

液体深层培养侧耳菌菌种

邹冠英 梁业光 刘汉仪 曾端容

(广州市微生物研究所)

栽培食用菌从来都是采用固体种。它的制备完全依靠手工操作,制种时间长,效率低,消耗不少粮食和大量玻璃种瓶,而且使用极不方便。为了克服上述缺点,我们用发酵罐培养侧耳菌的菌丝体作生产种,以便改革制种工艺,促进食用菌的发展。

材料和方法

(一) 菌种

平菇一号:糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 和平菇二号: *Pleurotus cystidiosus* 由本所菌种室提供。

(二) 培养基

试管斜面培养基用 PDA 培养基;摇瓶种子培养基与发酵培养基同[见结果(一)部分]。

(三) 培养设备条件

旋转摇床(200rpm);50L 发酵罐(不锈钢,罐身直径 32cm,高 84 cm,搅拌转速 470 rpm);500L 发酵罐(不锈钢,罐身直径 70cm,高 177 cm,搅拌转速 265rpm)。

(四) 测定方法

1. 糖的测定:斐林氏法(快速测糖法)。
2. 菌丝体重量:取发酵液一定量,过滤,用自来水洗二次,在 105℃ 烘干至恒重。
3. 菌球数目:取直径 9 cm 的平皿一个,在背面用玻璃笔划分几个象限,用吸管吸取发酵液 1ml,加水稀释后,计算菌球数目。

4. 菌丝体镜检:菌丝体涂片后用结晶紫染色,在高倍显微镜下观察。

(五) 放罐标准

1. 观感检查:发酵液无混浊,无酸败气味。

2. 镜检:无杂菌污染。

3. 菌体形态:用作液体种的菌丝体,要求菌龄适当,菌体粗壮,菌丝体比较完整,无断裂或很少断裂,没有明显的原生质凝聚现象和空胞出现。

4. 菌丝球数目:控制在 1000 粒/ml 以上。

5. 培养时间:约 45—60 小时为宜。

结果

(一) 发酵培养基的选择

经对各种碳源、氮源及 pH 进行比较试验,最后通过 $L_9(3^4)$ 正交表,筛选出以下最佳配方作种子培养基及发酵培养基(g):蔗糖 10,糖蜜 20,蛋白陈 3, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 维生素 B_1 100 μg ,水 1000 ml, pH6.5。

(二) 深层培养工艺流程

茄子瓶 $\frac{28^\circ\text{C}}{7\text{天}}$ 摇床振荡培养 $\frac{28^\circ\text{C}}{5-6\text{天}}$ 50L 种子罐 $\frac{28^\circ\text{C}}{2.5\text{天}}$ 500L 发酵罐 $\frac{28^\circ\text{C}}{2.5\text{天}}$ 放罐。

(三) 50L 发酵罐培养工艺

培养基用水溶解后调 pH 至 6.5,加 0.1% 甘油聚醚,放入罐中,在 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 压力下灭菌 30 分钟,冷却到 28℃,接种,维持罐温 28℃,罐压 $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$,通气搅拌培养,通气量前期 1:0.5—0.8,后期 1:1,45—60 小时放罐。

(四) 500L 发酵罐培养工艺

与 50L 罐类似。

(五) 液体种的质量指标

试验结果,菌龄一般在 45—60 小时较好,

广州市农科所、郊区农科所及广州市生物防治站等单位协助进行液体种出菇试验,谨致谢意。

表 1 50L 及 500L 罐培养的平菇液种质量指标

| 发酵罐(L) | 编 号 | 颜色及气味 | 镜 检 | 菌球数粒/ml | 残留(%) |
|--------|-----|-------------|------|---------|-------|
| 50 | 1 | 发酵液淡黄色有杏仁香味 | 菌丝粗壮 | 2129 | 0.67 |
| | 2 | 发酵液淡黄色有杏仁香味 | 菌丝粗壮 | >3215 | 0.69 |
| | 3 | 发酵液淡黄色有杏仁香味 | 菌丝粗壮 | >2206 | 0.58 |
| | 4 | 发酵液淡黄色有杏仁香味 | 菌丝粗壮 | 2182 | 1.11 |
| 500 | 1 | 发酵液淡黄色有杏仁香味 | 菌丝粗壮 | 1143 | 1.60 |

表 2 平菇一号液种出菇试验

| 编 号 | 第一潮菇 | | 第二潮菇 | | 鲜菇总得率 | | 出第一潮菇日数 |
|-----|-------|--------|-------|--------|-------|--------|---------|
| | 重量(斤) | 转化率(%) | 重量(斤) | 转化率(%) | 重量(斤) | 转化率(%) | |
| 1 | 7.5 | 62.5 | 4.9 | 41 | 12.4 | 103.3 | 35 |
| 2 | 9 | 75 | 4.26 | 36 | 13.26 | 110.5 | 36 |
| 3 | 7.2 | 60 | 5.4 | 45 | 12.6 | 105 | 35 |
| 4 | 6.54 | 54.5 | 5.6 | 47 | 12.14 | 101.2 | 36 |
| 合 计 | 30.24 | 63 | 20.16 | 42 | 50.4 | 105 | |

