

元蘑液体菌种的优化培养

李延雷¹, 陈炜东², 滕素岩², 高书成¹

(1. 黑龙江省东宁县暖泉子林场, 黑龙江牡丹江 157200; 2. 黑龙江省东宁县林业局, 黑龙江牡丹江 157200)

摘要 [目的] 筛选元蘑液体菌种培养基配方, 优化液体菌种培养工艺。[方法] 通过设置不同的液体培养基配方、不同的接种条件(包括不同菌龄、不同接种量)和不同的培养条件(包括不同转速、不同培养时间), 以菌丝体生物量、菌丝球密度及菌丝球形态为指标进行元蘑液体菌种的筛选。[结果] 液体培养元蘑菌种的最佳培养基配方为: 200 g 马铃薯、150 g 稻草粉、10 g 玉米粉、20 g 葡萄糖、3 g 蛋白胨、2 g 酵母膏、维生素 B₁ 1 片; 最佳接种菌龄为 5 d; 最佳接种量为 9%; 最佳培养转速为 160 r/min; 最佳培养时间为 7 d。[结论] 元蘑液体菌种经过优化培养, 菌丝体生物量、菌丝球密度及菌丝球形态都有很大提高。

关键词 元蘑; 液体菌种; 优化培养

中图分类号 S646 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)26-0001-03

Optimized Culture of Liquid Strains of *Hohenbuehelia serotina*

LI Yan-lei¹, CHEN Wei-dong², TENG Su-yan² et al (1. Dongning Nuanquanzi Forest Farm, Mudanjiang, Heilongjiang 157200; 2. Dongning Forestry Bureau, Mudanjiang, Heilongjiang 157200)

Abstract [Objective] To screen the medium formula of liquid strains of *Hohenbuehelia serotina* to optimize the culture process of liquid strains. [Method] By setting different liquid medium formulas, inoculation conditions (including strain age and amount of inoculum) and culture conditions (including rotation speed and culture time), culture conditions of liquid strains of *H. serotina* were optimized by mycelium biomass, density and shape of mycelium pellets. [Result] The optimal formula of the liquid medium of *H. serotina* strains are shown as follows: potato 200 g, straw powder 150 g, corn flour 10 g, glucose 20 g, peptone 3 g, yeast extract 2 g, and a piece of vitamin B₁; the optimal age of strains was 5 d; the optimal amount of inoculum was 9%; the optimal rotation speed was 160 r/min; the optimal culture time was 7 d. [Conclusion] By optimized culture, the mycelium biomass, density and shape of mycelium pellets of *H. serotina* were greatly improved.

Key words *Hohenbuehelia serotina*; Liquid seed; Optimized culture

元蘑 [*Hohenbuehelia serotina* (Pers: Fr.) Sing.] 隶属真菌界真菌门担子菌亚门层菌纲伞菌目侧耳科亚侧耳属^[1], 又称亚侧耳、黄蘑、冻蘑, 分布于吉林、黑龙江、河北、山西、广西、陕西、四川、云南、西藏等地区, 以东北林区最多。元蘑具有极高的营养价值, 其质地柔嫩、味道鲜美、食味独特, 含有蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素和矿质元素等多种营养成分^[2-3], 被誉为“山珍”“健康食品”“长寿食品”等, 在古代《奉天通志》中就曾记载, 在民间有很长的食用历史。元蘑不仅具有很高的营养价值, 而且是一种地方性草药, 具有疏风活络、强筋壮骨的功效^[4]。中医学认为, 元蘑性甘、温、能祛风活络、清热燥湿, 适用于癫痫、肝硬化腹水、风湿痛、肌肉痛和目赤肿痛等症^[4]。

目前, 在元蘑的人工栽培过程中普遍采用试管母种制作原种、再扩大制作栽培种的固体菌种接种培育法, 这种方法生产效率低, 菌丝满袋周期长且菌龄不一致。液体发酵生产液体菌种则可以克服上述缺点, 是一种适合规模化、工厂化的菌种制备技术。笔者对元蘑液体菌种制备过程中培养基配方进行了筛选, 对其生产工艺进行了优化, 以期为元蘑的大规模工厂化生产提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 供试菌株保存于东北林业大学森林保护学科实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的制备。 试验使用的分离培养基为 PDA 培养

