

**PENGARUH KONSENTRASI XILOSA DAN KOSUBSTRAT TERHADAP PRODUKSI XILITOL
OLEH *Candida shehatae* WAY 08**

(THE INFLUENCE OF XYLOSE CONCENTRATION AND COSUBSTRATE ON XYLITOL PRODUCTION
BY *Candida shehatae* WAY 08)

Wisnu Adi Yulianto¹⁾, Kapti Rahayu Kuswanto²⁾, Tranggono²⁾ dan Retno Indrati²⁾

ABSTRACT

The objectives of the research were to determine the optimum cultivation condition of initial xylose concentration, type of cosubstrate and ratio of cosubstrate to substrate (xylose) for xylitol production by *Candida shehatae* WAY 08. The initial xylose concentrations were varied within the range of 2-14 %. The cosubstrates were arabinose, galactose, glucose, and mannose. Ratios of cosubstrate to xylose were the range of 1:6 – 3:6 %. The fermentation was performed at 30°C in a 500 ml Erlenmeyer flask placed in a shaker incubator at 200 rpm for 72 h. Biomass concentration was determined by drying method. Xylose, cosubstrate and xylitol concentrations were determined using HPLC.

The result indicated that with the medium containing 6 % xylose produced the highest product yield (0,75 g/g) and xylitol volumetric productivity was 0,73 g/Lh. The addition of cosubstrate of arabinose increased xylitol production, while the addition of glucose, galactose, and mannose decreased its productions.

Keywords : xylose, cosubstrate, xylitol, and *Candida shehatae* WAY 08.

PENDAHULUAN

Secara komersial, xilitol diproduksi melalui proses hidrogenasi xilosa. Pada proses kimiawi ini selain diperlukan xilosa murni, suhu dan tekanan tinggi, ternyata rende-

Produksi xilitol dengan menggunakan yeast alami (bukan hasil rekayasa genetika), termasuk *Candida shehatae* WAY 08, memiliki kelemahan rendemen atau product yield xilitol yang dihasilkan rendah. Hal disebabkan sebagian xilitol yang dihasilkan dimetabolisme lebih lanjut menjadi biomasa sel, energi untuk pemeliharaan sel dan koenzim NADPH atau NADH (Hallborn dkk, 1994). Untuk menaikkan yield xilitol tersebut dapat dilakukan dengan penambahan kosubstrat sebagai nutrient pendamping substrat di dalam media fermentasi. Kosubstrat tersebut diharapkan dapat mencukupi untuk kebutuhan regenerasi koenzim tereduksi (NADPH atau NADH) yang digunakan untuk mereduksi xilosa menjadi xilitol, suplai energi dalam pemeliharaan metabolisme dan pertumbuhan sel.

Hallborn dkk (1994) menyampaikan hasil penelitiannya, yield xilitol oleh *Saccharomyces cerevisiae* XYL 1 (hasil rekayasa genetika) hampir mencapai 1 g xilitol/g xilosa terkonsumsi jika berturut-turut digunakan rasio kosubstrat glukosa dengan substrat (xilosa) sebesar 1 : 2 dan 2 : 1 (%). Mengingat kenyataan di alam yaitu di dalam limbah hasil pertanian, selain xilosa sebagai gula utama penyusun hemiselulosa, juga terdapat glukosa, manosa, arabinosa dan galaktosa (Parajo dkk, 1996; Roberto dkk, 1996; Dominguez dkk, 1996), maka gula-gula non xilosa tersebut perlu dikaji potensinya sebagai kosubstrat.

Tujuan penelitian ini adalah menentukan kadar xilosa dan jenis serta rasio kosubstrat dengan substrat yang

product yield-nya dapat mencapai 91,7 % (Barbosa dalam Silva dkk, 1996).

Untuk meningkatkan produksi xilitol secara fermentasi dapat dikerjakan dengan pemilihan mikroba penghasil xilitol yang unggul dengan pengaturan komposisi nutrisi dan kondisi lingkungan fermentasi yang tepat serta melalui rekayasa genetika untuk mendapatkan mikrobia penghasil xilitol yang unggul. Pada penelitian ini akan dikaji faktor yang kedua, terutama mengenai pengaruh kadar xilosa dan kosubstrat.

