

## بهینه‌سازی محیط کشت برای تولید اتانول با استفاده از قارچ موکور همیلیس

حسین اسماعیلی، کیخسرو کریمی\*

اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده مهندسی شیمی

پیام نگار: karimi@cc.iut.ac.ir

### چکیده

در این مطالعه تولید اتانول با استفاده از قارچ موکور همیلیس تحت شرایط بی‌هوازی مورد بررسی قرار گرفت. اثر ترکیبات محیط کشت شامل ویتامین‌ها، فلزات کم مقدار، سولفات روی، کلرید کلسیم، هیدروژن دی پتاسیم فسفات، سولفات آمونیوم، سولفات منیزیم و عصاره مخمر با استفاده از طراحی آزمایشات بروش کسری از فاکتوریل و ترکیب مرکزی بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت عصاره مخمر تأثیر بسیار زیادی بر روی رشد و تولید اتانول دارد. در شرایط بهینه بازدهی تولید اتانول ۰/۴۷ و بازدهی توده زیستی ۰/۱۶ گرم بر هر گرم قند مصرفی به دست آمد. در محیط کشتی که شامل ۳۰ گرم بر لیتر گلوکوز بود غلظت بهینه عصاره مخمر ۴ گرم بر لیتر به دست آمد و نتایج نشان داد که سایر ترکیبات، اثر ناچیزی بر میزان تولید اتانول داشتند. اصلی ترین محصول جانبی، گلیسرول با بازدهی بین ۰/۱۲ تا ۰/۱۵ گرم بر هر گرم قند مصرفی بود.

کلمات کلیدی: اتانول، موکور همیلیس، طراحی آزمایش‌ها، تخمیر، بهینه‌سازی محیط کشت

### ۱- مقدمه

امروزه بیواتانول نقش مهمی را در بازار سوخت جهان ایفا می‌کند. مخمر نان با نام علمی ساکارومایسیس سرویسیه، یکی از مناسب ترین ریز سازواره‌ها برای تولید بیواتانول از مواد نشاسته ای و قندی است. با وجود این، عدم توانایی آن برای مصرف پنتوزها بسیاری از محققین را بر آن داشته تا از گونه‌های دیگر موجود یا تغییر ژنتیکی یافته برای جایگزینی ساکارومایسیس سرویسیه برای تولید اتانول استفاده کنند. قارچ‌ها فیلامنتوس از نوع فوساریوم، موکور، مونیلیا، رازیوپوس و پاسیلومایسیس قارچ‌هایی هستند که قادرند پنتوزها را به اتانول تخمیر کنند [۱ و ۲]. موکور همیلیس نوعی قارچ فیلامنتوس است که بسیاری از آنزیم‌ها شامل پروتیناز، گلوکاناز، فسفولیپاز، لیپاز

و استیل گلوکوسامینیداز را تولید می‌کند [۳]. موکور همیلیس دارای مزیت‌هایی در مقایسه با بقیه ریزسازواره‌ها برای تولید اتانول می‌باشد که شامل (۱) استفاده از طیف وسیعی از مونوساکاریدها شامل پنتوزها مثل زایلوز و آرابینوز، (۲) داشتن مقدار قابل توجهی کیتوزان در دیواره سلولی که ماده بسیار با ارزشی است و (۳) قادر بودن به رشد در دماهای بالاتر در مقایسه با مخمر نان می‌باشد. کیتوزان یک جامد بی‌شکل بوده که در آب نامحلول می‌باشد ولی در اسیدهای آلی مثل اسید استیک و اسید فرمیک محلول است. کیتوزان در بسیاری از صنایع، داروها و مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کیتوزان را می‌توان از پوست آبزیان سخت پوست و یا از توده زیستی قارچ‌های فیلامنتوس تولید کرد [۴].

گرفته است. این قارچ در محیط کشتی شامل گلوکوز، عصاره مخمر، آگار و پپتون با غلظت‌های به ترتیب ۲۰، ۱۰، ۲۰ و ۱۰ (گرم در لیتر) و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز رشد داده شد و پس از آن در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. کشت‌های مایع در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری که شامل ۱۰۰ میلی لیتر محلول بود، انجام شد. محیط کشت حاوی محلول ویتامین، محلول فلزات کم مقدار، سولفات روی، کلرید کلسیم، هیدروژن دی پتاسیم فسفات، سولفات آمونیوم و سولفات منیزیم با غلظت‌های مختلف بود. مقادیر مواد محیط کشت بعنوان متغیر در طراحی آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. طراحی آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار MINITAB انجام شد. پس از تهیه محیط کشت مایع، ارلنها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شده و پس از سرد شدن اسپور قارچ با غلظت  $10^6 \times (\pm 1)5$  بر میلی لیتر به آن تلقیح شد. پس از آن کشت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، تحت شرایط بی‌هوایی و با دور ۱۱۰ دور بر دقیقه در گرمخانه همزن دار انجام شد. شرایط بی‌هوایی با استفاده از لوپ بی‌هوایی برقرار شد و در ابتدای کشت بی‌هوایی و در طول نمونه‌گیری از گاز نیتروژن خالص استفاده شد.

محلول فلزات کم مقدار (TMS)<sup>۵</sup> شامل ترکیبات زیر بود:

EDTA (۳ گرم در لیتر)، کلرید کلسیم ۲ آب (۰/۹ گرم در لیتر)، سولفات آهن ۷ آب (۰/۶ گرم در لیتر)، کلرید منگنز ۲ آب (۰/۱۶ گرم در لیتر)،  $H_3BO_3$  (۰/۲ گرم در لیتر)،  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (۰/۰۸ گرم در لیتر)،  $CoCl_2 \cdot 2H_2O$  (۰/۰۶ گرم در لیتر)، پتاسیم (۰/۰۲ گرم در لیتر)،  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (۰/۰۶ گرم در لیتر)

محلول ویتامین نیز شامل ترکیبات زیر بود:

بیوتین (۰/۰۵ گرم در لیتر)، اسید پارا بنزوئیک (۰/۲ گرم در لیتر)، اسید نیکوتینیک (۱ گرم در لیتر)، پانتوتنات کلسیم (۱ گرم در لیتر)، پیریدوکسین (۱ گرم در لیتر)، اینوسیتول (۲۵ گرم در لیتر)، تیامین (۱ گرم در لیتر).

