



研究报告

一株野生食用菌白芦菇的鉴定及发酵条件

戚梦¹ 刘城移¹ 赵强¹ 张琪辉² 胡开辉¹ 吴小平^{1,3} 林文雄¹ 傅俊生^{*1}

1 福建农林大学生命科学学院 福建 福州 350002

2 福建农林大学(古田)菌业研究院 福建古田县食用菌研发中心 福建 宁德 352200

3 福建农林大学菌物研究中心 福建 福州 350002

摘要:【背景】白芦菇是从沙县野外分离并驯化栽培的食用菌,因其子实体从原基形成到采摘时所经历的棒形期、钉头期均为白色且形似芦笋,因此当地也称之为“白芦菇”。【目的】对白芦菇进行鉴定,并研究其菌丝发酵培养特性。【方法】采用形态学观察与 rDNA-ITS 分析对白芦菇进行鉴定;以摇瓶发酵的菌丝体生物量干重为指标,经过单因素筛选及正交试验综合筛选得到白芦菇菌丝发酵的最适条件与配方。【结果】形态学观察与 ITS 鉴定分析表明白芦菇在分类上属于侧耳科(*Pleurotaceae*)侧耳属(*Pleurotus*),学名为 *Pleurotus giganteus*,其菌丝摇瓶发酵最适条件为温度 25 °C、pH 8.0 及避光培养,菌丝摇瓶发酵最适配方为:玉米粉 25.0 g/L,黄豆粉 3.0 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L, 硫酸素 50.0 mg/L。【结论】对白芦菇的种性鉴定与菌丝发酵条件研究可为后续的科学推广与开发应用奠定基础。

关键词: 白芦菇, 分类鉴定, 菌丝发酵

Identification and fermentation of a wild edible fungus “Bailugu”

QI Meng¹ LIU Cheng-Yi¹ ZHAO Qiang¹ ZHANG Qi-Hui² HU Kai-Hui¹
WU Xiao-Ping^{1,3} LIN Wen-Xiong¹ FU Jun-Sheng^{*1}

1 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

2 Institute of Fungi Industry, Fujian Agriculture and Forestry University, Ningde, Fujian 352200, China

3 Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract: [Background] Bailugu is an edible fungus isolated and domesticated from the wilderness of Sha county. As its fruit body is white and shaped like asparagus in the course from the formation of its primordium to the pick of fruit body, during which it experienced the rod-shaped period and the nail head period, it is called as “Bailugu” in local. [Objective] Identifying Bailugu and studying its characteristics in hyphal fermentation culture. [Methods] The morphological observation and rDNA-ITS analysis were used to identify Bailugu. Using the dry weight of mycelium biomass in shake flask fermentation as the main index,

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0400200); National Natural Science Foundation of China (81503187); Foundation for the Construction of Modern Seed Industry Engineering Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University.

*Corresponding author: E-mail: fujunsheng81@163.com

Received: 20-08-2018; Accepted: 09-01-2019; Published online: 28-02-2019

基金项目: 国家重点研发计划资助(2018YFD0400200); 国家自然科学基金(81503187); 福建农林大学现代种业工程研究院建设经费

*通信作者: E-mail: fujunsheng81@163.com

收稿日期: 2018-08-20; 接受日期: 2019-01-09; 网络首发日期: 2019-02-28

the optimum conditions and formula for the hyphae fermentation of Bailugu were obtained through the single factor screening and orthogonal comprehensive screening. [Results] Morphological observation and ITS analysis showed that Bailugu belongs to *Pleurotus*, *Pleurotaceae*, and its scientific name is *Panus giganteus*, its optimum conditions for mycelial shake flask fermentation were as follows: temperature of 25 °C, pH of 8.0 and protection from light, and the most suitable formula for fermentation of mycelial shake flask is corn flour of 25.0 g/L, soybean powder of 3.0 g/L, KH_2PO_4 of 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ of 1.0 g/L, thiamine of 50.0 mg/L. [Conclusion] This study conducted the research on the identification and mycelial fermentation culture of Bailugu, hoping to lay the foundation for the subsequent scientific promotion and development.

Keywords: Bailugu, Classification and identification, Mycelium fermentation

白芦菇是沙县金农菌业有限公司从沙县野外分离并驯化栽培的食用菌, 因其子实体从原基形成到采摘时所经历的棒形期、钉头期均为白色且形似芦笋, 因此当地也称之为“白芦菇”。新鲜的白芦菇肉质洁白鲜嫩, 口感清脆爽口。本实验室前期委托福建省产品质量检验研究院对白芦菇子实体营养成分进行检测, 结果显示白芦菇富含蛋白质、膳食纤维及多种氨基酸和微量元素, 但脂肪含量极低且不含重金属及残留农药, 表明白芦菇与现代人们追求的低脂肪、高蛋白、高营养的健康食品要求相符合, 值得推广种植^[1]。但由于白芦菇分类地位仍不清楚, 制约着白芦菇进一步的规模化生产与科学推广, 所以有必要对其种性进行鉴定。目前常用的分类鉴定方法是以外观形态鉴别与分子鉴定相结合为主^[2], 而分子鉴定方法则主要采用 ITS (Internal transcribed spacer) 序列分析技术, 该技术已在真菌分类和鉴定中得到广泛应用^[3]。

