

Candida mogii ATCC 18364를 이용한 D-Xylose로부터 Xylitol 생산

백 승 철 · † 권 윤 중

경기대학교 식품생물공학과

(접수 : 2004. 4. 1., 게재승인 : 2004. 6. 24.)

Xylitol Production from D-Xylose by *Candida mogii* ATCC 18364

Seoung-Chul Baek and Yun-Joong Kwont

Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

(Received : 2004. 4. 1., Accepted : 2004. 6. 24.)

Fermentation characteristics of D-xylose into xylitol by *Candida mogii* ATCC 18364, a potential xylitol producer from rice straw hemicellulose hydrolyzates, were investigated. The influences of the most important operational variables on xylitol production were examined. The best results in xylitol production were obtained in shake-flask fermentations when 3.0 g/L initial cell concentration of 12 hr-old cells grown in D-glucose containing medium were used as inoculum. The oxygen availability is a critical factor in xylose fermentation, therefore, xylose conversion into xylitol was investigated in a 2-L fermenter at different stirring rates. Maximum xylitol production was obtained with an aeration rate of 1 vvm at a stirring rate of 200 rpm.

Key Words : Xylitol, xylose, *Candida mogii*, fermentation

서 론

Xylitol은 자연계에 널리 존재하는 당알콜류로서 그 감미도가 설탕과 거의 비슷하고 인체 내에서 흡수가 느리므로 당뇨병 환자용과 저칼로리 식품의 감미료로 사용되고 있으며, 여러 천연 감미료 중에서 충치 예방효과 면에서 가장 우수한 것으로 보고되었다. 또한 xylitol은 용해될 때 열감소가 일어나는 흡열용해의 특성이 다른 당이나 당알콜보다 높아서 식품 중에 사용될 때 침을 냉각시켜 충치 예방 등에서 높은 청량감을 부여하게 된다(1, 2). 따라서 xylitol은 최근에 와서 츄잉껌, 캔디, 민트나 씹는 비타민 등의 태블릿 (tablet) 제품, 초코렛 등의 제과나 아이스크림, 요쿠르트, 치약 등에 널리 사용되고 있다.

Xylitol은 1970년대 초에 화학적인 환원에 의해 처음 상업적으로 생산되기 시작했으며, 현재에도 4단계의 화학적 방법에 의하여 목재로부터 생산되고 있다. 이러한 화학적인 공정은 부산물과 다른 polyol들을 제거하기 위하여 많은 단계의 복잡한 정제과정을 거치게 되므로 xylitol의 가격은 상당히

비싸게 된다(3). 많은 종류의 효모들은 xylose 대사의 첫 번째 단계인 xylitol로의 환원을 촉매하는 효소인 xylose reductase를 가지고 있어 xylitol을 생산할 수 있다고 알려져 있으며, 1990년대 들어와서 순수한 xylose를 기질로 하여 미생물 발효에 의한 xylitol 생산에 관한 많은 연구가 진행되고 있다(4). 그러나 가격이 비싼 상업적인 xylose를 기질로 하여 xylitol을 생산할 경우에는 우수한 발효공정이 개발되어도 화학적 방법에 의해 생산된 xylitol의 생산가격을 절감할 수는 없을 것으로 판단된다. 따라서 기존의 제품과 가격경쟁을 하기 위해서는 궁극적으로는 저렴한 기질인 반섬유소 물질을 이용하여 효모에 의한 발효공정으로 생산되어야 할 것이다.

지금까지 순수한 xylose를 이용한 연구는 많이 진행되어 왔는데 비해, 반섬유소 물질을 이용한 xylitol 생산에 관한 연구는 상대적으로 부족한 실정으로, 국내에서는 거의 이루어지지 않고 있으며 외국의 경우도 목재나 당밀 등 국내에서 이용하기가 어려운 원료를 사용한 경우가 대부분이었다. 따라서 국내에서 쉽게 이용할 수 있고 풍부한 농산 부산물인 볏짚을 이용할 경우 국내실정에 적합하여 경제적인 가치가 높을 것으로 사료된다. 볏짚을 이용하여 xylitol을 높은 수율과 속도로 생산할 수 있는 효율적인 발효공정을 개발하기 위해서는, 우선 생산효모의 xylose 발효특성에 대한 기초 자료를 얻기 위한 연구가 선행되어야 한다.

