

平菇液体发酵菌株的筛选

赵玉卉, 路等学, 韩润冰, 王 龙, 秦 鹏

(甘肃省科学院 生物研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘 要:以甘肃省主栽的5种平菇菌株(“德丰5号”“灰美2号”“8129”“抗病3号”“802”)为试材,通过液体发酵培养筛选适合液体菌种制作的菌株,并对筛选出的菌株进行中试发酵及栽培试验。结果表明:适合液体菌种制作的菌株有“802”和“德丰5号”;液体菌种栽培与固体菌种栽培相比,“802”与“德丰5号”的生物学效率分别提高了12.5%、13.2%。

关键词:平菇;液体发酵;筛选;中试

中图分类号:S 646.1⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0149-03

平菇(*Pleurotus ostreatus*)属侧耳科侧耳属,又名侧耳、糙皮侧耳,是目前我国栽培最多的4种主要食用菌(平菇、香菇、草菇、蘑菇)之一,栽培面积逐年增加^[1]。液体菌种发酵技术比传统的固体菌种培养方法有明显的优越性^[2],生产周期短、接种方便、生长快、成品率高等,有利于平菇规模化机械化生产。现以甘肃省大规模栽培的5个平菇菌株品种为研究对象,筛选出适合液体发酵的菌株,并进行中试发酵及栽培试验,以期平菇的工厂化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试平菇品种“德丰5号”“灰美2号”“8129”“抗病3号”引自江苏江都天达食用菌研究所,“802”为甘肃省科学院生物研究所保存菌种。

母种培养基:马铃薯20%,葡萄糖1.5%,酵母膏0.2%,蛋白胨0.2%,磷酸二氢钾0.1%,磷酸氢二钾0.1%,硫酸镁0.05%,琼脂2%,水1 000 mL,pH自然。

液体专用母种培养基:麸皮88.5%,锯末10%,玉米粉0.8%,黄豆粉0.3%,磷酸氢二钾0.15%,磷酸二氢钾0.15%,硫酸镁0.1%,料水比=1:1.25(锯末用3 mm筛子取下面,1 mm筛子取上面)。

液体发酵培养基:玉米粉2%,黄豆粉1%,磷酸氢二钾0.15%,磷酸二氢钾0.15%,硫酸镁0.1%,维生素B₁一片,加水至1 L,pH自然。

发酵罐培养基配方:马铃薯10%,麸皮4%,红糖1.5%,葡萄糖1%,蛋白胨0.2%,KH₂PO₄ 0.2%,MgSO₄ 0.1%,维生素B₁一片,泡敌0.03%,链霉素0.1 g·L⁻¹。

栽培培养基:棉籽壳76%+麸皮7%+锯末22%+玉米粉2%+黄豆粉2%+石灰1%+少许MgSO₄,料水比=1:1.25。

玉米粉、黄豆粉为现磨农家粉,试剂均采用分析纯试剂,全禾牌发酵罐QH-IV型发酵罐。

1.2 试验方法

1.2.1 液体菌株筛选试验 将5种菌株的试管种切成0.5 cm见方的小块,无菌条件下,接种到装有液体发酵培养液200 mL的500 mL的三角瓶中,每瓶接种菌块8~12块,每个菌株接6个三角瓶,25℃静置培养48 h,待菌丝萌发,摇床转速150 r·min⁻¹,温度25℃,培养6 d后,测定菌丝球直径、菌球密度、菌球干质量、污染率,观察菌球的紧实度。

1.2.2 中试试验 将筛选出的适合液体发酵的菌株进行摇床培养,培养5 d得液体一级种,无菌条件下接入发酵罐发酵。进气压力0.07 MPa,罐内压力0.04 MPa,温度24~26℃,发酵3 d结束发酵,得液体二级种,用于栽培试验。

1.2.3 液体菌种与固体菌种栽培比较试验 将发酵罐培养的液体菌种无菌条件下装入食用菌液体菌种储存接种一体机中^[3]进行栽培试验,以同品种的固体菌种为对照,每30个菌棒为1组,设4次重复,比较液体菌种与固体菌种间的差异。

1.3 项目测定

1.3.1 菌球直径 取1 mL发酵液在量筒中用蒸馏

第一作者简介:赵玉卉(1982-),女,甘肃民勤人,本科,助理研究员,现主要从事食用菌品种选育及栽培技术研究和示范推广等工作。E-mail:yuhuihao51@163.com。

责任作者:路等学(1962-),男,甘肃镇原人,硕士,高级工程师,现主要从事食用菌遗传育种及功能食用菌等研究工作。E-mail:ludengxue@126.com。

