome Sequence of the Ethanologenic Bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature Biotechnology*. 23(1): 63-68.
- Sims, R.R.H., Mabree, W., Saddler, J.N., and Taylor, M. (2010). An Overview of Second Generation Biofuels Technologies. *Bioresource Technology*. 101: 1570-1580.
- Somda, M.K., Savadogo, a., Barro, N., Thonart, P., and Traore, A.S. (2011). Effect of Mineral Salt in Fermentation Process using Mango Residues as Carbon Source for Bioethanol Production. *Asian Journal of Industrial Engineering*. 3(1): 29-38.
- Sue, C. and Horst Doelle, W. (1981). Nutritional Effect on the Kinetics of Ethanol Production from Glucose by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 11(2): 116-119.
- Swings, J., and De Ley, J. (1977). The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*. 41(1): 1-46.
- Thanonkeo, P., Laopaiboon, P., Sootsuwan, K. and Yamada. M. (2007). Magnesium Ions Improve Growth and Ethanol Production of *Zymomonas mobilis* under Heat or Ethanol Stress. *Biotechnology*. 6(1): 112-129.