

Candida mogii 에 의한 Xylitol 생산시 Xylose/Glucose 혼합배지의 2단계 발효

백 승 철 · † 권 운 중

경기대학교 식품생물공학과

(접수 : 2006. 11. 7., 게재승인 : 2006. 11. 20.)

Two Stage Fermentation of Xylose/Glucose Mixture for Xylitol Production by *Candida mogii*

Seung-Chul Baek and Yun-Joong Kwon†

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

(Received : 2006. 11. 7., Accepted : 2006. 11. 20.)

Two stage fermentations of glucose/xylose mixture which is similar composition with rice straw hemicellulose hydrolysate were performed by *Candida mogii* ATCC 18364. In first stage, glucose was consumed rapidly for cell growth in aerobic condition (2 vvm, 300 rpm), then D-xylose was used for xylitol production in semi-aerobic condition (1 vvm, 300 rpm). After 4 days of fermentation, about 24 g/l xylitol was produced with a yield of 0.58 g/g and volumetric productivity of 0.25 g/l · h. To improve the xylitol yield by reduction of xylose consumption for cell growth and maintenance, D-glucose was continuously supplemented during the second stage of fermentation. By D-glucose feeding of 6.8 g/l · day, xylitol was produced up to 29 g/l with a yield of 0.8 g/g and volumetric productivity 0.30 g/l · h which are 1.2-1.3 times higher than those obtained without D-glucose feeding.

Key Words : Xylitol, xylose/glucose, *Candida mogii*, glucose-feeding

서 론

Xylitol은 자연계에 널리 존재하는 당알콜류로서 그 감미도가 설탕과 거의 비슷하고 인체 내에서 흡수가 느리므로 당뇨병 환자용과 저칼로리 식품의 감미료로 사용되고 있으며, 충치예방 효과가 우수하고 청량감이 높은 것으로 알려져 치약, 캔디, 치약 등 다양한 제품에 사용되고 있다 (1, 2).

현재 xylitol은 반섬유소 가수분해물의 주성분인 xylose의 화학적 환원에 의해 상업적으로 생산되고 있다. 그러나 반섬유소 가수분해물에는 xylose외의 여러 당들이 존재하고, 이 당들로부터 polyol들이 생성되므로 xylose 또는 xylitol로부터 이들 부산물을 분리·정제하는데 비용이 많이 들어 xylitol의 가격은 상대적으로 고가이다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로 *Candida*속 등의 효모를 이용하여

xylose로부터 xylitol을 생산하는 연구가 많이 진행되고 있으며, 특히 생물공학적 공정의 단점인 낮은 생산성과 수율을 향상시키기 위한 많은 방법들이 제안되었다(3-5). 또한 저렴한 기질원이 될 수 있는 임산자원과 농산 폐자원 등과 같은 lignocellulosic biomass를 탄소원으로 이용하는 연구들도 보고되었다(6-8).

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 벚짚을 이용할 경우 국내실정에 적합하여 경제적인 가치가 높을 것으로 사료된다. 일반적으로 벚짚에는 약 20%의 반섬유소가 함유되어 있으며, 반섬유소 산가수분해물의 주성분은 xylose로써 glucose의 약 4배 가량 함유되어 있는 것으로 알려졌다(9). 벚짚을 이용하여 xylitol을 효율적으로 생산할 수 있는 발효공정을 개발하기 위해서는, 우선 xylose/glucose 혼합당의 발효특성에 관한 연구가 선행되어야 할 것이다.

