

液态氮超低温冻结保藏酵母菌 42 个月效果的检测

贾建华 元伟
(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 本文报告了采用液氮超低温冷冻方法保藏 28 属 84 种 297 株酵母菌的结果, 42 个月后经检测全部菌株保持了存活能力。

关键词 酵母菌; 液氮超低温冻结

1982 年我们曾探索采用液态氮超低温的方法保藏酵母菌, 观察了 34 种酵母菌经冻结和溶化后的反应。其结果已于 1984 年发表^[1]。在此基础上, 1985 年, 将本室保存的全部酵母采取用该方法冻结保藏。本文报道 28 属、84 种、297 株酵母菌, 经液态氮冻结保藏 3 年半全部存活的结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

28 属 84 种 297 株酵母, 见表 1。

(二) 培养基

12 Brix 麦芽汁琼脂。

(三) 保护剂

10% 甘油 (G), 5% 二甲基亚砷 (D)。二者的浓度都是指悬液的最终浓度。分别分装入安瓿瓶中, 每个安瓿各 1 ml。

(四) 细胞悬液

于 28℃ 培养 3—5 天 (不同菌株培养时间不同) 的细胞, 分别悬浮于装有不同保护剂的安瓿中。

(五) 冻结和解冻

控制降温速度 1℃/分钟, 由室温将安瓿中悬液冻至 -40℃, 然后将安瓿置液氮箱中于气相 -156℃ 保存。

由液氮冰箱中取出安瓿后, 立即放入 40℃ 恒温水浴中振荡, 使其迅速解冻。

(六) 培养

用接种环将经过冻结保藏而溶化的菌悬液接种于麦芽汁斜面上, 28℃ 培养 72 小时后, 观察生长情况。

结 果

所检测的 28 属、84 种、297 株酵母菌, 经

表 1 28 属、84 种、297 株酵母菌经液氮超低温冻结保藏 42 个月的结果

酵母名称	保护剂		G		D	
	结果		测定株数	存活株数	测定株数	存活株数
<i>Ashbya gossypii</i>			2	2	2	
<i>Bullera alba</i>			1	1	1	1
<i>B. sinensis</i>			1	1	1	1
<i>Candida albicans</i>			1	1	1	1
<i>C. arborea</i>			1	1	1	1
<i>C. famata</i>			2	2	2	1
<i>C. guilliermondii</i>			2	2	2	
<i>C. inconspicua</i>			1	1	1	1

酵母名称	保护剂 结果	G		D	
		测定株数	存活株数	测定株数	存活株数
<i>C. krusei</i>		1	1	1	1
<i>C. lambica</i>		1	1	1	1
<i>C. lipolytica</i>		6	6	6	6
<i>C. macedoniensis</i>		1	1	1	1
<i>C. parapsilosis</i>		3	3	3	3
<i>C. pseudotropicalis</i>		1	1	1	1
<i>C. rugosa</i>		10	10	10	10
<i>C. solani</i>		1	1	1	1
<i>C. tropicalis</i>		5	5	5	5
<i>C. utilis</i>		4	4	4	4
<i>C. vini</i>		1	1	1	1
<i>Candida</i> sp.		6	6	6	6
<i>Citeromyces matritensis</i>		2	2	2	2
<i>Crebrothecium ashbyii</i>		3	3	3	3
<i>Cryptococcus laurentii</i>		2	2	2	2
<i>C. neoformans</i>		1	1	1	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>		4	4	4	4
<i>D. polymorphus</i>		1	1	1	1
<i>D. pseudopolymorphus</i>		1	1	1	1
<i>Endomyces decipiens</i>		1	1	1	1
<i>Geotrichum candidum</i>		3	3	3	3
<i>G. ludwigii</i>		1	1	1	1
<i>G. robustum</i>		1	1	1	1
<i>G. suaveolens</i>		1	1	1	1
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>		1	1	1	1
<i>Hansenula anomala</i>		27	27	27	27
<i>H. arabitoligenes</i>		1	1	1	1
<i>H. beckii</i>		1	1	1	1
<i>H. bismundalis</i>		2	2	2	2
<i>H. capsulata</i>		1	1	1	1
<i>H. dadinii</i>		2	2	2	2
<i>H. minuta</i>		1	1	1	1
<i>H. meakii</i>		1	1	1	1
<i>H. petersonii</i>		1	1	1	1
<i>H. saturnus</i>		2	2	2	2
<i>H. silvicola</i>		1	1	1	1
<i>H. subpelliculosa</i>		8	8	8	8
<i>H. wingei</i>		1	1	1	1
<i>Kloeckera apiculata</i>		4	4	4	4
<i>Kluyveromyces lactis</i>		1	1	1	1
<i>K. marxianus</i>		2	2	2	2
<i>K. thermotolerans</i>		1	1	1	1
<i>Lipomyces starkeyi</i>		1	1	1	1

