

榆黄蘑液体菌种培养研究

韦珂¹, 李丽瑛², 覃培升¹, 蒙健宗²

(1. 广西大学 农学院, 广西南宁 530004; 2. 广西大学 生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

摘要:以榆黄蘑原种、栽培种为试材, 采用摇瓶培养榆黄蘑液体菌种, 通过单因子试验筛选较优的速效碳源和迟效碳源, 较优的复合碳源比、碳氮比、培养时间, 并通过回管法进行菌种落发试验。结果表明: 较优的速效碳源和迟效碳源分别为麦芽糊精和玉米淀粉, 较优的速效碳源和迟效碳源比例为 1:2, 较优的碳氮比为 12:1, 最适培养时间为 5 d, 采用此条件制备的液体菌种栽培榆黄蘑, 菌丝满袋时间较固体菌种减少 1~2 d, 生物学效率与固体接种相近。

关键词:榆黄蘑; 液体菌种; 碳源

中图分类号:S 646.1⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)20-0131-04

榆黄蘑(*Pleurotus citrinopileatus*)是一种珍贵的食药兼用真菌, 具有滋补强壮、降胆固醇和降血脂、抗疲劳、抑制肿瘤等营养保健功效^[1-3]。榆黄蘑生长力较强, 可利用多种易得的农林废弃物作为培养基质^[4]。人们在榆黄蘑菌种改良、培养基优化和栽培方法及深加工等方面已做了许多研究, 如通过单孢杂交获得了具有推广价值的多个菌株^[5], 采用以沼渣优化的桑枝培养料进行栽培可提高生物学效率 22.8%^[6]。食药菌的液体菌种栽培是近年来兴起的一种先进工厂化栽培方法, 不同品种的食药菌其液体菌种的最适培养基和最适培养条件均有所差异。该试验采用摇瓶培养法培养榆黄蘑液体菌种, 以菌丝干重、菌丝球数量等为指标, 从多种碳源中选择培养基的最佳碳源, 以优化复合碳源的配方组合; 通过研究培养时间对液体菌种菌丝生长的影响, 确定最佳培养终点, 以期制备出优良的液体菌种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试榆黄蘑原种、栽培种均由广西大学应用微生物研究所提供。

栽培材料: 麸皮、玉米淀粉、木薯淀粉、石膏粉等分别购自南宁市粮油市场、建材市场; 试验用蛋白胨、酵母

粉等为市售生化试剂, 葡萄糖、蔗糖等为分析纯试剂。

斜面培养基: PDA 培养基; 栽培培养基: 桑枝杆 82%、麸皮 15%、石膏粉 1%、过磷酸钙 2%。原料配水比 1:1.5, 含水量约为 60%; 液体菌种基本培养基: 葡萄糖 5%, 蛋白胨 0.6%, 酵母粉 0.2%, 磷酸二氢钾 0.1%, 硫酸镁 0.05%, pH 自然。接种摇瓶后于 25℃, 150 r/min 培养 5 d, 取样测定菌丝干重和菌丝球数量。

1.2 试验方法

1.2.1 碳源筛选试验 在液体菌种基本培养基的基础上, 碳源分别采用 5%(w/v)速效碳源葡萄糖、蔗糖、麦芽糊精, 或迟效碳源玉米淀粉、木薯淀粉进行对比; 以各碳源为单因子变量, 共做 3 组平行试验。

1.2.2 复合碳源优化试验 选取一种较优的速效碳源和一种较优的迟效碳源组成复合碳源, 在碳源总量为 5%(w/v)的前提下按不同加入量比例(1:3、1:2、1:1、2:1、3:1)进行单因子试验, 共做 3 组平行试验。

1.2.3 碳氮比优化试验 计算基本培养基的含氮量并选取一组较优的复合碳源计算含碳量; 保持氮源用量不变, 按不同碳氮比(6:1、8:1、10:1、12:1、14:1、16:1)进行单因子试验, 共做 3 组平行试验。

1.2.4 发酵终点试验 液体培养基采用优化的复合碳源和最适碳氮比, 以菌丝体含量、菌球的变化及回试管法菌丝萌发情况作为参考指标, 判断是否达到发酵终点。

1.2.5 菌丝体生物量(干重)测定方法 取 5 mL 的培养液, 用纱布过滤后(先称取纱布质量 $M_{\text{纱布}}$), 于 60℃ 烘干至恒重, 电子天平准确称重 $M_{\text{总}}$, 计算生物量: 生物量(g/mL) = $(M_{\text{总}} - M_{\text{纱布}})/5$ 。

1.2.6 菌丝球数量计数方法 取 5 mL 的培养液, 在烧杯中加水稀释至合适倍数, 摇匀后在烧杯下垫黑白相间

第一作者简介:韦珂(1972-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事应用微生物研究工作。E-mail: weikeflower@gxu.edu.cn.

