

## *Pichia stipitis*의 Xylitol Dehydrogenase Defective Mutant에 의한 Xylitol 생산 수율 향상

김민수\* · 김철 · 서진호<sup>1</sup> · 유연우

이주대학교 화학생명공학부 및 분자과학기술학과, <sup>1</sup>서울대학교 식품공학과

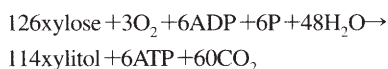
본 연구에서는 높은 수율로 xylitol을 생산하기 위하여 *P. stipitis* CBS 5776으로부터 xylitol dehydrogenase(XDH)의 활성이 결여된 변이균주의 개발과 xylitol 발효 특성에 관한 실험을 수행하였다. EMS(ethylmethane sulfonate)를 처리하여 XDH defective 변이균주인 PXM-4를 최종적으로 선별하였고, 변이균주 PXM-4의 XDH 활성을 측정함으로써 XDH 활성이 완전히 제거된 변이균주임을 확인하였다. 변이균주 PXM-4의 xylitol 발효에서 가장 적합한 cosubstrate로서 galactose를 선정하였다. Galactose와 xylose의 혼합당 배지에서 xylitol 발효를 수행한 결과 galactose의 농도가 20 g/l 이상에서는 xylitol 생산이 오히려 낮아졌고, 20 g/l의 xylose를 이용한 xylitol 발효에서 가장 적합한 galactose의 농도는 20 g/l이었으며, 생산된 xylitol의 농도는 14.4 g/l이었고, 수율은 97%이었다. 또한 잔존하는 xylose로 완전히 xylitol로 전환시키기 위해 xylitol 농도가 증가되지 않는 시기에 galactose를 첨가함으로써 최종 xylitol의 농도는 25 g/l로 향상되었다. 이와 같은 결과에 따라 XDH defective 변이균주의 개발과 배양 조건을 최적화함으로써 높은 수율의 xylitol 생산이 가능함을 확인하였다.

**Key words** □ Cosubstrate, *P. stipitis*, Xylitol, Xylitol dehydrogenase defective mutant

### 서 론

미생물에 의한 xylitol의 생산에 대한 연구는 Onish와 Suzuki (10)가 xylose 대사과정 중에 주요 생성물로 xylitol이 생산됨을 보고한 이후 주로 효모에 의한 xylitol 생산에 대한 많은 연구가 이루어졌다. Xylitol은 설탕 대체 감미료로서 우수한 기능성에도 불구하고 용도가 한정된 이유는 xylitol 생산 기질로서 xylose의 단가가 비싸기 때문이다. 따라서 현재로서는 xylitol의 산업적인 생산을 위한 수율 및 생산성 증가에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

효모에 의한 xylose의 초기 대사과정은 먼저 D-xylose가 NAD(P)H-dependent xylose reductase(XR)에 의하여 xylitol로 환원되고, 다음으로 NAD<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase(XDH)에 의하여 xylitol을 D-xylulose로 산화시키는 두 단계 반응이다. 이러한 반응경로를 통해 효모의 xylitol 생산에서 Barbosa 등(1)은 NADH를 cofactor로 사용하였을 때, 효모의 xylose 대사를 위한 전체적인 stoichiometry는 다음과 같이 나타내었다.



이러한 stoichiometry에 의한 xylitol의 이론적인 수율은 0.905 g xylitol/g xylose 라고 보고하였다. 일반적으로 xylitol 생산에 중요한 영향을 미치는 요인으로서 용존산소량인 것으로 보고되고

