

자일리톨 농도의 온라인 모니터링을 위한 흐름주입분석기술 개발

이 종 일

전남대학교, 응용화학공학부, 생물공정기술연구소
(접수 : 2002. 4. 26., 게재승인 : 2002. 8. 2.)

Development of a Flow Injection Analysis Technique for On-line Monitoring of Xylitol Concentrations

Jong Il Rhee

Bioprocess Technology Lab., Department of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Yongbong-Dong 300, KwangJu 500-757, Korea
(Received : 2002. 4. 26., Accepted : 2002. 8. 2.)

Flow injection analysis technique for monitoring of xylitol concentrations in biological processes has been developed using xylitol oxidase (XYO) immobilized on VA-Epoxy Biosynth carrier. The immobilized XYO cartridge has been integrated into a FIA system with an oxygen electrode and systematically investigated with regards to the factors which can affect the activity of the immobilized XYO, such as pH, temperature, salt concentration etc. The activity of the immobilized XYO increased with the temperature (19.0 - 29.0°C) and sample injection volume (75-250 µL) and molarity of potassium phosphate buffer (0.1-1 M), but it reached the highest value at pH 8.5. The XYO-FIA system has been also applied for on-line monitoring of xylitol concentrations in a reactor and showed good operational stability and agreement with off-line data measured with HPLC.

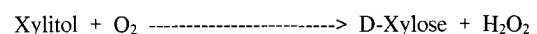
Key Words : Flow injection analysis, xylitol oxidase, monitoring of xylitol

서 론

자일리톨은 자연계에 존재하는 5 탄당 알코올로써 당도가 높고, 충치예방 특성이 있으며 또한 인슐린 의존 당뇨병 환자들이 이용할 수 있으므로 많은 관심이 집중되고 있다(1,2). 자일리톨은 D-xylose의 화학적 축매반응에 의해 주로 제조되어 오고 있지만 최근에는 다양한 미생물(3-5)과 효소를 이용한 생물학적 생산 방법이 많이 연구되고 있으며(6), 특히 생산성을 향상시키기 위해 생물공정에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다(7-11). 자일리톨의 생산성을 증대하기 위해서는 발효 공정중 자일리톨의 농도를 실시간으로 모니터링하고 공급되는 기질의 농도를 적절히 제어하는 것이 매우 중요하다. 자일리톨의 농도 분석은 보통 유색반응을 이용하거나 크로마토그래피 기술에 의해 이루어지지만, 이러한 분석 방법은 감도가 낮고 많은 시간을 필요로 하며 복잡하다. 한편, 효소를 사용한 자일리톨의 분석은 20년 전부터 주로 xylitol

reductase나 xylitol dehydrogenase를 이용하여 수행하였으나 분석시 효소의 활성이 불안정하고 값비싼 NAD 나 NADP와 같은 보조인자들을 필요로 하므로 주로 실험실 규모에서 제한적으로 이용되었다. 최근 일본의 Yamashita 교수팀은 호열성 미생물인 *Streptomyces sp.* IKD472에서 자일리톨 산화효소(xylitol oxidase (XYO))를 분리하여 *Escherichia coli*에 유전자를 재조합 하였다(12). 재조합 *E.coli*에서 생산되는 XYO는 5.5에서 10.5까지의 pH 범위와 65°C에서도 활성이 안정하므로 자일리톨의 농도 분석용으로 매우 적합하다. 또한, XYO를 적절한 담체에 고정화할 경우에는 미생물을 이용한 자일리톨 생산공정에서 생산되는 자일리톨의 농도를 온라인 모니터링 하는데 이용될 수 있다. 즉 아래와 같은 반응에서 XYO의 존재하에서 소모되는 산소의 농도를 적절한 산소센서를 이용하여 측정하므로써 자일리톨의 농도를 분석할 수 있다.

