KINETIKA FERMENTASI PADA PRODUKSI XILITOL DENGAN PENAMBAHAN ARABINOSA DAN GLUKOSA SEBAGAI KOSUBSTRAT OLEH Candida shehatae WAY 08

[A Kinetic Study of Xylitol Production with Glucose and Arabinose as Cosubstrate by Candida shehatae WAY 08]

Wisnu Adi Yulianto 1), Kapti Rahayu Kuswanto 2), Tranggono 2) dan Retno Indrati 2)

Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Wangsa Manggala, Yogyakarta 55753, Fax 0274-798213
 Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281, Fax 0274-549650

Diterima 30 November 2005 / Disetujui 6 Januari 2006

ABSTRACT

Xylitol production by Candida shehatae WAY 08 was investigated under two sets of conditions: (a) with addition of glucose or arabinose as cosubstrate, (b) ratio of xylose to cosubstrate at the range of 6:1 – 6:3%. The fermentation was performed at 30 °C in 500 ml Erlenmeyer flasks placed in a shaker incubator at 200 rpm for 72 h. Biomass concentration was calculated as dry mass. Xylose, cosubstrate, xylitol, ethanol, and acetic acid concentration ware determined using HPLC.

The result indicated that addition of arabinose as cosubstrate to xylose within the ratio range of 1:6–3:6% could increase xylitol production. The highest xylitol yield (0,84 g/g) and volumetric rate of xylitol production (0,66 g/L h) were achieved at ratio of xylose to arabinose as high as 6:1%. However, addition of glucose as cosubstrate decreased xylitol production. A medium containing 6% glucose as a sole carbon source could achieve the highest ethanol yield (0,32 g/g) and growth yield (0,21 g/g), while arabinose as a sole source was metabolized mainly for biomass formation.

Key words: xylose, cosubstrate, arabinose, glucose, xylitol, Candida shehatae WAY 08.

PENDAHULUAN

Xilitol merupakan pemanis alami yang bersifat antikariogen dan dapat diproduksi secara fermentasi. Pada penelitian terdahulu diperoleh *Candida shehatae* WAY 08 memiliki potensi sebagai penghasil xilitol (Yulianto, 1998). Peningkatan produksi xilitol dari kamir tersebut perlu diupayakan.

Xilitol pada kamir dibentuk dari xilosa oleh xilosa reduktase dengan menggunakan koenzim NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen*) atau NADH, yang kemudian diekskresi keluar sel dan atau dimetabolisme lebih lanjut menjadi xilulosa. Produksi xilitol dengan menggunakan kamir alami (bukan dari hasil rekayasa genetika), termasuk *Candida shehatae* WAY 08, memiliki kelemahan rendemen (%) atau *product yield* (g xilitol/ g xilosa terkonsumsi) yang dihasilkan rendah. Hal ini disebabkan sebagian dari xilitol yang dihasilkan, dimetabolisme lebih lanjut menjadi biomasa sel, energi untuk pemeliharaan sel dan koenzim NADPH atau NADH (Hallborn et al., 1994).

Untuk menaikkan product yield tersebut dapat dilakukan dengan memberikan nutrisi dan kondisi lingkungan yang optimum selama fermentasi. Penambahan kosubstrat ke dalam media fermentasi dapat menaikkan product yield xilitol. Kosubstrat

merupakan senyawa pendamping substrat yang jenis senyawanya berbeda dengan substrat. (Hallborn et al., (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 kosubstrat glukosa dengan rasio glukosa : substrat (xilosa) sebesar 1:2 dan 2:1 (%). Dengan adanya kosubstrat tersebut, sebagian besar atau seluruh xilosa dikonversi menjadi xilitol, sedangkan kosubstrat dapat digunakan untuk menyediakan koenzim dan energi untuk kehidupannya. Sementara itu, dilaporkan oleh (Prior et al., 1989) bahwa selama fermentasi xilosa oleh Candida sp, selain dihasilkan produk (xilitol) dan biomasa, juga terbentuk produk samping seperti etanol dan asam asetat. Keadaan ini tidak menguntungkan karena dapat menurunkan product yield.

