

栽培料发酵条件及环境条件对 瓶栽巨大口蘑菌丝生长影响

杨水莲¹, 聂健², 叶运寿³, 莫美华¹, 魏要武¹, 昌毓嵩¹

(1. 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642; 2. 东莞雀巢有限公司, 广东 东莞 523000;

3. 广东星河生物科技股份有限公司, 广东 东莞 523000)

摘要:以巨大口蘑为试材,通过单因素试验研究栽培料的发酵温度、初始 pH 值和水分含量对瓶栽巨大口蘑菌丝生长的影响,并采用均匀设计法优化菌丝培养环境条件中的温度、空气相对湿度、二氧化碳浓度,明确巨大口蘑瓶栽所需的必要条件,为实现巨大口蘑从传统的袋子覆土栽培向瓶子无土栽培的转化提供参考依据。结果表明:栽培料的最适发酵温度范围为 70~75℃,最适初始 pH 值为 8.5,最适水分含量为 61%;从均匀设计法的优化结果得出其菌丝生长的最优环境条件:最适培养温度为 30℃,空气相对湿度为 60%,二氧化碳浓度为 0.15%。

关键词:巨大口蘑;栽培料;发酵;环境条件;优化

中图分类号:S 646.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)18-0153-04

巨大口蘑(*Tricholoma giganteum*)属担子菌亚门,层菌纲,伞菌目,口蘑科,口蘑属,又名大白口蘑(*Tricholoma giganteum* Massee)、洛巴伊口蘑(*Tricholoma lobayensis*),商品名有金鞭口蘑、洛巴口蘑、金福菇等,是一种珍稀的食药大型真菌^[1]。主要分布在热带和亚热带地区,国外主要分布于非洲地区、亚洲的印度、孟加拉、日本等地;国内主要分布于台湾、福建、广东、香港、广西、云南、湖南等地,夏秋季在凤凰木等树桩附近、榕树下、竹丛中的沃土或草地上丛生^[2]。目前,国内外对巨大口蘑的研究多集中在生物学特性、栽培料配方优化、野生菌种的分离与驯化、覆土栽培学研究及营养成分、微量元素测定和贮藏等领域^[3-7]。巨大口蘑的生产方式都是用袋子装料,菌丝长满后开袋覆土出菇^[8-10],大部分生产巨大口蘑的食用菌生产企业尚未形成工业化、专业化、规模化的生产格局,受季节和自然条件的影响,无法周年生产、均衡供应市场,而且人工成本较高。为解决这些难题,该试验研究了巨大口蘑瓶栽技术,以期实现巨大口蘑的工厂化栽培。

第一作者简介:杨水莲(1990-),女,硕士研究生,研究方向为食用菌真菌学。E-mail:1061565326@qq.com.

责任作者:莫美华(1966-),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为食用菌真菌学。E-mail:mindymo@163.com.

基金项目:广东省省部产学研资助项目(2012B091100302);广东省农业科技推广资助项目(201201138);广东省省级科技计划资助项目(2013B020502019)。

收稿日期:2015-05-25

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种为巨大口蘑,由华南大学食品学院实验室保藏。

母种培养基:马铃薯 200 g,蔗糖 15 g,琼脂 18 g,水 1 000 mL(pH 7.0)。原种培养基:麦粒 900 g,加入 0.5% 酵母粉、0.3% 蛋白胨、0.1% KH_2PO_4 、0.1% MgSO_4 、1% 石灰。栽培料配方:蔗渣 40%,棉籽壳 40%,麸皮 18%,酵母粉 0.5%,磷酸二氢钾 0.1%,硫酸镁 0.1%,轻质碳酸钙 0.1%,生石灰 1%。

生化培养箱、超净工作台、高精度 pH 计、水分测定仪、高压灭菌锅、智能环境控制系统、手持农业气象监测仪、游标卡尺。

1.2 试验方法

1.2.1 沤料中的发酵温度对菌丝生长的影响 栽培料沤料时的发酵温度试验水平分别设为 45~50、50~55、55~60、60~65、65~70、70~75、75~80℃。沤料 7 d 后,调节栽培料为 pH 9.0,水分含量为 60%^[11]。分别采用清洁、无破损的塑料瓶子和瓶盖,瓶盖内海绵要求无破损无堵塞,每瓶装料 600 g 左右,装瓶高度为瓶口以下 1.5 cm,松紧度均匀,瓶肩无空隙,中间打孔至瓶底,然后盖紧所有瓶盖。高压蒸汽灭菌,接种后置于相同条件下培养。菌丝培养温度为 28℃,空气相对湿度 60%~70%,黑暗处培养。观察菌丝的生长情况,每隔 3 d 记录 1 次菌丝生长速度,用游标卡尺测量菌丝生长的深度并

