



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102199552 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201110112491. 5

CN 101857843 A, 2010. 10. 13,

(22) 申请日 2011. 05. 02

审查员 王宽

(73) 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

(72) 发明人 余挺 郑晓冬 杨林 卢黄娉
蓝天演

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

代理人 金祺

(51) Int. Cl.

C12N 1/16(2006. 01)

C12R 1/645(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101914459 A, 2010. 12. 15,

US 5763163 , 1998. 06. 09,

CN 1733897 A, 2006. 02. 15,

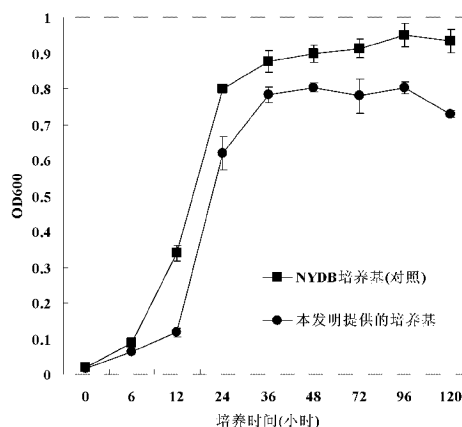
权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 1 页

(54) 发明名称

罗伦隐球酵母专用培养基及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种罗伦隐球酵母专用培养基, 每 1L 专用培养基中含有葡萄糖 10~20g、硫酸铵 3~6g、磷酸氢二钾 1. 5~3g、硫酸镁 1~6g、硫酸亚铁 0~0. 02g、硫酸锰 0~0. 01g、硫酸锌 0~0. 02g、氯化钙 0~0. 5g/L、氯化钠 0~1g、生物素 0. 4~0. 5mg、L- 天门冬氨酸 0. 2~0. 5mg 和维生素 B₁ 0. 2~1mg, 其余为水, pH 值 3~8。本发明还同时公开了上述罗伦隐球酵母的专用培养基的用途: 将罗伦隐球酵母按照体积比为 0. 2~4% 接种量接入专用培养基后, 在 200rpm、25~28℃ 条件下培养 24~120 小时。



1. 罗伦隐球酵母专用培养基,其特征是:每 1L 专用培养基中含有葡萄糖 10~20 g、硫酸铵 3~6 g、磷酸氢二钾 1.5~3 g、硫酸镁 1~6 g、硫酸亚铁 0~0.02g、硫酸锰 0~0.01 g、硫酸锌 0~0.02 g、氯化钙 0~0.5 g、氯化钠 0~1 g、生物素 0.4~0.5mg、L-天门冬氨酸 0.2~0.5 mg 和维生素 B₁ 0.2~1mg,其余为水, pH 值 3~8;罗伦隐球酵母为保藏号为 CGMCC NO.3590 的罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*) ZJU 10。

2. 根据权利要求 1 所述的罗伦隐球酵母专用培养基,其特征是:每 1L 所述专用培养基中含葡萄糖 10 g,硫酸铵 5 g,磷酸氢二钾 2 g,硫酸镁 3 g,硫酸锌 0.005 g,生物素 0.5 mg, L-天门冬氨酸 0.5 mg 和维生素 B₁1mg,其余为水。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的罗伦隐球酵母专用培养基的用途,其特征是:将所述罗伦隐球酵母按照体积比为 0.2~4% 接种量接入所述专用培养基后,在 200rpm、25~28℃ 条件下培养 24~120 小时。

罗伦隐球酵母专用培养基及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及果实采后生防酵母的发酵培养的技术领域,特别是一种罗伦隐球酵母专用培养基及其用途。

背景技术

[0002] 利用拈抗酵母控制采后果实病害的生物防治技术是当前国内外非常关注的新型采后病害控制方法之一。罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)是国内外较广泛研究的采后生物防治酵母菌株,其拈抗机理涉及营养和空间竞争、与病原菌粘合、分泌 β -1,3-葡聚糖酶、抗氧化胁迫、诱导果实抗性或抗性相关反应、降解病原菌分泌的真菌毒素和降解果实与激发病原菌孢子萌发相关的挥发物等。中国发明专利(专利号 ZL200510090063.1,一种酵母拈抗菌的培养方法及其专用培养基)公开了一种罗伦隐球酵母的培养基配方,该培养基的碳源选自柠檬酸、苹果酸或/和葡萄糖;氮源选自大豆蛋白胨、牛肉浸膏、肉蛋白胨或/和胰酶解蛋白胨;无机养分选自 $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 或/和 $MgCl_2$ 中的一种或几种;中国发明专利申请号 200310115336.4(一种生物拈抗菌及其应用)公开了一种利用罗伦隐球酵母和杀菌剂及氯化钙等防治甜樱桃、冬枣及苹果果实病害的方法;中国发明专利申请号 200810128441.4(一种生物活性果蔬保鲜膜)公开了一种利用罗伦隐球酵母和海藻酸钠等保鲜苹果和圣女果等果实的方法;中国发明申请号 200910078858.9(葡萄果实采后病害或果粒脱落的防治方法及其专用防治剂)公开一种利用罗伦隐球酵母和硼酸盐等防治葡萄果实病害或脱粒的方法。中国发明专利(专利号 ZL200510090065.0,酵母拈抗菌 *C. laurentii* 的真空冷冻干燥制品及其制备方法)公开了一种罗伦隐球酵母冷冻干燥制品的制备方法;中国发明申请专利(申请号 200910079774.7,一种隐球酵母属菌胶囊剂及其制备方法)公开了一种制备罗伦隐球酵母常温保存的胶囊剂制备方法。

[0003] 但罗伦隐球酵母的液体培养基多为 NYDB(nutrient yeast dextrose broth,营养酵母葡萄糖液体培养基)等天然培养基,其化学组成不明确,不但批次之间的平行性较差,而且不利于进一步对培养基进行改进和优化。