Mengingat kenyataan di alam yaitu di dalam limbah hasil pertanian, seperti ampas tebu, jerami gandum dan padi, serta kayu keras, selain didominasi gula xilosa pada fraksi hemiselulosanya, juga diikuti glukosa (heksosa) dan arabinosa (pentosa) (Parajo et al., 1998; Roberto et al., 1996; Dominguez et al., 1996), maka kedua gula non xilosa tersebut perlu dikaji peranannya sebagai kosubstrat.

Penelitian ini bertujuan meningkatkan *product* yield dengan penambahan kosubstrat pada berbagai rasio dengan substrat dan mengkaji kinetika fermentasi atas terbentuknya biomasa, produk (xilitol), dan produk sampingnya.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Biakan mikrobia yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Candida shehatae WAY 08*, sebagai kamir penghasil xilitol, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM Yogyakarta. Biakan tersebut disimpan pada suhu -80°C dalam gliserol 10% dan dipelihara dalam agar miring yang setiap liternya mengandung ekstrak kamir 20 g, xilosa 10 g, glukosa 10 g, KH₂PO₄ 5 g, Mg SO₄ 7H₂O 1 g, (NH₄)₂ SO₄ 3 g dan agar 8,5 g.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi shaker incubator, autoclave, spektrofotometer, sentrifuge, dan peralatan HPLC Beckman.

Preparasi starter

Diambil biakan *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 litemya terdiri dari kamir 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.

Pelaksanaan penelitian

Kosubstrat yang digunakan adalah L-arabinosa dan D glukosa. Rasio substrat (xilosa) dengan kosubstrat digunakan 6:1, 6:2, 6:3, dan 0:6 (%). Sebagai kontrol digunakan substrat xilosa saja 6 %.

C. shehatae ditumbuhkan pada media starter dan diinkubasi pada 30°C, dalam rotary shaker incubator dengan kecepatan 250 rpm selama 18 jam. Starter tersebut diinokulasikan pada media produksi dengan jenis dan rasio substrat dengan kosubstrat tersebut di atas. Inkubasi dilakukan di dalam rotary shaker incubator dengan kecepatan 200 rpm, 30°C, selama 72 jam. Pengambilan sampel setiap 12 jam dilakukan untuk memantau perubahan substrat, kosubstrat dan produk yang dihasilkan selama fermentasi.

Parameter kinetika fermentasi yang diamati meliputi: Y p/s = product yield (g xilitol / g xilosa terkonsumsi), Y x/s = growth yield (g biomasa sel kering/g total gula terkonsumsi), Qv = produktivitas xilitol volumetrik (g xilitol akhir/l jam) dan Ye/tg = yield etanol (g etanol / g total gula terkonsumsi).

Analisis

Analisis yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi perhitungan jumlah sel dan berat biomasa sel yang berturut-turut dikerjakan dengan metode "plate count" dan oven / pengeringan (AOAC, 1995), sedangkan penentuan kadar glukosa, arabinosa, xilosa, xilitol, etanol dan asam asetat digunakan HPLC. Kolom HPLC yang digunakan adalah Bio-Rad HPX-87 H , fase mobilnya aqua-deionisasi dengan H₂SO₄ 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 et al., 2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh penambahan kosubstrat terhadap pembentukan xilitol, biomasa, etanol dan asetat

Hasil pengamatan terhadap perubahan kadar substrat (xilosa) dan kosubstrat (arabinosa dan glukosa), xilitol, etanol, dan asetat pada akhir fermentasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar substrat , kosubstrat, xilitol, etanol, dan asetat pada akhir fermentasi (72 jam inkubasi) oleh *Candida shehatae* WAY 08 pada berbagai rasio substrat dengan kosubstrat

