

Candida parapsilosis에 의한 Xylitol 생성시 포도당의 영향

오덕근* · 김종화
우석대학교 식품공학과

Effect of Glucose on Xylitol Production by *Candida parapsilosis*. Deok-Kun Oh* and Jong-Hwa Kim.
Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Chonju 565-800, Korea — Effect of glucose addition to xylose medium on xylitol production was investigated by using *Candida parapsilosis* ATCC 21019 mutant. With increasing the ratio of glucose to xylose in total amount of 50 g/l as glucose and/or xylose, xylitol production was decreased but ethanol and glycerol production were increased. Ethanol and glycerol concentration were maximum in 10 g/l of xylose and 40 g/l of glucose medium as 21.5 g/l and 3.6 g/l, respectively. No xylitol was formed in glucose medium without xylose because xylitol could be not produced from glucose. With increasing the ratio of glucose to xylose, the activity of xylose reductase which converted xylose to xylitol were decreased. The activities of xylitol dehydrogenase which converted xylitol to xylulose and then cell materials were found to be constant regardless of the ratio of glucose to xylose. This results indicated that glucose addition to xylose medium on cell growth was not affected. In order to prevent the inhibitory effect of glucose on xylitol production, glucose in a fermentor was fed with low concentration and then ethanol and glycerol was critically decreased and the xylitol yield from xylose of the culture with glucose feeding was recovered the almost same as that with only 50 g/l of xylose. However, the xylitol yield from total sugars (xylose and glucose) was decreased and glucose was not contributed to xylitol production. Therefore, the fermentation at high concentration of xylose without glucose was carried out. A final xylitol concentration of 242 g/l which corresponding 80.7% of xylitol yield was obtained from 300 g/l of xylose for 273 hours.

오탄당인 xylitol은 높은 감미도로 인하여 식품의 여러분야에서 감미료로 응용되고 있고 특히 당뇨병 환자의 대용당과 충치의 감소에 사용되고 있다. 지금까지 xylitol은 xylose로부터 환원에 의한 화학적 방법으로 생산하여 왔으나, 화학적 방법은 분리정제의 비용이 고가이고 알칼리를 이용한 고온 고압의 반응이므로 위험성과 폐기물 문제가 존재하는 단점이 있다(1). 이러한 단점을 해결하기 위하여 미생물에 의한 xylitol 생산방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 미생물에 의한 xylitol의 생산은 주로 효모를 이용하여 xylose나 xylose가 많이 함유된 반섬유소 가수분해물(hemicellulose hydrolysate)로부터 이루어고 있다. Xylitol을 비교적 많이 생산할 수 있는 효모는 *Candida*속의 *blankii*, *guilliermondii*, *tropicalis*, *utilis*와 *Saccharomyces*속의 *bailii*, *rouxii*, *uvarium*와 *Schizosaccharomyces*속의 *pombe* 등이 있다(2-6).

Xylose를 발효하는 효모의 경우 xylose와 glucose의 대사경로가 각각 분리되어 있기 때문에 glucose로부터 xylitol을 생성하는 것은 불가능하고(7), 실제로 128종의 효모를 이용하여 glucose로부터 xylitol 생산을 시도하여 보았으나 실패하였다(8). Glucose를 이용하여 xylitol을 생산하는 방법으로는 glucose를 xylose 배지에

첨가하는 것이 보고되어 있다(9). 이때 glucose에 의한 xylose의 catabolite repression이 존재하여 xylitol의 생산감소가 존재하는데 이것은 glucose 함유배지 대신 xylose 함유배지에서 종배양을 한 후 xylose와 glucose의 혼합배지에 배양하여 catabolite repression을 해제할 수 있었고 xylitol의 생산량을 증가시킬 수 있었다. 그러나 이 방법 역시 glucose 함량이 증가하면 xylose에 대한 xylitol의 수율이 감소하는 문제점이 있다.

미생물에 의한 xylitol의 생성은 효소 xylose reductase에 의하여 xylose가 환원되어 xylitol로 전환되어 일어난다. 생성된 xylitol의 일부는 xylitol dehydrogenase에 의하여 xylulose로 산화된 후 대사경로를 거쳐 세포구성 성분이 된다. 이때 xylose reductase의 조효소로는 NADH와 NADPH가 관여하고, xylitol dehydrogenase의 조효소로는 NAD^+ 가 관여한다(10, 11). 그러므로 xylose reductase와 xylitol dehydrogenase의 역할을 분석한다면 간접적으로 xylitol 생산을 설명할 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구에서는 효모 *Candida parapsilosis* ATCC 21019 돌연변이주 사용하여 xylose 배지에서 xylitol 생산시 glucose 첨가영향을 살펴보고 이때 생성되는 부산물과 xylitol 생산 관련 효소역가를 조사하여 glucose의 xylitol 생산 저해현상을 규명하고 고농도의 xylose 배지에서 고수율 고농도의 xylitol 생산을 시도

*Corresponding author.

Key words: Xylitol, glucose, *Candida parapsilosis*

하고자 한다.

재료 및 방법

미생물 및 사용배지

냉동보관(-70°C)중인 균주 *Candida parapsilosis* ATCC 21019를 NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)로 처리하여 선별된 성장속도가 빠른 돌연변이주(한국미생물보존협회 기탁번호 KFCC-10875)(12)를 YM 배지(glucose 20 g/l, peptone 5 g/l, yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l로 구성) 50 ml가 들어있는 250 ml 플라스크를 진탕 배양기에서 240 rpm, 30°C로 16시간 배양하였다. 이 배양액을 발효배지(총당(xylose와/또는 glucose) 50 g/l 또는 xylose 300 g/l, yeast extract 5 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.4 g/l로 구성)가 포함된 플라스크 또는 발효조에 접종하였다.

배양 방법

플라스크 배양에서는 30°C에서 발효배지 50 ml가 들어있는 250 ml 플라스크를 사용하여 교반속도를 190 rpm으로 하였다. 배양은 당(xylose와 glucose)이 완전히 소모될 때까지 하였다. 초기 pH는 4.5였고 배양중 pH는 조절하지 않았다. 발효조 배양에서는 발효배지가 3l 첨가된 5l 발효조(한국발효기)를 사용하였다. 교반속도는 배양초기에는 400 rpm으로 하였고 배양 10시간에서 교반속도를 180 rpm으로 변화시켰다. pH는 발효 전과정 동안 4.5로 조절하였고 배양온도는 30°C였다.

