

# 高产黑木耳菌株的筛选及培养条件的优化研究

吕玉珍<sup>1</sup>, 张 爽<sup>2</sup>

(1. 扬州环境资源职业技术学院, 江苏 扬州 225127; 2. 黑龙江农业职业技术学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

**摘 要:**以黑龙江地区畅销的主要栽培菌种黑 29 为对照,研究了产自黑龙江山区柞木上经筛选获得的黑木耳野生 LY<sub>58</sub> 菌株的生物学性状。结果表明:该菌株的适宜培养条件为温度 28℃、pH 7.0;产量为(45±5)g/袋,生物学效率为 95.4,其各方面性状皆优于对照菌株黑 29,可用于黑龙江省气候条件的袋料栽培菌株。

**关键词:**黑木耳;野生菌株 LY<sub>58</sub>;筛选;培养

**中图分类号:**S 646.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)21-0157-03

黑木耳营养丰富,味美可口,常食有清肺、润肺、益气补血、增强人体免疫力,防癌抗癌等功效,还能预防血栓的形成,越来越受到人们的欢迎。黑木耳菌株对其色泽、香气、感官质量和风格的影响很重要,开展野生种质资源获得一株优质高产的新菌株势在必行。课题组从自然界中发掘并分离出了 60 株黑木耳菌株,按照常规育种程序从中筛选出 6 株生产性能较好的菌株,通过与当地畅销菌种的比较试验研究,最终获得了各项性能皆优良的 1 株菌株,使之有希望成为适合黑龙江气候条件的代料栽培菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 培养基** 母种培养基 CPDA:马铃薯 200 g(用浸出汁),葡萄糖 20 g,磷酸二氢钾 2 g,硫酸镁 0.5 g,琼脂 20 g,水 1.0 L,pH 自然。原种和栽培培养基(w/w):硬杂树木屑 61%,玉米芯 20%,麦麸 15%,豆饼粉 2%,石膏粉 1%,石灰粉 1%,含水量 60%,pH 自然。使用 17 cm×33 cm 的聚丙烯塑料袋,料高为 18~20 cm,袋的湿重量为(1.1±0.05)kg。

**1.1.2 菌株来源** 试验菌株系来源于我国东北地区黑龙江省西部山区富锦、嘉荫、牡丹江、大小兴安岭、漠河、肇源等 22 个地点,共 60 株菌株,用锯木屑保存,对照菌株黑 29(黑龙江地区畅销的主要栽培菌种)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 初筛** 将分离到的 60 株野生黑木耳菌种和对照菌株黑 29 分别接种在 PDA 培养皿和斜面试管上,一起放入 28℃温箱中培养,次日观察这些菌株的菌丝生长状况。同时分 2 批做拮抗试验。

**1.2.2 复筛** 将初筛中获得的优良的菌株作为原种进行扩大培养。同时配制裁培基质,每个菌株接种 10

袋,于菇房中培养,3 次重复。按常规方法进行日常管理,定时观察记录并计算供试菌株的鲜重(g/袋)、干重(g/袋)和生物学效率。

**1.2.3 形态特征观察** 利用稀释涂布法或来板划线分离法接种将菌株接到 CPDA 培养皿培养,进行 3 次重复,次日观察记录各菌株的菌丝生长状况,包括培养温度、菌丝生长速度、菌丝长势等,并计算出菌丝密度<sup>[1]</sup>。

**1.2.4 拮抗试验** 将测定菌接用 PDA 液体培养基进行活化、分离后,用 CPDA 琼脂扩散法<sup>[2]</sup>进行。在同一平板上按品字形接种 3 个菌株,28℃,50%的相对湿度下培养观察菌丝间的拮抗反应,从而确定是否是独立菌株。

**1.2.5 测定纤维素酶活力** 纤维素酶是一种复合酶,多组成协同作用完成纤维素的降解。黑木耳菌株在出菇阶段的纤维素酶活力测定方法用 DNS(3,5-二硝基水杨)法进行<sup>[4]</sup>。

**1.2.6 测定酯酶同工酶** 酯酶同工酶谱<sup>[5]</sup>已成为对食用菌菌种真实性鉴定的重要手段。采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳法,电流 10 mA/cm,分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 2.5%,电极缓冲液为 Tris\_Gly 系统(pH 8.0),用微量注射器加入样品 15 μL。

**1.2.7 比较试验** 将 LY<sub>58</sub>号菌株和对照菌株黑 29 号分别接种在 PDA 培养皿和栽培培养基上进行培养,作 3 次重复。比较它们的菌丝生长情况和生长速率。并通过酯酶同工酶测定确定这 2 株菌株是否为同一菌株。

