

# 杏鲍菇液体菌种质量评价及标准研究初探

冀 宏<sup>1</sup>, 梁永军<sup>2</sup>, 柳 宁<sup>1</sup>, 姚璐晔<sup>1</sup>, 王 慧<sup>2</sup>, 宋 驰<sup>1</sup>

(1. 常熟理工学院 生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500; 2. 山东万芝园食用菌科技有限公司, 山东 日照 276800)

**摘 要:**以杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)的4个品种为试材,采用液体发酵培养的方法,测量液体发酵过程中菌丝球密度、干重、直径以及发酵液 pH 值、还原糖等指标,研究液体发酵过程中菌丝球的生长情况及发酵液的变化;并通过感官检测、显微镜观察和菌丝球回接试验探索优良的液态杏鲍菇菌丝体的感官指标、生化指标和微生物学指标。结果表明:优质杏鲍菇液体菌种质量标准具体为菌液为淡黄色澄清状,含浓郁的苦杏仁味,无杂菌污染;菌丝球肉眼可见,洁白、均匀、表面有毛刺、直径<2.5 mm 且浓度达到 80%~100%;显微镜下菌丝体粗壮,每个视野有 3~4 个锁状联合;一般发酵时间为 120~144 h。

**关键词:**杏鲍菇;液体菌种;标准

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>41 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0128-05

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*),又名刺芹侧耳、雪茸等,是一种高品质、高营养的大型肉质伞菌<sup>[1]</sup>。杏鲍菇营养成分丰富,具有抗癌、抗氧化、降血脂等多种保健功能,在医药界具有明显的商品效应,又因其风味独特、口感鲜美,在食用菌界也深受喜爱,被列为 21 世纪最具有开发潜力的食用菌之一<sup>[2-3]</sup>。

目前我国杏鲍菇工厂化栽培大部分采用传统的栽培模式,即三级固体菌种制作方式。但是,固体菌种的生产过程较为繁琐、生长周期长、污染率高,经济效益低,再加上季节的影响,在一定程度上减缓了杏鲍菇的生产,使得杏鲍菇产业化发展受到制约<sup>[4]</sup>。而液体菌种相比于固体菌种,具有制种方便、培养时间短、接种快、效率高等优势<sup>[5-6]</sup>。目前,杏鲍菇菌种质量标准在我国已颁布并实施,但是只规定了杏鲍菇固体菌种标准,对检测液体菌种活力的方法和质量标准尚未统一,制约了杏鲍菇液体菌种的推广应用。因此优质液体菌种的质量控制指标对杏鲍菇液体菌种工厂化生产具有现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 杏鲍菇(*P. eryngii*)母种保藏于常熟理工学院食用菌工程技术实验室。选取菌种质量相对

较好、接受度高的 4 个品种 CS001(东张保龄球状)、CS002(东张柱状)、CS003(正兴保龄球状)、CS004(正兴柱状)为检测对象。试验前先将母种转管活化。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯(洗净、去皮)200 g 取汁、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL, pH 自然<sup>[7]</sup>。液体培养基:葡萄糖 30 g、磷酸二氢钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、琼脂 2 g、维生素 B<sub>1</sub> 0.01 g、胰蛋白胨 2 g、酵母浸出汁 5 g、水 1 000 mL, pH 自然<sup>[8]</sup>。

### 1.2 试验方法

将制备好的液体培养基分装于 250 mL 三角瓶中,装液量为 100 mL,棉塞封口。每瓶接入 3 块约 0.25 cm<sup>2</sup> 大小经活化的斜面菌块,25℃ 恒温培养箱内静置培养 2 d 后,转入恒温摇床中,25℃,180 r/min 振荡培养 48、72、96、120、144、168、192、216 h 后,测定各生理指标。

