بهینه سازی منبع ازت و میزان اکسیژن محلول برای تولید همزمان اتانول و زایلیتول در کشت همزمان دو مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida tropicalis*

امید زاهد[۱]، غلامرضا صالحی جوزانی[۲*] و فرامرز خداییان[۱]

[۱] کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی

[۲] کرج، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۳

چکیده

یکی از راهکارهای جدید و امید بخش برای اقتصادی سازی تولید بیواتانول از پسماندهای لیگنوسلولزی ، تولید همزمان یک یا چند ماده با ارزش دیگر در کنار اتانول از پسماند مد نظر (تصفیه زیستی) می باشد. هدف از اجرای تحقیق حاضر بهینه سازی تولید همزمان اتانول و زایلیتول در کشت همزمان دو مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida tropicalis* در محیط کشت طراحی شده در سطح فرمانتور غیر پیوسته بود. به منظور تعیین بهترین منبع ازت برای دو سویه، ابتدا دو سویه در ۸ منبع ازت آلی و معدنی مختلف (۶ گرم در لیتر) در قالب طرح یک فاکتور در یک زمان به صورت همزمان کشت داده شدند. نتایج به دست آمده نشانگر اختلاف معنی دار منابع مختلف از نظر کارآیی بود و عصاره مخمر بالاترین میزان اتانول(۲۴/۴۱ گرم در لیتر)، زایلیتول (۲۲/۷ گرم در لیتر) و زیست توده (۱۳/۲۴ گرم در لیتر) را نشان داد. در ادامه تأثیر غلظتهای مختلف اکسیژن محلول شامل ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد بر کارآیی تولید دو محصول در سطح فرمانتور غیر پیوسته مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان اتانول تولیدی(۳۸ گرم در لیتر) با بازدهی ۰/۴۷ (گرم اتانول تولیدی بر گرم گلوکز مصرف شده) در اکسیژن محلول ۵ درصد مشاهده شد، در حالی که بیشترین میزان زایلیتول تولیدی به میزان ۲۱/۶ گرم در لیتر با بازدهی ۰/۵۴ (گرم زایلیتول تولیدی نسبت به گرم زایلوز مصرف شده) در اکسیژن محلول ۱۰ درصد به دست آمد. همچنین بیشترین میزان بیومس تولیدی با میزان ۲۵/۲ در بالاترین میزان اکسیژن مورد آزمایش یعنی ۳۰ درصد به دست آمد. با توجه به نتایج به دست آمده برای تولید همزمان اتانول و زایلیتول در کشت همزمان دو مخمر مورد مطالعه، بهترین منبع ازت عصاره مخمر و بهترین غلظت اکسیژن محلول برای این منظور ۱۰-۵ درصد می باشد.

واژه های کلیدی: بیواتانول، بهینه سازی، زایلیتول، *Candida tropicalis*، *Saccharomyces cerevisiae*.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۶-۳۲۷۰۳۵۳۶، پست الکترونیکی: gsalehi@abrii.ac.ir

مقدمه

در سالهای اخیر استفاده از مواد لیگنوسلولزی کشاورزی در فرآیندهای تخمیر به منظور تولید فرآورده های زیستی مختلف مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. این موضوع به دلیل پتانسیل بالای این مواد برای تبدیل شدن به موادی که دارای ارزش اقتصادی و افزوده بیشتری هستند، می باشد(۴). سالیانه میلیاردها تن انواع زیست توده لیگنوسلولزی کشاورزی در جهان تولید می شوند که حاوی سه جز اصلی سلولز، همی‌سلولز و لیگنین با نسبتهای حدودی ۴:۳:۳ می‌باشند. این ۳ جزء از قندهای ساده ۵ کربنه مثل زایلوز و آرابینوز و قندهای ساده ۶ کربنه مانند گلوکز، مانوز و گالاکتوز تشکیل شده اند که در حین هیدرولیز مواد لیگنوسلولزی آزاد می شوند. وجود این

میزان عظیم زیست توده لیگنوسلولزی در جهان، پتانسیل بسیار مناسبی را برای امکان تولید سوختهای زیستی و انواع فرآورده های زیستی دیگر نوید می دهد (۱۵ و ۲۵). میزان برآورد شده توانمندی تولید انرژی از زیست توده بین ۱۳۰ تا ۱۷۰ اگزاژول در سال (EJ/year) می باشد که این میزان می تواند حدود ۲۰ درصد انرژی سالانه مورد نیاز جهان در سال ۲۰۵۰ را جبران نماید (۴).

با توجه به فرآیندهای پیش تیمار، هیدرولیز و تخمیر، امکان تولید انواع منابع انرژی، ترکیبات بیوشیمیایی و فرآورده های زیستی از پسماندهای لیگنوسلولزی کشاورزی وجود دارد. از مهمترین فرآورده های زیستی مد نظر می توان به بیواتانول، متانول، بوتانول، هیدروژن، زایلیتول، اسیدهای آلی، حلالهای آلی، اسیدهای آمینه، مکملهای خوراک دام، پروتئین تک سلولی و غیره اشاره نمود (۶، ۸، ۹ و ۲۲). در بین این فرآورده ها، تولید اتانول و زایلیتول اهمیت بسیار ویژه و بیشتری پیدا نموده اند (۲ و ۱۵). تولید بیواتانول به عنوان یکی از مهم ترین سوختهای تجدید پذیر و جایگزین سوختهای فسیلی با استفاده از گیاهان زراعی نشاسته ای از قبیل ذرت در سالهای گذشته همواره انجام شده است و میزان تولید آن سالانه در جهان محدود بوده است. تولید اتانول با استفاده از گیاهان زراعی با توجه به وجود فقر و گرسنگی در بسیاری از کشورهای جهان همواره مورد انتقاد بوده است (۱۵ و ۱۶). زایلیتول یک قند الکل پنج کربنه با قیمت جهانی به ازای هر کیلو گرم حدود ۳/۷-۳/۴ دلار و عملاً ارزش آن از اتانول بیشتر می باشد (۴۰). این قند دارای شیرینی معادل شکر بوده و به دلیل جذب کم در بدن به عنوان قند رژیمی شناخته می شود. زایلیتول در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، داروسازی و دندانپزشکی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۶ و ۴۰). علاوه بر این، زایلیتول در فرمولاسیون مواد غذایی دارای مزیتها و خواص فراوانی است و در محصولاتی مانند انوع آبنبات، نوشیدنیها، بستنی و آدامس مورد استفاده قرار می‌گیرد. این قند الکل در واکنش میلارد شرکت نمی‌کند و به همین دلیل در فرمولاسیونهای مواد غذایی بدون اینکه در طول دوره نگهداری این مواد باعث تغییراتی در آنها شود، باعث بهبود رنگ و طعم مواد غذایی می‌شود (۱۰ و ۱۳).

