(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113604362 B
(45)授权公告日 2022.10.14

(21)申请号 202110253909.8

(22)申请日 2021.03.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113604362 A

(43)申请公布日 2021.11.05

(73)专利权人 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街12号
专利权人 桐城市畜牧兽医管理中心
中牧实业股份有限公司
北京至微生物科技有限公司

(72)发明人 张桂山 苗少华 王华付 易可可 胡四化 龚旗 孙颖娇

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
专利代理师 陈征

(51)Int.Cl.
C12N 1/14(2006.01)
C12N 3/00(2006.01)
C12R 1/645(2006.01)

(56)对比文件
CN 112094782 A,2020.12.18
CN 103290058 A,2013.09.11
CN 106802356 A,2017.06.06
CN 107841514 A,2018.03.27
CN 103651913 A,2014.03.26
Huili Wang et al..Effects of Piriformospora indica on the growth, fruit quality and interaction with Tomato yellow leaf curl virus in tomato cultivars susceptible and resistant to TYCLV.《Plant Growth Regul》.2015,全文.

审查员 赵鹏

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种提高印度梨形孢产孢的方法

(57)摘要

本发明涉及一种提高印度梨形孢产孢的方法。印度梨形孢的培养方法，采用的发酵培养基由土豆粉、葡萄糖和水组成或制成，所述发酵培养基中土豆粉的含量为10-20g/L、葡萄糖的含量为10-20g/L。本发明将印度梨形孢在由土豆粉、葡萄糖和水组成的发酵培养基中进行培养，可以缩短培养周期，提高孢子产量，极大降低该生产成本，有利于工业化生产。



CN 113604362 B

1.发酵培养基在发酵培养印度梨形孢(*Piriformospora indica*)中的应用;所述发酵培养基为液体培养基,所述发酵培养基由土豆粉、葡萄糖和水组成,所述发酵培养基中土豆粉的含量为10-20g/L、葡萄糖的含量为10-20g/L。

2.根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述发酵培养基中土豆粉的含量为20g/L、葡萄糖的含量为20g/L。

3.根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述发酵培养基的pH为7-7.5。

4.根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述发酵培养基的pH为7。

5.一种印度梨形孢(*Piriformospora indica*)的培养方法,其特征在于,包括采用权利要求1-4任一项中所述的培养基对印度梨形孢(*Piriformospora indica*)进行发酵培养。

6.一种印度梨形孢(*Piriformospora indica*)的培养方法,其特征在于,包括将印度梨形孢种子液进行匀浆;然后将匀浆后的印度梨形孢种子液进行接种发酵;发酵所用培养基与权利要求1-4任一项中所述的培养基相同。

7.根据权利要求5或6所述的培养方法,其特征在于,发酵培养时匀浆后的印度梨形孢种子液的接种量为1-3%。

8.根据权利要求7所述的培养方法,其特征在于,发酵培养时匀浆后的印度梨形孢种子液的接种量为2%。

9.根据权利要求5、6、8任一项所述的培养方法,其特征在于,所述发酵培养的条件为:摇瓶发酵条件转速180-220rpm,温度25-28℃,发酵时间6-9d。

10.根据权利要求9所述的培养方法,其特征在于,所述发酵培养的条件为:转速200rpm,温度28℃,发酵时间6d。

一种提高印度梨形孢产孢的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种提高印度梨形孢产孢的方法。

背景技术

[0002] 印度梨形孢(Piriformospora indica)是一种能定殖于植物根际且对植物生长发育有益作用的一类真菌。现已报道该菌对12科24种宿主植物具有促进生长的作用,可与200种植物发生共生作用,其中包括农业、园艺业、重要经济作物和药用植物。已知印度梨形孢作用于玉米能够提高玉米抗旱能力,增加玉米产量;印度梨形孢与小白菜共培养时能明显提高小白菜的生物量,促进了小白菜主根的生长、侧根数量增加和长度的加长、根毛等多等;印度梨形孢与烟草共培养时能明显增加烟草叶片中蛋白质含量,烟草的总生物量也有所增加;印度梨形孢与油菜共培养时增加了油菜植株的叶片数量、叶柄长度、叶面积大小、地上和地下部分鲜重,并能促进油菜提前抽薹和开花,增加油菜子的产量;印度梨形孢与水稻共培养时能促进水稻地上部分的生长、提前抽穗,增加了水稻分蘖数,提高水稻叶片水稻的产量等。