XYO



† Corresponding Author : Bioprocess Technology Lab., Department of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Yongbong-Dong 300, KwangJu 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1847, Fax : +82-62-530-1849
E-mail : jirhee@chonnam.ac.kr

흐름주입분석기술(FIA)은 지난 20여년 전부터 생물공정에서 중요한 여러 성분의 온라인 모니터링에 광범위하게 사용되어 오고 있다(13-16). 그러나 고정화 효소를 사용하여 FIA 장치를 구성하고자 할 때는 고정화 효소의 안정성 및

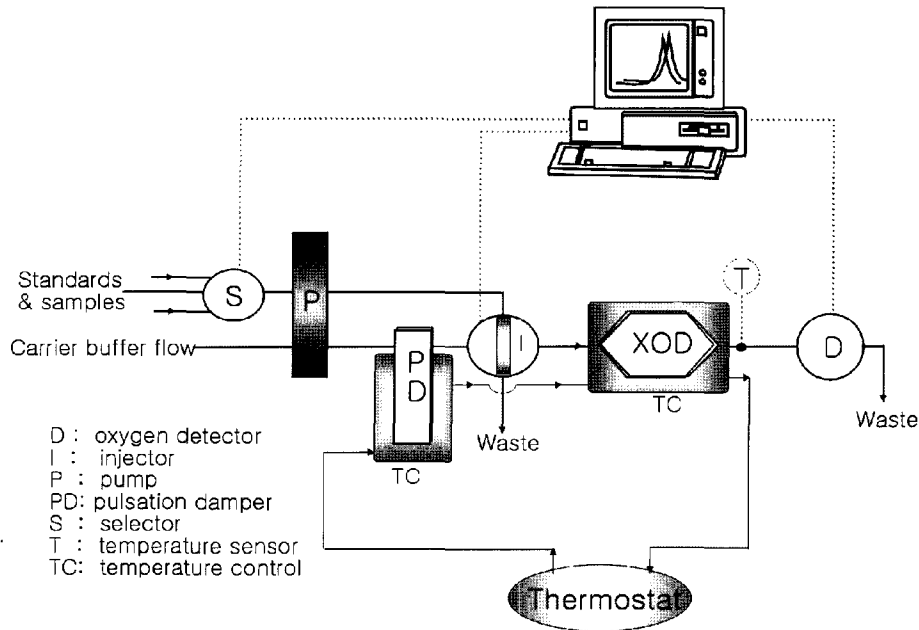


Figure 1. Schematic diagram of the XYO-FIA.

효소 반응기내의 균일한 압력차 및 배양조건에의 적합성 등을 고려하여야 한다.

본 연구에서는 자일리톨을 생산하는 생물공정의 온라인 모니터링을 위해 XYO를 고분자 담체에 고정화한 후 소형 반응기(cartridge)에 적재하여 XYO-FIA 시스템을 제작하고 고정화 효소 XYO의 특성 및 XYO-FIA의 성능을 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

시 약

본 연구에서 사용한 xylitol oxidase(XYO)는 재조합 *E.coli*에서 생산되었고 용액상으로 (325 U/mL, dissolved in 20 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5, 0.1 mM dithiothreitol) 일본 Osaka 대학의 Yamashita 박사로부터 기증 받았다. 사용된 XYO의 특성은 Yamashita 등의 논문 (12)을 참고하여 -40℃에서 보관하였다. 또한 본 연구에서 사용된 모든 시약은 분석용으로써 Sigma 사 제품 및 Fluka 사 제품을 사용하였다.

효소 고정화

효소 고정화를 위한 담체로써 VA-Epoxy-Biosynth E3 (50 μm, pore volume 1.3 mL/g, bulk density 0.32 g/mL, Rideld de Haen Co., Germany)를 사용하였는데 (14,15), 먼저 효소 용액 (70 μL)를 530 μL의 1 M 인산완충용액에 혼합한 후 200 mg의 VA-Epoxy-Biosynth E3가 적재된 소형 반응기 (1 mL, Mobitec GmbH, Germany)에 주입한 후 4℃에서 7일간 저장하였다. 고정화되지 않은 XYO는 7일 후 0.1 M의 인산완충용액으로 세척하였다.

XYO-FIA 시스템

자일리톨과 XYO가 반응하는 동안 산소는 소모되고 과산

Table 1. Reference operating conditions of the XYO-FIA system

Parameter	Values
Carrier flow rate (mL/min)	1.38
pH of the carrier solution	7.0
Sample flow rate (mL/min)	0.236
Sample loop volume (L)	125
Temperature (C)	room temperature
Activity of XYO immobilized (U)	16.25 or 22.75
Cyclus time (sec)	390
Recording frequency (Hz)	1.00

Enzyme unit represents the amount of XYO added to the carrier support.