基, 其制作方法如下: 将马铃薯洗净去皮, 用电子天平称取 200 g, 切成 1 cm × 1 cm × 1 cm 的小块, 用纱布包好后放入 1 000 mL 水中煮沸, 待马铃薯块软化后捞出。加入葡萄糖 20 g 和琼脂 15 g, 再次煮沸, 加水补足 1 000 mL, 再用双层纱布过滤, pH 自然, 倒入锥形瓶内, 将瓶口用封口膜封好后, 用高压灭菌锅高压湿热灭菌, 121 ℃ 下灭菌 20 min。灭菌结束后, 待培养基温度降低至不烫手但未凝固时, 在超净工作台内, 将经过灭菌的 PDA 培养基定量倒入直径 8 cm 的培养皿中, 装液量为 20 mL, 凝固后备用。

1.2.2 液体培养基的制备。 试验共采用 5 种液体培养基, 各培养基制作方法如下: ①对照组 (液体培养基 CK)。马铃薯处理方法同 PDA, 加入 20 g 葡萄糖, 再次煮沸, 加水补足 1 000 mL, 再用双层纱布过滤, pH 自然, 倒入 500 mL 锥形瓶内, 每个锥形瓶分装 300 mL 液体培养基, 封口膜封口后, 放入高压灭菌锅内, 121 ℃ 下灭菌 30 min 以备用。②试验组 I。马铃薯处理方法同 PDA, 与 150 g 稻草放入 1 000 mL 水中煮沸, 约 20 min 后捞出, 加入 10 g 玉米粉, 煮约 10 min, 然后用双层纱布过滤, 再加入 20 g 葡萄糖、3 g 蛋白胨、2 g 酵母膏和维生素 B₁ 1 片, 待融化后进行分装和灭菌, 分装与灭菌方法同对照组。③试验组 II。马铃薯处理方法同 PDA, 与 15 g 麦麸放入 1 000 mL 水中煮沸, 约 20 min 后捞出, 用双层纱布过滤, 再加入 20 g 葡萄糖、1 g 磷酸二氢钾、500 mg 硫酸镁, 待融化后进行分装和灭菌, 分装与灭菌方法同对照组。④试验组 III。称取 10 g 玉米粉和 10 g 豆饼粉加入 1 000 mL 水中煮沸, 约 10 min 后捞出, 4 层纱布过滤, 过滤后加入 20 g 蔗糖和 2 g 酵母膏继续煮, 待融化后进行分装和灭菌, 分装与灭菌方法同对照组。

基金项目 中央财政林业科技推广示范资金项目。

作者简介 李延雷 (1983 -), 男, 黑龙江大庆人, 高级工程师, 从事食用菌推广工作。

收稿日期 2016-07-08

1.2.3 不同液体培养基配方对菌丝生长的影响。将 PDA 斜面培养基保存的元蘑菌种,接种于新的 PDA 平板培养基中心,待菌丝长满整个平板培养基后,用内径 5 mm 已灭菌的打孔器在距平板中心接种点 4 cm 处打孔,将菌龄一致的菌块转接到各组液体培养基中,每瓶液体培养基接入菌块 10 块,每个配方设置 5 个重复。将接入菌块的液体培养基锥形瓶放入恒温振荡器内,在 25 ℃、130 r/min 的条件下培养 7 d,观察菌丝球形态,并检测菌丝球密度和生物量。

1.2.4 元蘑液体培养条件的优化。

1.2.4.1 种子培养。以筛选得到的最佳液体培养基,进行液体发酵培养。接种方法同“1.2.3”,接种后置于 25 ℃恒温箱中静止培养 1 d,然后放入 25 ℃的恒温振荡器中以 130 r/min 的转速恒温培养一定天数,备用。