† Corresponding Author : Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

Tel : +82-31-249-9651, Fax : +82-31-253-1165

E-mail : yjkwon@kyonggi.ac.kr

당 혼합물에서 효모를 회분배양할 경우 일반적으로 배지 중에 존재하는 glucose에 의해 xylose의 이용이 저해 또는 지연된다고 알려졌다(10, 11). 그러나 Kastner 등(12)은 *C. shehatae*의 연속배양시 glucose와 xylose가 동시에 이용되었다고 보고하였다. 또한 xylose 배지에 glucose를 첨가 또는 공급하면서 발효를 진행할 경우 xylitol의 수율이 증가된다는 연구결과도 보고되었다(13, 14). Xylitol 생산시 xylose를 단일 탄소원으로 사용할 경우 효모는 xylose를 xylitol 생산뿐 아니라 생육 및 세포유지에 사용하므로 xylitol 수율은 감소하게 된다. 따라서 xylose보다 빠르게 소비되는 탄소원을 균체 증식과 NADPH 재생산에 이용하면, xylose는 xylitol 생산에만 사용되어서 xylitol 수율은 증가하게 된다. Yahashi 등(13)은 *C. tropicalis*를 이용하여 xylose 배지에 glucose를 공급하는 유가식배양을 수행하여 xylitol 수율과 생산성을 증가시켰으며, Tavares 등(10)은 *Debaryomyces hansenii*를 xylose 배지에서 연속배양할 때 glucose를 10% 비율로 첨가하여 xylitol 수율을 30% 정도 증가시켰다고 보고하였다. 또한 Kim 등(15)은 glucose와 xylose 혼합배지로부터 *C. tropicalis*를 이용하여 xylitol 생산을 수행하였는데, 이때 glucose가 세포의 생육 단계에 우선적으로 이용된 후 xylose가 균체생육에 이용되지 않고 xylitol 생산에만 사용됨으로써 xylitol 생산을 증가시켰다고 보고하였다.

본 연구에서는 벗짚 가수분해물로부터 xylitol의 생산성과 수율이 높은 균주로 알려진 *Candida mogii* ATCC 18364를 이용하여 벗짚 가수분해물에 존재하는 xylose와 glucose를 유사한 비율로 함유한 배지로부터 xylitol 생산에 관하여 검토하였다. 2단계 회분배양을 실시하여 glucose의 존재가 xylitol 생산에 미치는 영향을 검토하였으며, glucose 소비 후 xylose 이용단계 중에 glucose를 지속적으로 공급하여 xylitol 수율에 미치는 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 glucose와 xylose는 각각 10 g/l, 50 g/l로 하여 갈변의 우려 때문에 별도로 살균하여 배양 전에 혼합하였다.

Xylose/Glucose 혼합배지의 2단계 발효

균액은 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 2 l Biostat B 발효조 (B. Braun, Germany)에서 수행하였다. 발효배지 1 l에 적당량의 균액을 접종한 후 30°C, pH 5.5에서 3-5일간 배양하였다. 배양 중 일정 시간마다

시료를 취하여 원심분리한 후 균체량을 구하고 상등액은 보관하여 당과 xylitol 분석에 사용하였다.

실제 벗짚 가수분해물의 성분과 유사한 함량을 가진 50 g/l xylose 와 10 g/l glucose의 혼합당에서 농축균과 10% (v/v) 접종균을 각각 이용하여 균체의 생육단계와 xylitol 생산단계의 통기조건을 달리하는 2단계 배양을 4일간 수행하였다. 초기의 glucose 소비단계 (약 10시간)에서는 균체의 생육을 최대화 하기 위하여 호기적인 조건인 통기량 2 vvm과 교반속도 300 rpm으로 조절하였다. Glucose 소비가 거의 끝난 후 xylose가 이용되는 단계에서는 균체의 생육보다는 xylitol의 생산을 최대로 증가시키기 위하여 반호기적인 조건으로 통기량을 조절하였다. 즉, 농축균을 이용하는 경우에는 1 vvm과 200 rpm으로 통기량을 변화시켰으며, 10% 접종균을 이용한 경우에는 통기량을 1-2 vvm, 교반속도를 200-300 rpm으로 달리해가면서 4일간 배양하여 xylitol 생산성을 비교하였다.

Glucose 공급 배양

Glucose 공급 배양은 2단계 배양 중 glucose가 모두 이용된 후 xylose가 소비되는 기간동안 glucose를 지속적으로 공급해 줌으로써 xylitol의 생산을 증가시키는 방법으로, xylitol의 생산에 영향을 주는 glucose의 공급속도를 변화시키면서 xylitol 생산을 비교 검토하였다. Glucose의 공급은 1 l에 100 g, 150 g 및 250 g의 glucose가 들어있는 용액을 1.9 ml/h으로 공급하였으며, glucose의 공급속도는 각각 4.6 g/L·day, 6.8 g/l·day 및 11.4 g/l·day으로 조절하였다. 발효조건은 2단계 배양의 최적조건과 마찬가지로 생육단계에서는 통기량 2 vvm과 교반속도 300 rpm, 그리고 xylitol 생산단계에서는 1 vvm과 300 rpm으로 유지하였다.

