

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۸-۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

بررسی تأثیر استراتژی‌های خوراک‌دهی روغن زیتون بر تولید لیپاز یارروویا لیپولیتیکا

فرشاد درویشی* : دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه مراغه، ایران، f.darvishi@ymail.com
برومند حسینی: کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه مراغه، ایران، brommandauthor@yahoo.com

چکیده

مقدمه: آنزیم لیپاز مخمر *Yarrowia lipolytica* در صنایع شوینده‌ها، آرایشی و بهداشتی، داروسازی و غذایی به کار می‌رود. تولید این آنزیم به ترکیب محیط کشت به ویژه منبع کربن بستگی دارد. هدف پژوهش حاضر، بررسی تأثیر استراتژی‌های خوراک‌دهی مختلف روغن زیتون بر تولید لیپاز *Y. lipolytica* بود.

مواد و روش‌ها: سویه مخمر *Y. lipolytica* FDY1390 در محیط‌های کشت با استراتژی‌های مختلف خوراک‌دهی کشت شد. سه الگو مختلف برای روش خوراک‌دهی نیمه پیوسته به کار رفت. رشد مخمر به روش شمارش مستقیم توسط لامنتوبار بررسی و فعالیت لیپاز با استفاده از روش تیتراسیون اندازه گیری شد.

نتایج: هر سه الگو خوراک‌دهی نیمه پیوسته میزان تولید لیپاز را نسبت به کشت بسته افزایش داد. Fed3 بهترین الگو خوراک‌دهی نیمه پیوسته بود که به تولید لیپاز با فعالیت برابر با ۵۲۶ واحد در میلی‌لیتر پس از ۱۲۰ ساعت منجر شد و ضریب بهره‌وری به ۴/۳۸ واحد بر ساعت رسید.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که الگوهای خوراک‌دهی کشت نیمه پیوسته نسبت به کشت بسته میزان تولید لیپاز را افزایش می‌دهد. بهترین استراتژی افزودن روغن زیتون به عنوان منبع کربن و سوبسترای القایی پس از ۴۸ ساعت از زمان تلقیح مخمر *Y. lipolytica* به محیط کشت است.

واژه‌های کلیدی: لیپاز، یارروویا لیپولیتیکا، کشت بسته، کشت نیمه پیوسته، خوراک‌دهی

* نویسنده مسؤل مکاتبات

مقدمه

لیپاز (EC 3. 1. 1. 3) جزو هیدرولازهاست که در درجه اول مسؤول هیدرولیز آسیل گلیسرول‌ها می‌باشد. لیپاز برای تجزیه و زیست تبدیلی لیپیدها به ویژه تری آسیل گلیسرول‌ها در طبیعت ضروری هستند. علاوه بر اهمیت زیستی، لیپازها توانایی بالقوه‌ای برای بهره‌برداری در بیوتکنولوژی دارند (۱ و ۲). لیپاز توسط حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود. لیپازهای میکروبی به علت ثبات در عمل، گزینش و استفاده از سوبستراهای متنوع مورد توجه صنایع مختلف هستند. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها به عنوان تولید کنندگان لیپاز خارج سلولی شناخته شدند (۳-۵).

مخمر *Yarrowia lipolytica* جزو گروه مخمرهای غیر معمول است که در دهه‌های گذشته در پژوهش‌های بنیادی و بیوتکنولوژی مورد توجه قرار گرفته است. این مخمر برای انسان غیر بیماری‌زا و برای چند فرآیند صنعتی ایمن شناخته شده است (۶).

آنزیم لیپاز *Y. lipolytica* با ایجاد آرایش فضایی اختصاصی و دارا بودن فعالیت آنزیمی بالا برای آبکافت، ساخت و ترانس-استریفیکاسیون، دامنه وسیعی از استرها و روغن‌هاست که به همین علت می‌توان از آن برای انجام بیوترانسفورماسیون‌های میکروبی در صنایع دارویی، آرایشی-بهداشتی و غذایی استفاده کرد (۷ و ۸). همچنین، این آنزیم به خاطر پایداری بالا، عدم نیاز به کوفاکتور، فعالیت سنتزی در حلال‌های آلی و طیف گسترده سوبسترا می‌تواند برای تبدیل مخلوط راسمیک به ترکیبات دارویی تک آنانتیومری به کار رود (۹ و ۱۰).

