

分光光度法测定高浓度培养液下的产油酵母菌生长曲线

马 勇, 图 雅, 陈 秀 莉, 门 中 华

(包头师范学院 生物科学与技术学院, 内蒙古 包头 014030)

摘 要:采用分光光度法测定酵母菌不同生长时间高浓度培养液的 OD_{600} 值, 并对不同生长时间高浓度培养液进行相应倍数的稀释, 使用建立 OD_{600} 值回归方程的方法, 利用回归后的 OD_{600} 值绘制出产油酵母菌 Y1 的生长曲线。结果表明: 所得到的生长曲线可以准确反应菌体的生长规律。酵母菌 Y1 在适宜生长条件下菌体细胞生长出现 4 个阶段: 延滞期、对数期、稳定期和衰亡期, 其中, 0~4 h 为延滞期, 4~24 h 为对数生长期, 24~68 h 为稳定期, 68 h 以后进入衰亡期。该研究旨在为相关研究人员提供类似问题的详细解决办法和重要参考。

关键词:产油酵母; 分光光度法; 生长曲线; 回归方程

中图分类号:Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)08-0116-03

我国人均石化资源储量十分有限, 而能源需求量却与日俱增。微生物油脂是石化能源替代品生物柴油的潜在油源^[1]。由微生物生产富含多种生理功能的不饱和脂肪酸油脂已引起国内外的广泛重视。因此, 微生物油脂的研究将成为新世纪油脂工业的一个发展方向^[2]。在进行产油酵母的研究中, 能够准确测定所使用菌种的生长量以及后期测定所用菌种的生长曲线, 对于了解所用菌种以及后期的发酵产脂培养是十分重要的一项生理指标^[3]。生长曲线反映了酵母菌在培养过程中的生长和繁殖的规律, 同一种酵母菌因研究方法不同其生长曲线也不一样^[3]。通过测定酵母菌的生长曲线, 了解其生长繁殖规律, 这对根据不同的需要, 有效地利用和控制酵母菌的生长具有重要的意义^[4]。

该研究对实验室保藏的 1 株产油酵母菌, 通过分光

光度法测定酵母菌不同生长时间高浓度培养液的 OD_{600} 值, 并对不同生长时间高浓度培养液进行相应倍数的稀释, 使得稀释后的培养液所测得的 OD_{600} 值均保持在 0.1~0.8 之间^[3], 然后建立相关稀释倍数间的 OD_{600} 值回归方程, 使所有实际测得的 OD_{600} 值均回归到同一稀释倍数所表现的回归后 OD_{600} 值, 最终确定了其生长曲线。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种为产油酵母菌 Y1, 由包头师范学院生物科学与技术学院实验中心保藏。

培养基: YEPD 液体培养基(g/L): 1 L 培养基中含葡萄糖 20 g, 酵母粉 10 g, 蛋白胨 10 g; 液体种子培养基(g/L): 1 L 培养基中含葡萄糖 20 g, $(NH_4)_2SO_4$ 5 g, KH_2PO_4 1 g, 酵母粉 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母菌 Y1 种子液的培养 取活化后斜面酵母菌 Y1 一环, 接种于 100 mL 液体 YEPD 培养基中, 28℃ 180 r/min 培养 14 h, 备用。

1.2.2 酵母菌 Y1 不同生长时间培养液收集 取 20 个 100 mL 已灭菌的三角瓶分别装入 25 mL 液体种子培养基, 标签编号, 其中 1 个标注为 CK, 另外将 19 个三角瓶

第一作者简介:马勇(1980-), 男, 辽宁台安人, 在读博士, 实验师, 现主要从事微生物油脂及植物生理与农作物基因工程等研究工作。

责任作者:门中华(1975-), 男, 内蒙古包头人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事植物生理生态学及分子生物学等研究工作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160254); 包头师范学院青年科学研究基金资助项目(BSYKJ2011-17)。

收稿日期:2012-12-13

was MS basal medium containing 6 g/L sucrose, 4.0 g/L agar powder and 10 g/L mannite supplemented with 2.0 mg/L CCC, 2.0 mg/L PP₃₃₃ and 2.0 mg/L ABA, in an illuminated chamber under 14~16 h photoperiod of 1 500 lx light intensity at 20℃, more than 50% conservation material survived after 300 days, most of them could grew well on propagation medium, and the chromosome number maintained stably.