[0003] 印度梨形孢能对多种植物发挥有益作用,但该菌发酵周期长,培养成本高是制约该菌投入农业生产的限制条件。传统印度梨形孢的培养通常采用的是Kafer培养基,一般适合于实验室小型试验阶段。由于生长速度较慢,现有方法不能满足生产上大批量定期定量对印度梨形孢生物菌肥的需求。因此需要通过有效手段来促进印度梨形孢的液体培养产量,同时提高代谢物的作用。刘慧春报道了印度梨形孢液体发酵产物的制备及其在日本青葱上的应用。该研究通过采用不同的培养基配方,并在印度梨形孢特定的发酵阶段加入不同来源的冷激蛋白和不同外源物,研究不同培养基配方和培养方法对提高印度梨形孢发酵产物的效果。发酵培养基为PDA平板培养基(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂15～20g,用水定容至1000mL,自然pH在121℃下灭菌20min。)液体种子培养基(葡萄糖5～20g,酵母粉4g,蛋白胨3g,KH_2PO_4 1g,$MgSO_4$ 0.5g,定容至1000mL,自然pH,在121℃下灭菌20min。)液体发酵培养基(葡萄糖15g,玉米粉4g,牛肉浸膏3g,KH_2PO_4 1.0g,$MgSO_4$ 0.55g,定容至1000mL,自然pH,在121℃下灭菌20min。)发酵培养:液体种子液的获取(取1～3cm2大小活化后的印度梨形孢菌种接种于1L液体种子培养基中,在22～24℃培养1～9d)液体发酵培养(印度梨形孢液体种子液按占液体发酵培养基体积3%～12%的量接种于添加有外源物固体发酵培养物的液体发酵培养基中,在18～28℃下培养1～5d后加入不同来源的冷激蛋白,然后调整温度在15～25℃继续培养1、5和12d,终止发酵后,得到印度梨形孢发酵产物。液体发酵培养基中外源物固体发酵培养物的添加量为0.8～9.0g/L,液体发酵培养基中冷激蛋白的添加量为0.2～5.0mg/mL)。但以上方法发酵培养需要提取冷激蛋白操作繁琐,发酵用于接种的液体种子液相对较对多,培养基成分复杂、发酵周期长不适合大规模发酵生产。

发明内容

[0004] 本发明提供一种提高印度梨形孢产孢的方法,可以缩短培养周期,提高孢子产量。

[0005] 本发明首先提供一种发酵培养基，其为液体培养基，所述发酵培养基由土豆粉、葡萄糖和水组成或制成，或者所述发酵培养基基本上由土豆粉、葡萄糖和水组成或制成；所述发酵培养基中土豆粉的含量为10-20g/L、葡萄糖的含量为10-20g/L。

[0006] 根据本发明实施例，所述发酵培养基中土豆粉的含量为10g/L、葡萄糖的含量为10g/L。

[0007] 根据本发明实施例，所述发酵培养基中土豆粉的含量为10g/L、葡萄糖的含量为20g/L。

[0008] 根据本发明实施例，所述发酵培养基中土豆粉的含量为20g/L、葡萄糖的含量为10g/L。

[0009] 根据本发明实施例，所述发酵培养基中土豆粉的含量为20g/L、葡萄糖的含量为20g/L。

[0010] 根据本发明实施例，所述发酵培养基的7-7.5，优选pH为7。

[0011] 若无特殊指明，本发明所述pH均指培养基灭菌前的pH。

[0012] 可采用本领域常规方法对所述发酵培养基的pH进行调整。

[0013] 根据本发明实施例，所述发酵培养基的原料除土豆粉、葡萄糖、水，以及必要的pH调节剂(例如本领域常用的酸、碱或盐)外，不含有其他原料。

[0014] 根据本发明实施例，调整所述发酵培养基的pH调节剂不包括本领域常用的无机盐。

[0015] 根据本发明实施例，所述发酵培养基的原料不包括冷激蛋白，且所述发酵培养基中也不含有冷激蛋白。

[0016] 根据本发明实施例，所述发酵培养基的原料不包括本领域常用的无机盐。

[0017] 本发明意外地发现，以上述发酵培养基对印度梨形孢(Piriformospora indica)进行发酵培养，可以缩短培养周期，提高孢子产量。与传统的发酵培养基、发酵方法相比，主要营养成份减少，不用添加微量元素或无机盐，且接种量少，培养周期短，使印度梨形孢培养成本极大降低。