تولید لیپازهای میکروبی بیشتر تحت تأثیر ترکیب

محیط و عوامل فیزیکی شیمیایی مانند دما، اسیدیته و اکسیژن محلول قرار دارند. از آنجا که معمولاً لیپاز جزو آنزیم‌های القایی می‌باشد، در نتیجه منبع کربن عامل مهمی در بیان و تولید لیپاز است. این آنزیم‌ها معمولاً در حضور لیپیدها و مشتقات آن‌ها مانند تری آسیل گلیسرول، اسیدهای چرب، استرهای قابل هیدرولیز، توئین، نمک‌های صفاوی و گلیسرول تولید می‌شود (۱۱) و (۱۲).

به طور کلی فرآیندهای تخمیری به روش‌های بسته^۱، خوراک‌دهی نیمه پیوسته^۲ و پیوسته^۳ انجام می‌شود. در روش بسته چیزی به محیط کشت اضافه نمی‌شود و یا از آن خارج نمی‌گردد. در روش خوراک‌دهی نیمه پیوسته ماده مغذی طی فرآیند تخمیر به محیط کشت اضافه می‌شود. در روش خوراک‌دهی پیوسته ماده مغذی به محیط کشت اضافه می‌شود و معادل آن محصول از محیط کشت خارج می‌گردد (۱۳).

هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر استراتژی‌های مختلف خوراک‌دهی بسته و نیمه پیوسته روغن زیتون به عنوان منبع کربن و القا کننده لیپاز بر فرآیند تخمیر و تولید لیپاز مخمر *Y. lipolytica* است.

مواد و روش‌ها

سویه میکروبی و شرایط کشت: در این پژوهش از سویه مخمر *Y. lipolytica* FDY1390 استفاده شد. از محیط کشت YPD حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر پپتون و ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۱۷ گرم در لیتر آگار برای کشت این مخمر در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ روزه استفاده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۴).

فعال‌سازی سویه‌ها با کشت بر روی محیط YPD

پس از هر بار نمونه برداری، نمونه‌ها در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد و از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. یک میلی لیتر از محلول رویی به طور مستقیم و یا رقیق شده به ۵ میلی لیتر از سوسترای سنجش فعالیت لیپاز (مخلوطی از روغن زیتون با هیدروکسید سدیم یک دهم مولار و پلی وینیل الکل دو درصد) به همراه ۴ میلی لیتر بافر فسفات یک دهم مولار با اسیدیته حدود ۷ اضافه شد. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مرحله برای متوقف کردن واکنش، ۵ میلی لیتر از محلول متوقف کننده (ترکیبی از الکل و استون به نسبت یک به یک حجمی/حجمی) اضافه شد. در ادامه ۳ تا ۵ قطره از محلول فنل فتالین دو در صد افزوده شد و با محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ میلی مولار تیترا شد. فعالیت لیپاز به شکل واحد در میلی لیتر گزارش می شود که یک واحد فعالیت آنزیمی، معادل مقدار آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را در یک دقیقه تحت شرایط سنجش آزاد سازد (۱۶). شایان ذکر است که تمام آزمایش‌ها حداقل با چهار تکرار انجام شد.

نتایج

روند رشد سویه مخمر مورد استفاده و میزان تولید لیپاز در محیط‌های کشت بسته و خوراک‌دهی شده با سه الگو مختلف با فواصل زمانی ۲۴ ساعت اندازه گیری و در زمان‌های مقرر خوراک‌دهی انجام شد. نتایج مربوط به تولید لیپاز و میزان رشد سویه *Y. lipolytica* FDY1390 در محیط‌های مختلف کشت بسته و خوراک‌دهی شونده نیمه پیوسته به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

انجام شد که پس از انکوبه کردن در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، یک کلونی به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط YPD مایع و فاقد آگار به عنوان مایع تلقیح انتقال داده شد. سپس، ارلن در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی گراد با سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد (۱۵).