Rasio				72 jam inkubasi						
Substrat	%	Kosubstrat	%	Substrat (g/L)	Ko-substrat (g/L)	Biomasa (g/L)	Xilitol (g/L)	Etanol (g/L)	Asetat (g/L)	
Arabinosa	6		0	20,9		5,9	-	-	-	
Glukosa	6		0	18		12,1	12	17,5	0.08	
Xilosa	6		0	VI-10-10-10-10-10-10-10-10-10-10-10-10-10-		8,31	43,4	0,56	0,03	
	6	Arabinosa	1	1,67	1,12	8,49	47,3	0,41	0,07	
	6	Arabinosa	2	2,11	4,18	8,02	46,9	0.50	0.08	
	6	Arabinosa	3	3,46	12,6	7,42	44,6	0,63	0.09	
	6	Glukosa	1	1.71	-	9,50	31,1	1.04	0,01	
	6	Glukosa	2	10-1	-	11,25	28,0	2,54	0.01	
	6	Glukosa	3	0,57	-	12,65	27.5	3.56	0,01	

⁻⁼ tidak terdeteksi

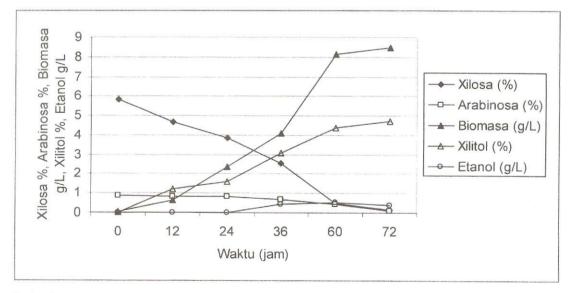
Di antara kosubstrat yang ditambahkan pada substrat xilosa ternyata arabinosa (pentosa) dapat meningkatkan produksi xilitol hingga mencapai 44,6 -47.3 g/L. Sebaliknya, tambahan kosubstrat yang berupa senyawa glukosa (heksosa) menurunkan produksi xilitol dan produknya hanya 27,5-31,1 g/L. Sementara pada kontrol (xilosa saja) mencapai 43,4 g/L. Hasil ini, nampaknya sejalan dengan hasil penelitian Meinander dan Hahn-Hagerdal (1997), bahwa glukosa, manosa. galaktosa dan fruktosa berturut-turut menghambat konversi xilosa menjadi xilitol sebesar 99, 77, 51 dan 78% pada S. cerevisiae xyl 1. Penurunan rasio xilosa dengan glukosa maupun dengan arabinosa dari 6:1% sampai 6:3%, mengurangi produksi xilitol berturut-turut dari 31.1 g/L menjadi 27,5 g/L dan 47,3 g/L menjadi 44,6 g/L. Sebagai pertimbangan penerapan rasio penelitian ini adalah pada limbah hasil pertanian, yaitu ampas tebu dan jerami padi, proporsi gula xilosa: glukosa: arabinosa yang terkandung pada fraksi hemiselulosa berturut-turut sebesar 3,5 : 1 : 1,5 (Chen dan Gong, 1985) dan 5,9 : 1,7:1 (g/L) (Roberto dkk, 1996). Oleh karena itu rasio substrat dengan kosubstrat paling tinggi dipilih 6:1%. Pada rasio tersebut, penggunaan kosubstrat arabinosa dapat mencapai kadar xilitol tertinggi.

Kurva pertumbuhan sel, pembentukan xilitol dan etanol serta penurunan substrat dan kosubstrat dapat dilihat pada Gambar 1, 2, dan 3. Xilitol diproduksi seiring dengan pertumbuhan selnya ditunjukkan pada media yang mengandung xilosa dengan kosubstrat, dan xilosa saja. Pada media yang hanya mengandung substrat glukosa atau arabinosa tidak dihasilkan xilitol.

