

草菇液体菌种培养条件的对比试验

覃宝山^{1,2,3}, 赵媛娟⁴, 蒙明月^{1,2}, 覃勇荣^{1,2,3*}

¹河池学院化学与生物工程学院, 广西 河池

²河池学院广西蚕桑生态学与智能化技术应用重点实验室, 广西 河池

³河池学院广西现代蚕桑丝绸协同创新中心, 广西 河池

⁴广西合山市农村农业局, 广西 来宾

收稿日期: 2024年7月30日; 录用日期: 2024年8月27日; 发布日期: 2024年9月4日

摘要

为了筛选合适的草菇液体菌种培养条件, 本实验设计三个配方进行草菇液体菌种摇床培养对比试验, 筛选出适宜的培养基配方, 即马铃薯50 g, 葡萄糖20 g, 蛋白胨1.5 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, 维生素 B_1 10 mg, 水1000 mL, pH自然。在此基础上设计摇床转速、维生素 B_1 添加浓度、培养基装瓶量、摇前静置时间等四个因子, 进行草菇液体菌种摇床培养的比较试验。结果表明, 草菇液体菌种培养最适合的摇床转速是130 r/min; 添加的维生素 B_1 的最佳浓度为15 mg/L; 规格为250 mL的锥形瓶, 培养基的最适装瓶量为80 mL; 培养基静置36 h再进行摇床培养效果最好。

关键词

草菇, 液体菌种, 摇床培养, 菌丝生长

Comparative Experiment on the Cultivation Conditions of *Volvariella volvacea* Liquid Strains

Baoshan Qin^{1,2,3}, Yuanjuan Zhao⁴, Mingyue Meng^{1,2}, Yongrong Qin^{1,2,3*}

¹School of Chemistry and Bio-Engineering, Hechi University, Hechi Guangxi

²Guangxi Key Laboratory of Sericulture Ecology and Applied Intelligent Technology, Hechi University, Hechi Guangxi

³Guangxi Collaborative Innovation Center of Modern Sericulture and Silk, Hechi University, Hechi Guangxi

⁴Guangxi Agriculture and Rural Bureau of Heshan City, Laibin Guangxi

Received: Jul. 30th, 2024; accepted: Aug. 27th, 2024; published: Sep. 4th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 覃宝山, 赵媛娟, 蒙明月, 覃勇荣. 草菇液体菌种培养条件的对比试验[J]. 农业科学, 2024, 14(9): 963-970.
DOI: 10.12677/hjas.2024.149120

Abstract

In order to screen suitable culture conditions of liquid strains for *Volvariella volvacea*, this experiment designed three formulas for comparative shaking table cultivation of *V. volvacea* liquid strains. The suitable medium formula was selected, namely 50 g of potato, 20 g of glucose, 1.5 g of peptone, 1 g of KH_2PO_4 , 0.5 g of MgSO_4 , 10 mg of Vitamin B_1 , 1000 mL of water, and natural pH. On this basis, four factors were designed, including shaking table speed, vitamin B_1 addition concentration, bottling volume of culture medium, and settling time before shaking, to conduct comparative experiments on *V. volvacea* liquid strain shaking table cultivation. The results showed that the most suitable shaking table speed for the cultivation of *V. volvacea* liquid strains was 130 r/min; the optimal concentration of added vitamin B_1 was 15 mg/L; the optimal filling volume for a 250 mL conical flask and culture medium was 80 mL; the best effect was to let the culture medium stand for 36 hours before shaking it on a shaker.