菌丝发酵培养技术可大量生产食用菌菌丝体、发酵液及其活性物质(如多糖、黄酮、蛋白等), 是人们提升食用菌精深加工产品和推广应用的一条重要途径^[4]。比如, 高玉荣等通过灵芝菌丝发酵培养, 从中提取到了具有抗肿瘤活性的多糖^[5]; 陈建华等通过桑黄菌丝发酵培养, 得到具有较好热稳定性的凝集素 SHL24^[6]; 秦楠等通过鸡腿菇发酵培养, 从中提取到一种具有抗菌及抗氧化活性的蛋白质^[7]。另外, 菌丝发酵技术还可用于生产液体菌种。与固体菌种相比, 液体菌种具有菌龄一致、生长速度快、生产周期短、接种方便、无季节性、适宜工厂化生产等优势, 是当前食用菌工厂化、规模化栽

培的主流趋势^[8]。

综上, 本研究立足于野外采集的白芦菇, 首先通过形态学与 ITS 鉴定相结合的方法, 对其分类地位进行鉴定; 其次以白芦菇菌丝的生物量为指标, 以不同碳源、氮源、无机盐等营养因子为变量, 筛选出白芦菇菌丝发酵生长的最适配方, 为白芦菇的后续生物活性物质研究以及工厂化栽培奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

沙县金农菌业有限公司提供白芦菇平板菌种(图 1A)及子实体(图 1E-F)。

1.2 主要试剂和仪器

真菌 DNA 提取试剂盒、2×Power Taq PCR Master Mix 试剂盒, Omega 公司; 蔗糖、葡萄糖、酒石酸铵、硫酸铵、硝酸铵等试剂均为国产分析纯。PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司。

1.3 培养基

PDA 普通培养基、PDA 加富培养基、PDB 培养基、无碳源培养基、无氮源培养基、基础培养基、常量元素培养基参考文献[9]配制。

1.4 形态学鉴定

参照《中国真菌志》^[10]《中国食用菌百科》^[11]《中国大型真菌原色图鉴》^[12]对白芦菇进行形态学鉴定。首先将试管白芦菇菌株接入平板 PDA 培养基 25 °C 培养活化, 待长满后用直径 0.6 cm 的打孔器制备接种块, 接种至 PDA 平板中央培养 1 周, 每天观察菌落形态和颜色等性状。采用插片法观察白芦菇的菌丝形态, 具体方法为: 在距离菌饼 2 cm

处,将灭菌盖玻片倾斜 45°插入培养基中,25 °C 培养 7 d 后用镊子取出盖玻片,置于载玻片上,显微镜下观察菌丝形态特征,收集子实体中的孢子,置显微镜下观察。

1.5 菌株的分子鉴定

利用真菌 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,按照 Bioteke 2×Power *Taq* PCR Master Mix 试剂盒说明扩增 ITS 区序列,引物采用真菌核糖体基因间隔区通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系:10×*Taq* buffer 2.5 μL,dNTPs (10 mmol/L) 2 μL,DNA 模板约 50 ng,ITS1 和 ITS4 (10 μmol/L)各 1 μL,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL,ddH₂O 补足到 25 μL。PCR 反应条件:95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 1 min, 28 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增样品经 1%琼脂糖胶检测后送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

通过 BLASTn 功能,将测序后的白芦菇 ITS 序列在 GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源比对;选取相似性较高的序列,采用 MEGA 6.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育进化树,用 *Lentinellus cochleatus* 做外群,进行 1 000 次自检抽值,以检验分子进化树的可靠性,判断白芦菇种性的分类学地位。

1.6 菌种的活化

将保存在斜面上的白芦菇母种接到 PDA 加富培养基斜面上,25 °C 恒温培养 7 d,待白芦菇菌丝体长满斜面后备用。

1.7 平板培养

将之前活化的白芦菇菌丝体接种于 PDA 加富培养基的中央,25 °C 恒温培养 7 d。

1.8 发酵培养条件筛选

1.8.1 温度

用直径为 5 mm 打孔器从白芦菇平板上打 10 个大小相同的菌丝体块,接入 100 mL 的 PDA 加富培养基中,设温度梯度为 20、25 和 30 °C,160 r/min

培养 10 d 后测定菌丝干重。实验设 3 个重复。

1.8.2 光照

用直径为 5 mm 打孔器从白芦菇平板上打 10 个大小相同的菌丝体块,接入 100 mL 的 PDA 加富液体培养基中,将接种好的培养基分别放置于 24 h 黑暗、12 h 光照+12 h 黑暗、24 h 光照中,25 °C、160 r/min 培养 10 d 后测定菌丝干重,实验设 3 个重复。

1.8.3 pH

用直径为 5 mm 打孔器从白芦菇平板上打 10 个大小相同的菌丝体块,分别接入 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的 100 mL PDA 加富液体培养基中,25 °C、160 r/min 培养 10 d 后测定菌丝干重。实验设 3 个重复。

