

# 两性绵霉菌生物量生产的营养需求和发酵条件的研究

张先恩<sup>1,2</sup> Jones A.<sup>2</sup> Kole M.<sup>2,4</sup>

Leung W. C.<sup>3</sup> Gerson D. F.<sup>2,4</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(<sup>2</sup> Biotechnology Department, Alberta Research Council, Edmonton, Alberta, Canada T6H 5X2)

(<sup>3</sup> University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas USA 72205)

(<sup>4</sup> 现在地址 Connaught Laboratories Ltd., 1755 Steeles Ave. W., Willowdale, Ontario, Canada M2R 3T4)

**摘要** 对两性绵霉菌(*Achlya ambisexualis*)生长所需的大量元素和微量元素进行了调查,在PYG培养基基础上研制出ZJK培养基。两性绵霉菌在ZJK液体培养基中的倍增时间为3.5小时,产生的生物量约5.5g/L,为PYG的3倍,体积生产率为0.073g/(L·h),为PYG的2倍。最适生长温度为29℃。最适pH为6.5, pH8时孢子萌发被完全抑制。采用pH6.5控制的生物量培养,碳素和氮素转化率明显提高,分别为47.1%和64.8%,体积生产率比非pH控制的分批培养提高50%。在20L发酵罐中,生长稳定期的氧提取速率为7.0-8.8mol/(L·h)。采用分批补料发酵法,生物量达到15g/L。

**关键词** 两性绵霉, 生物量, 营养因子, 发酵

绵霉菌属(*Achlya*)是一种水生丝状真菌,其生活史包括孢子、萌发孢子、菌丝体和孢子囊等阶段,是一种研究真核生物细胞分化的模式材料<sup>[1]</sup>。该菌无毒,且能分泌糖基化蛋白<sup>[2,3]</sup>,因此又被作为基因克隆与表达的真核生物系统<sup>[1-3]</sup>,是表达rDNA产物的潜在生产菌种。然而,迄今尚未见到有关该菌生长的营养需求和在发酵罐中培养的报道。由于生物量的大量生产常常是提高微生物产物产率的前提,有必要及早地进行这方面的研究。

人们在研究绵霉菌时大多沿用PYG培养基<sup>[1]</sup>。在摇瓶中,该培养基产生的生物量为1.5-1.8g/L。本研究通过调查绵霉菌的营养因子需求,在PYG的基础上研制出ZJK培养基,同时研究了环境条件对细胞生长的影响,并在发酵罐中对该菌进行了大量培养。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种及其保存

菌种 *Achlya ambisexualis* Raper (阴性菌, E87) 来自加拿大 Windson 大学 D. Thomas 博士。保存培养基为PYG斜面,组份如下(g/L):蛋白胨 1.25;酵母汁 1.25;葡萄糖 3.00;Bacto 琼脂 18.0。蛋白胨、酵母汁和葡萄糖均为 Difco 产品。菌种存放在室温,每月转接。

## 1.2 孢子制备

参照 Cameron 和 Lejohn<sup>[1]</sup>的方法制备孢子,大规模制备孢子时方法略作改进,基本过程如下:将孢子悬浮液接种到 PYG 液体培养基,接种后孢子浓度为 20—30 个/ml,于 29℃,150r/min 在 NBS G25 摇床上培养 48 小时,培养物经 Whatman 41 号滤纸过滤,用无菌 CaCl<sub>2</sub> 溶液(1mmol/L)洗涤菌丝体 3 次,将菌丝体转移到装有 1000ml CaCl<sub>2</sub> 溶液(1mmol/L)的 2L 三角瓶中,23℃,50 r/min 摇床培养,第 4 小时菌丝体开始形成孢子囊并逐渐释放成熟孢子,10 小时后,用 6 层无菌纱布将培养物过滤,滤液含孢子 5—6×10<sup>8</sup> 个/ml,可经离心和重悬浮使孢子悬浮液浓缩到所需要的浓度。此孢子悬浮液作为种子液,可在 4℃ 保存至少 3 个月而无明显失活。