基金项目:甘肃省科学院应用基础研究资助项目(2012yj-02);国家自然科学基金资助项目(31560037)。

收稿日期:2016-07-26

水稀释 10 倍,摇匀后取 20 个菌球在培养皿中排成一排,测定总长度,然后计算单个菌球直径,取 3 次平均值。

1.3.2 菌球密度 将培养好的液体菌种摇匀后,取 1 mL 发酵液于量筒中用蒸馏水稀释至 10 mL,置于培养皿中,皿下衬方格直观计数,取 3 次平均值。

1.3.3 菌球干质量 将发酵液用 80 目筛过滤出菌球,清水洗涤数次,然后放入干燥箱 105 ℃烘干 2 h,冷却后称重,然后再放入干燥箱中,105 ℃烘干 0.5 h 再称重,直至 2 次称量的质量差不超过 2 mg 即为恒重。

1.3.4 液体菌种无菌检验 细菌检验:发酵开始至结束每隔 24 h,取发酵液 1 次,每次取样不少于 10 mL,无菌条件下接入专用细菌培养平皿中,接种平皿 10 个,置于 36 ℃恒温培养,培养 72 h,观察有无细菌污染。真菌检验:发酵开始至结束每隔 24 h,取发酵液 1 次,每次取样

不少于 10 mL,无菌条件下接入专用真菌培养平皿中,接种平皿 10 个,置于 25 ℃恒温培养,培养 72 h,观察有无真菌污染。当发酵液同时通过细菌、真菌污染检验时,为合格菌种。

1.4 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 液体菌株筛选结果

由表 1 可知,液体培养的 5 种平菇菌株的生长情况差异较大,菌球直径为 1.33~2.05 mm,菌球密度最高达 221 个·mL⁻¹,最低仅 168 个·mL⁻¹,菌丝干质量最多达 26.25 g·(100mL)⁻¹,最低为 18.64 g·(100mL)⁻¹,菌球的紧实度较好的是‘802’和“德丰 5 号”,经无菌检验为合格菌种。

表 1

不同菌株在液体培养基中的生长情况

Table 1

Growth of different strains in liquid medium

菌株 Strain	菌球直径 Bacteria ball diameter/mm	菌球密度 Bacteria ball density/(个·mL ⁻¹)	菌球紧实度 Bacteria ball firmness	菌球干质量 Bacteria ball dry weight/(g·(100mL) ⁻¹)	污染率 Contamination rate/%
‘802’	1.50	213	++++	25.52	0
“抗病 3 号”	2.05	189	++	20.14	0
“德丰 5 号”	1.33	221	++++	26.25	0
“灰美 2 号”	2.00	192	++	19.62	0
‘8129’	1.66	168	++	18.64	0

注:++++表示紧实度较好,++紧实度一般。

Note:++++ shows firmness better,++ shows firmness general.

在 5 个供试菌株中,“德丰 5 号”和‘802’的菌球直径较小,分别为 1.33 mm 和 1.50 mm,菌球密度较大的也是“德丰 5 号”和‘802’,分别为 221 个·mL⁻¹和 213 个·mL⁻¹,菌球干质量较重的为“德丰 5 号”和‘802’,分别为 26.25 g·(100mL)⁻¹和 25.52 g·(100mL)⁻¹,‘802’与“德丰 5 号”发酵结束后,发酵液透明清亮,说明菌丝对营养成分吸收充分,生物学转化率高。因此在 5 个菌株中,“德丰 5 号”和‘802’性状表现好,适合液体培养。

2.2 中试试验

将筛选出适合液体发酵的“德丰 5 号”和‘802’在装有发酵培养基的发酵培养罐中,无菌条件下接入摇床培养。结果表明,发酵培养最适时间为 3 d,取发酵过程及发酵完成后的菌球进行无菌检验,经检验合格后作为栽培试验用种。

2.3 液体菌种与固体菌种栽培比较试验

由表 2 可知,‘802’(液体菌种)与‘802’(固体菌种)相比,菌丝日均长速更快,满袋天数提前了 10 d,菌丝长势更好,生物学效率更高,‘802’液体菌种接种的生物学效率较固体菌种接种的生物学效率提高了 12.5%。“德丰 5 号”(液体菌种)与“德丰 5 号”(固体菌种)相比,菌丝日均长速更快,满袋天数提前了 9 d,菌丝长势更好,生

表 2

液体菌种与固体菌种栽培比较试验

Table 2

Comparison of cultivation between liquid spawn and solid spawn

菌株 Strain	菌丝日均长速 Mycelium growing daily/(mm·d ⁻¹)	满袋天数 Sackful days/d	菌丝长势 Mycelium growing	生物学效率 Biological efficiency/%
‘802’(液体菌种)	7.42	32	+++	148.35±4.19
‘802’(固体菌种)	5.23	42	++	131.82±2.36
“德丰 5 号”(液体菌种)	7.55	31	+++	149.17±3.91
“德丰 5 号”(固体菌种)	5.48	40	++	131.75±2.71

注:+++表示菌丝长势很好,++表示菌丝长势一般。

Note:+++ represents mycelium growing well,++ represents mycelium growing general.