분석방법

Xylose, glucose 및 xylitol의 농도는 Sugar-Pak I column이 장착된 HPLC (영린기기, M720)를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 초순수 증류수를 사용하였고, 유속은 0.5 ml/min, column의 온도는 90°C로 조절하였으며, 검출기로는 RI detector (Waters 410, USA)를 이용하였다. 균체의 농도는 탁도계를 이용하여 600 nm에서 현탁도를 측정하여 미리 작성한 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

결과 및 고찰

Xylose와 glucose 혼합배지로부터 xylitol 생산

벗짚 가수분해물에는 일반적으로 xylose 외에 glucose와 약간의 arabinose가 함유되어 있다. 따라서 본 실험에서는 xylose와 glucose를 5 : 1 비율로 함유한 배지를 이용하여 회분배양을 실시하여 glucose의 첨가가 xylitol 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 전보(16)의 회분배양 결과에서 농축균을 이용한 발효방법이 10% (v/v)의 접종균을 이용한 것보다 생산성이 우수한 것으로 나타났다. 따라서 2단계 배양은 xylose와 glucose 혼합배지에서 glucose가 모두 소비되는 시간까지는 균 증식을 위해 호기적인 조건하에서 배양

하였고, 생산단계에서는 반호기 조건으로 전환함으로써 농축균을 이용한 발효와 같은 효과를 얻고자 하였다. 혼합당의 함량은 glucose 10 g/l와 xylose 50 g/l로 고정하여 실험하였으며, 먼저 농축균을 이용한 2단계 발효를 2 l 발효조에 혼합당을 함유된 YMP 배지 1 l를 넣고 30°C pH 5.5에서 5일간 배양하였다. 초기 glucose 소비기간 동안 통기량은 호기적 조건인 2 vvm, 300 rpm에서 실행하여 5-6시간 후에 glucose가 모두 소비되었으며, 균체량은 3 g/l에서 5 g/l로 증가하였다(Fig. 1). Glucose가 모두 소비된 후 xylose 이용단계에서는 균체의 생육을 억제하고 xylitol 생산을 최대화 하기 위하여 통기량을 반호기적 조건인 1 vvm, 200 rpm으로 감소시켜서 배양하였고, 그 결과 4일 후에 22.4 g/l의 xylitol을 생산하였으며 균체량은 약 8 g/l까지 증가하였다.

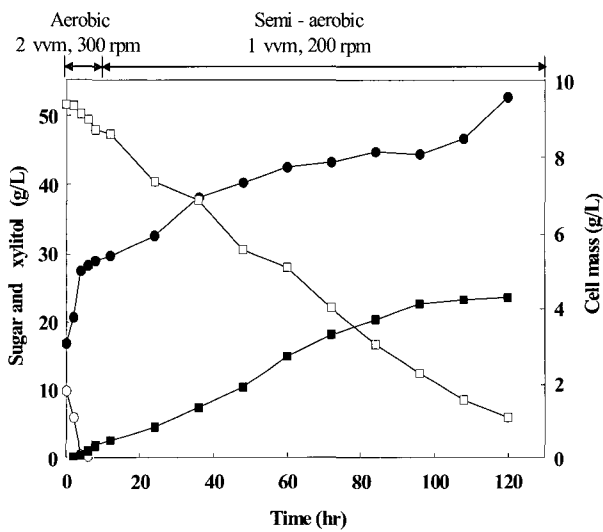


Figure 1. Two stage fermentation of glucose/xylose mixture by using concentrated inoculum. Aeration speed was switched from 2 vvm, 300 rpm to 1 vvm, 200 rpm after 8 hrs incubation (■, Xylitol ; ●, cell mass; □, xylose; ○, glucose).