Xylitol 발효는 세포의 대사 활성에 따라 수율과 발효속도

† Corresponding Author : Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea
Tel : +82-31-249-9651, Fax : +82-31-253-1165
Email : yjkwon@kyonggi.ac.kr

가 영향을 받는데, Pfeifer 등(5)은 *C. guilliermondii* FTI 20037을 이용한 xylitol 생산 실험에서 접종균 배양 시 탄소원과 age에 따른 xylitol의 생산성 및 수율의 변화를 검토하였다. 탄소원에 따른 차이는 포도당 배지에서 성장한 균이 xylitol 생산량 18.5 g/L 및 수율 0.57 g xylitol/g xylose로 가장 좋은 효과를 지니고 있었으며, 접종균의 배양시간이 24시간인 경우 xylitol 생산량이 18.6 g/L로 가장 좋은 결과를 얻었다고 보고하였다. Cao 등(6)은 초기 균체량에 따른 xylitol 생산의 영향을 연구한 결과 초기 균체량이 증가함에 따라 xylose가 xylitol로 전환되는 속도가 빨라짐을 보고하였고, 또한 Kim 등(7)은 *C. prapsilosus*의 초기 균체의 농도가 높은 상태에서 200 g/L의 xylose를 이용하여 140 g/L의 xylitol을 56시간 만에 생산하였다고 보고하였다. 일반적으로 *Candida* 속 균주들은 넓은 pH 범위에서 xylitol을 생산하나 생산성은 pH 값에 따라서 차이가 생기고 균의 종류에 따라 최적 pH 값이 변화한다고 알려졌다(8, 9). 또한, xylose의 생물학적 전환에 있어서 용존산소는 중요한 요소로서 작용한다. 호기적 조건하에서는 세포의 성장만이 일어나고 xylitol 생산이 이루어지지 않으며, 혐기적 조건하에서는 세포의 생육속도가 감소하고 xylitol 생산도 감소한다. 따라서 산소가 제한된 조건하에서 세포의 성장과 xylitol 생산이 동시에 일어나야한다(10-12). Silva 등(12)은 *C. guilliermondii*에 의한 xylitol 생산에서 일정한 통기량 하에 교반속도를 200 rpm에서 300 rpm으로 증가시켰을 경우 xylitol 생산이 증가하였으나 400 rpm에서는 xylose의 소비만을 증가시키고 xylitol 생산은 감소하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 벗짚 가수분해물에서 xylitol의 생산성과 수율이 높은 균주로 알려진 *Candida mogii* ATCC 18364(13)를 이용하여 xylose로부터 xylitol을 생산할 때 수율과 속도에 미치는 접종균의 배양 탄소원, 접종균의 age, 초기 균체농도 및 통기량 등의 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

본 연구에서는 *Candida mogii* ATCC 18364를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 YMP 사면배지에 냉장 보관하며 사용하였다. 발효 배지의 조성은 yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, bactopectone 5 g/L이었으며, 기질로 사용되는 자일로즈는 50 g/L로 하여 갈변의 우려 때문에 별도로 살균하여 배양 전에 혼합하였다.

플라스크 배양을 통한 xylitol 생산조건 검토

종균은 10 g/L의 glucose가 함유된 YMP 배지 50 mL에 접종하여 30°C에서 12시간 배양한 후, 재차 동일배지에서 배양하여 10% (V/V) 수준으로 접종하였다. 농축균을 사용할 경우에는 2차 배양 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 적당히 생리식염수에 현탁하여 사용하였다. Xylitol 생산은 125 mL 삼각플라스크에 50 g/L의 xylose를 함유한 배지 (pH 5.5) 50 mL을 가하고 일정량의 종배양한 균을 접종한 후 250 rpm, 30°C의 진탕배양기에서 약 3-4일간 배양하였다. 배양 중 일정 시간마다 시료를 취하여 원심분리하여 균체량을 구

하고 상등액은 보관하여 당과 xylitol 분석에 사용하였다.