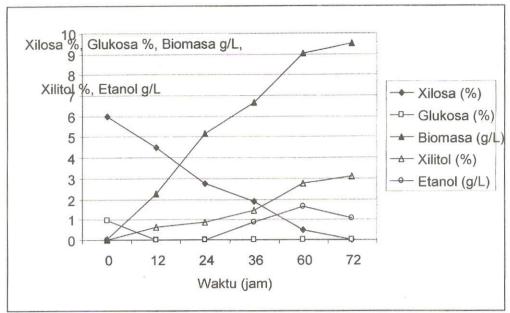
Penambahan kosubstrat yang berupa glukosa mendorong pembentukan biomasa sel dari 9,5 menjadi 12,7 g/L ketika rasio xilosa dengan glukosa diubah dari 6:1% menjadi 6:3% (Tabel 1). Sebaliknya dengan penambahan kosubstrat arabinosa, ketika rasio xilosa dengan arabinosa diubah dari 6:1% menjadi 6:3% menyebabkan produksi biomasa sel menurun dari 8,5 g/L menjadi 7,4 g/L. Pada substrat glukosa atau arabinosa saja berturut-turut menghasilkan biomasa 12,1 g/L dan 5,9 g/L, dan dari xilosa saja menghasilkan 8,3 g/L. Hasil ini dapat disebabkan oleh tingkat afinitas untuk transpor senyawa gula ke dalam sel dapat berbeda-beda sehinggga kecepatan penggunaannya pun berbeda (Walker, 1998).

Penambahan glukosa tidak mendorong pembentukan xilitol, tetapi digunakan untuk pembentukan biomasa sel. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Silva (1996) yang melaporkan efisiensi konversi xilosa menjadi xilitol oleh *Candida guillermondii* hanya sebesar 45% ketika ditumbuhkan pada media yang mengandung glukosa 1,5% dan xilosa 6,5%, tetapi dapat meningkat sampai 66% jika tanpa glukosa.

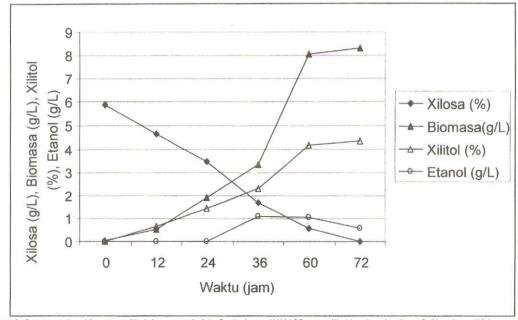
Kecepatan penggunaan xilosa dapat diamati dari kadar sisa xilosa dan arabinosa pada rasio xilosa : arabinosa 6:1% yaitu berturut turut tingggal 0,49 g/L dan 0,4 g/L pada inkubasi 60 jam (Gambar 1), sementara pada rasio 6:3% masih tersisa xilosa 1,3 g/L dan arabinosa 1,6 g/L. Sebaliknya, dengan penambahan glukosa, senyawa ini lebih cepat dikonsumsi dibanding arabinosa. Pada rasio xilosa : glukosa 6:1% (Gambar 2), glukosa habis terkonsumsi (kadar glukosa tak terdekteksi) setelah 12 jam inkubasi, sedangkan pada rasio 6:2% habis terkonsumsi setelah 24 jam inkubasi. Sedangkan pada kontrol (xilosa 6%), substrat ini tak terdeteksi pada 72 jam inkubasi (Gambar 3).



Gambar 1. Pembentukan biomasa, xilitol, dan etanol oleh *C. shehatae* WAY 08 yang dikultivasi pada rasio xilosa dengan arabinosa 6: 1 % selama 72 jam inkubasi.



Gambar 2. Pembentukan biomasa, xilitol, dan etanol oleh *C. shehatae* WAY 08 yang dikultivasi pada rasio xilosa dengan glukosa 6:1 % selama 72 jam inkubasi.



Gambar 3. Pembentukan biomasa, xilitol,dan etanol oleh C. shehatae WAY 08 yang dikultivasi pada xilosa 6 % selama 72 jam inkubasi.