上述所有操作均需在无菌条件下进行。

## 1.3 细胞培养

细胞培养分别在 250ml 摇瓶,2L 发酵罐(NBS, Murigen)和 20L 发酵罐(Chemap A. G. VOI Ketswil, Switzerland)中进行,操作体积分别为 100ml,1.5L 和 16L。培养温度 29±1℃(35℃ 时生长受抑制),摇床转速为 150r/min,发酵罐搅拌速度在 150—350r/min 之间,进气速度 0.5—0.8VVM,视细胞浓度而定,溶解氧维持在氧饱和度 40% 以上。发酵包括 pH 控制和非 pH 控制、分批和分批补料等方式。培养基组份见表 1。

表 1 培养基组份

Table 1 Media composition for the culture of *A. ambisexualis*

组分 Component	培养基 Medium (g/L)			
	PYG	PYGM1	PYGM2	ZJK
葡萄糖 Glucose	3.0	3.0	9.0	9.0
酵母汁 Yeast extract	1.25	1.25	5.0	5.0
蛋白胨 Peptone	1.25	1.25	3.75	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0	0.12	0.15	0.25
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0	0.021	0.05	0.063
CaCl <sub>2</sub>	0	0.021	0.05	0.063
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0	0.006	0.013	0.013
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0	0.013	0.025	0.025
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0	0.010	0.020	0.020
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0	0.002	0.006	0.006

## 1.4 样品分析

生物量计算采用细胞干重法,取一定体积培养物过滤,收集菌丝体,经蒸馏水洗涤 3 次后置于预先称重的塑料盘,80℃ 烘干 24 小时,称得菌干重。生物量单位为 g/L。

葡萄糖测定:酶电极法(YSI Model 27, USA),按说明书操作。

无机元素测定:Argon ICP 分光计法(ARL 34000),委托加拿大阿伯达研究院化学分析室测定。

pH测定与控制:pH电极购自Ingold公司,监控仪为Chemcadet pH测定/控制仪(Cole Parmer)。该控制系统提供pH阈值设定,当样品pH超出阈值范围时,蠕动泵自动向发酵罐泵入碱溶液(NaOH)直至pH回复到控制范围。

溶解氧(DO)测定:极谱型溶解氧电极法,二次仪表为LM-60数字溶氧仪(Marubishi Co. Ltd., Japan)。

碳氮测定:自动热解CHN分析仪法(Model CHN 600, Leco Instruments Ltd, Ontario)。细胞须先经冻干并捣碎成粉末状。委托加拿大Devon煤研究中心测定。

## 2 结果和分析

### 2.1 发酵动力学图谱

实验在2L发酵罐中进行,培养基为PYG。对生物量及各种营养成分进行定时测定并作图(图1)。生物量的增长服从一般的生长动力学,包括迟滞期(孢子萌发),对数生长期和稳定期。在稳定期阶段,葡萄糖、Mg、Ca和P等代谢底物降到限制性水平。因此有必要研究这些营养物质对细胞生长的影响。K、Na和S元素在整个发酵过程无明显变化。