접종균의 배양은 탄소원으로 10 g xylose/L 혹은 10 g glucose/L를 함유하는 배지에 배양하여 각각을 50 g xylose/L 발효배지에 접종한 후 xylitol 생산을 비교하여 탄소원을 결정하였고, 결정된 탄소원으로 접종균의 배양시간을 12시간, 24시간 및 36시간으로 달리하여 각각을 접종한 후 xylitol 생산에 미치는 영향을 비교하였다. 또한 초기 균체량이 xylitol 생산에 미치는 영향을 검토하기 위해 초기 균체량을 0.5-10 g/L로 하여 3일간 발효하여 그 효과를 비교하였으며, pH에 따른 xylitol 생산량을 검토하기 위하여 pH 5.0~6.5에서 각각을 4일간 배양하였다.

발효조를 이용한 희분배양

2 L 발효조 (working volume 1 L)에 적당량의 종균을 접종한 후 30°C, pH 5.5에서 3~5일간 배양하였다. 배양 중 일정 시간마다 시료를 취하여 원심분리하여 균체량을 구하고 상등액은 보관하여 당과 xylitol 분석에 사용하였다. 통기량의 영향을 검토하기 위하여 일정한 통기량에서 교반속도를 변화시키면서 생육과 xylitol 생산이 가장 좋은 조건을 설정하였다. 통기량은 1 vvm (volume of air/volume of media)으로 고정하였고, 교반속도를 100~300 rpm으로 달리하여 각각 종균을 10% (V/V) 접종하여 4일간 배양하였다. 농축균을 이용한 희분발효에서는 초기 균체량을 3.0 g/L로 하여 통기량 1~2 vvm에서 교반속도를 100~300 rpm으로 변화시켜 각각을 3일간 배양하였다.

분석방법

Xylose와 xylitol의 농도는 Sugarpak I column이 장착된 HPLC (영린기기, M720)를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 물을 사용하였고, 온도는 90°C, 유속은 0.5 ml/min이었으며, 검출기로는 RI (Waters 410, USA)를 이용하였다. 균체의 농도는 탁도계를 이용하여 600 nm에서 현탁도를 측정하여 미리 작성한 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

결과 및 고찰

종균 배양시 배양배지의 탄소원의 영향

일반적으로 종균 배양시 탄소원으로는 glucose가 많이 사용된다. 그러나 Pfeifer 등(5)에 의하면 본 배양 배지의 탄소원이 다를 경우에는 같은 탄소원에서 배양한 종균이 대사활성의 차이로 우수한 발효결과를 나타내는 경우가 있다고 보고하였다. Glucose와 xylose를 각각 1% 함유한 YMP 배지에 *Candida mogii*를 12시간 배양하여 50 g/L의 xylose를 함유한 본배지 50 ml (125 ml flask)에 1 ml씩 접종한 후 250 rpm, 30°C에서 4일간 발효시켰으며, 그 결과를 Table 1에 요약하였다. Glucose를 포함하는 배지에서 성장한 접종균이 다소 높은 23.2 g/L의 xylitol 생산량을 보여주었다. 따라서 이후의 모든 실험은 1% glucose를 포함하는 배지에서 접종균을 배양하였다.

종균의 age가 xylitol 생산에 미치는 영향

본 배양에 접종하는 종균의 age는 세포의 대사활성과 생존

율에 관계가 있으므로, 발효의 속도와 수율에 영향을 미치는 것으로 알려졌다. 따라서 *C. mogii*를 YMP 배지에서 12, 24 및 36시간 각각 배양한 접종균을 50 g/L의 xylose를 포함하는 YMP 배지 50 ml에 초기 균체량이 0.1 g/L이 되게 접종하여 균체의 생육과 xylitol 생산에 미치는 영향을 검토하였다. *C. guilliermondii* FTI 20037의 경우 24시간 배양한 접종균이 가장 우수한 결과를 나타냈으나(5), 본 실험에 이용한 *C. mogii*의 경우는 Fig. 1에 나타낸 것처럼 12시간 배양한 종균이 24시간과 36시간 배양한 종균에 비해 약간 우수한 발효 특성을 나타내는 것으로 보였다. 12시간 배양한 종균은 3일 후에 약 18 g/L의 xylitol을 생산하여 0.55 g xylitol/g xylose의 수율과 0.25 g/L · h의 생산성을 보인 반면, 24시간과 36시간 배양한 종균은 생산량, 수율 및 생산성 모두 떨어지는 것으로 나타났다.