علی رغم وجود پتانسیل بسیار نوید بخش پسماندهای لیگنوسلولزی برای تولید فراوده های زیستی، همچنان تولید بیواتانول و سایر فرآورده های زیستی از آنها در ابتدای راه می باشد. دلیل این امر گران بودن فرآیندهای پیش تیمار، هیدرولیز آنزیمی، تخمیر و نهایتاً خالص سازی اتانول می باشد (۱۵ و ۲۰). یکی از راهکارهای مناسب برای کاهش هرینه های تولید و همچنین افزایش کارآیی تبدیل زیستی پسماندهای کشاورزی، تصفیه زیستی (biorefinery) می باشد که در آن در فرآیندهای بالادستی تلفیقی از فرآیندهای مختلف استفاده شده و ضمن کاهش هزینه ها، در قسمت فرآیندهای پایین دستی نیز امکان تولید همزمان چند فراورده زیستی با ارزش از یک محیط یا بستر مورد استفاده وجود دارد (۱۹ و ۲۹).

در نتیجه هیدرولیز مواد لیگنوسلولزی قندهای ۵ کربنه و ۶ کربنه تولید می شوند که در این میان اکثر میکروارگانیسم ها توانایی مصرف قندهای ۶ کربنه (گلوکز) را دارند و قندهای ۵ کربنه(زایلوز) را به میزان کمتری مصرف می کنند. میکروارگانیسم هایی مانند *Pichia sp.*، *Debaryomyces sp.* و *Candida sp.* قابلیت تبدیل زایلوز به زایلیتول را دارند و میکروارگانیسم های دیگر مانند *Saccharomyces cerevisiae* توانایی تولید اتانول از ۶ کربنه ها را دارا می باشند (۳ و ۳۱). به طور کلی از بین میکروارگانیسم‌ها، مخمرهای *Candida guilliermondii* و *C. tropicalis* به عنوان بهترین تولید کنندگان زایلیتول در نظر گرفته شده اند (۱۲، ۳۷و ۴۱).

با توجه به توضیحات ذکر شده می توان فرآیندی تعریف کرد که علاوه بر مصرف قندهای ۶ کربنه و تولید محصولی مانند اتانول، قندهای ۵ کربنه حاصل از هیدرولیز مواد

لیگنوسلولزی هم برای تولید زایلیتول مورد مصرف قرار بگیرند. یکی از فرآیندهایی که اخیراً بسیار مورد توجه واقع شده است، کشت همزمان (Co- culture) می‌باشد. در این فرآیند چند میکروارگانیسم مختلف که از لحاظ فاکتورهای رشد شباهت‌های یکسانی دارند را با هم کشت داده تا از سوبستراهای مختلف محیط کشت موادی که دارای ارزش اقتصادی و افزوده بیشتری دارند، تولید کنند (۱۷ و ۳۲). لذا در تحقیق حاضر تلاش شده است تا به منظور تولید همزمان اتانول و زایلیتول شرایط کشت همزمان دو مخمر *S. cerevisiae* (تخمیر کننده قند گلوکز) و *C. tropicalis* (تخمیر کننده قند زایلوز) در سطح فرمانتور غیرپیوسته بهینه سازی شود. بدین منظور دو فاکتور مهم منبع ازت و میزان غلظت اکسیژن محلول در محیطهای کشت مدل بهینه سازی شد.

مواد و روشها

میکروارگانیسم های مورد استفاده: دو سویه مخمر شامل *S. cerevisiae NCIM 3090* (تخمیر کننده گلوکز) و *C. tropicalis NCIM 3119* (تخمیر کننده قند زایلوز) که در تحقیقات قبلی نویسندگان (۳۹) که به ترتیب به عنوان سویه های برتر تولید کننده زایلیتول و اتانول انتخاب شده بودند، مورد استفاده واقع شدند. سویه ها در محیط کشت حاوی گلوکز(۱۰ گرم در لیتر)، قند زایلوز (۳ گرم در لیتر) ، سولفات آمونیوم (۵ گرم در لیتر)، عصاره مخمر(۳ گرم در لیتر)، پپتون (۵ گرم در لیتر) و آگار (۱۵ گرم در لیتر) کشت شدند. سپس نمونه‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۲۹ درجه سلسیوس قرار داده شدند. مخمرهای مذکور پس از کشت در محیط حاوی ۴۰ درصد گلیسرول قرار داده شده و در ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی قابلیت تولید اتانول توسط سویه *S. cerevisiae* و زایلیتول توسط *C. tropicalis* : برای بررسی قابلیت تولید اتانول توسط سویه *S. cerevisiae* ، سویه منتخب در ۴۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی قند گلوکز (۱۴۰ گرم در لیتر)، سولفات آمونیوم (۶ گرم در لیتر)، عصاره استخراجی سبوس برنج به عنوان منبع ویتامین و اسید آمینه (۲۰ درصد حجم محیط) و همچنین کلراید کلسیم (۰/۱ گرم در لیتر) کشت شد و در یک انکوباتور در دور rpm ۲۰۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز کشت و نگهداری شد. در نهایت میزان اتانول تولید شده توسط سویه با HPLC اندازه‌گیری گردید. حجم مایه تلقیح در این سیستم ۴ درصد بود.

برای بررسی قابلیت تولید زایلیتول توسط سویه *C. tropicalis* در ۴۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی قندزایلوز (۲۰ گرم در لیتر)، سولفات آمونیوم (۵ گرم در لیتر)، عصاره مخمر(۱۰ گرم در لیتر)، عصاره استخراجی سبوس برنج به عنوان منبع ویتامین و اسید امینه(۲۰ درصد حجم محیط)و کلراید کلسیم(۰/۱ گرم در لیتر) در یک انکوباتر در دور rpm ۲۰۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز کشت و نگهداری شد و در نهایت میزان زایلیتول تولید شده توسط سویه با HPLC اندازه‌گیری شد. حجم مایه تلقیح در این سیستم ۴ درصد بود.

وزن خشک سلولی: برای تعیین وزن خشک سلولی مقدار مشخصی از سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت برداشت شد و سلولها از فیلترهای ۰/۲ میکرومتر که از قبل در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت خشک شده بودند، عبور داده شدند. سپس توسط آب تقطیر شده شستشو داده شده و برای رسیدن به وزن ثابت در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت تا رسیدن به یک وزن ثابت قرار داده شدند. در نهایت با توزین آن مقدار بیومس بر حسب گرم در لیتر ماده خشک سلولی گزارش شد.