### 1.3 项目测定

1.3.1 感官检测 菌液气味:在发酵前期培养液气味会较浓郁,随着发酵时间增长,气味会渐渐带有杏鲍菇的特殊香味。若有杂菌污染,则会闻到甜、霉臭、酒精等异味<sup>[9-11]</sup>。菌液澄清度:前期培养基中含有大分子的营养物质,故稍显浑浊,但随着发酵时间延长,菌丝不断生长,营养物质渐被利用,菌液会变得越来越澄清,大多呈淡黄色或橙黄色<sup>[12]</sup>。若是感染细菌、放线菌、酵母菌的菌液则很浑浊,且颜色也不一样<sup>[13]</sup>。菌丝球观察:肉眼可见,菌球表面有毛刺说明生长旺盛;后期,毛刺消失,菌丝球外部光滑或者菌丝球轮廓不清、甚至整个培养基处于粘稠的粥状物,则说明菌球老化。

1.3.2 菌丝球检测 菌丝球密度测定:将培养好的液体培养基摇匀,从摇瓶中吸取 1 mL 培养液,置于平皿中,

**第一作者简介:**冀宏(1969-),男,博士,教授,研究方向为食药菌工程菌种研究及现代农业技术经济与管理。E-mail:jihong8848@126.com。

**基金项目:**山东省日照市科技局 2014 年应用技术与开发资助项目“杏鲍菇良种繁育及液体菌种生产技术应用研究”。

**收稿日期:**2015-12-18

展开,直观计数,最后计算培养基中菌丝球密度的平均值。菌丝球干重测定:均匀吸取 30 mL 培养液,经 80 目筛网过滤,用无菌生理盐水洗涤,至洗涤液澄清。将菌丝球置于定量滤纸上,60℃烘干 2 h 后,称重,之后继续烘干,并每隔 30 min 称重 1 次,直至恒重(2 次称量差不超过 2 mg),即为干重,最后计算培养基中菌丝干重的平均值。菌丝球直径测定:随机吸取 1 mL 培养液,将其中的菌丝球排列成直线,清点菌球数量,用刻度尺测其总长度,计算每个菌丝球的平均直径,每瓶菌种重复 3 次,最后分别计算 4 种杏鲍菇菌丝球直径的平均值。

1.3.3 显微镜观察 取干净载玻片,滴 1 滴无菌水,用无菌操作方法挑取少量菌丝涂于水滴中,盖上盖玻片,置于光学显微镜下用 10×40 倍数观察菌丝形态是否粗壮、丰满、均匀,是否有锁状联合,并统计视野中锁状联合的数量。

1.3.4 回接平板检测 无菌条件下分别从发酵液中挑取单个大小一致的菌丝球接种到含有 PDA 培养基的平板中央,每种 3 个重复。试验从发酵第 3 天起,对振荡培养时间 72、96、120、144、168、192、216 h 的液体菌种进行 PDA 平板回接,25℃避光培养,测量菌落直径,计算菌丝日均生长速度。菌丝体生长速度(cm/d)=菌落半径(cm)/生长天数(d)。

1.3.5 pH 值测定 每个摇瓶均匀吸取 30 mL 培养液,经 80 目筛网过滤,用手持式 pH 计测量滤液的 pH 值。

1.3.6 还原糖检测 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定培养液中还原糖的含量<sup>[14]</sup>。

#### 1.4 数据分析

试验重复 3 次,数据的统计和分析使用 SPSS 13.0 和 Excel 2003 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 感官观察

2.1.1 菌液气味 发酵前期,因为液体培养基中含有酵母浸出汁和蛋白胨的缘故,培养液气味浓郁,带有特殊的甜味和肉香味。发酵中期(96 h 后),气味会渐带有杏鲍菇的特殊气味,即甜味与杏仁味并存。

2.1.2 菌液澄清度 4 种杏鲍菇菌种接种液体培养基后,均在第 2 天菌液开始出现浑浊,这是因为菌丝正在进行生长代谢,大量菌丝萌发;后期营养物质被利用,导致菌液越来越澄清,且颜色相对开始时较淡,最终呈淡黄色。