**1.2.8 菌株栽培试验** 配制袋栽基质,后冷却处理,次日接种。每种菌株接种 30 袋。按常规管理,定时观察记录催芽温度湿度、菌长势、污染代数、长满袋的时间、开口时间、从芽到耳片分化的时间、子实体生长状况等。按《NY 5099-2002 无公害食品 食用菌栽培基质安全技术要求》来评价产品性状和质量。

**1.2.9 培养条件优化研究** 将 LY<sub>58</sub>号菌株和黑 29 号菌株分别接种在 PDA 培养基和栽培培养基上,3 次重

第一作者简介:吕玉珍(1969-),女,本科,副教授,研究方向为食品科学。

收稿日期:2011-08-11

复。在 4.5~8.5 设置 9 个初始 pH 值,相隔 0.5;在 15~40℃ 设置 6 个培养温度,间隔 5℃,比较 2 种菌株的菌丝生长速率。

## 2 结果与分析

### 2.1 初筛结果

通过比较 60 株菌株在 PDA 斜面试管和培养皿上

表 1 6 株菌株的菌落形态特征

| 菌株号                                    | 菌丝密度   | 菌丝密度类型 | 菌落特征              | 第 14 天菌落面积(s)/mm <sup>2</sup> | 面积指数 T | ΔS /mm | 生长指数 t |
|--|--------|--------|-------------------|-------------------------------|--------|--------|--------|
| LY <sub>5</sub>                        | 80.56  | 中等     | 菌丝成放射状,表面绒状,外缘色素重 | 5 551                         | 1.08   | 1 345  | 1.19   |
| LY <sub>7</sub>                        | 119.19 | 密      | 中部有褐色色素,菌丝成放射状    | 4 318                         | 0.83   | 1 313  | 1.17   |
| LY <sub>12</sub>                       | 104.64 | 密      | 菌丝白色,中心密绒状        | 5 526                         | 1.07   | 471    | 0.42   |
| LY <sub>19</sub>                       | 107.55 | 密      | 微见色素,表面绒状,菌丝均一    | 5 417                         | 1.05   | 1103   | 0.98   |
| LY <sub>39</sub>                       | 95.51  | 密      | 中心有浅色素和褐斑,放射状     | 4 404                         | 0.85   | 1 289  | 1.15   |
| LY <sub>58</sub>                       | 97.63  | 密      | 无色素,较密,边缘菌丝放射状延伸  | 4 382                         | 0.85   | 1 389  | 1.24   |
| 黑 29                                   | 79.83  | 中等     | 稍有色素,较密,边缘菌丝放射状延伸 | 4 384                         | 0.85   | 997    | 0.89   |
| $\bar{S}=5\ 156\ \Delta\bar{S}=1\ 120$ |        |        |                   |                               |        |        |        |

注:T—用面积生长指数;ΔS—菌株生长到 12 d 和 14 d 菌落面积之差;t—生长指数。

### 2.2 复筛结果

2.2.1 纤维素酶活力的测定结果 纤维素酶是一种微生物活性制剂,黑木耳菌株有较强的分解木纤维素的能力。由试验证实,菌株的纤维素酶的活力与产量呈正相关。由表 2 可知,LY<sub>58</sub> 号菌株纤维素酶活力为  $5.6\times 10^3$  U/g,远远高于其它参试菌株。

表 2 6 株菌株的纤维素酶活力值

| 菌株号              | 酶活力/U·g <sup>-1</sup> | 菌株号              | 酶活力/U·g <sup>-1</sup> |
|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| LY <sub>5</sub>  | $3.5\times 10^3$      | LY <sub>19</sub> | $3.0\times 10^3$      |
| LY <sub>7</sub>  | $5.2\times 10^3$      | LY <sub>39</sub> | $3.4\times 10^3$      |
| LY <sub>12</sub> | $3.6\times 10^3$      | LY <sub>58</sub> | $5.6\times 10^3$      |

2.2.2 产量和生物学效率 产量是衡量菌株性能的最直接的指标。生物学效率表达菌种对培养基质转化利用能力。由表 3 可知,LY<sub>58</sub> 号菌株产量和生物学效率居参试菌株之首,且远远高于对照菌株。