责任作者:蒙健宗(1972-), 男, 硕士, 研究员, 现主要从事生物工程技术研究工作。E-mail: meng_jz@163.com.

基金项目:广西科学研究与技术开发计划资助项目(桂科能 1346007-26); 南宁市科学研究与技术开发计划资助项目(20122083)。

收稿日期:2013-07-25

的格子,用方格计数法计数测出菌丝球数量 A 个。计算菌丝球数量:菌丝球数量(个/mL)= $A/5$ 。

1.2.7 回试管法萌发试验 液体菌种接种培养的 2~7 d,每天取样接种到斜面培养基,25℃恒温培养,观察并记录回管后菌丝萌发时间^[7]。

1.2.8 栽培试验 将粉碎桑枝杆、麸皮按配方称量,加水充分拌匀,轻轻压实培养料使之成堆,以薄膜袋覆盖闷堆发酵过夜,再加入石膏及过磷酸钙,充分拌匀,检查含水量后即装入 33 cm×17 cm×0.005 cm 的聚乙烯塑料袋,于 0.14~0.15 MPa 压力下蒸汽灭菌 2.5 h,冷却至室温后接种。固体接种每袋接种 30 g,液体接种每袋接种 15 mL,置 25℃避光培养。发菌期间测量菌丝生长速度;待菌丝长满袋并有少许原基出现时,搬入出菇房,除去封口纸,按常规方法进行出菇管理,及时采收子实体并称重。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对榆黄蘑菌丝生长的影响

由图 1 和图 2 可知,迟效碳源培养的菌丝球生物量和单位体积菌丝球数量比速效碳源培养的要高得多,迟效碳源中玉米淀粉的生物量和菌丝球数均为最高,分别达到 1.33×10^{-2} g/mL 和 394 个/mL;菌丝球直径和均一程度也较一致,表明菌种质量较佳。速效碳源中麦芽糊精培养的生物量虽然较蔗糖的略低,但菌丝球数量较高,菌丝球颗粒大小的均一程度也较优。