화수소가 생산되므로 소모된 산소의 양이나 생산된 과산화수소를 측정하여 자일리톨의 농도를 분석한다. 본 연구에서는 소모된 산소의 양을 Clark-type 산소전극 (Yellow Springs Instruments Co., USA)을 사용하여 측정할 수 있도록 FIA 시스템을 구성하였는데, XYO를 고정화한 소형 효소 반응기 (1 mL)를 시료주입기 뒤에 설치하였다(20). 한편, XYO가 고정화 된 소형 효소 반응기의 반응온도에 따른 효소의 활성변화를 조사하기 위해 연동조절판(pulsation damper)과 효소 반응기를 소형 항온조에 설치하였다. 온도센서는 효소 반응기의 출구쪽에 설치하여 반응온도를 측정하였다. XYO-FIA 시스템의 조작은 컴퓨터 소프트웨어에 의해 자동되며 장치와 조작조건은 Figure 1과 Table 1에 나타났다.

결과 및 고찰

고정화 효소 XYO의 특성

고정화 효소를 이용한 흐름주입분석 시스템의 개발에 있어서 고려되어야 할 사항 중 하나는 고정화된 효소의 안정성 (stability)이다. 따라서 XYO-FIA 시스템 개발을 위해 고분자

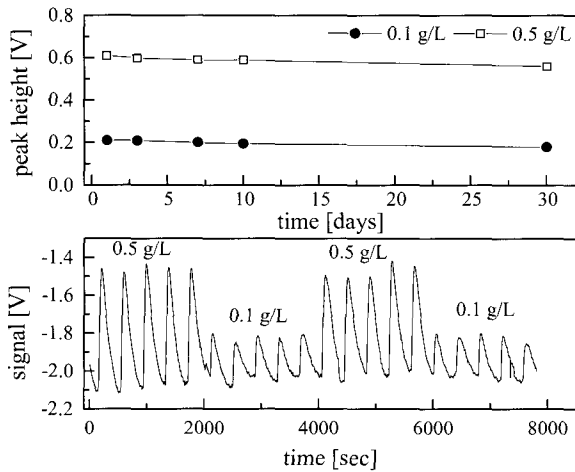


Figure 2. Stability and reproducibility of an immobilized XYO at xylitol concentrations of 0.1 g/L and 0.5 g/L.

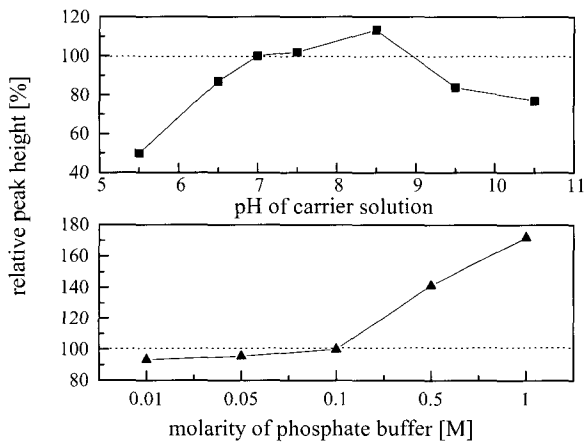


Figure 3. Effects of the pH values of the carrier solution and the molarities of potassium phosphate buffer on the immobilized XYO. Potassium phosphate buffer of 0.1 M and pH 7.0 was set to 100% as a reference value.

담체에 고정화된 효소 XYO의 안정성을 시험, 분석하는 것이 무엇보다도 선행되어야 한다. 고정화 효소 XYO의 안정성을 조사하기 위해 Table 1에 명시된 운전조건 하에서 (시료주입 부피 : 75 μ L) 두 개의 시료 (0.1 g/L xylitol, 0.5 g/L xylitol)를 XYO-FIA system을 이용하여 반복, 측정하여 Figure 2에 보였다. 고정화된 효소 XYO는 4 $^{\circ}$ C에 약 30일간 냉장 보관하였을 때 초기 활성의 92% 이상 유지되었으며 또한 0.5 g/L xylitol을 250회 이상 (즉 30시간 정도) 연속 측정하였을 때 피크의 높이가 초기 피크 높이의 85% 이상 유지되어 고정화 효소의 조작 안정성(operational stability)도 우수하였다. 이러한 고정화 효소 XYO의 우수한 저장 안정성과 신호의 재현성은 고정화 효소 XYO를 이용한 XYO-FIA 시스템의 개발 가능성을 잘 보여주었고 이 결과를 바탕으로 고정화 효소 XYO의 특성을 자세히 조사하였다.