1.2.4.2 接种菌龄对菌丝生长的影响。以 10% 的接种量,分别向装有 300 mL 最佳液体培养基的 500 mL 三角瓶中接入菌龄为 3、5、7、9、11 d 的种子,在 25 ℃的恒温振荡器中以 130 r/min 转速避光培养,每个处理 4 次重复。培养 5 d 后,检测菌丝体生物量。

1.2.4.3 接种量对菌丝生长的影响。采用最适接种菌龄的种子,分别按 3%、6%、9%、12%、15% 的接种量,接种于装有 300 mL 培养液的 500 mL 三角瓶中,在 25 ℃的恒温振荡器中以 130 r/min 的转速避光培养,每个处理 4 次重复。培养 5 d 后,检测菌丝体生物量。

1.2.4.4 摇床转速对菌丝生长的影响。采用最适菌龄和最适接种量,接种于装有 300 mL 培养液的 500 mL 三角瓶中,放入恒温振荡器中,分别以 120、140、160、180、200 r/min 的转速于 25 ℃恒温下培养,每个处理 4 次重复。培养 5 d 后,检测菌丝体生物量。

1.2.4.5 培养时间对菌丝生长的影响。采用最适菌龄和最

适接种量,接种于装有 300 mL 培养液的 500 mL 三角瓶中,放入恒温振荡器中,在最佳转速下 25 ℃恒温培养,每个处理 4 次重复。分别在培养 3、5、7、9、11 d 后,收集菌丝体,检测菌丝体生物量。

1.2.5 各项菌种质量指标的检测。

1.2.5.1 菌丝球密度的测定。将培养的液体菌种摇匀后,用移液器吸取 1 mL 的菌液,加入到 9 mL 的无菌水中稀释 10 倍,测定菌丝球个数。

1.2.5.2 生物量的测定。取 50 mL 液体菌种,2 000 r/min 离心 20 min,去上清,菌丝体沉淀经蒸馏水充分洗涤后,用滤纸过滤,待滤液无色透明后收集菌丝体,80 ℃下真空干燥至恒重,使用电子天平准确称重。按照以下公式计算菌丝体生物量:

菌丝体生物量(g/L) = $\frac{\text{菌丝体干质量(g)} \times 1\,000}{50(\text{mL})}$

2 结果与分析

2.1 不同液体培养基配方对菌丝生长的影响 由表 1 可知,对照组和 3 个试验组液体培养基的菌丝生长情况表现出较大差异。试验组 I 的菌丝生长情况最佳,菌丝体生物量和菌丝球密度分别达到 5.3 g/L 和 159 个/mL,试验组 III 次之,试验组 II 较差,对照组的菌丝生长情况最差。试验组培养基的营养比对照组更加丰富,因此试验组菌丝的生长情况好于对照组。从菌丝球性状来看,3 个试验组之间没有明显差异,菌丝球均为米黄色,大小均匀且稠密,而对照组菌丝球较为稀疏。从菌丝萌发时间来看,试验组 I 和 III 只需 1 d,试验组 II 需要 2 d,而对照组则需要 3 d 才能萌发,这大大延缓了菌丝体生长对数期的到来。由此可见,试验组 I 液体培养基配方更适合用于液体培养元蘑菌丝体。

表 1 液体培养基配方对菌丝生长的影响
Table 1 Effects of liquid medium formula on the growth of the mycelia

液体培养基配方 Formula of liquid mediums	菌丝体生物量 Mycelium biomass g/L	菌丝球密度 Density of mycelium pellets//个/mL	菌丝球性状 Shape of mycelium pellets	菌丝萌发时间 Germination time of mycelia//d
试验组 I Experimental group I	5.3	159	米黄色,大小均一,稠密	1
试验组 II Experimental group II	4.7	134	米黄色,大小均一,稠密	2
试验组 III Experimental group III	5.1	147	米黄色,大小均一,稠密	1
对照组 (CK)	3.9	118	米黄色,大小不均一,稀疏	3

