بررسی اثر دما، pH و غلظت گلوکز بر تولید اتانول توسط قارچ موکور ایندیکوس

حسین محمد بیگی*، کیخسرو کریمی

اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده مهندسی شیمی

پیام نگار: **h_mbeigi@yahoo.com**

زمان دریافت: ۱۳۸۸/۶/۲۱

زمان پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۲

چکیده

اثر دما، pH و غلظت گلوکز بر تخمیر قارچ موکورایندیکوس تحت شرایط هوازی به منظور بهینه‌سازی بازدهی اتانول بررسی شد. از روش تاگوچی در سه سطح برای طراحی آزمایشات و سطح اطمینان ۹۵ درصد برای تحلیل نتایج استفاده گردید. تحلیل نتایج نشان داد که دمای بهینه برای تخمیر این قارچ ۳۰ درجه سلسیوس است. غلظت گلوکز (در محدوده ۱۰۰- ۲۵ گرم بر لیتر) و pH (در محدوده ۵/۵-۴/۵) در مقایسه با دما اثر کمتری داشتند. مقدار بیشینه بازدهی اتانول ۰/۴۳ گرم بر هر گرم گلوکز به دست آمد. گلیسرول مهمترین محصول جانبی تخمیر بود که با توجه به تحلیل نتایج، غلظت گلوکز برای تولید بهینه گلیسرول ۱۰۰ گرم بر لیتر بود. دما و pH اثر کمی بر تولید گلیسرول داشتند. مقدار بیشینه بازدهی گلیسرول برابر با ۸۹ میلی گرم بر هر گرم گلوکز به دست آمد.

کلمات کلیدی: *موکور ایندیکوس*، pH ،دما و غلظت گلوکز

۱- مقدمه

کاهش سوخت‌های فسیلی و مباحث زیست محیطی موجب شده‌اند که اتانول به عنوان یک محصول مهم شناخته شود [۱]، در نتیجه توسعه یک واحد تخمیری که از منابع مختلف کربنی استفاده می‌کند برای تولید بیواتانول در مقیاس صنعتی اهمیت ویژه ای می‌یابد [۳و۲]. در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی در مورد توسعه فرایند تولید اتانول از منابع مختلف انجام گرفته است [۸-۴].

قارچ *موکور ایندیکوس* اخیراً به عنوان یک میکروارگانیسم تولید کنندهٔ اتانول به خصوص از منابع لیگنوسلولزی شناخته شده است[۱۰و۹]. این قارچ می‌تواند اتانول را با بازدهی بالا از قندهای شش کربنه و پنج کربنه تولید کند[۹]. همچنین این قارچ توانایی بالایی در تحمل بازدارنده‌های رشد نشان داده است. پیش‌بینی می‌شود این قارچ جایگزین مخمر ساکارومایسیس سرویسه در صنایع الکل شود [۱۱]. با وجود این، در مورد بهینه‌سازی شرایط فرایندی تولید اتانول با این قارچ تاکنون مطالبی در مراجع و مقالات آورده نشده است.

مهمترین عوامل اثرگذار بر روی تولید اتانول به روش تخمیر، عبارت‌اند از: دما، غلظت قند، غلظت اتانول، مقدار اکسیژن، pH و شدت هم زدن[۱۲و۸و۷]. گزارشی در مورد اثر این پارامترها بر تخمیر توسط قارچ *موکور ایندیکوس* ارائه نشده است.

این تحقیق، بررسی اثر سه عامل دما، pH و غلظت قند بر روی تخمیر الکلی موکوراینديکوس بوده است. نتایج حاصل از اثر این پارامترها بر بازدهی گلیسرول نیز ارائه شده است. برای بهینه سازی بازدهی اتانول از روش تاگوچی استفاده شده است. فاکتورها دما، pH و غلظت قند و پاسخ‌های اندازه گیری شده غلظت اتانول و گلیسرول هستند. نتایج این تحقیق می‌تواند برای تولید اتانول توسط این قارچ برای تخمیر ترکیبات لیگنوسلولزی به کار رود.