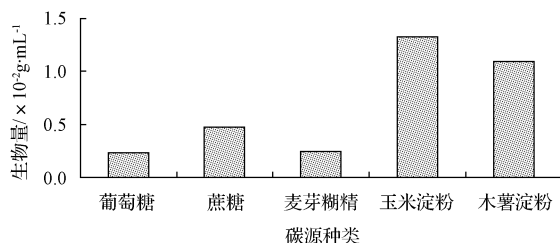


图1 不同碳源对榆黄蘑菌丝球生物量的影响

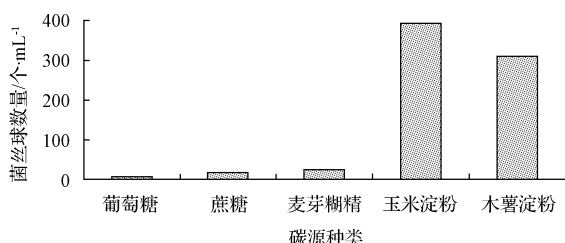


图2 不同碳源对榆黄蘑菌丝球数量的影响

2.2 速效碳源和迟效碳源组合对榆黄蘑菌丝生长的影响

小分子糖类等速效碳源可快速被菌体利用,在菌体

生长初期对菌体生长十分有利,但较高浓度的速效碳源容易产生抑制性代谢副产物,对菌体的长期生长反而不利,而迟效碳源的缓慢分解利用可为菌体的生长提供长期低浓度的小分子糖类,因此速效碳源和迟效碳源的组合使用有可能取得更好的效果。由图 3 和图 4 可知,菌丝生物量随着复合碳源中速效碳源比例的增加呈减少趋势,当麦芽糊精/玉米淀粉比例为 1:3 时菌丝生物量最高,但菌丝球数量较低。而麦芽糊精/玉米淀粉比例为 1:2 时生物量为 1.53×10^{-2} g/mL,略低于 1:3 时的 1.65×10^{-2} g/mL,但菌丝球数量最高,达 596 个/mL,远高于其它比例的组合,也远高于单独使用迟效碳源。菌丝球数量代表了接种菌包后菌丝萌发点的多寡,对菌包中菌丝满袋时间的影响更大,因此按 1:2 组合的麦芽糊精/玉米淀粉是榆黄蘑液体菌种培养的较优复合碳源。

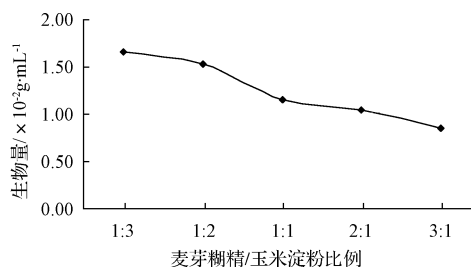


图3 复合碳源的不同比例对榆黄蘑菌丝球生物量的影响

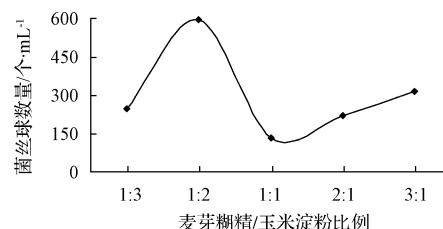


图4 复合碳源的不同比例对榆黄蘑菌丝球数量的影响

2.3 不同碳氮比对榆黄蘑菌丝生长的影响

培养基的碳氮比对食用菌菌丝生长及子实体形成有着重要意义^[8],碳源和氮源需比例适当才能使菌丝生长健壮,得到较高的生物量并且提高活力。由图 5

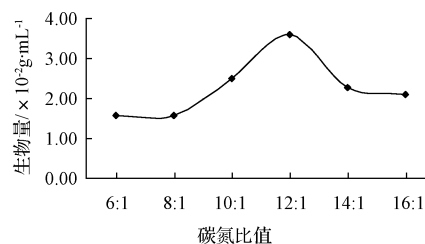


图5 不同碳氮比对榆黄蘑菌丝球生物量的影响

和图 6 可知,不同的碳氮比对榆黄蘑的生物量和菌丝球数量有很大影响。在氮源用量固定时,随着碳源用量的增加,菌丝生物量和菌丝球数量的变化近似正态分布曲线,当碳氮比为 12:1 时,生物量达到最大值 3.59×10^{-2} g/mL;菌丝球数量的最大值也是在碳氮比 12:1~14:1,达到 1 224 个/mL 以上。充足的碳源对菌丝生长有利,但过量也易使培养液的渗透压及粘度升高,阻滞菌丝生长发育。榆黄蘑与其它侧耳类深层培养的最佳碳氮比范围 12:1~16:1 接近^[9],高于金针菇的液体培养的最佳碳氮比^[10]。

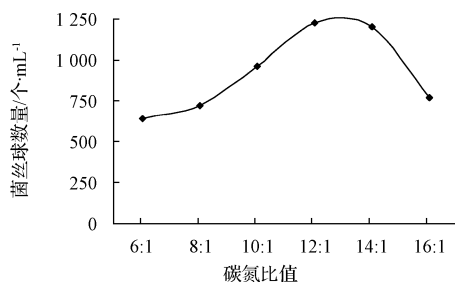


图 6 不同碳氮比对榆黄蘑菌丝球数量的影响

2.4 不同培养时间对榆黄蘑液体菌种的影响

由图 7 可知,摇瓶培养 5 d 之前,生物量逐日增加,第 5 天时生物量达 1.35×10^{-2} g/mL,之后生物量的变化趋于平缓;菌丝球数量也于第 5 天达到最大值 560 个/mL,之后呈快速下降趋势。