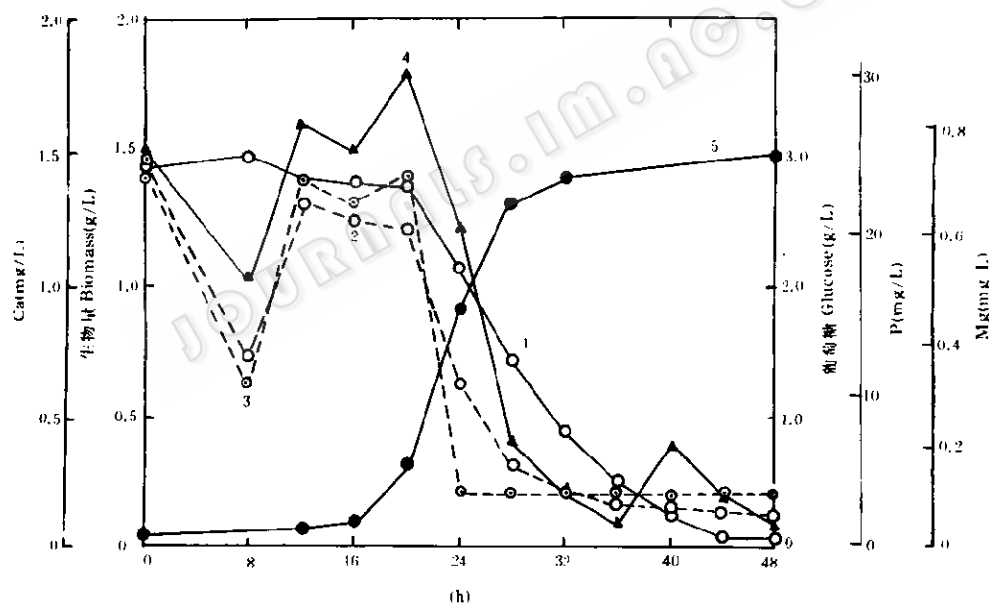


图1 在PYG培养基中的生长动力学图谱

Fig. 1 Growth kinetics and substrate metabolism in a 2L fermentor with PYG medium

1. 葡萄糖 Glucose; 2. P; 3. Mg; 4. Ca; 5. 生物量 Biomass

### 2.2 无机元素对生物量的影响

向PYG培养基中分别补充Ca、Mg和P对生物量有一定影响(图2)。3种化合物最适添加量均为0.1mg/L,生物量约增加0.15~0.6g/L。添加0.1~0.5g/L  $K_2HPO_4$ 未使培养基的pH明显变化。当 $CaCl_2$ 达1.0g/L时,菌生长明显受抑制。在1.0g/L  $MgCl_2$ 中

孢子停止萌发。

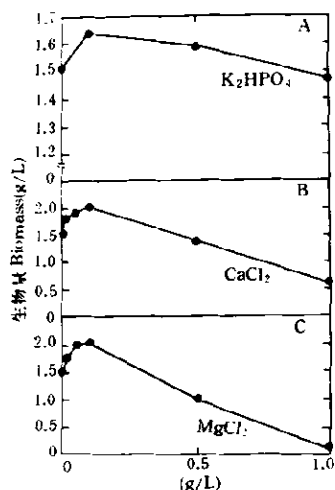


图2 钙镁磷元素添加到PYG中  
对生物量的影响

Fig. 2 Effects of (A) phosphorous (B) calcium and (C) magnesium supplements to PYG medium on cell yield

微量元素贮备液按 Schmidt 等<sup>[9]</sup>的方法制备。向 PYG 培养基中加入微量元素贮备液 0—1.4 ml/L。当添加量为 0.8 ml/L 时所产生的生物量最高(图 3),此时培养基中微量元素水平相当于 3.5 mg Mn/L, 2.5 mg Fe/L, 0.5 mg Cu/L 和 3.2 mg Zn/L (实测值)。在培养末期(第 48 小时),微量元素的残留量为 0.1 mg Mn/L, 0.7 mg Fe/L, 0.1 mg Cu/L 和 0.3 mg Zn/L, 4 种微量元素均被大量消耗。没有进一步对微量元素进行个别实验,因此还难以说明哪些元素在何种浓度下对菌体生长起促进或者抑制作用。

### 2.3 葡萄糖、酵母汁和蛋白胨对生物量的影响

在 PYG 培养基中添加葡萄糖对提高生物量作用甚微(图 4)。在培养末期,葡萄糖仍有相当的残留,这表明其它营养缺乏。改变培养基中酵母汁浓度,生物量随酵母汁的增加而增加。当培养基含酵母汁 5 g/L 和葡萄糖 9 g/L 时,不仅生物量最高,且生物量与葡萄糖残量的比值也最大,说明此培养基有合适的碳氮比。

继续配制两种培养基,分别含葡萄糖 9 g/L 和酵母汁 3.75 g/L,葡萄糖 9 g/L 和酵母汁 5 g/L,然后分别添加蛋白胨 0—5 g/L。由图 5 可见,蛋白胨的添