表 3 6 株菌株的产量和生物学效率

| 菌株号              | 生物学效率 | 产量 /g·袋 <sup>-1</sup> DW | 菌株号              | 生物学效率 | 产量 /g·袋 <sup>-1</sup> DW |
|------------------|-------|--------------------------|------------------|-------|--------------------------|
| LY <sub>5</sub>  | 24.7  | 9.1                      | LY <sub>39</sub> | 90.2  | 31.1                     |
| LY <sub>7</sub>  | 35.3  | 12.9                     | LY <sub>58</sub> | 95.4  | 45.2                     |
| LY <sub>12</sub> | 39.6  | 13.8                     | 黑 29             | 47.8  | 16.9                     |
| LY <sub>19</sub> | 88.7  | 28.2                     |                  |       |                          |

表 4 LY<sub>58</sub> 与黑 29 号菌株的菌落扩展速度

| 菌株号              | 日 龄/d    |          |          |          |          |         | mm/d |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|------|
|                  | 7        | 9        | 11       | 13       | 16       | 18      |      |
| LY <sub>58</sub> | 31.5/4.5 | 42.3/4.7 | 67.1/6.1 | 87.1/6.7 | 104/6.5  | 117/6.5 |      |
| 黑 29             | 42.7/6.1 | 55.8/6.2 | 70.4/6.4 | 84.5/6.5 | 99.2/6.2 | 112/6.2 |      |

注:分子表示的是菌落每天扩展的速度,分母表示生长几天内菌落共达到的高度。

2.3.3 酯酶同工酶 酯酶同工酶谱已成为对食用菌菌种真确性鉴定的重要手段。由图 2 可知,2 个菌株的谱带颜色很重,呈紫黑-黑色,由此看出供试菌株的遗传上的同源性。与黑 29 比较,LY<sub>58</sub> 号菌株基因点发生了变化,说明这 2 株菌株不为同一菌株。综合上述结果表明,LY<sub>58</sub> 菌株是最好的菌株。但若将其作为生产母种进行广泛推广,还需对该菌株的最适宜的培养

的生长情况,结果有 34 株菌株的生长速度慢,菌丝不够浓密,长势不健壮而被淘汰,有 8 株菌株因无拮抗现象(2 株菌株的菌丝相接,并呈镶嵌状)发生而被淘汰。对入选的 18 个初筛菌株的生长情况和培养特征与对照菌株进行进一步观察比较<sup>[6]</sup>,结果有 6 株菌株(LY<sub>5</sub>、LY<sub>7</sub>、LY<sub>12</sub>、LY<sub>19</sub>、LY<sub>39</sub>、LY<sub>58</sub>)的生长情况优于与对照菌株(表 1)。

### 2.3 试验结果比较

2.3.1 形态特征 采用平板观察法。各平行培养的 LY<sub>58</sub> 号菌株在培养皿上的菌落生长情况均相同。由图 1 可知,培养 12 d 后,LY<sub>58</sub> 号和黑 29 号菌株的菌丝都较浓密,皆呈放射状延伸,但 LY<sub>58</sub> 号菌株的菌丝呈白色无色素,黑 29 号稍有色素。

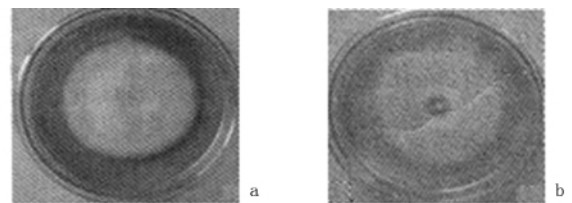


图 1 LY<sub>58</sub> 号与黑 29 菌株的菌落形态

注:a:LY<sub>58</sub>号;b:黑 29 号。

2.3.2 生长速度 由表 4 可知,培养初期黑 29 号菌株在 CPDA 培养皿上菌落扩展速度比 LY<sub>58</sub> 号菌株快,但在生长 13 d 后,LY<sub>58</sub> 号菌株的生长急速加速,达到了 6.7 mm/d,超过了对照株(6.5 mm/d)。

条件进行研究,促进菌株生长。

### 2.4 培养条件优化研究

2.4.1 pH 对 LY<sub>58</sub> 号菌株菌丝生长速率的影响 每种菌株生长都有一个适宜的 pH。由图 3 可知,pH 在 4.5~8.5 之间,LY<sub>58</sub> 号菌株均可生长,其中最适宜 pH 值为 7.0 左右,接近自然 pH。