Key words: *Zingiber officinale* Rosc.; germplasm resource; *in vitro* conservation; growth recovery; genetic stability

从 0~72 h, 每间隔 4 h, 分别标明培养时间。分别向已装入液体种子培养基的三角瓶中接入上述培养液 0.1 mL, 震荡摇匀后, 将 CK 和 0 的 2 个三角瓶取出, 立即放入 4℃ 冰箱贮存。将其余已接入培养液的 18 个三角瓶于 28℃ 180 r/min 震荡培养, 以后每隔 4 h 后取出三角瓶, 测定该瓶中的菌悬液 OD。

1.2.3 酵母菌 Y1 不同生长时间菌悬液 OD 值测定
以无菌的液体种子培养基作为空白对照, 调节仪器 0 位和透光率 100%。用 1 cm 比色杯, 加入未接种的 CK 样品调仪器 0 位。在 600 nm 波长下测定酵母菌 Y1 不同生长时间培养液的 OD₆₀₀ 值, 每份样品测定 3 次取其平均值。若菌悬液太浓, 应适当稀释, 使 OD 值在 0.1~0.8 之间, 并记录相应培养液全部培养时间、稀释倍数、OD₆₀₀ 值。

1.2.4 酵母菌 Y1 不同生长时间菌悬液 OD 值测定回归方程的建立
对于较浓的培养液, 在做适当稀释测得 OD₆₀₀ 值后, 需补测在同一稀释倍数区间内的任意 2 组 OD₆₀₀ 值在下一稀释倍数区间内被稀释到此稀释倍数时的 OD₆₀₀ 值, 每份样品测定 3 次取其平均值。设酵母菌 Y1 培养液不同稀释倍数间的 OD₆₀₀ 值回归方程为 $y=ax+b$ ^[5] (x 为相同培养时间培养液稀释后的 OD₆₀₀ 值, y 为相同培养时间培养液稀释前的 OD₆₀₀ 值), 通过解得 a 、 b 值后得到不同稀释倍数间的 OD₆₀₀ 值回归方程。然后将相应的 OD₆₀₀ 值带入相关回归方程后得到同一稀释倍数水平上的回归后所有 OD₆₀₀ 值, 以培养时间为横坐标, 以回归后与培养时间对应的 OD₆₀₀ 值作为纵坐标, 绘制酵母菌 Y1 的生长曲线。

2 结果与分析

2.1 酵母菌 Y1 不同生长时间培养液的 OD₆₀₀ 值

由表 1 可知, 测定酵母菌 Y1 不同生长时间培养液

表 1 酵母菌 Y1 不同生长时间培养液的 OD₆₀₀ 值

Table 1 OD₆₀₀ value of yeast Y1 medium with different growth time

培养时间/h	平均 OD ₆₀₀ 值(稀释倍数)
0	0.106(0)
4	0.387(0)
8	0.791(2)
12	0.219(10)
16	0.568(10)
20	0.473(20)
24	0.355(30)
28	0.239(50)
32	0.261(50)
36	0.265(50)
40	0.279(50)
44	0.284(50)
48	0.312(50)
52	0.315(50)
56	0.327(50)
60	0.330(50)
64	0.354(50)
68	0.347(50)
72	0.341(50)

过程中共做 5 次稀释, 稀释倍数分别为 2、10、20、30、50, 因此需要建立 4 组相应稀释倍数间的 OD₆₀₀ 值回归方程。

2.2 酵母菌 Y1 不同生长时间菌悬液 OD 值测定回归方程的建立

分别测定酵母菌 Y1 培养液在 12、16、20、24、28 h 稀释相应倍数后的 OD₆₀₀ 值。由表 2 可知, 随着菌体培养时间的增加, 在同一培养时间但不同稀释倍数的菌悬液中测定 2 组 OD₆₀₀ 值, 所测得数值均在合理范围之内, 可用于回归方程系数的计算。

表 2 酵母菌 Y1 不同稀释倍数培养液的 OD₆₀₀ 值

Table 2 OD₆₀₀ value of yeast Y1 medium with different dilution

培养时间/h	平均 OD 值(稀释倍数)
12	1.311(0)
12	0.256(10)
16	1.621(0)
16	0.427(10)
16	0.227(20)
20	0.596(10)
20	0.313(20)
20	0.204(30)
24	0.382(20)
24	0.235(30)
24	0.121(50)
28	0.307(30)
28	0.191(50)

将表 2 中数据代入 $y=ax+b$ 可得培养液相应稀释倍数间的 OD₆₀₀ 值回归方程。由表 3 可知, 随着菌体生长时间的增加, 菌体培养液分别被稀释 10、20、30、50 倍时, 每个稀释倍数由低到高的 OD₆₀₀ 值回归方程分别为 $y=1.8129x+0.8469$ 、 $y=1.9651x-0.0190$ 、 $y=2.2258x-0.1411$ 、 $y=1.0286x+0.1105$ 。

表 3 酵母菌 Y1 不同稀释倍数间的 OD₆₀₀ 值回归方程

Table 3 Regressive equations of OD₆₀₀ about yeast Y1 in different dilution

培养液稀释倍数	OD ₆₀₀ 值回归方程
0~10	$y=1.8129x+0.8469$
10~20	$y=1.9651x-0.0190$
20~30	$y=2.2258x-0.1411$
30~50	$y=1.0286x+0.1105$

