Turk J Engin Environ Sci
25 (2001) , 11 – 17.
© TÜBİTAK

Pachysolen tannophilus Kullanarak D-ksilozdan Etanol Üretimi

Mübeccel ERGUN, Ufuk GÜNDÜZ
Kimya Mühendisliği Bölümü, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi,
Gazi Üniversitesi 06570 Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi 27.01.1999

Özet

Pentoz şekerinden etanol eldesinde kullanılan çok çeşitli mayalar vardır. *Pachysolen tannophilus* bunlardan en önemli olanlarından birisidir. Bu çalışmada başlangıç maya konsantrasyonu, D-ksiloz konsantrasyonu ve pH 2^3-faktöriyel deney tasarımında bağımsız faktörler olarak seçilmiş ve bu faktörlerin P. tannophilus kullanarak D-ksilozdan etanol üretimine etkileri Box-Wilson deneysel tasarım methoduna göre belirlenen koşullarda sallamalı su banyosunda yapılan deney sonuçlarına dayanarak incelenmiştir. Maksimum üretim hızının 2,03 g $dm^{-3}$$gün^{-1}$ olduğu , ve bu değere başlangıç D-ksiloz konsantrasyonu, başlangıç maya konsantrasyonu, ve pH değerlerinin sırası ile 37,01 g dm^{-3}, 8,34 g dm^{-3}, ve 4,22 olduğu şartlarda ulaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Etanol üretimi, *Pachysolen tannophilus*, D-ksiloz.

Ethanol Production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*

Abstract

A number of different yeasts are now recognized as being capable of fermenting pentose sugar into ethanol. One of the most prominent among these is *Pachysolen tannophilus*. The initial yeast extract concentration, D-xylose concentration and pH were chosen as independent factors in 2^3-factorial experimental design and the effects of these factors on ethanol production from D-xylose by *P. tannophilus* were examined in repeated shake flask cultures according to the Box-Wilson experimental design method. A maximum ethanol production rate of 2.03 g dm^{-3} day^{-1} was obtained when the initial D-xylose concentration, yeast extract concentration, and pH were 37.01 g dm^{-3}, 8.34 g dm^{-3}, and 4.22, respectively.

Key Words: Ethanol production, *Pachysolen tannophilus*, D-xylose.

Giriş

D-ksiloz doğada en çok rastlanan pentoz şekerlerinden birisidir. Sert odunlar ve tarımsal atıkların sahip olduğu hemisellüloz şekerler arasında en önemli olanıdır ve bazı bitkilerin kuru biyokütle ağırlığının % 25 ine kadar ulaşmaktadır (Ladish ve arkadaşları,1983; Kadam ve Newman, 1997). Bitki dokularında D-ksiloz genellikle ksilan formunda bulunur ve kimyasal veya enzimatik işlemlerle lignin kısmından kolaylıkla ayrılarak monomerik birimlerine dönüşebilir. D-ksilozun doğada bulunurluğu ve saflaştırılmasındaki kolaylık, ona diğer yararlı kimyasalların üretiminde kullanılmasında önemli bir potansiyel kazandırmaktadır. D-ksilozu etanole çevirebilen mayaların daha önceleri atık olarak görülen hemisellüloz hidrolizatlarının etanol üretiminde kullanılmasını sağlamıştır (Schneider ve arkadaşları, 1983; Slilinger ve arkadaşları, 1982; Gong ve arkadaşları, 1983; Maleszka ve arkadaşları,

1982a; Du Preez ve arkadaşları, 1984; Jeffries, 1981; Slilinger ve arkadaşları, 1987; Delgenes ve arkadaşları, 1996).

D-ksilozdan etanol fermentasyonunda kullanılan mayalar arasında, *P. tannophilus* en etkin olanlarından birisi olarak görülmektedir. Üreme ve fermentasyon için olan potansiyeli, ksiloz, D-glukoz, D-mannoz, ve D-galaktoz (Maleszka ve arkadaşları, 1982 b) gibi sübstratlar içeren belirli ortamlardaki davranışına bakılarak belirlenmiştir. Değişik şeker karışımları ile elde edilen yüksek verim ve yüksek dönüşüm hızları, *P. tannophilus* mayasının değişik sübstratlar ile kullanılabileceğini göstermiştir (Neirinck ve arkadaşları, 1982; Slilinger ve Bothast, 1987; Zayed ve Meyer, 1996) .