物学效率更高,“德丰 5 号”液体菌种接种的生物学效率较固体菌种接种的生物学效率提高了 13.2%。

利用 SPSS 16.0 软件对‘802’(液体菌种)与‘802’(固体菌种)的生物学效率进行统计学分析,进行独立样本 *t* 检验。表 3 表明,用液体菌种接种与固体菌种接种间具有显著差异。

利用 SPSS 16.0 软件对“德丰 5 号”(液体菌种)与“德丰 5 号”(固体菌种)的生物学效率进行统计学分析,进行独立样本 *t* 检验。表 4 表明,用液体菌种接种与固体菌种接种间具有显著差异。

表 3 ‘802’菌种液体菌种与固体菌种栽培试验 *t* 检验结果
Table 3 The *t* test results of ‘802’ between liquid spawn and solid spawn

	Levene's 方差检验 Levene's test for equality of variances				均数 <i>t</i> 检验 <i>t</i> -test for equality of means				
	<i>F</i>	Sig.	<i>t</i>	<i>df</i>	Sig. (2-tailed)	Mean difference	Std. error difference	95% confidence interval of the difference	
								Lower	Upper
方差齐性 Equal variances assumed	1.792	0.229	6.829	6.000	0.000	16.425 00	2.405 16	10.539 79	22.310 21
方差非齐性 Equal variances not assumed			6.829	4.735	0.001	16.425 00	2.405 16	10.136 75	22.713 25

表 4 “德丰 5 号”菌种液体菌种与固体菌种栽培试验 *t* 检验结果
Table 4 The *t* test results of ‘Defeng 5’ between liquid spawn and solid spawn

	Levene's 方差检验 Levene's test for equality of variances				均数 <i>t</i> 检验 <i>t</i> -test for equality of means				
	<i>F</i>	Sig.	<i>t</i>	<i>df</i>	Sig. (2-tailed)	Mean difference	Std. error difference	95% confidence interval of the difference	
								Lower	Upper
方差齐性 Equal variances assumed	0.297	0.605	7.330	6.000	0.000	17.425 00	2.377 28	11.608 01	23.241 99
方差非齐性 Equal variances not assumed			7.330	5.330	0.001	17.425 00	2.377 28	11.426 18	23.423 82

3 讨论

液体菌种栽培平菇比固体菌种栽培平菇菌丝具有发育快、现蕾早、开采期提前、子实体性状好、生物学效率高等优点,已得到了广泛的验证^[4-5]。该试验的结论与上面的观点一致,筛选出了适合甘肃省栽培的液体菌种 2 株。结合甘肃省科学院生物研究所试验室的液体菌种接种装置,对平菇的工厂化生产提供了必要保障。

在试验过程中发现,液体菌种培养条件应随环境变化有所调整,外界温度低时,培养温度应适当调高一点,例如夏天培养用 25℃,冬天没有暖气时调至 28℃菌丝生长较好。

该试验在初期使用了放置一年的玉米粉、黄豆粉,致使几批液体发酵培养不理想,都长成大团的菌丝球,很松散,感觉像猴头菇的样子,用手摸有粘粘的感觉,无

异味。故液体菌种制作的培养料,需使用新鲜的玉米粉和黄豆粉,接种后菌块菌丝萌发好以后,再摇瓶培养,才能得到均匀的菌丝球。

液体菌种要达到规模化应用,还存在一系列问题,比如液体菌种的保藏问题、运输问题等,还需进一步研究。

参考文献

[1] 肖玉珍,许修宏,李长林.食用菌栽培技术[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,2001.
[2] 邓超,邹敏辰.食用菌深层发酵及其多糖活性研究进展[J].安徽农业科学,2007(15):4622-4623.
[3] 路等学,赵玉卉.食用菌液体菌种储存接种一体机:CN20130481009.4[P].2015-03-18.
[4] 李玉珍,王秉峰,邵建宁.侧耳液体菌种在不同培养料上的性状表现[J].甘肃农业科学,1999(1):27-28.
[5] 王淑芳,卜庆梅,钟旭生,等.平菇液体菌种发酵料栽培研究[J].江苏农业科学,2005(3):106-108.

Selection of Fermentation Strain of *Pleurotus ostreatus*

ZHAO Yuhui, LU Dengxue, HAN Runbing, WANG Long, QIN Peng
(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract: Five kinds of *Pleurotus ostreatus* were chosen as test materials, (‘Dengfeng 5’, ‘Huimei 2’, ‘8129’, ‘Kangbing 3’, ‘802’) which were popularly used in Gansu Province. By liquid fermentation method, the best *Pleurotus ostreatus* strains for liquid fermentation was selected, pilot test and cultivation test were conducted. The results showed that ‘802’ and ‘Defeng 5’ were the most suitable strains for liquid spawn. The biological efficiency increased by 12.5% and 13.2% of ‘802’ and ‘Defeng 5’ by comparison of cultivation between liquid spawn and solid spawn.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; fermentation; select; pilot test