2.3 酵母菌 Y1 生长曲线的绘制

将相应稀释倍数的菌体培养液 OD₆₀₀ 值带入对应回归方程后得到同一稀释倍数水平上的回归后所有 OD₆₀₀ 值。由表 4 可知, 菌体在培养过程中每 4 h 取样, 培养液经相对应回归方程后得到回归后 OD₆₀₀ 值, 其数值能够准确的体现该菌体的生长规律。

以培养时间为横坐标, 以表 4 中 OD₆₀₀ 回归值作为纵坐标, 绘制酵母菌 Y1 的生长曲线。由图 1 可知, 酵母菌 Y1 在适宜生长条件下菌体细胞生长出现 4 个阶段:

表 4 酵母菌 Y1 不同生长时间培养液的
OD₆₀₀ 回归值

Table 4 Average regressed values of the OD₆₀₀ about
yeast Y1 in different growth time in liquid medium

培养时间/h	平均 OD 值
0	0.106
4	0.387
8	0.791
12	1.244
16	1.877
20	2.498
24	3.125
28	3.135
32	3.315
36	3.347
40	3.462
44	3.502
48	3.730
52	3.755
56	3.853
60	3.877
64	4.073
68	4.016
72	3.968

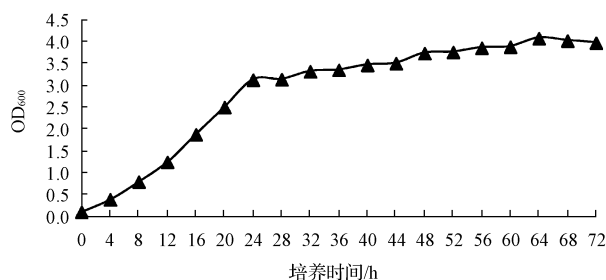


图 1 OD 值测定酵母菌 Y1 生长曲线

Fig. 1 The determination of growth curve of
the yeast Y1 by OD₆₀₀

延滞期、对数期、稳定期和衰亡期。其中,0~4 h 为延滞期,为菌体适应培养液中营养成分和菌体自身调整阶段;4~24 h 为对数生长期,24~68 h 为稳定期,但在此期间菌体数量还略有增加;68 h 以后进入衰亡期,菌体数量开始出现下降。

3 结论

通过分光光度法测定酵母菌不同生长时间高浓度培养液的 OD₆₀₀ 值,并对不同生长时间高浓度培养液进行相应倍数的稀释,建立了 4 组相关稀释倍数间的 OD₆₀₀ 值回归方程,并利用回归后的 OD₆₀₀ 值获得酵母菌 Y1 的生长曲线。试验结果表明,酵母菌 Y1 在适宜生长条件下菌体细胞生长出现 4 个阶段:延滞期、对数期、稳定期和衰亡期,其中,0~4 h 为延滞期,4~24 h 为对数生长期,24~68 h 为稳定期,68 h 以后进入衰亡期。

参考文献

- [1] Li Q, Du W, Liu D H. Perspectives of microbial oils for biodiesel production[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80: 749-756.
- [2] 杜凯,孙晓璐. 发酵性丝孢酵母发酵产油脂的碳源和氮源选择[J]. 中国油脂, 2010(7): 35-37.
- [3] 陶令霞,夏铁骑,常慧萍. 两种测定固氮菌 NT06 菌株生长曲线方法的比较[J]. 生物学杂志, 2007(5): 57-58.
- [4] Kamisaka Y, Noda N, Sakai T, et al. Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus[J]. Mortierella ramanniana var. angulisporea, Biochim Biophys Acta, 1999, 1438(2): 185-198.
- [5] 李学贵,袁生. 微生物转化过程中利用 OD 值实时监测细菌生物量变化的研究[J]. 南京师大学报, 2003(4): 92-93.
- [6] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社, 1999.
- [7] 童一中. 生物统计法[M]. 长沙:湖南科技出版社, 1986.
- [8] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社, 2002.

Growth Curves of Oleaginous Yeast in High Density Liquid Medium Determined by Spectrophotometry

MA Yong, TU Ya, CHEN Xiu-li, MEN Zhong-hua

(Department of Biological Sciences and Technology, Baotou Teachers College, Baotou, Inner Mongolia 014030)

Abstract: The oleaginous yeast OD₆₀₀ was determined through the spectrophotometer in different growth time which was in the high density liquid medium, and the high density liquid medium was diluted in different dilution which was in different growth time. Using the method of establishing set of regression equation of OD₆₀₀, yeast Y1 growth curve was drawn using the OD₆₀₀ values after the reunification. The results showed that the growth curve can accurately reflect the cell growth regular. Bacterial cells of yeast Y1 occurred four stages under suitable growth conditions, lag phase, 0~4 hours; logarithmic phase, 4~24 hours; stationary phase, 24~68 hours; decline phase, after 68 hours. This research aimed to provide research solutions to similar problems in detail and important information for related researchers.

Key words: oleaginous yeast; spectrophotometry; growth curve; regressive equation