운반용액의 pH 변화에 따른 고정화 효소 XYO의 활성 변화를 알아보기 위해 pH 5.5에서 pH 10.5 사이 범위에서 Table 1의 조건 하에서 XYO-FIA 시스템을 조작하였다. 운반용액의 pH 값 조절은 염산 수용액(5 M)과 수산화나트륨 수

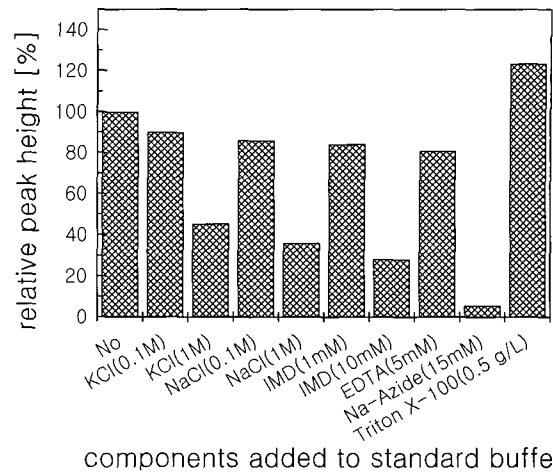


Figure 4. Effects of some components added to a standard buffer solution on the activity of the immobilized XYO. The peak height of 0.5 g/L xylitol was set to 100% as the reference value, when 0.1 M potassium phosphate buffer solution was employed as the standard buffer.

용액(5 M)으로 하였다. pH 7의 인산완충용액 (0.1 M)을 운반용액으로 사용하였을 때 피크 높이를 100%로 하였는데 고정화 효소 XYO의 최대 활성은 pH 8.5에서 나타났다 (Figure 3). 효소 XYO를 고정화하지 않은 경우 최적 pH 값(pH 7.5)에 비해(12) 고정화 효소 XYO의 최적 pH 값이 alcohol oxidase(AOD)의 고정화에서처럼 알칼리 영역으로 조금 옮겨진 것을 알 수 있다(17). 그러나 고정화 효소 XYO의 활성은 인산완충용액의 몰농도가 0.01 M에서 1 M로 증가함에 따라 증가하였다. AOD의 경우에서도 인산완충용액의 몰농도를 0.01 M에서 0.1 M로 바꿨을 때 효소의 활성이 약 8% 증가하였고 0.1 M에서 1 M로 했을 때 약 70% 증가하였다(13).

염화 음이온이나 계면 활성제와 같은 성분들은 고정화 효소의 활성을 높일 뿐만 아니라 효소의 수명을 증가시킬 수 있기 때문에 완충용액에 첨가된다(13). 염화 음이온(KCl, NaCl), imidazole(IMD), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), surfactant(Triton X-100) 그리고 sodium azide 첨가에 대한 고정화 효소의 활성을 조사하였는데, XYO-FIA 시스템에서 0.5 g/L xylitol의 측정시 chloride anions를 첨가한 인산완충용액에서는 고정화된 XYO의 활성이 감소하였다 (Figure 4). 염화 이온이나 계면활성제를 첨가하지 않고 0.1 M의 인산완충용액만을 운반용액으로 사용한 경우의 피크 높이를 100%로 설정하였을 때 0.1 M의 인산완충용액에 1 M의 KCl, NaCl 또는 10 mM의 EDTA를 첨가한 경우 피크 높이는 50% 이상 감소되었다. 그러나 0.5 g/L의 Triton X-100을 첨가했을 때 효소의 활성 즉 피크의 높이는 25% 증가하였고 15 mM의 sodium azide를 첨가한 경우는 고정화 효소 XYO의 활성이 거의 없어졌다.