آماده سازی مایه تلقیح اولیه برای کشت مخمر در محیطهای آزمایشگاهی: برای تهیه مایه تلقیح یک لوپ کامل از سویه های*S. cerevisiae* و *C. tropicalis* به یک ارلن ۱۲۵ میلی لیتری که شامل ۵۰ میلی لیتر از محیطی

حاوی۸۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۴۰ گرم بر لیتر قند زایلوز، ۵گرم بر لیتر سولفات آمونیوم، ۶گرم بر لیتر عصاره مخمر با pH ۵ اضافه شد.ارلن حاوی محیط کشت در یک انکوباتور در دور rpm ۲۰۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت و نگهداری شد.

انتخاب مناسبترین منبع نیتروژنی برای کشت همزمان دو مخمر با استفاده از طرح یک فاکتور در یک زمان: به منظور انتخاب مناسب ترین منبع نیتروژنی برای کشت همزمان دو مخمر و تولید همزمان اتانول و زایلیتول ۸ منبع ازت شامل ۴ منبع آلی (عصاره مالت، عصاره مخمر، باکتو تریپتون و کازئین) و ۴ منبع ازت معدنی (کلرید آمونیوم، نیترات آمونیوم، سولفات آمونیوم و مولیبدات آمونیوم) با غلظت ۶ گرم در لیتر استفاده شدند. دو سویه (۴ درصد مایه تلقیح) به صورت کشت همزمان در محیط حاوی یک منبع ازت اشاره شده در بالا (۶ گرم در لیتر)، گلوکز(۵۰ گرم در لیتر)، زایلوز (۴۰ گرم در لیتر) و کلراید کلسیم(۰/۱ گرم در لیتر) در انکوباتور در دور rpm ۲۰۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH۵ به مدت پنج روز کشت و نگهداری شدند. در نهایت میزان اتانول و زایلیتول تولید شده در هر منبع نیتروژنی با HPLC اندازه‌گیری شد.

انتخاب مناسب‌ترین میزان اکسیژن محلول برای کشت همزمان دو مخمر در فرمانتور برای تولید اتانول و زایلیتول: برای تعیین مناسب ترین میزان غلظت اکسیژن محلول برای کشت همزمان جهت تولید اتانول و زایلیتول، دو سویه (۴ درصد مایه تلقیح) به صورت کشت همزمان در ۴ غلظت اکسیژن محلول ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد در فرمانتور مدل Bioflo 310 (New Brunswik, USA) انجام شد. تنظیم اکسیژن به سه روش تنظیم دبی هوای ورودی به وسل فرمانتور (۱/۵ vvm)، جریان گاز اکسیژن خالص(۹۹/۹ درصد) و سرعت به هم زدن کنترل شد. بدین منظور دو سویه در محیط حاوی منبع ازت بهینه (۶ گرم در لیتر)، گلوکز(۸۰ گرم در لیتر)، زایلوز (۴۰ گرم در لیتر) و کلراید کلسیم(۰/۱ گرم در لیتر)به صورت کشت همزمان در فرمانتور با مخزن ۲ لیتری که حاوی ۱/۵ لیتر محیط کشت در دور rpm ۳۰۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH ۵ کشت شدند. در طول تخمیر pH محیط کشت به وسیله NaOH سه نرمال و HCL سه نرمال کنترل می‌شد و کشت به مدت ۴ روز انجام شد. در نهایت میزان زیست توده، اتانول و زایلیتول تولید شده در هر جریان هوادهی با HPLC اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری قندها، الکل و مواد بازدارنده: غلظت مواد (گلوکز،زایلوز،اتانول و زایلیتول) توسط HPLC (Knauer) شامل پمپ k1001، دتکتور RI مدل K-2301، ستون Eurokat H ، حلال آب اسیدی با PH= 2 و نرم افزار Chromgate انجام شد. میزان ۲۰ میکرو لیتر از نمونه با جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه از ستون Eurokat H به قطر ذرات ۱۰ میکرومتر و ابعاد ۸ × ۳۰۰ میلی متر عبور داده و ترکیبات اندازه گیری و شناسایی شدند.کل زمان هر تجزیه ۱۵ دقیقه بود (۲۳). تمام منابع نیتروژنی شامل عصاره مخمر و سولفات آمونیوم و از کمپانی مرک (آلمان) تهیه شد. قندهای زایلوز، گلوکز، زایلیتول و اتانول مورد نیاز به عنوان استاندارد برای کروماتوگرافی (HPLC) از کمپانی سیگما (آلمان) تهیه شد.

نتایج و بحث

ارزیابی اولیه سویه های منتخب نشان داد که سویه منتخب *S. cerevisiae* در محیط کشت حاوی قند گلوکز (۱۴۰ گرم در لیتر)، توانایی تولید ۶۶ گرم در لیتر اتانول با بازدهی ۰/۴۷ (گرم اتانول تولید شده نسبت به گرم گلوکز استفاده شده) را دارد و سویه منتخب *C. tropicalis* نیز در محیط کشت حاوی (۲۰ گرم در لیتر زایلوز) قابلیت تولید حدود ۱۰ گرم در لیتر زایلیتول با بازدهی ۰/۴۹ (گرم زایلیتول تولید شده نسبت به گرم زایلوز استفاده شده) را دارد. در ادامه اثر منابع مختلف نیتروژنی بر تولید زیست توده، اتانول و زایلیتول تولیدی در کشت همزمان ۲ مخمر

S. cerevisiae و *C. tropicalis* در قالب طرح یک فاکتور در یک زمان مورد بررسی قرار گرفت. کارآیی این روش آماری در بهینه سازی منابع مورد نیاز برای تولید زیست توده و سایر فرآورده های زیستی به اثبات رسیده است (برای مثال ۱ و ۲). همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود عصاره مخمر بهترین نتیجه را از لحاظ تولید زیست توده، اتانول و زایلیتول نشان می‌دهد. این ۲ مخمر در حضور این منبع نیتروژنی ۱۳/۲ گرم در لیتر زیست توده تولید کردند که تفاوت بسیار معنی‌داری با بقیه منابع نیتروژنی داشت. میزان اتانول کل و زایلیتول تولیدی نیز به ترتیب برابر با ۲۴/۴و ۲۲/۷ گرم در لیتر می‌باشند. این ۲ مخمر در حضور عصاره مخمر بالاترین بازده تولید اتانول از قند گلوکز (۰/۴۸ گرم اتانول تولید شده به گرم گلوکز استفاده شده) و همچنین بالاترین بازده تولید زایلیتول از قند زایلوز (۰/۵۶ گرم زایلیتول تولید شده نسبت به گرم زایلوز استفاده شده) را نشان دادند که نسبت به سایر شرایط بطور معنی داری بیشتر بود. این نتایج با نتایج سایر محققین از قبیل کاروالهیرو و همکاران (۲۰۰۷)(۹)، گرانستروم و همکاران (۲۰۰۲)(۱۵) و پاراجو و همکاران (۱۹۹۸) (۲۴) در حین بررسی اثرات منابع ازت مختلف بر تولید زایلیتول در کشت تکی مخمر مشابه بود، زیرا آنها هم نشان دادند که مهم ترین و بهترین منبع ازت برای تولید زایلیتول عصاره مخمر می باشد. همچنین راجرزو همکارانش در تحقیق دیگری عنوان کردند که اضافه کردن انواع مختلف منابع ازت و غلظتهای مختلف عصاره مخمر تأثیر متفاوتی در تولید اتانول دارد (۲۶).