농축균을 사용하지 않고서도 농축균의 효과를 얻기 위한 2단계 배양의 목적을 확인하기 위하여 초기에 같은 호기적인 조건으로 10% (v/v) 접종균을 10시간 배양한 후 2단계에서 통기량을 변화시키면서 발효를 진행하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 먼저 glucose가 거의 소비되는 10시간 후에 통기량을 1 vvm, 200 rpm으로 감소시켜 수행한 결과 균체의 농도는 0.38 g/l에서 12시간 후에 4.7 g/l까지 증가하였고 4일 후에 약 7.2 g/l까지 증가하여 농축균을 이용한 것과 같은 효과를 얻을 수 있었으나, xylitol 생산량은 4일 후에 약 18.3 g/L가 생산되어 농축균을 이용한 것에 비해 감소하였다(Fig. 2, a)). 따라서 xylose 소비량과 생산성을 높이기 위해서 두 번째 단계를 조금 더 호기적인 1 vvm, 300 rpm으로 높여서 실험을 반복한 결과 더 많은 xylose가 소비되어 균체의 생육은 4일 후에 약 8.4 g/L로 증가하였으며, xylitol도 24 g/l 정도 생산되어 Fig. 2, a보다 증가되었을 뿐만 아니라 농축균 이용 시보다도 증가하였다(Fig. 2, b)). 그러나 4일 이후 xylose의 소비는

계속 진행되었으나 xylitol은 더 이상 생산되지 않았고 균체의 증식은 지속되었다.

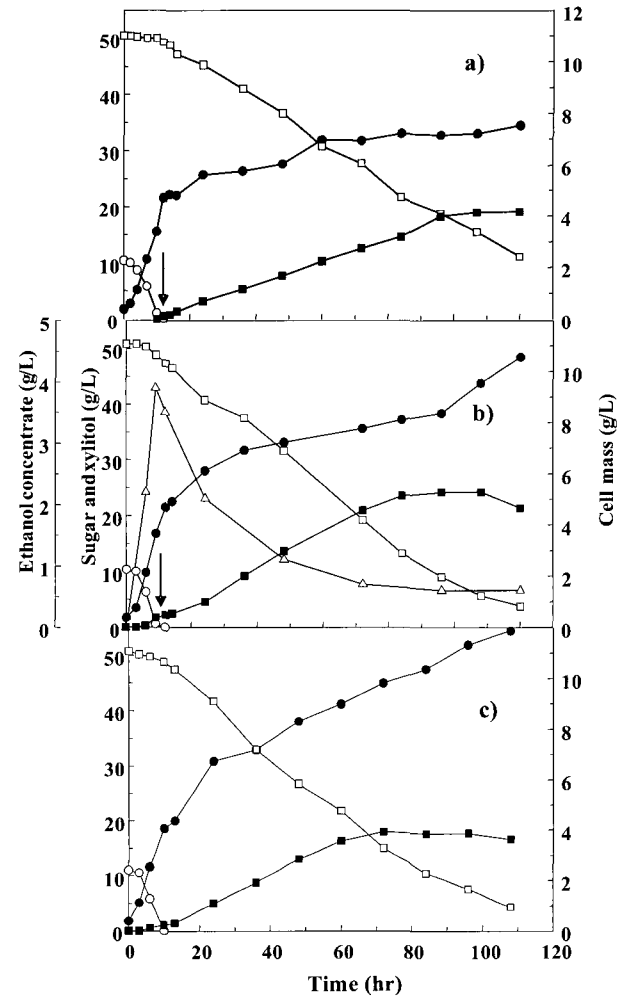


Figure 2. Effect of aeration on xylitol production during two stage fermentation of glucose/xylose mixture by *Candida mogii* ATCC 18364. Agitation speed was changed after 10 hrs of incubation (arrow ↓). a) 2 vvm, 300 rpm → 1 vvm, 200 rpm, b) 2 vvm, 300 rpm → 1 vvm, 300 rpm, c) 2 vvm, 300 rpm (■, Xylitol ; ●, cell mass; □, xylose; ○, glucose; △, ethanol).