2.2 不同接种菌龄对菌丝生长的影响 不同菌龄的菌丝体所处的生长期不同,其活力也存在较大差异,因此选择不同菌龄的菌种对菌丝体后期的生长影响较大。由表 2 可知,接种菌龄在 3~11 d,随菌龄的增加,菌丝体生物量和菌丝球密度先增加后减少。当菌龄为 3 d 时,菌丝体生物量和菌丝球密度为 5.1 g/L 和 157 个/mL;当菌龄为 5 d 时,菌丝体生物量和菌丝球密度达到最大,分别为 6.9 g/L 和 214 个/mL,此后随菌龄增加,菌丝体生物量和菌丝球密度逐渐减小;当菌龄为 11 d 时,菌丝体生物量和菌丝球密度减小至 5.9 g/L 和 181 个/mL,但仍然高于菌龄为 3 d 时。从菌丝球性状来看,

菌龄为 3 d 时,菌丝球为米黄色,大小均一但比较稀疏,而菌龄达到 11 d 时,菌丝球为米黄色,虽然较稠密,但大小不均一,只有菌龄在 5~9 d 时,菌丝球性状较好。因此,选择菌龄为 5 d 时的液体菌种,菌丝体的生长情况最佳。

2.3 不同接种量对菌丝生长的影响 接种量对液体培养菌丝体的生长情况影响较为显著。由表 3 可知,在相同培养时间的条件下,接种量越大,菌丝体的生物量和菌丝球密度也越大。当接种量为 12% 时,菌丝体生物量和菌丝球密度均达到最大值,分别为 6.9 g/L 和 219 个/mL。当接种量为 9% 时,菌丝体生物量和菌丝球密度与接种量 12% 差异不显著,

分别为 6.8 g/L 和 212 个/mL;当接种量为 3% 时,菌丝体的生物量和菌丝球密度最小,分别为 4.7 g/L 和 139 个/mL。从菌丝球性状来看,当接种量在 6% 以上时,菌丝球均表现为米黄色,大小均一,稠密;当接种量为 3% 时,菌丝球较为稀疏。因此,从节约菌种的角度来看,接种量为 9% 最为合适。

表 2 接种菌龄对菌丝生长的影响

Table 2 Effects of age of inoculation strains on the growth of the mycelia

接种菌龄 Age of inoculation strains d	菌丝体 生物量 Mycelium biomass g/L	菌丝球密度 Density of mycelium pellets 个/mL	菌丝球性状 Shape of mycelium pellets
3	5.1	157	米黄色,大小较均一,较稀疏
5	6.9	214	米黄色,大小均一,稠密
7	6.8	209	米黄色,大小均一,稠密
9	6.3	192	米黄色,大小较均一,稠密
11	5.9	181	米黄色,大小不均一,稠密

表 3 不同接种量对菌丝生长的影响

Table 3 Effects of amount of inoculation on the growth of the mycelia

接种量 Amount of inoculation %	菌丝体 生物量 Mycelium biomass g/L	菌丝球密度 Density of mycelium pellets 个/mL	菌丝球性状 Shape of mycelium pellets
3	4.7	139	米黄色,大小较均一,较稀疏
6	5.5	168	米黄色,大小均一,较稠密
9	6.8	212	米黄色,大小均一,稠密
12	6.9	219	米黄色,大小均一,稠密
15	6.9	217	米黄色,大小均一,稠密

2.4 不同摇床转速对菌丝生长的影响 液体培养时不同转速对菌丝生长也有一定程度的影响。由表 4 可知,当转速为 120~160 r/min 时,随着转速的增加,菌丝体生物量和菌丝球密度也在逐渐增加。当转速为 160 r/min 时,菌丝体生物量和菌丝球密度达到最大值,分别为 7.1 g/L 和 223 个/mL;当转速为 120 r/min 时,菌丝体生物量和菌丝球密度最小,分别为 6.1 g/L 和 182 个/mL;当转速为 180 和 200 r/min 时,菌丝体生物量分别为 6.8 和 6.9 g/L,菌丝球密度分别为 211 和 214 个/mL,与转速 160 r/min 相比略有下降。从菌丝球性状来看,各转速之间的差异不大,都表现为菌丝球米黄色,大小均一且稠密。因此,液体培养时,160 r/min 为最佳的培养转速。

