تولید زایلیتول توسط مخمر جداسازی شده از برگ گیاهان

فروغ عسگری کرچگانی[1*]، غلامرضا قزلباش[2]، ایرج نحوی[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
[2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
[3] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۵

چکیده

D- زایلیتول یک الکل قندی پنج کربنه با قدرت شیرین‌کنندگی بالا است و با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی و تکنولوژیکی که این الکل قندی دارد، در صنایع شیمیایی، غذایی و دارویی بسیار ارزشمند می‌باشد. تولید شیمیایی زایلیتول در شرایط فشار و دمای بالا انجام می‌شود و نیاز به کاتالیست‌های گرانقیمت به منظور خالص‌سازی سوبسترا دارد. با در نظر گرفتن معایب روش شیمیایی، تولید بیوتکنولوژیکی زایلیتول با استفاده از میکروارگانیسم‌ها نیاز به این مراحل گرانقیمت ندارد و بسیار اختصاصی است و با توجه به انرژی کمتری که نیاز دارد به طور وسیعی به عنوان یک روش جایگزین روش شیمیایی مورد مطالعه قرار گرفته است. اطلاعات نشان می‌دهد در میان میکروارگانیسم‌ها، مخمرها بهترین تولیدکننده می‌باشند. در این بررسی این شیرین‌کننده ارزشمند توسط مخمر کاندیدا که از برگ تربچه جداسازی گردید، تولید شد. این مخمر بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و نیز ویژگی‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید. زایلیتول تولید شده توسط مخمر کاندیدای جداسازی شده، با روش آنالیزی کروماتوگرافی لایه نازک و با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت مگازایم ایرلند و نیز روش رنگ سنجی مورد مطالعه کیفی و کمی قرار گرفت. این سویه مخمری بعد از ۹۶ ساعت در محیط حاوی ۴۰ گرم بر لیتر زایلوز، ۱۷/۱۴ گرم بر لیتر زایلیتول تولید کرد.

واژه های کلیدی: زایلیتول، زایلوز، کاندیدا، تولید بیوتکنولوژیکی.

* مسوول مکاتبات: fo.askary63@yahoo.com

۱- مقدمه

الکل‌های قندی دسته‌ای از پلی اُل ها[1] هستند که دارای مزیت‌هایی از جمله مقدار کالری پایین، خاصیت آنتی اکسیدانی، کاهش قند خون و قدرت شیرین‌کنندگی می‌باشند و به همین دلایل در صنایع غذایی به عنوان مکمل و جایگزین شیرین‌کننده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷). در حال حاضر شیرین‌کننده‌ای که به طور وسیعی در صنایع مختلف استفاده می‌شود، زایلیتول[2] است.

D- زایلیتول یک پلی الکل پنج کربنه می‌باشد که به طور طبیعی خاصیت شیرین‌کنندگی بالایی دارد (۲). این پلی‌اُل یک شیرین-کننده‌ی طبیعی غذاست که شیرینی مشابه ساکارز، اما مقدار انرژی کمتری نسبت به ساکارز دارد (۲/۵ در مقایسه با ۴ (کالری بر گرم)) و با توجه به مقدار کالری کم، به عنوان جایگزین قند در صنایع غذایی در تولید نبات، شیرینی، شکلات، بستنی و نوشیدنی-ها استفاده می‌گردد (۲۳،۵). زایلیتول برخلاف ساکارز اسید تولید نمی‌کند و به همین دلیل به عنوان یک عامل مؤثر برای جلوگیری از پوسیدگی دندان در آدامس، خمیر دندان و دهان‌شویه استفاده می‌شود (۲۷،۱۱). به دلیل اینکه متابولیسم زایلیتول غیر وابسته به انسولین است، در شرایط کمبود انسولین یک جایگزین قند مناسب برای افراد دیابتی می‌باشد (۱۷).