[0004] 目前 NYDB 是目前最主要、也是最常用的 NYDB 培养基;其主要由牛肉浸膏,酵母粉,葡萄糖和水组成。其中牛肉浸膏,酵母粉作为氮源为天然物质,实际为大量不同成分的混合物,其组分及含量在不同批次间会有一定差异,表现在不同氮源批次间 PH 会有一定差异(PH 值会在 5~6 之间波动)。中国发明专利(专利号 ZL200510090063.1,一种酵母拈抗菌的培养方法及其专用培养基)公开了一种罗伦隐球酵母的培养基配方中氮源仍为大豆蛋白胨、牛肉浸膏、肉蛋白胨或/和胰酶解蛋白胨等天然物质。利用天然物质的好处是由于成分多样,对酵母培养比较有利(指收获菌体数量而言)。但也由于是天然混合物质,成分及浓度(含量)在不同厂家、不同批次间会有一定差异,给基于该培养基的理论研究会带来一定负面的影响。例如,当需要研究一种具体物质对酵母培养及活性的影响时,会由于原有培养基中成分及含量的不确定给最后的实验结果及判断造成不利的影响。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种适合罗伦隐球酵母发酵培养的组分明确、可重复验证的合成培养基配方,该培养基对酵母自身生长和生理活力没有显著负面影响。其包括碳源、氮源、无机盐和微量元素、生长因子种类和数量的优化。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种罗伦隐球酵母的专用培养基,培养基由葡萄糖、硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸亚铁、硫酸锰、硫酸锌、氯化钙、氯化钠、生物素、L-天门冬氨酸、维生素 B₁ 和水组成,每 1L 培养基中含有葡萄糖 10 ~ 20g,硫酸铵 3 ~ 6g,磷酸氢二钾 1.5 ~ 3g,硫酸镁 1 ~ 6g,硫酸亚铁 0 ~ 0.02g,硫酸锰 0 ~ 0.01g、硫酸锌 0 ~ 0.02g、氯化钙 0 ~ 0.5g/L、氯化钠 0 ~ 1g,生物素 0.4 ~ 0.5mg, L-天门冬氨酸 0.2 ~ 0.5mg,维生素 B₁ 0.2 ~ 1mg,其余为水,PH 值 3 ~ 8。

[0007] 作为本发明的罗伦隐球酵母专用培养基的改进:每 1L 所述专用培养基中含葡萄糖 10g,硫酸铵 5g,磷酸氢二钾 2g,硫酸镁 3g,硫酸锌 0.005g,生物素 0.5mg, L-天门冬氨酸 0.5mg 和维生素 B₁ 1mg,其余为水,PH 值 3 ~ 8(较优的 PH 值为 6 ~ 8)。其制备方法为:将葡萄糖、硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸锌和水事先采用常规的高压灭菌(121℃,灭菌 20min)后备用,然后将生物素 0.5mg, L-天门冬氨酸 0.5mg 和维生素 B₁ 1mg 以及上述灭菌后的葡萄糖 10g,硫酸铵 5g,磷酸氢二钾 2g,硫酸镁 3g,硫酸锌 0.005g 相混合,并用上述灭菌后的水定容至 1L。

[0008] 作为本发明的罗伦隐球酵母专用培养基的进一步改进:罗伦隐球酵母为保藏号为 CGMCC NO. 3590 的罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*)ZJU 10。

[0009] 本发明还同时提供了上述罗伦隐球酵母专用培养基的用途:将罗伦隐球酵母按照体积比为 0.2 ~ 4% 接种量接入所述专用培养基后,在 200rpm、25 ~ 28℃ 条件下培养 24 ~ 120 小时。

[0010] 罗伦隐球酵母的保藏名称为:罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*)ZJU 10,保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期:2010 年 1 月 20 日,保藏号:CGMCC NO. 3590。保藏地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所。该罗伦隐球酵母在申请号为 201010152108.4 的专利中有明确告知。

[0011] 本发明提供的罗伦隐球酵母专用培养基由合成原料组成,具有组分明确、可重复验证等突出优点,有利于研究罗伦隐球酵母代谢调节规律,从而对进一步利用、开发罗伦隐球酵母的拮抗活性、研制安全高效、环境友好的绿色生物保鲜剂等具有重要意义。

附图说明

[0012] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0013] 图 1 是不同培养基起始 PH 值对酵母生物量的影响。

[0014] 图 2 是酵母在本发明提供的合成培养基中的生长动态图。

具体实施方式

[0015] 以下所用的 NYDA 培养基为:牛肉浸膏 8g,酵母粉 5g,葡萄糖 10g,琼脂 20 克,水定容至 1000ml,常规高压(121℃,30 分钟)灭菌。所用的 NYDB 种子培养基为:牛肉浸膏 8g、酵母粉 5g、葡萄糖 10g,水定容至 1000ml,常规高压(121℃,30 分钟)灭菌。

[0016] 实施例 1

[0017] 1、罗伦隐球酵母菌种活化及种子液培养

[0018] 取出在 4℃ 冰箱内保存的罗伦隐球酵母 CGMCC NO. 3590, 用划线接种的方法接种于 NYDA 培养基中, 在 28℃ 生化培养箱中活化 48h 后再在同样条件下活化培养 1 次。

[0019] 从活化好的罗伦隐球酵母斜面上挑取少许菌体接种于含有 50mL NYDB 培养基的 250mL 锥形瓶中, 在 28℃ 的摇床培养箱中培养 24h, 转速 200rpm。

[0020] 2、发酵培养基制备

[0021] 在 250mL 锥形瓶中按正交试验法 $L_{16}(2^{15})$ 加入各个培养基成分 (见表 1 和表 2, 为每 L 中的重量 g), 常规高压灭菌 (121℃, 灭菌 20min) 后备用 (生物素、L- 天门冬氨酸和维生素 B1 采取过滤灭菌后加入), 用水定容至 50mL。