记录菌丝的长势。每处理重复 5 次。

1.2.2 栽培料初始 pH 值对菌丝生长的影响 把在相同发酵温度下已沤料 7 d 的栽培料 pH 值分别调为 7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0。水分含量为 60%。装瓶、灭菌、接种、培养和记录方法同 1.2.1。

1.2.3 栽培料水分含量对菌丝生长的影响 把在相同发酵温度下已沤料 7 d 的栽培料水分含量分别调为 55%、58%、61%、64%、67%、70%。pH 值为 9.0。装瓶、灭菌、接种、培养和记录方法同 1.2.1。

1.2.4 菌丝生长环境条件优化试验设计 选取温度 X_1 、空气相对湿度 X_2 、二氧化碳浓度 X_3 为参试因素,根据以上单因素试验得出的栽培料最适发酵温度、最适 pH 值、最适水分含量作为每个因素水平设计的依据,每个因素设 5 个水平(表 1)。采用 $U_5(5^3)$ 均匀设计表进行试验设计,试验方案见表 2。制作瓶子栽培料、灭菌、接种后按照表 2 中的试验方案进行培养。栽培料制作和结果记录方法同 1.2.1。

表 1 参试因子水平

Table 1 Experimental factor level table

因素水平 Factor level	因素 Factor		
	X_1 温度 Temperature /℃	X_2 空气相对湿度 Relative humidity of the air /%	X_3 二氧化碳浓度 Concentration of carbon dioxide /%
1	26	60	0.05
2	28	63	0.15
3	30	66	0.25
4	32	69	0.35
5	34	72	0.45

表 2 菌丝生长环境条件均匀设计优化方案

Table 2 The uniform design of mycelium culture conditions

处理 Treatment	X_1 温度 Temperature /℃	X_2 空气相对湿度 Relative humidity of the air /%	X_3 二氧化碳浓度 Concentration of carbon dioxide /%
1	26	63	0.35
2	28	69	0.25
3	30	60	0.15
4	32	66	0.05
5	34	72	0.45

1.3 数据分析

采用 DPS v 9.50 统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 沤料时的发酵温度对菌丝生长的影响

由图 1 可以看出,菌丝在不同发酵温度下的栽培料上均能生长,其中,发酵温度为 70~75℃ 时,菌丝生长速度最快,为 $8.366 0 \pm 0.186 8$ mm/d,与其它发酵温度下的栽培料对巨大口蘑菌丝生长影响的差异显著,而且菌丝长势浓密。发酵温度为 65~70℃ 时,菌丝生长速度次之,菌丝长势浓密;而发酵温度为 45~50℃ 时,菌丝生长速度最慢,菌丝长势也比较稀疏。当发酵

温度低于 75℃ 时,栽培料发酵的温度越高,菌丝生长速度越快,当发酵温度大于 75℃ 时,菌丝生长速度呈下降趋势。

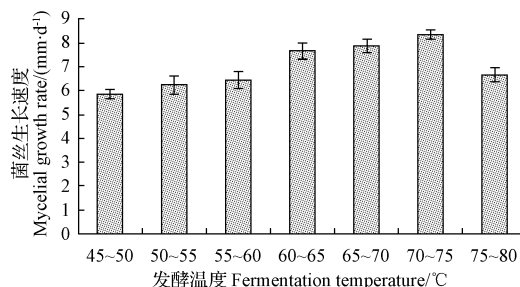


图 1 栽培料的发酵温度对瓶栽巨大口蘑菌丝生长的影响

Fig. 1 The influence of fermentation temperature on mycelial growth of *Tricholoma giganteum*

2.2 栽培料初始 pH 值对菌丝生长的影响

由图 2 可以看出,菌丝在不同初始 pH 值的栽培料中均能生长,而初始 pH 值为 8.5 时,菌丝生长速度最快,为 $8.895 7 \pm 0.179 9$ mm/d,与其它 pH 值下的菌丝生长速度有显著差异,菌丝长势浓密。栽培料的 pH 值高于或低于 8.5 时菌丝生长速度都会降低,特别是当 pH 值高达 10.0 时,菌丝生长速度极慢。