مقادیر عناصر کم مقدار و ویتامین‌ها به‌صورت متغیر در طراحی آزمایش‌ها در نظر گرفته شده‌اند.

میلاتی و همکارانش [۱] برای تولید اتانول از ماکورهمیلیس در حالت هوایی استفاده و بازدهی تولید اتانول برابر با ۰/۳۹ و ۰/۴۴ گرم بر گرم به ترتیب از سوبسترای گلوکوز و هیدرولیزیت اسیدی رقیق چوب به دست آوردند. آنها برای رسیدن به بازدهی بالا از یک محیط کشت بسیار غنی که شامل ۷/۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم، ۳/۵ گرم بر لیتر دی هیدروژن پتاسیم فسفات، ۰/۷۴ گرم بر لیتر سولفات منیزیم، ۱ گرم بر لیتر کلرید کلسیم، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۰ میلی لیتر بر لیتر فلزات کم مقدار بود استفاده نمودند. با وجود خواص قابل توجه ماکورهمیلیس، اطلاعاتی در ارتباط با اثر ترکیب محیط کشت این قارچ بر روی میزان تولید اتانول توسط آن وجود ندارد.

با استفاده از روش طراحی آزمایش‌ها می‌توان چندین عامل مختلف در ترکیب محیط کشت را مورد مطالعه قرار داد. تقریب‌های آماری در طراحی آزمایش‌ها ابزار قدرتمندی را برای مطالعه و بهینه‌سازی چند متغیر مهیا می‌کند. روش‌های طراحی فاکتوریل کامل<sup>۱</sup>، کسری از فاکتوریل<sup>۲</sup> و ترکیب مرکزی (CCRD)<sup>۳</sup> عمومی‌ترین روش‌های مورد استفاده برای آنالیز فرایند و مدل‌سازی می‌باشند [۵]. هنگامی که تعداد متغیرها و پاسخ‌ها افزایش می‌یابد، روش ترکیب مرکزی نیاز به تعداد آزمایش‌های کمتری در مقایسه با دیگر روش‌ها دارد و در عین حال اطلاعات بیشتری نسبت به سایر روش‌ها در اختیار می‌گذارد [۶].

هدف اصلی از این تحقیق بهینه‌سازی تولید اتانول و توده زیستی با استفاده از قارچ ماکورهمیلیس می‌باشد. اثر محلول ویتامین‌ها، محلول فلزات کم مقدار، سولفات روی، کلرید کلسیم، هیدروژن دی پتاسیم فسفات، سولفات آمونیوم و سولفات منیزیم مورد مطالعه قرار گرفته و مؤثرترین ترکیبات برای بهینه‌سازی با استفاده از روش طراحی آزمایش‌ها به‌دست آمده‌اند.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱ نوع قارچ و محیط کشت آن

در این مطالعه قارچ ماکورهمیلیس<sup>۴</sup> با مشخصه CCUG16148 (کلکسیون میکروبی دانشگاه گوتنبرگ، سوئد) مورد استفاده قرار

1. Full Factorial Design  
2. Fractional Factorial Design  
3. Central Composite Rotatable Design  
4. *Mucor Hiemalis*

5. Trace Metal Solution

## ۲-۲ روش‌های آنالیز

دستگاه HPLC مورد استفاده در این تحقیق ساخت شرکت Jasco ژاپن سری ۹۰۰ بود. نمونه مورد آنالیز با تزریق دستی وارد پیش ستون و بعد از ستون شده و در حین عبور از آشکارسازهای (UV/Vis) و RI آنالیز شدند و پیک‌های مربوطه توسط نرم‌افزار Browin نسخه ۱/۵ رسم و سطح زیر آنها محاسبه گردید. برای آنالیز محصولات از دو ستون استفاده شد. با استفاده از ستون Aminex (HPX-87H) محصول اصلی اتانول و محصولات جانبی گلیسرول، اسید سوکسینیک، گلوکوز، اسید استیک و اسید لاکتیک جداسازی شد. جریان حامل این ستون، محلول اسید سولفوریک ۵ میلی مولار در دمای ۶۵ درجه سلسیوس و با شدت جریان ۰/۶ میلی لیتر بر دقیقه بود. برای آنالیز قندهای گلوکوز، زایلوز، گالاکتوز، آرابینوز و مانوز از ستون Aminex (HPX-87 P) استفاده شد. جریان حامل این ستون عبارت از آب بدون یون در دمای ۸۰ درجه سلسیوس و با شدت جریان یک میلی لیتر بر دقیقه بود. برای تعیین وزن توده زیستی خشک، ابتدا توده زیستی توسط کاغذهای صافی به اندازه ۰/۴۵ میکرومتر از نوع واتمن جدا گردید و سپس با آب مقطر شسته شد و در نهایت قبل از وزن کردن، در دستگاه کوره به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس خشک شد. همه آزمایش‌ها دو بار انجام شد و مقادیر تکرارها در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت.

## ۳-۲ آنالیز آماری

روش‌های آماری شامل طراحی به روش کسری از فاکتوریل و طراحی ترکیب مرکزی (CCRD) بود که برای تعیین اثر ۸ متغیر شامل: محلول ویتامین، محلول فلزی، سولفات روی، کلرید کلسیم، عصاره مخمر، سولفات منیزیم، هیدروژن دی پتاسیم فسفات و سولفات آمونیوم مورد استفاده قرار گرفت. در تمام آزمایش‌ها متغیر پاسخ برای طراحی، بازدهی تولید اتانول بود. هدف از این بخش، یافتن بهترین ترکیب محیط کشت برای تولید حداکثر اتانول بود. روش طراحی کسری از فاکتوریل در این سری آزمایش‌ها شامل ۵ عامل و ۲ سطح بود که در جدول (۱) به صورت کد استاندارد آورده شده است. در جدول (۲) طراحی و نتایج حاصل از آزمایش‌ها بر اساس مقادیر کد شده حاصل از جدول (۱) نشان داده شده است. مطابق جدول (۲) این عامل‌ها غلظت‌های سولفات روی، محلول فلزی، محلول ویتامین، کلرید کلسیم و عصاره مخمر بودند که به ترتیب با  $X_5$ ,  $X_4$ ,  $X_3$ ,  $X_2$ ,  $X_1$  مشخص شده اند. در این آزمایش‌ها سایر مواد دارای غلظت ثابتی بودند، این مواد شامل دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سولفات آمونیوم، سولفات منیزیم و گلوکوز با غلظت‌های به ترتیب ۳/۵، ۷/۵، ۰/۷۵ و ۳۰ گرم در لیتر بودند.