P. tannophilus mayasının kültürlenmesinde çeşitli değişik ortamlar kullanılmıştır. Azot ve karbon kaynakları hücre duvarını ve etanol eldesini etkilemektedir (Kerstin ve Barbel, 1988). Besi ortamı çalışmalarını rapor etmeselerde, çoğu araştırmacılar hücrelerin kültürlenmesinde zengin maya ortamları kullanmışlardır. Slilinger ve arkadaşları (1982), Roebuck ve arkadaşları (1995), Bravo ve arkadaşları (1993), pH in hücre üremesi ve etanol üretim hızı üzerine etkisini incelemişlerdir. Hücre üremesi ve etanol üretim hızı için başlangıç pH değerinin, fermentasyonun yapıldığı ortamın kompozisyonuna ve kullanılan *P. tannophilus* organizmasının türüne bağlı olabildiği gözlenmiştir.

Ksiloz konsantrasyonunun hücre üremesi, fermentasyonu ve verimi için çok kritik olduğu gösterilmiştir (Slilinger ve arkadaşları, 1982; Ligthhelm ve arkadaşları, 1988; Bravo ve arkadaşları,1995). Ksiloz fermentasyonunda sübstrat konsantrasyonunun artırılması, verimi ve etanol üretimini azaltır. Schwester ve arkadaşları (1983) yüksek sübstrat konsantrasyonunun hücre üremesini inhibe ettiğini bulmuşlar, ancak bu etkinin *P.tannophilus* ile etanol üretiminde az olduğunu belirtmişlerdir.

Literatürde, başlangıç pH değeri ile maya özütü ve D-ksiloz konsantrasyonlarının etanol üretimine etkilerini veren bir kaç çalışma vardır (Roebuck ve arkadaşları, 1995; Bravo ve arkadaşları, 1993; Slilinger ve arkadaşları, 1982; Du Preez ve arkadaşları, 1984; Bravo ve arkadaşları, 1995). Ama, bizim bilgilerimize göre, bu üç faktörün etanol üretimine beraber olarak etkisi üzerine dair herhangi bir çalışma yoktur. Bu makalemizin amacı Box-Wilson deneysel tasarım yönteminden yararlanarak fermentasyon şartlarını belirlemek ve üretim hızının seçilen bu değişkenlere bağlı olarak değişimini gösteren model eşitliğini çıkarmaktır. İlaveten bu modelden etanol üretim hızının maksimum değerini ve bu değere karşı gelen ortam koşullarını belirlemektir.

Materyal ve Metod

Materyal

NRRL Y-2460 kodlu , *P. tannophilus* mayası "Northern Regional Research Center" dan elde edilmiştir. Mikroorganizmalar buzdolabında eğik agar üzerinde muhafaza edilmiştir. Eğik agar ortamının bileşimi şöyledir (g dm^{-3}): malt özütü 3,0, maya özütü 3,0, pepton 5,0, D-ksiloz 10,0, and agar 20,0. Bu ortamın pH değeri 4,0 dür.

Üreme ortamı

Mikroorganizmaların üremesi için gerekli üreme ortamı, 1 litresinde 10 cm^3 A çözeltisi, 10 cm^3 B çözeltisi, 100 cm^3 C çözeltisi, 10 g maya özütü ve 50 g D-ksiloz olacak şekilde hazırlanmıştır. Bir dm^3 A çözeltisi, 1,10 g Ca0, 0,40 g ZnO, 5,40 g $FeCl_36H_20$, 0,36 g MgO, 0,25 g $CuSO_4.5H_2O$, 0,06 g $H_3.BO_3$, ve 13 cm^3 derişik HCl ve bir dm^3 B çözeltisi , 10,1 g MgO ve 45,0 cm^3 derişik HCl, bir dm^3 C çözeltisi ise 64,0 g üre, 12,0 g KH_2PO_4 ve 1,8 g Na_2HPO_4 içermektedir (Slilinger ve arkadaşları, 1982).