있다. 산소 제한조건에서 세포 내 NADPH와 NADH의 농도가 높아지게 되어 D-xylose의 환원이 유도되어 xylitol이 축적된다(5). Furlan 등(3)은 배지 내 용존산소량을 0.44%에서 0.80%로 증가시켰을 때, 생산된 xylitol 농도 및 수율이 감소하였다고 보고하였으며, 또한 Nollet 등(9)과 Winklenhausen 등(15)은 *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida boidinii*에 의한 xylitol 발효에서 배지 내 통기량을 감소시킴으로서 ethanol보다는 xylitol의 생산성 및 수율이 증가한다고 보고하였다. Xylitol 수율을 증가시키기 위한 또 다른 요인으로서 cosubstrate의 첨가이다. Silva 등(13)은 *C. guilliermondii*를 이용한 xylitol 발효에서 glucose의 첨가는 xylose reductase(XR)의 활성을 억제시키기 때문에 xylitol 농도는 감소한다고 보고하였다. 그러나 Yahashi 등(16)은 고정화된 *C. tropicalis*에서 cosubstrate로서 glucose를 첨가함으로써 xylitol의 생산수율 및 발효속도가 증가한다고 보고하였으며, 그 원인은 세포성장을 위해 glucose가 xylose보다 더 빨리 소비됨으로써 pentose phosphate pathway에서 NADPH의 생성을 증가시켜 xylitol 생산 수율이 증가하였기 때문으로 분석하였다. 따라서 본 연구에서는 xylitol 생산 수율의 증가를 목적으로 *P. stipitis* CBS 5776으로부터 xylitol dehydrogenase의 활성이 제거된 변이균주를 개발하고, 이를 이용한 xylitol 발효에서 배양 조건을 최적화함으로써 높은 수율의 xylitol 생산에 관한 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배지조성

본 연구에서는 *Pichia stipitis* CBS 5776으로부터 xylitol

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel : 042-860-4317, Fax : 042- 860-4445  
E-mail : ms5732@mail.kribb.re.kr

dehydrogenase (XDH)의 활성을 완전히 제거시킨 변이균주 PXM-4를 사용하였다. 야생균주의 보관용 배지는 YPX (10 g/l yeast extract, 10 g/l Bacto peptone, 20 g/l xylose)에 20 g/l agar를 첨가한 사면배지를 사용하였으며, 변이균주 PXM-4는 xylose 대신 glucose가 첨가된 배지(YPD)를 사용하였다. 균주의 계대는 사면배지에 균을 접종시켜 항온 배양기에서 30°C로 24시간 배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였으며, 4주마다 동일한 조성의 사면배지에 계대배양하였다. XDH defective mutant의 선별을 위한 배지는 YPDx (10 g/l yeast extract, 10 g/l Bacto peptone, 20 g/l xylose, 5 g/l glucose)의 배지를 사용하였다. 접종용 균주의 배양은 250 ml 삼각 flask에 YPD 배양배지 50 ml를 첨가하여 멸균한 후 균주를 접종하여 12시간 동안 30°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하여 사용하였다. 모든 배양 및 발효를 위한 접종용 균주의 양은 0.2 g/l로 하였다.

### Xylitol 발효

Xylitol 생산을 위한 발효배지는 5 g/l yeast extract, 5 g/l Bacto peptone, 5 g/l  $K_2HPO_4$ , 2 g/l  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.4 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 사용하였고, xylose 및 cosubstrate의 농도는 필요에 따라 변화시켜 사용하였다. 진탕 배양기에 의한 xylitol 발효는 10~100 g/l의 당이 포함된 발효배지 200 ml를 500 ml 삼각 flask에 넣고 30°C에서 150 rpm으로 배양하였다.