جدول ۱- مقادیر کد شده متغیرها با استفاده از روش کسری از فاکتوریل

متغیرهای کد شده					شماره آزمایش
$X_5$	$X_4$	$X_3$	$X_2$	$X_1$	
عصاره مخمر	کلرید کلسیم	محلول ویتامین	محلول فلزی	سولفات روی	
۱	۱	-۱	-۱	۱	۱
۱	۱	۱	-۱	-۱	۲
۱	-۱	-۱	-۱	-۱	۳
-۱	-۱	۱	۱	۱	۴
-۱	-۱	-۱	-۱	۱	۵
-۱	۱	-۱	-۱	-۱	۶
۱	-۱	۱	۱	-۱	۷
-۱	۱	۱	۱	-۱	۸
۱	-۱	-۱	۱	۱	۹
-۱	-۱	۱	-۱	-۱	۱۰
-۱	۱	-۱	۱	۱	۱۱
-۱	۱	۱	-۱	۱	۱۲
-۱	-۱	-۱	۱	-۱	۱۳
۱	-۱	۱	-۱	۱	۱۴
۱	۱	۱	۱	۱	۱۵
۱	۱	-۱	۱	-۱	۱۶

جدول ۲- مطالعه اثر غلظت‌های سولفات روی، محلول فلزی، محلول ویتامین، کلرید کلسیم و عصاره مخمر (گرم بر لیتر) بر روی محصولات تخمیری به روش طراحی کسری از فاکتوریل

شماره آزمایش	متغیرها (گرم بر لیتر)							بازده محصولات (گرم بر گرم)
	عصاره مخمر (X <sub>5</sub> )	کلرید کلسیم (X <sub>4</sub> )	محلول ویتامین (X <sub>3</sub> )	فلزات کم مقدار (X <sub>2</sub> )	سولفات روی (X <sub>1</sub> )	توده زیستی	گلیسرول	
۱	۵	۱	۰	۰	۰/۲۵	۰/۱۳	۰/۰۴۵	۰/۴۱
۲	۵	۱	۱	۰	۰	۰/۱۲	۰/۰۴۸	۰/۴۲
۳	۵	۰	۰	۰	۰	۰/۰۵	۰/۰۴۵	۰/۳۹
۴	۰	۰	۱	۱	۰/۲۵	۰/۱۱	۰/۰۴۵	۰/۱۸
۵	۰	۰	۰	۱	۰/۲۵	۰/۱۱	۰/۰۱۹	۰/۱۲
۶	۰	۱	۰	۰	۰	۰/۰۸	۰/۰۲۶	۰/۱۳
۷	۵	۰	۱	۱	۰	۰/۱۲	۰/۰۴۸	۰/۳۸
۸	۰	۱	۱	۱	۰	۰/۰۹	۰/۰۳۸	۰/۲۰
۹	۵	۰	۰	۱	۰/۲۵	۰/۰۷	۰/۰۴۱	۰/۳۴
۱۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰/۱۰	۰/۰۲۹	۰/۱۹
۱۱	۰	۱	۰	۱	۰/۲۵	۰/۰۷	۰/۰۳۲	۰/۱۵
۱۲	۰	۱	۱	۰	۰/۲۵	۰/۰۹	۰/۰۴۹	۰/۱۷
۱۳	۰	۰	۰	۱	۰	۰/۰۸	۰/۰۲۷	۰/۱۳
۱۴	۵	۰	۱	۰	۰/۲۵	۰/۱۰	۰/۰۴۵	۰/۳۶
۱۵	۵	۱	۱	۱	۰/۲۵	۰/۱۱	۰/۰۵۶	۰/۴۱
۱۶	۵	۱	۰	۱	۰	۰/۰۵	۰/۰۴۶	۰/۳۸

بودند. نتایج حاصل از این آزمایش‌ها نیز در جدول (۴) نمایش داده شده است. تعداد آزمایش‌های مورد نیاز با در نظر گرفتن مبدأ آن در مرکز، به صورت مجموع  $2^k$  کسری از فاکتوریل است. همچنین تعداد  $2k$  آزمایش به صورت محوری به همراه تعدادی آزمایش مکرر در مرکز در نظر گرفته می‌شود، که در اینجا  $k$  تعداد متغیرهاست. مقادیر متغیرها به صورت  $\pm 1$  برای نقاط کسری از فاکتوریل، صفر برای نقاط مرکزی و  $\pm 2$  برای نقاط محوری، می‌باشد [۶].

در مرحله بعد، غلظت‌های کلرید کلسیم، عصاره مخمر، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سولفات آمونیوم و سولفات منیزیم در ۵ سطح مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور از روش CCRD استفاده شد. تعداد ۳۲ آزمایش طراحی شد که در جدول (۳) به صورت کد استاندارد نشان داده شده است. در این جدول متغیرهای  $X_1, X_2, X_3, X_4$  و  $X_5$  به ترتیب سولفات آمونیوم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سولفات منیزیم، کلرید کلسیم و عصاره مخمر

جدول ۳- مقادیر کد شده متغیرها با استفاده از روش طراحی سطح پاسخ

متغیرها					شماره آزمایش
$X_5$	$X_4$	$X_3$	$X_2$	$X_1$	
عصاره مخمر	کلرید کلسیم	سولفات منیزیم	دی پتاسیم هیدروژن فسفات	سولفات آمونیوم	
۰	۰	۰	۰	۰	۱
۰	۰	۰	۰	-۲	۲
-۱	-۱	۱	۱	۱	۳
-۱	-۱	-۱	۱	-۱	۴
۱	۱	۱	-۱	-۱	۵
۱	۱	-۱	۱	-۱	۶
۰	۰	۰	۲	۰	۷
۱	-۱	-۱	۱	۱	۸
-۱	۱	۱	-۱	۱	۹
-۱	۱	-۱	-۱	-۱	۱۰
۰	-۲	۰	۰	۰	۱۱
۱	-۱	۱	-۱	۱	۱۲
۰	۰	۰	۰	۰	۱۳
۰	۲	۰	۰	۰	۱۴
۰	۰	۰	-۲	۰	۱۵
-۱	۱	-۱	۱	۱	۱۶
۱	-۱	-۱	-۱	-۱	۱۷
۰	۰	۰	۰	۰	۱۸
۲	۰	۰	۰	۰	۱۹
۱	-۱	۱	۱	-۱	۲۰
۱	۱	۱	۱	۱	۲۱
۰	۰	-۲	۰	۰	۲۲
۰	۰	۰	۰	۰	۲۳
۰	۰	۲	۰	۰	۲۴
-۱	-۱	-۱	-۱	۱	۲۵
۰	۰	۰	۰	۲	۲۶
-۲	۰	۰	۰	۰	۲۷
۱	۱	-۱	-۱	۱	۲۸
-۱	-۱	۱	-۱	-۱	۲۹
-۱	۱	۱	۱	-۱	۳۰
۰	۰	۰	۰	۰	۳۱
۰	۰	۰	۰	۰	۳۲