1.9 发酵营养要素筛选

1.9.1 碳源

设置无碳源培养基为空白对照,分别添加 2% (质量体积比)的葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、玉米粉、面粉作为碳源变量处理组,调节培养基 pH 为 8.0。用直径为 5 mm 打孔器从白芦菇平板上打 10 个大小相同的菌丝体块接入 PDB 培养基中,每组 3 个重复,25 °C、160 r/min 避光培养 10 d 后测定菌丝干重。

1.9.2 氮源

设置无氮源培养基为空白对照,分别添加 2% 的黄豆粉、蛋白胨、酵母粉、酒石酸铵、硫酸铵、硝酸铵作为氮源变量处理组,调节培养基 pH 为 8.0。用直径为 5 mm 打孔器从白芦菇平板上打 10 个大小相同的菌丝体块接入 PDB 液体培养基中,每组 3 个重复,25 °C、160 r/min 避光培养 10 d 后测定菌丝干重。

1.9.3 碳氮比

以无氮源培养基中的葡萄糖为碳源,以酒石酸铵为氮源,调节氮源用量。设置碳源/氮源质量比为 5:1、10:1、15:1、20:1、30:1、50:1、75:1、100:1 共 8 个梯度实验组,调节培养基 pH 为 8.0。用直径为 5 mm 打孔器从白芦菇平板上打 10 个大小相同的菌丝体块接入 PDB 液体培养基中,每组 3 个重复,25 °C、160 r/min 避光培养 10 d 后测定菌丝干重。

1.9.4 常量元素

在常量元素培养基中按下列要求添加所需试剂,分别配制出6种缺陷培养基和对照培养基^[9](表1),调节培养基pH为8.0。用直径为5 mm打孔器,从白芦菇平板上打10个大小相同的菌丝体块接入PDB液体培养基中,每组3个重复,25 °C、160 r/min避光培养10 d后测定菌丝干重。

1.9.5 维生素

设置基础培养基配方为摇瓶培养对照组,分别添加生物素、核黄素、硫胺素、尼克酸、叶酸、抗坏血酸50 mg/L为实验组,调节培养基pH为8.0。用直径为5 mm打孔器从白芦菇平板上打10个大小相同的菌丝体块接入PDB液体培养基中,每组3个重复,25 °C、160 r/min避光培养10 d后测定菌丝干重。

1.9.6 正交试验优化配比

根据单因素实验结果,以确定的碳源(A)、氮源(B)、常量元素(C)作为营养因子,采用3因素3水平正交表 $L_9(3^3)$ (表2)设计培养基配方组合,用直径为5 mm打孔器从白芦菇平板上打10个大小相同的菌丝体块接入液体培养基中,每组3个重复,25 °C、160 r/min避光培养10 d后测定菌丝干重。

1.9.7 最适配方的校验

综合上述单因素筛选及正交实验,把优化后得到的最适发酵培养配方与目前食用菌生产上常用的PDA培养基、PDA加富培养基进行对比,以期明确是否优化后的培养基能够提高白芦菇菌丝的生物量。用直径为5 mm打孔器从白芦菇平板上打10个大小相同的菌丝体块接入PDB液体培养基中,每组3个重复,25 °C、160 r/min避光培养10 d后测定菌丝干重。

1.10 统计分析

利用SPSS 20.0软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA)、*t*检验和LSD检验。

2 结果与分析

2.1 白芦菇种性鉴定

2.1.1 白芦菇形态鉴定

白芦菇菌丝在PDA培养基上呈白色丝状放射型生长,常有同心环纹出现(图1A),显微观察发现白芦菇担孢子呈矩椭圆形至阔卵球形(图1B);菌丝系统为二系菌丝系统,由生殖菌丝和骨架菌丝组成;生殖菌丝直径为6 μm–7 μm,膨胀,具有稍厚

表1 各种常量元素与添加量

Table 1 Seven major inorganic salt elements and the added amount (g/L)

常量元素 Major inorganic salt	对照 Control	缺K Without K	缺P Without P	缺Mg Without Mg	缺S Without S	缺Na Without Na	缺Ca Without Ca
KH ₂ PO ₄	1.00	/	/	/	1.00	1.00	1.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	0.50	/	/	/	0.50	0.50
NaCl	0.50	/	0.50	/	0.50	/	0.50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	/
NaH ₂ PO ₄	/	0.90	/	0.90	/	/	/
K ₂ SO ₄	/	/	0.50	0.50	/	/	/
MgCl ₂	/	/	0.25	/	0.25	/	/

注: g/L表示每升培养液中添加的无机盐的质量。/: 不添加。

Note: g/L indicates the mass of inorganic salt added per liter of culture solution. /: Not added.