본 논문에서 사용한 XYO는 55 $^{\circ}$ C에서 최적 활성을 갖는다고 보고되었는데 epoxy 담체에 고정화한 효소 XYO의 최적 반응온도를 조사하기 위하여 19.0 $^{\circ}$ C와 29.0 $^{\circ}$ C에서 실험을 수행하였다. Figure 5는 반응온도 증가에 따른 고정화 효소 XYO의 활성을 보여주고 있다. 한편, 30 $^{\circ}$ C 이상에서는 XYO-FIA 시스템의 튜브내에 작은 공기방울 등이 발생하여 출력

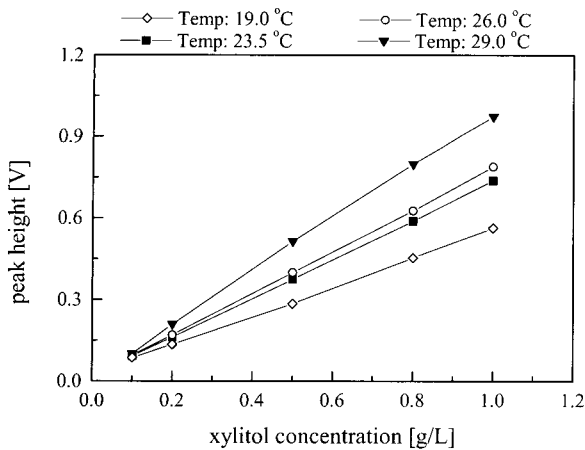


Figure 5. Effects of reaction temperature on the activity of the immobilized XYO.

되는 신호가 불안정하였으므로 30°C 이상의 온도에서 분석실험은 수행하기가 어려웠다.

생물공정의 발효액 중에는 염, 기질 그리고 각종 대사물질 등이 존재하며 이러한 성분들은 XYO-FIA 시스템으로 주입되는 시료속에 포함되어 있으며 고정화 효소 XYO의 활성에 영향을 미친다. Table 1과 같은 XYO-FIA 시스템의 조작 조건으로 분석시료(0.5 g/L의 xylitol)를 측정할 때 배양액중 각종 염류(sodium chloride, potassium chloride 등), 기질(xylose, glucose, mannose 등) 그리고 대사물질(acetate, glycerol, pyruvate 등)의 고정화 효소 XYO에 대한 반응 특성 (저해 또는 촉진 작용)을 조사하였다. 배양액중의 염류 및 기질의 농도는 발효과정 초기에 들어가는 배양액의 조성을 기초로 하였는데(1-11,17,18), Table 2a)에서 염류의 농도가 높았을 때 피크 높이가 기준값보다 50% 이상 감소함을 알 수 있다. 그러나 자일리톨 생산 공정에 사용되는 몇 가지 기질에서는 피크의 높이가 증가하였다. 예를 들면 10 g/L의 malt extract

나 4 g/L의 furfural이 분석 시료 속에 포함되어 있을 때 고정화 효소 XYO의 활성을 촉진하거나 생산물의 증가로 인하여 피크의 높이가 10% 정도 증가하였다. 그러나 30 g/L의 xylose와 20 g/L의 arabinose는 고정화 효소 XYO의 저해제로 작용하여 피크의 높이를 20 - 30% 정도 감소시켰다 (Table 2b)). 자일리톨을 생산하는 미생물을 배양하는 동안 각종 대사물질들이 배양액으로 배출되고 이러한 대사물질들이 섞여 있는 배양액이 분석시료로써 XYO-FIA 시스템에 주입된다. 생성된 대사물질의 종류와 농도는 사용한 기질 및 미생물에 따라 다르며 문헌의 자료를 기초로 하여 대사물질의 농도를 선택하였다. Table 2c)에서 8 g/L의 arabitol은 자일리톨과 함께 산화하여 XYO의 활성을 50% 이상 증가시켰으며 4 g/L의 glycerol은 반응에 저해작용을 하여 피크 높이를 12% 정도 감소시켰다. 그러나 acetate(2 g/L), ethanol(20 g/L), pyruvate(5 g/L)와 lactate(5 g/L)는 고정화 효소 XYO의 활성에 그다지 큰 영향을 미치지 않았다.