D- زایلیتول به طور صنعتی از طریق احیای شیمیایی D-زایلوز تولید می‌شود. از جمله معایب فرآیند شیمیایی تولید زایلیتول نیاز به فشار بالا (۵۰ اتمسفر) و دمای بالا(۸۰ تا ۱۴۰ درجه سانتی-گراد)، استفاده از کاتالیست و نیز مراحل هوادهی و خالص‌سازی گران قیمت می‌باشد (۱۴). تولید بیوتکنولوژیکی D-زایلیتول با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به دلیل اینکه نیاز به کاتالیست سمی ندارد و از نظر زیست محیطی ایمن می‌باشد و با توجه به معایب روش شیمیایی، از اهمیت بسزایی برخوردار است(۴). تبدیل میکروبی زایلوز به زایلیتول اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است که در میان میکروارگانیسم ها مخمرها بهترین تولیدکننده می‌باشند(۲۰). مخمرها از مدت‌ها پیش قابل قبول‌ترین منابع میکروبی در صنایع مختلف و صنایع غذایی هستند و به علت عدم بیماریزایی[3] گونه‌های صنعتی، آن‌ها را به عنوان یک عامل تولید-کننده سالم می‌دانند (۲۵).

مجموعه عوامل بیولوژیک، شیمیایی و فیزیکی در پراکندگی مخمرها دخالت دارند و باعث می‌گردند که اجتماعات مخمری زیستگاه‌های متنوعی را تصرف کنند (۱۰). از جمله زیستگاه‌های مخمرها می‌توان به گیاهان اشاره کرد. گیاهان به سبب داشتن توانایی فتوسنتز و ساختن بسیاری از ترکیبات کربنی متنوع، زیستگاه‌های مناسبی را برای مخمرهای مختلف مهیا می‌سازند. بخش‌های مختلف گیاهان از جمله پهنک برگ جایگاه زیست خاصی برای مخمرها به شمار می‌رود (۱۹). سطح برگ گیاهان که توسط میکروب‌ها کلونیزه می‌شود را فیلوسفر[4] می‌نامند و از جمله میکروارگانیسم‌های این زیستگاه طبیعی مخمرها می‌باشند (۱۲).

از جمله مخمرهایی که قادر به تبدیل زایلوز به زایلیتول هستند شامل جنس‌های: Pichia، Debaryomyces، Pachysolen، Candida و Saccharomyces مهندسی شده می‌باشند(۴). اکثر مخمرهای تولیدکننده زایلیتول از زایلوز به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. مسیر کاتابولیکی زایلوز به این صورت است که ابتدا D- زایلوز توسط آنزیم زایلوز ردوکتاز به زایلیتول احیا می‌شود و سپس زایلیتول توسط زایلیتول دهیدروژناز به D-زایلولوز اکسید می‌شود و سرانجام D- زایلولوز توسط آنزیم زایلوز کیناز به D- زایلولوز ۵ فسفات فسفریله شده و سپس وارد مسیر پنتوز فسفات می‌شود (۷).

تولید میکروبی زایلیتول از منابع کربنی دیگر در موارد نادر انجام شده است. تولید زایلیتول از گلوکز تنها در یک مورد توسط اونیشی و سوزوکی گزارش شد (۱۸) و نیزتولید زایلیتول از لاکتوز در یک مورد، طی یک فرآیند سه مرحله‌ای با استفاده از میکروارگانیسم‌ها انجام گرفت (۲۴).

در مطالعات اخیر مخمر کاندیدا بهترین مخمر مولد زایلیتول در نظر گرفته شده است که به دلیل خصوصیات این مخمر از جمله اینکه مصرف کننده‌ی طبیعی D- زایلوز است و نیز حفظ تعادل اکسیداسیون و احیا در طول تجمع D- زایلیتول می‌باشد (۹). در مطالعاتی که مخمرهای مولد زایلیتول جداسازی شده‌اند، از نمونه-های محیطی متفاوتی مانند خاک مزارع و پارک‌ها، مخصوصاً خاک‌هایی که در تماس با برگ‌های افتاده از درختان باشند (۸)، مزارع انگور و از علف‌های ذرت که در سیلوها انبار شده‌اند (۲)، توت‌فرنگی (۱) و از خاک (۴و۲۱) استفاده گردیده است.