Çalışma Koşulları

Her deneyin başlangıcında maya önce eğik agar üzerinde yenilenmiş ve bu başlangıç kültürü 30°C deki inkübatörde 48 saat bekletilmiştir. Bu taze kültürden steril öze yardımıyla alınan aşı 100 cm^3 lük bir üreme ortamına aşılanmıştır. Bu sıvı ortam, 250 cm^3 hacimli erlenlerde homojenliği sağlayacak bir şekilde magnetik bir karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Yaklaşık 18 saat sonra, üssel üreme evresinin ortalarına doğru 10 cm^3 lük aşı kültürü alınarak 50 cm^3 lük fermentasyon ortamına eklenmiştir.

Bu fermentasyon çalışmaları 250 cm^3 hacimli erlenler içerisinde 30 °C deki sallamalı su banyosunda 125 d/d hızında gerçekleştirilmiştir. Erlenler pamuk ile kapatılmıştır. Kontaminasyonu önlemek üzere üreme ve fermentasyon ortamları 121°C de 15 dakika süreyle otoklavda bekletilmişlerdir. Üreme ortamının sterilizasyonu sırasında , ksilozun ortamdaki diğer maddelerle reaksiyona girmesini önlemek için ksiloz ayrı otoklavlanmıştır. 24 saatlik fermentasyon sonrası yaklaşık 5 cm^3 hacimli numuneler aseptik koşullarda alınmış ve maya hücreleri filtre

edildikten sonra , etanol analizi için derin dondurucuda bekletilmiştir.

Fermentasyon ortamlarının içeriği Tablo 1 de gösterilen deneysel tasarıma göre maya konsantrasyonu 1,60-18,41 g dm^{-3} ve D-ksiloz konsantrasyonu 9,77-60,23 g dm^{-3} aralığında değişmektedir. Ortamın pH değeri ise 2,82 ile 6,18 aralığındadır.

Table 1. Plan matrisindeki bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri, X_1 : Başlangıç pH, X_2(g dm^{-3}): Başlangıç maya özütü konsantrasyonu, ve X_3(g dm^{-3}): Başlangıç D-ksiloz konsantrasyonu.

Kodlandırılmış Değerler	-1,682	-1	0	+1	+1, 682
Gerçek Değerler					
X_1	2,82	3,5	4,5	5,5	6,18
X_2(g dm^{-3})	1,60	5,0	10,0	15,0	18,41
X_3(g dm^{-3})	9,77	20,0	35,0	50,0	60,23

Analizler

Hücrelerden arındırılmış sıvıdaki etanol miktarı dikromat oxidasyon metodu ile belirlenmiştir (Hormitz, 1980). Dinitrosalisilik asit metodu (Miller, 1959) ise D-ksiloz konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır. Mikrobiyal üreme bir Bausch and Lomb spectropotometre ile 620 nm dalga boyunda 1 cm lik hücreler ile ölçülmüştür. Numuneler Lambert-Beer kanunu gereğince absorpsiyon okumalarının 0.1-0.35 aralığında olması için saf su ile seyreltilmişlerdir.

Deneysel Tasarım

Etanol üretimi hızının modellenmesinde deneysel tasarım (Box ve Hunter, 1957; Box ve arkadaşları, 1978) metodu kullanılmıştır. pH (X_1), maya konsantrasyonu (X_2, g dm^{-3}) and D-ksiloz konsantrasyonu (X_3, g dm^{-3}) fermentasyon çalışmalarında bağımsız değişkenler, ve etanolün hacimsel üretim hızı (P, g dm^{-3} $gün^{-1}$) bağımlı değişken olarak seçilmişlerdir (Bkz. Tablo 2). Hesaplamalar için X_i, i değişkeninin gerçek değeri, aşağıdaki denkleme göre x_i olarak kodlanmıştır;

$$x_i = (X_i - X_o)/\Delta X \tag{1}$$

burada x_i, i değişkeninin kodlanmış değeri, X_o ise i değişkeninin taranan alanın orta noktadaki değeri, ve ΔX is adım aralığıdır. Her bir bağımsız değişken için aşağıda verilen kodlanmış değer eşitlikleri kullanılmıştır.

$$x_1 = (X_1 - 4,5)/1,0 \tag{2}$$

$$x_2 = (X_2 - 10,0)/5,0 \tag{3}$$

$$x_3 = (X_3 - 35,0)/15,0 \tag{4}$$

3 değişkenli bir Box-Wilson deney düzenleme planına göre çalışma, yıldız noktasındaki (α = 1,682) altı deney ve merkez noktasındaki altı deney ile birlikte 20 deneyden oluşmaktadır (Horitsu ve arkadaşları, 1992). Tablo 1 de, belirlenen değerlerin gerçek ve kodlu değerleri, Tablo 2 de ise çalışmalarımızla ilgili 2^3 plan matrisi görülmektedir.