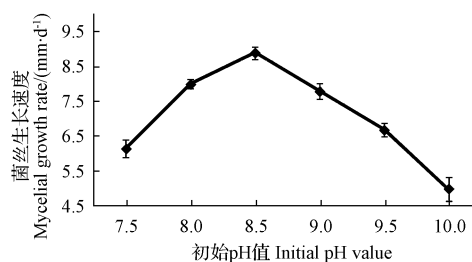


图 2 栽培料初始 pH 值对瓶栽巨大口蘑菌丝生长的影响

Fig. 2 The influence of initial pH value on mycelial growth of *Tricholoma giganteum*

2.3 栽培料水分含量对菌丝生长的影响

由图 3 可以看出,菌丝在水分含量不同的栽培料中均能生长,在栽培料水分含量为 61% 时,菌丝生长速度

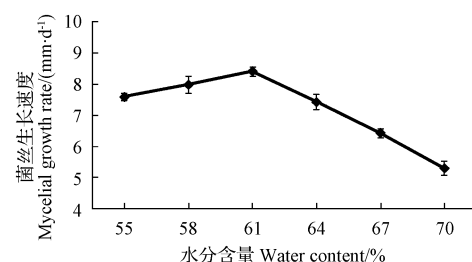


图 3 栽培料水分含量对瓶栽巨大口蘑菌丝生长的影响

Fig. 3 The influence of water content on mycelial growth of *Tricholoma giganteum*

最快,达到 $8.433\ 3 \pm 0.143\ 7\ \text{mm/d}$,与其它水分含量的菌丝生长速度有显著差异,且菌丝长势浓密。栽培料水分含量超过 61%时,随着水分含量升高,菌丝生长速度减慢。

2.4 菌丝生长环境条件优化

由表 3 可知,以菌丝生长速度为目标函数(Y),用 DPS v 9.50 对数据进行二次多项式逐步回归分析,所得回归方程为: $Y=11.525\ 595\ 26-0.000\ 000\ 261\ 530\ 520\ 33X_3^2-0.002\ 440\ 600\ 056\ 5X_1X_2+0.000\ 037\ 120\ 576\ 66X_1X_3$ 。对回归方程进行检验,得到相关系数 $R=0.999\ 943$,由此可见,菌丝生长速度与回归方程中试验因素的数值有密切的相关性,其显著性检验值 $F=2\ 908.528\ 6$,显著水平 $P=0.013\ 6<0.05$,剩余标准差 $S=0.019\ 3$,调整相关系数 $R=0.999\ 771$,回归方程显著,说明方程的可信度高。

表 3 菌丝生长环境条件优化试验结果

Table 3 The test results of mycelium culture environmental conditions

处理 Treatment	因素 Factor			
	X ₁ 温度 Temperature /℃	X ₂ 空气相对湿度 Relative humidity of the air/%	X ₃ 二氧化碳浓度 Concentration of carbon dioxide/%	生长速度 Growth rate /(mm·d ⁻¹)
1	26	63	0.35	7.702 3±0.170 2ab
2	28	69	0.25	7.788 8±0.226 3ab
3	30	60	0.15	8.202 3±0.145 5a
4	32	66	0.05	6.900 3±0.363 1b
5	34	72	0.45	5.931 2±0.224 6c

表 6

菌丝生长环境条件验证实验结果

Table 6 The verified test results of mycelium culture conditions

试验号 Test No.	因素 Factor			生长速度 Growth rate/(mm·d ⁻¹)
	X ₁ 温度 Temperature/℃	X ₂ 空气相对湿度 Relative humidity of the air/%	X ₃ 二氧化碳浓度 Concentration of carbon dioxide/%	
理论最优 The theoretical optimum	26	60	0.09	7.510 2±0.145 5b
处理 3 Treatment 3	30	60	0.15	8.405 0±0.400 5a

通过 DPS v 9.50 进行显著性分析,组间最优处理 3 生长速度显著高于理论最优组合。因此,瓶栽巨大口蘑菌丝生长速度的最适环境条件为温度 30℃,空气相对湿度为 60%,二氧化碳浓度为 0.15%。