2.1.3 菌丝球观察 肉眼观察到前期,菌丝球表面有毛刺,数量不断增多;显微镜下可发现液体发酵至 144 h 含较多锁状联合(部分品种锁状联合情况见图 1),每个视野至少 3~4 个锁状联合,且菌丝较粗壮,说明该时段菌丝球生长旺盛;而发酵后期,菌丝体老化,轮廓不清,培养基也变得粘稠,呈粥状。

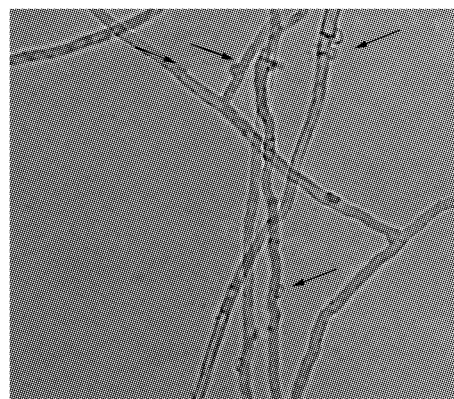


图 1 CS001(东张保龄球状)培养 144 h 的锁状联合

Fig. 1 The clamp connection of CS001 in liquid fermentation for 144 hours

### 2.2 发酵中菌丝球密度的变化

4 种杏鲍菇液体菌种在不同发酵终点的菌丝球密度的结果见图 2。4 种杏鲍菇液体菌种在不同发酵终点的菌丝球密度变化趋势基本相同,呈先降后升再降的趋势。这是因为发酵前期菌丝球多处于生长状态,菌液中菌丝球的密度呈下降趋势;而发酵中期,大量菌丝球成型,数量增多,密度上升,发酵 144 h 达到最大量,1 mL 菌液菌丝球的数量均在 20 个以上;发酵后期,因生长空间有限,数量增长减慢,菌球侧重于增大,同时因衰退期的来临,菌丝球也存在老化的现象,故而密度下降。因而,1 mL 菌液中菌丝球数量大于 20 个时,可视为优良杏鲍菇液体菌种。

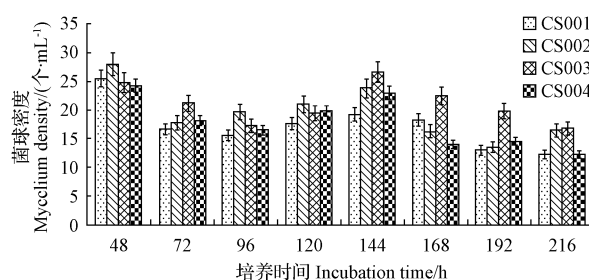


图 2 发酵中菌丝球密度的变化

Fig. 2 Changes of density of mycelial pellets in submerged culture

### 2.3 发酵中菌丝球干重的变化

4 种杏鲍菇液体菌种在不同发酵终点的菌丝球干重变化见图 3。4 种杏鲍菇液体菌种在不同发酵终点的干重变化均呈先升后降趋势。随发酵时间的延长,菌丝均处于增长期,生物量快速提高,液体菌种活力旺盛。此后,菌丝球渐渐老化,生长速度减缓,进入衰退期,生物量因此不断下降,与上面密度的变化相吻合。因而,1 000 mL 菌液中菌丝体干重达到 10~15 g 时的液体菌种,可视为优良杏鲍菇液体菌种。