[1] Polyols
[2] Xylitol
[3] Generally regarded as safe (GRAS)
[4] Phyllosphere

هدف از این پژوهش که برای اولین بار در ایران انجام شد، بررسی تولید زایلیتول توسط مخمر کاندیدای جداسازی شده از برگ تربچه بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- جداسازی و شناسایی مخمرمولد زایلیتول

مخمر کاندیدا از برگ تربچه جدا شد، به این ترتیب که ابتدا برگ‌های تربچه را به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در آب خیسانده و سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول فوق را به ارلن حاوی محیط جداسازی YePX[1](عصاره مخمر ۱۰، پپتون ۲۰، زایلوز ۲۰ (گرم بر لیتر) و ۵ : pH) انتقال داده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه همزده شدند (۲۲). بعد از ۴۸ ساعت، از محیط مایع بر روی محیط جداسازی جامد کشت داده و بعد از دو روز کلنی‌ها در زیر میکروسکوپ مشاهده و بررسی شدند. مخمر کاندیدای جداسازی شده توسط تست‌های بیوشیمیایی جذب و تخمیر بعضی از قندها و نیز از نظر مورفولوژیکی (خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی پرگنه) با کشت بر روی محیط PDA[2] مورد شناسایی قرار گرفت (۱۰). این مخمر در محیط‌های اسلنت YPD[3](گلوکز ۲۰، پپتون ۲۰، عصاره مخمر ۱۰ و آگار ۲۰ (گرم بر لیتر)) و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا تولید زایلیتول آن مورد بررسی قرار گیرد (۲).

۲-۲- تولید زایلیتول توسط مخمر کاندیدا

یک لوپ از مخمر فعال شده مورد نظر به یک ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط تولید زایلیتول (زایلوز ۴۰، سولفات آمونیوم ۵، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۲، سولفات منیزیم ۰/۵، عصاره مخمر ۵ و پپتون ۱ (گرم بر لیتر) و pH:۵/۵) انتقال داده شد و سپس ارلن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور با ۱۸۰ دور در دقیقه همزده گردید و تولید زایلیتول، هر ۲۴ ساعت به مدت ۵ روز بررسی شد(۴).

۲-۳- شناسایی زایلیتول

۱- روش کروماتوگرافی لایه نازک [4] : کروماتوگرافی لایه نازک به عنوان یک روش آنالیزی ساده و سریع به منظور شناسایی زایلیتول در مراحل ابتدایی استفاده شد. به این ترتیب که مقدار ۱ میکرولیتر از محیط حاوی زایلیتول تولید شده توسط مخمر را بر روی کاغذهای سیلیکاژل TLC گذاشته و کاغذ به مدت ۲ ساعت در حلال شامل پروپانل- بوتانل- آب با نسبت ۷ : ۲ : ۱ قرار داده شد (۲۷). سپس به منظور ظاهر شدن لکه‌های ایجاد شده، کاغذ با رنگ (هیدروکسید سدیم- پرمنگنات پتاسیم) اسپری شد و بعد از خشک شدن، تولید زایلیتول مورد بررسی قرار گرفت.

۲- کیت : زایلیتول تولید شده توسط مخمر کاندیدا با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت مگازایم ایرلند شناسایی شد و مورد تایید قرار گرفت.

۳- روش رنگ سنجی [5] : این روش شامل اکسیداسیون ملایم زایلیتول با استفاده از سدیم متاپریودات تحت شرایط ملایم اسیدی (کلریدریک اسید) به مدت ۱۰ دقیقه و سپس مخلوط سازی با رامنوز و در نهایت استفاده از معرف ناش (آمونیوم استات ۱۵۰ گرم بر لیتر،استیک اسید ۲ و استیل استن ۲ (میلی‌لیتر بر لیتر)) می باشد. مخلوط فوق را به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۵۳ درجه سانتی‌گراد حرارت داده و بعد از سرد کردن آن، مقدار زایلیتول تولید شده در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد(۳).

اندازه‌گیری قند باقیمانده

از زایلوز به عنوان منبع کربن استفاده و منحنی قند باقی‌مانده رسم گردید. در اندازه‌گیری قند زایلوز از معرف دی نیتروسالیسیلات[6] استفاده شد. به محلول حاصل از تخمیر که طی سانتریفوژ سلول-های مخمر آن جدا شده، معرف دی نیتروسالیسیلات(هیدروکسید سدیم ۱۶، معرف دی نیتروسالیسیلات ۱۰ و نمک تارتارات سدیم- پتاسیم ۲۵۰ (گرم بر لیتر)) اضافه کرده و بعد از حرارت دادن آن به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، در آب یخ سرد شده و جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر یادداشت می‌گردد(۱۶).