此时镜检可观察到菌丝长而分枝多,生长旺盛,粗壮,用结晶紫染色时着色深,菌丝细胞原生质尚未出现凝集现象,这种菌丝球用作栽培种,生长快,效果好(见表1)。

(六) 液体种出菇试验

菇房为普通平房,设有菇床架,房内无控温及排风设备。栽培料为废棉,栽培时不灭菌,只是用自来水浸湿废棉,控制适宜的含水量,铺在菇床上,厚度约10cm,用条播法接上液体种后,在栽培料上盖以塑料薄膜,2—3天后,栽培料上长出白色的平菇菌丝,这时可按常规管理。为了缩短试验周期,每批只采集两潮菇。经过几个点的多次试验,结果大致相同。

1. 平菇一号菌液(用50L发酵罐培养),接种量20%,栽培料48斤,分4块,每块12斤,平均转化率为105%,结果见表2。

2. 平菇二号(用500L发酵罐培养),接种量为4—33%,栽培料93斤,分13块,每块栽培料为7斤(其中一块为9斤),平均总转化率为100.86%(见表3)。

(七) 接种量及生物效率

从表3可见,接种量由最低的4%增加到最高的33%,第一、二潮菇总转化率平均达100%以上,接种量对平菇子实体的产量没有规律性的关系,但接种量对出菇时间有关(相关

系数 $r = -0.76$),即接种量越大,开始出菇时间越早。

接种量对子实体产量虽无大的影响,但从经济合理性考虑,接种量以15—20%左右为宜,过小则出菇时间长,易染杂菌,过大则用种量多,成本高。

(八) 经济效益

使用液体种栽培食用菌成本低,效果好,例如500L发酵罐每批可生产400kg液体种,培养基消耗原料很少,而它可接种栽培料2500kg(接种量按16%计),若每1kg栽培料平均得鲜菇1kg,则可得鲜菇2500kg,产值可达3000—3500元(每公斤1.2—1.4元计算)。

(九) 液体种与麦粒种比较

液体种不仅节约粮食,同时大大地缩短制种工时,以接种栽培料2500kg计:

1. 节约小麦约130kg。按每3kg栽培料用一瓶麦粒种(每瓶装小麦0.155kg)计,则2500kg栽培料需

$$\text{小麦} = \frac{0.155 \times 2500}{3} \approx 130\text{kg}$$

2. 缩短制种时间约40天,制备麦粒种约需57天;制备液体种约需17天:

(1) 麦粒种: 母种 $\frac{7\text{天}}$ 原种 $\frac{25\text{天}}$ 栽培

表 3 平菇二号液体种出菇试验

| 编 号 | 料 重 (斤) | 接 种 量 | | 第 一 潮 菇 | | 第 二 潮 菇 | | 鲜 菇 总 得 率 | | 出 第 一 潮 菇 日 数 |
|-----|------------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|-----------|--------|------------------|
| | | 体积(ml) | % (约数) | 重量(斤) | 转化率(%) | 重量(斤) | 转化率(%) | 重量(斤) | 转化率(%) | |
| 1 | 7 | 125 | 4 | 4.5 | 64.29 | 2.6 | 37.14 | 7.1 | 101.43 | 48 |
| 2 | 7 | 250 | 7 | 4.3 | 61.43 | 1 | 14.29 | 5.3 | 75.71 | 42 |
| 3 | 7 | 250 | 7 | 4.8 | 68.57 | 4 | 57.14 | 8.8 | 125.71 | 41 |
| 4 | 7 | 500 | 15 | 4.05 | 57.86 | 1.1 | 15.71 | 5.15 | 73.57 | 36 |
| 5 | 7 | 500 | 15 | 4.45 | 63.57 | 4.15 | 59.29 | 8.6 | 122.86 | 35 |
| 6 | 7 | 500 | 15 | 5.3 | 75.71 | 2 | 28.57 | 7.3 | 104.29 | 36 |
| 7 | 7 | 500 | 15 | 4.9 | 70 | 3.75 | 53.57 | 8.65 | 123.57 | 34 |
| 8 | 7 | 500 | 15 | 4 | 57.14 | 3 | 42.86 | 7 | 100 | 36 |
| 9 | 7 | 500 | 15 | 3.5 | 50 | 2.5 | 35.71 | 6 | 85.71 | 37 |
| 10 | 7 | 500 | 15 | 4.1 | 58.57 | 2.7 | 38.57 | 6.8 | 97.14 | 36 |
| 11 | 7 | 1000 | 28 | 4.9 | 70 | 0.9 | 12.86 | 5.8 | 82.86 | 37 |
| 12 | 7 | 1000 | 28 | 4.1 | 58.57 | 2.2 | 31.43 | 6.3 | 90 | 36 |
| 13 | 9 | 1500 | 33 | 8.0 | 88.89 | 3 | 42.86 | 11 | 122.22 | 32 |
| 合计 | 93 | | | 60.9 | 65.48 | 32.9 | 35.38 | 93.8 | 100.86 | |

种 25 天 固体种。

(2) 液体种: 茄子瓶种 7 天 摇瓶培养
5 天 种子罐 2.5 天 发酵罐 2.5 天 液体种。

讨 论

1. 采用液体种具有较大的经济效益, 0.5 吨发酵罐每批可生产 0.4 吨液体种, 生产 2.5 吨以

上的鲜菇。大型食用菌场值得进一步研究和推广应用。

2. 液体种的主要缺点是贮放时间短, 时间长则菌体自溶, 这是今后必需解决的问题。我们曾将培养好的液体种放在 4℃ 左右的冰箱中, 7—14 天甚至一个多月后再作栽培种, 结果对出菇没有什么影响, 这是否是解决贮放问题的一种方法还需进一步探讨。