

# 杏鮑菇液體菌種開發之研究

陳錦桐<sup>1</sup> 鄭吉助<sup>2</sup> 黃健覃<sup>3</sup> 石信德<sup>4\*</sup>

## 摘要

陳錦桐、鄭吉助、黃健覃、石信德。2016。杏鮑菇液體菌種開發之研究。台灣農業研究 65(2):136–145。

以搖瓶培養杏鮑菇液體菌種，評估不同含碳、氮素營養源的液體培養基，對杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株菌絲生長之影響，並探討不同液體菌種接種量對於菌絲長滿栽培基質所需時間與出菇特性。結果發現，液體培養的含碳素營養源以可溶性澱粉對杏鮑菇菌絲生長最佳，含氮素營養源則以酵母抽出物培養對菌絲生物量表現最佳。在不同液體菌種接種量對菌絲長滿栽培瓶表現上，二菌株皆以 20 mL 或 30 mL 之接種菌量表現最佳，平均只要 16.3–16.5 d 即可長滿栽培瓶，比對照組固體菌種長滿基質需要 22.8–23.5 d 顯著快速。在出菇產量表現上，B012 菌株以 10 mL 或 20 mL 接種量的產量最高，平均每瓶產量為 186.5 g 與 185.6 g，而 ESPS 菌株則以接種量 20 mL 的表現最佳，平均每瓶產量為 190.2 g。二菌株的試驗結果都顯示，利用液體菌種方式生產杏鮑菇產量，顯著高於接種固體菌種的栽培方式。綜合研究結果，以液體菌種方式生產杏鮑菇，可節省其菌種之製備時間、接種後菌絲培養及出菇採收所需時間，較傳統固體菌種栽培方式縮短 30–32 d，並可降低培養基之成本及提高栽培庫房的年利用率 4–5 次。

**關鍵詞：**杏鮑菇、液體菌種、產量。

## 前言

杏鮑菇 [*Pleurotus eryngii* (Dc.: Fr.) Quél.] 為蠔菇屬的一種真菌，具有絕佳的風味、質地及烹煮特性，深受消費者喜愛而被譽為蠔菇類的極品 (Singer 1986)。台灣是全世界最早研究開發與生產杏鮑菇的國家之一 (Peng 1993)，杏鮑菇富含高量的蛋白質、纖維素、多糖及礦物質，而脂肪含量低 (Yan *et al.* 2002)，除具有豐富的營養成分外，又具有降血壓、降血脂等功效 (Chen *et al.* 2012)，是具有天然、營養、保健等特性的珍貴食用菇類，非常受到台灣消費者歡迎。在 2005 年台灣杏鮑菇年產量僅 2,000 Mg，至 2011 年達 9,000 Mg 以上，呈現大幅成長，係台灣第 3 大產值的生鮮菇

類 (Fang & Tsai 2011)。長期以來杏鮑菇栽培大多利用固體菌種方式進行植菌，固體菌種生產要經過較為繁瑣的原種、母種、栽培種的 3 級培育，最後才能擴大到栽培瓶 (袋) 生產，需要的工作量大、工續繁瑣，又因雜菌污染率高、生長週期長、菌齡不一致及標準規模化程度低 (Ruan *et al.* 2008)，致使栽培生產常出現不穩定現象。

自 1948 年美國 Humfeld 氏首先採用並報導液體培養技術可以培養傘菌屬菇類 (*Agaricus campestris* L.) 菌絲體後，利用深層醱酵技術培養各種食、藥用菌，引起人們極大重視 (Eyal *et al.* 1991)。Szuecs (1958) 是第 1 個用發酵槽來培養羊肚菌 (*Morchella esculenta* Fr.) 與多種食用菌菌絲體，從此食用菌液體培

投稿日期：2015 年 6 月 24 日；接受日期：2015 年 9 月 14 日。

\* 通訊作者：tedshih@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 南投縣埔里鎮公所農經觀光課技士。台灣 南投縣。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

養菌種的成功例子相繼出現。大多數的食藥用菇類的菌絲均能在適宜的培養條件下於液體培養基中生長，並生產出符合標準的液體菌種 (Leatham & Griffin 1984; Kawai *et al.* 1995; Friel & McLoughlin 2000)。近年來荷蘭、日本、韓國及中國大陸已有報導應用液體菌種生產技術進行洋菇、杏鮑菇及金針菇之商業運轉 (Yamanaka 2011; Li *et al.* 2012)，國內菇類栽培業者對於液體菌種一直都採取觀望態度，到目前為止僅少數菇農嘗試，限制了液體菌種的推展 (Shih *et al.* 2011)。本研究進行杏鮑菇液體發酵培養基的碳、氮素源組成及培養條件的初步探討，並予比較出菇生產特性，以確定其適宜的營養液配方與搖瓶培養條件，期以提供液體菌種培養杏鮑菇商業生產的參考而有助於杏鮑菇產業的發展。