Pada umumnya dalam proses batch jika mikrobia yang dikultivasi toleran terhadap konsentrasi dan tekanan osmotik yang tinggi maka penambahan konsentrasi gula awal akan meningkatkan kecepatan pembentukan produk dan product yield. Kadar xilosa juga mempengaruhi pertumbuhan sel, pembentukan xilitol, dan pengaruhnya bervariasi di antara spesies atau strain yeast (Horitsu dkk; 1992; Vandeska dkk, 1995). Hasil penelitian terdahulu, dengan menggunakan sumber nitrogen yang tinggi (yeast ekstrak 20 g/L) dan sumber fosfat yang tinggi (KH₂PO₄ 15 g/L), selain tidak hemat, ternyata yield tertingginya hanya sebesar 0,54 g/g yang dicapai pada kadar xilosa 100 g/L (Yulianto, 1998).

BAHAN DAN CARA

Materi

Biakan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Candida shehatae* WAY 08 yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi PS Pangan dan Gizi, UGM Yogyakarta. Biakan tersebut merupakan hasil isolasi dari tongkol jagung dan dipelihara dalam agar miring yang setiap literanya mengandung yeast ekstrak 3 g, xilosa 10 g, glukosa 10 g, KH₂PO₄ 5 g, Mg SO₄ 7H₂O 1g, (NH₄)₂ SO₄ 3 g dan agar 8 g.

Pembuatan Inokulum/ Starter

Diambil kultur *C. shehatae* WAY 08 berumur 1 hari di dalam media pemeliharaan sebanyak 3 jarum ose dan diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang telah berisi 25 ml media starter yang setiap literanya terdiri dari yeast ekstrak 3 g, xilosa 30 g, KH₂PO₄ 5 g, Mg SO₄ 7H₂O 1g, (NH₄)₂ SO₄ 3 g, dan pH media diatur 5. Inkubasi dilakukan di dalam shaker incubator, agitasi 250 rpm, suhu 30° C, selama 16 jam. Sebanyak 5 ml starter tersebut diinokulasikan lagi kedalam 50 ml media starter dan diinkubasi dengan kondisi yang sama selama 16-18 jam.

¹⁾ Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian UNWAMA Yogyakarta

²⁾ Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian UGM Yogyakarta

Penentuan Kadar Xilosa, Jenis dan Rasio Kosubstrat dengan Substrat yang Optimal untuk Produksi Xilitol

Pada penelitian tahap ini dipelajari pengaruh kadar xilosa. Variasi kadar xilosa yang digunakan adalah 2, 6, 10 dan 14 %. Dua puluh ml inokulum yang sudah disiapkan, diinokulasikan pada 180 ml (dalam erlenmeyer 500 ml) media fermentasi yang setiap literanya terdiri dari yeast ekstrak 3 g, KH_2PO_4 15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 3 g, kadar xilosa dibuat sesuai perlakuan tersebut di atas. Kadar sel awal dalam media diperkirakan $1-5 \times 10^7$ sel/ml. Inkubasi dilakukan dalam *shaker incubator* pada suhu 30°C selama 3 hari. Pengambilan sampel sebanyak 5 ml dilakukan setiap 12 jam untuk penentuan kadar xilitol, xilosa, dan biomasa selnya. Percobaan dilakukan sebanyak dua kali ulangan.

Kosubstrat yang digunakan adalah D-galaktosa, D-glukosa, D-manosa dan L-arabinosa (bentuk alami), Rasio keempat kosubstrat tersebut dengan xilosa (substrat) digunakan 1 : 6, 2 : 6, 3 : 6, dan 6 : 0 (%). Sebagai kontrol digunakan substrat xilosa saja 6 %. Cara fermentasi dikerjakan sebagaimana tersebut di atas.

ANALISIS

Analisis yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi berat sel yang diukur dengan metode gravimetri (AOAC, 1995), dan penentuan kadar xilitol, xilosa dan kosubstrat digunakan HPLC. Kolom HPLC yang digunakan adalah Bio-Rad HPX-87 H , fase mobilnya aqua-deionisasi dengan H_2SO_4 0,01 N, kecepatan alirnya 0,5 ml/menit, suhu kolom 50°C , detektor 56 refraksi indeks Backman dan printer CR 3A Chromatopac Shimadzu (Yulianto dkk, 2002).