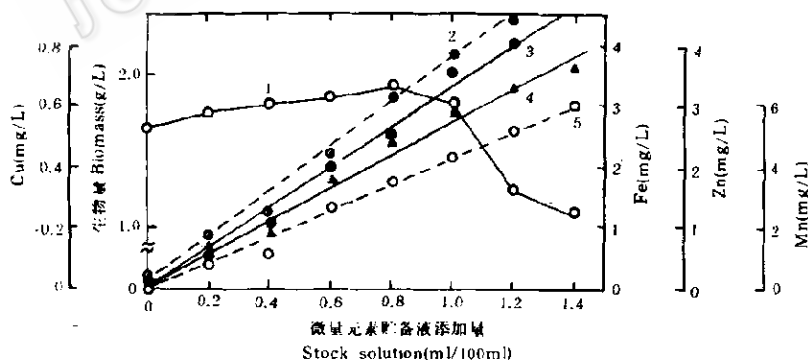


图3 微量元素添加到PYG中对生物量的影响

Fig. 3 Effects of trace elements mixture on cell yield in PYG medium

1. 生物量 Biomass; 2. Zn; 3. Cu; 4. Fe; 5. Mn.

加对生物量的影响不显著,在蛋白胨为 3.75 g/L、酵母汁为 5 g/L 和葡萄糖为 9 g/L 时获得的生物量较高,达 4 g/L,但培养时间为 80 小时以上。

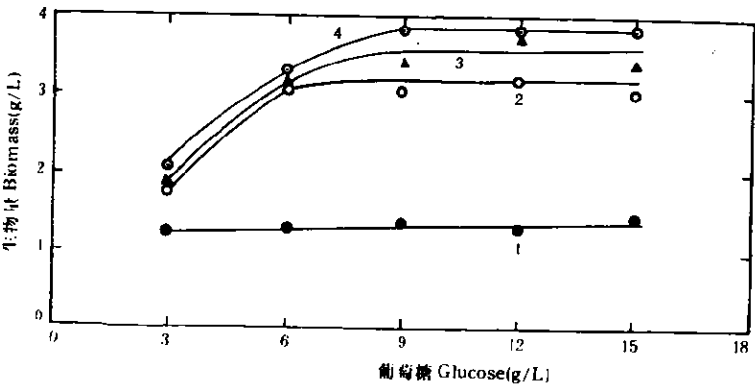


图 1 葡萄糖和酵母汁对生物量的影响

Fig. 4 Effects of glucose and yeast extract on cell yield

酵母汁 YE: 1. 1.25g/L; 2. 2.5g/L; 3. 3.76g/L; 4. 5.0g/L;

2.4 改变培养基组份对发酵动力学的影

根据前面实验调查的结果初步设计了几种培养基,其组份见表 1。将孢子悬浮液等量接种到 4 种培养基中同时培养,定时取样分析,发现各培养物中最高生物量及出现的时间为: PYG 为 1.68g/L (48h); PYGM1 为 2.25g/L (48h); PYGM2 为 5.52g/L (96h); ZJK 为 5.27g/L (72h)。在各培养末期营养物质残留百分比见表 2。

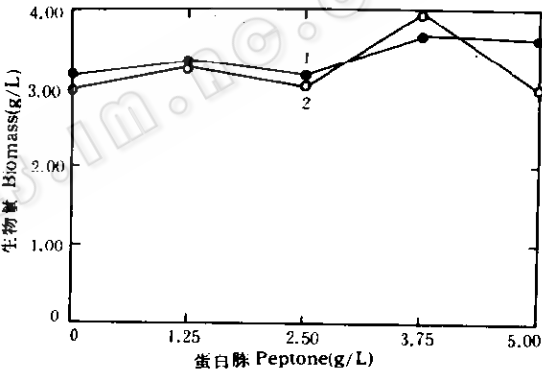


图 5 在葡萄糖/酵母汁培养基中添加蛋白胨对生物量的影响

Fig. 5 Effects of peptone on cell yield in glucose/yeast extract media

1. 葡萄糖 Glucose 9.0g/L+酵母汁 YE 3.75g/L;

2. 葡萄糖 Glucose 9.0g/L+酵母汁 YE 5.00g/L;