Table 1. Parameters for xylose fermentations with cells pre-grown on glucose or xylose

C-source	Fermentation time (days)	Xylose consumption (%)	Xylitol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L · h)
glucose	3	63	19.2	0.55	0.27
	4	85	23.2	0.49	0.24
xylose	3	56	15.6	0.51	0.22
	4	77	20.7	0.49	0.22

$Y_{P/S}$, xylitol yield (g/g of xylose used); Q_P , volumetric xylitol productivity (g/L · h)

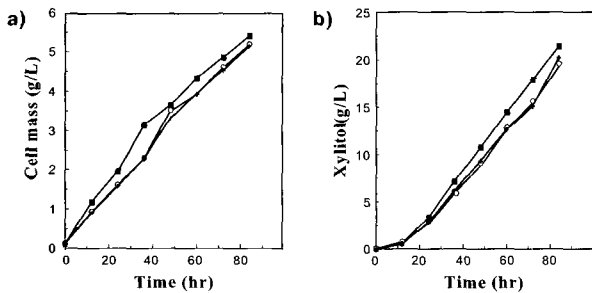


Figure 1. Effect of inoculum age on a) cell growth and b) xylitol production (■: 12 hrs-old cells, ○: 24 hrs-old cells, +: 36 hrs-old cells).

초기 균체의 농도가 xylitol 생산에 미치는 영향

일반적으로 순수한 xylose를 발효시켜 xylitol을 생산할 때 초기 균체의 농도가 증가함에 따라 xylose의 소비속도와 xylitol의 생산성이 증가한다고 알려져 있다(6, 7). 그러나 *C. guilliermondii*의 경우 높은 농도의 초기 균체를 이용하여 벗짚 가수분해물을 발효시킬 때 큰 영향이 없었다고 보고 되었다(14). 따라서 균의 종류에 따라 최적 초기 균체의 농도가 각각 다르기 때문에 *C. mogii*의 초기 균체의 농도에 따른 xylitol 생산에 미치는 영향을 검토하여 보았다. 먼저 *C. mogii*를 12시간 배양한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 적당히 희석한 다음 50 ml YMP 배지에 접종하여 초기 균체의 농도를 0.5~10 g/L로 조절하였다. 본 배양은 250 rpm, 30°C, pH 5.0에서 3일간 진탕배양하며 균체의 증식과 xylitol의 생산을 비교하여 Table 2에 요약하였다. *C. mogii*의 경우 초기 균체의 농도를 3.0 g/L로 접종하여 3일간 발효시켰을

때 22.3 g/L의 xylitol을 생산하였으며, 수율은 0.55 g xylitol/g xylose, 생산성은 0.31 g/L · h로 실험범위 내에서 가장 좋은 결과를 나타냈다. 그러나 다른 연구보고에 비해 괄목할만한 차이는 없었다.

Table 2. Effect of the initial cell concentration on xylitol production after 3 days with semi-aerobic condition

X_0 (g/L)	X_f (g/L)	S_0 (g/L)	S_f (g/L)	Xylitol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L · h)
0.60	5.2	55.6	10.1	19.0	0.42	0.26
1.1	5.3	52.5	8.1	20.9	0.47	0.29
3.1	6.4	48.7	8.5	22.3	0.55	0.31
5.4	9.2	50.7	11.5	19.1	0.49	0.27
10.4	14.3	50.7	9.9	16.4	0.40	0.23

X_0 , initial cell concentration; X_f , final cell concentration; S_0 , initial xylose concentration; S_f , residual xylose concentration (50 ml medium in 125 ml flask, 250 rpm agitation).

Xylitol 생산에 미치는 pH의 영향

일반적으로 *Candida* 속은 pH 4~6에서 xylitol을 잘 생성하는 것으로 알려져 있다. Rodrigues 등(8)에 의하면 *C. guilliermondii*의 경우 pH 6.0에서 xylitol 생산성이 가장 높은 것으로 보고되었다. 따라서 본 실험에서는 YMP 배지의 초기 pH를 5~6.5로 조절하여 각각에 *C. mogii*를 접종한 후 4일간 배양하며 xylitol 생산을 검토해 보았다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 4일간 발효했을 때 *C. mogii*의 경우 xylose 소비율은 거의 유사하였고, xylitol 생산은 pH 5.5에서 25.1 g/L로 다른 범위에서 보다 다소 높은 결과를 얻었으며, 수율과 생산성 또한 각각 0.53 g xylitol/g xylose와 0.28 g/L · h로 다소 좋은 결과를 얻었다.