효소 역가

배양액으로 부터 세포를 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 회수한 후, 0.5M phosphate buffer로 두번 세척하였다. 세척된 세포에 glass bead를 넣고 mixer로 3분간 분쇄하였다. 세포분쇄액을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 상등액으로 효소역가를 분석하였다. Xylose reductase의 역가는 xylose 첨가 후 NADPH 또는 NADH의 산화에 의한 흡광도 340 nm에서 감소를 측정하였다. Xylitol dehydrogenase의 역가는 xylitol 첨가 후 NAD⁺의 환원에 의한 흡광도 340 nm에서 증가를 측정하였다(13). 이때, 영점은 기질(xylose 또는 xylitol)을 첨가하지 않은 때로 보정하였고, 역가(specific enzyme activity)는 1분 동안 단백질 1 mg 당 1 mM의 산화된 NADPH(xylose reductase의 경우) 또는 환원된 NAD⁺(xylitol reductase)로 정의하였다.

분석방법

Xylose, glucose, xylitol, glycerol과 ethanol의 농도는 Sugar-Pak I column(Millipore, USA)이 장착된 HPLC(Shimadzu C-R6A, Japan)의 Refractive Index Detector(Shimadzu RID-6A, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이

때, 용매는 물을 사용하였고, 온도는 70°C이고, 유속은 0.6 ml/min이었다. Pyruvic acid와 acetic acid는 KC-811 column(Millipore, USA)을 장착하여 측정하였다. 이때, 용매는 0.1%의 phosphoric acid 수용액을 사용하여 온도는 60°C이고, 유속은 1.0 ml/min이었다. 균체농도는 흡광도(600 nm)를 측정하여 미리 측정한 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 전환하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법으로 측정하였다(14).

결과 및 고찰

Xylose와 Glucose의 복합배지가 산물생산에 미치는 영향

Glucose가 xylitol생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 플라스크에서 총당을 50 g/l로 하여 xylose와 glucose의 함량을 변화시키면서 실험을 수행한 결과 Fig. 1과 같았다. Xylose만 50 g/l 존재하는 배지에서 배양하면 xylitol 29.8 g/l가 생성되었고 부산물인 ethanol과 glycerol이 생기지 않았으나 xylose에 glucose를 첨가하여 배양하면 xylitol 외에 부산물로 ethanol과 glycerol이 생성되었다. 이때, 다른 부산물로 pyruvic acid와 acetic acid는 검출되지 않았다. Glucose 함량이 높을수록 xylitol 생성량은 감소하였지만 ethanol과 glycerol 양은 증가하여 xylose 10 g/l와 glucose 40 g/l일 때 그 양이 각각 21.5 g/l와 3.6 g/l로 최대값을 나타내었으나 glucose만 첨가하여 배양한 경우는 최대치보다 약간 감소

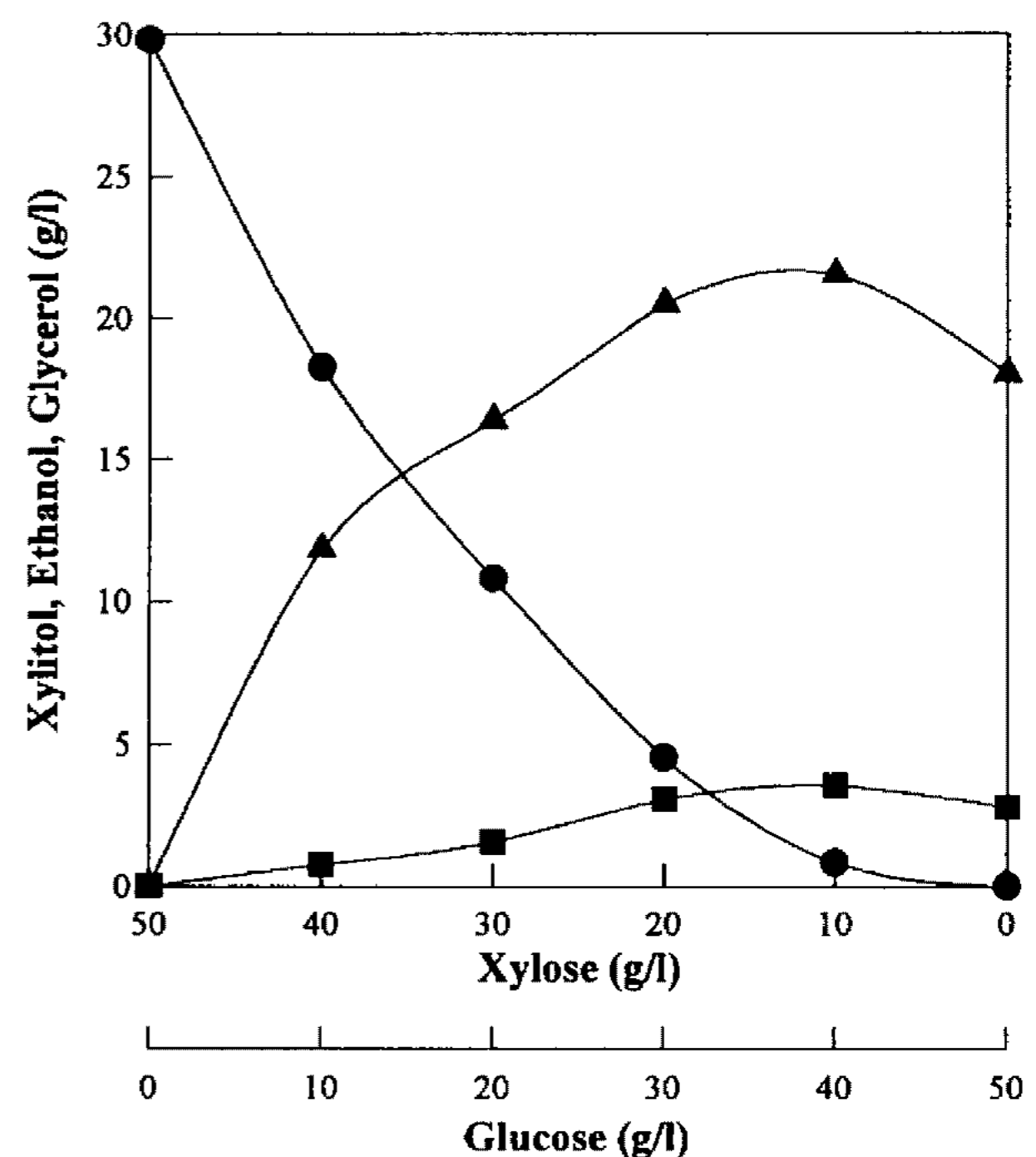


Fig. 1. Combination effect of xylose and glucose on xylitol, ethanol, and glycerol production. Xylitol (●), ethanol (▲), and glycerol (■).