### 돌연변이의 유도 및 XDH defective mutant의 선별

돌연변이의 유도는 Ryu 등(12)의 방법에 따라 기본 배양 배지에서 12 시간 동안 배양한 세포 5 ml를 원심 분리하여 세포를 수집하고 멸균수로 2회 세척한 후 돌연변이 유도를 위한 시료로 사용하였다. 시료에 3%(v/v) ethylmethane sulfonate를 처리하여 변이를 유도하였으며, EMS의 처리 시간은 시간에 따른 사멸을 곡선을 작성한 후 99.9% 이상의 사멸을 나타내는 20분 동안 처리하였다. 또한 동일 부피의 5%(w/v) sodium thiosulfate를 첨가하여 변이 유도를 중단하고 적절하게 희석하여 선별배지에 도말한 후, 30°C에서 3일 간 배양하여 생성된 colony 중에서 상대적으로 작은 colony를 선별하였다. 일차적으로 선별한 변이균주를 각각 20 g/l glucose 및 xylose가 포함된 배양 배지에서

replica plating 방법을 이용하여 5회 계대배양한 후 xylose 배지에서 성장하지 못하는 변이균주를 최종적으로 선별하였다

### XDH 활성측정

XDH의 활성은 Han 등(4)의 방법을 변형시켜 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 효소용액의 준비는 발효배지에서 일정시간 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 상등액을 제거하고 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척한 후 bead beater (Biospec. USA)를 이용하여 4,000 rpm으로 3분간 세포를 파쇄한 후에 원심분리(12,000 rpm, 15 min)하여 상등액을 효소용액으로 이용하였다. 모든 효소용액의 준비과정은 4°C에서 수행하였다. XDH의 활성은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 1.5 ml, 0.1 M 2-mercaptoethanol 0.2 ml, 4 mM  $NAD^+$  0.2 ml, 효소용액 1 ml를 넣고 기질로서 0.5 M D-xylitol 0.2 ml를 첨가하여 반응을 시작한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 1 unit는 1분당 1 nmol의 NADH가 생성되는 초기속도로 정의하였다. 또한 효소의 specific activity는 unit/mg-protein으로 나타내었다. 효소용액의 단백질 농도는 Lowry-Foline법(6)에 의하여 측정하였다.

### 분석 방법

균체량의 측정은 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도와 건조 균체량의 표준곡선에 의하여 건조 균체량으로 환산하였다. Xylitol 및 모든 당은 carbohydrate analysis column(Waters Co., USA)을 이용하여 HPLC (Waters Co., USA)에서 Refractive Index (RI) detector로 측정하였다. 용매의 조성은 물과 acetonitrile을 15:85로 혼합하여 사용하였으며, 유속은 2 ml/min으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### XDH defective mutant의 유도

Xylitol 생산을 위한 기질로서 xylose는 단가가 비싸기 때문에 xylitol 생산 수율의 증진은 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 효모의 xylose 대사 과정 중 xylitol로부터 xylulose로 전환을 야

**Table 1.** Selection of XDH defective mutant from *P. stipitis* CBS 5776

Strain	Residual Xylose (g/l)	Xylitol Conc. (g/l)	Xylitol Yield (%)	Specific XDH Activity (unit/mg-protein)
<i>P. stipitis</i>	0	0.2	2	107
mutant PXM-1	2.5	4.5	60	56
" -4	4.2	5.7	98	ND <sup>a</sup>
" -7	4.8	4.9	94	ND
" -8	4.9	4.7	92	24
" -13	5.1	4.8	98	ND
" -15	4.8	5.2	100	ND
" -22	3.8	4.5	73	49
" -45	2.1	3.5	45	88

<sup>a</sup>not detected.

기하는 xylitol dehydrogenase의 활성이 제거된 변이균주를 유도하였다. 일차적으로 선별한 변이균주를 각각 20 g/l glucose 및 xylose가 포함된 배양 배지에서 replica plating 방법을 이용하여 5회 계대배양한 후 xylose 배지에서 성장하지 못하는 변이균주를 최종적으로 선별하였다. *P. stipitis*의 wild type과 선별된 변이균주들을 10 g/l xylose와 10 g/l glucose가 첨가된 발효배지에서 배양하면서 XDH 활성 및 xylitol 생산 정도를 비교하여 Table 1에 나타내었다. XDH의 활성은 glucose가 모두 소비된 후 xylose가 소비되는 시간인 배양 24시간에서 측정된 결과 변이균주 PXM-4, 7, 13, 15는 XDH의 활성이 완전히 제거되었음을 확인하였다. 또한 배양 4일 후 최종 xylitol 농도를 분석한 결과 PXM-4가 5.7 g/l로 가장 우수하였으며, 이 때의 수율은 98%이었다. 따라서 이러한 결과에 근거하여 xylitol 생산 및 수율이 우수하고, XDH 활성이 완전히 제거된 변이균주인 PXM-4를 최종적으로 선별하였다.