表2 $L_9(3^3)$ 正交设计

Table 2 $L_9(3^3)$ orthogonal design

水平(Level)	(A)玉米粉 Corn flour (g/L)	(B)黄豆粉 Soybean powder (g/L)	(C) KH ₂ PO ₄ +MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)
1	20	2.5	0.5+0.0
2	25	3.0	1.0+0.5
3	30	3.5	1.5+1.0

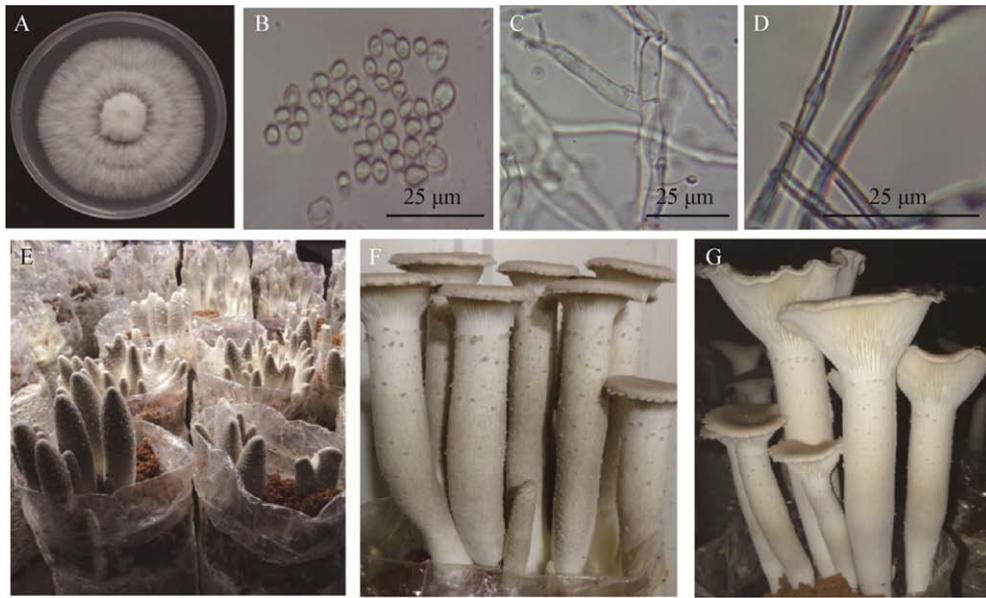


图1 白芦菇形态特征

Figure 1 The morphological characteristics of Bailugu

注: A: 菌落; B: 担孢子; C: 生殖菌丝; D: 骨架菌丝; E-G: 白芦菇不同阶段子实体. 标尺=25 μm .

Note: A: Colony; B: Basidiospores; C: Reproductive mycelium; D: Skeletal hyphae; E-G: Different stages of fruiting bodies of Bailugu. Bars=25 μm .

的壁, 较多分枝, 具有隔膜和锁状联合(图 1C); 骨架菌丝无分隔, 厚壁, 无色, 极少分枝或不分枝(图 1D)。

白芦菇子实体初期破土而出似芦笋般笔直生长(图 1E), 因此得名; 成熟期子实体顶部颜色由白变暗, 直到菌盖开伞内凹; 菌盖直径约 5 cm–10 cm, 表面光滑, 边缘不规则且开裂, 呈波纹鳞状; 菌盖表皮与菌肉结合紧密, 菌肉呈白色; 菌褶整齐, 刀片状, 宽窄不一, 与菌柄延生; 菌柄中生, 笔直, 棒状, 菌柄无附属物(图 1F); 子实体成熟后期菌盖向内翻卷, 呈漏斗状(图 1G)。根据上述白芦菇形态特征, 查阅《中国真菌志》(第四十五卷)^[10]、《中国食用菌百科》^[11]以及《中国大型真菌原色图鉴》^[12], 发现白芦菇与巨大侧耳(*Pleurotus giganteus*)特征相似。

2.1.2 白芦菇 ITS 鉴定

经 PCR 扩增和测序, 获得白芦菇菌株 ITS 序列片段 660 bp, GenBank 登录号为 KY800375。将白芦菇的 ITS 序列进行 BLAST 序列比对, 选取与供

试序列相似性最高的 15 个种, 用 MEGA 6.1 中的邻接法(Neighbor-Joining)进行聚类分析(图 2)。结果表明, 白芦菇与与 *Panus giganteus*、*Pleurotus giganteus*、*Lentinus giganteus* 等 13 个种的序列相似性高达 99%, 并聚为一类; 进一步检索文献资料表明, *Panus giganteus*、*Pleurotus giganteus*、*Lentinus giganteus* 是不同时期 *Pleurotus giganteus* 的学名, 即同种异名^[13]。结合形态学鉴定与分子鉴定, 可表明野外采集并驯化的白芦菇为侧耳科(*Pleurotaceae*)侧耳属(*Pleurotus*) *Pleurotus giganteus* (Berk. Karun & Hyde)。

2.2 白芦菇发酵培养条件筛选

2.2.1 温度和光照对白芦菇菌丝发酵的影响

表 3 结果表明, 白芦菇菌丝在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时生长情况最好, 且在白芦菇菌丝生长阶段应避免光照, 因为光照会降低菌丝生物量。

2.2.2 pH 对白芦菇菌丝发酵的影响

研究发现白芦菇菌丝在 pH 为 5.0–10.0 条件下均能生长, 其中 pH 为 8.0 长势较佳, 生物量达到 7 733.3 \pm 484.2 mg/L (表 4)。