表 2 培养末期各培养基组份残留情况

Table 2 Residue of components in the media at the end of culture

培养基 Medium	残留量(原水平%) Residue (% of original level)						葡萄糖 Glucose
	Mg	P	Mn	Fe	Cu	Zn	
PYG	-	16.5	-	-	-	-	2.4
PYGM1	-	6.5	36.4	1.6	-	-	1.7
PYGM2	-	13.7	-	-	-	-	2.0
ZJK	3.33	51.7	14.3	-	-	30.0	1.3

注: - 表示 1mg/L 以下

从表 2 和表 3 结果分析: (1) PYGM1 比 PYG 的生物量增加了 20%, 而培养时间仍为 48 小时, 加入的各元素大多被消耗, 说明添加的元素是必要的; (2) PYGM2 的营养最充足, 生物量也最高, 各元素残留最少, 但发酵周期过长; (3) ZJK 的生物量仅次于 PYGM2, 葡萄糖利用彻底, 但 Mg、P、Mn 和 Zn 几种元素残留较多, 原料有些浪费, 若能补充有机营养, 可望进一步提高生物量, 因此有利于分批补料培养。进而比较有关生长参数(表 3)。4 种培养基都属复合培养基, 投入的碳、氮源为混和有机物。按常规法计算得率比较困难, 因此将生物量得率( $Y_{x/s}$ )定义为每克有机营养投料所产生的生物量克数, 其大小顺序为 PYGM1 > ZJK > PYGM2 > PYG。再比较生物量的体积生产率( $g \text{ 细胞} / (L \cdot h)$ ), 顺序却为 ZJK > PYGM2 > PYGM1 > PYG。ZJK 所产生的生物量为 PYG 的 3 倍, 体积生产率是 PYG 的 2 倍, 可见 ZJK 为绵霉菌生长的良好培养基。

表 3 *A. ambisexualis* 在各培养基中的生长参数的比较

Table 3 Comparison of growth parameters in different media

培养基 Medium	总有机营养 Total organic nutrients (g/L)	生物量 Biomass (g/L)	生物量得率 <sup>a</sup> $Y_{x/s}$ (g/g)	培养时间 Cultivation time (h)	体积生产率 Productivity (g/(L · h))
PYG	5.5	1.68	0.31	48	0.035
PYGM1	7.5	2.35	0.41	52	0.045
PYGM2	17.7	5.52	0.32	96	0.056
ZJK	14.9	3.27	0.38	72	0.073

<sup>a</sup> 每克有机营养投料获得的生物量克数 Yield of biomass on organic nutrients

## 2.5 pH 控制的分批培养

实验在 20L 发酵罐中进行, 培养基为 ZJK, pH 控制值分别为 5.0、6.0、6.5、7.0 和 8.0 (精度为 0.1), 结果见图 6。在 pH6.5 处观察到最大比生长速率 (0.21/h), 最短的发酵周期 (<50 小时) 和最高的生物量 (5.7 g/L), 比非 pH 控制的生物量高出 8—9%。在 pH6 和 pH7 也最终能达到近似的生物量, 但培养时间至少多出 10 小时。在 pH5.0 处达到最大生物量至少需要 70 小时。由此可以推断, 非 pH 控制的培养周期需 72 小时, 显然与培养过程中 pH 降至 5 以下造成对生长的酸抑制有关。实验还发现, 在 pH8 时孢子几乎不萌发。

发酵动力学图谱(略)表明, 在 pH6.5 处葡萄糖利用速度最快,  $NH_4^+$  在醪液中的积累最少。对培养基中有机质和发酵产生的细胞经冻干处理后进行 C、N 分析, 有机投料的碳和氮含量分别为 (%): 葡萄糖 40 和 0; 酵母汁 40.6 和 10.9; 蛋白脲 46.0 和 15.8。对冻干细胞的分析结果见表 4。在 pH6.5 条件下, 碳和氮的转化率均高出非 pH 控制的水平。N 的摄入量高可解释为合适的 pH 有利于细胞蛋白的合成, pH 下降时常伴随醪液中  $NH_4^+$  积累上升, 意味着部分细胞裂解并发生蛋白质分解脱氨, 可见 pH 变化导致了代谢漂移 (Metabolism shift)。

表 4 在各种培养条件下的碳素和氮素转换

Table 4 Comparison of carbon/nitrogen conversions under various growth conditions