Kadar xilosa awal yang optimum ditentukan berdasarkan nilai *product yield*, sedangkan untuk menentukan jenis kosubstrat dan rasio kosubstrat dengan substrat yang cocok untuk produksi xilitol dipilih yang dapat menghasilkan kadar xilitol lebih tinggi dibanding kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Kadar Xilosa Awal Terhadap Produksi Xilitol

Hasil pengamatan pada percobaan pertama terhadap perubahan kadar xilosa, xilitol dan biomasa sel selama 72 jam inkubasi oleh *Candida shehatae* WAY 08 pada berbagai kadar xilosa awal 20, 60, 100 dan 140 g/l disajikan pada Gambar 1. Produksi xilitol baik pada percobaan pertama maupun kedua , seiring dengan pertumbuhan selnya. Produksi xilitol oleh *Candida shehatae* WAY 08 termasuk tipe *associated growth* yaitu pembentukan produk seiring dengan pertumbuhan selnya. Pola yang serupa juga ditunjukkan oleh Vandeska dkk (1995), Silva dkk (1996), Preziosi-Belloy dkk, (1997), yang berturut-turut menggunakan *Candida boidinii*, *Candida guilliermondii* FTI 20037 dan *Candida parasilopsis*. Produksi biomasa sel *Candida shehatae* WAY 08 tertinggi dicapai pada kadar xilosa awal 100 dan 140 g/L sebesar 8,63-8,67 g/L dan produksi xilitolnya tertinggi pada kadar xilosa 140 g/L yaitu sebesar 5,33 g/L.

Waktu fermentasi yang optimal untuk produksi xilitol sangat dipengaruhi kadar xilosa (substrat) awal. Pada kadar xilosa 2%, produksi xilitol tertinggi dicapai lama waktu inkubasi 36-48 jam. Pada xilosa awal 6, 10, dan 14 % , produksi xilitolnya meningkat seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi. Peningkatan kadar xilosa dari 20 g/l menjadi 60 g/l cenderung meningkatkan kadar xilitol, tetapi

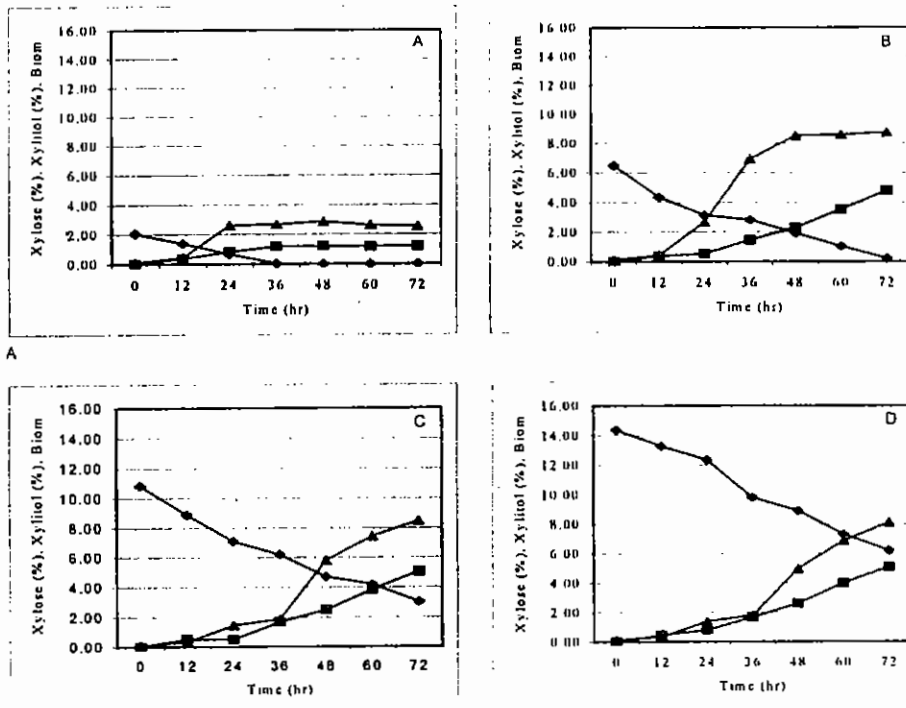


Figure 1. Production of Xylitol and Biomass by *Candida shehatae* WAY 08 for 72 hr of Incubation at Initial Xylose Concentration 2% (A), 6% (B), 10% (C) and 14% (D). —◆— : Xylose (%) —■— : Xylitol (%), —▲— : Biomass (g/l)