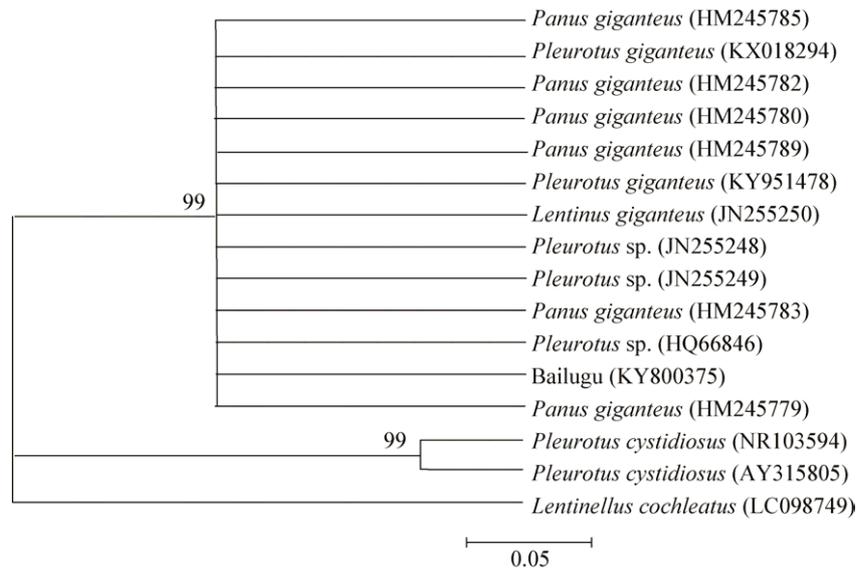


图 2 基于白芦菇 rDNA ITS 序列的 NJ 聚类分析

Figure 2 NJ clustering analysis based on rDNA ITS region sequences of Bailugu

注: 树分支上的值为 Bootstrap 值.

Note: Numbers at the nodes are the bootstrap value.

表 3 不同温度和光照对白芦菇菌丝发酵的影响

Table 3 Effects of different temperatures and illumination on dry weight of mycelia of Bailugu

温度 Temperature (°C)	菌丝干重 Mycelia dry weight (mg/L)	光照情况 Illumination	菌丝干重 Mycelia dry weight (mg/L)
20	6 206.7±12.0b	Dark	7 566.7±185.6a
25	7 106.7±157.2a	Light 12 h+	7 100.0±202.1a
		Dark 12 h	
30	6 473.3±337.1b	Light	6 116.7±726.0b

注: 单位 mg/L 表示每升培养液中的菌丝干重. 相同字母组间无显著差异; 不同字母组间有显著性差异($P<0.05$). 下同.

Note: Unit mg/L means the dry weight of hyphae per liter of culture. No significant difference between the same letter groups; Significant different between the different letter group ($P<0.05$). The same below.

表 4 不同 pH 对白芦菇菌丝发酵的影响

Table 4 Effects of different pH on dry weight of mycelia of Bailugu

pH	菌丝干重 Mycelia dry weight (mg/L)
5.0	6 400.0±152.8b
6.0	6 466.7±617.3ab
7.0	6 566.7±186.0ab
8.0	7 733.3±484.2a
9.0	6 966.7±536.4ab
10.0	6 333.3±348.0b

2.3 白芦菇菌丝发酵营养配方优化

2.3.1 营养因子单因素筛选

实验结果表明(表 5)白芦菇在不同的碳源培养基中菌丝生物量不同. 任意碳源处理组的菌丝干重均大于对照组, 白芦菇菌丝生长较适的碳源为面粉及玉米粉. 但由于面粉粘度大, 培养基易与菌球混合, 不利于实际应用栽培, 因此将葡萄糖和玉米粉作为生产栽培过程中适宜碳源; 在氮源实验中, 无氮对照组的菌丝干重最低, 有机氮源黄豆粉对白芦菇菌丝生长影响最大, 菌丝干重达到 $10\ 798\pm776.6$ mg/L, 是无氮对照组的 26 倍. 不同的碳氮比也能影响白芦菇菌丝生长, 碳氮比在(20–30):1 时菌丝生物量最高.

常量元素钾、磷、钙、硫等离子缺乏显著地抑制白芦菇菌丝的生长, 其中以钾离子缺乏对白芦菇菌丝生长的影响最大, 钠离子和镁离子缺乏对菌丝生长影响相对较小. 硫酸素对白芦菇菌丝生长具有促进作用.