۲- مواد و روشها

۲-۱ محیط کشت

قارچ *موکور اینديکوس* CCUG ۲۲۴۲۴ (تهیه شده از کلکسیون میکروبی دانشگاه گوتبورگ) بر روی محیط کشت جامد آگار حاوی (گرم بر لیتر) : گلوکز:۲۰، عصاره مخمر: ۱۰، پپتون: ۱۰، آگار: ۲۰ ، به مدت ۵ روز رشد داده شد و سپس در یخچال نگهداری گردید. برای تهیه سوسپانسیون اسپورها، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به اسلنت‌ها اضافه و به شدت هم زده شد.

۲-۲ تخمیر

تخمیر به صورت هوازی و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری انجام گرفت. هر کدام از ارلن‌ها حاوی۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت با ترکیبات زیر (بر حسب گرم بر لیتر) بود [۱۳]:

عصارهٔ مخمر: ۵ ،دی آمونیوم سولفات: ۷/۵، پتاسیم دی هیدروژن فسفات: ۳/۵، سولفات منیزیم ۷ آبه : ۰/۷۵، کلرید کلسیم : ۱.

محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. تخمیر در دما و pH مورد نظر و با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت.

۲-۳ آنالیز

غلظت گلوکز، اتانول و گلیسرول نمونه‌های مایع به روش کروماتوگرافی با بازدهی بالا[1] اندازه گیری شد. این دستگاه ساخت شرکت جاسکوی ژاپن[2] سری ۹۰۰ و مجهز به آشکارسازهای UV و RI است. از ستون Aminex HPX-87H ساخت شرکت بیوراد[3] برای آنالیز استفاده گردید. فاز متحرک آن، اسید سولفوریک با غلظت ۵ میلی مولار و شدت ۰/۶میلی‌لیتر بر دقیقه و دمای ستون ۶۵ درجه سلسیوس بود.

جداسازی زیست توده نیز توسط دستگاه سانتریفیوژ (۴۵۰۰ دور بر دقیقه -۱۰دقیقه) انجام گرفت. در هربار نمونه‌گیری، ۱ میلی‌لیتر از محلول، تحت شرایط استریل برداشته می‌شد. در این تحقیق همه آزمایش‌ها دو بارتکرار شدند و انحراف معیار برای گلوکز، اتانول و گلیسرول به ترتیب کمتر از ۴/۱، ۴/۹ و ۵/۵ درصد به دست آمد. داده‌های ارائه شده در این مقاله متوسط نتایج بدست آمده است.

۳- طراحی آزمایش‌ها

از روش تاگوچی برای کاهش تعداد آزمایش‌ها و بررسی پارامترها استفاده شد. مهمترین هدف این تحقیق بهینه سازی محصولات حاصل از تخمیر (اتانول و گلیسرول) بود. در این تحقیق روش تاگوچی با سه فاکتور در سه سطح (L_9) مورد استفاده قرار گرفت و تعداد آزمایشات را از ۲۷ به ۹ آزمایش کاهش داد. آنالیز واریانس بر روی نتایج انجام گرفت. پارامترهایی که در این مقاله برای آنالیز واریانس استفاده شده در جدول (۱) نشان داده شده است.

برای مطالعه اثر پارامترها بر روی بهینه سازی، F_j با $F_{m,n}$ که از جداول F برای سطح اطمینان ۹۵ درصد به دست می‌آید مقایسه شد. نسبت F در جداول دو بعدی نشان داده شده است که در آن mبیانگر درجه آزادی فاکتور و n بیانگر درجه آزادی خطا است. در حالی که F_j از $F_{m,n}$ بزرگتر باشد پارامتر مورد نظر بر روی بهینه سازی مؤثر است در غیر این صورت باید از آن صرف نظر کرد. با حذف این پارامترها درصد و سطح اطمینان پارامترهای باقیمانده افزایش می‌یابد[۱۴]. پارامترهای فرایند و نحوه انجام آزمایش‌ها به ترتیب در جدول‌های (۲) و (۳) آورده شده اند.