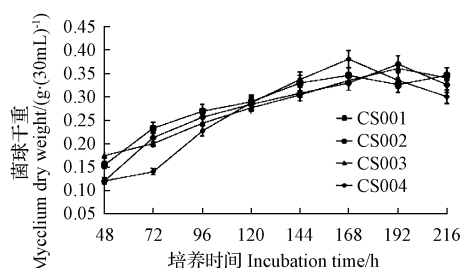


图3 发酵中菌丝球干重的变化

Fig. 3 Changes of dry weight of mycelial pellets in submerged culture

#### 2.4 发酵中菌丝球直径的变化

由图4可以看出,4种杏鲍菇液体菌种的菌丝球直径在不同发酵终点均呈先升后降再趋于平缓趋势。这是因为发酵前期新生菌丝处于延滞期,长速慢,大部分转接的菌丝处于生长的状态,直径上升,且发酵至96 h达到最大值;发酵中期,大量新生菌丝球成型,数量增多,相对直径下降,发酵144 h直径达到最低值,可见该时段菌丝生长旺盛,活力强。随着发酵时间的延长,菌球因空间、营养等限制,菌丝球进入老化阶段,故直径变化趋于平缓,与不同发酵终点密度的变化相吻合。因而,直径小于2.5 mm的菌丝球,可视为优良杏鲍菇液体菌种。

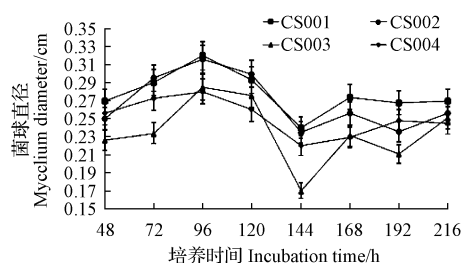


图4 发酵中菌丝球直径的变化

Fig. 4 Changes of diameter of mycelial pellets in submerged culture

#### 2.5 发酵后回接菌丝的生长速度变化

4种杏鲍菇液体菌种在不同发酵终点回接平板后25℃培养3、4、6、8 d时的菌丝生长速度变化见图5~8。结果分析发现,发酵至144 h回接平板培养3 d的菌丝球长速最快,菌丝粗壮洁白,发酵至120 h回接平板的菌丝长速次之;同样,这2个发酵终点回接平板培养4 d的菌丝长速也是如此;但是,平板培养6 d以后,不同发酵终点回接平板的菌丝的生长速度处于同一水平。故菌丝生长速度最快的是发酵终点144 h时的菌丝球,此时菌丝活力最高,可确定144 h为杏鲍菇液体菌种生产的最佳发酵周期。