[0022] 3、罗伦隐球酵母的发酵培养和生物量测定

[0023] 在无菌条件下, 吸取 1mL 种子液接种于 250mL 灭菌后的发酵培养基中, 在 28℃ 的摇床培养箱中培养 24h, 转速为 200rpm。

[0024] 测定生物量时先以 5000 转 / 分离心 5min, 弃去发酵上清液, 然后用水清洗 2 次, 最后在 600nm 波长下测定酵母悬浮液的吸光值。各个处理的实验结果为菌体培养液离心、稀释相同倍数后在 600nm 波长下所测的吸光值。

[0025] 4、实验结果

[0026] 从表 2 可知, 处理 7 的配方所获得的酵母数量最大, 此配方所含各个物质成分为葡萄糖 10g/L、硫酸铵 6g/L、磷酸氢二钾 3g/L、硫酸镁 3g/L、硫酸亚铁 0.01g/L、生物素 0.4mg/L、L- 天门冬氨酸 0.2mg/L、维生素 B₁ 0.2mg/; 而硫酸锰、硫酸锌、氯化钠、氯化钙均为 0。

[0027] 从表 2 的极差可以看出葡萄糖、硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸亚铁、硫酸锰、硫酸锌、氯化钠、维生素 B₁ 的极差大于 0.1, 表明该试验条件下这些成份对罗伦隐球酵母生物量有较强的影响。而从表 2 的均值 1、均值 2 可以看出, 葡萄糖、磷酸氢二钾、硫酸锰、硫酸锌、维生素 B₁ 的均值 1 大于均值 2, 表明该试验条件下低剂量的上述物质对罗伦隐球酵母培养更有利; 而硫酸铵、硫酸镁、硫酸亚铁、氯化钠、氯化钙、生物素、L- 天门冬氨酸的均值 2 大于均值 1, 表明该试验条件下高剂量的上述物质对罗伦隐球酵母培养更有利。综合极差和均值结果, 理论上以下成分的几个较佳使用浓度为: 葡萄糖 10g/L, 硫酸铵 6g/L, 硫酸镁 3g/L, 硫酸亚铁 0.01g/L, 氯化钠 0.5g/L, 氯化钙 0.5g/L, 生物素 0.4mg/L, L- 天门冬氨酸 0.4mg/L; 而磷酸氢二钾、硫酸锰、硫酸锌、维生素 B₁ 均为 0。

[0028] 表 1 $L_{16}(2^{15})$ 正交试验表头

[0029]

	葡萄糖	硫酸铵	磷酸氢二钾	硫酸镁	硫酸亚铁	硫酸锰	硫酸锌	氯化钠	氯化钙	生物素	L-天门冬氨酸	维生素B1
水平 1	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
水平 2	20	6	3	3	0.01	0.01	0.01	0.5	0.5	0.4	0.2	0.2

[0030] 注：表 1 中单位生物素、L-天门冬氨酸、维生素 B1 为 mg/L，其余均为 g/L，表 2 同。

[0031] 表 2 $L_{16}(2^{15})$ 正交试验实际处理安排和试验结果

[0032]

处理	培养基成分及含量												实验结果
	葡萄糖	硫酸铵	磷酸氢二钾	硫酸镁	硫酸亚铁	硫酸锰	硫酸锌	氯化钠	氯化钙	生物素	L-天门冬氨酸	维生素 B1	OD600
1	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0742
2	10	3	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.4	0.2	0.2	1.3596
3	10	3	0	3	0.01	0.01	0.01	0	0	0	0	0.2	1.1346
4	10	3	0	3	0.01	0.01	0.01	0.5	0.5	0.4	0.2	0	1.3343
5	10	6	3	0	0	0.01	0.01	0	0	0.4	0.2	0	0.5550
6	10	6	3	0	0	0.01	0.01	0.5	0.5	0	0	0.2	1.1011
7	10	6	3	3	0.01	0	0	0	0	0.4	0.2	0.2	1.6237
8	10	6	3	3	0.01	0	0	0.5	0.5	0	0	0	1.3148
9	20	3	3	0	0.01	0	0.01	0	0.5	0	0.2	0	1.1282
10	20	3	3	0	0.01	0	0.01	0.5	0	0.4	0	0.2	0.4909
11	20	3	3	3	0	0.01	0	0	0.5	0	0.2	0.2	0.3598
12	20	3	3	3	0	0.01	0	0.5	0	0.4	0	0	1.1190
13	20	6	0	0	0.01	0.01	0	0	0.5	0.4	0	0	1.1047
14	20	6	0	0	0.01	0.01	0	0.5	0	0	0.2	0.2	0.9795
15	20	6	0	3	0	0	0.01	0	0.5	0.4	0	0.2	0.9476
16	20	6	0	3	0	0	0.01	0.5	0	0	0.2	0	1.1814
均值 1	1.18	1.0	1.14	0.97	0.96	1.14	1.12	0.99	1.02	1.03	1.04	1.10	
均值 2	0.91	1.1	0.96	1.13	1.14	0.96	0.98	1.11	1.08	1.07	1.07	1.00	
极差	0.27	0.1	0.2	0.15	0.18	0.18	0.13	0.12	0.06	0.03	0.03	0.1	

[0033] 实施例 2

[0034] 1、罗伦隐球酵母菌种活化及种子液培养

[0035] 同实施例 1。

[0036] 2、发酵培养基制备

[0037] 在 250mL 锥形瓶中，每个处理中的葡萄糖均为 10g/L，硫酸铵均为 3g/L，其余成分

按正交试验法 $L_{18}(2 \times 3^7)$ 加入各个培养基成分（见表 3 和表 4, 为每 L 中的重量 g），高压灭菌（121℃, 灭菌 20min）后备用（维生素 B1 采取过滤灭菌后加入），用水定容至 50mL。

[0038] 3、罗伦隐球酵母的发酵培养和生物量测定

[0039] 在无菌条件下, 吸取 2mL 种子液接种于 250ml 灭菌后的发酵培养基中, 在 25℃ 的摇床培养箱中培养 24h, 转速为 200rpm。测定生物量时先以 5000 转 / 分离心 5min, 弃去发酵上清液, 然后用水清洗 2 次, 最后在 600nm 波长下测定酵母悬浮液的吸光值。各个处理的实验结果为菌体培养液离心、稀释相同倍数后在 600nm 波长下所测的吸光值。