Sonuçlar ve Tartışma

Deneysel planda belirtilen koşullarda yapılan deneyler sonucunda elde edilen etanol üretim hızı (P) değerleri Tablo 2 de verilmektedir. Deneylerin tekrar edilebilirliğini sağlamak amacıyla deneyler en az iki kez yapılmıştır. Bu verilerin kullanılmasıyla geliştirilen model, kodlanmış değerler cinsinden şu şekilde ifade edilmiştir:

$$\begin{aligned} P \;=\; & -0,4891x_1^2 0,1631x_2^2 - 0,4674x_3^2 + 0,2921x_1x_2 0,1691x_1x_3 \\ & -0,0309x_2x_3 0,1062x_1 0,0251x_2 + 0,0800x_3 + 1,5201 \end{aligned} \tag{5}$$

Bu denklemdeki sabitler *Mathematica* paket programında yazılan bir program ile belirlenmiş ve bu eşitlikten maksimum üretim hızının hesaplanması amacıyla dik yokuş yöntemi kullanılmıştır. Denklem (5), x_1 = 0,2163, x_2 = -0,2833 ve x_3 = 0,1340, olduğu değerlerde maksimum üretim hızını vermektedir. Bu değerlerin ve (2), (3), ve (4) numaralı denklemlerin kullanılması ile bu kodlanmış değerlere karşı gelen gerçek değerler hesaplanmıştır. Böylece maksimum üretim hızının (2,03 g dm^{-3} $gün^{-1}$), başlangıç pH değerinin 4,22 ve ksiloz ve maya özütü başlangıç konsantrasyonlarının sırası ile 8,34 g dm^{-3} ve 37,01 g dm^{-3}, olması durumunda gerçekleştiği belirlenmiştir.

Table 2. Deneysel ve hesaplanan etanol üretim hızları.

	Kodlandırılmış değer			Üretim hızı (g dm^{-3} $gün^{-1}$)	
Deney No	x_1	x_2	x_3	Deneysel	Hesaplanan
1	-1	-1	-1	1,05	1,04
2	-1	-1	1	1,66	1,60
3	-1	1	-1	0,43	0,45
4	-1	1	1	0,68	0,90
5	1	-1	-1	0,43	0,58
6	1	-1	1	0,32	0,46
7	1	1	-1	0,74	1,17
8	1	1	1	0,85	0,93
9	-1,682	0	0	0,74	0,81
10	1,682	0	0	0,69	0,45
11	0	-1,682	0	1,66	1,59
12	0	1,682	0	1,97	1,51
13	0	0	-1,682	0,74	0,56
14	0	0	1,682	1,17	0,83
15	0	0	0	1,59	1,52
16	0	0	0	1,45	1,52
17	0	0	0	1,80	1,52
18	0	0	0	1,51	1,52
19	0	0	0	1,75	1,52
20	0	0	0	1,50	1,52

Mathematica da çizilen 3-boyutlu grafikler, başlangıç pH değeri ile başlangıç D-ksiloz ve maya özütü konsantrasyonlarının etanol üretim hızı üzerine etkilerini göstermekte ve Şekil 1 de verilmektedir. Şekil 1a da başlangıç pH değerinin 4,22 olduğu durumda, etanol üretim hızının başlangıç D-ksiloz ve maya özütü konsantrasyonlarının değişimlerinden nasıl etkilendiği verilmektedir. D-ksiloz konsantrasyonunun çok düşük veya çok yüksek olduğu durumlarda etanol üretim hızının sıfıra yaklaştığı görülmektedir. Orta bölgede ise, D-ksiloz konsantrasyonunun 37,01 g dm^{-3} ve maya konsantrasyonunun 8,34 g dm^{-3} yerde, üretim hızının maksimumu olan 2,03 g dm^{-3} $gün^{-1}$ değerine ulaşılmaktadır.