جدول ۴- مطالعه اثر ترکیبات محیط کشت بر روی محصولات تخمیری با استفاده از طراحی آزمایش‌ها به روش CCRD

بازدهی محصولات (گرم بر گرم)			متغیرها (گرم بر لیتر)					شماره آزمایش
اتانول	گلیسرول	توده زیستی	عصاره مخمر (X <sub>3</sub> )	کلرید کلسیم (X <sub>4</sub> )	سولفات منیزیم (X <sub>5</sub> )	دی پتاسیم هیدروژن فسفات (X <sub>2</sub> )	سولفات آمونیوم (X <sub>1</sub> )	
۰/۴۶	۰/۰۵۶	۰/۱۴	۴	۰/۵	۰/۵	۳	۵	۱
۰/۴۵	۰/۰۶۰	۰/۰۴	۴	۰/۵	۰/۵	۳	۰	۲
۰/۴۶	۰/۰۴۷	۰/۰۴	۲	۰/۲۵	۰/۷۵	۴/۵	۷/۵	۳
۰/۴۵	۰/۰۵۳	۰/۰۷	۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۴/۵	۲/۵	۴
۰/۴۷	۰/۰۵۶	۰/۱۲	۶	۰/۷۵	۰/۷۵	۱/۵	۲/۵	۵
۰/۴۷	۰/۰۵۱	۰/۱۷	۶	۰/۷۵	۰/۲۵	۴/۵	۲/۵	۶
۰/۴۷	۰/۰۵۳	۰/۱۰	۴	۰/۵	۰/۵	۶	۵	۷
۰/۴۷	۰/۰۵۵	۰/۱۱	۶	۰/۲۵	۰/۲۵	۴/۵	۷/۵	۸
۰/۴۶	۰/۰۵۳	۰/۰۸	۲	۰/۷۵	۰/۷۵	۱/۵	۷/۵	۹
۰/۴۴	۰/۰۵۸	۰/۰۸	۲	۰/۷۵	۰/۲۵	۱/۵	۲/۵	۱۰
۰/۴۵	۰/۰۵۷	۰/۰۶	۴	۰	۰/۵	۳	۵	۱۱
۰/۴۷	۰/۰۵۸	۰/۱۲	۶	۰/۲۵	۰/۷۵	۱/۵	۷/۵	۱۲
۰/۴۶	۰/۰۵۲	۰/۱۲	۴	۰/۵	۰/۵	۳	۵	۱۳
۰/۴۷	۰/۰۶۱	۰/۰۶	۴	۱	۰/۵	۳	۵	۱۴
۰/۴۵	۰/۰۵۷	۰/۱۹	۴	۰/۵	۰/۵	۰	۵	۱۵
۰/۴۵	۰/۰۶۲	۰/۰۵	۲	۰/۷۵	۰/۲۵	۴/۵	۷/۵	۱۶
۰/۴۵	۰/۰۶۱	۰/۰۴	۶	۰/۲۵	۰/۲۵	۱/۵	۲/۵	۱۷
۰/۴۶	۰/۰۵۱	۰/۰۹	۴	۰/۵	۰/۵	۳	۵	۱۸
۰/۴۵	۰/۰۵۱	۰/۱۷	۸	۰/۵	۰/۵	۳	۵	۱۹
۰/۴۶	۰/۰۵۸	۰/۱۲	۶	۰/۲۵	۰/۷۵	۴/۵	۲/۵	۲۰
۰/۴۷	۰/۰۵۳	۰/۱۳	۶	۰/۷۵	۰/۷۵	۴/۵	۷/۵	۲۱
۰/۴۶	۰/۰۶۷	۰/۱	۴	۰/۵	۰	۳	۵	۲۲
۰/۴۶	۰/۰۴۷	۰/۱۱	۴	۰/۵	۰/۵	۳	۵	۲۳
۰/۴۴	۰/۰۵۰	۰/۰۸	۴	۰/۵	۱	۳	۵	۲۴
۰/۴۵	۰/۰۴۸	۰/۱۰	۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۱/۵	۷/۵	۲۵
۰/۴۷	۰/۰۴۸	۰/۱۶	۴	۰/۵	۰/۵	۳	۱۰	۲۶
۰/۱	۰/۰۱۵	۰/۰۴	۰	۰/۵	۰/۵	۳	۵	۲۷
۰/۴۷	۰/۰۶۰	۰/۱۳	۶	۰/۷۵	۰/۲۵	۱/۵	۷/۵	۲۸
۰/۴۴	۰/۰۶۰	۰/۰۷	۲	۰/۲۵	۰/۷۵	۱/۵	۲/۵	۲۹
۰/۴۵	۰/۰۶۰	۰/۱	۲	۰/۷۵	۰/۷۵	۴/۵	۲/۵	۳۰
۰/۴۶	۰/۰۶۰	۰/۱	۴	۰/۵	۰/۵	۳	۵	۳۱
۰/۴۶	۰/۰۵۴	۰/۱	۴	۰/۵	۰/۵	۳	۵	۳۲

کلرید کلسیم، سولفات منیزیم، محلول ویتامین، محلول فلزی، سولفات روی، دی پتاسیم هیدروژن فسفات و سولفات آمونیوم بودند.