[0018] 基于上述研究，本发明还提供一种培养基，其为固体培养基，其由土豆粉和葡萄糖组成，其中土豆粉和葡萄糖的重量比为(1:2)-(2:1)，优选为1:1。在一些实施例中，该培养基可以直接由土豆粉和葡萄糖按比例配置而成。在使用时，加入适量水可配置成上述发酵培养基，用于对印度梨形孢(Piriformospora indica)进行发酵培养。在一些实施例中，可将上述发酵培养基脱水制成培养基，使用时再复水。

[0019] 本发明还提供上述发酵培养基或上述发酵培养基在发酵培养印度梨形孢(Piriformospora indica)中的应用。

[0020] 本发明还提供一种印度梨形孢(Piriformospora indica)的培养方法，包括采用上述发酵培养基对印度梨形孢(Piriformospora indica)进行发酵培养。

[0021] 本发明人还发现，将印度梨形孢种子液进行匀浆后，使得其菌丝分散，种子液能均匀分布培养基中，从而使得真菌生长更快。经这种匀浆处理后，大大缩短了发酵培养的时间，而且还显著地降低了接种量。在一些实施例中，使用经匀浆处理后的印度梨形孢种子液采用本发明上述发酵培养基进行发酵，接种量可降低至1-3%，可选为2%。为此，本发明还提供一种印度梨形孢(Piriformospora indica)的培养方法，包括将印度梨形孢种子液进

行匀浆;然后将匀浆后的印度梨形孢种子液进行接种发酵。发酵所用培养基可为PDB培养基。在一些实施例可为上述发酵培养基。采用上述发酵培养基进行发酵培养,可以进一步缩短产孢时间。

[0022] 在一些实施例中,使用经匀浆处理后的印度梨形孢种子液采用本发明上述发酵培养基进行发酵,在接种量为2%时(摇瓶发酵),培养3d出现少量孢子,培养5d出现大量菌丝并开始产生孢子,6d出现大量孢子并达到稳定。

[0023] 本发明还对发酵培养的条件进行了优化。在一些实施例中,发酵培养的条件为:摇瓶发酵条件转速180-220rpm,温度25-28℃,发酵时间6-9d。可选地,发酵培养的条件为:转速200rpm,温度28℃,发酵时间6d。

[0024] 本发明所述印度梨形孢是已知的,可市售购得。实施例中购自中国农业微生物菌种保藏管理中心,菌种编号ACCC 39199。本发明方法及发酵培养基适用于已知的印度梨形孢。

[0025] 本发明中,可将活化后的印度梨形孢菌种接种于液体种子培养基中培养的时间一般为7-9d,得到印度梨形孢液体种子液。

[0026] 可采用本领域常规方法对印度梨形孢菌种进行活化。例如,将斜面保藏的印度梨形孢菌种接种到PDA培养基上,在22-28℃活化培养4-15d,得到活化后的印度梨形孢菌种。其中,可用本领域常规PDA培养基及液体种子培养基,例如市售购得。

[0027] 在一些实施例中,所用液体种子培养基:葡萄糖20g、酵母粉4g、蛋白胨3g、KH_2PO_4 1g、$MgSO_4$ 0.5g,用水定容至1000mL后分装,在121℃灭菌15min,备用。

[0028] 本发明提供的印度梨形孢(Piriformospora indica)的培养方法,可以缩短培养周期,提高孢子产量,极大降低该生产成本,有利于工业化生产。