2.3.2 碳源、氮源及常量元素正交试验

由于单因素实验结果单一, 所以采用正交实验进一步对白芦菇菌丝生长因子进行优化. 根据单因素实验结果, 选取碳源、氮源、常量元素进行 3 因素 3 水平的正交试验(表 6), 进一步进行方差

表 5 不同营养因子对白芦菇菌丝发酵的影响

Table 5 Effect of different nutritional factors on mycelium fermentation of Bailugu (mg/L)

碳源 Carbon source	菌丝干重 Mycelia dry weight (mg/L)	氮源 Nitrogen source	菌丝干重 Mycelia dry weight (mg/L)	C/N	菌丝干重 Mycelia dry weight (mg/L)	常量元素 Constant element	菌丝干重 Mycelia dry weight (mg/L)	维生素 Vitamin	菌丝干重 Mycelia dry weight (mg/L)
无碳对照 CK	136.3±9.7h	无氮对照 CK	413.3±26.2c	5:1	3 313.2±90.7bc	对照组 CK	2 638.5±83.4a	空白对照 CK	2 311.3±144.2bc
葡萄糖 Glucose	1 503.7±91.0d	酵母粉 Yeast	4 472.7±331.1b	10:1	3 348.1±23.0a	缺 K Without K	1 827.1±70.4c	核黄素 VB ₂	1 976.5±173.4bc
果糖 Fructose	1 179.0±131.0e	黄豆粉 Soybean meal	10 798.±776.6a	15:1	3 564.0±14.3abc	缺 P Without P	1 944.8±68.8c	生物素 VH	1 996.6±225.6bc
麦芽糖 Maltose	781.7±59.8f	蛋白胨 Peptone	5 051.7±458.9b	20:1	3 846.9±46.2abc	缺 Mg Without Mg	2 343.2±41.9b	抗坏血酸 VC	2 514.3±160.3b
蔗糖 Sucrose	1 067.7±41.9e	酒石酸铵 C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	1 503.7±91.0c	30:1	3 834.4±44.0ab	缺 S Without S	2 045.7±42.9c	叶酸 VB ₉	2 362.6±90.8bc
淀粉 Starch	1 919.3±119.1c	硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	1 456.7±172.7c	50:1	3 134.0±406.2cd	缺 Na Without Na	2 372.4±131.8b	硫胺素 VB ₁	3 303.6±324.7a
玉米粉 Maizeflour	2 202.7±60.5b	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	812.7±39.2c	75:1	2 784.7±251.1d	缺 Ca Without Ca	1 930.4±92.2c	尼克酸 VB ₃	1 992.7±159.4c
面粉 Flour	2 991.3±93.9a			100:1	1 562.2±63.7e				
NaHCO ₃	477.7±30.1g								

表 6 L₉(3³)正交设计实验结果

Table 6 L₉(3³) experimental results of orthogonal design

编号 No.	A	B	C	菌丝干重 Mycelia dry weight (mg/L)
1	1	1	1	3 658.3±92.80c
2	1	2	2	3 574.2±267.28c
3	1	3	3	4 400.0±88.19ab
4	2	1	2	3 737.5±295.89c
5	2	2	3	4 616.7±9.61a
6	2	3	1	3 950.0±28.87bc
7	3	1	3	4 016.7±178.51bc
8	3	2	1	3 920.1±27.65c
9	3	3	2	3 683.3±67.35c
K ₁	11 632.5	11 412.5	11 528.4	
K ₂	12 304.2	12 110.9	10 995.0	
K ₃	11 620.1	12 033.3	13 033.3	
k ₁	3 877.5	3 804.2	3 842.8	
k ₂	4 101.4	4 037.0	3 665.0	
k ₃	3 873.4	4 011.1	4 344.4	
R	228.0	232.8	679.4	

分析(表 7)可以发现, 3 种影响因素中, A(碳源)、B(氮源)对白芦菇菌丝生物量影响不显著, 但 C 因素(常量元素)对菌丝生物量影响极显著, 根据正交试验结果最终确定最优组合为 A₂B₂C₃。因此, 通过正交实验发现白芦菇在玉米粉 25.0 g/L、黄豆粉 3.0 g/L、KH₂PO₄ 1.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L 的培养基中菌丝生物量最大, 可达到 4 616.7±9.61 mg/L。

表 7 正交试验结果的方差分析

Table 7 Variance analysis of orthogonal test results

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
碳源 Carbon source	3 098.29	2	1 549.14	2.164	0.14
氮源 Nitrogen source	2 960.29	2	1 480.14	2.068	0.15
常量元素 Constant element	22 365.41	2	11 182.70	15.624	<0.001
Error	14 315.18	20	715.76		
Total	4 249 886	27			

2.3.3 最适发酵培养配方的校验

把正交试验优化后得到的最适白芦菇发酵培养配方(玉米粉 25.0 g/L、黄豆粉 3.0 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L)与目前食用菌生产常用的 PDA 培养基、PDA 加富培养基进行对比,结果(表 8)表明在最适培养基中,白芦菇菌丝干重为 $11\,990 \pm 610.30$ mg/L,是 PDA 的 2.3 倍,是加富 PDA 的 1.9 倍,与基础 PDA 组、加富 PDA 组形成显著性差异。这表明正交实验筛选得到的最适培养基(玉米粉 25.0 g/L, 黄豆粉 3.0 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L)对白芦菇菌丝发酵生长具有显著的促进作用。