### Cosubstrate의 선정

변이균주 PXM-4는 세포의 성장과 유지 및 xylitol 생산을 위

한 cofactor의 공급을 위해서는 xylitol 발효에서 cosubstrate의 첨가가 필수적이다. 따라서 선별된 PXM-4가 탄소원 및 에너지원으로서 이용 가능하면서 xylitol 생성을 위한 cofactor를 제공할 수 있는 cosubstrate의 선정에 관한 실험을 수행하였다. Cosubstrate 선정에 사용된 기질로서는 단당류 및 이당류였고, 각각 10 g/l cosubstrate와 10 g/l xylose가 첨가된 발효배지에서 xylitol 발효를 수행한 결과를 Table 2에 나타내었다. 세포 성장은 cosubstrate로서 maltose를 사용한 경우 7.3 g/l로 가장 우수하였으나, xylitol 생산을 위한 cosubstrate로서는 galactose가 가장 적합한 것으로 확인되었으며, 이 때 생산된 xylitol의 농도는 5.6 g/l이었고, 수율은 99%이었다.

또한 *P. stipitis*의 야생균주와 변이균주 PXM-4를 이용하여 10 g/l galactose와 xylose가 포함된 발효 배지에서 xylitol 발효를 수행하여 당 이용의 경향과 xylitol 생성능력을 검토한 결과에서 야생균주의 경우(Fig. 1)는 배양 1일만에 galactose와 xylose를 모두 소비하였으나 xylitol은 전혀 생성되지 않았다. 반면 변이균주 PXM-4의 경우(Fig. 2)는 배양 1일만에 galactose는 모두 소비되었고 xylose는 galactose가 모두 소모된 이후부터 이용되기 시작

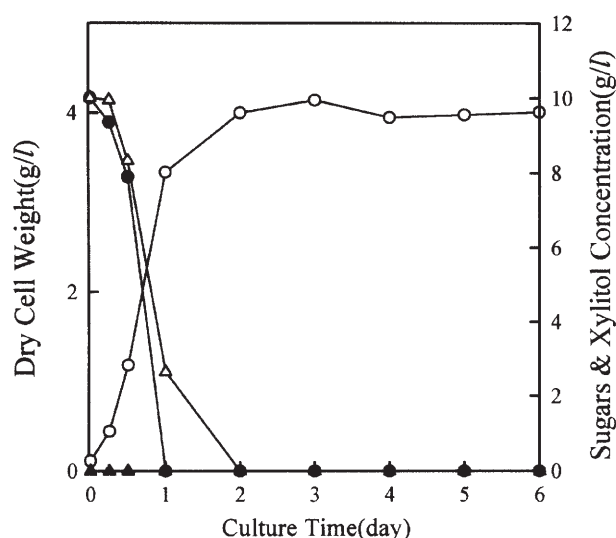


Fig. 1. Profiles of cell growth; (○), galactose; (●), xylose; (△), and xylitol; (▲), concentrations during the batch fermentation of *P. stipitis*.