مقادیر بهینه برای متغیرهای انتخاب شده با استفاده از نرم‌افزار MINITAB به دست آمد. متغیر پاسخ در این آزمایش‌ها بازدهی تولید اتانول و متغیرهای مستقل شامل غلظت‌های عصاره مخمر،

## ۳- نتایج

## ۳-۱ اثرات عناصر جزیی و ویتامین ها

موکور همیلیس در محیط حاوی ۳۰ گرم بر لیتر از گلوکوز در ارلن‌هایی که در دمای ۳۰°C و pH=۵/۵ قرار داشتند، تحت شرایط بی‌هوایی و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. در سری اول آزمایش‌ها اثر سولفات روی، فلزات کم مقدار، محلول ویتامین، کلرید کلسیم و عصاره مخمر بر روی محیط کشت این قارچ که غلظت ترکیبات ثابت آن آورده شد، مورد بررسی قرار گرفت. در این سری آزمایش‌ها، ترکیبات دیگر دارای غلظت ثابتی بودند که شامل سولفات آمونیوم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سولفات منیزیم به ترتیب با غلظت‌های ۷/۵، ۳/۵ و ۰/۷۵ گرم بر لیتر بودند [۷]. نتایج حاصل از این آزمایش‌ها در جدول (۲) آورده شده است.

آنالیز آماری این آزمایش‌ها شامل مقادیر تخمین زده شده عامل‌ها، ضرایب، عبارت‌های برهم کنشی، ضریب t و مقادیر p در جدول (۵)

نشان داده شده است.  $X_1$ ،  $X_2$ ،  $X_3$ ،  $X_4$  و  $X_5$  به ترتیب غلظت‌های محلول فلزی، سولفات روی، کلرید کلسیم، عصاره مخمر و محلول ویتامین می‌باشند.  $X_{ij}$  بیانگر برهم کنش مرتبه اول مابین  $X_i$  و  $X_j$  می‌باشد. مقادیر بزرگتر ضریب t و مقادیر کوچکتر p نشان‌دهنده اهمیت بیشتر ضرایب می‌باشد به طوری که مقادیر p کوچکتر از ۰/۰۵ برای یک متغیر، نشان‌دهنده اهمیت آن متغیر می‌باشد. آنالیز نتایج نشان می‌دهد که عصاره مخمر و کلرید کلسیم دارای اهمیت بیشتری برای تولید اتانول هستند زیرا مقدار p برای آنها کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد. برای سایر عوامل، p بزرگتر از ۰/۰۵ است و به همین دلیل این عوامل، تأثیر ناچیزی بر روی بازدهی تولید اتانول داشتند (جدول (۵)). بنابراین نتایج نشان می‌دهند که محلول فلزی، محلول ویتامین و سولفات روی بر بازدهی تولید اتانول و توده زیستی اثر خیلی ناچیزی داشتند.

## جدول ۵- تخمین ضرائب مدل به وسیله رگرسیون خطی چندگانه برای بازدهی تولید اتانول

به وسیله روش طراحی کسری از فاکتوریل

متغیرهای مورد استفاده	عدد - P	عدد - t	ضریب
ثابت	۰	۳۷/۷۸	۰/۲۷۳۲۳
$X_1$	۰/۴۳۲	۰/۸۱	۰/۰۰۵۸۳
$X_2$	۰/۱۴۶	-۱/۵۳	-۰/۰۱۱۰۴
$X_3$	۰/۰۱۱	۲/۸۹	۰/۰۲۰۹۴
$X_4$	۰	۱۶/۱۸	۰/۱۱۷۰۵
$X_5$	۰/۱۲۱	۱/۶۴	۰/۰۱۱۸۴
$X_{12}$	۰/۲۶۷	۱/۱۵	۰/۰۰۸۳۱
$X_{13}$	۰/۷۵۷	-۰/۳۱	-۰/۰۰۲۲۸
$X_{14}$	۰/۱۶۶	-۱/۴۵	-۰/۰۱۰۵۱
$X_{15}$	۰/۴۷۵	۰/۷۳	۰/۰۰۵۲۹
$X_{23}$	۰/۱۴۱	۱/۵۵	۰/۰۱۱۲
$X_{24}$	۰/۶۵۹	-۰/۴۵	-۰/۰۰۳۲۶
$X_{25}$	۰/۹۲۴	-۰/۱	-۰/۰۰۰۰۷
$X_{34}$	۰/۲۹	۱/۰۹	۰/۰۰۷۹۲
$X_{35}$	۰/۵۸	۰/۵۶	۰/۰۰۴۰۹
$X_{45}$	۰/۰۸	-۱/۸۷	-۰/۰۱۳۹۲

با توجه به جدول (۵) ارتباط مابین متغیرها و بازدهی تولید اتانول به صورت رابطه (۱) می‌باشد.

$$Y_{eth} = 0/27 + 0/006X_1 - 0/01X_2 + 0/02X_3 + 0/117X_4 + 0/01X_5 + 0/01X_{12} - 0/002X_{13} - 0/01X_{14} + 0/005X_{15} + 0/01X_{23} - 0/003X_{24} - 0/0007X_{25} + 0/008X_{34} + 0/004X_{35} - 0/013X_{45} \quad (1)$$

آنالیز واریانس مربوط به این آزمایش‌ها نیز در جدول (۶) نشان داده شده است.

جدول ۶- آنالیز واریانس برای دو مدل درجه دوم بازدهی اتانول با استفاده از روش طراحی کسری از فاکتوریل

F	P	درجه آزادی	مجموع مربعات متوالی	مجموع مربعات تنظیم شده	مربعات میانگین تنظیم شده	منبع
۵۵/۱۸	۰	۵	۰/۴۶۲	۰/۴۶۲	۰/۰۹۲۴	اثرات اصلی
۱/۱۷	۰/۳۷۷	۱۰	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۰۱۹	بر هم کنش دو مرحله ای
		۱۶	۰/۰۲۷	۰/۰۲۷	۰/۰۰۱۶۷	خطای باقیمانده
		۱۶	۰/۰۲۷	۰/۰۲۷	۰/۰۰۱۶۷	خطای خالص
		۳۱	۰/۵۰۸			مجموع