1. HPLC

2. Jasco International Co., Tokyo, Japan

3. Bio-Rad (USA)

جدول ۱- معادلات آنالیز واریانس

	معادلات
۱	$S_T = \sum_{i=1}^{N} Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{N} Y_i\right)^2 / N$
۲	$S_j = \sum_{k=1}^{L}\left(\left(\sum_{i=1}^{N_k} Y_i\right)^2 / N_k\right) - \left(\sum_{i=1}^{N} Y_i\right)^2 / N$
۳	$S_e = S_T - \sum_{i=1}^{M} S_j$
۴	$V_j = S_j / f_j$
۵	$V_e = S_e / f_e$
۶	$f_j = L - 1$
۷	$f_e = f_T - \sum_{j=1}^{M} f_j$
۸	$f_T = M - 1$
۹	$F_j = V_j / V_e$
۱۰	$P_j = (S_j - f_j V_e)100 / S_T$
۱۱	$P_e = \left(S_e + \sum_{j=1}^{M} f_j V_e\right)100 / S_T$

جدول ۲- پارامترهای فرایند و سطوح آنها

	پارامترهای طراحی	سطوح		
		۱	۲	۳
A	دما (درجه سلسیوس)	۳۰	۳۵	۳۸
B	pH	۴/۵	۵	۵/۵
C	غلظت گلوکز(گرم بر لیتر)	۲۰	۵۰	۱۰۰

۴- نتایج و بحث پیرامون آنها

۴-۱ اثر دما، pH و غلظت قند بر بازدهی اتانول

بازدهی اتانول (بیشینه اتانول تولید شده به ازای قند مصرف شده ، گرم بر گرم) در حالت تخمیر قارچ *موکور ایندیکوس* در جدول (۳) نشان داده شده است. نتایج نشان داد که این قارچ توانایی تولید اتانول در تمامی شرایط آزمایش شده را دارد و بازدهی اتانول آن بین ۰/۱۱ تا ۰/۴۳ گرم بر گرم می‌باشد. بالاترین بازدهی تولید اتانول در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، pH برابر با ۵/۵ و غلظت گلوکز ۱۰۰ گرم بر لیتر و پایین‌ترین بازدهی در شرایط دمایی ۳۸ درجه سلسیوس، pH برابر با ۵ و غلظت گلوکز ۲۵ گرم بر لیتر به دست آمد. این دو حالت به ترتیب در پایین‌ترین و بالاترین دما حاصل شد و این حاکی از اثر مهم دما در تولید اتانول بود. در شرایط بهینه ۸۶ درصد گلوکز برای تولید اتانول و ۶/۴ درصد برای تولید گلیسرول مصرف شده است. بقیه گلوکز نیز برای تولید زیست توده، دی اکسید کربن و دیگر متابولیت‌های ثانوی مصرف شده است.

جدول ۳- نحوه انجام آزمایش‌ها و مقادیر بازدهی اتانول و گلیسرول در تخمیر گلوکز توسط قارچ *موکور ایندیکوس*

پارامترهای فرایند				بازدهی	
شماره آزمایش	C	B	A	$Y_{E/S}$[1]	$Y_{E/S}$[1]
۱	۱	۱	۱	۰/۳۶	۳۰
۲	۲	۲	۱	۰/۳۹	۴۴
۳	۳	۳	۱	۰/۴۳	۵۵
۴	۲	۱	۲	۰/۴	۴۱
۵	۳	۲	۲	۰/۴۱	۶۲
۶	۱	۳	۲	۰/۳۳	۲۲
۷	۳	۱	۳	۰/۲۵	۸۹
۸	۱	۲	۳	۰/۱۱	۱۰
۹	۲	۳	۳	۰/۳۱	۴۲

[1] بیشینه اتانول تولید شده به ازای قند مصرف شده ، گرم بر گرم

[2] بیشینه گلیسرول تولید شده به ازای قند مصرف شده ، میلی گرم بر گرم

نتایج آنالیز واریانس در جدول (۴)آورده شده است. آنالیزها در سطح اطمینان ۹۵ درصد توسط معادلات جدول (۱) انجام گرفت. از جدول آماری در مرجع [۱۴]، $F_{2,2}$ برابر با ۱۹ بدست آمد. نتایج نشان داد که F_j مربوط به همه پارامترها از $F_{2,2}$ کوچکتر است. بنابراین پارامتر pH که کمترین اثر را داشت حذف گردید و آنالیز ادامه یافت.