باکتو تریپتون یکی دیگر از منابع نیتروژنی است که بعد از عصاره مخمر بالاترین مقدار بیومس۱۲/۱ گرم در لیتر، اتانول ۲۳/۰۶ گرم در لیتر و زایلیتول به میزان ۱۳/۳ در لیتر را تولید کرد (جدول ۱). از میان منابع معدنی نیتروژن، بهترین نتایج از مصرف سولفات آمونیوم به دست آمد. در حضور این ترکیب در هر لیتر محیط کشت ۶/۳ گرم زیست توده، ۸/۲ گرم در لیتر اتانول و ۸ گرم در لیتر زایلیتول تولید شد. بنا براین، با توجه به نتایج به دست آمده، عصاره مخمر به عنوان بهترین منبع نیتروژنی برای تولید اتانول و زایلیتول با ۲ مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* انتخاب شد.

جدول ۱- اثر منابع مختلف ازت بر رشد و تولید اتانول و زایلیتول در کشت همزمان دو مخمر

منابع نیتروژنی	بیومس(g/l)	اتانول(g/l)	زایلیتول(g/l)
عصاره‌ی مالت	۱۱/۱۱ ±۰/۱۵^{c}	۱۷/۱۳ ±۰/۴۳^{d}	۱۲/۰۹ ±۰/۱۰^{*c}
عصاره‌ی مخمر	۱۳/۲۴ ±۰/۱۹^{a}	۲۴/۴۱ ±۰/۲۸^{a}	۲۲/۷۰ ±۰/۳۱^{a}
باکتو تریپتون	۱۲/۱۷ ±۰/۱۵^{b}	۲۳/۰۶ ±۰/۱۹^{b}	۱۳/۳۲ ±۰/۶۹^{b}
کازئین	۹/۸۳ ±۰/۰۶^{d}	۲۱/۹ ±۰/۵۳^{c}	۱۲/۳۱ ±۰/۱۶^{c}
سولفات آمونیوم	۶/۳۳ ±۰/۲۳^{f}	۸/۲۴ ±۰/۸۱^{e}	۸/۰۴ ±۰/۲۹^{d}
مولیبدات آمونیوم	۵/۹۹ ±۰/۲۲^{fg}	۷/۶۹ ±۰/۷۳^{ef}	۳/۹۱ ±۰/۴۹^{g}
کلرید آمونیوم	۵/۵۶ ±۰/۳۷^{g}	۵/۱۶ ±۰/۷۵^{g}	۵/۶۲ ±۰/۹۲^{f}
نیترات آمونیوم	۸/۹ ±۰/۱۸^{e}	۷/۴۳ ±۰/۵۴^{ef}	۷/۴۷ ±۰/۴۶^{de}

*میانگین ± خطای استاندارد. حروف کوچک انگلیسی متفاوت اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد را نشان می دهد.

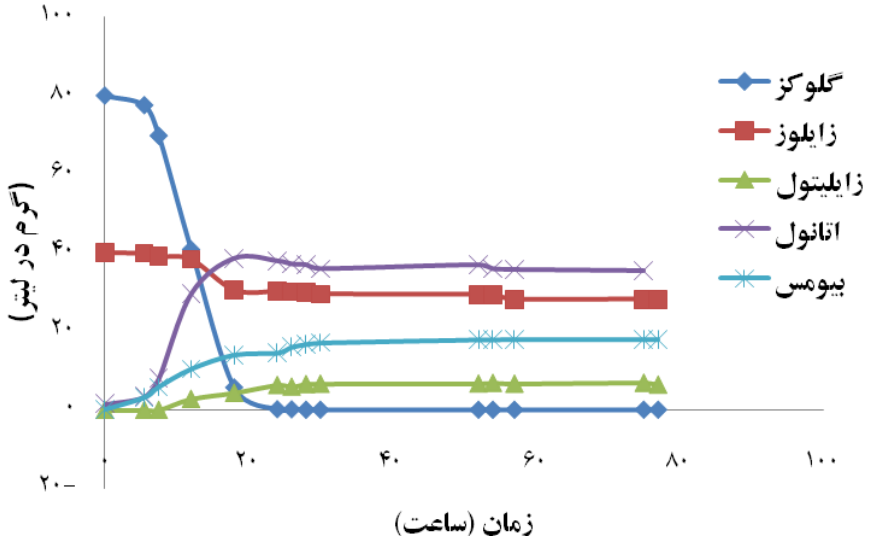
یکی از فاکتورهای مهم و مؤثر در رشد میکروارگانیسمهای هوازی، اکسیژن می‌باشد. *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* دو مخمر هوازی می‌باشند که رشد آنها وابسته به اکسیژن محلول محیط است (۳۵). در این مطالعه اثر چهار سطح اکسیژن محلول (۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) بر رشد و تولید اتانول و زایلیتول بررسی شد. شکلهای ۱ تا ۳ پروفیل زمانی رشد و تولید اتانول و زایلیتول را برای دو مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* در شرایط کشت همزمان و میزان اکسیژن محلول متفاوت نشان می‌دهند. این شکلها نشان می‌دهند که دو مخمر تا ساعت ۱۲ به صورت لگاریتمی رشد می‌کنند و سپس رشد کاهنده آنها شروع می شود . سپس در ساعت ۱۶وارد فاز یکنواخت می‌شوند. همچنین مصرف قند گلوکز توسط این دو مخمر در ابتدای عمل تخمیر و زودتر از قند زایلوز صورت می‌گیرد و در ساعت ابتدایی دو مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* قند گلوکز را مصرف و تولید اتانول می‌کنند (۵ و ۳۴).