XYO-FIA 시스템의 성능 및 고찰

XYO-FIA 시스템을 이용하여 분석을 수행하는데 있어서 시료의 주입량(sample injection volume) 및 운반용액의 흐름 속도등 여러 변수들이 성능에 영향을 끼친다. 따라서 XYO-FIA 시스템의 각종 조작변수에 의한 피크의 높이 변화를 조사하고자 한다. 먼저 Table 1에 주어진 조작 조건하에서 주입 시료의 부피를 75~250 μL 범위에서 실험을 수행하였다. Figure 6에서 시료 주입량이 증가함에 따라 피크의 높이가 증가하였지만 시료 주입량이 많아지면 시료의 주입시간이 길어지기 때문에 시료채취 속도도 감소한다.

한편, 운반용액의 흐름속도는 XYO-FIA 시스템의 소형 효소반응기내의 효소와 기질(xylitol) 사이의 반응에 중요한 영향을 미친다. Figure 7에는 0.7~2.0 mL/min 범위의 운반용액 흐름속도에서 피크의 높이 변화를 조사하였다. 용액의 운반속도를 감소시켰을 때 효소 반응기내에서 기질의 전환율이

Table 2. Effects of nutrient salts, substrates and metabolites in sample on the peak height of 0.5 g/L xylitol. The peak height of 0.5 g/L xylitol without the addition of nutrient salts, substrates and metabolites was set to 100% as reference value

a)	Nutrient salts added to sample	Relative peak height [%]	Nutrient salts added to sample	Relative peak height [%]
	No	100	90 g/L KH ₂ PO ₄	52.9
	30 g/L NaCl	49.4	80 g/L NaHPO ₄	53.3
	50 g/L KCl	47.3	20 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	96.8
	95 g/L MgSO ₄	58.9	-	-

b)	Nutrient salts added to sample	Relative peak height [%]	Nutrient salts added to sample	Relative peak height [%]
	No	100	10 g/L malt extract	112.8
	20 g/L arabinose	66.0	8 g/L mannose	100
	4 g/L furfural	114.5	30 g/L xylose	82.4
	50 g/L glucose	104.4	10 g/L yeast extract	101.8

c)	Nutrient salts added to sample	Relative peak height [%]	Nutrient salts added to sample	Relative peak height [%]
	No	100	4 g/L glycerol	86.2
	2 g/L acetate	96.7	5 g/L lactate	104.5
	8 g/L arabitol	148.2	5 g/L pyruvate	102.7
	20 g/L ethanol	102.6	-	-

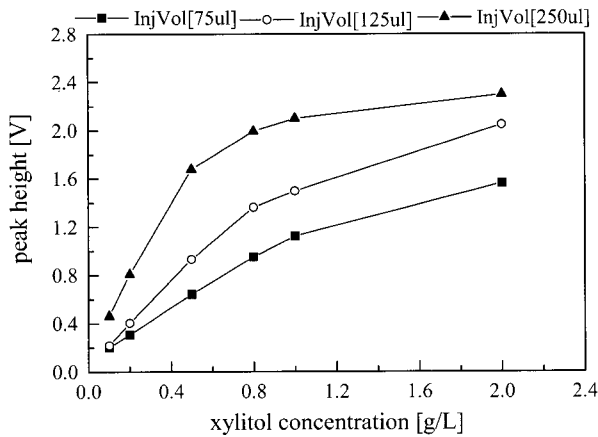


Figure 6. Calibration curves of 22.75-U XYO at different sample injection volumes.

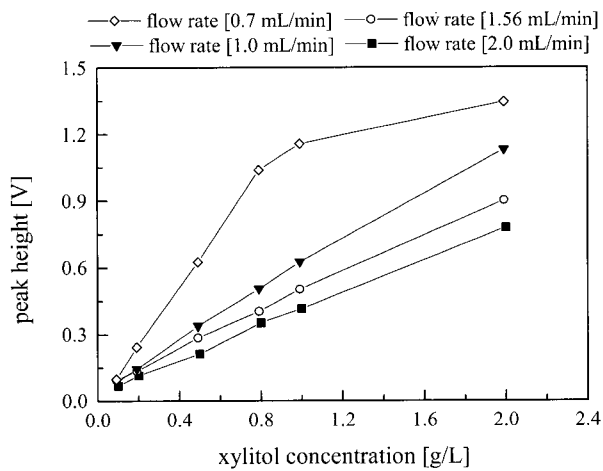


Figure 7. Calibration curves of 16.25-U XYO at different carrier buffer flow rates.