3 讨论与结论

对食用菌进行分类和鉴定的传统方法主要是通过观察菌丝、孢子和子实体的形态学特征,并结合生理生化性状的描述进行分类。传统分类法的优势主要表现为:形态特征不仅易于观察和比较,而且具有相对的稳定性。但只单独利用形态鉴定存在一定的局限性,因为子实体形态、颜色会由于环境条件的变化而变化。随着分子生物学的发展,研究者们发现可以利用 ITS 序列进行鉴定。基于 ITS 序列对真菌进行鉴定这项技术具有准确性高、特异性高和对样品需求量少的特点,而且该方法易操作、成本低、实用性强^[14]。然而,仅根据 ITS 序列分析来鉴定未知真菌,由于相似序列的数量繁多,不同种间相似序列的差异很小,有些可达 99% 的相似

度,给鉴定工作增加了难度,因此鉴定真菌最好的方法就是将形态鉴别与分子鉴别两种方法有机结合,这样可以更好地确定其种属^[15]。通过参考《中国真菌志》(第四十五卷)^[10]、《中国食用菌百科》^[11]以及《中国大型真菌原色图鉴》^[12],发现白芦菇与大革耳在形态学上较接近。ITS 分析得到白芦菇与巨大侧耳序列相似性高达 99%。因此,通过形态学结合 ITS 鉴定确定白芦菇为巨大侧耳(*Panus giganteus*)。巨大侧耳又名猪肚菇,其学名问题一直备受争议,国内最早被鉴定为杯伞属(*Clitocybe*)^[16],然而后续研究发现猪肚菇是典型的木腐生菌,并具有明显的骨骼菌丝,显然不是杯伞属(*Clitocybe*)种类^[10]。因此,就猪肚菇的学名一直争议不断,有人认为其属于革耳属,学名应为 *Panus giganteus*^[17];也有人认为猪肚菇属于侧耳属,学名应为 *Pleurotus giganteus*。直到 2010 年之后才逐渐明确为侧耳科侧耳属,学名为 *Pleurotus giganteus*^[12]。

白芦菇虽已实现了子实体的人工栽培,但还是存在周期长、制种工艺不成熟、生物学活性不明等问题。菌丝发酵技术不仅能解决制种难题,缩短栽培周期,还可得到大量白芦菇菌丝体及发酵液,为后续食用菌活性成分研究奠定基础^[18]。有研究表明,发酵所得菌丝体与食用菌子实体在营养成分与生理功能上相似,因此通过对食用菌液体发酵技术的探究,不仅可以通过工业化生产,使食用菌菌丝块在市场上销售成为现实,同时其发酵液可以提取多种活性物质,生产深受人们欢迎的保健食品^[19],有助于后续对白芦菇相关产品的开发。综上所述,开展白芦菇菌丝发酵工艺的研究具有十分重要的意义。食用菌液体发酵技术研究的关键是培养基的选择,不同食用菌要用不同的培养基进行培养,另外还必须考虑食用菌液体发酵培养的温度、pH 值等环境条件^[20]。因此本文通过摇瓶培养对白芦菇菌丝发酵生长条件和营养要素进行筛选,结果表明白芦菇菌丝发酵培养过程中最适碳源为玉米粉或葡萄糖,最适氮源为黄豆粉,最适碳氮比为(20-30):1,

表 8 综合培养基对白芦菇菌丝发酵的影响

Table 8 Effects of comprehensive culture medium on dry weight of mycelium of *Bailugu* (mg/L)

培养基 Medium	PDA	加富 PDA Enrichment medium	综合 Comprehensive
I	4 900	5 950	11 280
II	4 940	6 660	11 920
III	5 940	6 360	12 770
Mycelia dry weight (mg/L)	5 260±481.10b	6 323.33±291.01b	11 990±610.30a

同时给培养基中添加适量硫酸素及钾离子可提高菌丝生物量; 菌丝发酵应在偏弱碱性、温度为 25 °C 及黑暗的环境下生物量较高。正交试验结果发现白芦菇菌丝发酵生长最适培养基为: 玉米粉 25.0 g/L, 黄豆粉 3.0 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, 硫酸素 50 mg/L。本研究通过对白芦菇进行分类鉴定, 对其菌丝发酵条件、营养要素进行研究, 为白芦菇的进一步开发及推广提供科学依据。