일반적으로 2단계 배양에서는 glucose 이용으로 인한 ethanol 생성으로 인하여 균체의 생육과 xylitol 생산이 저해 받는다고 알려져 있다(17). 따라서 ethanol 생산을 동시에 분석하여 본 결과 초기에 약 4 g/l의 ethanol이 생산되었으나 그 이후에 계속 소모되어 발효 후반부에는 0.7 g/l 정도의 낮은 농도를 유지하였기 때문에 ethanol에 의한 저해는 일어나지 않은 것으로 판단되었다. 두 번째 단계의 통기량을 조금 더 호기적인 조건으로 수행한 결과 xylitol의 생산량이 증가하였기 때문에, 다음에는 균의 생육단계와 생산단계의 통기량을 모두 호기적인 조건인 2 vvm, 300 rpm으로 일정하게 유지하면서 발효를 진행시켰다. 그 결과 Fig. 2, c)에서와 같이 xylose의 소비속도는 증가하여 최종 균체의 농도는 4일 후에 약 11 g/l로 가장 높았으나, xylitol의 생산량은 약 17.7 g/l로 오히려 감소하였다.

2단계 배양의 경우 모두 glucose 소비 후의 균체량이 4-4.7 g/l 정도에 도달하여 농축균을 사용한 것과 같은 효과를 얻을 수 있었으며 최종 균체량도 비슷하였다. Xylitol 생산과 xylose 이용은 두 번째 단계의 통기량에 의해 많은 영향을 받았으며, 통기량을 1 vvm, 300 rpm으로 조절한 경우 4일 후에 약 82%의 xylose가 소비되어 0.58 g/g의 수율과 0.25 g/l · h의 생산성으로 약 24.1 g/l의 xylitol이 생산되어 가장 우수한 결과를 얻을 수 있었다(Table 1). 이 결과는 농축균을 이용한 것보다도 다소 우수한 것으로 나타났다.

Table 1. Kinetic parameters of two stage fermentations of glucose/xylose mixture

Agitation condition	X ₀ (g/L)	X _f (g/L)	Time (hr)	Xylose consumption (%)	Xylitol (g/L)	Y _{pts} (g/g)	Q _p (g/L · h)
300 rpm, 2 vvm → 200 rpm, 1 vvm	3.02	12.30	96	76	22.4	0.57	0.23
300 rpm, 2 vvm → 200 rpm, 1 vvm	0.38	7.14	96	64	18.3	0.57	0.19
300 rpm, 2 vvm → 300 rpm, 1 vvm	0.38	8.35	96	82	24.1	0.58	0.25
300 rpm, 2 vvm	0.39	11.32	96	85	17.7	0.41	0.18

Glucose 공급을 이용한 xylitol 생산

2단계 배양의 결과에서 보는 바와 같이 통기량을 낮추어도 xylose 이용단계에서 xylose가 효모 생육에 소비되어 균체가 지속적으로 증가하였음을 알 수 있었다. 따라서 xylose 이용단계에서 glucose를 지속적으로 공급함으로써 glucose가 균체 증식과 NADPH의 재생에 이용되게 하면 xylose가 xylitol 생산에 이용되어 xylitol 수율을 증가시키는 효과를 얻을 수 있을 것이다. Glucose 공급배양에서 가장 중요한 요소인 glucose 공급속도의 영향을 검토하기 위하여 glucose의 농도는 10%, 15% 및 25% 용액으로 준비하여 1.9 ml/h로 공급하여 glucose의 공급속도를 각각 4.6 g/l · day glucose, 6.8 g/l · day glucose 및 11.4 g/l · day glucose로 조절하였다. Glucose의 공급 시점은 glucose가 전부 소비되는 10시간 후에 공급하기 시작하였고 2단계 발효의 최적 조건 (2 vvm, 300 rpm → 1 vvm, 300 rpm)을 이용하였다.