(۷) نشان می‌دهد که سولفات آمونیوم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سولفات منیزیم و کلرید کلسیم اثر خیلی ناچیزی بر بازدهی تولید اتانول دارند، در حالی که عصاره مخمر جزء بسیار مؤثری می‌باشد. در جدول (۷) متغیرهای شامل  $X_1, X_2, X_3, X_4$  و  $X_5$  به ترتیب غلظت‌های سولفات آمونیوم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سولفات منیزیم، کلرید کلسیم و عصاره مخمر می‌باشند.  $X_{ij}$  نیز بیانگر بر هم کنش مرتبه اول مابین  $X_i$  و  $X_j$  می‌باشد. با توجه به جدول (۷) ارتباط مابین متغیرها و بازدهی تولید اتانول به صورت رابطه (۲) می‌باشد.

$$Y_{eth} = 0/285 - 0/01X_1 - 0/02X_2 - 0/09X_3 + 0/035X_4 + 0/1X_5 + 0/0007X_1^2 + 0/006X_2^2 + 0/025X_3^2 + 0/115X_4^2 - 0/01X_5^2 - 0/0004X_{12} + 0/03X_{13} - 0/017X_{14} - 0/0004X_{15} - 0/013X_{23} - 0/02X_{24} - 0/0002X_{25} - 0/023X_{34} - 0/005X_{35} + 0/002X_{45} \quad (2)$$

تنها ۵٪ از کل تغییرات توسط مدل قابل پیش بینی نیست زیرا  $R^2 = ۰/۹۵$  می‌باشد که تطبیق خیلی خوبی بین معادله داده شده و مقدار به دست آمده توسط آزمایش دارد.

### ۳-۲ اثر مواد غذایی اصلی

در این سری آزمایش‌ها، اثر غلظت‌های سولفات آمونیوم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سولفات منیزیم و دو ماده مشخص شده در قسمت قبل، یعنی کلرید کلسیم و عصاره مخمر مورد بررسی قرار گرفتند. روش طراحی سطحی پاسخ برای بهینه کردن محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت که در جدول (۴) ارائه شده است. در همه این آزمایش‌ها، غلظت گلوکوز، مدت کشت و دمای محیط کشت به ترتیب برابر ۳۰ گرم در لیتر، ۲۴ ساعت و  $30^\circ\text{C}$  در نظر گرفته شده و نتایج بازدهی تولید اتانول، گلیسرول و توده زیستی در جدول (۴) نشان داده شده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری مندرج در جدول



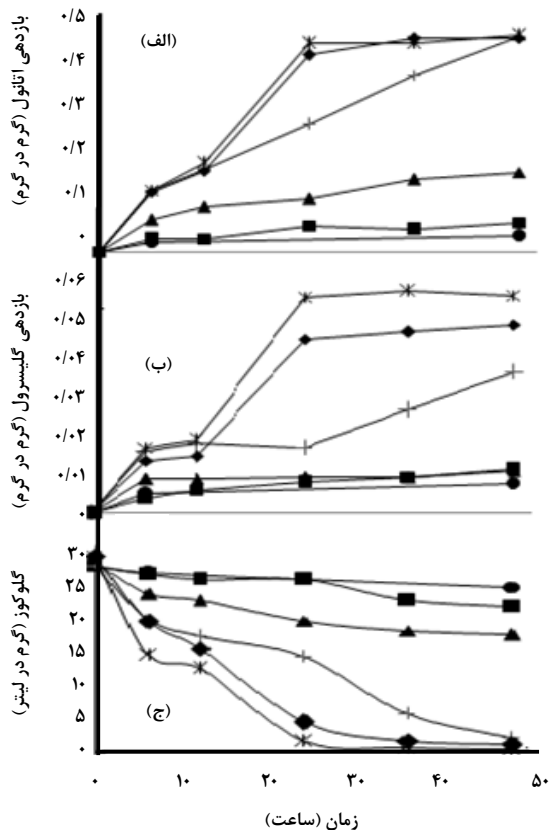
جدول ۷- تخمین ضرائب مدل بوسیله رگرسیون خطی چندگانه برای بازدهی تولید اتانول به وسیله روش سطح پاسخ

متغیرهای مورد استفاده	عدد - P	عدد - t	ضریب
عدد ثابت	۰/۲۴۶	۱/۲۲۳	۰/۲۸۴۸
X <sub>1</sub>	۰/۷۴۵	-۰/۳۳۳	-۰/۰۱۰۸
X <sub>2</sub>	۰/۷۴۸	-۰/۳۳	-۰/۰۲۰۸
X <sub>3</sub>	۰/۷۸۶	-۰/۲۷۸	-۰/۰۸۹۹
X <sub>4</sub>	۰/۹۱۴	۰/۱۱۱	۰/۰۳۵۹
X <sub>5</sub>	۰/۰۲۷	۲/۵۴۴	۰/۱۰۲۸
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	۰/۷۲۷	-۰/۳۵۸	۰/۰۰۰۷
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	۰/۳۸۹	-۰/۸۹۷	۰/۰۰۶۲
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	۰/۸۹۵	۰/۱۳۵	۰/۰۲۵۶
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	۰/۵۵۸	۰/۶۰۵	۰/۱۱۴۸
X <sub>5</sub> <sup>2</sup>	۰/۰۰۵	-۳/۴۶۹	-۰/۰۱۰۳
X <sub>12</sub>	۰/۹۲۶	-۰/۰۹۴	-۰/۰۰۰۴
X <sub>13</sub>	۰/۲۸۳	۱/۱۲۹	۰/۰۲۸۹
X <sub>14</sub>	۰/۵۱۵	-۰/۶۷۳	-۰/۰۱۷۳
X <sub>15</sub>	۰/۹۱	-۰/۱۱۵	-۰/۰۰۰۴
X <sub>23</sub>	۰/۷۶۶	-۰/۳۰۴	-۰/۰۱۳
X <sub>24</sub>	۰/۶۳۱	-۰/۴۹۳	-۰/۰۲۱۱
X <sub>25</sub>	۰/۹۷۵	-۰/۰۳۱	-۰/۰۰۰۲
X <sub>34</sub>	۰/۹۲۹	-۰/۰۹۱	-۰/۰۲۳۵
X <sub>35</sub>	۰/۸۶۸	-۰/۱۶۹	-۰/۰۰۵۴
X <sub>45</sub>	۰/۹۴۳	۰/۰۷۳	۰/۰۰۲۴

آنالیز واریانس مربوط به این آزمایش‌ها نیز در جدول (۸) نشان داده شده است.