样品 Sample	生物量 Biomass (g/L)	碳氮含量 Content of (%)		碳氮转换率* Conversion of (%)	
		C	N	C	N
ZJK-pH6.5	5.7	46.5	6.2	47.1	64.8
ZJK-no pH control	5.1	42.0	5.2	44.0	52.3
PYG-no pH control	1.74	44.9	1.9	34.2	24.5

\* 碳氮转换率(%)=细胞中总碳(氮)/培养基中总碳(氮)投料×100  
Conversion of C and N (%) =  $\frac{\text{Total C (or N) in cells}}{\text{Total C (or N) supplied in medium}} \times 100$

2.6 氧摄取速率(OUR)

采用动态充气法(Dynamic gassing out)<sup>[10]</sup>测定pH控制发酵中对数生长期、晚期和稳定期的OUR,结果见表5。通过调节搅拌速度和进气量使溶解氧饱和度在40%以上。OUR随生物量增加而增大,稳定期时达到8.8mmol/(L·h),该结果可作为分批培养过程放大的依据。在对数生长期,比氧摄取速率( $q_{O_2}$ )保持在1.8~1.9mmol/(g·h),而在稳定期降到1.6mmol/(g·h),且溶解氧回升了5%,说明稳定期细胞呼吸已不如对数生长期旺盛。

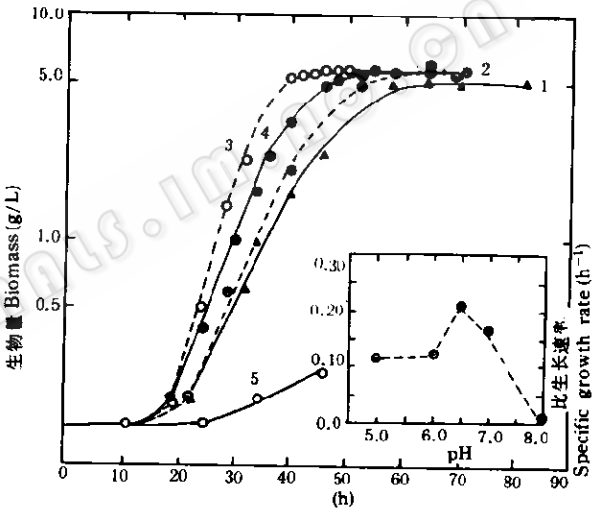


图6 pH对*A. ambisexualis*生长的影响  
Fig. 6 Effect of pH on the growth of *A. ambisexualis* on ZJK medium  
1. pH5.0; 2. pH6.0; 3. pH6.5; 4. pH7.0; 5. pH8.0

表 5 *A. ambisexualis* 在 pH6.5 控制条件培养下的氧摄取速率(OUR)

Table 5 Oxygen uptake rate (OUR) during growth of *A. ambisexualis* at pH 6.5

时间 Time (h)	搅拌速度 Agitation (r/min)	进气速度 Aeration (vvm)	溶解氧饱和度 DO (%) of Saturation	生物量 Biomass (g/L)	氧摄取速率 OUR (mmol/(L·h))	比氧摄取速率 $q_{O_2}$ (mmol/(g·h))
74	350	0.5	40	0.5	0.9	1.9
11	350	0.8	40	5.1	7.0	1.8
8	350	0.8	45	7.5	8.8	1.6

## 2.7 分批补料培养

ZJK 培养物中无机营养的过剩有利于分批补料培养。已知在培养末期发酵液中缺 C、N 源和 Fe、Cu(表 2),配制的补料液含葡萄糖 237g/L 酵母汁 126g/L 和适量  $\text{CuSO}_4$ 。Fe 的不足由酵母汁中的 Fe 份补充。发酵在 20L 罐中操作, pH 控制在  $6.5 \pm 0.1$ 。根据该菌在 ZJK 培养基中的倍增时间为 3.5 小时,进入对数生长期后开始补料,补料速率为 200ml/4h,结果见图 7。生物量的线性增长期大约延长了 20 小时,其中包括对数生长期大约延长了 8 小时。在培养末期(第 89 小时),葡萄糖残留 3.87g/L,  $\text{NH}_4^+$  的积累与葡萄糖同步,显然与补料有关,最终保持在低水平( $0.6 \times 10^{-3} \text{mmol/L}$ )。Cu、Fe 和 Zn 的剩余量都低于 0.7mg/L,生物量达 15g/L,补料共 1.4L,培养物总体积达 17L。将补入物质与原培养基物质加起来,平均每升投入有机营养物质共 43.9g,因此,生物量得率为 0.34g/g,体积生产率为 0.169g/(L·h),等于非补料分批培养的 2.3 倍。