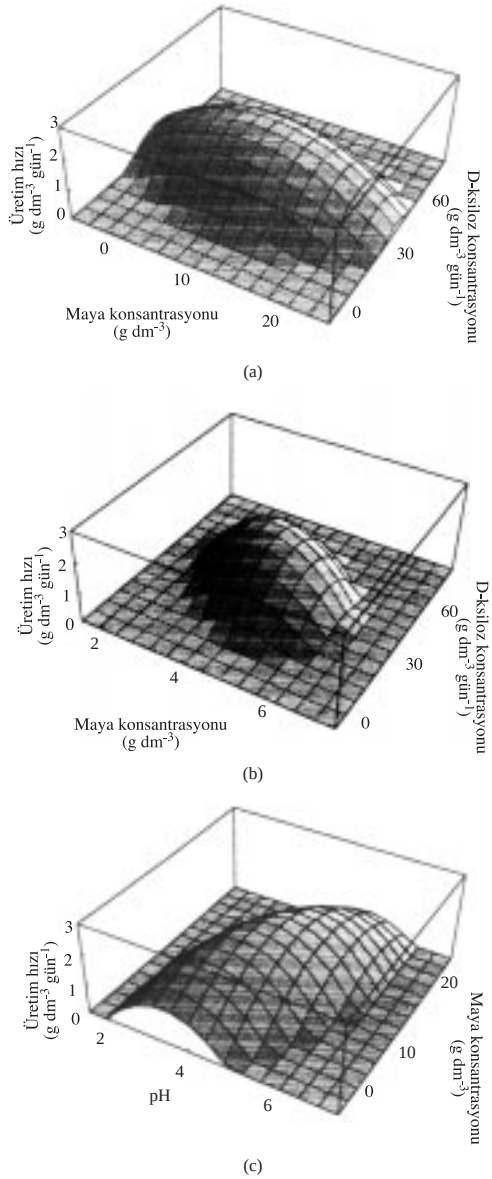
Şekil 1b ise maksimum üretim hızını veren başlangıç maya konsantrasyonunun, 8.34 g dm^{-3} değeri için çizilmiştir. Bu şekilden görülebileceği gibi, herhangi bir sabit pH değerinde, hem düşük hem de yüksek D-ksiloz konsantrasyonları ile herhangi bir sabit D-ksiloz konsantrasyonunda, hem düşük hem de yüksek pH değerlerinde etanol üretim hızı hemen hemen sıfırdır. Yine maksimum üretim hızı pH in 4,22 ve D-ksiloz konsantrasyonunun 37,01 g dm^{-3} olduğu orta bölgede gözlenmektedir.

Şekil 1c ise D-ksiloz konsantrasyonunun maksimum etanol üretim hızını verdiği 37,01 g dm^{-3} değerinde, maya konsantrasyonunun sabit olması durumunda yüksek ve düşük pH değerlerinin üretim hızını sıfıra yaklaştırdığını göstermektedir. Orta bölge civarında, pH 4,22 ve maya konsantrasyonu 8,34 g dm^{-3} olduğunda, üretim hızı maksimum değeri olan 2,03 g dm^{-3} $gün^{-1}$ olmaktadır.

Modelden elde edilen maksimum üretim hızını sağlayan koşullarda (başlangıç pH değerinin 4,22 ve ksiloz ve maya özütü başlangıç konsantrasyonlarının sırası ile 8,34 g dm^{-3} ve 37,01 g dm^{-3}) etanolik fermentasyon deneyleri yapılmış ve bu deneyler sonucu elde edilen etanol üretim hızı, 1,92 g dm^{-3} $gün^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer modelimizden belirlediğimiz 2,03 g dm^{-3} $gün^{-1}$ değeriyle uyumludur.

Literatürde görülen çarpıcı sonuçlardan birisi çalışmamızda kullandığımız *P. tannophilus* türü kullanılarak değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda çok farklı miktarlarda etanol elde edilmesidir. Etanol konsantrasyonu ve hacimsel etanol üretim hızı, sırası ile şu aralıklarda değişmektedir, 5,0-38,0 g dm^{-3} ve 0,02-0,24 g dm^{-3} $saat^{-1}$ (Du Preez ve arkadaşları, 1984; Schwester ve arkadaşları, 1983; Watson ve arkadaşları, 1984; Bravo ve arkadaşları, 1995). Bu tür veriler bize ksilozdan etanol üretiminin kültürleme koşullarına çok bağlı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmamızda elde ettiğimiz maksimum etanol konsantrasyonu (9,04 g dm^{-3}) ve hacimsel üretim hızı (0,083 g dm^3 $saat^{-1}$) literatürde verilen aralıktadır.