نتایج آنالیز بدون pH در جدول (۵) آورده شده است. با توجه به نتایج این جدول مشاهده می‌شود که تنها F_j مربوط به دما از $F_{2,4}$ که برابر با ۶/۹۴۴۳ است بزرگتر می‌شود. بنابراین دما مهمترین پارامتری است که بر بازدهی اتانول اثر می‌گذارد.

جدول ۴- آنالیز واریانس برای اتانول

پارامترهای فرایند	$S_j.10^3$	f_j	$V_j.10^3$	F_j	$P_j(\%)$
A	۵۳/۶۲۲	۲	۲۶/۸۱۱	۱۴/۸۰۴	۶۱/۷۶۲
B	۴/۳۵۶	۲	۲/۱۷۸	۱/۲۰۲	۰/۹۰۶
C	۱۹/۳۵۶	۲	۹/۶۷۸	۵/۳۴۴	/۴۳۵ ۱۹
خطا	۳/۶۲۲	۲	۱/۸۱۱	۱/۰۰۰	/۸۹۷ ۱۷
مجموع	۸۰/۹۵۶	۸	-	-	۱۰۰

جدول ۵- آنالیز واریانس برای اتانول با حذف pH

پارامترهای فرایند	$S_j.10^3$	f_j	$V_j.10^3$	F_j	$P_j(\%)$
A	۵۳/۶۲۲	۲	۲۶/۸۱۱	۱۳/۴۴۳	۶۱/۳۰۹
B		Pooled			
C	۱۹/۳۵۶	۲	۹/۶۷۸	۴/۸۵۲	۱۸/۹۸۲
خطا	۷/۹۷۸	۴	۱/۹۹۴	۱/۰۰۰	۱۹/۷۰۹
مجموع	۸۰/۹۵۶	۸	-	-	۱۰۰

در جدول (۶) نیز اثر اصلی پارامترها بر بازدهی اتانول مشاهده می‌شود. علامت تفاضل بین L۱ و L۲ نشان می‌دهد که چگونه تغییرات فاکتور بر پاسخ یعنی بازدهی اتانول اثر می‌گذارد. همان‌طور که انتظار داشتیم غلظت نهایی اتانول و مصرف گلوکز با افزایش دما کاهش یافت و باعث کاهش بازدهی اتانول شد [۱۵]. با توجه به نتایج جدول (۶) و آنالیز واریانس، حالت بهینه برای تولید بالای اتانول در دمای ۳۰ درجه سلسیوس حاصل گردید، در حالی که pH و غلظت گلوکز تأثیر اندکی بر بازدهی اتانول می‌گذارد.

در دمای بالا انتقال مواد و همچنین سطح اشباع آن‌ها در داخل سلول تغییر می‌کند، که ممکن است باعث افزایش غلظت اتانول درون سلولی و در نهایت افزایش سمیت شود[۱۶]. اثر دیگر دمای بالا تغییر ماهیت ریبوزوم و آنزیم‌ها و مشکلات مربوط به سیالیت غشاء است[۱۷]. در این تحقیق در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و غلظت گلوکز ۱۰۰ گرم بر لیتر، پس از مدت ۴۸ ساعت تمامی گلوکز مصرف شد اما با افزایش دما تا ۳۸ درجه سلسیوس سلول توانایی مصرف تمام گلوکز در این مدت را نداشت.