peningkatan xilosa 100 sampai 140 g/l laju produksi xilitol cenderung menurun. Pola pembentukan xilitol tersebut, juga terjadi pada pembentukan biomasa selnya. Pada penelitian ini sengaja dibatasi sampai 72 jam inkubasi, karena dalam waktu tersebut diharapkan telah cukup untuk mengetahui potensi *Candida shehatae* WAY 08 dalam menghasilkan xilitol pada berbagai kadar xilosa. Evaluasi potensi tersebut dapat dilihat dari kemampuannya mengonsumsi xilosa, efisiensi fermentasi (pembentukan xilitol dari xilosa) atau *product yield* serta kecepatan pembentukan xilitol volumetrik (g xilitol/L jam).

Hasil perhitungan parameter fermentasi untuk produksi xilitol oleh *Candida shehatae* WAY 08 pada

berbagai kadar xilosa disajikan pada Tabel 1, yang terlihat bahwa *growth yield* ($Y_{x/s}$) tertinggi dicapai sebesar 0,14 g/g pada kondisi kadar xilosa 20 dan 60 g/l. Nilai *growth yield* ini tak jauh berbeda dibanding nilai *growth yield* yang dicapai *Candida* NRF41 (0,16 g/g) pada kadar xilosa 50 g/L dan *Candida shehatae* WAY 08 sebesar 0,13 g/g pada xilosa awal 50 g/L (Yulianto, 1998). Peningkatan kadar xilosa awal dari 20 sampai 140 g/l ternyata cenderung menurunkan nilai *growth yield*.

Product yield ($Y_{p/s}$) tertinggi sebesar 0,75 g/l dicapai pada kondisi kadar xilosa awal 60 g/L. Hasil ini lebih tinggi dibanding hasil yang dapat dicapai oleh *Candida* sp. WAY 08 (0,57 g/g) (Yulianto, 1989).

Table 1. Fermentation Parameters for Xylitol Production by *Candida shehatae* at Various Xylose Concentrations

Initial Xylose (%)	Xylitol (%)	Y p/s (g/g)	Yx/s (g/g)	Qv (g/L hr)	Xylosa consumed (%)
2	1.13 ± 0.12	0.55 ± 0.06	0.14 ± 0.01	0.27 ± 0.03	99.50 ± 0,71
6	4.76 ± 0.05	0.75 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.73 ± 0.09	97.55 ± 1,34
10	5.26 ± 0.28	0.65 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.73 ± 0.04	75.35 ± 4,60
14	5.33 ± 0.32	0.63 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.75 ± 0.05	59.70 ± 3,96

Values shown are mean ± standart deviation.

Perbedaan hasil ini dapat disebabkan adanya perbedaan komposisi media fermentasi dan media pemeliharaan biakan. Pada penelitian terdahulu digunakan sumber fosfat KH_2PO_4 sebesar 15 g/L dan media pemeliharaan biakan digunakan MEA (malt ekstrak yeast agar), sementara pada penelitian ini KH_2PO_4 diturunkan menjadi 5 g/L dan media pemeliharaannya ditambah xilosa sebesar 10 g/L. Dikemukakan oleh Tavares dkk (1999), penggunaan kadar fosfat yang terbatas dapat meningkatkan produksi xilitol (0,1 g/L/jam) pada *Debaryomyces hansenii*. Pemeliharaan biakan pada media yang mengandung xilosa memungkinkan terjadinya adaptasi enzim-enzim yang mengkatalisa substrat xilosa.

Peningkatan kadar xilosa dari 20 sampai 60 g/L menaikkan nilai $Y_{p/s}$, tetapi berangsur menurun dengan meningkatnya kadar xilosa awal yang diberikan. Dilaporkan oleh Prior dkk (1989), selama fermentasi xilosa oleh *Candida* sp selain dihasilkan produk utama xilitol, dapat terbentuk gliserol, arabitol, ribitol, xilulosa, asetat dan etanol. Terbentuknya produk samping ini dapat menurunkan nilai *product yield* (xilitol).