[0040] 4、实验结果

[0041] 从表 4 可知, 处理 8 的配方所获得的酵母数量最大, 此配方所含各个物质成分为: 葡萄糖 10g/L, 硫酸铵为 3g/L, 磷酸氢二钾 3g/L, 硫酸镁 3g/L, 硫酸亚铁 0.02g/L, 硫酸锰 0.005g/L, 氯化钠 1g/L; 而硫酸锌和维生素 B_1 均为 0。

[0042] 从表 4 的极差可以看出, 硫酸镁、硫酸锌、维生素 B_1 的极差值大于 0.1, 表明该试验条件下上述物质对罗伦隐球酵母生长的影响较强。而从均值栏可以看出, (1) 磷酸氢二钾、硫酸亚铁、硫酸锰、氯化钠的均值 1、均值 2、均值 3 均较接近, 表明该试验条件下, 磷酸氢二钾、硫酸亚铁、硫酸锰、氯化钠浓度变化对罗伦隐球酵母的生物量的影响不明显; (2) 硫酸镁的均值 2 大于均值 1 均值 3, 表明该试验条件下硫酸镁浓度在 3g/L 时对罗伦隐球酵母生长最有利; (3) 硫酸锌的均值 1 大于均值 2 均值 3, 表明该试验条件下低浓度的硫酸锌更有利罗伦隐球酵母的生长。综合极差和均值结果, 理论上以下成分的各个较佳使用浓度为: 硫酸镁 3g/L, 硫酸亚铁 0 或 0.02g/L, 硫酸锰 0.005g/L, 氯化钠 1g/L; 而磷酸氢二钾、硫酸锌、维生素 B_1 均为 0。

[0043] 表 3 $L_{18}(2 \times 3^7)$ 正交试验表头

[0044]

	K_2HPO_4	$MgSO_4$	$FeSO_4$	$MnSO_4$	$ZnSO_4$	NaCl	维生素 B1
水平 1	0	0	0	0	0	0	0
水平 2	1.5	3	10	5	5	0.5	0.1
水平 3	3	6	20	10	10	1	0.2

[0045] 注: 表 3 中单位 $FeSO_4$ 、 $MnSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 和维生素 B1 为 mg/L, 其余均为 g/L, 表 4 同。

[0046] 表 4 $L_{18}(2 \times 3^7)$ 正交试验实际处理安排和试验结果

[0047]

处理	培养基成分及含量									实验结果
	葡萄糖	硫酸铵	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	FeSO ₄	MnSO ₄	ZnSO ₄	NaCl	维生素 B1	OD600
1	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0.7414
2	10	3	0	3	10	2	5	0.5	0.1	1.005
3	10	3	0	6	20	10	10	1	0.2	1.0984
4	10	3	1.5	0	0	2	5	1	0.2	0.286
5	10	3	1.5	3	10	10	10	0	0	1.3588
6	10	3	1.5	6	20	0	0	0.5	0.1	1.0528
7	10	3	3	0	10	0	10	0.5	0.2	0.2901
8	10	3	3	3	20	2	0	1	0	1.6169
9	10	3	3	6	0	10	5	0	0.1	1.0812
10	10	3	0	0	20	10	5	0.5	0	0.6117
11	10	3	0	3	0	0	10	1	0.1	1.2006
12	10	3	0	6	10	5	0	0	0.2	1.1183
13	10	3	1.5	0	10	10	0	1	0.1	0.4495
14	10	3	1.5	3	20	0	5	0	0.2	1.1455
15	10	3	1.5	6	0	5	10	0.5	0	1.3258
16	10	3	3	0	20	5	10	0	0.1	0.2295
17	10	3	3	3	0	10	0	0.5	0.2	1.1238
18	10	3	3	6	10	0	5	1	0	1.2311
均值1	/	/	0.963	0.435	0.960	0.944	1.017	0.946	1.148	
均值2	/	/	0.936	1.242	0.909	0.930	0.893	0.902	0.836	
均值3	/	/	0.929	1.151	0.959	0.954	0.917	0.980	0.844	
极差	/	/	0.034	0.807	0.051	0.024	0.124	0.078	0.312	

[0048] 实施例 3

[0049] 1、罗伦隐球酵母菌种活化及种子液培养

[0050] 同实施例 1。

[0051] 2、发酵培养基制备

[0052] 在 250mL 锥形瓶中,每个处理中的葡萄糖均为 10g/L,硫酸铵均为 3g/L,其余成分按正交试验法 L₉(3⁴) 加入各个培养基成分(见表 5 和表 6,为每 L 中的重量 g),高压灭菌(121℃,灭菌 20min)后备用,用水定容至 50mL。

[0053] 3、罗伦隐球酵母的发酵培养和生物量测定

[0054] 在无菌条件下,吸取 1mL 种子液接种于 250ml 灭菌后的发酵培养基中,在 25℃的摇床培养箱中培养 24h,转速为 200rpm。

[0055] 测定生物量时先以 5000 转/分离心 5min,弃去发酵上清液,然后用水清洗 2 次,最后在 600nm 波长下测定酵母悬浮液的吸光值。各个处理的实验结果为菌体培养液离心、稀释相同倍数后在 600nm 波长下所测的吸光值。

[0056] 4、实验结果

[0057] 从表 6 可知,处理 5 的配方所获得的酵母数量相对最大,此配方所含各个物质成分为:葡萄糖 10g/L,硫酸铵 3g/L、硫酸氢二钾 1.5g/L,硫酸镁 3g/L,硫酸亚铁 0.02g/L,而硫酸锰为 0g/L。