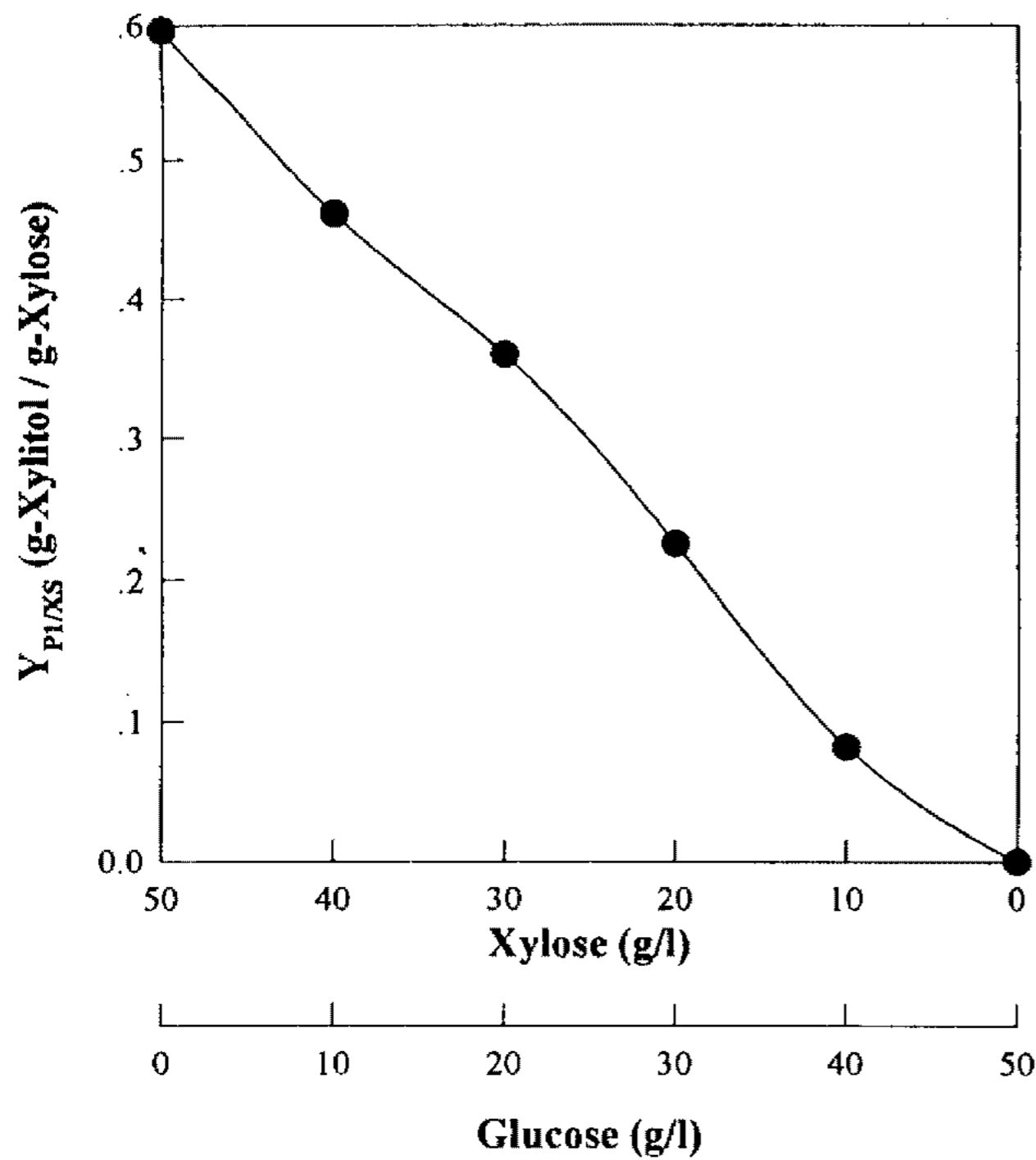


Fig. 2. Inhibitory effect of glucose on xylitol yield from xylose.

하였다. Glucose에서는 xylitol이 생성되지 못하므로 glucose만 존재하는 배지에서는 xylitol이 전혀 생성되지 않았다(7). 그러므로 이용된 xylose로부터 생성된 xylitol의 수율에 대하여 조사하였다(Fig. 2). Xylose에 대한 glucose 비율이 높을수록 xylose에 대한 xylitol의 수율이 감소하였다. Glucose에 의한 xylitol 생산감소 현상은 부산물인 ethanol과 glycerol 생산증가에 의한 결과로 생각된다.

Glucose에 의한 xylitol 생성저해 현상을 알아보기 위하여 배양시간 30시간에서 xylose를 xylitol로 전환시키는 효소인 xylose reductase와 xylitol을 xylulose로 전환시키는 xylitol dehydrogenase의 역할을 측정하였다(Table 1). Xylose reductase의 역할은 NADPH를 첨가하였을 때는 나타났으나 NADH를 첨가하였을 때는 나타나지 않아 *Candida parapsilosis*는 NADPH-linked xylose reductase만 존재하는 것으로 생각된다. Xylose의 농도가 20 g/l 이하(glucose 농도 30 g/l 이상)에서는 배지중에 아직 glucose가 존재하고 있어 xylose 이용이 catabolite repression 되고 있기 때문에 xylose reductase와 xylitol dehydrogenase의 역할이 거의 나타나지 않았다. Xylose의 농도가 30 g/l 이상(glucose 농도 20 g/l 이하)에서는 배지중에 glucose가 이미 고갈되어 존재하지 않고 xylose만 있어 xylose 이용 효소들이 이미 induction 되어 xylose reductase와 xylitol dehydrogenase의 역할이 나타나고 있다. Xylitol dehydrogenase의 역할은 존재하였던 glucose 농도에 상관없이 비교적 일정하였으나, xylose reductase는 존재하

Table 1. Combination effect of xylose and glucose on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase.

Medium	Xylose reductase (NADPH)	Xylose dehydrogenase (NAD ⁺)
Xylose 0 g/l and Glucose 50 g/l	0	0
Xylose 10 g/l and Glucose 40 g/l	0	0
Xylose 20 g/l and Glucose 30 g/l	0.06	0.02
Xylose 30 g/l and Glucose 20 g/l	0.29	0.37
Xylose 40 g/l and Glucose 10 g/l	0.36	0.34
Xylose 50 g/l and Glucose 0 g/l	0.42	0.36

Sampling time is 30 hours
Specific enzyme activities are expressed as mmol/mg/min.