Etanol merupakan produk kedua yang dihasilkan setelah xilitol pada fermentasi xilosa yang ditambah kosubstrat arabinosa atau glukosa. Senyawa ini juga diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel atau bersifat associated growth. Kadar etanol tertinggi 17,5 g/L dihasilkan pada substrat glukosa saja, sementara pada substrat arabinosa saja sebagian besar substrat hanya digunakan untuk pertumbuhan sel. Penambahan

kosubstrat glukosa ternyata meningkatkan produksi etanol dan biomasa. Keadaan ini dapat menyebabkan arah pembentukan produk utama (xilitol) menjadi berkurang, sehingga xilitol yang dihasilkan lebih rendah dibanding kontrol. Pembentukan produk samping etanol tersebut, juga dilaporkan Preziosi-Belloy et al., (1997), dan Lee dkk (196) yang berturut turut menggunakan biakan Candida parapsilosis dan Candida guillermondii

untuk produksi xilitol dari substrat xilosa yang ditambah alukosa atau xilosa saja.

Asam asetat dihasilkan dalam jumlah yang sangat kecil pada semua perlakuan, kecuali pada substrat arabinosa yang tak terdeteksi asetatnya. Asam asetat dapat diproduksi dari oksidasi etanol. Menurut Postma et al., (1984) asetaldehid dehidrogenase mampu mengoksidasi asetaldehid (hasil oksidasi etanol oleh dehidrogenase) meniadi asetat menghasilkan kofaktor NADPH. Pada penelitian ini nampaknya tahapan reaksi tersebut bukan merupakan jalur penting dalam penyedian koenzim NADPH yang diperlukan untuk mereduksi xilosa menjadi xilitol. Dilaporkan oleh Hallborn et al., (1994), rekombinan S. cerevisiase mampu menghasilkan 1 g xilitol / g xilosa terkonsumsi apabila disediakan kosubstrat yang berupa etanol sebesar 1% dan substrat (xilosa) 1%, meskipun produktivitas volumetriknya hanya sebesar 0,08 g xilitol/

Product yield, growth yield dan kecepatan pembentukan produk

Hasil perhitungan parameter fermentasi untuk produksi xilitol oleh *C. shehatae* pada berbagai jenis dan rasio substrat dengan kosubstrat disajikan pada Tabel 2. Dari tabel tersebut terlihat, *product yield* meningkat hingga mencapai 0,81-0,84 g xilitol/g xilosa terkonsumsi, jika ditambahkan dengan kosubstrat arabinosa (pentosa), sebaliknya dengan penambahan glukosa (heksosa) menurunkan *product yield-*nya (0,46-0,52 g/g). Sementara kontrolnya (xilosa saja) menghasilkan *product yield* 0,74 g/g. Hasil penelitian ini, baik kontrol maupun yang ditambah kosubstrat arabinosa lebih tinggi dibanding yang dicapai oleh *C. mogii* (0,62 g/g), *C. tropicalis* (0,4 g/g), *C. parapsilosis* (0,4 g/g), *C. kefyr* (0,29 g/g) dan *C. utilis* (0,18 g/g) (Sirisansaneeyakul et al., 1995).

Efisiensi fermentasi xilosa menjadi xilitol dengan kosubstrat arabinosa 1% tergolong tinggi (0,84 g/g), karena menurut Barbosa (1990) (dalam Silva dkk, 1996), efisiensi fermentasi xilosa menjadi xilitol secara teoristis Yp/s maksimal 0.917 g xilitol/g xilosa terkonsumsi. Meskipun demikian hasil ini masih lebih rendah dibanding nilai Yp/s dari S. cerevisiae xyl 1 sebesar 0,96 dan 1 xilitol/ g xilosa terkonsumsi, jika berturut-turut digunakan rasio xilosa : glukosa sebesar 2:1% dan 1:2% (Hallborn et al., 1994). Namun tingginya product yield oleh S. cerevisiae xyl 1 tersebut, tidak diikuti oleh kecepatan pembentukan xilitol vometrik (Qv). Qv yang dicapai hanya sebesar 0,21 -0,23 g/L jam. Sementara pada penelitian ini dengan rasio xilosa sengan arabinosa 6:1% dapat menghaslkan Qv 0,66 g/L jam.