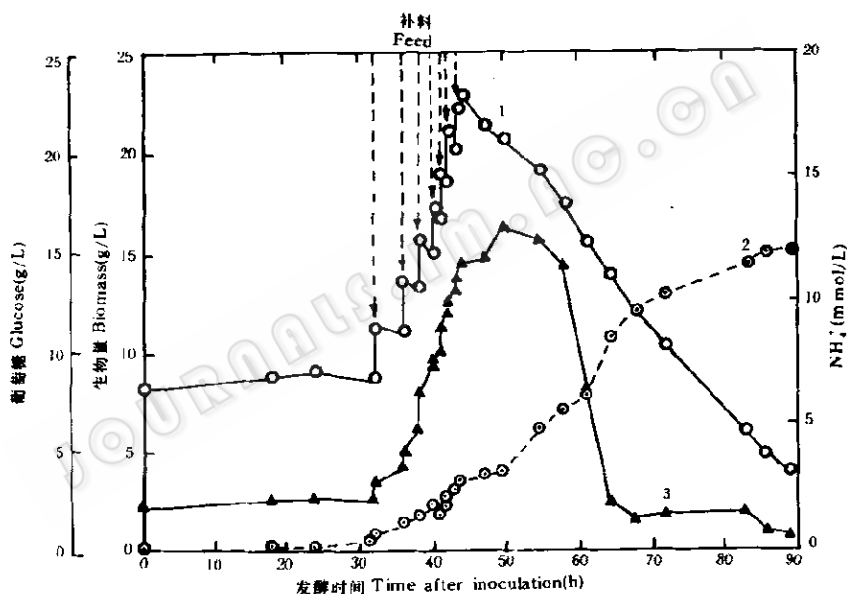


图 7 *A. ambisolaris* 在 ZJK 培养基及 pH 控制下的分批补料培养

Fig. 7 Fed-batch culture of *A. ambisolaris* on ZJK medium with pH control at pH  $6.5 \pm 0.1$

1. 葡萄糖 Glucose; 2. 生物量 Biomass; 3.  $\text{NH}_4^+$

## 3 讨论

通过调查绵霉菌生长所需的营养因子和研究其发酵动力学图谱,认识到 PYG 是一种缺乏微量元素的培养基,仅添加适量的无机元素(PYGM1)就能使生物量提高 20%。

已测知葡萄糖、酵母汁和蛋白胨的 C/N 含量,可计算出 4 种培养基的 C/N 比:PYG 为 6.84:1;PYGM1 为 6.84:1;PYGM2 为 6.31:1;ZJK 为 10.33:1。在发酵过程中, C 素参与物质代谢和能量代谢,从表 4 计算出,在最适生长条件下,细胞构成物中的 C/N 值为 7.42:1,此外相当一部分碳源要转化为维持能,可见除 ZJK 以外其他 3 种培养基的



C/N 值偏低,即碳源不足而 N 源相对过剩。

ZJK 培养基采用酵母汁而未采用蛋白胨作为主要 N 源,有 3 个主要原因:(1)酵母汁富含氨基酸,不仅提供了易同化的碳源和氮源,还是 Ca、Mg、P 和其他微量元素以及维生素等生长辅助因子的来源<sup>[11]</sup>,而蛋白胨不具有这些特点;(2)向培养基中添加蛋白胨未能使生物量明显增加,说明蛋白胨对缙霉菌是一种“慢底物”,(3)如果将来的发酵产物是 rDNA 蛋白,则采用无蛋白胨培养基有利于产品的分离纯化。