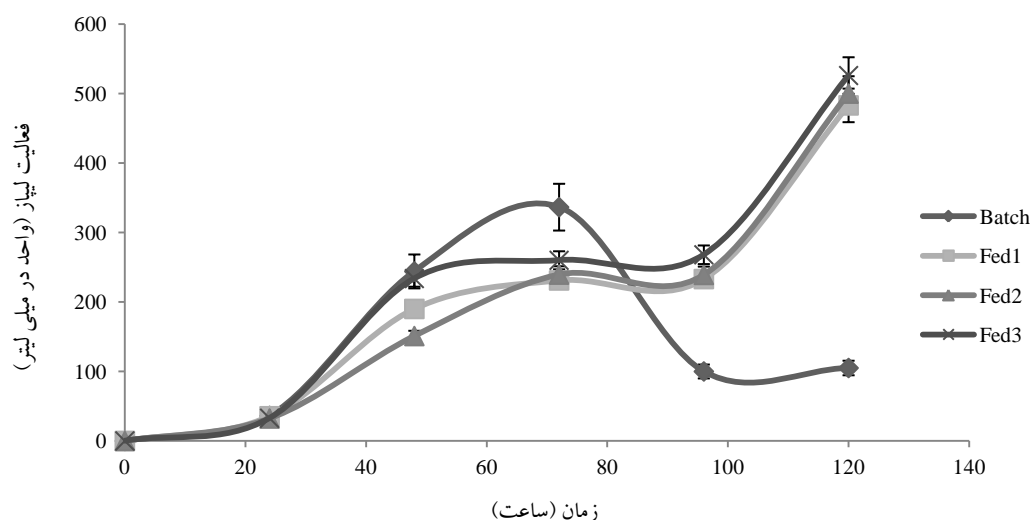
روش‌های خوراک‌دهی: برای روش بسته، ۵۰

میلی لیتر محیط کشت تولید حاوی یک درصد عصاره مخمر و تریپتون و یک درصد روغن زیتون در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری در نظر گرفته شد. پس از استریل کردن محیط کشت، یک درصد مایع تلقیح از سویه مخمر *Y. lipolytica* FDY1390 در شرایط استریل اضافه شد. سپس، ارلن‌ها به منظور انکوبه کردن به انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی گراد و با سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه منتقل شدند. هر ۲۴ ساعت به منظور بررسی رشد مخمرها و فعالیت لیپاز از ارلن‌ها در شرایط استریل نمونه برداری شد.

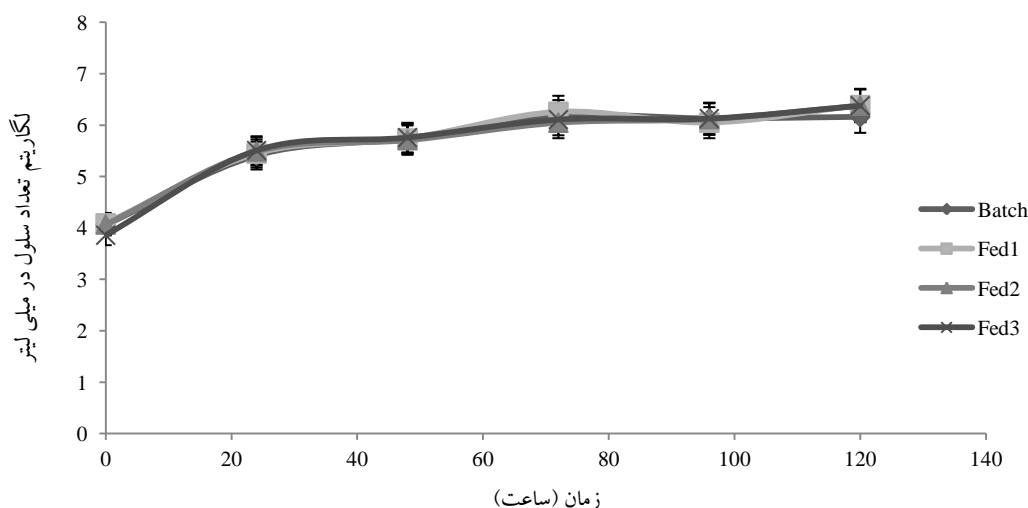
برای روش خوراک‌دهی نیمه پیوسته، سه الگو مختلف با نام‌های Fed1، Fed2 و Fed3 به کار رفت. برای هر سه الگو محیط کشت اولیه، روش تلقیح و مطالعه نمونه‌ها مشابه روش بسته بود. برای الگو Fed1، پس از ۲۴ ساعت ۰/۵ درصد روغن زیتون اضافه شد و پس از ۴۸ ساعت ۰/۵ درصد دیگر از روغن زیتون اضافه شد. برای الگو Fed2، تنها پس از ۲۴ ساعت یک درصد روغن زیتون اضافه شد. برای الگو Fed3، تنها پس از ۴۸ ساعت یک درصد روغن زیتون اضافه شد.