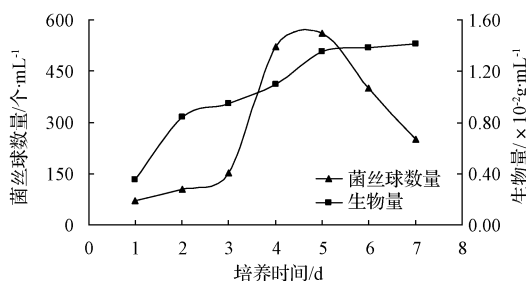


图 7 培养时间对榆黄蘑生物量、菌丝球数量的影响

从液体培养第 2 天起增加回试管法测定菌丝萌发情况,由表 1 可知,菌龄为 6 d 的液体菌种在斜面培养基上的萌发时间最短,而菌龄为 5 d 的菌种萌发时间仅比菌龄 6 d 的萌发时间多 1.0 h;菌龄 7 d 的液体菌种已显示出明显的老化。综合菌丝生物量和菌丝球数量的变化趋势及回管萌发时间趋势,可以确定榆黄蘑液体菌种的发酵终点为 5 d。

表 1 不同菌龄的液体菌种回管萌发时间

液体菌种菌龄/d	2	3	4	5	6	7
回管萌发时间/h	43.0	23.0	18.5	12.0	11.0	22.5

2.5 液体菌种栽培试验

从表 2 可以看出,与固体菌种比较,榆黄蘑液体菌

种由于其萌发点多,菌丝生长速度较快,满袋时间缩短了 1~2 d;液体菌种栽培榆黄蘑 2 潮的生物学效率与固体菌种的相近;液体菌种栽培在开袋 3 d 后开始出菇,第 4 天可以采收,而固体菌种开袋后第 4 天出菇;液体菌种栽培出菇比较整齐,基本相隔 2~4 d,而固体菌种栽培出菇整齐度比液体菌种的略差,相隔 2~8 d。从整体上看,液体菌种栽培具有菌龄一致、出菇整齐、生长周期短的特点。

表 2 榆黄蘑液体菌种与固体菌种的比较

接种方式	菌丝满袋时间/d	菌丝生长速度/mm·d ⁻¹	生物学效率/%	
			第 1 潮菇	第 2 潮菇
液体菌种	16~18	18.3~20.6	30.7	28.1
固体菌种	17~20	16.5~19.4	32.4	24.1

3 结论

该试验通过单因子试验筛选了榆黄蘑液体培养较优的碳源成分,优化了速效碳源和迟效碳源的组合为 1:2 的麦芽糊精/玉米淀粉,优化了培养基的碳氮比为 12:1,通过菌体生长曲线和回管试验确定了液体菌种最适培养时间为 5 d,采用以上条件制备的榆黄蘑液体菌种栽培时取得了菌丝生长较快,出菇整齐,且生物学效率与固体接种相近的结果。随着榆黄蘑的营养保健价值被人们逐渐认识,榆黄蘑的鲜销和深加工市场不断扩大,栽培规模将向集约化发展,此时液体菌种栽培接种快速、发菌时间短、出菇整齐、污染率低的优势将可以得到充分利用。

参考文献

- [1] 郑超楠,金在久,施溯筠. 榆黄蘑饮料对小鼠实验性高脂血症的降脂作用[J]. 食品工业科技,2012,33(5):369-371.
- [2] 薛冰. 榆黄蘑的抗氧化性和榆黄蘑饮料的抗疲劳作用研究[D]. 延吉:延边大学,2011.
- [3] 施溯筠,李秀国. 榆黄蘑饮料抑制肿瘤和拮抗环磷酰胺毒副作用的研究[J]. 食品工业科技,2010,31(8):332-333,390.
- [4] 上海农科院食用菌所. 中国食用菌志[M]. 北京:中国林业出版社,1991:77.
- [5] 张玉铎. 榆黄蘑单孢杂交及后代筛选[D]. 保定:河北农业大学,2010.
- [6] 蒙健宗,陈伟超,秦宇,等. 沼渣沼液对栽培榆黄蘑的影响[J]. 北方园艺,2011(5):192-194.
- [7] 张胜友. 中国液体菌种生产新技术[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2010:30-32.
- [8] 张宇. 不同碳氮比栽培料对秀珍菇菌丝及子实体生长的影响[J]. 北方园艺,2013(3):152-154.
- [9] Khanna P, Garcha, 王锦涛. 侧耳对碳源利用的研究[J]. 食用菌,1986(1):29-31.
- [10] 杜世或,党阿丽,王凤云. 金针菇菌丝生长的营养需求及液体发酵研究[J]. 微生物学通报,1997,24(3):134-137.