생산단계에서 glucose를 4.6 g/l · day로 공급하면서 배양한 결과 Fig. 3, a)에서와 같이 4일 후에 5.5 g/l의 ethanol과 25.8 g/l의 xylitol이 생산되어 glucose를 공급하지 않은 2단계 배양보다 약간 증가하였음을 알 수 있었다. 균체의 증식도 지속적인 glucose의 공급으로 인하여 4일 후에 약 10 g/L까지 증식하였다. Glucose의 공급속도를 6.8 g/l · day로 증가시켜 실험을 반복한 결과, 4일 후에 0.8 g/g의 수율과 0.31 g/l · h의 생산성으로 약 29.4 g/l의 xylitol을 생산하여 glucose 공급을 하지 않았을 때 보다 약 20%의 증가를 보여주었다(Table 2). 또한 4일 후에 균체량은 약 10.8 g/l까지 증식하였으며 약 11.6 g/l의 ethanol을 생산하였다(Fig. 3, b)). Glucose 공급을 증가시킴으로써 glucose가 xylose보다 쉽게 이용되어 pentose phosphate 경로를 통하여 지속적으로 NADPH를 공급하고 균체의 증식으로 xylose가 소비되는 것을 감소시켜 줌으로써 xylose가 보다 효율적으로 xylitol로 전환되어 수율을 0.8 g/g로 증가시킬 수 있었던 것으로 사료된다. Glucose 공급을 11.4 g/l · day로 더

증가시켰을 경우에는 Fig. 3, c)에서와 같이 4일 후에 약 16.5 g/l의 ethanol과 26 g/l의 xylitol을 생산하여 오히려 xylitol 생산성과 수율이 감소하였다. 이는 과잉의 glucose 공급으로 인한 ethanol 생산의 증가와 glycerol과 ribitol과 같은 부산물의 생성에 기인된 것으로 생산된다. 따라서 glucose 공급시 전체적으로 xylose의 소비는 약 72%로 공급하지 않았을 때의 82%에 비하여 감소하였으며, glucose를 6.8 g/l · day로 공급하였을 경우 xylitol의 수율은 이론 수율의 약 90%를 얻었고, xylitol 생산량과 생산성은 약 20%정도 증가하였다(Table 2).

Table 2. Kinetic parameters of two stage fermentations of glucose/xylose mixture with different glucose feeding rates

Glucose feeding rate (g/L · day)	Time (hr)	Xylose consumption (%)	Xylitol (g/L)	Y _{pts} (g/g)	Q _p (g/L · h)
4.6	96	72	25.8	0.70	0.27
6.8	96	72	29.4	0.80	0.31
11.4	96	73	26.2	0.72	0.27