جدول ۶- اثر اصلی پارامترها بر روی بازدهی اتانول

پارامتر	سطح۱ (L۱)	سطح۲ (L۲)	سطح۳ (L۳)	L۲-L۱
دما	۰/۳۹	۰/۳۸	۰/۲۲	-۰/۰۱
pH	۰/۳۴	۰/۳	۰/۳۶	-۰/۰۴
غلظت گلوکز	۰/۲۷	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۱

مقدار بالای گلوکز اولیه نیز می‌تواند منجر به محدودیت در رشد به دلیل ایجاد گرادیان بالای فشار اسمزی در غشای سلولی شود[۱۸]، اما در این تحقیق اثر نا مطلوبی بر بازدهی اتانول نداشت و بازدهی اتانول در ۱۰۰ گرم بر لیتر بیشتر از بازدهی آن در ۲۵ گرم بر لیتر بود و این می‌تواند به دلیل اثر کرب تری باشد[۱۹].

pH از پارامترهای مهم در تخمیر بحساب می‌آید. در صنایع تخمیری pH پائین بخاطر آلودگی کمتر، مطلوب‌تر است. به طور کلی غلظت H^+ می‌تواند مقدار بار سیتوپلاسم غشاء و در نتیجه نفوذپذیری آن را نسبت به برخی ترکیبات تغییر دهد[۲۰]. نتایج این تحقیق نشان داد که pH اثر چندانی بر بازدهی اتانول ندارد و *موکور ایندیکوس* نسبت به آن حساسیت زیادی در بازه ۴/۵ الی ۵/۵ نشان نمی‌دهد.

بازدهی اتانول بهینه شده در این تحقیق از نتایج تحقیق قبلی که توسط ریا میلاتی و همکارانش[۱۰] به دست آمد بهتر بود. روش، میکروارگانیسم و محیط کشت در هر دو تحقیق یکسان بود. در تحقیق قبلی در ۳۷ درجه سلسیوس و مدت ۷ روز تخمیر بازدهی اتانول ۰/۳۹۹ گرم بر گرم به دست آمده بود. در حالی که در این تحقیق در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و مدت ۴۸ ساعت تخمیر، بازدهی ۰/۴۳ گرم بر گرم به دست آمد. این نتایج مشابه نتایج تولید اتانول از مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* و *زیموموناس موبیلیس* می‌باشد[۹].

۴-۲ اثر دما، pH و غلظت قند بر بازدهی گلیسرول

بازدهی گلیسرول (بیشینه گلیسرول تولید شده به ازای قند مصرف

شده ، میلی گرم بر گرم) در حالت تخمیر قارچ موکور ایندیکوس در جدول (۳) نشان داده شده است. بهینه‌سازی بازدهی تولید گلیسرول توسط قارچ موکور ایندیکوس همانند اتانول انجام گرفت. در تمام شرایط آزمایش‌ها گلیسرول تولید شد و بازدهی آن بین ۱۰ تا ۸۹ میلی گرم بر گرم به دست آمد در حالی که غلظت سایر محصولات جانبی مانند لاکتیک، سوکسینیک و پیروویک اسید ناچیز بود. بیشترین و کمترین مقدار بازدهی گلیسرول به ترتیب در غلظت گلوکز برابر با ۱۰۰ و ۲۵ گرم بر لیتر به دست آمد که این نشان از اثر بالای غلظت قند در تولید گلیسرول دارد.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس در جدول (۷) آمده است. با توجه به این نتایج گلوکز تنها پارامتر مؤثر بر روی بازدهی گلیسرول است. اثر اصلی پارامترها بر روی بازدهی گلیسرول در جدول (۸) نشان داده شده است. همان‌طور که انتظار داشتیم، غلظت گلوکز اثر مثبتی بر بازدهی گلیسرول داشت[۲۱] به طوری که بیشترین بازدهی در غلظت گلوکز ۱۰۰ گرم بر لیتر به دست آمد و اثر دما و pH در مقایسه با غلظت گلوکز ناچیز بودند. از طرفی هنگامی که مقدار زیادی گلیسرول تولید می‌شود منطقی است که مقدار اتانول کمتر شود زیرا مصرف منبع کربنی برای تولید گلیسرول موجب کاهش تولید اتانول می‌گردد.