Sonuçlarımız bizimle aynı *P. tannophilus* türünü kullanan ve 12,6 g dm^{-3} and 0,09 g dm^{-3}saat^{-1} etanolü 50,0 g dm^{-3} ksiloz fermentasyonu ile üreten Du Preez ve arkadaşlarının (1984) sonuçları ile yakın bir uyum içindedir.



Şekil 1. Etanol üretim hızı (g dm^{-3} $gün^{-1}$) : (a) sabit pH (4,28), (b) sabit maya özütü konsantrasyonu (8,34 g dm^{-3}), ve (c)sabit D-ksiloz konsantrasyonu (37,01 g dm^{-3}).

Bu çalışmada, fazla miktarlarda etanol üretilememesinin nedeni, muhtemelen aşı konsantrasyonunun düşük olması ve oksijen miktarının etanol üretimini artıracak yönde ayarlanamamış olmasıdır. Sallamalı su banyosunda yapılan fermentasyon deneylerinde, oksijenlenme derecesi fermentasyon ortamının hacmi ve çalkalama hızıyla nitelendirilir ve bazı araştırmacılar (Gong ve arkadaşları, 1983, Du Preez ve arkadaşları, 1984; Jeffries, 1981; Watson ve arkadaşları, 1984; Furlan ve arkadaşları, 1994) karıştırma hızı ve çözelti hacmini ve dolaylı olarakta oksijen transfer hızını değiştirerek oksijenin etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmaların bir kısmında, aerobik koşullarda esas olarak mikroorganizmaların ürediğini, buna karşılık anaerobik koşulların etanol üretimi lehine olduğunu belirtmişlerdir (Delgenes ve arkadaşları, 1986). Diğer bir araştırmada yarı-aerobik şartlarda sürdürülen fermentasyon sonunda anaerobik şartlara göre daha kısa sürede, maksimum etanol verimine ulaşıldığı belirtilmiştir (Watson ve arkadaşları, 1984). Slilinger ve arkadaşlarının (1982) bir çalışmasında ise *P. tannophilus* organizmasının etanolü hem aerobik hem de anaerobik koşullarda ürettiği gözlenmiştir. Suihko ve Drazic (1983) pentoz fermentasyonu sırasında etanole dönüşümün aerobik veya yarı-aerobik koşullarda etanol üretiminin söz konusu olabileceği sonucuna varmışlardır. Sözü edilen bu çalışmalar oksijenin etkisinin çok önemli olduğunu ve aerobik ve anaerobik kavramlarının değişik araştırmacılar tarafından değişik biçimde algılandığını göstermektedir.

Bu çalışmada, etanol üretim verimliliğini artırmak üzere, araştırmalara, deney koşullarının özellikle oksijen transfer hızının kontrol edilebildiği koşullarda devam edilmesinin uygun olacağı sonucuna varılmış ve Box-Wilson deneysel tasarım yönteminin *P. tannophilus* ile etanol üretilmesi prosesine uygulanabileceği gösterilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Araştırma Merkezi tarafından (AFP-MMF 06/97-27) desteklenmiştir.

Kaynaklar

Box, G., Hunter, W., and Hunter, J., Statistics for Experiments, Wiley, New York, 1978.

Bravo, V., Camacho, F., Sanchez, S. and Castro, E., "The effect of pH on kinetic and yield parameters during ethanolic fermentation of D-xylose with *P. tannophilus*", Bioprocess Eng., 9, 159-165,1993.

Bravo, V., Camacho, F., Sanchez, S. and Castro, E., "Influence of the concentrations of D-xylose and yeast extract on ethanol production by *P. tannophilus*", J. Ferment. Bioeng., 79, 566-571, 1995.

Box, G., and Hunter, W., "Multifactor Experimental Design for Exploring Response Surfaces", Ann. Math. Stat., 28, 195-241, 1957.

Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M., "The Effect of Aeration on D-Xylose Fermentation by *Pachysolen tannophilus*", Biotechnology Letters, 8, 897-900, 1986.

Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M., "Effects of Lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisrae, Zynomonas mobilis, Pichia strpitrs*, and *Candida shehatae*", Enzyme Microb. Technol., 19, 220-225, 1996.