Keywords

Volvariella volvacea, Liquid Strains, Shake Cultivation, Mycelial Growth

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

草菇(*Volvariella volvacea* (Bull.) Singer)是热带、亚热带常见的食用菌,也是我国南方广泛种植的食用菌,草菇属于伞菌目,光柄菌科,草菇属[1]。草菇肉质细腻脆嫩,味道鲜美,含有丰富的蛋白质,常被作为重要的蛋白质食物来源之一[2] [3]。此外,草菇中还含有丰富的海藻糖、纤维素和维生素 C 等物质,其中维生素 C 可以预防坏血病等[4],因此草菇深受消费者的青睐。近年来,市场需求逐年增多,草菇生产规模也随之增大,并形成工厂化生产,由此对草菇菌种生产提出了更高的要求[5]-[8]。相对食用菌固体菌种而言,液体菌种可以满足草菇工厂化生产的需要,因此越来越多的企业、专家与学者积极进行草菇液体菌种生产工艺改进和研究,期望生产出高质量的菌种,以适应草菇工厂化生产的需要[9]-[13]。本实验采用单因素试验的方法,对草菇液体菌种进行摇床培养,通过对草菇培养基配方、摇床转速、液体培养基装液量、摇前静置时间、维生素 B_1 浓度等五个培养条件的试验,探讨适合草菇液体菌种生长的最佳培养条件,为改进草菇液体菌种生产工艺提供借鉴和支持。

2. 材料与方

2.1. 实验材料

2.1.1. 供试菌株

从当地市场上购买新鲜的草菇,经子实体组织分离后获得。

2.1.2. 药品及试剂

蔗糖、葡萄糖、酵母膏、蛋白胨、琼脂、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、维生素 B_1 等。

2.1.3. 仪器设备

手提式压力蒸汽灭菌器(YXQ-LS-18SI 型)、超净工作台(SW-CJ-1F 型)、天呈恒温培养振荡器(TS-211C

型)、生化培养箱(SPX-150 型)、电热鼓风干燥箱(GZX-9030MBE 型)、电子天平(HC-C 型)等。

2.1.4. 斜面培养基

去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 水 1000 mL, pH 自然。

2.2. 试验方法

2.2.1. 一级菌种的制备

1) 培养基的制备: 从市场上挑选新鲜无芽马铃薯, 洗净去皮称取 200 g, 用去离子水煮至熟而不烂, 把漏斗放在三脚架上用六层纱布过滤取滤液, 把滤液重置锅中加入去离子水煮沸, 加入称好的琼脂和葡萄糖, pH 自然, 待葡萄糖和琼脂完全溶解后加水定容至 1000 mL, 用漏斗分装试管, 塞上棉塞, 用牛皮纸和麻绳包扎成捆, 121℃条件下高压灭菌 30 min, 摆斜面制得 PDA 斜面固体培养基。

2) 母种制备: 采用菌柄组织块分离法制备母种。先把草菇菌柄用无菌水清洗一遍, 放进超净工作台, 用 75%的酒精消毒, 用无菌滤纸吸干草菇表面水分, 从菌柄处开始把草菇撕成两半, 用灭菌过的解剖刀在菇盖与菌柄交界的地方划成井字, 切取 0.5 × 0.5 cm 的组织块, 然后接到 PDA 培养基上, 放置 25℃的恒温箱中培养 7 d, 再通过转管获得一级母种。

2.2.2. 草菇液体菌种培养基配方的筛选

草菇液体菌种生长所需要的营养物质有碳素营养、氮素营养、维生素及矿物质等。其中, 比较常见的碳素营养物质有马铃薯、蔗糖、葡萄糖等; 常用的氮素营养物质是酵母膏、蛋白胨等; KH_2PO_4 、 MgSO_4 和维生素 B_1 则是常用的矿物质和维生素; 洋葱是一种新型的综合营养物质。

为获得良好的草菇液体菌种培养基配方, 利用上述营养物质设计三个配方进行对比试验, 培养基配方成分见表 1。

Table 1. Composition table of the tested formula (g/L)

表 1. 供试配方成分表(g/L)

原料	配方一	配方二	配方三
洋葱	200	0	0
马铃薯	0	50	0
葡萄糖	20	20	20
蛋白胨	0	1.5	2
酵母膏	5	0	2
蔗糖	0	0	0
KH_2PO_4	1.5	1	1
K_2SO_4	0	0	1
MgSO_4	0.5	0.5	0.5
琼脂	15	0	0.25
维生素 B_1	0.01	0.01	0.01
H_2O (mL)	1000	1000	1000