Nilai growth yield pada substrat arabinosa sama tinggi dengan substrat xilosa ditambah kosubstrat arabinosa. Hal ini dapat disebabkan pada substrat arabinosa hampir seluruh sumber karbon tersebut digunakan untuk pembentukan biomasa, sedangkan pada xilosa yang ditambah arabinosa selain untuk pembentukan xilitol, juga untuk pembentukan biomasa, etanol dan asam asetat. Pada glukosa, selain sumber karbonnya untuk pertumbuhan sel, juga untuk pembentukan produk, terutama etanol. Pada xilosa yang ditambah atau tidak ditambah kosubstrat, dihasilkan xilitol, biomasa, sedikit etanol, dan sangat sedikit asam asetat. Secara umum dapat dikatakan penambahan kosubstrat baik arabinosa maupun glukosa kurang berpengaruh terhadap growth yield (0,11-0,15 g/g), sementara tanpa kosubstrat 0,14 g/g. Dikemukakan oleh Prior et al., (1989), besarnya growth yield yang dihasilkan oleh C. shehatae CBS 2779 yang ditumbuhkan pada glukosa dan xilosa, berturut-turut sebesar 0,13 dan 0,10 g/g.

Tabel 2. Parameter fermentasi untuk produksi xilitol oleh C. shehatae pada berbagai rasio xilosa dengan arabinosa dan glukosa

Rasio				Y p/s (g/g)	Y x/s (g/g)	Qv (g/Ljam)	substrat terkon-sumsi	Y e/tg (g/g)	Waktu (jam)
Substrat	(%)	Kosubstrat	(%)				, , , ,		
Arabinosa	6	-	0		0,11		64		72
Glukosa	6	-	0		0,21		100	0,32	60
Xilosa	6	-	0	0,74	0,14	0,60	100	0,01	72
	6	Arabinosa	1	0,84	0,13	0,66	97	0.01	72
	6	Arabinosa	2	0,83	0,11	0,65	96	0.01	72
	6	Arabinosa	3	0,81	0,11	0,62	94	0,01	72
	6	Glukosa	1	0,52	0,14	0,43	100	0,02	72
	6	Glukosa	2	0,47	0,14	0,39	100	0,03	72
	6	Glukosa	3	0,46	0,15	0,38	90	0,04	72

Y p/s = product yield (g xilitol / g xilosa terkonsumsi), Y x/s = growth yield (g biomasa sel kering/g total gula terkonsumsi), Qv = produktivitas xilitol volumetrik (g xilitol akhir/l jam) dan Ye/tg = yield etanol (g etanol / g total gula terkonsumsi).

Nilai kecepatan pembentukan xilitol volumetrik (Qv) tertinggi dicapai sebesar 0,62-0,66 g/L jam pada xilosa yang ditambah arabinosa. Penambahan kosubstrat berupa glukosa hanya menghasilkan Qv 0.38-0,43 g/L jam, jauh lebih rendah dibanding kontrol (xilosa saja) yang mencapai 0,60 g/L jam. Hasil tersebut relatif lebih tinggi dibanding dengan Qv yang dicapai oleh Candida boidinii 0,24 g/L jam (Vandeska et al., 1995) dan 0,23 g/L jam oleh S. cerevisiae xyl 1 (Hallborn et al., 1994), tetapi masih lebih rendah dibanding Qv yang dihasilkan oleh Candida sp. 11-2 (0,99 g/L jam), C. guillermondii 20118 (0,72 g/L jam) dan Debaryomyces hansenii NRRL Y-7426 (0,9 g/L jam) (Dominguez et al., 1996)

Product yield etanol diperoleh setinggi 0,02 - 0,04 g/g ketika digunakan penambahan glukosa dengan rasio xilosa: glukosa sebesar 6:1 menjadi 6:3%. Product yield tersebut relatif lebih besar dari yang dihasilkan pada penambahan kosubstrat arabinosa dan xilosa (kontrol), yang masing-masing hanya mencapai 0,01 g/g. Growth yield dan product yield untuk etanol tertinggi dicapai pada substrat glukosa berturut-turut sebesar 0,21 g/g dan 0,32 g/g. Hasil ini menunjukkan penambahan glukosa ke dalam media yang mengandung xilosa mendorong terbentuknya etanol dan biomasa.