---

[1] Yeast extract Pepton Xylose
[2] Potato Dextrose Agar
[3] Yeast Pepton Dextrose Agar
[4] Thin Layer Chromatography (TLC)
[5] Colorimetric method
[6] Dinitrosalicylate(DNS)

۲-۴- اندازه‌گیری بیومس میکروبی

اندازه‌گیری توده زنده همزمان با اندازه‌گیری ماکزیمم تولید زایلیتول صورت گرفت. به این ترتیب که محیط کشت تخمیری را در ۶۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و با آب مقطر ۲ بار شستشو داده شد. سپس در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تا ثابت شدن وزن، خشک گردید(۲).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی و شناسایی مخمر کاندیدا

در ابتدا بر اساس اینکه مخمر مورد نظر توانایی مصرف زایلوز را به عنوان منبع کربن داشته باشد غربالگری می‌شود. مخمر کاندیدا از برگ تربچه و در خرداد ماه جداسازی شد و با بررسی تست‌های بیوشیمیایی و نیز بر اساس خصوصیات مورفولوژیک مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج تست‌های بیوشیمیایی تخمیر و جذب مربوط به این مخمر به ترتیب در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

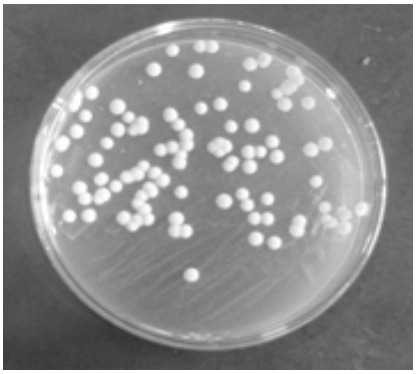
جدول۱- تست تخمیر به منظور شناسایی مخمر

مخمر کاندیدا	نوع قند
+	گلوکز
+	سوکروز
+	مالتوز
–	لاکتوز

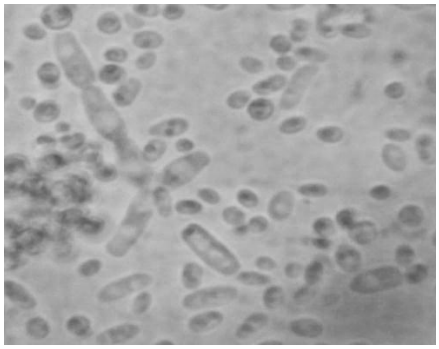
جدول۲- تست جذب به منظور شناسایی مخمر

مخمر کاندیدا	نوع قند
+	گلوکز
+	سوکروز
+	مالتوز
–	لاکتوز
+	ملی بیوز
+	د ـ زایلوز
+	ال ـ آرابینوز
+	د ـ مانیتول
+	اینولین
–	اینوزیتول
–	نشاسته
+	سیترات

مخمر کاندیدا دارای کلنی‌های نرم، صاف و سفید مایل به کرم رنگ بر روی محیط PDA می‌باشد (شکل ۱). این مخمر بلاستوکنیدی و جوانه‌های کروی دارد و قادر به تشکیل هیف کاذب می‌باشد(شکل ۲).



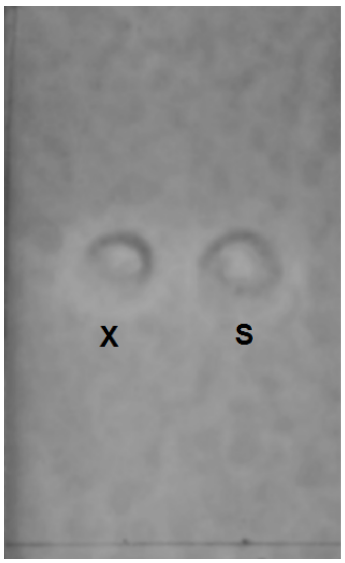
شکل ۱- کلنی‌های مخمر کاندیدا بر روی محیط PDA