جدول ۸- آنالیز واریانس برای دو مدل درجه دوم بازدهی اتانول با استفاده از روش طراحی سطح پاسخ

منبع	مربعات میانگین تنظیم شده	مجموع مربعات تنظیم شده	مجموع مربعات تناوبی	درجه آزادی	P	F
رگرسیون	۰/۰۰۴۶	۰/۰۹۲۵	۰/۰۹۲۵	۲۰	۰/۴۳۴	۱/۱۳
باقیمانده	۰/۰۰۴۱۱	۰/۰۴۵۲	۰/۰۴۵۲	۱۱		
مجموع		۰/۱۳۷۶		۳۱		



شکل ۱- نمودارهای بازدهی تولید اتانول (الف)، بازدهی تولید گلیسرول (ب) و غلظت گلوکوز (ج) با افزودن غلظت‌های مختلف از عصاره مخمر. نشانه‌ها شامل عصاره مخمر با غلظت‌های ۰ گرم بر لیتر (●)، ۰/۵ گرم بر لیتر (■)، ۱ گرم بر لیتر (▲)، ۲ گرم بر لیتر (+)، ۴ گرم بر لیتر (●) و ۶ گرم بر لیتر (\*) می‌باشند.

محصولات زیستی متنوعی بوده و توده زیستی آن نیز شامل مقدار زیادی کیتوزان است [۱۴ و ۱۳ و ۱۱ و ۳ و ۱]. تولید اتانول به وسیله موکور همیلیس بر حسب بازدهی و سرعت تولید، قابل مقایسه با مخمر نان می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک جایگزین برای ساکارومایسیس سرویسیه برای تولید اتانول در نظر گرفته شود [۸ و ۱]. میلاتی و همکارانش [۱] تولید اتانول با استفاده از گونه مشابه را آزمایش کردند و بازدهی تولید اتانول را برابر با ۰/۳۹ گرم بر گرم در محیط با سوبسترای گلوکوز و همچنین بازدهی اتانول برابر با ۰/۴۴ گرم بر گرم در محلول هیدرولیزیت اسیدی رقیق چوب به دست آوردند. با این وجود، این بازدهی تولید، بر روی یک محیط کشت غنی که شامل ۷/۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم، ۳/۵ گرم بر

تنها ۲۰٪ از کل تغییرات توسط مدل قابل پیش بینی نیست زیرا  $R^2 = 0.80$  می‌باشد که تطبیق نسبتاً خوبی بین معادله داده شده و مقدار به دست آمده توسط آزمایش را نشان می‌دهد. البته این انحراف در بعضی نقاط، خیلی کمتر از این مقدار نیز می‌باشد و در کل رابطه (۲) معتبر است.

کمترین بازدهی اتانول ۰/۱ گرم بر گرم گلوکوز مصرفی بود و زمانی این بازدهی به دست آمد که هیچ عصاره مخمری در محیط کشت وجود نداشت. بازدهی اتانول در آزمایش‌های دیگر مابین ۰/۴۴ تا ۰/۴۷ گرم اتانول به ازای هر گرم گلوکوز مصرفی به دست آمد که نشان‌دهنده اهمیت بسیار زیاد عصاره مخمر در محیط کشت بود.

### ۳-۳ بهینه‌سازی غلظت عصاره مخمر

اثر عصاره مخمر در محیط کشتی که شامل غلظت ثابتی از گلوکوز (۳۰ گرم در لیتر) بوده توسط قارچ موکور همیلیس مورد بررسی قرار گرفت. در این محیط کشت‌ها علاوه بر گلوکوز که در تمام نمونه‌ها دارای غلظت ثابت بود، عصاره مخمر با غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. وجود عصاره مخمر با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶ گرم بر لیتر در محیط کشت موجب تولید توده زیستی این قارچ به ترتیب برابر با ۰/۰۳، ۰/۱، ۰/۱۴، ۰/۱۶، ۰/۲۴ و ۰/۲۶ گرم بر لیتر پس از مدت ۴۸ ساعت شد. نمودارهای بازدهی تولید اتانول، بازدهی گلیسرول و غلظت گلوکوز مصرفی حاصل از این آزمایش‌ها در شکل (۱) آورده شده است.

قارچ موکور همیلیس در محیط کشتی که شامل ۲ گرم در لیتر عصاره مخمر بود، در مدت ۴۸ ساعت نتوانست تمامی گلوکوز موجود را مصرف کند. ولی هنگامی که محیط کشت شامل غلظت‌های ۴ یا ۶ گرم در لیتر عصاره مخمر بود، قارچ، تمام گلوکوز موجود در محیط کشت را در مدت زمان ۲۴ ساعت مصرف کرد (شکل (۱) - ج). با وجود این، موکور همیلیس نیاز به زمان طولانی تر برای مصرف کامل گلوکوز در حضور ۲ گرم بر لیتر عصاره مخمر داشت.

### ۴- بحث

موکور همیلیس یک قارچ از نوع زیگوماپست است که قادر به رشد به صورت هوازی یا بی‌هوازی بر روی منابع کربنی مختلفی در محیط کشت مایع می‌باشد [۱۲-۸ و ۳]. این قارچ قادر به تولید آنزیم‌ها و

این نتایج نشان داد که قارچ موکور همیلیس از نظر بازدهی تولید الکل و محصولات جانبی آن شباهت زیادی به مخمر نان دارد. به عنوان مثال یک مخمر ساکارومایسیس سرویسه با بازدهی بالای اتانول بر روی محیط کشتی حاوی ۷/۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم، ۳/۵ گرم بر لیتر دی هیدروژن پتاسیم فسفات، ۰/۷۵ گرم بر لیتر سولفات منیزیم، ۱ گرم بر لیتر کلرید کلسیم، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، بازدهی برابر ۰/۴۸ گرم بر هر گرم اتانول تولید می‌نماید [۱۸] که مشابه نتایج بهینه این تحقیق می‌باشد.