2.4.2 温度对 LY<sub>58</sub> 号菌株菌丝生长速率的影响 温

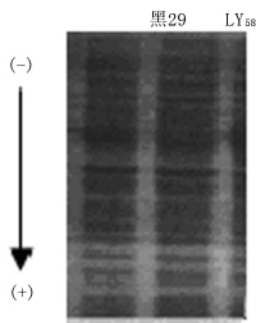


图2 LY<sub>58</sub> 号和黑 29 号菌株的酯酶同工酶谱

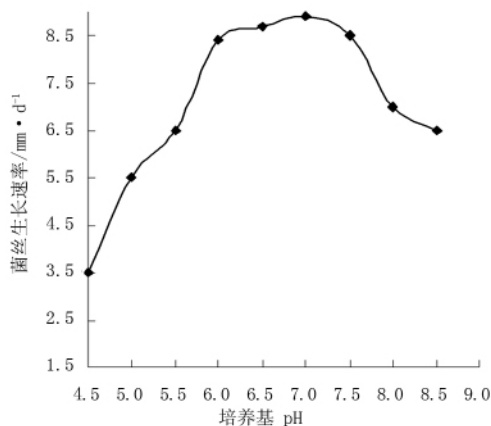


图3 pH 对 LY<sub>58</sub> 号菌株菌丝生长的影响

度是影响 LY<sub>58</sub> 菌株生长的一个重要因子。由图 4 可知,在 15~40℃,LY<sub>58</sub> 号菌株均可生长,其中最适宜生长温度为 28℃,与对照菌株的适宜生长温度相近。

3 结论

从黑龙江省西部山区采集、分离到 60 株野生黑木

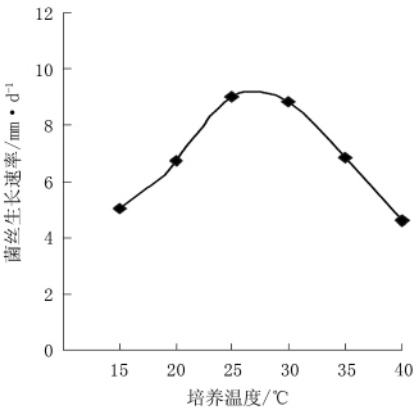


图4 温度与 LY<sub>58</sub> 号菌株菌丝生长的影响

耳菌株,经初筛、复筛、生理性能测定、栽培试验、生理活性物质含量测定、产量和质量测定,筛选出一株优良菌株,编号为 LY<sub>58</sub> 号。该菌株适宜培养条件为温度 28℃、pH 值 7.0,具有高产(达(45±5)g/袋,生物学效率 95.4)、商品价值高(出耳早、出耳齐、易开片、朵大、耳片厚)等特点,建议可作为适用于黑龙江省气候条件的代料栽培菌株进行推广使用。

参考文献

[1] 暴增海. 食用菌栽培学[M]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2005:236-265.  
[2] Holt J G,Krieg N R,Sneath P H,et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. Int J syst Evol Microbiol,2007;2259-2261.  
[3] 孔祥君,宋德瑜,黄小东,等. 食用菌术语 GB/T12728-2006[S]. 国家技术监督局,2006;12.  
[4] 王同雨. 浅谈黑木耳林地仿野生高产栽培技术[J]. 食用菌,2008, 59(7):18-21.  
[5] 农业行业标准. 食用菌菌种真实性鉴定酯酶同工酶电泳法 NY/T1097-2006[S]. 中华人民共和国农业部,2006;10.  
[6] 刘金柱,李桂荣. 桑枝黑木耳的栽培技术[J]. 北京农业,2007(3): 24-25.

Screening of *Auricularia auricular* Strains with High Production and the Improvable Research of its Cultivated Conditions

LV Yu-zhen<sup>1</sup>, ZHANG Shuang<sup>2</sup>

(1. Yangzhou Vocational College of Environment and Resources, Yangzhou, Jiangsu 225127; 2. Heilongjiang Agricultural College of Vocational Technology, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

**Abstract:** The best-selling main culture strains ‘Heiwei29’ was used as control, the biological character of wild *Auricularia auricular* strains LY<sub>58</sub>, isolated from *Quercus oka* wood in mountain area in Heilongjiang province were studied. Through conventional breeding procedure, the characteristics of these strains were made further comparison. The results showed that the cellulase activity, bio-efficiency, output and hypha growth speed of number LY<sub>58</sub> strain were suitable culture conditions for the temperature of 28℃, pH 7.0, 95.4, (45±5)g/bag, respectively. It was also to say that all aspects of this stain were better than the controlled strain ‘Heiwei 29’. In conclusion, number LY<sub>58</sub> strain could spread as stock strain in industrial production.

**Key words:** *Auricularia auricular*; wild strain LY<sub>58</sub>; screening; cultivated