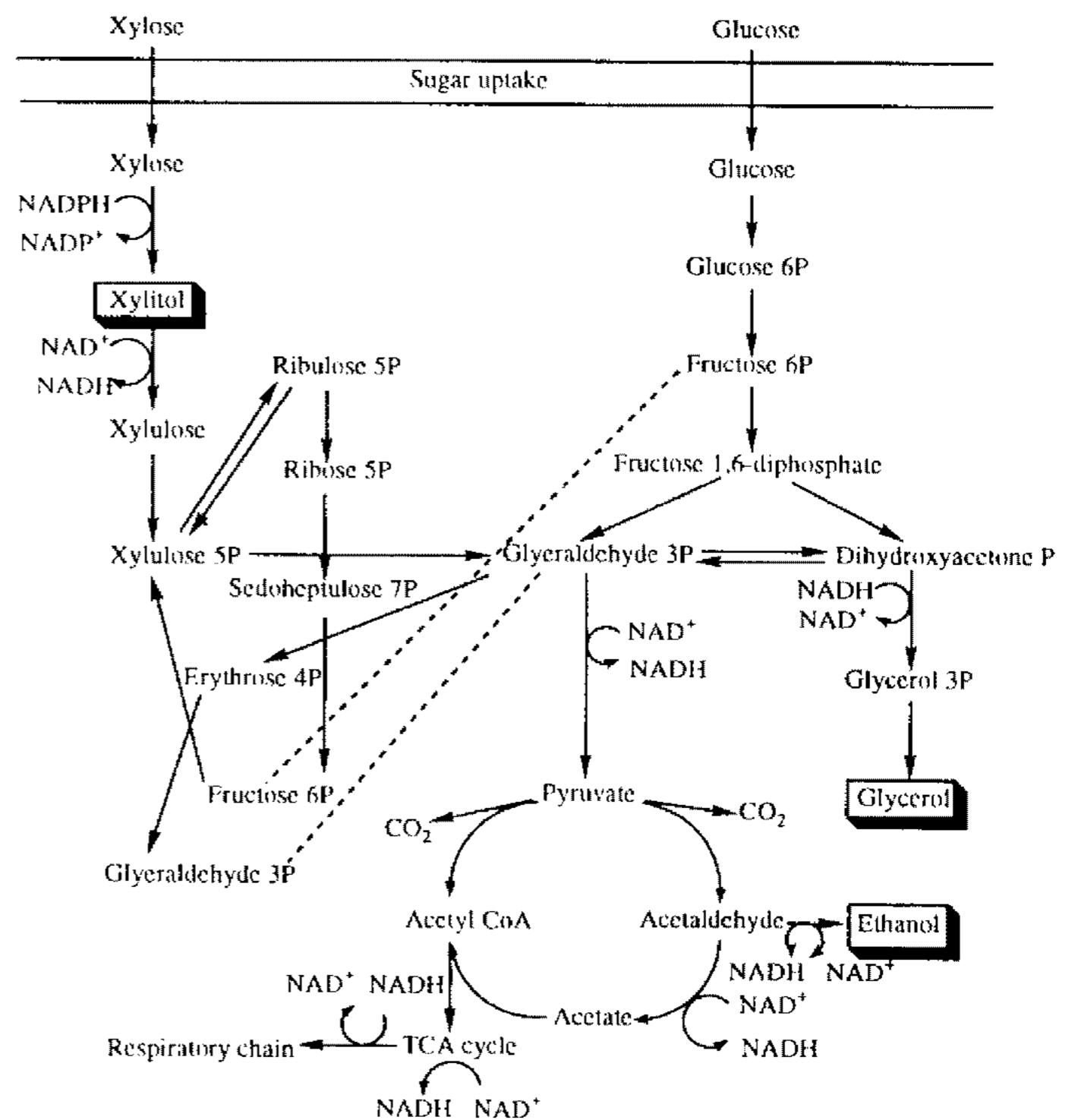


Fig. 3. Proposed pathway for the metabolism of xylose and glucose in *Candida parapsilosis*.

였던 glucose 농도가 높을수록 감소하였다. 이것은 glucose 함량이 높을수록 xylitol 생성량은 감소하는 것을 잘 설명하여 주는 결과라고 할 수 있다. *C. parapsilosis*의 xylose와 glucose의 대사경로를 본 실험결과와 문헌들을(7, 15) 종합하면 Fig. 3과 같이 제안할 수 있다.