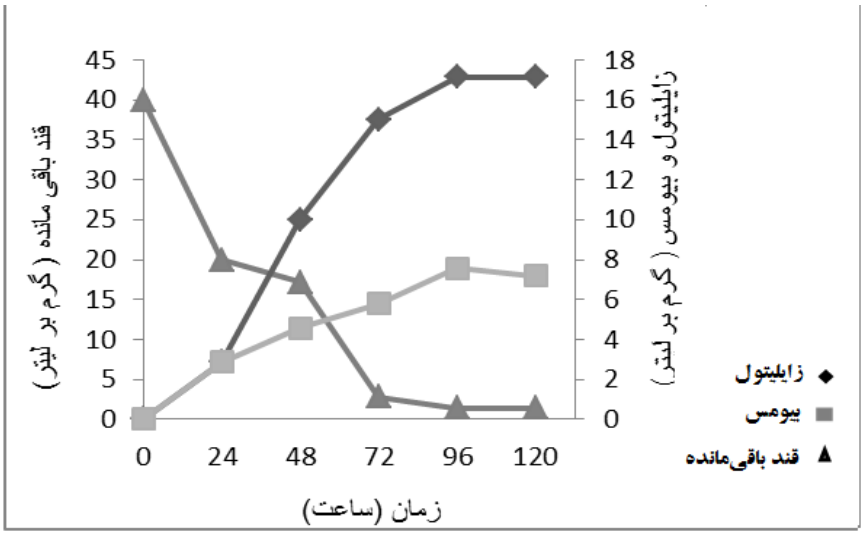
شکل ۲- تصویری از سلول‌های مخمر کاندیدا (بلاستوکنیدی و سلول‌های جوانه) و هیف کاذب در زیر میکروسکوپ

۳-۲- شناسایی کیفی و کمی زایلیتول تولید شده توسط مخمر کاندیدا

مخمر کاندیدا بعد از ۲۴ ساعت قادر به تولید زایلیتول از قند زایلوز می‌باشد. زایلیتول تولید شده در روز سوم بر روی کاغذ TLC در شکل ۳ نشان داده شده است (مقدار ۱۰ گرم بر لیتر زایلیتول به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت). سپس زایلیتول تولید شده توسط این مخمر با استفاده از کیت شناسایی و تایید گردید. هم‌چنین مقدار تولیدبا استفاده از روش رنگ‌سنجی اندازه-گیری شد که همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود این مخمر در روز چهارم بیشترین تولید زایلیتول را داشته (۱۷/۱۴ گرم بر لیتر). هم‌چنین مقدار قند زایلوز باقی‌مانده و مقدار بیومس، طی این فرآیند تخمیر اندازه‌گیری شد و بیشترین بیومس تولیدی (۷/۵۸ گرم بر لیتر) بعد از ۹۶ ساعت گزارش شد(شکل ۴).



شکل ۳-TLC حاصل از زایلیتول تولید شده (X : زایلیتول شاهد، S : زایلیتول تولید شده توسط مخمر کاندیدا)



شکل ۴- منحنی تولید زایلیتول در مخمر کاندیدا

زایلیتول این شیرین‌کننده ارزشمند به طریق بیوتکنولوژیکی توسط میکروارگانیسم‌هایی که به طور طبیعی مصرف‌کننده زایلوز هستند تولید می‌شود و این میکروارگانیسم‌ها دارای آنزیم زایلوز ردوکتاز می‌باشند و زایلیتول محصول اصلی متابولیسم زایلوز است. از جمله مطالعاتی که مخمرهای مولد زایلیتول را از نمونه-های محیطی جدا کردند، ایکوچی و همکاران (۸) از خاک مزارع و پارک‌ها، مخصوصاً خاک‌هایی که در تماس با برگ‌های افتاده از درختان باشند، مخمرهایی مربوط به جنس کاندیدا جداسازی کردند. آلتامیرانو و همکاران (۲) نیز مخمرهایی مانند کاندیدا، دباریومایسز و پیچیا را از مزارع انگور و از علف‌های ذرت که در سیلوها انبار شده، جداسازی کردند. ابوزید و همکاران (۱) سویه مخمری کاندیدا تروپیکالیس را از توت‌فرنگی جدا کردند. مخمر کاندیدا تروپیکالیس هم‌چنین توسط رائو و همکاران (۲۱) و چنگ و همکاران (۴) از خاک جداسازی شد. در این مطالعه نیز مخمر مولد زایلیتول، از برگ گیاه تربچه جداسازی و به عنوان جنس کاندیدا شناسایی شد که این جداسازی برای اولین بار در ایران انجام گردید.