سنجش رشد و فعالیت آنزیمی: برای بررسی رشد و

شمارش تعداد سلول‌های مخمر از لام نئوبار استفاده شد. روش تیتراسیون برای سنجش فعالیت لیپاز به کار رفت.



شکل ۱- نمودار تولید لیپاز توسط سویه مخمر *Yarrowia lipolytica* FDY1390 در محیط‌های مختلف کشت بسته (Batch)، کشت نیمه پیوسته خوراک‌دهی شونده با الگو اول (Fed1)، الگو دوم (Fed2) و الگو سوم (Fed3).



شکل ۲- نمودار میزان رشد سویه مخمر *Yarrowia lipolytica* FDY1390 در محیط‌های مختلف کشت بسته (Batch)، کشت نیمه پیوسته خوراک‌دهی شونده با الگو اول (Fed1)، الگو دوم (Fed2) و الگو سوم (Fed3).

میلی‌لیتر بود. بررسی روند رشد و فعالیت لیپاز تا ۱۲۰ ساعت از آغاز فرآیند ادامه داده شد. طی این زمان که از خوراک‌دهی Fed1 و Fed2 مدت ۹۶ ساعت و از خوراک‌دهی Fed3 مدت ۷۲ ساعت می‌گذشت حداکثر فعالیت لیپاز در آن‌ها مشاهده شد که به ترتیب برابر ۴۸۳، ۵۰۰ و ۵۲۶ واحد در میلی‌لیتر بود. بهره‌وری تولید لیپاز

سویه مخمر *Y. lipolytica* FDY1390 در تخمیر به حالت کشت بسته پس از ۷۲ ساعت به حداکثر فعالیت لیپاز خود رسید که معادل ۳۳۶/۵ واحد در میلی‌لیتر بود. طی این زمان که ۴۸ ساعت از خوراک‌دهی Fed1 و Fed2 و ۲۴ ساعت از خوراک‌دهی Fed3 گذشته بود، فعالیت لیپاز این به ترتیب ۲۳۱، ۲۳۹/۵ و ۲۶۰ واحد در

دارا بودن ترکیبی از ویژگی‌های کشت بسته و کشت پیوسته به کار گرفته می‌شود. مزیت اصلی کشت به روش خوراک‌دهی نیمه پیوسته، امکان‌پذیر بودن کنترل نرخ واکنش و واکنش‌های متابولیک با استفاده از نرخ خوراک‌دهی است (۱۳).

حداکثر تولید لیپاز در مخمر *Y. lipolytica* نزدیک مرحله سکون منحنی رشد انجام می‌شود و برای این مخمر حدود ۴۸ ساعت پس از تلقیح است (۲۳ و ۲۴). در نتیجه سه الگو مختلف خوراک‌دهی نیمه پیوسته با روغن زیتون در پژوهش حاضر به کار گرفته شد. برای الگو Fed1، پس از ۲۴ ساعت، ۰/۵ درصد روغن زیتون به محیط کشت اضافه شد و پس از ۴۸ ساعت، ۰/۵ درصد دیگر از روغن زیتون اضافه شد. برای الگو Fed2، تنها پس از ۲۴ ساعت، یک درصد روغن زیتون به محیط کشت اضافه شد. برای الگو Fed3، تنها پس از ۴۸ ساعت، یک درصد روغن زیتون به محیط کشت اضافه شد.