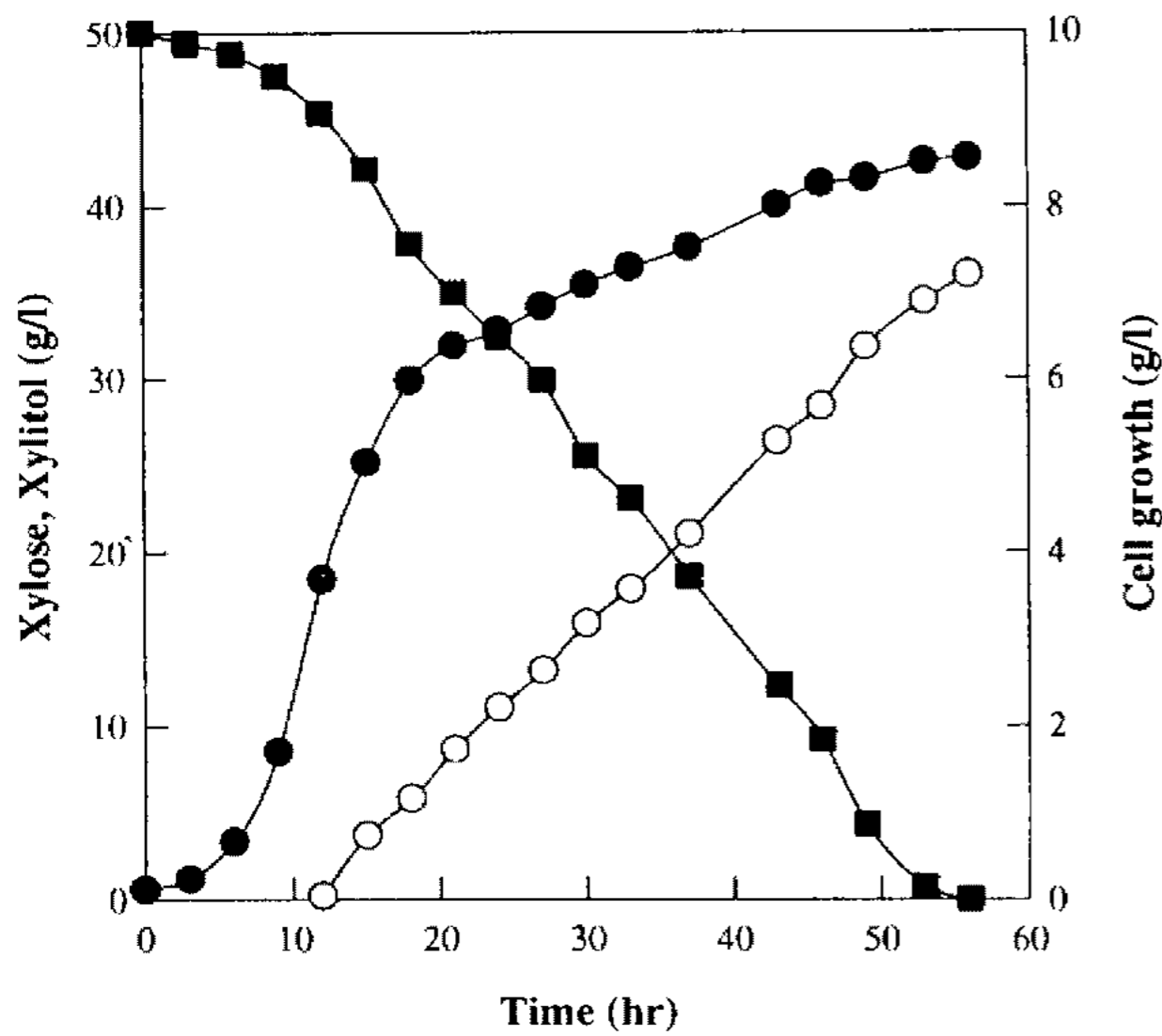


Fig. 4. Xylitol production from 50 g/l of xylose by *Candida parapsilosis* ATCC 22019 mutant. Cell growth (●), xylose (■), and xylitol (○).

그림에서 보면 xylitol 생성에는 NADPH가 관여하고 ethanol과 glycerol이 생성된 NADH를 사용되어 산화환원 전위에서 경쟁적인 관계임을 알 수 있다. 그러므로 고농도의 glucose가 존재하면 ethanol과 glycerol의 생성이 촉진되어 NADH가 사용되고, 그 결과 xylitol로 전환될 환원력(NADPH)이 감소되므로 xylose reductase의 역가가 감소되었고 xylose로부터 생성되는 xylitol의 양도 감소된 것으로 생각된다. 또한 존재하였던 glucose 농도와 무관하게 xylitol dehydrogenase의 역가가 일정한 것은 xylose에서 균체생성 능력은 존재하였던 glucose 농도와 무관하다는 것을 의미한다.

Glucose 첨가 방법이 Xylitol 생산에 미치는 영향

*Candida shehatae*의 경우 glucose 함유 배지에서 종배양을 한 후 xylose와 glucose의 혼합배지에서 배양하면 catabolite repression에 의하여 xylitol의 생산이 감소하였으나, xylose 함유배지에서 종배양을 하면 catabolite repression이 해제되어 xylitol의 생산이 증가된 보고가 있어(9) *Candida parapsilosis* ATCC 21019 돌연변이주를 xylose 함유 배지에서 종배양을 한 후 xylose와 glucose의 혼합배지에서 배양하였다. *C. parapsilosis* ATCC 21019 돌연변이주 경우는 *C. shehatae*와 달리 glucose에 의한 catabolite repression이 해제되지 않았고 발효 양상도 glucose 함유 배지에서 종배양을 한 경우와 차이점이 거의 없었다. Glucose를 첨가하지 않고 50 g/l의 xylose만으로 배양한 경우는 xylitol이 36 g/l까지 증가하였으며 acetic acid, pyruvic acid, ethanol과 glycerol 같은 부산물이 생성되지 않았다(Fig. 4). 이에 비하여 10 g/l의 glucose와 40 g/l의 xylose 함유 배지에서는 glucose의 catabolite repression에 의하여 glucose가 이용된 후 xylose가 이용되었고 xylitol 생