Produktivitas volumetrik xilitol sebesar 0,73-74 g/L jam dicapai oleh *Candida shehatae* WAY 08 pada kondisi kadar xilosa awal 60 - 140 g/l. Namun demikian pada

kadar xilosa awal 100 dan 140 g/L, hasil ini tidak diikuti dengan rendemen atau *product yield* yang tinggi pula, masing-masing hanya sebesar 0,65 dan 0,63 g/g. Hasil penelitian ini lebih tinggi dibanding dengan kecepatan produksi xilitol oleh *Candida boidinii* yang mencapai 0,24 g/l jam pada xilosa awal 130 g/L (Vandeska dkk, 1995), 0,052 g/L jam oleh *Candida* sp. NRF 41 dan 0,16 g/L jam oleh *Candida shehatae* WAY 08 pada xilosa awal 100 g/L (Yulianto, 1989), dan 0,37 g/L jam oleh *Debaryomyces hansenii* pada xilosa awal 50 g/L (Girio dkk, 1994).

Pengaruh Jenis dan Rasio Kosubstrat dengan Substrat terhadap Produksi Xilitol

Penelitian untuk mengetahui pengaruh jenis dan rasio kosubstrat dengan substrat (xilosa) ini dikerjakan dengan xilosa 60 g/L karena pada kadar tersebut dapat menghasilkan *product yield* dan produktivitas volumetrik xilitol yang tinggi. Pertumbuhan sel dan produksi xilitol selama 72 jam inkubasi oleh *Candida shehatae* WAY 08 pada berbagai jenis kosubstrat dan rasio kosubstrat dengan substrat disajikan pada Tabel 2.

Penambahan kosubstrat yang berupa glukosa, galaktosa dan manosa pada berbagai tingkat rasio kosubstrat

Tabel 2. The influence of Type of Cosubstrate and Ratio of Cosubstrate to Substrate (Xylose) on Xylitol Production by *Candida shehatae* WAY 08 for 72 hr fermentation

Ratio of Cosubstrate: Substrate (%)	Time					
	48 hr		60 hr		72 hr	
	Biomass (g/l)	Xylitol %	Biomass (g/l)	Xylitol %	Biomass (g/l)	Xylitol %
Arabinose : Xylose =						
1 : 6	5.33 ± 0.13	2,81 ± 0.11	6.81 ± 0.02	3.73 ± 0,06	7.95 ± 0,51	4.51 ± 0.25
2 : 6	4.82 ± 0.22	2.92 ± 0.17	6.48 ± 0.11	3.43 ± 0.18	7.66 ± 0.46	4.40 ± 0.25
3 : 6	4.73 ± 0.20	2.48 ± 0.28	6.39 ± 0.08	3.38 ± 0.03	7.10 ± 0.17	4.30 ± 0.18
6 : 0	3.92 ± 0.17	nd*	4.90 ± 0.22	nd	5.69 ± 0.16	nd
Glucose : Xylose =						
1 : 6	6.29 ± 0.54	2,46 ± 0.02	7.40 ± 0.87	2,69 ± 0.12	8.43 ± 1.52	2,99 ± 0.16
2 : 6	6.16 ± 0.69	2.63 ± 0.17	7.54 ± 0.91	2.68 ± 0.11	8.78 ± 1.34	2.88 ± 0.04
3 : 6	6.63 ± 0.67	2.36 ± 0.03	8.06 ± 1.36	2.65 ± 0.02	9.51 ± 1.60	2.82 ± 0.09
6 : 0	7.27 ± 0.75	Nd	7.97 ± 0.69	nd	9.03 ± 0.81	nd
Galactose : Xylose =						
1 : 6	6.44 ± 0.62	1.52 ± 0.07	7.38 ± 0.75	2,95 ± 0.19	8.47 ± 0.62	3.41 ± 0.56
2 : 6	6.58 ± 0.44	1.28 ± 0.08	8.02 ± 0.89	2.68 ± 0.17	9.11 ± 0.35	2.72 ± 0.13
3 : 6	7.21 ± 0.86	1.22 ± 0.22	8.68 ± 1.10	2.27 ± 0.38	9.73 ± 1.00	2.51 ± 0.17
6 : 0	6.97 ± 0.09	nd	8.36 ± 0.42	nd	8.93 ± 0.45	nd
Mannose : Xylose =						
1 : 6	6.12 ± 0.55	2,39 ± 0.08	7.35 ± 1.36	2,89 ± 0.11	8.19 ± 1.17	3.21 ± 0.29
2 : 6	6.13 ± 0.38	2.27 ± 0.06	7.68 ± 1.46	2.54 ± 0.14	9.03 ± 0.91	2.37 ± 0.14
3 : 6	6.62 ± 0.29	1.37 ± 0.20	7.76 ± 1.54	2.46 ± 0.16	9.70 ± 1.28	2.42 ± 0.12
6 : 0	6.89 ± 0.69	nd	7.52 ± 0.59	nd	9.04 ± 0.28	nd
Xylose = 6	5.36 ± 0.52	2.71 ± 30	6.60 ± 0.13	3.29 ± 0.16	7.81 ± 0.55	4.20 ± 0.15

Values shown are mean ± standart deviation.