方法: 按照配方分别制备以上的三种培养基各 1000 mL, pH 为自然, 然后把每种配方的培养液用漏斗和量筒分别装 100 mL 到 250 mL 的锥形瓶, 每种培养基各十瓶, 贴好标签, 用封口膜和牛皮纸封三角

锥形瓶瓶口, 在 121℃ 高压条件下灭菌 30 min, 静置 24 h 观察没有污染之后, 和试管母种放至无菌超净工作台, 打开紫外灯消毒 30 min, 把 2 粒 0.5×0.5 cm 的母种接入液体培养基, 在 33℃ 的培养箱中静置培养 24 h 后, 转移至摇床, 设定摇床转速 120 r/min、温度 33℃ 的条件下培养 6 d, 每天观察和记录实验各个时间段菌丝球的大小、均匀度、密度、布满培养基等情况, 培养结束后测定菌丝体干重, 试验设置三个重复, 选出最适合的培养基配方。

2.2.3. 草菇液体菌种摇床培养条件的对比试验

通过以上草菇液体菌种培养基配方的比较试验, 筛选出草菇液体菌种培养基配方: 马铃薯 50 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1.5 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, 维生素 B_1 10 mg, 水 1000 mL, pH 自然。在此基础上设计摇床转速、维生素 B_1 添加浓度、培养基装瓶量、摇前静置时间等四个因子, 进行草菇液体菌种摇床培养的对比试验。

1) 液体菌种的不同摇床转速对比试验

按上述的配方配制培养液, 并装入规格为 250 mL 的锥形瓶中, 装瓶量为 100 mL, 用封口膜和牛皮纸包扎封瓶, 高温高压灭菌 30 min 后备用, 共制备 90 瓶溶液。在无菌条件下, 接入 0.5×0.5 cm 的试管母种, 每瓶 2 粒, 移至 33℃ 的恒温培养箱静置培养 24 h 后, 转移至摇床上振荡培养 6 d, 培养温度为 33℃, 做好观察记录。摇床转速设置为: 110、120、130、140、150、160、170、180、190、200 r/min 十个梯度, 每一个梯度设置试验量 9 瓶。

2) 液体培养基添加不同浓度的维生素 B_1 对比试验

液体培养基配方同上, 摇床转速为 130 r/min, 添加维生素 B_1 浓度设置为: 0、5、10、15、20 mg/L 五个梯度。每个梯度配置 1000 mL 的培养液, 分装规格为 250 mL 的锥形瓶, 装瓶量为 100 mL, 每个梯度配制 10 瓶, 用封口膜和牛皮纸包扎封瓶高温高压灭菌 30 min 后备用, 在超净工作台上进行无菌操作, 将两粒 0.5×0.5 cm 的母种接入锥形瓶的培养液中, 移至 33℃ 的恒温培养箱静置培养 24 h 后, 再进行摇床培养 6 d, 培养温度为 33℃, 做好观察记录。

3) 不同培养液装瓶量的对比试验

按上述配方配制培养液, 并装入规格为 250 mL 的锥形瓶中, 装瓶量设置为: 50、60、70、80、90、100 mL 六个梯度, 每个试验梯度为 10 个 250 mL 的锥形瓶, 绑好封口膜和牛皮纸, 在 121℃ 高压条件下灭菌 30 min, 冷却后, 在超净工作台上将两粒 0.5×0.5 cm 的母种接入锥形瓶的培养液中, 移至 33℃ 的恒温培养箱静置培养 24 h 后, 摇床振荡培养 6 d, 做好观察记录。

4) 液体菌种摇前静置时间对比试验

按上述配方配制培养液, 并装入规格为 250 mL 的锥形瓶中, 装瓶量为 100 mL, 用封口膜和牛皮纸包扎封瓶, 高温高压灭菌 30 min, 冷却后, 在超净工作台上将两粒 0.5×0.5 cm 的母种接入锥形瓶的培养液中, 移至 33℃ 的恒温培养箱静置培养, 静置培养时间分别设置为: 0、12、24、36、48 h 五个梯度, 每个梯度设置试验量为 9 个, 摇床转速为 130 r/min, 摇床培养 6 d, 做好观察记录。