鼓槌石斛分株繁殖研究

郑志新¹, 金亚征¹, 翟金玲²

(1. 河北北方学院 农林科技学院 园艺系, 河北 张家口 075000; 2. 张家口市森林病虫害防治检疫站, 河北 张家口 075000)

摘 要:以鼓槌石斛为试材,研究了激素种类及浓度、栽培基质和营养液等对鼓槌石斛分株繁殖时新枝萌发及生长的影响。结果表明:植物生长调节剂浸泡鼓槌石斛基部可以在一定程度上促进新枝萌发和生长,但激素种类不同对其促进作用不同;栽培基质在一定程度上对鼓槌石斛分株新枝萌发及生长的影响很大,熟树皮+水苔藓是最佳的栽培基质,其次是水苔藓、陶粒+蛇木;营养液在一定程度上对于鼓槌石斛新枝的生长有促进作用,全肥(含微量元素)为最佳选择。

关键词:鼓槌石斛;分株繁殖;萌发系数;生长情况

中图分类号:S 567 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)20-0134-03

石斛(*Dendrobium*)是我国传统名贵中药材,应用历史悠久,具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、延年益寿之功效^[1],其中铁皮石斛(*D. officinale*)、金钗石斛(*D. nobile*)、流苏石斛(*D. fimbriatum*)、黄草石斛(*D. chrysanthum*)和环草石斛(*D. loddigesii*)以及鼓槌石斛(*D. chrysotomum*)等共 10 种被 2010 版《中华人民共和国药典》^[2]收录,它们均以新鲜或干燥茎入药。但由于人类的过度采挖和自然环境的破坏,铁皮石斛、金钗石斛、霍山石斛等传统入药名贵石斛野生资源面临枯竭的危险,而对石斛资源的需求却日益增长,亟待对现有的其

它石斛种类进行开发利用。鼓槌石斛又名金弓石斛、粗黄草、小瓜黄草等,茎直立,通常纺锤形,叶生于近茎顶端,革质,近矩圆形,先端急尖,茎中间形似“鼓槌”而得名^[3]。该试验以鼓槌石斛为试材,进行分株繁殖试验,研究了激素种类及浓度、栽培基质和营养液等对鼓槌石斛分株繁殖时新枝萌发及生长的影响。以期对石斛的人工栽培提供技术支持和依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于昆明市中国林业科学院资源昆虫研究所院内苗圃和温室,地理位置北纬 23°36′、东经 102°01′,海拔 1 892 m,年均温 15.1℃,最热月平均气温 19.8℃,最冷月平均气温 7.7℃,年降雨量 1 012 mm,雨季 5~10 月。由于滇池水域的调节作用,昆明市区气候温和,季节变化不大,属亚热带低纬高原季风气候。

第一作者简介:郑志新(1980-),女,河北张北人,硕士,讲师,现主要从事植物栽培及繁育等研究工作。E-mail: zjkzzxin@sohu.com.
基金项目:国家林业局“948”技术引进资助项目(200424227)。
收稿日期:2013-05-17

Study on Culture of Liquid Strain of *Pleurotus citrinopileatus*

WEI Ke¹, LI Li-ying², QIN Pei-sheng¹, MENG Jian-zong²

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004; 2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004)

Abstract: Taking original species and cultivars of *Pleurotus citrinopileatus* as test materials, using shake flasks citrinopileatus liquid spawn, the more fast-acting and slow-acting carbon source ratio, complex carbon source ratio, carbon-nitrogen ratio, culture time were screened by single factor experiment, and strain germination experiment was done by return pipe method. The results showed that the best more fast-acting and slow-acting carbon carbon were maltodextrin and corn starch. Acting on better carbon and delayed-carbon ratio was 1 : 2, and more of the carbon-nitrogen ratio of 12 : 1; optimal culture time was 5 d; using this condition citrinopileatus liquid spawn cultivation, bacteria solid silk bag full of bacteria decreased over 1~2 d, biological efficiency and solid vaccination similar.

Key words: *Pleurotus citrinopileatus*; liquid strain; carbon source