[0058] 从表 6 的均值可以看出,磷酸氢二钾的均值 2 最大,硫酸镁的均值 2 最大,硫酸亚铁的均值 1 最大,硫酸锰的均值 1 最大,表明该试验条件下,磷酸氢二钾浓度在 1.5g/L 时对酵母生长最有利,硫酸镁浓度在 3g/L 时对酵母生长最有利。硫酸亚铁和硫酸锰在浓度为 0 时对酵母生长最有利。

[0059] 表 5 $L_9(3^4)$ 正交试验表头

[0060]

	K_2HPO_4	$MgSO_4$	$FeSO_4$	$MnSO_4$
水平 1	0	0	0	0
水平 2	1.5	3	0.01	0.005
水平 3	3	6	0.02	0.01

[0061] 注:表 5 中单位 5 均为 g/L,表 6 同

[0062] 表 6 $L_9(3^4)$ 正交试验实际处理安排和试验结果

[0063]

处理	培养基成分及含量						实验结果
	葡萄糖	$(NH_4)_2SO_4$	K_2HPO_4	$MgSO_4$	$FeSO_4$	$MnSO_4$	OD600
1	10	3	0	0	0	0	0.3439
2	10	3	0	3	0.01	0.005	0.9224
3	10	3	0	6	0.02	0.01	0.7641
4	10	3	1.5	0	0.01	0.01	0.7619
5	10	3	1.5	3	0.02	0	1.4728
6	10	3	1.5	6	0	0.005	1.4642
7	10	3	3	0	0.02	0.005	0.5588
8	10	3	3	3	0	0.01	1.4106
9	10	3	3	6	0.01	0	1.4057
均值1	/	/	0.677	0.555	1.073	1.074	
均值2	/	/	1.233	1.269	1.030	0.982	
均值3	/	/	1.125	1.211	0.932	0.979	
极差	/	/	0.556	0.714	0.141	0.095	

[0064] 实施例 4

[0065] 1、罗伦隐球酵母菌种活化及种子液培养

[0066] 同实施例 1。

[0067] 2、发酵培养基制备

[0068] 在 250mL 锥形瓶中,每个处理中的葡萄糖均为 10g/L,硫酸铵均为 3g/L, K_2HPO_4 均为 1.5g/L, $MgSO_4$ 均为 3g/L, $FeSO_4$ 均为 0.02g/L, $MnSO_4$ 均为 0.005g/L,生长因子成分按正交试验法 $L_9(3^4)$ 加入各个培养基成分(见表 7 和表 8,为每 L 中的重量 g),高压灭菌(121℃,灭菌 20min)后备用(生物素、L-天门冬氨酸和维生素 B1 采取过滤灭菌后加入),用水定容至 50mL。

[0069] 3、罗伦隐球酵母的发酵培养和生物量测定

[0070] 在无菌条件下,吸取 1mL 种子液接种于 250mL 灭菌后的发酵培养基中,在 28℃ 的摇床培养箱中培养 24h,转速为 200rpm。

[0071] 测定生物量时先以 5000 转/分离心 5min,弃去发酵上清液,然后用水清洗 2 次,最后在 600nm 波长下测定酵母悬浮液的吸光值。各个处理的实验结果为菌体培养液离心、稀释相同倍数后在 600nm 波长下所测的吸光值。

[0072] 4、实验结果

[0073] 从表 8 可知,处理 5 的配方所获得的酵母数量相对最大,此配方所含各个物质成分为:葡萄糖 10g/L,硫酸铵 3g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, $MgSO_4$ 3g/L, $FeSO_4$ 为 0.02g/L, $MnSO_4$ 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L-天门冬氨酸 0.5mg/L,维生素 B₁ 1mg/L。

[0074] 从表 8 的均值可以看出,生物素均值 2 最大,L-天门冬氨酸均值 2 最大,维生素 B₁ 均值 3 最大,表明该试验条件下,生物素在 0.5mg/L、L-天门冬氨酸在 0.5mg/L、维生素 B₁ 在 1mg/L 时对罗伦隐球酵母的生长最有利,且以上结果与处理 5 的实际结果相符。

[0075] 表 7 $L_9(3^4)$ 正交试验表头

[0076]

	生物素	L-天门冬氨酸	维生素 B1
水平 1	0	0	0
水平 2	0.5	0.5	0.5
水平 3	1	1	1

[0077] 注:表 7 中单位生物素、L-天门冬氨酸、维生素 B1 为 mg/L,其余均为 g/L,表 8 同。

[0078] 表 8 $L_9(3^4)$ 正交试验实际处理安排和试验结果

[0079]

处 理	培养基成分及含量									实验结果
	葡萄 糖	硫酸 铵	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	FeSO ₄	MnSO ₄	生 物 素	L-天 门冬氨 酸	维生 素 B1	OD600
1	10	3	1.5	3	0.02	0.005	0	0	0	0.7553
2	10	3	1.5	3	0.02	0.005	0	0.5	0.5	1.0945
3	10	3	1.5	3	0.02	0.005	0	1	1	1.0137
4	10	3	1.5	3	0.02	0.005	0.5	0	0.5	1.1449
5	10	3	1.5	3	0.02	0.005	0.5	0.5	1	1.3944
6	10	3	1.5	3	0.02	0.005	0.5	1	0	1.0771
7	10	3	1.5	3	0.02	0.005	1	0	1	1.0666
8	10	3	1.5	3	0.02	0.005	1	0.5	0	1.1141
9	10	3	1.5	3	0.02	0.005	1	1	0.5	1.0956
均	/	/	/	/	/	/	0.955	0.989	0.982	

[0080]

值1										
均 值2	/	/	/	/	/	/	1.205	1.201	1.112	
均 值3	/	/	/	/	/	/	1.092	1.062	1.158	
极 差	/	/	/	/	/	/	0.250	0.212	0.176	

[0081] 实施例 5

[0082] 1、罗伦隐球酵母菌种活化及种子液培养

[0083] 同实施例 1。

[0084] 2、发酵培养基制备

[0085] 在 250mL 锥形瓶中,每个处理分别按表 9 加入各个成分(为每 L 中的重量 g),高压灭菌(121℃,灭菌 20min)后备用(生物素、L-天门冬氨酸和维生素 B1 采取过滤灭菌后加入),用水定容至 50mL。