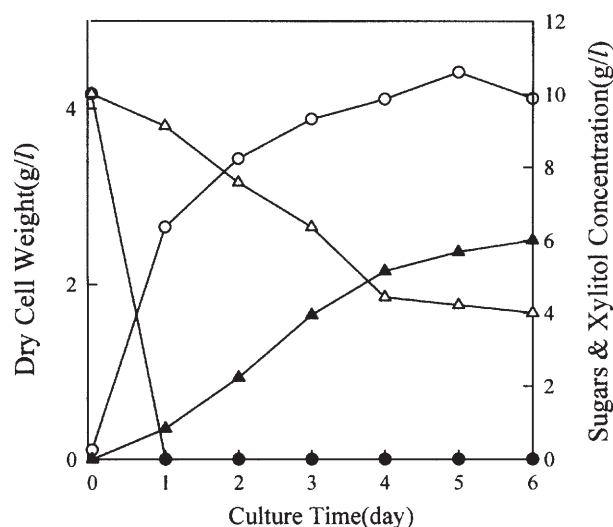


Fig. 2. Profiles of cell growth; (○), galactose; (●), xylose; (△), and xylitol; (▲), concentrations during the batch fermentation of mutant PXM-4.

Table 2. Selection of a appropriate cosubstrate for xylitol production by mutant PXM-4

Cosubstrate	Dry Cell Weight (g/l)	Residual Xylose (g/l)	Xylitol Conc. (g/l)	Xylitol Yield (%)
Fructose	6.2	5.2	4.4	92
Galactose	6.4	4.4	5.6	99
Glucose	6.4	4.3	5.6	97
Mannose	5.3	5.8	4.3	100
Cellobiose	0.2	9.7	0	0
Lactose	0.3	10.1	0	0
Maltose	7.2	7.6	1.1	43
Sucrose	6.5	8.6	0.7	53

**Table 3.** Effect of initial xylose concentration on the production of xylitol by mutant PXM-4

Initial xylose Conc. (g/l)	Dry Cell Weight (g/l)	Residual Xylose (g/l)	Xylitol Conc. (g/l)	Xylitol Yield (%)
10	4.7	4.7	5.7	100
20	4.9	6.8	13.1	99
50	4.6	32.1	18.7	100
100	4.5	80.1	21.6	100

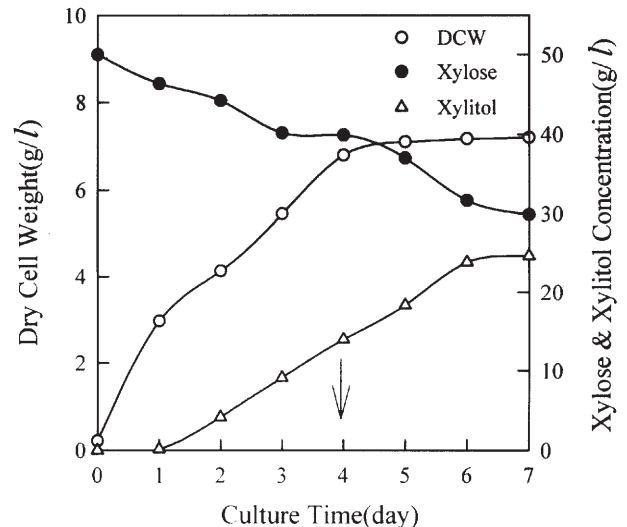
**Table 4.** Effect of initial galactose concentration of medium containing 20 g/l xylose on the production of xylitol by mutant PXM-4

Initial galactose Conc. (g/l)	Dry Cell Weight (g/l)	Residual Xylose (g/l)	Xylitol Conc. (g/l)	Xylitol Yield (%)
10	2.8	15.2	4.6	96
20	5.0	5.1	14.4	97
50	8.3	10.9	8.8	97
100	14.1	16.4	3.4	94

하였다. 또한 배양 4일 이후에는 xylitol 생성 속도가 급격히 감소하였고, 배양 5일 이후에는 더 이상 xylitol의 생성이 증가하지 않았으며, 생성된 xylitol의 양은 약 6.0 g/l 이고, 소비된 xylose에 대한 xylitol 생산 수율은 100% 이었다. 이러한 결과는 galactose가 xylose의 transport를 억제함으로써 galactose가 모두 소비된 이후에 xylose가 세포 내로 주입됨으로써 xylose가 xylitol로 전환되는 과정에 필요한 NAD(P)H가 부족하기 때문인 것으로 사료된다(8,11).