증가하여 피크의 높이가 증가하였다. 그러나 운반용액의 유속이 작은 경우(0.7 mL/min) FIA 시스템의 시료 채취 속도를 감소시킨다. 따라서 빠르고 감도 높은 검출결과를 얻기 위해 Figure 6과 Figure 7의 결과 그리고 분석하고자 하는 자일리톨의 농도를 고려하여 XYO-FIA 시스템의 운반용액의 유속, 시료의 주입량 등을 주의 깊게 선택하여야 한다.

본 연구에서 개발된 XYO-FIA 시스템을 연속 교반 탱크 반응기 (유입 및 유출 속도: 0.95 mL/min) 내의 자일리톨의 농도를 온라인 모니터링 하는데 적용하였다 우선 300 mL의 증류수가 채워진 반응기내에 2.0 g/L의 자일리톨 용액을 2시간 동안 유입시킨 후 증류수를 주입하였다. 그리고 6시간 후 다시 2.0 g/L의 자일리톨 수용액을 반응기로 주입하여 반응기 내 자일리톨의 농도를 임의로 변화시켰다. 반응기로부터 시료를 모니터링 하기 위한 XYO-FIA 시스템의 조작 조건은 Table 1의 조건을 사용하였으며 시료 주입량은 75 μ L로 하였다. Figure 8에 XYO-FIA에 의한 온라인 모니터링 결과와 HPLC (High performance liquid chromatography: Waters model M 510 RI detector, injection volume of 25 μ L, a carrier of deionized water with 0.2 mL/min and a column of Waters sugar-pak I at 90°C)에 의한 오프라인 측정값과 비교

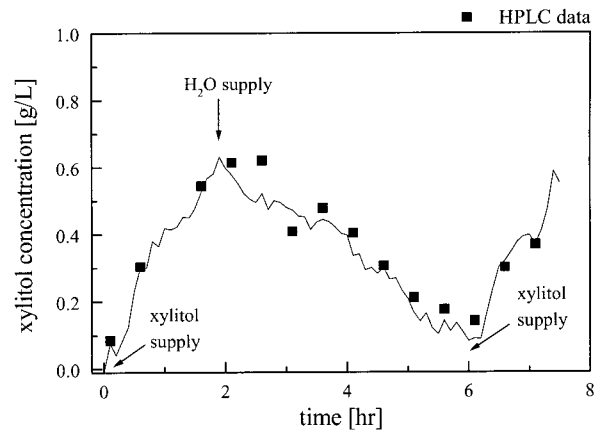


Figure 8. On-line monitoring of xylitol concentrations in a simulated process.

하여 나타냈다. 온라인 모니터링 값과 오프라인 측정값은 큰 차이를 보이지 않았으므로 XYO를 고분자 담체에 고정화한 XYO-FIA 시스템은 생물공정내 자일리톨의 농도를 온라인 모니터링 하는데 이용 가능함을 알 수 있다.

결론

생물공정내의 자일리톨 농도를 온라인 모니터링하기 위해 소형 반응기 안에 VA-Epoxy Biosynth E3-carrier에 고정화된 효소 XYO를 적재하고 Clark 형태의 산소전극을 이용한 XYO-FIA 시스템을 개발하였다. 고정화 효소 XYO의 활성은 운반용액의 pH값과 인산완충용액의 농도, 반응온도 그리고 운반용액의 조성에 따라 변화를 나타냈다. 고정화 효소 XYO의 활성은 1 M 인산 완충용액에 계면활성제 triton X-100 (pH 8.5, 0.5 g/L)를 혼합한 경우와 29°C의 운반용액 상에서 가장 높게 나타났다. 자일리톨 생산 공정의 배양액에 용해되어 존재할 수 있는 각종 무기염류, 기질 및 대사물질의 고정화 효소 XYO의 활성에 대한 영향을 조사하였다. 생물공정에서 자일리톨의 농도를 큰 오차 없이 모니터링하기 위해서는 고정화 효소 XYO의 활성을 증대시키거나 감소시킬 수 있는 물질을 적절히 혼합하여 분석검정용액을 제조할 필요가 있다.