2.2.4. 相关指标的说明和测量

本试验通过菌丝球的生物量、密度、均匀度和形状等方面来判断菌丝的生长状况是否良好, 菌丝球的生物量越大, 密度、均匀度越好, 说明菌丝的生长状况越好, 反之则差。

1) 菌丝球生物量的测量

培养结束后, 将培养液用 4 层纱布过滤, 蒸馏水冲洗 3 次, 收集菌丝球, 将菌丝球放入培养皿中, 置于 60℃ 烘干箱中烘干至恒重(烘干 2 h 后测量一次, 此后每隔 30 min 测量一次, 直至与上次测量的值相差不大于 2 mg 方为恒重), 用分析天平称量干重。菌丝体生物量(g/100 mL) = 菌丝体干重/培养液体积。

2) 菌丝球均匀度指标

培养结束后, 根据菌丝球直径及密度大小, 采用肉眼目测的方法确定菌丝的均匀度。用“+”号表示均匀度, “+”代表均匀度较差, “++”代表均匀度良好, “+++”代表均匀度最佳。

3) 菌丝球密度指标

菌丝球的密度用“*”表示, 其中“*”代表菌丝球密度较差, “**”代表菌丝球密度良好, “***”代表菌丝球密度最佳。

3. 结果与分析

3.1. 不同配方的培养基对液体菌种生长的影响

不同配方的液体培养基菌丝球的生长状况见表 2。

Table 2. Growth status of fungal mycelium balls in liquid culture media with different formulations

表 2. 不同配方的液体培养基菌丝球的生长状况

配方	生物量 g/100 mL	菌丝球密度	培养时间/d	菌丝球均匀度	菌丝球形状	感染率/%
一	0.20	**	6	+	球形、条状	11
二	0.30	***	6	+++	球形	0
三	0.12	*	6	+	球形	11

从表 2 可以看出, 不同液体培养基配方对菌丝球生长的影响是有差异的, 从菌丝球的生物量、密度、均匀度和形状来看, 配方二的比较好, 菌丝球含量最高, 菌丝球干重在重复多次称量中变化差距最小, 且均匀度最好。配方一有部分菌丝形成了条状, 而配方三表现较差, 所以最适的配方应该为配方二, 即马铃薯 50 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1.5 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, 维生素 B_1 10 mg, 水 1000 mL, pH 自然。

3.2. 草菇液体菌种摇床培养条件对比试验的结果与分析

3.2.1. 摇床转速对菌丝球生长的影响

不同摇床转速菌丝球的生长状况见表 3。

Table 3. Comparison of growth status of fungal mycelium balls at different shaking table speeds

表 3. 不同摇床转速菌丝球的生长状况比较

摇速 r/min	生物量 g/100 mL	菌丝球密度	培养时间/d	菌丝球均匀度	菌丝球形状	感染率/%
110	0.16	**	6	+++	条状、球形	0
120	0.20	***	6	+++	球形	11
130	0.28	***	6	+++	球形	0
140	0.25	**	6	+++	球形	11
150	0.18	**	6	+	不规则菌块	13
160	0.19	*	6	+	不规则菌块	0
170	0.22	*	6	+	不规则菌块	12
180	0.26	*	6	+	不规则菌块	11
190	0.24	*	6	+	不规则菌块	13
200	0.25	*	6	+	不规则菌块	11

从表 3 可以看出, 不同的摇床转速对菌丝球生长是有影响的, 从菌丝球的生物量、密度、均匀度和形状来看, 摇床转速为 130 r/min 的菌种生长最好, 菌丝球的生物量最大, 菌丝球密度最佳, 菌丝球均匀度最好, 因此, 草菇液体菌种培养最适合的摇床转速是 130 r/min。