#### 초기 xylose 및 galactose 농도의 영향

효율적인 xylitol의 생산을 위한 초기 xylose 농도의 영향에 대한 실험을 수행하였다. 초기 xylose 농도를 10~100 g/l로 변화시켰고, 이 때 galactose의 농도는 xylose의 농도와 1:1이 되도록 첨가하여 5일 동안 xylitol 발효를 수행하였다. Table 3에서 나타난 것처럼 초기 xylose의 농도가 20 g/l에서 세포성장은 4.9 g/l로서 가장 우수하였고, xylose의 농도가 50 g/l 이상에서는 galactose의 농도가 증가함에도 불구하고 세포성장이 감소하였는데, 그 이유는 *P. stipitis*가 당에 대한 내성이 낮기 때문인 것으로 사료된다. 이러한 결과에 비추어 초기 xylose의 농도는 20 g/l가 가장 적합한 것으로 판정하였다. 또한 초기 xylose의 농도가 증가함에 따라 잔존하는 xylose의 농도가 크게 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Vandeska 등(14)이나 Meyrial 등(7)이 보고한 *Candida* sp.에서 초기 xylose의 농도가 증가함에 따라 xylitol의 생산 및 수율이 증가한다는 결과와는 상이한 결과를 얻었다. 그 원인은 고농도로 첨가된 galactose가 xylitol 생산을 위한 cosubstrate로서의 역할보다는 xylose의 transport를 억제하였기 때문으로 사료된다. 따라서 xylose의 transport를 억제하지 않는 galactose의 최적 초기 농도를 선정하기 위한 실험을 수행하였고, 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 초기 xylose 농도는 20 g/l로 고정하였고, galactose의 농도는 10~100 g/l로 변화시켜 첨가한 후 5일 동안 xylitol 발효를 수행하였다. Table 4에 나타난 것과 같이 xylitol 생산을 위한 galactose의 농도는 20 g/l에서 가장 우

**Fig. 3.** Profiles of cell growth (○), xylose (●), xylitol (△), concentrations during the fermentation of mutant PXM-4 with 10 g/l galactose feeding. Arrow means feeding of 10 g/l galactose.

수하였으며, 이 때 최종 xylitol의 농도 및 수율은 각각 14.4 g/l, 97% 이었다. 그러나, galactose의 농도가 증가함에 따라 세포 성장은 증가하여 100 g/l galactose 배지에서 14.1 g/l의 세포 성장을 나타내었으나, xylitol의 생산은 오히려 galactose의 농도가 증가함에 따라 급격히 감소하였다. 이러한 결과로 보아 고농도의 galactose는 xylose의 transport를 억제하여 xylitol 생산이 저해됨을 확인하였다. 또한 10 g/l galactose 배지에서는 4.6 g/l의 xylitol만이 생산되었는데 이는 첨가된 galactose가 대부분 세포 성장에 이용되어 xylitol 생산을 위한 cofactor를 충분히 공급하지 못하였기 때문으로 사료된다.