در یک بررسی که توسط ونگسووانلرت و تانی انجام شد، سویه *Candida boidinni* 2201 در محیط حاوی ۱۰۰ گرم بر لیتر زایلوز طی ۱۲۰ ساعت، ۴۰ گرم بر لیتر زایلیتول تولید کرد(۲۶). در مطالعه دیگری که توسط میریال و همکاران صورت گرفت، سویه *C. guilliermondii NRC5578* قادر به تولید ۲۲۱ گرم بر لیتر زایلیتول طی مدت ۴۰۶ ساعت در محیط حاوی ۳۰۰ گرم بر لیتر زایلوز بود (۱۵). لو و همکاران گزارش کردند

که سویه *Candida sp. L-102* در محیط حاوی ۱۱۴ گرم بر لیتر زایلوز طی مدت ۶۵ ساعت قادر به تولید ۱۰۰ گرم بر لیتر زایلیتول بود (۱۳). در مطالعه‌ای که زاگوستینا و همکاران بر روی تولید زایلیتول توسط *C. guilliermondii 2581* انجام دادند، گزارش کردند که این سویه مخمری بعد از ۳ روز در محیط حاوی ۱۵۰ گرم بر لیتر زایلوز، قادر به تولید ۹۰ گرم بر لیتر زایلیتول بود (۲۷). در این بررسی مخمر کاندیدا جداسازی شده از برگ تربچه ۱۷/۱۴ گرم بر لیتر زایلیتول از ۴۰ گرم بر لیتر زایلوز تولید کرد و مقدار زایلیتول تولید شده توسط این سویه نزدیک به مطالعات انجام شده‌ی مشابه می‌باشد.

۴- نتیجه‌گیری

با توجه به خواص ارزشمندی که زایلیتول دارد و با در نظر گرفتن معایب روش شیمیایی تولید زایلیتول، این شیرین‌کننده طبیعی به طریق بیوتکنولوژیکی توسط مخمر جداسازی شده از طبیعت تولید شد که می‌توان از آن به‌عنوان بهترین جایگزین قندی در صنایع مختلف شیمیایی، غذایی و دارویی استفاده کرد. به دلیل اینکه زایلوز، فراوان‌ترین مونومر قندی موجود در ترکیبات همی سلولزی هیدرولیز شده است، از لحاظ اقتصادی تولید زایلیتول از این منبع ارزان‌قیمت، می‌تواند بسیار مقرون به صرفه باشد. فرآیند تخمیر که در مخمرها منجر به تولید زایلیتول می‌شود از طریق یک سری فاکتورها کنترل می‌گردد. از جمله این فاکتورها شامل: غلظت زایلوز، منبع نیتروژن، هوادهی، دما و pH می‌باشند (۵). برای افزایش بازدهی فرآیند بیوتکنولوژیکی زایلیتول می‌توان این پارامترها را بهینه‌سازی نمود. جداسازی سویه‌های مخمری مولد زایلیتول و شناسایی اولیه این سویه‌ها گامی نخست در جهت دستیابی به سویه‌های برتر برای تولید زایلیتول می‌باشد.