همان گونه که این شکلها نشان می‌دهند تولید اتانول تا ساعت ششم ناچیز بوده و پس از آن سنتز اتانول با سرعت بیشتری ادامه می‌یابد تا اینکه در حدود ساعت ۲۰ به حداکثر مقدار خود می‌رسد. در ساعت ۲۰ کل قند گلوکز موجود در محیط توسط این دو مخمر مصرف شده و میزان آن در محیط به صفر می‌رسد. همچنین در این دوره زمانی مصرف قند زایلوز توسط *C. tropicalis* ناچیز بوده و به میزان کمی تولید زایلیتول می‌کند، زیرا همان گونه که قبلاً اشاره شد، این مخمر قند گلوکز (هگزوز) را در مقایسه با زایلوز (پنتوز) زودتر مصرف می‌کند. بعد از اتمام قند گلوکز در محیط (ساعت ۲۰) همچنان فاز رشد ادامه داشته که این رشد مربوط به مخمر *C. tropicalis* می‌باشد که پس از اتمام قند گلوکز، قند پنج کربنه زایلوز را مصرف کرده و تولید زایلیتول انجام می شود. این شکل ها نشان می دهند که روند بیوسنتز اتانول و زایلیتول موازی با تولید زیست توده نیست، اما تولید آنها در سیستم فرمانتور نیز مقل سیستم ارلن مایر می‌توان تا حدودی وابسته به رشد مخمرها می باشد.

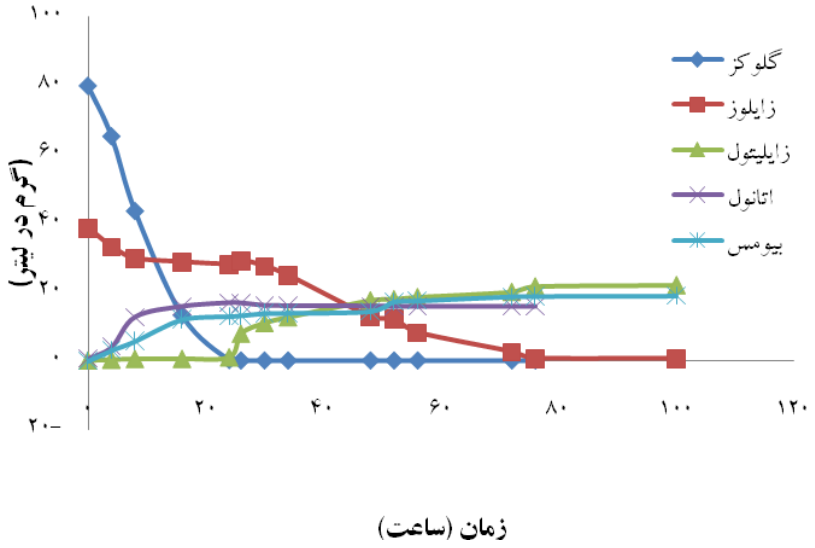
شکل ۱ میزان رشد ۲ مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* و تولید اتانول و زایلیتول را در اکسیژن محلول ۵ درصد (شرایط تقریبا بی هوازی) نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود در این شرایط دو مخمر تا ساعت ۱۲ به صورت لگاریتمی رشد می‌کنند و سپس رشد کاهنده آنها شروع شده تا اینکه درساعت۱۶وارد فاز یکنواخت می‌شوند. همچنین مصرف قند گلوکز توسط این دو مخمر در ابتدای عمل تخمیر و زودتر از قند زایلوز صورت می‌گیرد و در ساعت ابتدایی دو مخمر قند گلوکز را مصرف و تولید اتانول می‌کنند. در این میزان اکسیژن (۵ درصد) قند گلوکز موجود در محیط(۸۰ گرم در لیتر)، در طی ۲۰ ساعت از کشت انجام شده به طور کامل مصرف شده و دو مخمر به میزان ۳۸ گرم در لیتر تولید اتانول می-کنند. به طور کلی در شرایط تقریبا بی هوازی قند ۵ کربنه زایلوز توسط مخمر *C. tropicalis* به میزان کمی متابولیزه می‌شود و به گونه‌ای که می‌توان مشاهده کرد، غلظت قند زایلوز در محیط بعد از گذشت ۸۰ ساعت از کشت از ۴۰ گرم در لیتر به ۳۰ گرم در لیتر کاهش پیدا می‌کند و تمامی آن مصرف نمی‌شود و زایلیتول به میزان ۷/۱ گرم در لیتر تولید می‌شود. نتایج مشابهی از مصرف قند زایلوز و گلوکز در شرایط بی هوازی توسط فورلان و همکارانش در کشت *C. parapsilosis* در محیط کشت سنتتیک (۱۱) و همچنین روبیو و همکاراندر کشت *C. guilliermondii* در محیط هیدرولیزی پوسته سویا مشاهده گردید (۲۷).

در میزان اکسیژن محلول ۱۰ درصد (شرایط میکروارو‌فیلیک)، مخمر *Candida* قادر است در طی ۸۰ ساعت از زمان کشت تمامی قند زایلوز موجود در محیط کشت را مصرف کند. این مصرف تمامی قند زایلوز در شرایط محدود اکسیژن (۱۰ درصد) به این علت است که سیستم انتقال الکترون در مخمرها به طور کامل قادر است

NAD^+ تولید شده از NADH در مرحله اول متابولیسم زایلوز را احیاء کند، و در این شرایط به میزان ۲۱/۶ گرم در لیتر تولید قند الکل زایلیتول کند. در این میزان اکسیژن محلول در طی ۲۲ ساعت از کشت گلوکز موجود در محیط متابولیزه می‌شود و ۱۶/۹ گرم در لیتر اتانول تولید می‌شود (شکل ۲).



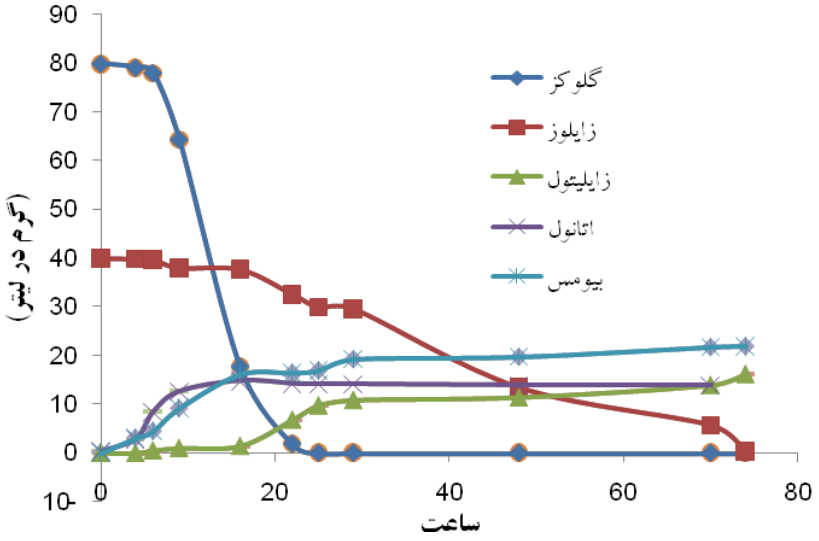
شکل ۱- پروفیل زمانی رشد، مصرف گلوکز و زایلوز، و تولید اتانول و زایلیتول در ۲ مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* در غلظت ۵ درصد اکسیژن محلول .