هر سه الگو خوراک‌دهی نیمه پیوسته میزان تولید تولید لیپاز را نسبت به کشت بسته افزایش داد که از بین آن‌ها بهترین الگو، Fed3 بود. این الگو به تولید لیپاز با فعالیت برابر با ۵۲۶ واحد در میلی‌لیتر پس از ۱۲۰ ساعت منجر شد که ضریب بهره‌وری حدود ۴/۳۸ واحد بر ساعت به دست آمد.

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که الگوهای خوراک‌دهی نیمه پیوسته نسبت به کشت بسته میزان تولید تولید لیپاز را افزایش می‌دهد و بهترین استراتژی افزودن روغن زیتون به عنوان منبع کربن و سوبسترای القایی پس از ۴۸ ساعت از زمان اولیه تلقیح مخمر *Y. lipolytica* به محیط کشت است.

(PL) به شکل میزان تولید لیپاز بر زمان تخمیر و بر حسب واحد فعالیت آنزیمی بر ساعت (U/h) گزارش می‌شود. در این پژوهش، بهره‌وری تولید لیپاز برای تخمیر در حالت کشت بسته برابر ۴/۶۷، برای خوراک‌دهی نیمه پیوسته الگو یک، معادل با ۴/۰۲، الگو دو، معادل ۴/۱۶ و الگو سه، برابر ۴/۳۸ واحد فعالیت آنزیمی بر ساعت محاسبه شد.

بحث و نتیجه‌گیری

مخمر *Y. lipolytica* یک مخمر هوازی غیربیماری‌زاست که قادر به متابولیزه کردن تری‌گلیسریدها و اسیدهای چرب به عنوان منبع کربن است (۱۷ و ۱۸). منبع کربن موجود در محیط کشت می‌تواند باعث تحریک تولید لیپاز شود و یا تولید آن را مهار کند. برخی از چربی‌ها یا روغن‌ها به عنوان القا کننده تولید لیپاز در مخمر *Y. lipolytica* استفاده شدند (۱۹ و ۲۰). محیط‌های رشد حاوی مواد چربی مثل روغن زیتون، اسید اولئیک و مشتقات آن‌ها باعث القا تولید لیپاز می‌شوند. روغن زیتون غنی از اسید اولئیک است که باعث تنظیم مثبت بیان ژن مسؤوول تولید لیپاز می‌شود (۲۱ و ۲۲).

یکی از عوامل افزایش بهره‌وری بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط محیطی است. بهینه‌سازی غلظت هر ترکیب به کار رفته در محیط کشت معمولاً یک روش وقت‌گیر است، ولی بهینه‌سازی متغیرهای کلیدی از جمله منابع کربن لیپیدی در فرآیند تولید لیپاز یک روش منطقی است، زیرا منبع کربن از مهم‌ترین عامل مؤثر بر بیان و تولید لیپاز است (۱۱ و ۱۲).