[0086] 3、罗伦隐球酵母的发酵培养和生物量测定

[0087] 在无菌条件下,吸取 1mL 种子液接种于 250mL 灭菌后的发酵培养基中,在 28℃ 的摇床培养箱中培养 24h,转速为 200rpm。

[0088] 测定生物量时先以 5000 转/分离心 5min,弃去发酵上清液,然后用水清洗 2 次,最后在 600nm 波长下测定酵母悬浮液的吸光值。各个处理的实验结果为菌体培养液离心、稀释相同倍数后在 600nm 波长下所测的吸光值。

[0089] 4、实验结果

[0090] 从表 9 可知,处理 5 结果最好,该培养基中各个成分含量分别为:葡萄糖含量为 10g/L,硫酸铵含量为 5g/L,磷酸氢二钾含量为 2g/L,硫酸镁含量为 1g/L,硫酸亚铁含量为 0.01g/L,硫酸锌含量为 20mg/L,生物素含量为 0.5mg/L,L-天门冬氨酸含量为 0.5mg/L,维生素 B₁ 含量为 1mg/L。

[0091] 表 9 实际处理安排和试验结果

[0092]

处 理	培养基成分及含量												实验结果
	葡 萄 糖	硫 酸 铵	硫 酸 氢 二 钾	硫 酸 镁	硫 酸 亚 铁	硫 酸 锰	硫 酸 锌	氯 化 钠	氯 化 钙	生 物 素	L-天 门 冬 氨 酸	维 生 素 B ₁	OD600
	糖	铵	氢 二 钾	镁	亚 铁	锰	锌	钠	钙	素	氨酸	素B ₁	
1	10	5	3	1.5	0.01	0	0	0	0	0.5	0.5	1	1.0623
2	10	5	3	1.5	0.01	0	0	0	0	0	0	0	1.0751
3	10	5	3	1.5	0.02	0	0	1	0	0	0	0	1.3318
4	10	5	1.5	1.5	0.02	0	0	0	0	0	0	0	1.2569
5	10	5	2	1	0.01	0	20	0	0	0.5	0.5	1	1.4263
6	10	5	2	1	0.01	0	20	0	0	0	0	0	1.1613
7	10	3	1.5	1.5	0.02	0	0	0	0	0.5	0.5	1	1.1514

[0093] 注:表 9 中的单位葡萄糖、硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸亚铁、硫酸锰、氯化钠、氯化钙的单位为 g/L;硫酸锌、生物素、L-天门冬氨酸、维生素 B₁ 的单位为 mg/L。

[0094] 实施例 6

[0095] 1、罗伦隐球酵母菌种活化及种子液培养

[0096] 同实施例 1。

[0097] 2、发酵培养基制备

[0098] 在 250mL 锥形瓶中,分别加入以下对比组的处理配方,高压灭菌(121℃,灭菌 20min)后备用(生物素、L-天门冬氨酸和维生素 B₁ 采取过滤灭菌后加入),用水定容至 50mL。

[0099] 2.1 对比组一

[0100] 处理 1:葡萄糖 10g/L、硫酸铵 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 3g/L、硫酸亚铁 0.01g/L、硫酸锰 0.005g/L、硫酸锌 0.005g/L、氯化钠 0.5g/L、生物素 0.5mg/L、L-天门冬氨酸 0.5mg/L、维生素 B₁ 1mg/L

[0101] 处理 2:葡萄糖 10g/L、硫酸铵 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 3g/L、硫酸锰 0.005g/L、硫酸锌 0.005g/L、氯化钠 0.5g/L、生物素 0.5mg/L、L-天门冬氨酸 0.5mg/L、维生素 B₁ 1mg/L(即硫酸亚铁不添加)

[0102] 2.2 对比组二

[0103] 处理 1 : 葡萄糖 10g/L、硫酸铵 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 3g/L、硫酸亚铁 0.01g/L、硫酸锰 0.005g/L、硫酸锌 0.005g/L、氯化钠 0.5g/L、生物素 0.5mg/L、L- 天门冬氨酸 0.5mg/L、维生素 B1 1mg/L

[0104] 处理 2 : 葡萄糖 10g/L、硫酸铵 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 3g/L、硫酸亚铁 0.01g/L、硫酸锌 0.005g/L、氯化钠 0.5g/L、生物素 0.5mg/L、L- 天门冬氨酸 0.5mg/L、维生素 B1 1mg/L (即硫酸锰不添加)

[0105] 2.3 对比组三

[0106] 处理 1 : 葡萄糖 10g/L、硫酸铵 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 3g/L、硫酸亚铁 0.01g/L、硫酸锰 0.005g/L、硫酸锌 0.005g/L、氯化钠 0.5g/L、生物素 0.5mg/L、L- 天门冬氨酸 0.5mg/L、维生素 B1 1mg/L

[0107] 处理 2 : 葡萄糖 10g/L、硫酸铵 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 3g/L、硫酸亚铁 0.01g/L、硫酸锰 0.005g/L、氯化钠 0.5g/L、生物素 0.5mg/L、L- 天门冬氨酸 0.5mg/L、维生素 B1 1mg/L (即硫酸锌不添加)

[0108] 2.3 对比组四

[0109] 处理 1 : 葡萄糖 10g/L、硫酸铵 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 3g/L、硫酸亚铁 0.01g/L、硫酸锰 0.005g/L、硫酸锌 0.005g/L、氯化钠 0.5g/L、生物素 0.5mg/L、L- 天门冬氨酸 0.5mg/L、维生素 B1 1mg/L

[0110] 处理 2 : 葡萄糖 10g/L、硫酸铵 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 3g/L、硫酸亚铁 0.01g/L、硫酸锰 0.005g/L、硫酸锌 0.005g/L、生物素 0.5mg/L、L- 天门冬氨酸 0.5mg/L、维生素 B1 1mg/L (即氯化钠不添加)