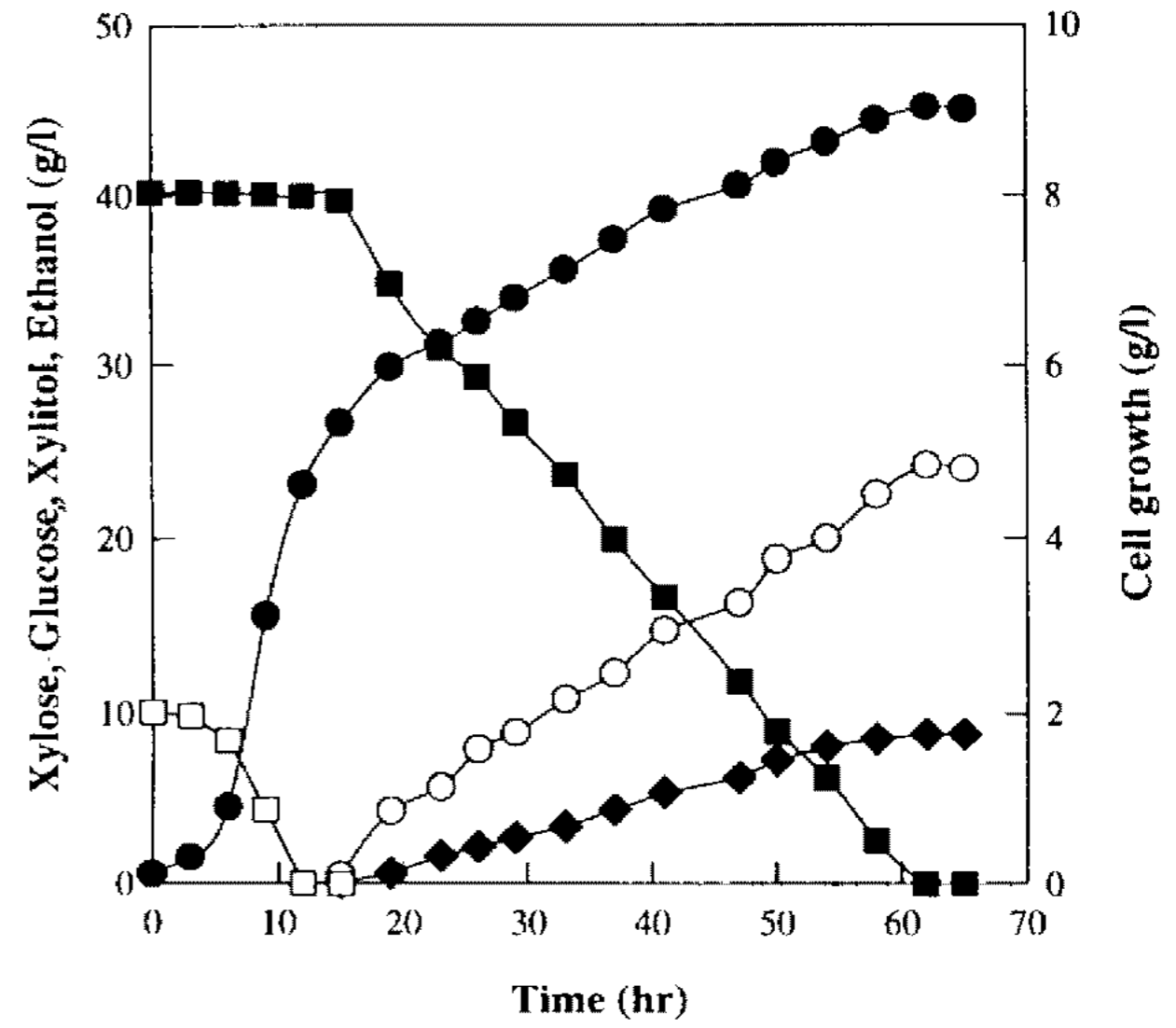


Fig. 5. Effect of the initial addition of glucose to xylose medium on xylitol production with *Candida parapsilosis* ATCC 22019 mutant. Initial 10 g/l of glucose and 40 g/l of xylose were added. Cell growth (●), xylose (■), glucose (□), xylitol (○), and ethanol (◆).

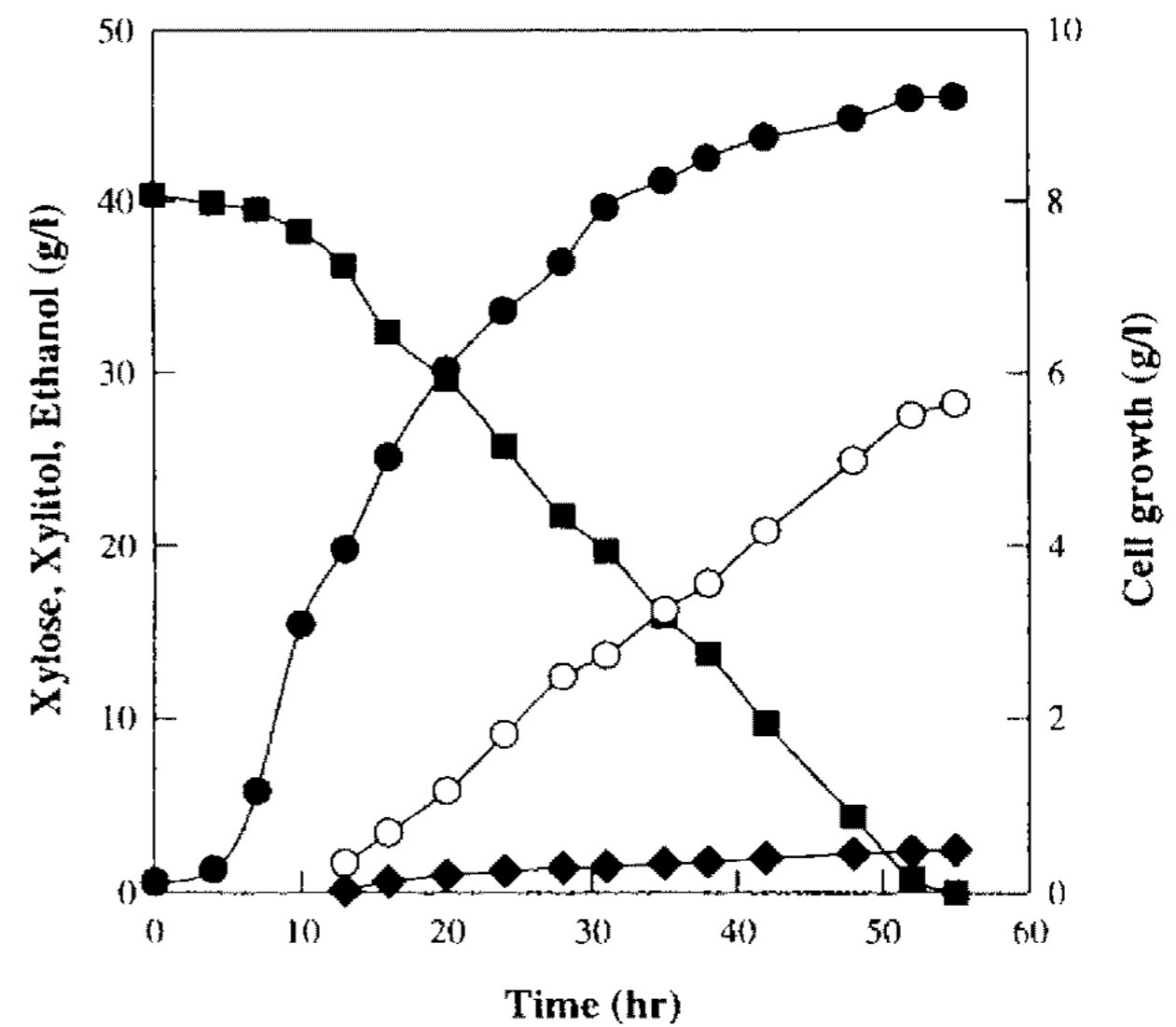


Fig. 6. Effect of the constant feeding of glucose to xylose medium on xylitol production with *Candida parapsilosis* ATCC 22019 mutant. Glucose with total amount of 10 g/l was fed with 0.25 g/l/h for 40 hours in 40 g/l of xylose medium. Cell growth (●), xylose (■), xylitol (○), and ethanol (◆).

성량도 감소하였고 부산물로 다량의 ethanol이 생성되었다(Fig. 5). Xylitol의 생성량 감소는 ethanol 생성에 의한 것으로 생각되고 생성된 ethanol은 glucose에 의하여 induction 된 것으로 생각된다. Glucose와 xylose의 혼합 배지에서 glucose에 의한 xylitol의 생성저해를 방지하기 위하여 40 g/l의 xylose 배지에 glucose의 농도를 특정 농도 이하로 하여 첨가하는 실험을 수행하였다(Fig. 6). Glucose는 0.25 g/l/h 속도로 40시간동안

Table 2. Effect of glucose addition to xylose medium on xylitol fermentation parameters.