#### Galactose의 feeding에 의한 xylitol 발효

Fig. 2의 결과에서 나타난 것처럼 *P. stipitis*의 변이균주 PXM-



4에 의하여 효과적으로 xylitol을 생산하기 위해서는 잔존하는 xylose를 완전히 xylitol로 전환시키는 방법이 요구된다. 변이균주 PXM-4에 의한 xylitol 발효에서 잔존하는 xylose의 농도가 높은 이유는 배양 초기에 galactose가 모두 소비됨으로써 xylose에서 xylitol로 전환하는데 필요한 NAD(P)H가 부족하기 때문인 것으로 사료되었다. 따라서 유가식 배양 방법을 통한 최종 xylitol 농도, 발효 속도를 증가시키기 위한 실험을 수행하였다. 회분식 배양에서 xylitol 농도가 증가되지 않는 시기인 배양 4일에 galactose를 feeding하여 xylitol 생성에 대한 변화를 조사하였다. Fig. 3에서 나타난 것처럼 배양 4일에 10 g/l의 galactose를 feeding한 이후 배양 6일까지 xylitol의 생성이 계속적으로 증가하였고, 배양 6일 이후에는 다시 xylitol 생성이 중단되는 것을 알 수 있었다. 이러한 이유는 xylitol의 농도가 더 이상 증가하지 않는 시간에서 에너지 대사 및 NAD(P)H의 regeneration을 위한 substrate가 고갈되었기 때문에 이 시기에 galactose를 공급함으로써 xylitol 생성을 증가시키는 결과를 얻었다.

### 감사의 글

본 연구는 서울대학교 농업생물신소재연구센터를 통한 한국과 학재단 우수연구센터 지원금에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Barbosa, M.F.S., M.B. Medeiros, I.M. de Mancilha, H. Schnieder, and H. Lee. 1998. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol.* 3, 241-251.
- Bruinenberg, P.M., J.P. van Dijken and W.A. Scheffers. 1983. An enzyme analysis of NADPH production and consumption in *C. utilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 965-971.
- Furlan, S.A., P. Bouilloud, P. Strehaiano, and H.F. de Castro. 1991. Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. *Biotechnol. Lett.* 13, 203-206.
- Han, W.O., J.H. Seo, and Y.W. Ryu. 1998. Production of xylitol by catabolite derepressed mutant of *Candida* sp. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 13(1) 6-12.
- Horitsu, H., Y. Hayashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki, and N. Wadanabe. 1992. Production of xylitol from xylose by *C. tropicalis*: Optimization of production rate. *Biotech. Bioeng.* 40, 1085-1091.
- Lowry, O.H., N.R. Rosebrough, A.L. Farr, and R.G. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biochem.* 193, 265-275.
- Meyrial, V., J.P. Delgènes, R. Moletta, and J.M. Navano. 1991. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: Fermentation behaviour. *Biotechnol. Lett.* 13, 281-286.
- Nina, Q.M. and H. Babel. 1997. Fed-batch xylitol production with two recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing xyl1 at different levels, using glucose as a cosubstrate: a comparison of production parameters and strain stability. *Biotech. Bioeng.* 54, 391-399.
- Nolleau, V., L. Preziosi-Belloy, and J.M. Navarro. 1995. The reduction of xylose to xylitol by *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis*: Incidence of oxygen and pH. *Biotechnol. Lett.* 17, 41-422.
- Onishi, H. and T. Suzuk. 1966. The Production of xylitol, L-arabitol and ribitol by yeasts. *Agric. Biol. Chem.* 30, 1139-1144.
- Rusturia, A. and R. Lagunas. 1986. Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 379-385.
- Ryu, Y.W. and S.H. Ko. 1993. Selective isolation and characterization of *Schwanniomyces castellii* mutants with increased production of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 3(2), 95-98.
- Silva, SS., I.C. Roberto, M.G.A. Felipe, and I.M. Mancilha. 1994. Fed-batch culture for xylitol production by *C. guilliermondii*. *Process Biochem.* 31, 205-208.
- Vandeska, E., S. Amarte, S. Kuzmanova, and T.W. Jeffries. 1995. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. *J. Microbiol. biotechnol.* 11, 213-218.
- Winklenhausen, E., P. Pittman, S. Kuzmanova and T.W. Jeffries. 1996. Xylitol formation by *Candida boidinii* in oxygen limited chemostat culture. *Biotechnol. Lett.* 18, 753-758.
- 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(2), pp. 148-152.

(Received June 4, 2001/Accepted June 14, 2001)