* nd : not detected

tersebut dengan xilosa sebesar 1:6 sampai 3:6 % ternyata tidak dapat meningkatkan produksi xilitol. Kosubstrat tersebut lebih dapat dimanfaatkan untuk pembentukan biomassa daripada pembentukan produk (xilitol). Hal itu ditunjukkan dengan bertambahnya persentase kosubstrat tersebut mulai dari 1 sampai 3 % meningkat pula produksi biomasannya. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian terdahulu (Hsiao dkk dan Meyrial dkk dalam Nigam dan Singh, 1995) yang menyatakan glukosa menghambat penggunaan xilosa oleh *Candida* dan *Schizosaccharomyces*, dan dilaporkan bahwa *Candida guilliermondii* mampu mengonsumsi glukosa, manosa, galaktosa, dan arabinosa secara cepat hanya untuk pertumbuhan dan pembentukan etanol, tetapi senyawa poliol tidak terdeteksi di dalam media kultur. Hal yang sama juga dikemukakan oleh Lee dkk (1995) bahwa fermentasi campuran glukosa-xilosa dan fruktosa-xilosa menghasilkan xilitol yang relatif lebih rendah dibanding kontrol (xilosa 2 %).

Sebaliknya, kosubstrat arabinosa dapat meningkatkan produksi xilitol menjadi 4,30-4,51 % yang relatif lebih tinggi dibanding kontrol (xilosa 6 %) 4,20 %. Peningkatan rasio kosubstrat dengan substrat sampai 3:6 % cenderung menurunkan produksi xilitol dan produksi

biomassa. Pada tabel tersebut terlihat semakin besar arabinosa yang ditambahkan maka semakin kecil pula biomassa yang terbentuk. Hal ini sejalan dengan pendapat peneliti terdahulu bahwa *Candida* sp B-22 (Chen dan Gong, 1985), dan *Candida guilliermondii* (Bicho dkk, 1988) relatif lambat mengonsumsi arabinosa dari pada gula heksosa ; glukosa, galaktosa, dan manosa. Kadar xilitol yang lebih tinggi mungkin dapat tercapai jika digunakan kadar arabinosa yang lebih rendah dari kadar yang dipilih dalam penelitian ini.

Keberadaan arabinosa dapat meningkatkan produksi xilitol tersebut, diduga arabinosa dimetabolisme melalui jalur lingkaran fosfat dan akan dihasilkan koenzim NADPH yang dibutuhkan oleh xilosa reduktase untuk mereduksi xilosa menjadi xilitol. Arabinosa, sebagaimana xilosa termasuk gula pentosa dimetabolisme melalui jalur pentosa fosfat (Walker, 1998). Dikemukakan oleh Gancedo dkk (dalam Hahn-Hagerdal dkk, 1994), semua xilosa dimetabolisme melalui jalur pentosa fosfat, sedangkan glukosa hanya sebesar 0,9-10 % dimetabolisme lewat jalur tersebut. Sementara kosubstrat lainnya (glukosa, galaktosa, dan manosa) kurang atau tidak cukup mendukung pembentukan NADPH.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa *Candida shehatae* WAY 08 yang ditumbuhkan pada media yang mengandung xilosa 60 g/L dapat menghasilkan *product yield* tertinggi yaitu 0,75 g/g dan produktivitas volumetrik xilitol sebesar 0,73 g/l jam. Penambahan kosubstrat dengan rasio kosubstrat arabinosa (pentosa) dengan xilosa 1:6 – 3:6 % dapat meningkatkan produksi xilitol, sedangkan penambahan kosubstrat gula heksosa yaitu galaktosa, glukosa dan manosa menurunkan produksi xilitol.