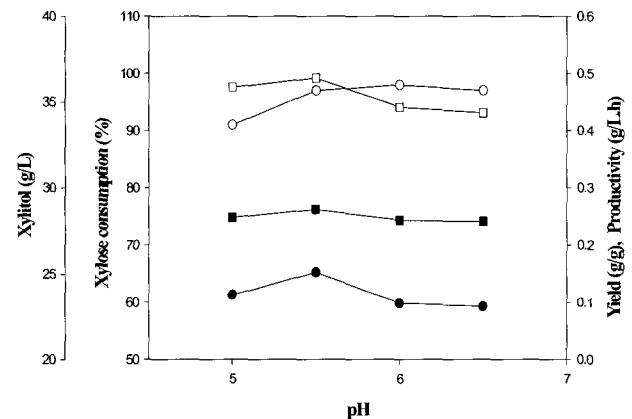


Figure 2. Effect of pH on xylitol production after 4 days of flask fermentation. (○, Xylose consumption; ●, Xylitol; □, Yield; ■, Productivity).

희분배양에서 통기량에 따른 xylitol 생산

Xylose 발효에서 통기량은 xylitol 생산에 가장 중요한 영향을 미치는 인자로 알려져 있다. 특히 호기적 조건 하에서는 일반적으로 xylitol이 생성되지 않으며 혐기적인 조건하에서는 효모의 증식이 일어나지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 제한적인 산소공급 하에서만 균체의 증식과 xylitol의

생산이 동시에 일어난다. Silva 등(12)은 *C. guilliermondii*의 회분배양에서 교반속도의 변화에 따른 xylitol 생산을 비교하였는데 0.5 vvm, 300rpm에서 가장 좋은 결과를 얻었다. *C. mogii*의 경우 Mayerhoff 등(13)에 의하면 *C. guilliermondii* 보다 더 호기적인 조건에서 xylitol의 생산이 일어나는 것으로 보고된 바 있다. 따라서 본 실험에서는 xylitol 생산조건을 검토한 실험에서 얻은 결과를 이용하여 2 L 발효조 (1 L 배지)에서 회분배양을 실시하여 통기량의 영향을 검토하였다.

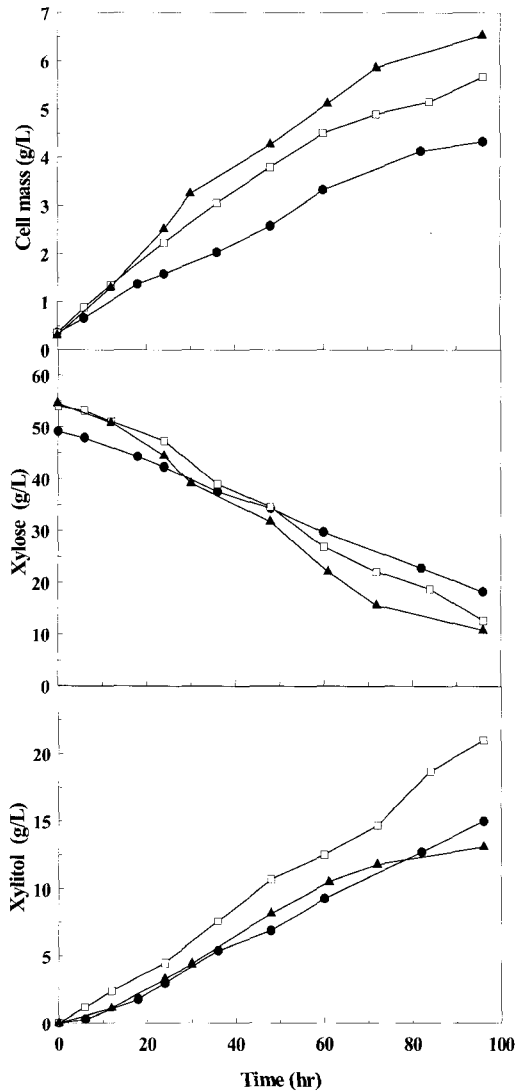


Figure 3. Effect of the agitation speed on xylitol production during batch fermentation of xylose by using 10% inoculum of *Candida mogii*. (●, 100 rpm; □, 200 rpm; ▲, 300 rpm).