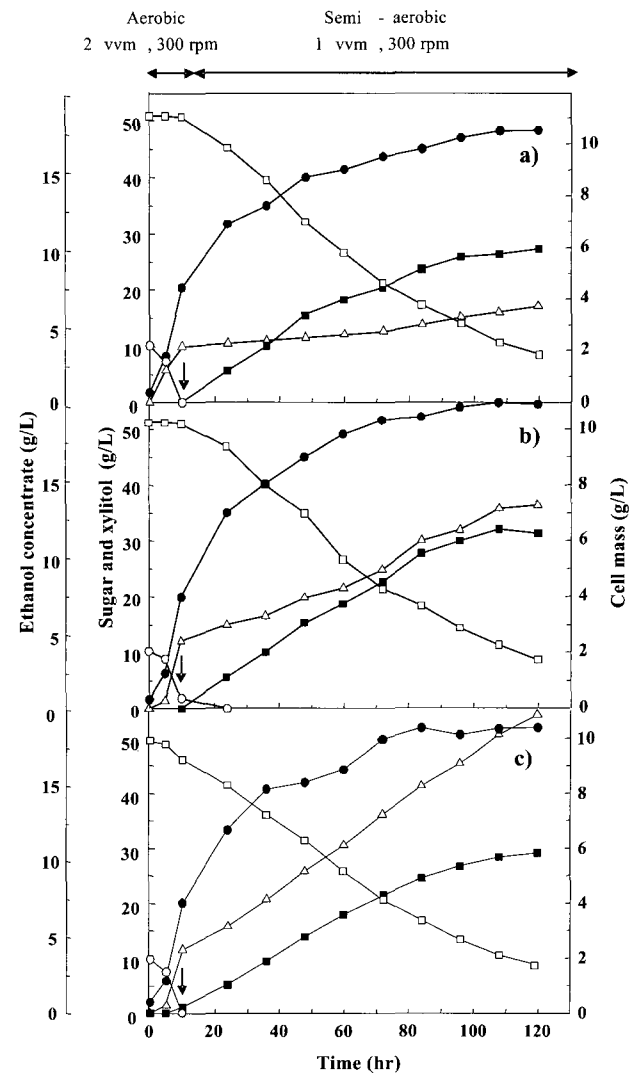


Figure 3. Effect of glucose feeding rate on xylitol production during two stage fermentation of glucose/xylose mixture. Glucose feeding was started after 10 h of incubation (arrow ↓). a) 4.6 g/l · day glucose, b) 6.8 g/l · day glucose, c) 11.4 g/l · day glucose (■, Xylitol; ●, cell mass; □, xylose; ○, glucose; △, ethanol).

요 약

벗짚 가수분해물의 조성과 유사한 xylose/glucose 혼합배지를 이용하여 *Candida mogii* ATCC 18364에 의한 xylitol 생산성 및 수율에 관한 연구를 수행하였다. 통기량을 생육단계 (약 10시간)는 호기적인 2 vvm, 300 rpm에서, 생산단계는 반호기적 조건인 1 vvm, 300 rpm으로 조절한 결과 균체의 농도가 10시간 만에 약 4.7 g/l 까지 증가하여 농축균을 사용한 것과 같은 효과를 얻을 수 있었으며, 4일 후에 0.58 g/l의 수율과 0.25 g/l·h의 생산성으로 약 24 g/l의 자일리톨이 생산되어 농축균을 이용한 것보다 약간 더 우수하였다. 또한 생산단계에서 xylose를 이용한 세포의 성장을 감소시키기 위해 생산단계에서 포도당을 6.8 g/l·day로 공급한 결과 4일 후에 0.8 g/l의 수율과 0.31 g/l·h의 생산성으로 약 29.4 g/l의 자일리톨을 생산하여, 포도당 공급을 하지 않았을 때보다 약 20~30%의 증가를 보여주었다.

REFERENCES

1. Pepper, T. and P. M. Olanger (1998), Xylitol in sugar-free confections, *Food Technol.* **10**, 98-106.
2. Ylikhri, R. (1979), Metabolic and nutritional aspect of xylitol, *Adv. Food Res.* **25**, 159-180.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Parajó, J. C., H. Domínguez, and J. M. Domínguez (1998), Biotechnological production of xylitol. part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresour. Technol.* **66**, 25-40.
8. Tran, L. H., M. Yogo, H. Ojima, O. Idota, K. Kawai, T. Suzuki, and K. Takamizawa (2004), The production of xylitol by enzymatic hydrolysis of agricultural wastes, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 223-228.
9. Roberto, I. C. C., S. S. Silva, M. G. A. Felipe, I. M. D. Mancilha, and S. Sato (1996), Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolyzate for the production of xylitol, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**, 339-347.
10. Tavares, J. M., L. C. Duarte, M. T. Amaral-Collaco, and F. M. Girio (2000), The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation, *Enz. Microb. Technol.* **26**, 743-747.
11. Du Preez, J. C. (1994), Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts, *Enz. Microb. Technol.* **16**, 944-956.
12. Kastner, J. R., W. J. Jones, and R. S. Roberto (1998), Simultaneous utilization of glucose and D-xylose by *Candida shehatae* in a chemostat, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 339-343.
13. Yahashi, Y., H. Horitsu, K. Kawai, T. Suzuki, and K. Takamizawa (1996), Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding, *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 148-152.
14. Kastner, J. R., M. A. Eitman, and S. A. Lee (2001), Glucose repression of xylitol production in *Candida tropicalis* mixed-sugar fermentations, *Biotechnol. Lett.* **23**, 1663-1667.
15. Kim, J. H., Y. W. Ryu, and J. H. Seo (1999), Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 181-186.
16. Baek, S. C. and Y. J. Kwon (2004), Xylitol production from D-xylose by *Candida mogii* ATCC 18364, *Korea J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 226-230.
17. Oh, D. and S. Kim (1996), Effect of xylose and glucose on xylitol production by *Candida parapsilosis*, *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 1151-1156.