

杏鲍菇液体菌种培养基的筛选和优化

杨丽维¹, 王玉², 班立桐², 刘静³, 亢洪明³

(1. 天津市林业果树研究所, 天津 300384; 2. 天津农学院, 天津 300384; 3. 天津鸿滨禾盛农业技术开发有限公司, 天津 300400)

摘要:以杏鲍菇为试材, 采用摇瓶液体培养法, 以菌丝干重、菌球密度、菌丝球回接平板萌发时间和菌球直径为指标, 对杏鲍菇液体菌种培养基进行筛选和优化, 以期筛选一种适合杏鲍菇生长的液体菌种培养基。结果表明: 最佳培养基配方为葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 黄豆饼粉 60 g/L, 磷酸二氢钾 0.5 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 维生素 B₁ 0.01 g/L, 该配方中菌丝量大、密度高、回接平板萌发时间短, 且菌球直径适当。

关键词:杏鲍菇; 液体菌种; 培养基; 筛选; 优化

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)06-0150-03

杏鲍菇是一种集食、药用于一体的珍稀食用菌, 其子实体菌肉肥厚、质地脆嫩、口感独特^[1]。在杏鲍菇生产过程中, 目前多数是采用传统的固体菌种培养模式, 但固体菌种生产制种周期长、污染率高、菌体内菌龄上下相差悬殊、出菇不整齐, 不利于规模化和机械化生产。相比之下, 液体菌种的生产制种周期短、发菌速度快、污染率低, 有利于杏鲍菇栽培生产的工厂化和现代化^[2]。为了缩短杏鲍菇的制种及生产周期, 提高其产量和质量, 很多学者对液体菌种进行了大量研究, 而在液体菌种生产中, 选择一种适合杏鲍菇液体菌种生长的培养基是非常重要的^[3]。该试验采用摇瓶液体培养法, 以菌丝干重、菌球密度、菌丝球回接平板萌发时间和菌球直径为指标, 优化和筛选了杏鲍菇液体菌种培养基, 以期筛选一种适合杏鲍菇生长的液体菌种培养基。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试杏鲍菇引自韩国, 由天津农学院生物技术教研室保存。

平板培养基: 马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、磷酸二氢钾 3 g/L、硫酸镁 1.5 g/L、琼脂 20 g/L、维生素 B₁ 0.02 g/L、蛋白胨 5 g/L。种子培养基: 葡萄糖 30 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、琼脂 2 g/L、维生素 B₁ 0.01 g/L、蛋白胨 2 g/L、酵母浸出汁 5 g/L。初始发酵培养基: A 麸皮 60 g/L、葡萄糖 20 g/L、磷酸二氢钾

0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、维生素 B₁ 0.01 g/L、蛋白胨 3 g/L; B 玉米粉 60 g/L、葡萄糖 20 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、维生素 B₁ 0.01 g/L、蛋白胨 3 g/L; C 黄豆粉 60 g/L、葡萄糖 20 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、维生素 B₁ 0.01 g/L、蛋白胨 3 g/L; D 豆粕 60 g/L、葡萄糖 20 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、维生素 B₁ 0.01 g/L、蛋白胨 3 g/L; E 黄豆饼粉 60 g/L、葡萄糖 20 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、维生素 B₁ 0.01 g/L、蛋白胨 3 g/L; F 土豆 60 g/L、葡萄糖 20 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、维生素 B₁ 0.01 g/L、蛋白胨 3 g/L。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种制备 斜面菌种活化: 将保存的杏鲍菇菌种转接到无菌斜面培养基上, 置于 25℃ 恒温培养箱中, 培养 10~12 d, 得斜面母种。种子液的制备: 按常规方法制备种子液培养基后, 分装于 250 mL 三角瓶中, 装液量 100 mL, 棉塞封口, 121℃ 高压灭菌 30 min, 待冷却后, 按无菌操作方法, 每瓶接入约 0.2 cm² 大小的经活化的斜面菌种 3 块, 放入 25℃ 的恒温培养箱内静置培养 2 d 后, 放入恒温摇床中, 在 25℃ 条件下 180 r/min 振荡培养 3 d, 用于接种发酵培养基中。液体菌种的制备: 发酵培养基制备方法同上, 将培养好的种子液以 10% 的接种量接种于发酵培养基中, 在 25℃ 条件下 180 r/min 振荡培养 4 d 后取出, 即可用于杏鲍菇栽培。