Product yield untuk asetat tidak ditampilkan karena kadar asetat yang dihasilkan relatif kecil Dilaporkan oleh Prior dkk (1989), selama fermentasi Dxilosa oleh Candida sp. dapat terbentuk gliserol, arabitol, ribitol, xilulosa, asetat, dan etanol. Terbentuknya produk samping ini juga dapat menurunkan product yield xilitol yang diinginkan.

KESIMPULAN

Penambahan kosubstrat arabinosa ke dalam media yang mengandung xilosa dapat meningkatkan produksi xilitol. Produksi xilitol tertinggi dengan Qv 0,66 g/L jam dan Yp/s 0,84 g/g dicapai pada media yang mengandung xilosa: arabinosa sebesar 6:1%. Sebaliknya, penambahan kosubstrat glukosa ke dalam media yang mengandung xilosa menurunkan produksi xilitol tetapi mendorong terbentuknya biomasa dan etanol, sementara substrat arabinosa saja hanya dipergunakan untuk pembentukan biomassa. Growth yield dan product yield etanol tertinggi dicapai pada substrat glukosa saja yang besamya berturut turut 0,21 g/g dan 0,32 g/g.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC, 1995, Official Standard of Analysis of OAC International, 16th edition AOAC International, Arlington, Virginia.
- Chen, L.F., and Gong, C.S. 1985. 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. Biotechol., 57/58: 44 56.
- Hallborn, J., Gorwa, M.F., Meinander, N., Pentilla, M. Keranen, S. and Hahnhagerdal, B. 1994. The influence of cosubstrate and aeration on xylitol formation on recombinant Saccharomyces cerevisiae expressing the XYL 1 gene. Appl Microbiol Biotechnol, 42:326-333.
- Lee, H., Sopher, C.R. dan Yan, K.Y.F. 1996. Induction of xilosa reductase and xylitol dehydrogenase ativities on mixed sugars in *Candida guillermondii*. J. Chem. Tech. Biotechnol., 66: 375 379.
- Postma, E. Verduyn, C., Scheffers, W.A., and van Dijken, J.P., 1989. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose limited chemostat cultures of Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ Hiorobiol., 55: 468 477
- Preziosi Belloy, L., Nollen, V., Navarro, J.M. 1997.
 Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. Enzyme Microb. Technol., 21: 124 129.
- Meinander, N.Q., dan Hahn-Hagerdal, B. 1997.
 Influence of cosubstrat concentration on xylosa conversion by recombinant, XYL1-expressing Saccharomyces cerevisiae: a comparison of different sugar and etanol as cosubstrates.

 Appl Environ Microbiol, 63: 1959-1964.
- Parajo, J.C., Dominguez, H., dan Dominguez, J.M. 1998.
 Biotechnological production of xylitol. Part 3:
 Operation in culture media from lignocellulose hydrolysates. Bioresource. Technol. 66: 25-40
- 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 fementation of xylose for xylitol production in strirred tank biocreactor. Proc. Biochom, 31: 549-553.

- Sirisansaneeyakul, S., Staniszewski, M., dan Rizzi, M, 1995. Screening of yast for production of xylitol from D-xylose. Jerment.Bioeng., 80: 565-570.
- 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. 1998. Yeast Physiology ang Biotechnology. John Wiley and Sons Itd, West Susex, Inggris.
- Yulianto, W.A., Indrati, R., dan Wesniati, N., 2003.

 Peningkatan fermentabilitas hidrolisat tandan kosong kelapa sawit untuk produksi xilitol dengan pretreatment karbon aktif. Prosiding Seminar Nasional PATPI, Yogyakarta