附图说明

[0029] 图1为实施例1实验结果。

[0030] 图2为实施例2实验结果。

具体实施方式

[0031] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购买得到的常规产品。

[0032] 以下所用印度梨形孢(Piriformospora indica)菌株,编号为ACCC 39199,购自中国农业微生物菌种保藏中心。

[0033] 以下所用的PDA培养基制备方法如下:马铃薯洗净去皮,取200克切成小块,加水1000ml,煮沸至马铃薯成糊状时,冷却过滤,在滤液中加葡萄糖20g,琼脂20g,补水至1000ml,趁热分装,灭菌,备用。

[0034] 以下所用的PDB培养基:200g马铃薯的浸出液、葡萄糖20g,用水定容至1000mL,调节pH为7,按每瓶200ml分装到500ml到锥形瓶,115℃灭菌20min。

[0035] 以下所用液体种子培养基:葡萄糖20g、酵母粉4g、蛋白胨3g、KH_2PO_4 1g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g,用水定容至1000mL,按每瓶100ml分装到250ml到锥形瓶,115℃灭菌20min。

[0036] 以下所用固体种子培养基:在上述液体种子培养基中加入琼脂20g。

[0037] 取印度梨形孢(Piriformospora indica)菌株,在PDA培养基上培养成熟,在光学显微镜下观察印度梨形孢的菌丝是白色接近透明状,菌丝随机缠绕在一起,局部会形成小节,分支无规律。印度梨形孢菌丝壁虽然比较薄,但具有多层结构,其表面局部会形成凸状物,能够被苯胺兰染色。印度梨形孢在液体Kafer培养基中生长良好,生长温度在25-35℃之间,菌体从小到大类似海胆放射状生长,在培养第10天时菌体长到最大。在PDA培养基上生长菌丝致密,菌丝在培养基表面的附着力强。

[0038] 实施例1印度梨形孢发酵培养基的优化(土豆粉与葡萄糖配比的筛选)

[0039] 实验材料:印度梨形孢菌株、血球计数板、离心机、打孔器、纱布、摇床、漩涡震荡仪、烘箱、超声仪、1mol/L的NaOH标准液、1mol/L的HCl标准液、PDA培养基、PDB培养基、液体种子培养基。

[0040] 1%土豆全粉的培养基:称取10g土豆全粉,用水定容至1000ml,调节pH为7。

[0041] 1%土豆全粉+1%葡萄糖的培养基:称取10g土豆全粉,10g葡萄糖,用水定容至1000ml,调节pH为7。

[0042] 1%土豆全粉+2%葡萄糖的培养基:称取10g土豆全粉,20g葡萄糖,用水定容至1000ml,调节pH为7。

[0043] 2%土豆全粉+1%葡萄糖的培养基:称取20g土豆全粉,10g葡萄糖,用水定容至1000ml,调节pH为7。

[0044] 2%土豆全粉+2%葡萄糖的培养基:称取20g土豆全粉,20g葡萄糖,用水定容至1000ml,调节pH为7。

[0045] 印度梨形孢(Piriformospora indica)的活化及种子液的获取:将印度梨形孢(Piriformospora indica)ACCC 39199活化到PDA培养基上,28℃,黑暗条件下培养,培养15天用打孔器取5mm的菌饼放液体种子培养基,黑暗28℃,转速200rpm条件下培养7天,得到种子液;可保藏于4℃恒温冰箱中,备用。

[0046] 优化指标:

[0047] 测量孢子:加入1mL吐温到100mL的培养液,涡流,在搅拌器中研磨,超声5分钟,以使孢子和菌丝分离。分离后,用血球计数板计数孢子。

[0048] 测定菌丝产量:发酵培养后,将各锥形瓶中的混和物在5500rpm条件下离心,收集上层滤液,于4℃冰箱储存备用:收集印度梨形孢菌丝体测其鲜重,并于60℃烘箱中烘干,测量各组菌丝体的干重。

[0049] 配制上述五种不同浓度的土豆全粉与葡萄糖的比例的培养基和液体种子培养基,配制完成后,按每瓶100ml分装到250ml到锥形瓶,115℃灭菌20min,备用。

[0050] 接种:将印度梨形孢种子液按照2%接种量接种到不同培养基中,黑暗28℃,转速200rpm条件下发酵培养。发酵培养条件:转速200rpm,温度28℃。发酵24h后开始记录印度梨形孢的产孢及菌丝量情况,每24h进行一次检测。