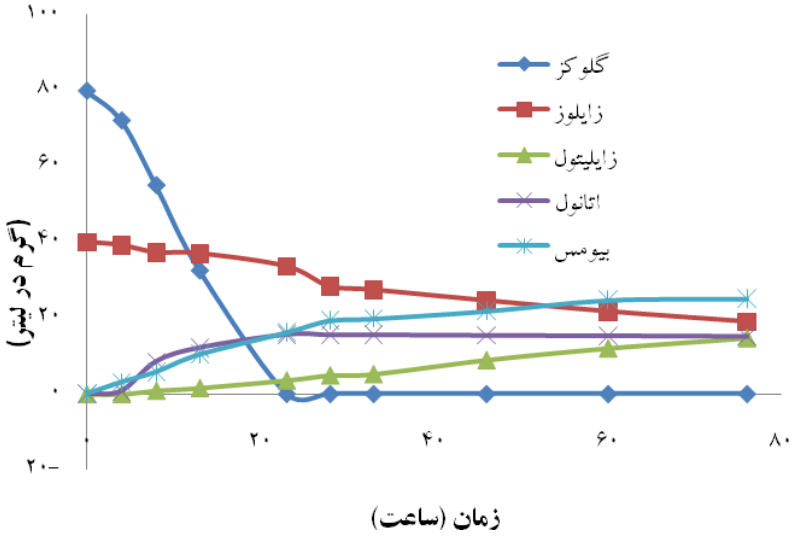
شکل ۲- پروفیل زمانی رشد، مصرف گلوکز و زایلوز، و تولید اتانول و زایلیتول در ۲ مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* در غلظت ۱۰ درصد اکسیژن محلول .

شکلهای ۳ و ۴ سینتیک رشد سلولی و مصرف ۲ قند گلوکز و زایلوز را توسط ۲ مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* در شرایط ۲۰ درصد و ۳۰ درصد اکسیژن محلول موجود در محیط کشت را نشان می‌دهد. همان گونه که در این شکلها مشاهده می‌شود مشابه شرایط کشت ۱۰ درصد اکسیژن محلول، تمامی قند گلوکز و زایلوز

موجود در محیط توسط ۲ مخمر مصرف می‌شود. در میزان اکسیژن محلول ۳۰ درصد، میزان بیشتری از زیست (۲۵/۲ گرم در لیتر) به دست می‌آید. به گونه‌ای که با افزایش میزان هوادهی و اکسیژن محلول بر میزان زیست توده تولیدی در محیط افزوده می‌شود. تحقیقات قبلی نیز نشان داده اند که با افزایش میزان هوادهی رشد مخمر در محیط افزایش می‌یابد (۱ و ۳۳). میزان محصولات اتانول و زایلیتول تولید شده در این شرایط نسبت به شرایطی که میزان اکسیژن محلول در محیط (۵ و ۱۰ درصد) می‌باشد، کاهش می‌یابد به گونه‌ای که در شرایط اکسیژن ۳۰ درصد اتانول و زایلیتول تولید شده توسط ۲ مخمر به ترتیب برابر با ۱۵/۷ و ۱۴/۸ گرم می‌باشد.



شکل ۳- پروفیل زمانی رشد، مصرف گلوکز و زایلوز، و تولید اتانول و زایلیتول در ۲ مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* در غلظت ۲۰ درصد اکسیژن محلول .



شکل ۴- پروفیل زمانی رشد، مصرف گلوکز و زایلوز، و تولید اتانول و زایلیتول در ۲ مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* در غلظت ۳۰ درصد اکسیژن محلول .

جدول ۲ فاکتورهای سینتیکی حداکثر به دست آمده برای دو مخمر را در شرایط مختلف اکسیژن محلول نشان می دهد و همان گونه که مشاهده می‌شود بالاترین میزان تولید اتانول و زایلیتول به ترتیب با میزان ۳۸ گرم در لیتر و بهره دهی ۱/۹ گرم در لیتر در ساعت (بازدهی ۰/۴۷ گرم اتانول تولیدی به گرم گلوکز مصرفی) در غلظت اکسیژن ۵ درصد به دست آمده است، در صورتی که بالاترین میزان تولید زایلیتول با غلظت ۲۱/۶ گرم در لیتر و بهره دهی ۰/۲۸ گرم در لیتر در ساعت (بازدهی ۰/۵۴ گرم زایلیتول تولیدی به گرم زایلوز مصرفی) در غلظت اکسیژن ۱۰ درصد به دست آمده است. اما در خصوص تولید زیست توده با افزایش میزان اکسیژن محلول در محیط بر میزان زیست توده افزوده شده و بالاترین میزان زیست توده (۰/۲۵/۲ گرم در لیتر) و با بهره دهی ۰/۳۶ گرم در لیتر در ساعت در غلظت ۳۰ درصد اکسیژن محلول به دست آمده است. گزارشات متعددی در خصوص کشت همزمان مخمر *ساکارومایسس* با سایر میکروارگانیسم ها برای تولید اتانول وجود دارد. برای مثال لطیف و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۱۸) از کشت همزمان دو مخمر مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* بر روی محیط حاوی عصاره مخمر و پسماندهای ذرت تنها توانستند به میزان ۲۱ گرم در لیتر اتانول تولید (با بازدهی ۰/۱۹) و میزان ۲۱ گرم در لیتر با بازدهی ۰/۴۵ زایلیتول تولید نمایند. رودمویی و همکاران (۲۰۰۵) با بهینه سازی کشت همزمان دو مخمر *S. cerevisiae* و *C. tropicalis* بر روی محیط حاوی گلوکز و زایلوز توانستند تا اتانول با غلظت حداکثر ۷ گرم بر لیتر و زایلیتول با غلظت ۹/۲ گرم بر لیتر به طور جداگانه تولید نمایند (۲۸). یاداو و همکاران (۲۰۱۱)(۳۸) نیز با کشت همزمان دو مخمر *S. cerevisiae* و *P. stipitis* بر روی کاه و کلش هیدرولیز شده برنج غلظتهای پایین تری اتانول تولید نمودند (غلظت ۱۲ گرم در لیتر و بازدهی ۰/۴). همان طور که مشاهده می شود این مقادیر اتانول و زایلیتول تولید شده در این دو تحقیق از میزان غلظت و بازده اتانول تولیدی در تحقیق حاضر کمتر است. البته سانچز و همکاران در سال ۲۰۰۷ با کشت تک سویه *C. tropicalis* توانستند مقادیر قابل توجهی زالیتول با بازده ۰/۵۶ (گرم زایلیتول تولیدی بر گرم زایلوز مصرفی)زایلیتول تولید نمایند که کمی از میزان زایلیتول تولیدی در این تحقیق بیشتراست (۳۰).