Medium	X (g/l)	P1 (g/l)	P2 (g/l)	P3 (g/l)	μ_{max} (h ⁻¹)	q _{P1} (g/g/h)	Q _{P1} (g/l/h)	Y _{P1/S} (g/g)	Y _{P1/XS} (g/g)
Xylose 50 g/l	8.55	36.0	---	---	0.311	0.123	0.643	0.720	0.720
Xylose 40 g/l + Glucose 10 g/l (Initial)	9.03	24.2	8.75	0.58	0.413	0.067	0.390	0.484	0.605
Xylose 40 g/l + Glucose 10 g/l (Feeding)	9.22	28.5	2.39	0.12	0.497	0.101	0.585	0.570	0.713

P1=Xylitol, P2=Ethanol, P3=Glycerol

첨가하여 총 10 g/l 첨가하였고 이때 배지중의 glucose는 거의 축적되지 않았다. Glucose 첨가 결과 초기에 glucose를 10 g/l 첨가한 경우와 비교하면 부산물인 ethanol의 양이 감소되었고 xylitol 생성량도 약간 증가하였다.

Xylitol 생성시 glucose 첨가 효과를 정리하면 Table 2와 같았다. Glucose를 첨가하면 부산물로 ethanol과 glycerol이 생성되었으나 ethanol에 비하여 glycerol 양은 비교적 소량(0.6 g/l 이하)이었다. 성장속도 및 균체농도는 xylose만 존재할 때보다 glucose를 첨가하는 경우 더 높게 나타났고 glucose를 낮은 수준으로 첨가할 때는 균체농도와 비성장속도가 최대값을 보여주었다. Glucose를 낮은 수준으로 연속 첨가하여 초기에 glucose를 첨가한 경우보다 부산물인 ethanol과 glycerol을 현저히 감소시켰고, xylitol 생산성과 평균 xylitol 비생성속도도 증가시켰고, 이용된 xylose에 대한 생성된 xylitol의 수율도 증가하여 xylose만으로 배양할 때의 수준까지 접근하였다. 그러나 xylitol 생성시 전체 당(xylose와 glucose)에 대한 xylitol 수율은 감소하여 glucose에 의한 xylitol 생성 기여는 전혀 없었다.

고농도 xylose 배지에서 xylitol 생산

C. parapsilosis ATCC 21019 돌연변이주는 glucose에 대한 xylitol의 생산성 저해가 존재함으로 glucose가 없는 고농도 xylose 배지로 xylitol 생산을 시도하였다. 고농도의 xylose에서는 xylitol의 생산은 저해 받지 않지만 균체성장이 저해를 받으므로(16) 배양초기에는 150 g xylose가 첨가된 2l 배양액으로 배양하였고, 균체농도가 5 g/l 되는 시점(배양시간 10시간)부터 750 g의 xylose를 30시간동안 첨가하여 최종 배양액이 3l가 되게 하는(총 첨가된 xylose 농도는 300 g/l에 해당) 유가식 배양을 수행하였다(Fig. 7). 배양 결과 272시간에서 xylose를 모두 소모하였고 최종 균체농도는 약 8 g/l로 50 g/l의 xylose로 배양할 때보다 약간 감소하였으며 xylitol의 생산량은 242 g/l이었고 xylose로부터 xylitol의 생산수율은 80.7% 이었다. 이것은 고농도의 xylose는 xylitol 생성을 저해하지 않는다는 것을 의미한다. 고농도의 xylose에서 xylitol 생산수율이 높은 것

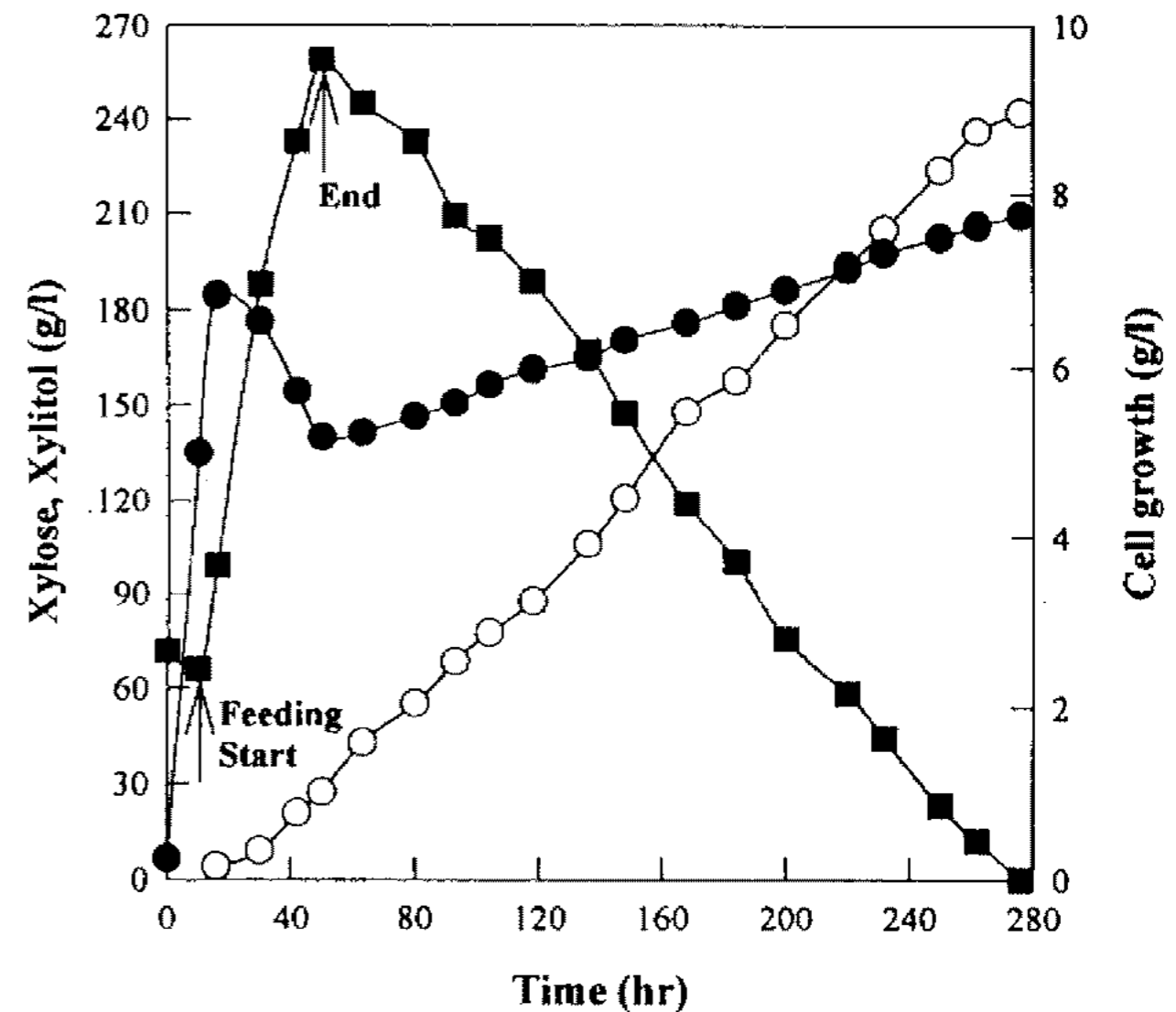


Fig. 7. Xylitol production from 300 g/l of only xylose by *Candida parapsilosis* ATCC 22019 mutant. Cell growth (●), xylose (■), and xylitol (○).