1.2.2 初始发酵培养基的筛选 将培养好的杏鲍菇种子液以 10% 接种量分别接种于 6 种初始发酵培养基中, 在 25℃ 条件下 180 r/min 振荡培养 4 d, 然后测定各配方的菌球密度、菌丝干重、菌球直径和萌发时间, 每个配方 3 次重复。

第一作者简介:杨丽维(1981-), 女, 硕士研究生, 助理研究员, 现主要从事农产品加工等研究工作。E-mail: liwei981916@163.com。

责任作者:班立桐(1972-), 男, 教授, 现主要从事食用菌产业技术教学与研究等工作。E-mail: banlitong@126.com。

基金项目:天津市北辰区科技发展计划资助项目(BCNYKJ2013-4)。

收稿日期:2013-12-10

1.2.3 正交实验 采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计正交实验,进一步优化发酵培养基配方,各因素与水平见表1。以10%的接种量接种于不同发酵培养基(100 mL/250mL三角瓶)中,在25℃条件下180 r/min 振荡培养4 d,每个处理3次重复。

表1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素与水平

Table 1 Factor and level of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment g/L				
水平	因素			
	A 葡萄糖	B 蛋白胨	C 空白	D 黄豆饼粉
1	10	1.0	—	30
2	25	2.5	—	60
3	50	5.0	—	90

1.3 项目测定

1.3.1 菌丝干重的测定 把培养好的液体菌种用80目的筛网进行过滤,收集菌球,用清水进行反复冲洗,而后置于恒温烘干箱中80℃烘干2 h后,称重,之后继续烘干,并每隔30 min 称量1次,直至2次称量差不超过2 mg^[4],即为恒重。最后计算每种发酵培养基中菌丝干重的平均值。

1.3.2 菌球密度的测定 从液体培养基的每个重复摇瓶中取1 mL 培养液置于培养皿中,在暗背景下,用放大镜直观菌球数量进行计数,每瓶菌种3次重复,最后计算每种发酵培养基中菌球密度的平均值。

1.3.3 菌丝球回接平板萌发时间的测定 分别从6种发酵培养基的培养液中取1个菌球置于PDA 平板培养基中央,每种发酵培养基做3个重复,将放有菌球的PDA 平板置于培养箱中25℃进行培养,每隔1 h 观察1次,等到观测到有1组菌球萌发后,改为每30 min 观测1次,并记录各处理的萌发时间,最终计算每种发酵培养基中菌球回接平板后萌发时间的平均值^[3]。

1.3.4 菌球直径的测定 根据每种培养液中所含菌球大小数量的比例选取15个菌球在培养皿中排成长列,皿下衬坐标纸,测量总长度,然后求平均值,每瓶菌种3次重复,最后计算每种发酵培养基中菌球直径的平均值。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对菌种生长的影响

2.1.1 不同培养基对菌丝干重的影响 从表2可以看出,配方E中的菌丝干重最高,为5.4 g/L,其次是配方B和F。方差分析表明,配方E与B之间差异不显著,但是与其它4个配方均存在极显著性差异。可见,不同培养基配方对杏鲍菇液体菌种的菌丝干重影响较大,从高到低的顺序依次为E>B>F>C>A>D。

2.1.2 不同培养基对菌球密度的影响 从表2可以看出,配方E中的菌球密度最大,为 1.04×10^5 个/L,且与配方B、A、F、C、D之间都存在极显著性差异,配方F、C、D之间差异不显著,菌球密度最小的是配方D,为