回接平板试验还表明,发酵96 h时回接平板后菌丝

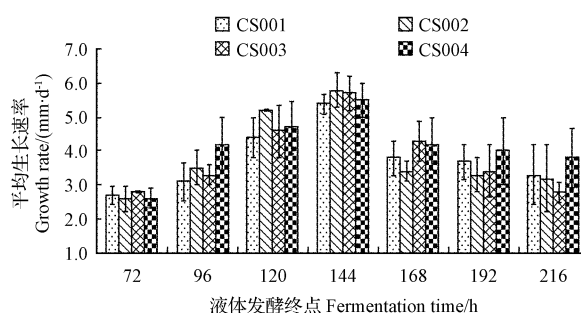


图5 不同发酵终点平板培养3 d的生长速率

Fig. 5 The growth rate in plate culture for 3 days

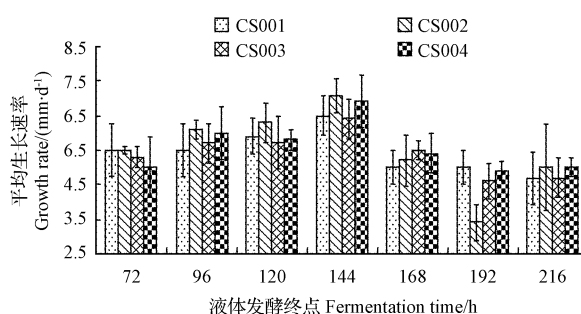


图6 不同发酵终点平板培养4 d的生长速率

Fig. 6 The growth rate in plate culture for 4 days

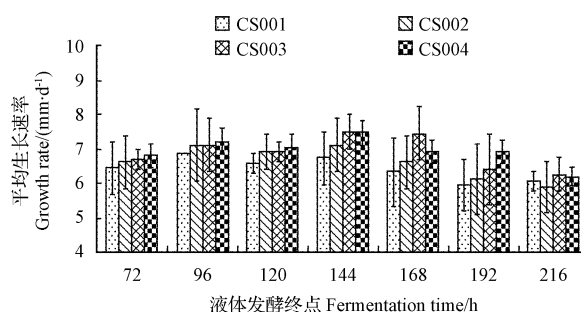


图7 不同发酵终点平板培养6 d的生长速率

Fig. 7 The growth rate in plate culture for 6 days

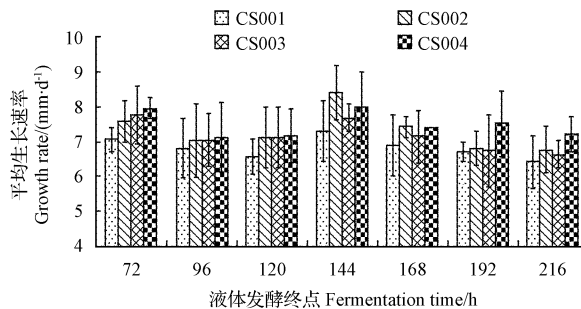


图8 不同发酵终点平板培养8 d的生长速率

Fig. 8 The growth rate in plate culture for 8 days



长满平板需要 11 d 的时间,而发酵至 120、144 h 时回接平板后菌丝长满平板只需要 10 d 时间,符合国家颁布的杏鲍菇菌种质量标准(NY862,《食用菌技术标准汇编》)<sup>[15]</sup>;而发酵至 192、216 h 时回接平板后菌丝生长缓慢,有污染率增加的风险。

2.6 发酵液 pH 值的变化

杏鲍菇属于木腐类真菌,菌液 pH 范围在 3~6 都有利于菌丝的生长<sup>[16]</sup>。4 种杏鲍菇液体菌种在不同发酵终点的菌液 pH 值变化见图 9,结果分析表明,杏鲍菇液体菌种在不同发酵终点的菌液 pH 值呈现先上升后下降再上升的趋势。发酵初期,由于菌丝还处于适应期,新生菌丝量不多,故分解代谢强于合成代谢,pH 值上升<sup>[17]</sup>;而后菌丝球进入快速增长期,生物量快速提高的同时有氧化代谢活动增强,二氧化碳和有机酸大量产生,菌液 pH 值下降,并在 144 h 达到最低值。此后,菌丝球渐老化且自溶,pH 值有所上升。

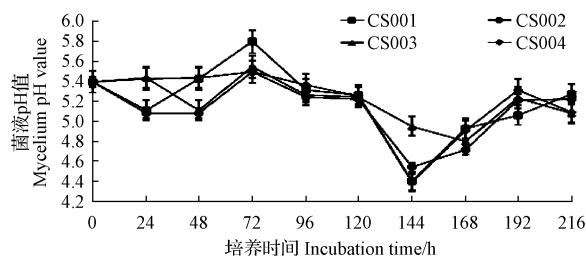


图 9 发酵液 pH 值的变化  
Fig. 9 Changes of the pH value in submerged culture

2.7 发酵液还原糖含量的变化

4 种杏鲍菇液体菌种在不同发酵终点发酵液还原糖含量的变化趋势见图 10。结果表明,4 种杏鲍菇菌种在不同发酵终点的还原糖含量变化趋势相同,均呈现为不断下降趋势,但在不同的发酵终点下降速率不同。发酵前 96 h,还原糖含量下降不明显,下降速度较为缓慢,这是因为发酵初期转接的菌丝占主导,新菌丝还处于适应阶段,菌丝球虽在消耗还原糖,但消耗速度较慢。随着培养时间的延长(96~192 h),新的菌丝开始大量生长,菌丝球数量增多,导致碳源物质消耗加大,还原糖消耗速率加快,下降趋势明显。发酵后期(192 h 后),培养基中营养物质大量消耗,相对的代谢产物不断积累,因而菌丝球生长速度减慢,还原糖下降也趋于缓慢。