جدول۲- مقایسه فاکتورهای حداکثری سینتیکی کشت دو مخمر *C. tropicalis* و *S. cerevisiae*در شرایط کشت همزمان در غلظتهای مختلف اکسیژن محلول

فاکتورهای اندازه‌گیری	درصد اکسیژن محلول			
	٪۵	٪۱۰	٪۲۰	٪۳۰
زیست توده (گرم بر لیتر)	۱۸±۰/۴^{d}	۱۹/۱±۰/۵^{c}	۲۲/۶±۰/۵^{b}	۲۵/۲ ±۰/۷^{a}
اتانول (گرم بر لیتر)	۳۸±۱/۳^{a}	۱۶/۹±۰/۸^{b}	۱۴/۹±۰/۷^{c}	۱۵/۷ ±۰/۸^{bc}
زایلیتول (گرم بر لیتر)	۷/۱ ±۰/۴ ^{d}	۲۱/۶±۰/۸^{a}	۱۶/۳±۰/۶^{b}	۱۴/۸ ±۰/۴^{c}
بهره دهی حجمیزیست توده (گرم بر لیتر در ساعت)	۰/۲۵±۰/۰۳ ^{bc}	۰/۲۷±۰/۰۴^{b}	۰/۳۲±۰/۰۴^{ab}	۰/۳۶±۰/۰۴^{a}
بهره‌دهی حجمی اتانول(گرم در لیتر در ساعت)	۱/۹±۰/۱^{a}	۰/۸۴±۰/۰۶^{c}	۰/۶۷±۰/۰۵^{d}	۱/۰۴±۰/۰۷^{b}
بهره‌دهی حجمی زایلیتول(گرم در لیتر در ساعت)	۰/۰۹±۰/۰۱^{d}	۰/۲۸ ±۰/۰۳^{a}	۰/۲۱±۰/۰۳^{b}	۰/۱۹±۰/۰۳^{bc}

به طورکلی در پایان می توان جمع بندی نمود که در این تحقیق تأثیر برخی از مهم ترین عوامل محیطی در تولید بیوتکنولوژیک اتانول و زایلیتول از قند گلوکز و زایلوز توسط کشت همرمان دو مخمر *S. cerevisiae* و

C. tropicalis مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت بهترین شرایط مورد انتخاب قرار گرفت. در بحث منبع ازت، بهترین منبع ازتی برای کشت همرمان دو مخمر مورد مطالعه و تولید همزمان اتانول و زایلیتول، عصاره مخمر بود. در زمینه میزان اکسیژن محلول محیط نیز بالاترین بازده اتانول (گرم اتانول تولید شده به گرم گلوکز استفاده شده) $Y_{P/S}$=۰/۴۷در شرایط اکسیژن پایین (۵ درصد) به دست آمد در حالیکه بیشترین میزان بازده زایلیتول به میزان $Y_{P/S}$=۰/۵۴ (گرم زایلیتول تولیدی نسبت به گرم زایلوز مصرف شده) در شرایط اکسیژن ۱۰ درصد به دست آمد. لذا لازم است در آینده غلظتهای اکسیژن بین این دو دامنه (۱۰-۵ درصد) مورد بررسی قرار بگیرد و غلظت نهایی بهینه به دست آید. نتایج تحقیق حاضر در برنامه تحقیقاتی آتی نویسندگان که تولید همزمان اتانول و زایلیتول از پسماند کاه و کلش برنج در شرایط فرمانتور پیوسته خواهد بود مورد استفاده واقع خواهد شد.

سپاسگزاری:

نویسندگان بر خود لازم می دانند تا از همکاریهای صمیمانه آقای مهندس سعید عباسعلیزاده و همچنین سایر همکاران بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تقدیر و تشکر نمایند. این تحقیق در قالب پروژه مصوب پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران طراحی و اجرا شده است.

منابع

1. Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J. L., Goma, G., Guillouet, S. E. 2004. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. Applied Microbiology and Biotechnology, 63(5): 537-542.
2. Ali, S.S., Khan, M., Fagan, B., Mullins, E., Doohan, F.M. 2012. Exploiting the inter-strain divergence of *Fusarium oxysporum* for microbial bioprocessing of lignocellulose to bioethanol. AMB Express, 15:2(1):16.
3. Barbosa, M.F.S., De Medeiros, M., De Manchila, I.M. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from xylose and some factors whit affect xylitol yield i*n candida guilliermondii*. Journal of Industrial Microbiology, 3: 241-251.
4. Beringe, T.I.M., Lucht, W., Schaphoff, S.2011. Bioenergy production potential of global biomass plantations under environmental and agricultural constraints. GCB Bioenergy, 3(4): 299-312.
5. Bhalla, T. C., Joshi, M.1994. Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10(1): 116-117.
6. Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R.R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R.K., Pandey, A. 2010. Bioethanol production from rice straw: an overview. Bioresource Technology, 101: 4767-4774
7. Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Medeiros, R. 2007. Supplementation requirement of brewerys spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. Journalof Industrial Microbiology and Biotechnology, 33:646-654.
8. Cherubini, F. 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. Energy conversion and Management, 51: 1412-1421.
9. Cherubini, F., Ulgiati, S. 2010. Crop residues as raw materials for biorefinery systems–A LCA case study. Applied Energy, 87: 47-57
10. de Jong, E.A., Higson, A., Walsh, P., Wellisch, M. 2012. Product developments in the bio-based chemicals arena. Biofuels, Bioproducts and Biorefining,6: 606–624.
11. Furlan, S.A., Bouilloud, P., Castro, H.F.1994. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. Process Biochemistry, 29:657-662.
12. Girio, M.F., Pelica, F., Collaco, M.T.A. 1996. Charactrization of xylitol dehydrogenase from *Dobaryomyces Hansenii*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 56:79-87.

13. Granström, T. 2002. Biotechnological production of xylitol with *Candida* yeasts (Doctoral dissertation, Helsinki University of Technology).

14. Granström, T.B., Izumori, K., Leisola, M. 2007. A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. Appled Microbiology and Biotechnology, 74: 273-276

15. Haghighi Mood, S., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G.H., Gholami, M., Ardjmand, M. 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment, Renewable andSustainable Energy Reviews, 27: 77–93.

16. Horiuchi, J., Tada, K., Kanno, T. 2010. Biorefinery for bioethanol, lactic acid, xylitol and astaxanthin production from corn cobs. Journal of Biotechnology, 150: 171

17. Karagöz, P., Özkan, M. 2014. Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and*Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. Bioresource Technology, 158: 286-293.

18. Latif, F., Rajoka, M.I. 2001. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts, Bioresource Technology, 77(1): 57–63.