은 고농도일 수록 xylose에 대한 균체 수율이 감소되기 때문이다. 즉, xylose의 균체수율은 50 g/l일 때 0.17임에 비하여 고농도인 300 g/l의 경우 균체수율은 0.03 이었다. 300 g/l의 xylose에서의 xylitol의 생산성이 0.89 g/l/h로 50 g/l의 xylose에서의 생산성 0.64 g/l/h보다 증가하였는데 이는 기질의 농도가 높을수록 전체 배양 시간중 xylitol을 생성하지 않는 균체성장기가 차지하는 비율이 짧아지기 때문이다. 또한 발효과정중 ethanol과 glycerol은 전혀 생성되지 않았다. 기질을 xylose로 하여 xylitol을 생성한 경우 문헌보고 최고수준은 *Candida guilliermondii*를 사용하여 배양시간 406에서 300 g/l의 xylose부터 221 g/l의 xylitol을 생성한(생산수율 73.7%) 것이다(4). *C. parapsilosis* ATCC 21019 돌연변이주를 사용한 발효의 경우 *C. guilliermondii*를 사용한 경우보다 배양시간도 134시간 단축되었고 발효농도도 21 g/l 증가한 결과를 보여주었다.

요 약

Candida parapsilosis ATCC 21019 돌연변이주를 사

용하여 xylose 배지에서 배양시 glucose 첨가가 xylitol 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Glucose를 첨가한 배지에서 glucose 함량이 높을수록 xylitol 생성량은 감소하였지만 ethanol과 glycerol 양은 증가하여 xylose 10 g/l와 glucose 40 g/l일 때 최대값 각각 21.5 g/l, 3.6 g/l을 나타내었다. Glucose만 존재하는 배지에서는 xylitol이 전혀 생성되지 않았고 이 결과는 glucose에서는 xylitol이 생성되지 않는다는 것을 의미한다. Xylose에 대한 glucose의 비율을 증가시키며 배양한 결과 glucose 비율이 높을수록 xylose를 xylitol로 전환하는 xylose reductase 역가가 감소하였다. Xylitol을 xylulose로 전환(xylulose는 세포 구성성분으로 전환됨)하는 xylitol dehydrogenase의 역가는 첨가된 glucose의 양에 상관없이 xylose 이용하는 동안에서는 일정하여 glucose 첨가가 세포성장에 미치는 영향은 거의 보여주지 않았다. Xylose로 부터 xylitol 생성시 glucose의 저해효과를 방지하기 위하여 glucose를 낮은 수준으로 유지되게 첨가하는 실험을 수행하였다. 그 결과 부산물인 ethanol과 glycerol 양이 감소되었고 이용된 xylose에 대한 생성된 xylitol의 수율은 xylose 만으로 배양할 때와 거의 같은 수준을 보여주었다. 그러나, xylitol 생성시 전체 당(xylose와 glucose)에 대한 xylitol 수율은 감소하였고 glucose에 의한 xylitol 생성 기여는 전혀 없었다. 그러므로 glucose가 없는 고농도 xylose 배지로 xylitol 생산을 시도하였다. Xylose 농도 300 g/l의 배지에서 배양시 272시간에서 xylose가 모두 소모 되었으며 최종 xylitol의 농도는 242 g/l이었고 이것은 xylose에 대한 xylitol의 생산수율 80.7%에 해당된 것이다.

사용기호

- P : product concentration (g/l)
 P1 : xylitol (concentration) (g/l)
 P2 : ethanol (concentration) (g/l)
 P3 : glycerol (concentration) (g/l)
 q_p : average specific production rate (g/g/h)
 X : biomass concentration (g/l)
 $Y_{P1/S}$: overall yield of xylitol on substrate (glucose and xylose) (g/g)
 $Y_{P1/XS}$: overall yield of xylitol on xylose (g/g)
 μ_{max} : maximum specific growth rate (h^{-1})

참고문헌

1. Hyvonen, L. and P. Koivistoinen. 1983. Food technological evaluation of xylitol. *Adv. Food. Res.* **28**: 273-

2. Gong, C.S., T.A. Claypool, L.D. McCracken, C.M. Maun, P.P. Ueng, and G.T. Tsao. 1983. Conversion of pentoses by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 85-102.
3. Horitsu, H., Y. Yahashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki, and N. Watanabe. 1992. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of production rate. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1085-1091.
4. Meyrial, V., J.P. Delgenes, R. Moletta, and J.M. Navarro. 1991. Xylitol production by *Candida guilliermondii*: Fermentation behavior. *Biotechnol. Lett.* **13**: 281-286.
5. Nishio, N., K. Sugawa, N. Hayase, and S. Nagai. 1989. Conversion of D-xylose into xylitol by immobilized cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HU. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 356-360.
6. Du Preez, J.C., B. van Driessel, and B.A. Prior. 1989. D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnol. Lett.* **11**: 131-136.
7. Hahn-Hagerdal, B., H. Jeppsson, K. Skoog, and B.A. Prior. 1994. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 933-943.
8. Onishi, H. and T. Suzuki. 1969. Microbial production of xylitol from glucose. *Appl. Microbiol.* **18**: 1031-1035.
9. Kastner, J.R. and R.S. Roberts. 1990. Simultaneous fermentation of D-xylose and glucose by *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* **12**: 57-60.
10. Rizzi, M., K. Harwart, N.A. Bui-Thahn, and H. Dellweg. 1989. A kinetic study of the NAD⁺ xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 25-30.
11. Smiley, K.L. and P.L. Bolen. 1982. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachsolon tannophilus*. *Biotechnol. Lett.* **4**: 607-610.
12. 오덕근, 김상용, 최진환, 김수은. 1995. 산소분압의 조절을 이용한 자일리톨의 생물공학적 제조방법. 한국특허 출원 번호 95-37516.
13. Chiang, C. and S.G. Knight. 1966. D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase from *Penicillium chrysogenum*. *Meth. Enz.* **9**: 188-193.
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, L. Farr, and R.J. Randall. 1955. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
15. Furlan, S.A., P. Bouilloud, H.F. de Castro. 1994. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochem.* **29**: 657-662.
16. Chen, L.F. and C.S. Gong. 1985. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. *J. Food Sci.* **50**: 226-228.

(Received 25 November 1995)