续表 1

酵母名称	保护剂 结果	G		D	
		测定株数	存活株数	测定株数	存活株数
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		1	1	1	1
<i>Pichia burtonii</i>		1	1	1	1
<i>P. farinosa</i>		5	5	5	5
<i>P. membranaefaciens</i>		4	4	4	4
<i>P. ohmeri</i>		1	1	1	1
<i>P. wickerhamii</i>		1	1	1	1
<i>Rhodospiridium toruloides</i>		1	1	1	1
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>		1	1	1	1
<i>R. glutinis</i>		4	4	4	4
<i>R. lactosa</i>		1	1	1	1
<i>R. minuta</i>		4	4	4	4
<i>R. marina</i>		1	1	1	1
<i>R. rubra</i>		6	6	6	6
<i>R. sinensis</i>		1	1	1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		87	87	87	87
<i>Saccharomycodes exiguus</i>		2	2	2	2
<i>S. ludwigii</i>		3	3	3	3
<i>S. sinenses</i>		1	1	1	1
<i>Sascharomycopsis capsularis</i>		1	1	1	1
<i>S. fibuligera</i>		2	2	2	2
<i>S. lipolytica</i>		3	3	3	3
<i>Schzosaccharomyces octosporus</i>		2	2	2	2
<i>S. pombe</i>		4	4	4	4
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>		1	1	1	1
<i>S. roseus</i>		3	3	3	3
<i>S. salmonicolor</i>		2	2	2	2
<i>Torulaspora delbrueckii</i>		4	4	4	4
<i>Trichosporon capitatum</i>		1	1	1	1
<i>T. cutaneum</i>		4	4	4	4
<i>Wickerhamia fluorescens</i>		1	1	1	1
<i>Zygosaccharomyces baslii</i>		2	2	2	2
<i>Z. bisporus</i>		1	1	1	1
<i>Z. microellipsoides</i>		1	1	1	1
<i>Z. rouxii</i>		9	9	9	9

超低温冻结保藏 42 个月后全部保持着生活能力(表 1)。

讨 论

利用本文所介绍的方法, 28 属 84 种 297 株酵母菌经冻结保藏 42 个月后全部保持着生

活能力。关于用液氮冻结保存的菌种的生理特
性问题, 根据我室的观测, 凡经冻结保藏一段时
期, 溶化后经培养而保持着生活能力的菌株, 一
般都保持着冻结保藏前的生理活性。如我室曾
测定过酵母菌产乙醇、乙酸乙酯、脂肪酶活力、
嗜渗透压的能力^[4]; 犁头霉产 α -半乳糖苷酶; 根

霉产反丁烯二酸、葡萄糖苷酶、果胶酶、脂肪酶；毛霉产蛋白酶^[2]；曲霉的糖化酶、蛋白酶、产柠檬酸、亚甲丁二酸^[3]；23 种 41 株食用担子菌经冻结保藏后再经栽培形成子实体（出菇）的能力^[4]；短杆菌产异亮氨酸、铜绿假单孢菌产 2-酮基-L-古龙酸；大肠杆菌产青霉素酰化酶；植物乳杆菌产乳酸；溶表微球菌对溶菌酶的敏感性^[5]，金色产色链霉菌产多氧霉素；龟裂链霉菌产土霉素；玫瑰暗黄链霉菌和微白链霉菌产蛋白酶^[6]等等。上述被检测的各种菌种的生理特性都保持着冻结保藏前所具有的活力。由此可

见液态氮超低温冻结保藏酵母菌种是一种较可靠的方法。其缺点是必须定期向贮罐补充液氮来保持其温度，否则一旦液氮挥发完后温度上升，则冻结的菌株将会大部分死亡。

参 考 文 献

1. 李钟庆, 元 伟: 真菌学报, 3(3): 178—187, 1984。
2. 朱丽钊, 李钟庆: 真菌学报, 6(1): 46—50, 1987。
3. 谢玉梅, 丛兆海: 真菌学报, 6(1): 51—57, 1987。
4. 陈燕研: 真菌学报, 6(2): 110—117, 1987。
5. 马延生: 微生物学报, 26(2): 164—169, 1986。
6. 周玉瑶, 李钟庆: 微生物学论文集, 45—51 页, 科学出版社, 北京 1985。