Du Preez, J. C., Prior, B. A., Aida, M. T. and Monterio, M., "The effect of Aeration on Xylose Fermentation by *Candida shehatae* and *Pachysolen tannophilus*", Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 261-266, 1984.

Furlan, S. A., Bouilloud, P. and deCastro H. F., "Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylosefermenting yeasts", Process Biochemistry, 29, 657-662, 1994.

Gong, C.S., Claypool, T.A., Mc Cracken, L.D., Maun, C.M., Veng, P.P. and Tsao, G.T., "Conversion of Pentoses by Yeasts", Biotechnol. Bioeng., 25, 85-102, 1983.

Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K. Kawai, K., Suzuki, T. and Watanabe, N., "Production of Xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of Production Rate", Biotechnol. Bioeng., 40, 1085-1091, 1992.

Hormitz, W., "Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)", 12^{th} edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, 1980.

Jeffries, T.W., "Conversion of Xylose to Ethanol under Aerobic Conditions by *Candida tropicalis*", Biotechnol. Lett., 3, 213-218, 1981.

Kadam, K. L. and Newman, M. H., "Development of a low-cost fermentation medium for ethanol production from biomass ", Appl. Microbiol Biotechnol., 47, 625-629, 1997.

Kautola, H., Rymowicz, W., Linko, Y.Y. and Linko, P., "Itaconic Acid Produced by Immoblized *Aspergillus terreus* with Varried Metal Additions", Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 154-158, 1991.

Kerstin, S. and Barbel, H.H., "Xylose Fermentation", Enzyme Microb. Technol., 10, 66-80, 1988.

Ladish, M.R., Lin, K.W., Voloch, M. and Tsao., G.T., Enzyme Microb. Technol., 5, 82-92, 1983.

Ligthhelm, M.E., Prior, B.A. and Du Preez, J.C., "The Oxygen Requirements of Yeasts for the Fermentation of D-xylose and D-glucose to Ethanol", Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 63-68, 1988.

Maleszka, R., Wang, P.Y. and Schneider, H., "Yeasts that Ferment D-cellobiose as well as D-xylose", Biotechnol. Lett., 4, 133-136, 1982a.

Maleszka, R., Wang, P.Y. and Schneider, H., Enzyme Microb. Technol., 5, 349-352, 1982b.

Miller, G. L., "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Anal. Chem., 31, 426-428, 1959.

Neirinck, L., Maleszka, R., and Schenieder, H., "Alcohol Production from Sugar Mixtures by *Pachysolen tannophilus*", Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 12, 161-169, 1982.

Roebuck, K., Brundin, A. and Johns, M. "Response surface optimization of temperature and pH for the growth of *Pachysolen tannophilus*", Enzyme Microb. Technol., 17, 75-78, 1995.

Schneider, H., Maleszka R., Neirinck, L., Veliky, I. A., Wang, P.V., and Chan, K.Y., "Ethanol Production from D-Xylose and several other Carbohydrates by *Pachysolen tannophilus* and *other Yeasts*", Adv Biochem. Eng. Biotechnol. 27, 57-71, 1983.

Schwester, P., Robinson, C.W. and Moo-Young, M. "Xylose Fermentation to Ethanol by *Pachysolen tannophilus*" Biotechnol. Bioeng. Symp., 13, 131-152, 1983.

Slilinger, P.J., Bothast, R.J., Van Cauwenberge, J.E. and Kurzman, C.P., "Conversion of D-xylose into Ethanol by the Yeast *Pachysolen tannophilus*", Biotechnol. Bioeng., 34, 371-384, 1982.

Slilinger, P.J., Bolem, P. L. and Kurzman, C.P., "*Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose", Enzyme Microb. Technol., 9, 5-15, 1987.

Slilinger, P.J. and Bothast, "Continuous fermentation of feed streams containing D-glucose and D-xylose in a two-stage process utilizing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*", Biotechnol. Bioeng., 32, 1104-1112, 1988.

Suihko, M.L. and Drazic, M., "Pentose Fermentation by Yeasts", Biotechnology Lett., 5, 107-112, 1983.

Watson, N.E., Prior, A.B., Du Preez, J.C. and Lategan, P. M., "Oxygen Requirements for D-xylose Fermentation to Ethanol and Polyols by *Pachysolen tannophilus*", Enzyme Microb. Technol., 6, 447-450, 1984.