3 讨论与结论

采用单因素实验分别对栽培料的发酵温度、初始 pH 值和水分含量对瓶栽巨大口蘑菌丝生长的影响进行了研究,从试验结果可以看出,栽培料的最适发酵温度范围为 70~75℃,最适初始 pH 值为 8.5,最适水分含量为 61%。采用均匀设计法优化菌丝培养温度、空气相对湿度、二氧化碳浓度对瓶栽巨大口蘑菌丝生长的影响,从回归方程中可以看出,菌丝生长速度与回归方程中试验因素的数值之间有密切的相关性,均达到显著水平;培养温度、空气相对湿度、二氧化碳浓度之间的交互作用对菌丝生长速度的影响很大,全部达到显著水平。瓶

由表 4 可知,方程中各个回归项的显著水平均小于 0.05,说明培养温度、空气相对湿度和二氧化碳浓度的交互作用对瓶栽巨大口蘑菌丝生长速度影响很大,达到显著水平^[12]。由表 5 可知,观察值与拟合值接近,最大拟合误差绝对值仅为 0.014 6,进一步说明了回归方程的准确性。经数学模拟,分析得出一个最高指标时各个因素的优化组合,将此理论最优组合与组间最优处理 3(直观最优)进行验证,以确定瓶栽巨大口蘑菌丝生长的最佳环境条件,验证结果如表 6 所示。

表 4 各回归项的回归系数检验

Table 4 The test of each regression item coefficient

回归项 The regression item	偏相关 The partial correlation	t 值 t value	P 值 P value
$r(y, X_3 X_3)$	-0.999 6	35.658 9	0.017 8
$r(y, X_1 X_2)$	-0.999 9	70.306 6	0.009 1
$r(y, X_1 X_3)$	0.999 5	32.015 4	0.019 9

表 5 样本的观察值、拟合值和拟合误差

Table 5 The observed value, fitting value and fitting error of the sample

样本 Sample	观察值 The observed value	拟合值 The fitting value	拟合误差 The fitting error
1	7.702 3	7.702 1	0.000 2
2	7.788 8	7.774 2	0.014 6
3	8.202 3	8.214 5	-0.012 2
4	6.900 3	6.899 6	0.000 7
5	5.931 2	5.934 5	-0.003 3

栽巨大口蘑菌丝生长的环境条件为:最适培养温度 30℃,空气相对湿度 60%,二氧化碳浓度 0.15%。

巨大口蘑为草腐菌,用作栽培料的原料大都需经过堆沤发酵^[13]。在发酵过程中,可利用料内好氧微生物生长所释放的热量提高料堆温度,一般要达到 60℃以上,以杀灭料内的杂菌和虫卵,有效的减轻病虫害,同时也可以对培养料起到降解和软化作用,有利于菌丝生长。如果发酵温度较低时,栽培料没有完全软化,不容易被菌丝分解,菌丝生长速度缓慢;如果其发酵温度过高,超过 75℃时,菌丝生长速度开始变慢,可能是因为高温破坏了原料中的一部分营养成分。从该试验的结果得出,栽培料的发酵温度在 60~75℃时,菌丝生长速度都快,而且菌丝长势浓密。

pH 值对稳定食用菌菌丝细胞内酸碱平衡和促进分解吸收栽培料的营养物质具有很大作用,不同食用菌菌

丝生长的最适 pH 值各不相同。栽培料是菌丝生长的外部环境,菌丝体的生长依赖该菌丝体内部酶的催化作用方可实现,而酶的活性与 pH 值有很大关系,在最适 pH 值下,表现出最强活性,高于或低于最适 pH 值时,酶的活性都会下降^[14]。因而菌丝体的培养必须选择最适的 pH 值,使其新陈代谢处于最佳状态。

食用菌菌丝在生长发育过程中所需水分主要来源于栽培料,栽培料水分含量过高或过低都不利于菌丝生长。水分含量过低,不能满足菌丝生长的需要;水分含量高时会影响氧气的进入和菌丝呼吸作用^[15],造成菌丝生长缓慢,长势较弱,在瓶底甚至出现停止生长的现象。从该试验看出,当水分含量高达 70% 时,菌丝生长明显变慢。

巨大口蘑菌丝的生长发育包括菌丝的发育、生长周期、生长速度、生长势、抗逆性、菌丝表现等^[16]。食用菌的一生可分为营养生长和生殖生长两大阶段,前者为后者提供营养物质,只有积累足够的营养并达到生理成熟,方能顺利出菇。营养生长即菌丝培养阶段。因此,在营养生长阶段,除了需要最适的栽培料,还必须满足适宜的温度、空气相对湿度、二氧化碳浓度等环境条件以及足够的时间,使菌丝在营养生长阶段积累足够的营养物质使其生育成熟,为无土瓶栽培提供理论基础^[17]。

参考文献

- [1] 黄年来. 适合热带地区栽培的珍稀菇—巨大口蘑[J]. 食用菌, 2001(5):12-13.
- [2] 张振富,王元忠,张锐,等. 云南野生菌坛中发现的巨大口蘑王[J]. 云

南农业大学学报,2005(1):151-153.