جدول ۷- آنالیز واریانس برای گلیسرول

پارامتر	سطح۱ (L۱)	سطح (L۲)	سطح۳ (L۳)	L۲-L۱
دما	۰/۰۴۳	۰/۰۴۲	۰/۰۴۷	۰/۰۰۱
pH	۰/۰۵۳	۰/۰۳۹	۰/۰۴	-۰/۰۱۴
غلظت گلوکز	۰/۰۲۱	۰/۰۴۲	۰/۰۶۹	۰/۰۲۱

جدول ۸- اثر اصلی پارامترها بر بازدهی گلیسرول

پارامترهای فرایند	$S_j.10^3$	f_j	$V_j.10^3$	F_j	$P_j(\%)$
A		Pooled			
B	۰/۴۰۳	۲	۰/۲۰۱	۱/۷۹۴	۴/۱۲۹
C	۳/۴۶۷	۲	۱/۷۳۳	۱۵/۴۳۹	۷۵/۰۷۳
خطا	۰/۴۹۹	۴	۰/۱۱۲	۱/۰۰۰	۲۰/۷۹۸
مجموع	۴/۳۱۹	۸	-	-	۱۰۰

با توجه به مطالعات انجام شده [۲۲] و نتایج حاصل از آزمایش‌ها، برهم کنش بین فاکتورها اثر ناچیزی بر نتایج داشتند و از آن‌ها صرف‌نظر شد.

هدف نهایی میکروارگانیسم از مصرف گلوکز رشد سلول و تولید زیست توده است. آنها سنتز اتانول را طی یک سری واکنش‌های کاتابولیکی و برای تولید انرژی انجام می‌دهند. در این میان، گلیسرول برای حفظ تعادل (اکسید- احیا) تولید می‌شود و مقداری کربوکسیلیک اسید نیز از سلول به بیرون ترشح می‌شود. بنابراین سلول اتانول را به عنوان ماده اصلی و گلیسرول و تعدادی کربوکسیلیک اسید را به عنوان محصول جانبی تولید می‌کند[۲۳]. نتایج این تحقیق حاکی از بازدهی نسبتاً بالای گلیسرول در مقایسه با کربوکسیلیک اسید بود.

۵- نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاکی از اثر بالای دما بر تولید اتانول توسط قارچ موکوراینديکوس بود و pH بین ۴/۵ تا ۵/۵ و غلظت قند بین ۲۵ تا ۱۰۰ گرم بر لیتر اثر چندانی بر بازدهی اتانول نداشت. این در حالی بود که غلظت قند مؤثرترین پارامتر بر تولید گلیسرول بود. شرایط بهینه برای تولید اتانول در ۳۰ درجه سلسیوس و pH بین ۴/۵ تا ۵/۵ و غلظت قند بین ۲۵ تا ۱۰۰ گرم بر لیتر به دست آمد.

۶- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلکسیون دانشگاه گوتبورگ برای فراهم آوردن قارچ موکوراینديکوس و همچنین خانم هادیان به منظور شناسایی و آنالیز نمونه‌ها توسط دستگاه HPLC مرکز آنالیز دستگاهی دانشگاه صنعتی اصفهان تشکر و قدردانی می‌شود.

علایم واختصارات

f_e	درجه آزادی واریانس خطا
f_i	درجه آزادی پارامتر j
$F_{m,n}$	مقدار استاندارد از جداول F
f_T	درجه آزادی کل
L	تعداد سطوح
M	تعداد پارامترها

N	تعداد کل آزمایش‌ها
N_k	تعداد آزمایش‌ها در سطح k
OA	آرایه‌های عمودی
S_e	جمع مربعات خطا
S_j	جمع مربعات پارامتر j
S_T	جمع کل مربعات
V_e	واریانس خطا
V_j	متوسط مربعات پارامتر j
P_e	اثر نسبی خطابر بهینه سازی پاسخ مورد نظر (٪)
P_j	اثر نسبی پارامتر j بر بهینه سازی پاسخ مورد نظر
Y_i	مقدار پاسخ مورد نظر

مراجع

[1] L. Davis, Y. Jeon, C.Svenson, P.Rogers, J.Pearce, P. Peiris, "Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonasmobilis*", Biomass Bioenerg, 29,49-59, (2005).