REFERENCES

1. Parajo, J. C., H. Dominguez, and J. M. Dominguez (1996), Xylitol from wood: study of some operational strategies, *Food Chem.* **57**, 531-535.
2. Silva, S. S., I. C. Roberto, M. G. A. Felipe, and I. M. Mancilha (1996), Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor, *Proc. Biochem.* **31**, 549-553.
3. Vandeska, E., S. Amartey, S. Kuzmanova, and T. W. Jeffries (1996), Fed-batch culture for xylitol production by *Candida boidinii*, *Proc. Biochem.* **31**, 265-270.
4. Azuma, M., T. Ikeuchi, R. Kiritani, J. Kato, and H. Ooshima (2000), Increase in xylitol production by *Candida tropicalis* upon addition of salt, *Biomass Bioenergy*, **19**, 129-135.
5. Walther, T., P. Hensirisak, and F. A. Agblevor (2001),

- The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*, *Biores. Technol.* **76**, 213-220.
6. Neuhauer, W., M. Steininger, D. Haltrich, K. D. Kulbe, and B. Nidetzky (1998), A pH-controlled fed-batch process can overcome inhibition by formate in NADH-dependent enzymatic reductions using formate dehydrogenase-catalyzed coenzyme regeneration, *Biotechnol. Bioeng.* **60**, 277-282.
 7. Parajo, J. C., H. Dominguez, and J. M. Dominguez (1998), Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis, *Biores. Technol.* **65**, 191-201.
 8. Preziosi-Belloy, L., V. Nolleau, and J. M. Navarro (1997), Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*, *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 124-129.
 9. Felipe, M. G. A., M. Vitolo, I. M. Mancila, and S. S. Silva (1997), Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of pH, *Biomass and Bioenergy*, **13**, 11-14.
 10. Converti, A., P. Perego, P. Torre, and S. Silverio da Silva (2000), Mixed inhibitions by methanol, furfural and acetic acid on xylitol production by *Candida guilliermondii*, *Biotechnol. Lett.* **22**, 1861-1865.
 11. Snachez, S., V. Bravo, E. Castro, A. J. Moya, and F. Camacho (1998), The production of xylitol from d-xylose by fermentation with *Hansenula polymorpha*, *Appl. Microb. Biotechnol.* **50**, 608-611.
 12. Yamashita, M., H. Omura, E. Okamoto, Y. Furuya, M. Yabuuchi, K. Fukai, and Y. Murooka (2000), Isolation, Characterization, and Molecular Cloning of a Thermostable Xylitol Oxidase from *Streptomyces* sp. IKD472, *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 350-360.
 13. Jürgens, H., R. Kabuss, T. Plunbaum, B. Weigel, G. Kretzmer, K. SchÜgerl, K. Andres, E. Ignazek, and F. Giffhorn. (1994), Development of enzyme-cartridge flow-injection analysis for industrial process monitoring ; Part I. development and characterization, *Anal. Chim. Acta*, **298**, 141-149.
 14. Burfeind, J., B. Weigel, G. Kretzmer, K. SchÜgerl, A. Huwig, and F. Giffhorn (1996), Determination of the concentration of higher alcohols with enzyme coupled flow-injection analysis in model systems, *Anal. Chim. Acta*, **322**, 131-139.
 15. Rhee, J. I., and K. SchÜgerl (1997), The influence of metabolites on enzyme based flow injection analysis, *Anal. Chim. Acta*, **355**, 55-62.
 16. Keay, P. J. and Y. Wang (1997), Applications of flow injection analysis to analytical biotechnology. *TIBTECH*, **15**, 76.
 17. Rodrigues, D. C. G. A., S. S. Da Silva, and M. G. A. Felipe (1999), Fed-batch culture of *Candida guilliermondii* FTI 20037 for xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate, *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 359-363.
 18. Oh, D.-K., S.-Y. Kim, and J.-H. Kim (1998), Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*, *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 440-444.
 19. SchÜgerl, K. (1993), Which requirements do flow injection analyzer/biosensor systems have to meet for controlling the bioprocess? *J. Biotechnol.* **31**, 241-250.
 20. Kim, J. -H, D. -H. Park, and J. I. Rhee (2001), On-line monitoring of glucose and starch by a flow injection analysis technique, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16(5)**, 459-465.