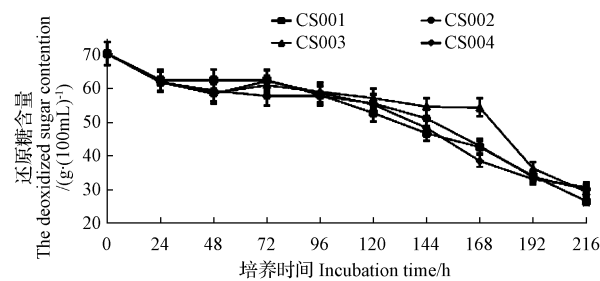


图 10 发酵液中还原糖含量的变化  
Fig. 10 Changes of deoxidized sugar content in submerged culture

3 结论与讨论

3.1 感官指标

表 1

杏鲍菇液体菌种感官指标

Table 1 The sensory parameters of *Pleurotus eryngii* mycelium

检测项目 Test items		杏鲍菇优质液体菌种 High quality of <i>Pleurotus eryngii</i> liquid spawn	杏鲍菇次、差液体菌种 Poor quality of <i>Pleurotus eryngii</i> liquid spawn
菌液 Liquid culture	气味	具有特殊苦杏仁的香味	具甜味、霉臭或酒精等味道
	澄清度	前期略浑浊,后期越来越澄清	菌液很浑浊,可能染细菌、霉菌或酵母菌等
	颜色	淡黄色或橙黄色	红色或者黄褐色等
	密度	菌球浓度达到 80%~100% 1 mL 菌液菌丝球数量>20 个	<80%且菌丝球悬浮力差
菌丝球 Pelleted mycelia	大小	大小均匀,界限分明	大小不一或轮廓不清
	干重	菌丝体达到 1.0~1.5 g/100mL	过高过低说明未达到最佳发酵时间
	直径	80%菌球直径<2.5 mm	直径过大,菌种活力不够旺盛
	特征	颜色洁白,表面有毛刺	颜色变暗,外部光滑
容器内壁		允许少量白色棉毛状菌膜	菌膜颜色较深,如黑色、青色等

3.2 微生物指标

表 2

杏鲍菇液体菌种微生物学指标

Table 2 The microbiological parameters of *Pleurotus eryngii* mycelium

检测项目 Test items		杏鲍菇优质液体菌种 High quality of <i>Pleurotus eryngii</i> liquid spawn	杏鲍菇次、差液体菌种 Poor quality of <i>Pleurotus eryngii</i> liquid spawn
菌丝生长状态 Hyphae growth situation		粗壮、均匀、丰满	菌丝细长、分叉多,出现空泡
锁状联合 Clamp connection		较多(3~4 个/视野)	较少甚至无
杂菌 Contamination		无	细菌,酵母菌,霉菌等

## 3.3 生化指标

表 3

杏鲍菇液体菌种生化指标

Table 3

The biochemical parameters of *Pleurotus eryngii* mycelium

检测项目 Test items	杏鲍菇优质液体菌种 High quality of <i>Pleurotus eryngii</i> liquid spawn	杏鲍菇次、差级液体菌种 Poor quality of <i>Pleurotus eryngii</i> liquid spawn
发酵液还原糖含量 Deoxidized sugar concentration	还原糖下降速率快,活力旺盛	还原糖下降趋缓,菌丝球进入衰老期
发酵液 pH 值测定 Liquid culture pH value	pH 3~4	pH 值偏高

通过研究不同杏鲍菇液体菌种在不同发酵终点的密度、直径、pH 值、还原糖以及生物量的变化规律,发现杏鲍菇不同菌种之间存在着明显的相关性,有助于找出其中的规律建立液体菌种质量检测标准。但该研究仅研究了不同发酵终点菌丝球生长的变化,并通过数据分析找出了杏鲍菇优势菌种的标准,而其它控制参数(如温度、溶氧量等)未进行研究,因此,该标准还需进一步深入地研究,以找到最佳最完善的杏鲍菇液体菌种质量标准。