کشت به روش خوراک‌دهی نیمه پیوسته به علت

References

- (1) Vakhlu J., Kour A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology* 2006; 9 (1): 69- 85.
- (2) Bora L., Gohain D., Das R. Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2013; 88 (11): 1959- 70.
- (3) Houde A., Kademi A., Leblanc D. Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2004; 118 (1-3): 155- 70.
- (4) Griebeler N., Polloni A., Remonato D., Arbter F., Vardanega R., Cechet J., et al. Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. *Food and Bioprocess Technology* 2011; 4 (4):578- 86.
- (5) Singh A., Mukhopadhyay M. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2012; 166 (2): 486- 520.
- (6) Casaregola S., Neueglise C., Lepingle A., Bon E., Feynerol C., Artiguenave F., et al. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Letters* 2000; 487 (1): 95-100.
- (7) Treichel H., de Oliveira D., Mazutti M., Di Luccio M., Oliveira J. A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology* 2010; 3 (2):182- 96.
- (8) Fickers P., Marty A., Nicaud JM. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 2011; 29 (6): 632- 44.
- (9) Guieysse D., Sandoval G., Faure L., Nicaud J-M., Monsan P., Marty A. New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron: Asymmetry* 2004; 15 (22): 3539- 43.
- (10) Yu MR., Lange S., Richter S., Tan TW., Schmid RD. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein Expression and Purification* 2007; 53 (2): 255- 63.
- (11) Sharma R., Chisti Y., Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 2001; 19 (8): 627- 62.
- (12) Gupta R., Gupta N., Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004; 64 (6): 763- 81.
- (13) Stanbury PF., Whitaker A., Hall SJ., cartographers. Principles of fermentation technology. Burlington: Elsevirescience Ltd; 2003.
- (14) Mirbagheri M., Nahvi I., Emtiazi G., Mafakher L., Darvishi F. Taxonomic characterization and potential biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* isolated from meat and meat products. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2012; 5 (1): 346- 51.
- (15) Mafakher L., Mirbagheri M., Darvishi F., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H., Emtiazi G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnology* 2010; 27 (4): 337- 40.
- (16) Darvishi F., Destain J., Nahvi I., Thonart P., Zarkesh-Esfahani H. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. *New Biotechnology* 2011; 28 (6): 756- 60.
- (17) Fickers P., Benetti PH., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit MS., et al. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research* 2005; 5 (6-7): 527- 43.

- (18) Papanikolaou S., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggelis G. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Electronic Journal of Biotechnology* 2007; 10 (3): 425- 35.
- (19) Guerzoni ME., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F., et al. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 69 (1-2): 79- 89.
- (20) Fickers P., Nicaud JM., Gaillardin C., Destain J., Thonart P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology* 2004; 96 (4):742- 9.
- (21) Dominguez A., Deive FJ., Sanroman MA., Longo MA. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2003; 78 (11):1166-70.
- (22) Darvishi F., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H., Momenbeik F. Effect of Plant Oils upon Lipase and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009; 2009: 1-7.
- (23) Kar T., Delvigne F., Masson M., Destain J., Thonart P. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2008; 35: 1053-9.
- (24) Darvishi F., Hosseini B. Effect of olive oil with different purity grades on *Yarrowia lipolytica* lipase production. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4 (13): 35-42.

¹ - Batch

² - Fed-batch

³ - Continuous

Investigation the effect of olive oil feeding strategies on *Yarrowia lipolytica* lipase production

Farshad Darvishi *

Associate professor of Microbiology, University of Maragheh, Maragheh, Iran, f.darvishi@ymail.com

Barumand Hosseini

M.Sc. of Microbial biotechnology, University of Maragheh, Maragheh, Iran, brommandauthor@yahoo.com

Abstract

Introduction: Lipase of the yeast *Yarrowia lipolytica* used in detergents, cosmetics, pharmaceuticals and food industries. This enzyme production depends on medium composition, especially carbon source. The purpose of this study was to investigate the effect of olive oil different feeding strategies on *Y. lipolytica* lipase production.

Materials and methods: The yeast strains *Y. lipolytica* FDY1390 was cultured in media with different feeding strategies. Three different models were used to fed-batch feeding method. The yeast growth is monitored by direct counting method with neubauer chamber. Lipase activity was measured using titration method.

Results: All three models of fed-batch feeding increased lipase toward the batch culture. Fed3 was the best model of fed-batch feeding, in which the model leads to the production of lipase activity with 526 U/ml after 120 hours and the productivity reached to 4.38 U/ h.

Discussion and conclusion: The results showed that feeding patterns of fed-batch culture increase production rate of lipase production towards batch culture. The best strategy is to add olive oil as the carbon source induction substrate in medium after 48 hours of inoculation.

Key words: Lipase, *Yarrowia lipolytica*, Batch culture, Fed-batch culture, Feeding

* Corresponding author

Received: May 24, 2014 / Accepted: June 25, 2014