19. Lau, M. W., Bals, B. D., Chundawat, S. P., Jin, M., Gunawan, C., Balan, V., Dale, B. E.2012. An integrated paradigm for cellulosic biorefineries: utilization of lignocellulosic biomass as self-sufficient feedstocks for fuel, food precursors and saccharolytic enzyme production. Energy and Environmental Science, 5(5):7100-7110.

20. Limayem, A., Ricke, S.C.2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. Progress in Energy and Combustion Science, 38(4): 449-467.

21. Lu, Y., Warner, R., Sedlak, M., Ho, N.Mosier, N.S.2009. Comparison of glucose/xylose cofermentation of poplar hydrolysates processed by different pretreatment technologies. Biotechnology Progress,25*:* 349–356.

22. Ma, H., Liu, W.W., Chen, X., Wu, Y.J., Yu, Z.L. 2009. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. Bioresource Technology, 100: 1279-1284

23. Nigam, J.N.1999. Continuos ethanol production from pineapple cannery waste, Journal of Biotechnology,72: 197-202

24. Parajo, J.C., Dominguez, H., Dominguez, J.M. 1998.Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamental of its biosynthesis. Bioresource Technology, 65: 191-201.

25. Pirzadah, T.B., Malik, B., Kumar, M., Rehman, R.U.2014.Lignocellulosic biomass: As future alternative for bioethanol production. In Biomass and Bioenergy (pp. 145-163). Springer International Publishing.

26. Rogers, P. L., Lee, K. J., Skotnicki, M. L., Tribe, D. E.1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. In Microbial reactions (pp. 37-84). Springer Berlin Heidelberg.

27. Rubio, C., Latina, C., Navarro, A. 2012, Fermentation of Corncob Hydrolysate for Xylitol Production. Bio Tecnologia, *16*(3): 48-15.

28. Rodmui, A., Dandusitapun, Y., Kongkiattikajorn, J. 2005. Biological production of xylitol and ethanol, from xylose/glucose mixture by mixed cultures. Kasetsart Journal (Natural Science) (Thailand).http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TH2006000244.

29. Saddler, J. N., Mabee, W.E., Simms, R., Taylor, M. 2012. The biorefining story: progress in the commercialization of biomass-to-ethanol. In Forests in Development: A Vital Balance (pp. 39-51). Springer Netherlands.

30. Sanchez, S., Bravo, V., Garcıa, J. F., Cruz, N., Cuevas, M. 2008. Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24:709–716.

31. Sene, L., Arruda, P.V., Oliveira, S.M.M., Felipe, M.G.A. 2011.Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. Brazilian Journal of Microbiology, 42(3): 1141-1146.

32. Singh, L. K., Majumder, C. B., Ghosh, S.2014. Development of sequential-co-culture system (*Pichia stipitis* and*Zymomonas mobilis*) for bioethanol production from Kans grass biomass. Biochemical Engineering Journal, 82: 150-157.

33. Sonnleitner, B., Käppeli, O. 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. Biotechnology and bioengineering, 28(6): 927-937.

34. Srilekha Y. K., Naseeruddin, S., Sai Prashanthi, G., Sateesh, L., Venkateswar Rao, L. 2011.Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of*Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. Bioresource Technology, 102(11): 6473-6478.

35. Tang, Y., Minzhe, A., Kai, L., Saki, N., Shigematsu, T. 2006. Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. Process Biochemistry, 41 :909–914

36. Wang, L., Wang, J.G., Littlewood, J., Cheng, H.B.2014. Co-production of biorefinery products from kraft paper sludge and agricultural residues: opportunities and challenges. Green Chemistry, 16(3): 1527-1533.

37. Winkelhausen, E., Kuzmanova, S. 1998. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. Journal of Fermentation and Bioengineering, 86(1): 1-14.

38. Yadav, K.S., Naseeruddin, S., Prashanthi, G.S., Sateesh, L., Rao, L.V. 2011. Bioethanol fermentation of concentrated Rice straw hydrolysate using co culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. Bioresource Technolology, 102(11):6473-8

39. Zahed, O., Salehi Jouzani, Gh., Abbasalizadeh, S., Khodaiyan, F.,, Tabatabaei, M., 2015, Continuous co-production of ethanol and xylitol from rice straw hydrolysate in a membrane bioreactor. Folia Microbiologica (In Press).

40. Zha, J., Li, B.Z., Shen, M.H., Hu, M.L., Song, H., Yuan, Y.J. 2013. Optimization of CDT-1 and XYL1 expression for balanced co-production of ethanol and xylitol from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*, PLoS ONE 8(7): e68317.

41. Zhang, J., Geng, A., Yao, C., Lu, Y., Li, Q. 2012. Xylitol production from d-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. Bioresource Technology, 105: 134-141.

Optimization of nitrogen source and dissolved oxygen concentration to enhance co-production of ethanol and xylitol in a co-culture system of two *Saccharomyces cerevisiae* and*Candida tropicalis* strains

Zahed O.[1], Salehi Jozani Gh.R.[2] and Khodaiyan F.[1]

[1] Food Science and Technology Dept., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

[2] Biosafety and Microbial Biotechnology Research Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Application of biorefinery approach in which in addition to bioethanol, simultaneously one or more other biological products are produced, has attracted attention as a new and hopeful strategy to economize ethanol production from lignocellulosic biomass. So, objective of the present study was to optimize co-production of ethanol and xylitol in a co-culture system of two *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis*strains in a batch fermentor. To determine the best nitrogen source, two strains were co-cultured on the medium containing one of 8 different organic and mineral nitrogen sources (6 g/l). The results showed that different nitrogen sources showed significantly different biorefinery efficiency, and the maximum ethanol (24.41 g/l), xylitol (22.7 g/l) and biomass (13.24 g/l) production was observed when yeast extract was used. At the next step, effect of different dissolved oxygen concentrations, 5, 10, 20 and 30%, was evaluated on the efficiency of ethanol and xylitol production at batch fermentor level. The maximum ethanol production (38 g/l) and yield efficiency ($Y_{p/s}$= 0.47 gram ethanol per gram used glucose) was achieved when dissolved oxygen concentration was 5%, whereas the maximum xylitol production (21.6 g/l) and yield efficiency ($Y_{p/s}$= 0.54 gram produced xylitol per gram used xylose) was achieved when dissolved oxygen concentration was 10%. Also, the maximum biomass (25.7 g/l) was achieved at 30% dissolved oxygen concentration. Finally, it could be concluded that the yeast extract and 5-10 % oxygen concentrations were selected as the best nitrogen source and oxygen concentrations, respectively, for co-production of xyltitol and ethanol by co-culture of the studied yeasts.

Keywords: Bioethanol, *Candida tropicalis*, Optimization, *Saccharomyces cerevisiae,* Xylitol.