3.2.2. 液体培养基添加不同浓度的维生素 B₁ 对菌丝球生长的影响

液体培养基中添加不同浓度的维生素 B₁, 菌丝球的生长状况见表 4。

Table 4. Growth status of mycelium balls with different concentrations of vitamin B₁ added to liquid medium

表 4. 液体培养基中添加不同浓度的维生素 B₁ 菌丝球的生长状况

浓度 mg/L	生物量 g/100 L	菌丝球密度	培养时间/d	菌丝球均匀度	菌丝球形状	感染率/%
0	0.08	**	6	++	球形	11
5	0.11	**	6	+++	球形	0
10	0.15	***	6	+++	球形	13
15	0.17	***	6	+++	球形	0
20	0.10	**	6	++	球形	11

根据表 4, 从菌丝球的生物量来看, 维生素 B₁ 在 0 至 15 mg/L 时, 菌丝球生物量呈上升趋势, 其中, 当维生素 B₁ 浓度为 15 mg/L 时, 菌丝球生物量最大; 当维生素 B₁ 浓度为 20 mg/L 时, 菌丝球生物量有所下降。另外, 从菌丝球的密度、均匀度和直径来看, 当维生素 B₁ 浓度为 15 mg/L 时, 菌丝球直径小而均匀, 且密度大, 综上所述, 草菇液体菌种培养添加的维生素 B₁ 最佳浓度为 15 mg/L。

3.2.3. 不同的培养基装瓶量对菌丝球生长的影响

不同的培养基装瓶量对菌丝球生长的影响见表 5。

Table 5. Growth status of fungal mycelium balls with different bottling volumes on different culture media

表 5. 不同培养基装瓶量菌丝球的生长状况

装瓶量/mL	生物量 g/100 mL	菌丝球密度	培养时间/d	菌丝球均匀度	菌丝球形状	感染率/%
50	0.10	*	6	+	菌块	0
60	0.12	**	6	+++	球形	0
70	0.15	***	6	+++	球形	11
80	0.28	***	6	++	球形	0
90	0.23	**	6	+++	球形	33
100	0.21	**	6	+	球形	22

表 5 表明, 从观察到的菌丝球密度、均匀度和测量的生物量来看, 规格为 250 mL 锥形瓶, 培养基的装瓶量为 80 mL 的培养效果最好, 菌丝球生物量最大, 菌丝球较密、均匀。装瓶量为 50 mL 的, 菌丝球生长不均匀, 主要原因是摇瓶装液量较少, 溶液在摇床上振荡的时候没有得到充分摇匀。当装瓶量为 100 mL 时, 装液量的体积对于接入的菌丝粒偏大, 营养过多, 导致菌丝部分形成较大的菌丝球, 均匀度也一般。

3.2.4. 摇前静置时间对菌丝球生长的影响

不同的静置时间对菌丝球生长的影响见表 6。

Table 6. Growth status of fungal mycelium balls at different settling times**表 6.** 不同静置时间菌丝球的生长状况

静置时间/h	生物量 g/100 mL	菌丝球密度	培养时间/d	菌丝球均匀度	菌丝球形状	感染率/%
0	0.082	*	6	++	球形	11
12	0.115	**	6	+++	球形	11
24	0.133	**	6	++	球形	0
36	0.162	***	6	+++	球形	0
48	0.126	**	6	+	球形, 柱状	22

由表 6 可知, 静置时间在 0~36 h 时, 菌丝球的生物量呈增长趋势, 静置培养 36 h 时, 菌丝球的生物量最大, 菌丝球的密度、均匀度最好, 因此培养基静置 36 h 再进行摇床培养效果最好。静置培养 48 h 时, 菌丝生长不均匀, 菌丝的形状出现了柱状, 原因是静置时间过长, 接入的母种菌丝在温度适合条件下, 生长旺盛, 菌丝长得较长, 部分交叉盘绕在一起, 经过 120 r/min 的摇床培养后, 造成受力不均, 无法形成菌球而变成了柱状, 综合分析得出静置 36 h 最佳。