0.42×10^5 个/L。通过表2可以看出,不同培养基中菌球回接平板后的萌发时间由短到长依次为E<C<A<D<B<F,配方E中的菌球萌发时间最短为7.5 h,说明配方E中的菌球回接平板后的生长速度最快。方差分析表明,配方C、E与其余配方的萌发时间无显著性差异,二者之间差异也不显著。

2.1.2 不同培养基对菌球菌球直径的影响 由表2可知,配方E中的菌球直径最小,并与配方F、B之间存在显著差异,而配方B、A、C、D之间差异不显著。不同培养基中菌球直径由小到大的顺序依次为E最小,为0.95 mm,C与D稍大,F最大,为2.14 mm。综上所述,不同培养基配方对杏鲍菇液体菌种的菌丝干重、菌球密度和回接平板萌发时间影响较大。配方E中的液体菌种菌丝量大、密度高、回接平板萌发时间短,且菌球直径适当,综合考虑,确定配方E为初始培养基配方。

表2 不同培养基对杏鲍菇液体菌种菌丝干重、菌球密度、菌球回接平板萌发时间、菌球直径的影响

Table 2 The effect of mycelial dry weight, mycelial density, mycelial germination time, the fungus ball diameter in different liquid spawn medium of <i>Pleurotus eryngii</i>				
培养基 配方	菌丝干重 /g	菌球密度 / $\times 10^5$ 个·L ⁻¹	菌球回接平板 萌发时间/h	菌球直径 /mm
A	1.2±0.1cB	0.63±0.08cC	9.5±0.50abAB	1.21±0.06bcB
B	3.5±0.3abAB	0.86±0.04bB	9.8±0.29abAB	1.39±0.03bAB
C	2.1±0.2bcB	0.46±0.02dD	8.0±1.00bB	1.15±0.04bcB
D	0.9±0.1cB	0.42±0.02dD	9.7±0.29abAB	1.17±0.02bcB
E	5.4±0.2aA	1.04±0.12aA	7.5±0.50bB	0.95±0.02cB
F	2.4±0.1bcB	0.47±0.01dD	11.5±0.50aA	2.14±0.05aA

2.2 最适培养基的优化

由表3可知,最优水平组合为A₁B₃D₂,即杏鲍菇液体菌种最优培养基配方为葡萄糖10 g/L,蛋白胨5 g/L,黄豆饼粉60 g/L,磷酸二氢钾0.5 g/L,硫酸镁0.5 g/L,维生素B₁ 0.01 g/L。各组分对菌丝干重的影响大小依

表3 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Table 3 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment g/L								
因素	A 葡萄糖	B 蛋白胨	C 空白	D 黄豆饼粉	菌丝干重			
					1	2	3	平均值
1	1	1	1	1	8.26	8.30	8.28	8.28
2	1	2	2	2	11.05	11.10	11.09	11.08
3	1	3	3	3	11.99	11.99	11.98	11.99
4	2	1	2	3	5.70	5.63	5.63	5.65
5	2	2	3	1	2.56	2.59	2.58	2.58
6	2	3	1	2	9.84	9.85	9.87	9.85
7	3	1	3	2	13.64	13.63	13.67	13.65
8	3	2	1	3	8.34	8.28	8.31	8.31
9	3	3	2	1	6.46	6.49	6.47	6.47
X1	10.45	9.19	8.81	5.78				
X2	6.03	7.32	9.45	11.53				
X3	9.48	9.43	9.40	8.65				
R	4.42	2.12	1.67	5.75				

注:Xi为各因素同一水平试验指标的平均数;R为各因素的极差。

表 4 方差分析

Table 4 Table of variance analysis

变异来源	偏差平方和	自由度	F 比	F 值($\alpha=0.10$)
A	32.42	2	7.51	9.00
B	8.02	2	1.86	9.00
C	4.32	2	1.00	9.00
D	49.59	2	11.49*	9.00
误差	4.32	2		