[0111] 3、罗伦隐球酵母的发酵培养和生物量测定

[0112] 在无菌条件下, 吸取 1mL 种子液接种于 250ml 灭菌后的发酵培养基中, 在 28℃ 的摇床培养箱中培养 24h, 转速为 200rpm。

[0113] 测定生物量时先以 5000 转 / 分离心 5min, 弃去发酵上清液, 然后用水清洗 2 次, 最后在 600nm 波长下测定酵母悬浮液的吸光值。各个处理的实验结果为菌体培养液离心、稀释相同倍数后在 600nm 波长下所测的吸光值。

[0114] 4、实验结果

[0115] 从表 10 可知, 对比组三即是否添加硫酸锌的 2 个处理之间存在显著性差异, 而是否添加硫酸亚铁、硫酸锰、氯化钠 3 个对比组之间不存在显著差异。

[0116] 表 10 对比实验结果

[0117]

对比组	处理	平均数及标准误	显著性差异
对比组一	处理 1	1.50±0.088	a
	处理 2	1.35±0.085	a
对比组二	处理 1	1.57±0.098	a
	处理 2	1.40±0.075	a
对比组三	处理 1	1.51±0.059	a
	处理 2	1.23±0.061	b
对比组四	处理 1	1.57±0.10	a
	处理 2	1.48±0.012	a

[0118] 实施例 7

[0119] 1、罗伦隐球酵母菌种活化及种子液培养

[0120] 同实施例 1。

[0121] 2、发酵培养基制备

[0122] 在 250mL 锥形瓶中制备 50mL 的罗伦隐球酵母专用培养基,所含发酵培养基组份及浓度为:葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L。即,每 1L 培养基中含葡萄糖 10g,硫酸铵 5g,磷酸氢二钾 2g,硫酸镁 3g,硫酸锌 0.005g,生物素 0.5mg, L- 天门冬氨酸 0.5mg 和维生素 B_1 1mg,其余为水。

[0123] 制备方法为:葡萄糖、硫酸铵、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4$ 、硫酸锌和水事先采用常规高压灭菌(121℃, 20min),生物素、L- 天门冬氨酸和维生素 B_1 采取过滤灭菌后加入,用少量 1mol/L 盐酸或氢氧化钠将培养基 PH 值调整到所需要的数值 (pH 值 3 ~ 8)。

[0124] 处理 1 :NYDB 培养基 (作为对照,市购而得,实测 PH 是 5.8)。

[0125] 处理 2 :葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L,自然 PH 值 (6.5)。

[0126] 处理 3 :葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L, PH 值 = 3.0。

[0127] 处理 4 :葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L, PH 值 = 4.0。

[0128] 处理 5 :葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L, PH 值 = 5.0。

[0129] 处理 6 :葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L, PH 值 = 6.0。

[0130] 处理 7 :葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L, PH 值 = 7.0。

[0131] 处理 8 :葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L, PH 值 = 8.0。

[0132] 处理 9 :葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L, PH 值 = 9.0。

[0133] 3、罗伦隐球酵母的发酵培养和生物量测定

[0134] 在无菌条件下,吸取 1mL 种子液接种于 250ml 灭菌后的发酵培养基中,在 28℃ 的摇床培养箱中培养 24h,转速为 200rpm。

[0135] 测定生物量时先以 5000 转 / 分离心 5min,弃去发酵上清液,然后用水清洗 2 次,最后在 600nm 波长下测定酵母悬浮液的吸光值。各个处理的实验结果为菌体培养液离心、稀释相同倍数后在 600nm 波长下所测的吸光值。

[0136] 4、实验结果

[0137] 结果如图 1 所示。本发明所获得的合成培养基培养获得罗伦隐球酵母的生物量已非常接近天然培养基 (NYDB) 所能获得的生物量。培养基的起始 PH 值对酵母的生物量有显著的影响,当较低 (PH = 3) 或较高 (PH = 9) PH 值时,酵母的生物量显著减少。培养基起始 PH 值在 6 ~ 8 之间时与自然 PH 的结果相近,无显著差异。

[0138] 实施例 8

[0139] 1、罗伦隐球酵母菌种活化及种子液培养

[0140] 同实施例 1。

[0141] 2、发酵培养基制备

[0142] 在 250mL 锥形瓶中,所含发酵培养基为 50ml 的 NYDB 培养基 (市购而得,实测 PH 是 5.8) 或本发明所提供的罗伦隐球酵母专用培养基。本发明所提供的罗伦隐球酵母专用培养基为 :葡萄糖 10g/L,硫酸铵为 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4$ 3g/L,硫酸锌 0.005g/L,生物素 0.5mg/L, L- 天门冬氨酸 0.5mg/L, 维生素 B_1 1mg/L。葡萄糖、硫酸铵、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4$ 、硫酸锌这些组份采用常规高压灭菌 (121℃, 20min),生物素、L- 天门冬氨酸和维生素 B_1 采取过滤灭菌后加入。pH 值 7。

[0143] 3、罗伦隐球酵母的发酵培养和生物量测定

[0144] 在无菌条件下,吸取 1mL 种子液接种于 250ml 灭菌后的发酵培养基中,在 28℃ 的摇床培养箱中培养 120h,转速为 200rpm。

[0145] 测定生物量时先以 5000 转 / 分离心 5min,弃去发酵上清液,然后用水清洗 2 次,最后在 600nm 波长下测定酵母悬浮液的吸光值。各个处理的实验结果为菌体培养液离心、稀释相同倍数后在 600nm 波长下所测的吸光值。

[0146] 4、实验结果

[0147] 结果如图 2 所示。罗伦隐球酵母在本发明所提供的合成培养基中良好的生长。其前 12 小时为生长延滞期,随后的 12 ~ 36 小时即进入快速生长的对数生长阶段,36 ~ 96 小时为稳定生长期,96 小时生长数量降低,即进入衰退期。虽然与 NYDB 培养基相比,在菌体收集数量略低一些,但足以保证进一步研究的需要。