2.5 不同培养时间对菌丝生长的影响 液体培养时不同培养时间对菌丝生长有极显著的影响。由表 5 可知,液体培养至 11 d 时,菌丝体生物量和菌丝球密度都达到最大值,分别为 7.3 g/L 和 241 个/mL;液体培养 3~7 d 时,随着培养时间的延长,菌丝体生物量和菌丝球密度也逐渐增加。液体培养 3 d 时,菌丝体生物量和菌丝球密度都最小,分别为 5.2 g/L 和 157 个/mL;液体培养 7 d 时,菌丝体生物量和菌丝球密度与培养 9 d 时无显著差异,菌丝体生物量为 7.2 g/L,菌丝球

密度为 237 个/mL。在菌丝球性状方面,液体培养 5 d 后,菌丝球颜色为米黄色,大小均一且稠密,培养时间不足 5 d 时,菌丝球则相对稀疏。因此,从生产周期来看,液体培养时间为 7 d 时,效果最佳。

表 4 不同转速对菌丝生长的影响

Table 4 Effects of rotation speed on the growth of the mycelia

转速 Rotation speed r/min	菌丝体 生物量 Mycelium biomass g/L	菌丝球密度 Density of mycelium pellets 个/mL	菌丝球性状 Shape of mycelium pellets
120	6.1	182	米黄色,大小均一,较稠密
140	6.6	204	米黄色,大小均一,稠密
160	7.1	223	米黄色,大小均一,稠密
180	6.8	211	米黄色,大小均一,稠密
200	6.9	214	米黄色,大小均一,稠密

表 5 不同培养时间对菌丝生长的影响

Table 5 Effects of culture time on the growth of the mycelia

培养时间 Culture time d	菌丝体 生物量 Mycelium biomass g/L	菌丝球密度 Density of mycelium pellets 个/mL	菌丝球性状 Shape of mycelium pellets
3	5.2	157	米黄色,大小均一,较稠密
5	6.9	215	米黄色,大小均一,稠密
7	7.2	237	米黄色,大小均一,稠密
9	7.3	240	米黄色,大小均一,稠密
11	7.3	241	米黄色,大小均一,稠密

3 结论与讨论

元蘑质地柔嫩、味道鲜美,不仅具有很高的营养价值,而且具有一定的药用功效。液体培养生产液体菌种是一种适合规模化、工厂化生产食用菌的菌种制备技术,具有接种效率高、菌种萌发快、菌丝生长快等优点。然而,关于元蘑液体菌种培养的研究却鲜有报道。辛树权等^[5]研究发现以元蘑菌丝体生物量为指标时,最佳氮源为马铃薯,最佳碳源为葡萄糖,最佳无机盐为磷酸二氢钾,最佳 pH 为 6.0。笔者对元蘑液体菌种制备过程中培养基配方和培养条件进行了筛选,发现液体培养元蘑菌种的最佳培养基配方为试验组 I,最佳接种菌龄为 5 d,最佳接种量为 9%,最佳培养转速为 160 r/min,最佳培养时间为 7 d。该研究结果可为元蘑的大规模工厂化生产提供科学指导和技术支撑。

参考文献

[1] 曹德宾,刘英,王艳芹. 元蘑[J]. 农业知识,2007(5): 12-15.
[2] 曹瑞敏,王志才,陈海燕,等. 长白山野生亚侧耳中部化学成分及微量元素分析[J]. 中国中药杂志,1995(4): 233-234.
[3] 姚永志,左锦静,王垒. 元蘑游离必需氨基酸的测定[J]. 食品研究与开发,2009(9): 146-148.
[4] 李茹光,王策篇,杨成录,等. 东北食用药用及有毒蘑菇[M]. 长春: 东北师范大学出版社,1992: 62-66.
[5] 辛树权,赵骥,沈永. 不同培养条件对元蘑菌丝生长的影响[J]. 北方园艺,2013(10): 140-142.