4. 小结

本试验第一阶段的研究内容是, 设计三个配方进行草菇液体菌种摇床培养对比试验, 设定摇床转速为 120 r/min、温度为 33℃ 的条件下培养 6 d。通过菌丝球的生物量、密度、均匀度和形状等指标进行对比, 判断菌丝的生长状况, 从而筛选出最适合的培养基配方。研究表明: 最适合的培养基配方是马铃薯 50 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1.5 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, 维生素 B_1 10 mg, 水 1000 mL, pH 自然。

试验第二阶段的研究内容是, 在第一阶段研究的基础上设计摇床转速、培养基装瓶量、维生素 B_1 添加浓度、摇前静置时间等四个因子, 进行草菇液体菌种摇床培养的对比试验。试验结果表明: 草菇液体菌种培养最适合的摇床转速是 130 r/min; 添加的维生素 B_1 最佳浓度为 15 mg/L; 培养基静置 36 h 再进行摇床培养效果最好; 规格为 250 mL 的锥形瓶, 培养液的装瓶量为 80 mL 的培养效果最好, 菌丝球生物量最大, 菌丝球较密、均匀。

本试验与前人相关研究的不同之处, 主要体现在以下两个方面:

第一, 研究的内容更加完整。本研究内容包含两个方面, 即培养液的配方筛选和培养条件的对比试验, 以往的研究内容大多比较单一, 多数是培养条件的对比试验, 关于培养液的配方筛选相对较少。

第二, 试验结果有较大的差异。本试验所得的摇床转速、培养基装瓶量、维生素 B_1 添加浓度、摇前静置时间等草菇液体菌种培养优化工艺条件, 与前人相关研究结果不同, 孰优孰劣, 有待今后进一步探讨。

基金项目

河池市中央引导地方科技发展资金项目(河科 ZY230301), 桂西北地方资源保护与利用工程中心(桂教科研[2012] 9 号), 河池学院高层次人才科研启动费项目(XJ2018GKQ015, XJ2018GKQ016)。

参考文献

- [1] 吕作舟. 食用菌栽培学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [2] 常昌明. 食用菌栽培学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.

- [3] 王贺祥, 刘庆洪. 食用菌栽培学[M]. 第2版. 北京: 中国农业大学出版社, 2014.
- [4] 秦惠娟, 陈屏, 王琦, 等. 草菇的化学成分、生物活性及栽培现状[J]. 食品工业, 2017(38): 210-213.
- [5] 曾志忠, 曹学文, 蔡月彩, 等. 草菇常用育种技术[J]. 广东农业科学, 2008(4): 93-94.
- [6] 王杰, 谌金吾. 食用菌液体菌种技术优势、瓶颈及关键技术分析[J]. 食用菌, 2019, 41(1): 4-7.
- [7] 戴建清, 曾志恒. 食用菌液体菌种研究现状及发展趋势[J]. 中国食用菌, 2012, 31(5): 1-3.
- [8] 李崇, 李森柱, 谢意珍, 等. 草菇菌种液体培养及出菇试验研究[J]. 食用菌, 2012, 34(2): 16-18.
- [9] 伍国明, 李梅. 营养及培养温度对草菇菌丝生长的影响[J]. 食用菌, 2009, 31(3): 8-9.
- [10] 张萍, 蒋小满, 卜庆梅, 等. 不同营养条件对草菇液体培养的影响[J]. 江苏农业科学, 2005(5): 97-99.
- [11] 王芳, 陶鸿, 陈明, 等. 不同培养条件对草菇菌丝生物量的影响[J]. 农学学报, 2011, 1(2): 40-43.
- [12] 徐秀华, 邹存兵, 王丹, 等. 优化液体菌种振荡培养方式的试验研究[J]. 辽宁农业科学, 2009(6): 27-29.
- [13] 金卫根. 草菇菌丝体液体培养条件的优化研究[J]. 北方园艺, 2011(7): 154-156.