[2] K.Tanaka, Z.D.Hilary, A.Ishizaki, "Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*", J. Biosci. Bioeng, 87, 642-646, (1999).

[3] F.Tao, J.Y.Miao, G.Y. Shi, K.C.Zhang, "Ethanol fermentation by an acid- tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition", Proc.Biochem, 49, 138-187, (2005).

[4] A. Mohagheghi, M.Ruth, D.J.Schell, "Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: effects of overliming pH on sugar and ethanol yields", Process Biochem , 41, 1806-1811, (2006).

[5] V. Ruanglek, D.Maneewatthana, S.Tripetchkul, "Evaluation of Thai agro- industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*", Process Biochem, 41, 1432-1437, (2006).

[6] H.K. Sreenath, T.W.Jeffries, "Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts", Biores. Technol, 72, 253-260, (2000).

[7] M.L.Cazetta, M.A.P.C.Celligoi, J.B. Buzato, I.S.Scarmino, "Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*:Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production", Biores Technol, 98, 2824-2828, (2007).

[8] R.Liu, F.Shen, "Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*(CCIC 1308)", Biores Technol, 99, 847-854, (2008).

[9] A.Sues, R.Millati, L.Edebo, M. J. Taherzadeh, "Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*", FEMS Yeast Res, 5, 669-676, (2005).

[10] R.Millati, L.Edebo , M .J. Taherzadeh, "Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates", Enzyme Microb Technol, 36, 294-300, (2005).

[11] K.Karimi, T.Brandberg, L.Edebo, MJ. Taherzadeh. "Fed-batch cultivation of *Mucor indicus* in dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate for ethanol production", Biotechnology letters, 27, 1395-1400, (2005).

[12] P.Ribereau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Doneche, A.Lonvaud, "Handbook of Enology The Microbiology of Wine and Vinification", Wiley,West Sussex, England vol.I,(2000).

[13] K.Karimi, G. Emtiazi, M.J. Taherzadeh, "Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*", Process Biochem, 41, 653-658, (2006).

[14] R.K. Roy, "A Primer on the Taguchi Method", Van Nostrand Reinhold, New York, USA, (1990).

[15] G.P. Casey, Ingledew, W.M. "Ethanol tolerance in yeasts CRC Critical Reviews in Microbiology", 13(3), 219– 280, (1986).

[16] T.W. Nagodawithana, C.Castellano, K.H. Steinkraus, "Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations", Applied Microbiology, 28, 383, (1974).

[17] T.A.McMeckin, J. Olley, D.A. Ratkwsky, T. Ross, "Predictive microbiology:towards the interface and beyond, International Journal of Food Microbiology", 73, 395-407,(2002).

[18] M.Phisalaphong, N. Srirattana, W.Tanthapanichakoon, "Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation", Biochemical Engineering Journal, 28, 36–43, (2006).

[19] M.Moo-Young, "Comprehencive biotechnology", Elsevier science Ltd. 3, 43, 81-879, (1985).

[20] S.B.Jia, "Alcohol Craft (New Edition)", Chemical Industry Press, Beijing, (2005).

[21] S.Hohmann, "Shaping up: The response of yeast to osmotic stress, In: Hohmann, S., Mager, W.H. (Eds.), Yeast stress responses", Springer, Heidelberg, Germany, 101–145, (1997).

[22] S.H. Zheng, F.H. Jiang, "Design of Experiments and Data Processing", Industry and Building Materials Press Of China, Beijing, (2004).

[23] M.J.Taherzadeh, K.Karimi, "Bioethanol: Market and Production Processes, In: Biofuels Refining and Performance by Ahindra Nag", Mc Graw Hill, 69-106, (2008).