۵- منابع

1. Abou Zeid AA, El-Fouly MZ, El-Zawahry YA, El-Mongy TM, El-Aziz ABA. 2008. Bioconversion of rice straw xylose to xylitol by a local strain of candida tropicalis. Journal of Applied Sciences Research, 4(8): 975-986.
2. Altamirano, A., Vazquez, F. and De Figueroa, L.I.C. 2000. Isolation and identification of xylitol- producing yeasts from agricultural residues. Folia Microbiological, 45(3): 255-258.
3. Bok, S.H. and Demain, A. 1977. An improved colorimetric assay for polyols, Annual Biochemistry, 81: 18-20.
4. Cheng, k.k., Ling, H.Z., Zhang, J.A., Ping, W.X., Huang, W., Ge, J.P., Xu JM. 2010. Strain isolation and study on process parameters for xylose- to- Xylitol bioconversion. Food Biotechnology, 24(1): 1606- 1611.
5. EL- Batal, A.I. and Khalaf, S.A. 2004. Xylitol production from corn cobs hemicellulosic hydrolysate by Candida tropicalis immobilized cells in hydrogel copolymer carrier. Journal of Agricultural Biological, 1066-1073.
6. Ghindea, R., Csutak, O., Stoica, I., Tanase, A.M. and Vassu, T. 2010. Production of xylitol by yeasts. Romanian Biotechnological, 3: 5217-5222.
7. Granstrom, T.B., Izumori, K. and Leisola, M. 2007. A rare sugar xylitolPartI:the biochemistry and biosynthesis of xylitol. Applied Microbiology and Biotechnology, 2: 277-281.
8. Ikeuchi T, Azuma M, kato J, Ooshima H. 1999. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose. Biomass Bioenergy, 333-339.
9. Ko, B.S., Kim, J. and Kim, J.H. 2006. Production of xylitol from D – xylose by a xylitol dehydrogenase gene disrupted mutant of Candida tropicalis. Applied and Environmental Microbiology, 72: 4207- 4213.
10. Kurzman, C.P. and Fell, J.W. 1998. The yeast, a taxonomic study, Fourth edition. Elsivier Publication, 1-100 and 891-946.
11. LifHolgerson, P., StecksenBlicks, C., Sjostrom, I., Oberg, M. and Twetman, S. 2006. Xylitol concentration in saliva and dental plaque after use of various xylitol-containing products. Caries Research, 40: 393-397.
12. Lindow, S.E. and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of phyllosphere. Applied and Environmental Mirobiology, 69(4): 1875-1883.
13. Lu, J., Larry, B., Gong, C.S. and Tsao, G.T. 1995. Effect of nitrogen sources on xylitol production from D- xylose by Candida sp. L-102. Biotechnology Letters, 17: 167-170.
14. Meinander, N., Hahn-Hagerdal, B., Linko, M., Linko, P. and Ojamo, H. 1994. Fed- batch xylitol production with recombinant XYL-1 expressing Saccharomyces cerevisiae using

ethanol asa co- substrate. Applied Microbiology and Biotechnology, 42: 334-339.

15. Meyrial, V., Delgenes, J.P., Moletta, R. and Navarro, J.M. 1991. Xylitol production from D- xylose by Candida guilliermondii fermentation behavior. Biotechnology Letters, 13: 281-286.
16. Millier, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Annual Chemistry, 31: 426-428.
17. Natah, S.S., Hussien, K.R., Tuominen, J.A. and Koivisto, V.A. 1997. Metabolic response to lactitol and xylitol in healthy men. . Journal of Clinical Nutrition, 65: 947-950.
18. Onishi, H. and Suzuki, T. 1969. Microbial production of xylitol from glucose. Applied Microbiology, 18: 1031-1035.
19. Phaff, H.J. and Starmer, W.T. 1987. Yeast associated with plants, insect and soil. Pp. 123-180. In: Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds). The yeasts: Biology of yeasts, second edition, Academic Press, Orlando, Florida.
20. Rao, R.S., Bhadra, B. and Shivaji, S. 2007. Isolation and characterization of xylitol-producing yeasts from the gut of colleopteran insects. Current Microbiology, 5: 441-446.
21. Rao RS, Jyothi CP, Prakasham RS, Sarma PN, Rao LV. 2006. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysate by Candida tropicalis. Bioresource Technology, 97: 1974-1978.
22. Rao, R.S., Prahasham, R.S., Prasad, K.K., Rajesham, S., Sarma, P.N. and Rao, L.V. 2004. Xylitol production by Candidasp. : Parameter optimization using Taguchi approach. Process Biochemistry, 39: 951- 956.
23. Russo, J.R. 1977. Xylitol: anti-carie sweetener. Food Engineering, 79: 37-40.
24. Toyoda, T. and Ohtaguchi, K. 2009. Xylitol production from lactose by biotransformation. Journal of Biochemical Technology, 2: 126-132.
25. Vakhlu, J. and Kour, A. 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology, 9: 69-85.
26. Vongsuvanlert, V. and Tani, Y 1989. Xylitol production by a methanol yeast Candida boidinii (Kloeckera sp.) no. 2201. Journal of Fermentation and Bioengineering, 67: 35-39.
27. Zagustina, N.A., Rodionova, N.A., Mestechkina, N.M., Shcherbukhin, V.D. and Bezborodov, A.M. 2001. Xylitol production by a culture of Candida guilliermondii 2581. Applied Microbiology and Biotechnology, 37(5): 489-492.