[0148] 需要指出的是 NYDB 培养基是利用牛肉浸膏,酵母粉作为氮源 (其为天然物质),实际为大量不同成分的混合物,其组分及含量在不同批次间会有一定差异,表现在不同氮源批次间 PH 会有一定差异 (PH 值会在 5 ~ 6 之间波动)。利用天然物质的好处是由于成分多

样,对酵母培养比较有利(指收获菌体数量而言)。但也由于是天然混合物质,成分及浓度(含量)不同厂家、批次间会有一定差异,给基于该培养基的理论研究会带来一定负面的影响,如需要研究一种具体物质对酵母培养及活性的影响时,会由于原有培养基中成分及含量不确定给最后的实验结果及判断造成不利的影响。而本发明正是为了解决这一问题而开展的。本发明提供的罗伦隐球酵母专用培养基能利用成分及含量非常确定的基础上收获大量的酵母菌体,为进一步开展相关深入研究提供了基础(虽然与 NYDB 培养基相比在菌体收集数量略低一些,但足以保证进一步研究的需要。)因此本发明提供的罗伦隐球酵母专用培养基具有重要的理论研究意义。

[0149] 最后,还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

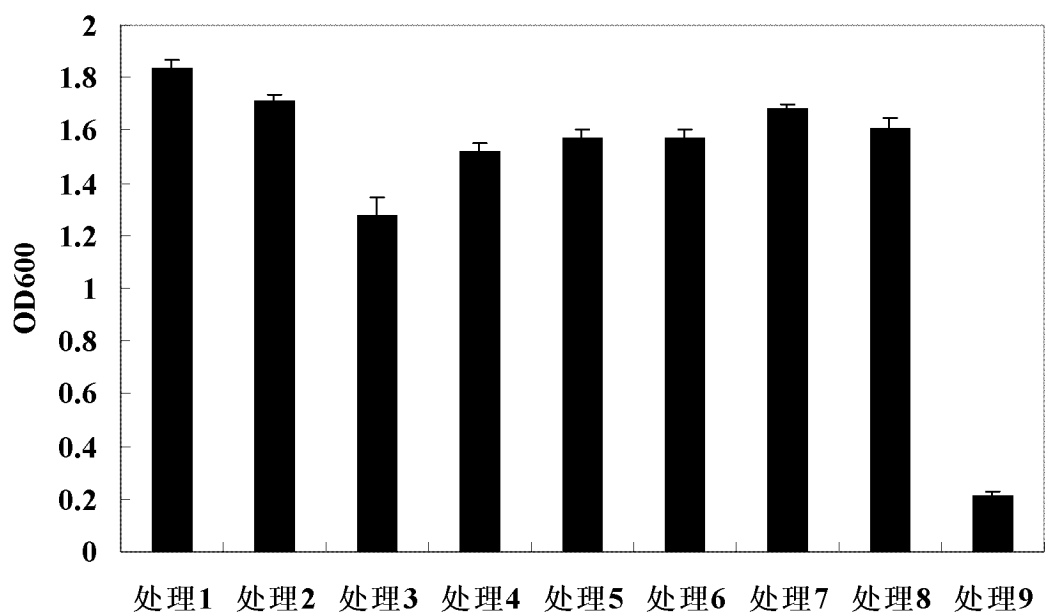


图 1

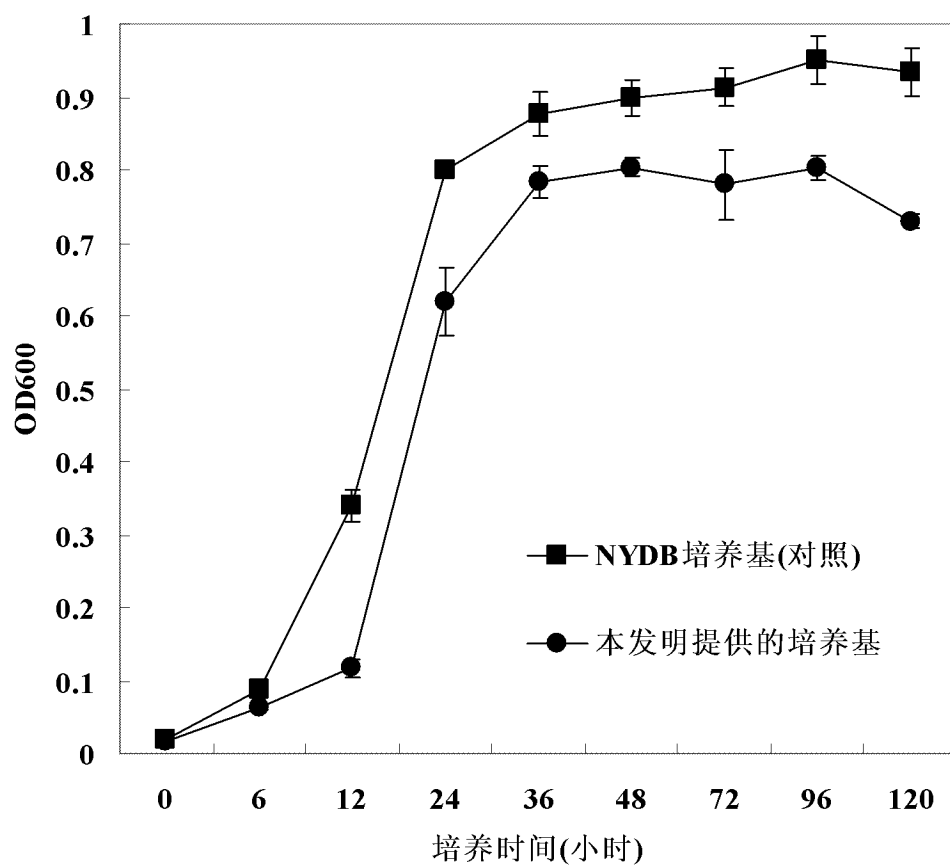


图 2