次为黄豆饼粉>葡萄糖>蛋白胨。通过方差分析(表 4)可知,黄豆饼粉含量对杏鲍菇液体菌种的菌丝产量影响显著,其余因素均不显著。

3 讨论与结论

对于杏鲍菇液体菌种来讲,菌丝干重越大,则菌种的品质越好;菌球密度越大,则菌种的流动性越强,接种后越容易分散,发菌点也就越多;菌球回接平板后萌发时间越短,说明菌种的活性越强,接种后菌丝萌发和生长速度越快,越有利于生产。

该试验对比了麸皮培养基、玉米粉培养基、黄豆粉培养基、豆粕培养基、黄豆饼粉培养基和土豆培养基中杏鲍菇液体菌种的各项指标,结果表明,在黄豆饼粉培

养基中杏鲍菇液体菌种菌丝量大、菌球密度高、回接平板萌发时间短,且菌球直径适当。同时,通过正交实验进行培养基优化,确定各组分的含量及影响力大小。由此得到,黄豆饼粉培养基为杏鲍菇液体菌种生长的最佳培养基,其各组分的最佳含量为葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,黄豆饼粉 60 g/L,磷酸二氢钾 0.5 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,维生素 B₁ 0.01 g/L。

参考文献

- [1] 马瑞霞,刘慧. 杏鲍菇液体菌种培养基的筛选及培养条件的探讨[J]. 中国农学通报,2011,27(7):452-456.
- [2] 孟丽君,王芳,张玉萍,等. 杏鲍菇液体菌种的制备条件及应用研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2009,29(2):153-156.
- [3] 袁建平,张国凤,马立芝. 杏鲍菇液体菌种培养基的筛选[J]. 廊坊师范学院学报,2006,22(4):82-83.
- [4] 王叔淳. 食品卫生检验技术手册[M]. 北京:化学工业出版社,2002:117.
- [5] 刘冠卉,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.
- [6] 秦艳梅,王娟萍,冀宏,等. 杏鲍菇液体菌种的生产工艺优化与应用[J]. 中国食用菌,2008,27(4):28-30.

Study on the Screening and Optimizing of Liquid Spawn Medium of *Pleurotus eryngii*

YANG Li-wei¹, WANG Yu², BAN Li-tong², LIU Jing³, KANG Hong-ming³

(1. Tianjin Research Institution of Forestry and Pomology, Tianjin 300384; 2. Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384; 3. Tianjin Hong Bin He Sheng Agricultural Technology Development Co. Ltd., Tianjin 300400)

Abstract: Taking *Pleurotus eryngii* as material, the screening and optimizing of liquid spawn medium of *Pleurotus eryngii* in submerged culture with shake flask were studied according to the indexes of mycelial dry weight, mycelial density, mycelial germination time and the fungus ball diameter. The results showed that the optimum formula for liquid spawn medium of *Pleurotus eryngii* was glucose 10 g/L, peptone 5 g/L, soybean bread flour 60 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, VB₁ 0.01 g/L, the mycelium of the formula had abundant biomass, high density, short germination time and appropriate diameter.

Key words: *Pleurotus eryngii*; liquid spawn; medium; screening; optimizing

食用菌多糖

在国际上,食用菌多糖被称为“生物反应调节物”,简称“BRM”,经研究表明,多糖具有生物反应调节物的特征,可做为免疫增强剂和免疫激活剂,这些活性多糖具有一个的结构,即主链由 β -D(1~73)连接的葡萄糖基组成,沿主链随机分布着同 β -D(1~73)边接的葡萄糖基呈梳状结构,生物的大小随多糖的精细结构和构象不同而变化。

按研究表明,药用菌的活性多糖成份 β -D(1-73)葡萄糖对异源的、同源的甚至遗传性的肿瘤都有变化。此外,它还具有抗细菌、抗病毒和抗凝聚的作用,提高肝功能和解毒力,提高动物耐缺氧能力和氧的利用率,降低血液的粘稠度,增加心肌收缩力,改善心律,降血糖、镇静、镇痛、平喘、止咳、化痰的功效。

(来源:百度百科)