## 参考文献

- [1] 郭美英. 珍稀食用菌杏鲍菇生物学特性的研究[J]. 福建农业学报, 1998(3):45-50.
- [2] 袁建平, 马立芝, 郭晓燕. 杏鲍菇液体菌种保存方法试验[J]. 食用菌, 2005(5):18-19.
- [3] 吴祖峰. 杏鲍菇液体发酵的初步研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2007.
- [4] 郭团玉, 陈峰, 陈锡雄. 杏鲍菇液体菌种培养及应用初探[J]. 食用菌, 2006(5):25-27.
- [5] 沈敏, 李文生, 周雷. 杏鲍菇液体菌种研制与工厂化栽培应用[J]. 中国农技推广, 2011(6):14-15.
- [6] 戴建清, 曾志恒. 食用菌液体菌种研究现状及发展趋势[J]. 中国食用菌, 2012(5):1-3.
- [7] 秦艳梅, 王娟萍, 冀宏. 杏鲍菇液体菌种的生产工艺优化与应用[J]. 中国食用菌, 2008(4):28-30.
- [8] 杨丽维, 王玉, 班立桐, 等. 杏鲍菇液体菌种培养基的筛选和优化[J]. 北方园艺, 2014(6):150-152.
- [9] 王凤芳. 杏鲍菇中营养成分的分析测定[J]. 食品科学, 2002(4):132-135.
- [10] 陈亚凡, 李力, 郑永刚. 食用菌液体菌种生产中几个问题的探讨[J]. 宁夏农林科技, 2005(6):82-83.
- [11] 戴建清, 曾志恒. 食用菌液体菌种研究现状及发展趋势[J]. 中国食用菌, 2012(5):1-3.
- [12] 王稳, 朱忠贵, 李萍萍. 食用菌液体菌种的几种实用检测方法[J]. 食用菌, 2005(1):20-21.
- [13] 高连超, 李咏. 液体菌种接种后染杂菌原因剖析[J]. 中国食用菌, 2004(1):36.
- [14] 李维焕, 于兰兰, 韩峰, 等. 2 种食用菌液体菌种发酵终点的质量变化检测方法[J]. 中国酿造, 2010(11):160-162.
- [15] 郑丽雪, 李尧尧, 郑雪平, 等. 基于生物量的杏鲍菇菌株筛选及液态摇瓶发酵培养条件的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(12):4040-4049.
- [16] 于海龙, 郭倩, 杨娟, 等. 环境因子对食用菌生长发育影响的研究进展[J]. 上海农业学报, 2009(3):100-104.
- [17] 刘冠升, 屠洁, 张久成, 等. 杏鲍菇液体菌种的制备研究[J]. 北方园艺, 2009(11):230-232.

Research on Quality Evaluation and Standard System of *Pleurotus eryngii* Liquid Spawn

Ji Hong<sup>1</sup>, LIANG Yongjun<sup>2</sup>, LIU Ning<sup>1</sup>, YAO Luyi<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, SONG Chi<sup>1</sup>

(1. School of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500; 2. Shandong Wanzhiyuan Mushroom Company, Rizhao, Shandong 276800)

**Abstract:** The mycelial growth activity in liquid culture were studied using four species of *Pleurotus eryngii*. Mycelial density, dry weight, diameter, pH value, growth rate and the deoxidized sugar concentration were investigated. Moreover, the sensory, biochemical and microbiological parameters of excellent *P. eryngii* mycelium were determined by microscopic morphology detection and mycelia pellets back inoculation experiments. The results showed *P. eryngii* liquid spawn quality standard was that the culture liquid which was light yellow, clarified and bitter almond flavor. While the hypha ball was visible, white, uniform size, burr, and its diameter < 2.5 mm, concentration reached 80%—100%. By microscope, the mycelium was robust, which contained 3—4 per visual fields and without sundry bacterium. The excellent *P. eryngii* mycelium was obtained through liquid fermentation for 120—144 hours.

**Keywords:** *Pleurotus eryngii*; liquid strain; standard