- [3] 杨春敏. 巨大口蘑和双孢蘑菇贮藏期间多酚氧化酶与褐变度的研究[J]. 才智,2012(27):356-357.
- [4] 邓优锦,傅俊生,谢宝贵,等. 野生金福菇的鉴定及其生物学特性研究[J]. 浙江食用菌,2008(6):10-14.
- [5] 修翠娟. 野生口蘑菌种分离及人工驯化[J]. 微生物学杂志,2012(3):98-100.
- [6] 张国广,邹金美,郑琳,等. 一株野生大型真菌的 ITS 分析及生物学特征研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),2010(6):395-399.
- [7] 汤洪敏,虞泓,梁南熙. 高效液相色谱法分析大白口蘑菌株的化学多样性[J]. 理化检验(化学分册),2009(10):1141-1144.
- [8] 李碧琼,陈政明,林俊扬,等. 袋栽金福菇高产栽培技术[J]. 食用菌,2007(3):53-54.
- [9] 韦仕岩,黄卓忠,王灿琴,等. 金福菇 3 种覆土出菇模式的比较试验[J]. 中国食用菌,2011(5):22-23.
- [10] 卢成英,钟以举,张敏. 吉首大白口蘑 (*Tricholoma giganteum*) 研究[J]. 微生物学通报,2001,28(4):20-23.
- [11] 高珠清. 巨大口蘑优质高产栽培技术[J]. 食用菌,2004(5):33.
- [12] 马紫英,夏斌,倪焱,等. 以椰子壳为主碳源的巨大口蘑原种培养基优化[J]. 北方园艺,2014(13):142-145.
- [13] 李碧琼,陈政明,林俊扬. 洛巴伊口蘑栽培最适覆土厚度研究[J]. 中国食用菌,2009(2):26-28.
- [14] 肖兴,陈春兰,陈清乐,等. 培养基和 pH 值对巨大口蘑菌丝生长的影响[J]. 安徽农业科学,2009(9):3990-3991.
- [15] 王崇鼎. 杏鲍菇工厂化栽培中几个关键问题研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [16] 林兴生,林衍铨. 袋口高度、光照、CO₂ 等因子对杏鲍菇工厂化栽培的影响[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(4):737-739.
- [17] 谢凌慧. 杏鲍菇高效栽培技术及其液体菌种的应用研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2009.

Influence of Fermentation and Environmental Conditions on Mycelial Growth of *Tricholoma giganteum*

YANG Shuilian¹, NIE Jian², YE Yunshou³, MO Meihua¹, WEI Yaowu¹, CHANG Yusong¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642; 2. Dongguan Nestle Co. Ltd., Dongguan, Guangdong 523000; 3. Starway Bio-Technology Co. Ltd., Dongguan, Guangdong 523000)

Abstract: *Tricholoma giganteum* was taken as test material, the influence of fermentation temperature, initial pH value and water content of the cultivation material on mycelial growth of *Tricholoma giganteum* was researched by the single factor experiment. The uniform design method was used to optimize the temperature, the relative humidity of the air and the concentration of carbon dioxide of mycelium culture conditions. The objective was to clear the necessary conditions of bottle cultivation and realize *Tricholoma giganteum* cultivation from the traditional bag cultivation with soil to bottle cultivation without soil. The results showed that from the single factor experiment, the optimal fermentation temperature was 70—75℃, the optimum initial pH value was 8.5, the optimum moisture content was 61%. The optimal environment conditions of mycelial growth from the result of the uniform design experiment was that the optimal temperature 30℃, the optimal relative humidity of the air 60%, and the optimal concentration of carbon dioxide 0.15%.

Keywords: *Tricholoma giganteum*; cultivation material; fermentation; environmental condition; optimization