Glucose (10 g/L)에서 12시간 배양한 종균을 10% (V/V) 접종하여 pH 5.5, 30 °C, 통기량 1 vvm에서 교반속도를 100, 200 및 300 rpm으로 조절하여 각각에서 4일간 배양하면서 균의 생육과 xylitol 생산을 비교하였다. Fig. 3에 나타난 것과 같이 1 vvm, 200 rpm에서 4일 후에 xylitol이 21.0 g/L 생산되었으며, 수율 0.51 g xylitol/ g xylose, 그리고 0.22 g/L · h의 생산성을 나타내어 가장 우수한 결과를 보여주었다. 반면 1 vvm, 100 rpm의 경우 xylose의 소비속도가 느려 xylitol이 15 g/L 정도 생산되었으며, 수율은 0.49 g xylitol/g xylose로, 생산성은 0.16 g/L · h로 감소하였다. 300 rpm의 경우 균체의 생육이 가장 빨라 4일 후에 약 6.5 g/L까지 증식되었으나 xylitol 생산량이 13.1 g/L로 감소하였고, 특히 수율은 0.31 g xylitol/g xylose로 크게 감소하였다. 이는 소비된 xylose가 세포의 성장대사에 작용한 것으로 사료되며, Silva 등(12)의 결과와 유사하였다.

전 실험에서 접종균의 양을 10% (v/v)로 하여 통기량 1 vvm, 200 rpm에서 xylitol 발효를 진행시켰을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었으나, 농축균 이용시에는 이미 균의 증식이 많이 되어있는 상태이기 때문에 용존산소의 요구량이 달라질수 있을 것이다. 따라서 본 실험에서는 농축균을 1 L 발효배지에 초기 균체농도가 3.0~3.5 g/L 되도록 접종하여 3일간 배양하며 통기량이 xylitol 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 용존산소의 농도는 통기량 1 vvm에서 교반속도를 100 rpm과 200 rpm으로, 그리고 통기량 2 vvm에서 교반속도 300 rpm으로 변화시키며 조절하였다. Table 3에 나타난 것과 같이 교반속도를 100에서 200 rpm으로 증가시켰을 때는 세포의 생육, 기질의 소비와 xylitol의 생산에 있어서 모두 우수한 결과를 나타내었다. 그러나 통기조건을 보다 호기적인 2 vvm, 300 rpm으로 하였을 때는 기질의 소비는 증가하였지만 xylitol 생산량은 오히려 감소하였다. 낮은 통기조건에서는 3일 후에 xylitol 수율이 0.69 g/g으로 가장 높았으나 생산성은 0.21 g/L · h로 가장 낮았다. 이것은 산소제한 조건에서 균의 증식보다는 xylitol 생산이 더 일어났으나 기질의 소비가 느려서 생산성은 떨어진 것으로 보인다. 호기적 조건에서는 기질의 소비가 가장 많이 되었지만 수율은 0.35 g/g으로 상대적으로 가장 낮았는데, 그 이유는 기질이 균체의 증식에 더 많이 소비되었기 때문인 것으로 사료된다. 또한 농축균을 사용한 결과를 10% (V/V) 접종균을 사용했을 때와 비교하여 보면 xylitol 생산량은 3일 후에 19.3 g/L를 생산하여 약 30% 증가를 보였으며, 생산성은 0.20에서 0.27 g/L · h로 증가하였고, 수율은 0.46에서 0.58 g/L · h로 증가하였다. 그러나 10% 접종균을 사용했을 경우 균체의 농도가 증가함에 따라 xylitol 생산속도가 증가하여 4일 후에는 약 21 g/L

Table 3. Kinetic parameters of xylose fermentation for 3 days by using concentrated inoculum of *Candida mogii* ATCC 18364