REFERENCES

- [1] Zhao Q. Study on the identification, nutrition evaluation and cultivation techniques of Bailu mushroom[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2017 (in Chinese)
赵强. 白芦菇种属鉴定、营养评价与栽培技术研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2017
- [2] Yin YG, Liu Y, Xu F, et al. Isolation and identification for a wild fungus of genus *Agaricus*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27(3): 126-129 (in Chinese)
尹永刚, 刘宇, 许峰, 等. 一株 *Agaricus* 属野生菌的分离与鉴定[J]. *华北农学报*, 2012, 27(3): 126-129
- [3] Wang FJ, Zhou XY, Gan L. Identification of a wild mushroom based on its morphology and ITS sequence[J]. *Northern Horticulture*, 2017(21): 159-162 (in Chinese)
王锋尖, 周向宇, 甘露. 一株野生食用菌的形态及分子鉴定[J]. *北方园艺*, 2017(21): 159-162
- [4] Li Y, Zeng DF. Current trends in research of edible mushroom fermentation by submerged fermentation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(7): 199-201,205 (in Chinese)
李云, 曾东方. 食用菌液体深层发酵的研究热点[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(7): 199-201,205
- [5] Gao YR, Lu YM. Study on submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* hypha[J]. *China Brewing*, 2006(1): 18-20 (in Chinese)
高玉荣, 卢艳明. 灵芝菌丝液体深层发酵培养基的研究[J]. *中国酿造*, 2006(1): 18-20
- [6] Chen JH, Sun J, Lyu FJ, et al. Isolation and bioactive characters of a novel lectin SHL24 from the liquid fermentation of *Phellinus baumii*[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(2): 420-427 (in Chinese)
陈建华, 孙捷, 吕福娇, 等. 桑黄发酵液中凝集素 SHL24 的分离与生物活性研究[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(2): 420-427
- [7] Qin N, Liu Y, Wang LY. Response surface analysis for optimizing antimicrobial protein from mushroom *Coprinus comatus* fermentation liquid and its antioxidant activity[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(4): 83-90 (in Chinese)
秦楠, 刘羽, 王力宇. 响应曲面法优化鸡腿菇菌丝发酵液抗菌蛋白及其抗氧化活性[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(4): 83-90
- [8] Yang YJ. Screening of nutritional elements of *Flammulina velutipes* "Jiangshan No.1" and study on the culture of liquid spawn[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2017 (in Chinese)
杨云静. 金针菇“江山一号”营养要素筛选及其液体菌种培养研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2017
- [9] Zhang XJ. Studies on submerged culture fermentation technology and polysaccharide properties of *Antrodia camphorata*[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2007 (in Chinese)
张迅捷. 樟芝深层液体发酵工艺及其多糖特性的研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2007
- [10] Li Y, BAU Tolgor. *Flora Fungorum Sinicorum: Vol. 45 Pleurotoid-Lentinoid Fungi*[M]. Beijing: Science Press, 2014: 1-206 (in Chinese)
李玉, 图力古尔. 中国真菌志: 第四十五卷 侧耳——香菇型真菌[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 1-206
- [11] Huang NL. *Chinese Edible Fungus Encyclopedia*[M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1997: 1-448 (in Chinese)
黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 农业出版社, 1997: 1-448
- [12] Huang NL. *Colored Illustrations of Macrofungi (Mushrooms) of China*[M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1998: 1-193 (in Chinese)
黄年来. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 北京: 农业出版社, 1998: 1-193
- [13] Deng WQ, Li TH, Chen ZN, et al. A critical note on the scientific name of the cultivated edible fungus, *Zhudugu*[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2006, 13(3): 71-79 (in Chinese)
邓旺秋, 李泰辉, 陈枝南, 等. 栽培食用菌猪肚菇的学名考证[J]. *食用菌学报*, 2006, 13(3): 71-79
- [14] Su CL, Tang CH, Zhang JS. Molecular detection of *Ganoderma sinense* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2014, 9(2): 121-123 (in Chinese)
苏春丽, 唐传红, 张劲松. 基于 ITS 序列的紫芝分子鉴定[J]. *成都医学院学报*, 2014, 9(2): 121-123
- [15] Zhu HQ, Wang PP, Zhang M, et al. Application of rDNA-ITS sequence analysis and traditional classification method in the identification of fungi[J]. *Journal of China West Normal University (Natural Sciences)*, 2016, 37(3): 264-269 (in Chinese)
朱洪庆, 王盼盼, 张萌, 等. rDNA-ITS 序列分析法与传统分类法相结合在真菌鉴定中的应用[J]. *西华师范大学学报: 自然科学版*, 2016, 37(3): 264-269
- [16] Dong HX, Cai DH, Li Y. Research situation and prospect of *Panus giganteus*[J]. *Edible Fungi of China*, 2010, 29(3): 3-6 (in Chinese)
董洪新, 蔡德华, 李玉. 猪肚菇的研究现状及展望[J]. *中国食用菌*, 2010, 29(3): 3-6
- [17] Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, et al. A revised checklist of edible

- fungi in China[J]. *Mycosystema*, 2010, 29(1): 1-21 (in Chinese)
戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 等. 中国食用菌名录[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 1-21
- [18] Wang WY, Zhu JH. Advances and prospects of submerged fermentation technology of edible fungi[J]. *Edible Fungi of China*, 1998, 17(2): 11-12 (in Chinese)
汪维云, 朱金华. 食用菌液体深层发酵技术研究进展及展望[J]. 中国食用菌, 1998, 17(2): 11-12
- [19] Yang Y, Zhang JS, Zhou CY. Application of submerged fermentation technology to research and development of *Ganoderma lucidum*[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2005, 21(4): 115-119 (in Chinese)
杨焱, 张劲松, 周昌艳. 深层发酵技术在灵芝研究开发中的应用[J]. 上海农业学报, 2005, 21(4): 115-119
- [20] Du DQ, Wang LX, Chen ZS. Application of fermentation technique in edible mushroom cultivation[J]. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 2003, 23(3): 83-85 (in Chinese)
杜德清, 王丽霞, 陈志生. 液体深层发酵技术在食用菌方面的应用[J]. 浙江林业科技, 2003, 23(3): 83-85

~~~~~  
(上接 p.1610)

### 征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

### 4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>