[0051] 实验结果见下表1和图1。

[0052] 图1中,A为PDB培养基、B为2%土豆全粉+2%葡萄糖的培养基中接种印度梨形孢培养3天的结果。

[0053] 表1

[0054]

培养基	最大菌丝量（g/L）第 9d	检测到孢子时间	最大产孢量（个/ml）
1%土豆全粉	7.86 ± 0.34	第 3d	6.6×10^4（第 5d）
1%土豆全粉+1%葡萄糖	10.56 ± 0.61	第 4d	4.83×10^6（第 6d）

[0055]

1%土豆全粉+2%葡萄糖	9.45 ± 0.42	第 5d	8.26×10^5（第 6d）
2%土豆全粉+1%葡萄糖	10.36 ± 0.51	第 4d	8.15×10^6（第 6d）
2%土豆全粉+2%葡萄糖	12.23 ± 0.46	第 4d	2.36×10^7（第 6d）
液体种子培养基	7.46 ± 0.23	第 7d	4.56×10^5（第 9d）

[0056] 结果表明，采用“2％土豆全粉+2％葡萄糖的培养基”菌丝量及产孢量最高。与传统的发酵培养基配方相比，主要营养成份减少，不用添加微量元素，接种量少，培养周期短，使印度梨形孢培养成本极大降低。

[0057] 实施例2印度梨形孢发酵培养条件的优化

[0058] 实验材料：规格50ml的匀浆器、摇床、500ml的锥形瓶、PDA培养基、PDB培养基、液体种子培养基。

[0059] 印度梨形孢(Piriformospora indica)的活化及种子液的获取：将(Piriformospora indica)ACCC 39199活化到PDA培养基上，28℃，黑暗条件下培养，培养15天用打孔器取5mm的菌饼放液体种子培养基，黑暗28℃，转速200rpm条件下培养7天，得到种子液；可保藏于4℃恒温冰箱中，备用。

[0060] 优化指标：

[0061] 测量孢子：加入1mL吐温到100mL的培养液，涡流，在搅拌器中研磨，超声5分钟，以使孢子和菌丝分离。分离后，用血球计数板计数孢子。

[0062] 测定菌丝产量:发酵培养后,将各锥形瓶中的混和物在5500rpm条件下离心,收集上层滤液,于4℃冰箱储存备用:收集印度梨形孢菌丝体测其鲜重,并于60℃烘箱中烘干,测量各组菌丝体的干重。

[0063] 配制PDB培养基,配制完成后,按每瓶100ml分装到250ml到锥形瓶,115℃灭菌20min,备用。

[0064] 接种:取30ml印度梨形孢种子液放进匀浆器中匀浆,匀浆至种子液成均匀的液体,按照2%的接种量进行接种至PDB培养基。另取未经匀浆处理的种子液按2%接种量接种至PDB培养基,作为对照组。发酵培养条件:转速200rpm,温度28℃。发酵24h后开始记录印度梨形孢的产孢及菌丝量情况,每12h进行一次检测。

[0065] 实验结果见下表2和图2。

[0066] 图2中,C为未经匀浆处理的种子液、D为经匀浆处理的种子液培养7天的结果。

[0067] 表2

[0068]

接种方式	最大菌丝量（g/L）	检测到孢子时间（d/天）	最大产孢量（个/ml）
匀浆处理的种子液	13.46 ± 0.39（第 6d）	3 天	6.6×10^{7}（第 6d）
未经处理种子液	11.56 ± 0.61（第 9d）	6 天	4.83×10^{6}（第 9d）

[0069] 结果表明,采用经匀浆处理的种子液与未经匀浆处理的种子液相比,菌丝量及产孢量显著提高,并且产孢子的时间明显缩短。匀浆处理后能使菌丝和孢子充分分散到液体培养基中,使真菌快速增殖,从而更快的促进印度梨形孢的成熟。与常规方法相比,可以显著地降低接种量,极大缩短产孢时间,从而极大节约时间成本,有利于工业化发酵。

[0070] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。



图1



图2