Aeration	X ₀ (g/L)	X _f (g/L)	S ₀ (g/L)	S _f (g/L)	Xylitol (g/L)	Y _{PS} (g/g)	Q _P (g/L · h)
1 vvm, 100 rpm	2.86	6.93	45.4	23.3	15.3	0.69	0.21
1 vvm, 200 rpm	3.50	10.54	47.4	13.9	19.3(21.9) [*]	0.58	0.27
2 vvm, 300 rpm	3.46	10.64	52.5	2.7	17.6	0.35	0.25
1 vvm, 200 rpm	0.35	4.90	54.0	22.1	14.7(21.0) [*]	0.46	0.20

^{*} after 4 days

의 xylitol을 생산함에 따라 농축균을 사용했을 때와 큰 차이가 없었다.

요 약

벗짚 가수분해물로부터 xylitol 생산능력이 가장 우수하다고 알려진 *Candida mogii* ATCC 18364의 xylose 발효특성에 관한 기초연구를 수행하였다. 상업적인 자일로즈로부터 *C. mogii*에 의해 xylitol을 생산할 때 수율과 속도에 미치는 여러 영향을 검토한 결과, 포도당을 함유한 기질에서 12시간 배양한 종균을 3.0 g/L의 농도로 접종하여 발효시켰을 때 가장 좋은 결과를 얻었다. 또한 xylose 발효에서 가장 중요한 요인인 용존산소 농도의 영향을 알아보기 위해, 2 L 발효조에서 통기량과 교반속도를 조절해 가면서 xylitol 생산을 비교 검토하였다. 농축균과 10% 접종균을 사용했을 경우 모두, 1 vvm의 통기량과 200 rpm의 교반속도에서 xylitol 생산이 가장 우수하였다.

감 사

본 연구는 2002 (10차)년도 산학연 공동기술개발 컨소시엄 사업 (중기청) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Pepper, T. and P. M. Olinger (1988), Xylitol in sugar-free confections, *Food Technol.* **10**, 98-106.
2. Ylikhri, R. (1979), Metabolic and nutritional aspects of xylitol, *Adv. Food Res.* **25**, 159-180.
3. Parajo, J. C., H. Dominguez, and J. M. Dominguez (1998), Biotechnological production of xylitol. Part I: Interest of xylose and fundamentals of its biosynthesis, *Biores. Technol.* **65**, 191-201.
4. Winkelhausen, E. and S. Kuzmanova (1998), Microbial conversion of D-xylose to xylitol, *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 1-14.
5. Pfeifer, M. J., S. S. Silva, M. G. A. Felipe, I. C. Roberto, and I. M. Mancilha (1996), Effect of culture condition on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**, 423-430.
6. Cao, N. J., R. Tang, C. S. Gong, and L. F. Chen (1994), The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by Yeast, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **45**, 515-519.
7. Kim, S-H., S-H. Yoon, J-M. Kim, and D-K. Oh (1996), Effect of cell density on xylitol fermentation by *Candida parapsilosis*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 970-973.
8. Rodrigues, D. C. G. A., S. S. Silva, and M. Vitolo (2002), Influence of pH on the xylose reductase activity of *Candida guilliermondii* during fed-batch xylitol bioproduction, *J. Basic Microbiol.* **42**(3), 201-206.
9. Nollet, V., L. Preziosibello, and J. M. Navarro (1995), The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH, *Biotechnol. Lett.* **17**, 417-422.
10. Parajo, J. C., H. Dominguez, and J. M. Dominguez (1998), Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media with commercial sugars, *Biores. Technol.* **65**, 203-212.
11. Martinez, E. A., S. S. Silva, and G. A. Felipe (2000), Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by continuous stirred-tank reactor fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84/86**, 633-641.
12. Silva, S. S., I. C. Roberto, M. G. A. Felipe, and I. M. de Mancilha (1996), Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor, *Process Biochem.*, **31**, 549-553.
13. Mayerhoff, Z. D. V. L., I. C. Roberto, and S. S. Silva (1997), Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains, *Biotechnol. Lett.* **19**, 407-409.
14. Roberto, I. C., S. Sato, and I. M. de Mancilha (1996), Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*, *J. Ind. Microbiol.* **16**, 348-350.