### مراجع

- [1] Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M.J., "Performance of Rhizopus, Rhizomucor, and Mucor in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates", *Enzyme Microbial Technology*, 36, pp. 294-300, (2005).
- [2] Karimi, K., Edebo, L., Taherzadeh, M.J., "Mucor indicus as a biofilter and fermenting organism in continuous ethanol production from lignocellulosic hydrolyzate", *Biochem. Eng. J.* 39, pp. 383-388, (2008).
- [3] Yazdi, M., Zarrini, G., Mohit, E., Faramarzi, M., Setayesh, N., Sedighi, N., Mohseni, F., "Mucor hiemalis: a new source for uricase production", *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, pp. 325-330, (2006).
- [4] Weiyu Fan, J.A.B., Trinkle, J.R., Steinke, J.D., Hwang, K.O., Henning, J.P., "Chitosan and method of preparing chitosan", *United States Patent 7413881*, (2000).
- [5] Montgomery, D.C., "Design and analysis of experiments", fifth ed., John Wiley & Sons, New York, (2001).
- [6] Talebnia, F., PourBafarani, M., Lundin, M., Taherzadeh, M.J., "Optimization study of citrus wastes saccharification by dilute acid hydrolysis", *BioResources* 3, pp. 108-122, (2008).
- [7] Demirbas, A., "Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass", *Energy Sources Part A* 27, pp. 327 - 337, (2005).
- [8] Millati, R., "Ethanol production from lignocellulosic materials", Ph.D thesis, Chemical Reaction Engineering, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden, (2005).
- [9] Mysyakina, I.S., Funtikova, N.S., "Changes in the lipid composition of Mucor hiemalis sporangiospores related to the age of the spore-forming culture", *Microbiology (Moscow, Russ. Fed.)* 72, pp. 461-465, (2003).

لیتر دی هیدروژن پتاسیم فسفات، ۰/۷۴ گرم بر لیتر سولفات منیزیم، ۱ گرم بر لیتر کلرید کلسیم، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۰ میلی لیتر بر لیتر فلزات کم مقدار بود به دست آمد، در صورتی که نتایج این کار نشان داد که این قارچ نیاز به مواد غذایی پیچیده‌ای ندارد.

نتایج حاضر نشان داد که غلظت عصاره مخمر تأثیر زیادی بر روی تولید اتانول بوسیله قارچ موکور همیلیس دارد، در حالی که حضور مواد دیگر از جمله کلرید کلسیم، ویتامین ها، فلزات کم مقدار و سولفات روی تأثیر خیلی ناچیزی بر روی بازدهی اتانول تولیدی دارند. هنگامی که عصاره مخمر در محیط کشت وجود داشته باشد، اثر افزودن سولفات آمونیوم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، کلرید کلسیم و سولفات منیزیم قابل نظر کردن بودند. هنگامی که محیط کشت شامل ۴ و ۶ گرم بر لیتر عصاره مخمر بود، بازدهی نسبتاً بالایی از اتانول (حدود ۰/۴۷ گرم بر گرم) در محیط کشت به دست آمد. این بازدهی در حالی که به دست آمد که به جز عصاره مخمر، گلوکوز نیز در محیط کشت وجود داشت ولی سایر مواد غذایی در محیط کشت موجود نبودند. عصاره مخمر شامل پروتئین (۲۰ تا ۳۰٪)، پپتید (۱۵ تا ۱۰٪) و آمینو اسیدهای آزاد (۳۵ تا ۴۰٪) بود. مواد غذایی دیگری نیز شامل ویتامین‌های مختلف، کربوهیدراتها، موادی مثل تری هالوز و گلیکوژن در عصاره مخمر وجود دارند [۱۵]. عصاره مخمر همچنین شامل بسیاری از عناصر مانند Al, Mg, Ti, Zn, Mo, Ni, Pb, Sn, V, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr, Cd, Co, Cr, Ga نیز می‌باشد [۱۶-۱۷]. در این تحقیق هیچکدام از مواد غذایی نتوانست نقشی مانند عصاره مخمر ایفا کند. با استفاده از آزمایش‌هایی که انجام گرفت، مشخص شد که غلظت بیش از ۴ گرم بر لیتر عصاره مخمر در محیط کشتی که شامل ۳۰ گرم در لیتر گلوکوز باشد می‌تواند نقش تمام مواد غذایی دیگر را ایفا کند. گلیسرول در محیط کشت به عنوان اصلی ترین محصول جانبی توسط قارچ موکور همیلیس تولید شد در حالی که هیچ سوخت وساز دیگری شناسایی نشد. بیشترین بازدهی تولید اتانول، گلیسرول و توده زیستی در کشت بی‌هوای توسط قارچ در محیط کشتی که شامل ۳۰ گرم بر لیتر گلوکوز بود به ترتیب برابر با ۰/۴۸، ۰/۰۸ و ۰/۱۹ گرم بر گرم گلوکوز مصرفی به دست آمدند. بازدهی دیگر سوخت و سازها مثل اسیدهای لاکتیک، پیروویک و ساکسینیک کمتر از ۰/۰۱ گرم بر گرم گلوکوز مصرفی به دست آمدند.

- [10] Grob, E.C., Butler, R., "The biosynthesis of b-carotene by *Mucor hiemalis*. IV. The part played by acetic acid in the synthesis of the carotene molecule, especially positions 3,4,6 and 3',4',6', studied with the aid of carbon 14-labeled acetic acid", *Helv. Chim. Acta* 39, pp. 1975-1980, (1956).
- [11] Grob, E.C., Schopfer, W.H., Poretti, G.G., "The biosynthesis of carotenoids from labeled acetate by *Mucor hiemalis*" , *Congres International de Biochimie, Resumes des Communications* 212, (1952).
- [12] Mysyakina, I.S., Funtikova, N.S., "Lipid composition of the arthrospores, yeastlike cells, and mycelium of the fungus *Mucor hiemalis*", *Microbiology (Moscow, Russ. Fed.)* 70, pp. 403-407, (2001).
- [13] Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K., Chatterjee, B.P., "Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization", *Process Biochem.* 40, pp. 395-400, (2005).
- [14] Ebner, C., Puempel, T., Gamper, M., "Biosorption of Cr(III) by the cell wall of *Mucor hiemalis*", *Eur. J. Miner. Process Environ. Protect.* 2, pp.168-178(2002).
- [15] Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G., "Industrial microbiology: an introduction", Wiley-Blackwell, (2001).
- [16] Grant, C.L., Pramer, D., "Minor element composition of yeast extract", *J Bacteriol.*, 84: pp. 869-870, (1962).
- [17] Asenjo, J.A., Merchuk, J.C., "Bioreactor system design", Marcel Dekker, New York, pp.95,(1995).
- [18] Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M.J., "Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*", *Enzyme Microb Technol.* 40, pp. 138-144 (2006).