DAFTAR ACUAN

- AOAC, 1995., Official Standard of Analysis of OAC International, 16th edition AOAC International, Arlington, Virginia.
- Bicho, P.A., Ranneli, P.L. Cunningham, J.D., dan Lee, H. 1988, "Induction of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activities in *pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on Mixed Sugars. *Appl. Environ Microbiol.*, 54 : 50 –54.
- Chen, L.F. dan Gong C.S 1985., "Fermentation of Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate to xilitol by a Hydrolysate – Acclimatized Yeast". *J.Food Sci.*, 50 : 226-228.
- Dominguez, J.M. Gong, C.S., dan Isao, G.T. 1996., "Pretreatment of Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by Yeast". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57/58 : 44 – 56.
- Girio, F.M., Roseiro, J.C., Sa-Machado, P., Duarte-Reir, A.R. dan Amaral-Collaco, M.T. 1994., "Effect of Oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii*". *Enzyme Microbiol. Technol.*, 16 : 1074 – 1078.
- Hahn-Hagerdal, B. Jeppsson, H., Skoog, K., dan Prior, B.A. 1994., "Biochemistry and Physiology of Xylose Fermentation by Yeast". *Enzyme Microb Technol.*, 16 : 933-943.
- Hallborn, J., Gorwa, M.F., Meinander, N., Pentilla, M. Keranen, S. and Hahn-hagerdal, B. 1994., "The influence of Cosubstrate and Aeration on Xylitol Formation on Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the XYL I gene". *Appl Microbiol Biotechnol*, 42 : 326-333.
- Horitsu, H Yahashi, Y., Takamizawa, K., Kawai, K, Suzuki, T dan Watanabe, N. 1992., "Production of Xylitol from Xylose by *Candida tropicalis* : Optimization of Production Rate". *Biotechnol. Bioeng.*, 40 : 1085-1091.
- Lee, H., Sopher, C.R. dan Yan, K.Y.F. 1996., "Induction of Xilosa Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activities on Mixed Sugars in *Candida guilliermondii*". *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 66 : 375 – 379.
- Nigam, P. dan Singh. D. 1995., "Processes for Fermentation Production of Xilitol a Sugar Substitute". *Proc. Biochem.*, 30 : 117-124.
- Parajo. J.C., Dominguez, H., and Dominguez, J.M. 1996., "Production of Xylitol from Concentrated Wood Hydrolysates by *Debaryomyces hansenii* : Effect of the Initial Cell Concentration". *Biotechnol. Lett.*, 18 (5) : 593 – 598.
- Preziosi – Belloy, L., Nollen, V., dan Navarro, J.M. 1997., "Fermentation of Hemicellulosic Sugars and Sugar Mixtures to Xylitol by *Candida Parapsilosis*". *Enzyme Microb. Technol.* 21 : 124-129.
- Prior, B.A., Kilian, S.G dan Du Preezee, J.C. 1989., "Fermentation of D-Xylose by Yeast *Candida shehatae* dan *Pichia stipitis* Prospects and Problems". *Proc. Biochem*, 24 : 21-32.
- Roberto, I.C. Silva, S.S Felipe, M.G.A., Demancilha, I.M., dan Sato, S. 1996, "Bioconversion of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate for the Production of Xylitol-Effect of pH and Nitrogen Source". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57 : 339-347
- Silva, S.S., Roberto, I.C., Felipe M.G.A. dan Machilha, I.M. 1996, "Batch Fermentation of Xylose for xylitol Production in Stirred Tank Bireactor". *Proc. Biochem*, 31 : 549-553.
- Vandeska, E., Kuzmanova, S dan Jeffries, T.W. 1995, "Xylitol Formation and Key Enzyme Activities in *Candida boindii* under Different Oxygen Transfer Rates". *J.Ferment. Bioeng.*, 80 : 513 – 516.
- Walker, G.M. 1997., "Yeast Physiology ang Biotechnology". John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, Inggris.
- Yulianto, W.A. 1998., "Seleksi Yeast untuk produksi Polioli dan Studi Kondisi Lingkungan Fermentasi terhadap Produksi Xilitol oleh Yeast Terpilih". Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Yulianto, W.A., Rahayu, E.S., Naruki, S. dan Indrati, R. 2002., "Preparasi Hidrolisat Tandan Kosong Kelapa Sawit Sebagai Media Fermentasi Untuk Produksi Xilitol oleh *Candida shehatae* WAY 08". Prosiding Seminar Nasional PATPI, Batu – Malang, 2002, Hal D 50 – 55.