实验结果表明,缙霉菌对 pH 比较敏感,在 pH6.5 时只要变动  $\pm 0.5$ ,就可使比生长速率大幅度下降(图 6),因此可以认为,培养过程中菌体代谢产酸是导致发酵周期过长的主要原因。相对非 pH 控制的发酵而言,不仅生物量的体积生产率提高了 50%,碳和氮素的转化率也明显增加,说明 pH 变化能导致不利于底物同化的代谢漂移。

分批补料培养的初步尝试使生物量达到 15g/L,体积生产率增长一倍多,若结合采用  $\text{NH}_4^+$  控制<sup>[12]</sup>、溶氧控制<sup>[13]</sup>和葡萄糖控制<sup>[14]</sup>的补料技术,生物量可望进一步提高。今后的工作将根据缙霉菌的产物(如 rDNA 蛋白)的特性,对培养基及培养条件作进一步修正。

**致谢** 本研究工作承蒙 Bob Silliphant 先生和加拿大 Alberta 研究院生物工程中试基地职员的支持与协助,特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Kropf D L *et al.* *Science*, 1983, **200**:1385—1387.
- [2] Thomas D S *et al.* *Nature*, 1974, **249**:140—142.
- [3] Sengupta E *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1981, **674**:105—117.
- [4] Manavathu E K *et al.* *J Gen Microbiol*, 1988, **134**:2019—2029.
- [5] Manavathu E K *et al.* *Gene*, 1987, **57**:53—59.
- [6] Leung W C, Ed Chang S T *et al.* *Recent Advances in Biotechnology and Applied Biology*. Hong Kong: Chinese Univ Press, 1989. 143—154.
- [7] Griffin D H. *Plant Physiol*, 1966, **41**:1254—1256.
- [8] Cameron I. E *et al.* *J Biological Chemistry*, 1972, **247**:4729—4739.
- [9] Schmidt W J *et al.* *Analytica Chimica Acta*, 1984, **163**:101—109.
- [10] Atkinson B *et al.* *Biochemical and Biotechnology Handbook*. New York: The Nature Press, 1983. 727—801.
- [11] Scott R E *et al.* *Canadian J Microbiol*, 1986, **32**:259—267.
- [12] Gerson D F *et al.* Ed Russell G E. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. London: Intercept, 1988. 67—149.
- [13] Kole M M *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **28**:404—408.
- [14] 张先恩. 生物工程进展, 1990, **10**(2):31—34.

## MEDIUM DEVELOPMENT AND BATCH FERMENTATION FOR MASS CULTURE OF *ACHLYA AMBISEXUALIS*\*

Zhang Xianen<sup>1,2</sup> Jones A<sup>2</sup> Kole M<sup>2,1</sup>

Leung W. C.<sup>3</sup> Gerson D. F<sup>2,1</sup>

(<sup>1</sup> Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

(<sup>2</sup> Biotechnology Department, Alberta Research Council, Edmonton, Alberta, Canada, T6H 5X2)

(<sup>3</sup> University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, USA 72205)

(<sup>4</sup> Connaught Laboratories Ltd, 1755 Steeles Ave. W, Willowdale, Ontario, Canada M2R 3T4)

**Abstract** The medium condition for growth and sporulation of *Achlya ambisexualis* were studied in submerged fermentation. Optima were determined for both macro and micro nutrients. These have been incorporated into the ZJK medium, containing glucose, yeast extract and trace nutrients. In simple batch cultivations, ZJK medium yields approximately 5.3 g/L cell dry weight. Batch fermentation conditions were optimal when pH was controlled at  $6.5 \pm 0.1$  and resulted in final biomass of approximately 5.5 g/L cell dry weight. In condition of pH controlled at 6.5, the volumetric productivity was 50% higher than that of fermentation without pH control. Oxygen uptake rate (OUR) was 7.0–8.8 mmol/(L · h) at stationary growth stage. Fedbatch fermentation providing supplementation of glucose, yeast extract and CuSO<sub>4</sub> resulted in final biomass of approximately 15 g/L cell dry weight.

**Key words** *Achlya ambisexualis*, Biomass, Nutritional factors, Fermentation

\* The authors thank Bob Silliphant and staff members of the Pilot Plant of Biotechnology Department, Alberta Research Council for their kind assistance to the research.