## 材料與方法

### 供試杏鮑菇品系與基礎培養基製作

杏鮑菇 [*Pleurotus eryngii* (Dc.: Fr.) Quél.] 來源為農委會農業試驗所植病組菇類研究室所雜交保存之 B012 (Peng *et al.* 2001) 及自東石農會栽培的杏鮑菇子實體分離的 ESPS 2 支菌株。馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar; PDA) 的製作，係先將馬鈴薯洗淨、削皮並挖去芽眼，切成小丁塊，取 200 g 在容器中加水 1,000 mL，煮沸約 20 min。以數層紗布過濾取其濾液後，加入 20 g 洋菜 Bacto agar (BD, USA)，用小火加熱並不斷攪拌，至完全融化為止。再加入 20 g 葡萄糖 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Sigma, USA)，攪拌至溶解，最後將培養基溶液加水補充至總量為 1,000 mL。趁熱分裝試管，將之以 121°C 高溫及 1.2 kg cm<sup>-2</sup> 高壓蒸氣進行滅菌 20 min，取出置桌上擺成斜面，待冷卻凝固後即成為 PDA 試管培養基。抑或以血清瓶裝載培養基，經高溫高壓滅菌後，在無菌操作台內將尚未凝固的 PDA 倒入無菌的培養皿，每皿倒入約 15 mL，待冷卻後即可收取平板培養基備用。試驗用的杏鮑菇二菌株分別培養於 PDA 試管及平板，在 24°C 培養置長滿後置於 5°C 定溫箱保存，每 3 mo 定期更新 1 次。

### 液態基礎培養基配製與不同碳素源對杏鮑菇菌絲生長的影響

以 0.2% (W/V) 酵母抽出物 (yeast extract) (Difco, USA)、0.1% (W/V) 磷酸二氫鉀 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma, USA)、0.05% (W/V) 硫酸鎂 (MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) (Sigma, USA) 及 0.01% (W/V) 硫酸亞鐵 (FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) (Sigma, USA) 為基礎培養液，分別加入 0.5% (W/V) 葡萄糖、蔗糖 (sucrose) (Sigma, USA)、麥芽抽出物 (malt extract) (Difco, USA)、可溶性澱粉 (potato starch) (Sigma, USA) 及甘油 (glycerol) (Sigma, USA) 等 5 種不同碳素源所配置的液態培養基。各取 100 mL 裝入 500 mL 玻璃搖瓶內，每 1 處理 4 重複，搖瓶口以透氣矽膠塞塞緊後，經高溫高壓蒸氣 121°C，1.2 kg cm<sup>-2</sup> 壓力條件下滅菌 20 min，待冷卻後接種。每一搖瓶分別接種，以打孔器 (內徑 10 mm) 切取培養在 PDA 平板 10 d 的杏鮑菇二菌株菌絲塊 5 塊，續將搖瓶置於轉速 150 rpm 的搖盪培養箱 (Hsin Chien Xiang, 580C)。經 24°C 定溫暗培養 7 d 後，將搖瓶內培養好的菌絲球以抽氣過濾方式，用先秤重之濾紙 (Whiteman No. 1) 收集菌絲球，並用蒸餾水反復沖洗 3 次，然後將收集到的菌絲球在烘箱 60°C 的溫度下乾燥 2 d。以分析天平稱量，扣除濾紙重量後取其平均值，以測定菌絲生物乾物重。

### 不同有機與無機含氮素營養源對杏鮑菇菌絲生長的影響

以 2% (W/V) 可溶性澱粉、0.1% (W/V) 磷酸二氫鉀、0.05% (W/V) 硫酸鎂及 0.01% (W/V) 硫酸鐵為基礎培養液，先各取 100 mL 裝入 500 mL 的玻璃搖瓶內，再分別加入 0.3% (W/V) 米糠 (rice bran)、粉頭 (wheat middlings)、硫酸銨 [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (Bio Basic, Canada)、硝酸鈉 (NaNO<sub>3</sub>) (Hanawa, Japan)、尿素 (urea) (Bio Basic, Canada) 及酵母抽出物等 6 種不同含氮素營養源所配置的液態培養基，每處理 4 重複。搖瓶口以透氣矽膠塞塞緊後，經高壓蒸氣 1.2 kg cm<sup>-2</sup> 壓力條件下滅菌 20 min。待冷卻後，每搖瓶分別接種，以打孔器 (內徑 10 mm) 切取培養在 PDA 平板 10 d

的杏鮑菇二菌株菌絲塊 5 塊，將搖瓶置於轉速 150 rpm 的搖盪培養箱。在 24°C 定溫箱暗培養 7 d 後，將搖瓶內培養好的菌絲球以抽氣過濾方式，用先秤重之濾紙 (Whiteman No.1) 收集菌絲球，並用蒸餾水反復沖洗 3 次。然後，將收集到的菌絲球在烘箱 60°C 的溫度下烘乾 2 d，再用分析天平稱量，扣除濾紙重量後取其平均值，以測定菌絲乾物重。

### 液體菌種製作

由碳氮素源的測試結果，配製 2.0% (W/V) 可溶性澱粉、0.3% (W/V) 酵母抽出物、0.1% (W/V) 磷酸二氫鉀、0.05% (W/V) 硫酸鎂及 0.01% (W/V) 硫酸鐵，並調整 pH 值為 6.0。此液體培養基以可溶性澱粉搭配酵母抽出物的組合，稱此為 SY 液體培養基。將 100 mL 配製後培養液倒入 500 mL 玻璃搖瓶，經高溫高壓 (121°C 及 1.2 kg cm<sup>-2</sup> 壓力) 條件下滅菌 30 min 後備用。在無菌操作台內，切取 1 皿在 PDA 平板培養 10 d 的杏鮑菇菌絲塊加入 100 mL 無菌水，經均質機 (Han Shuo, UH-500A) 以 2,842× g 處理 30 s 均質後，利用分注器接種 5 mL 的菌量到含 SY 液體培養基的玻璃搖瓶中。置於 24°C 振盪培養箱中下靜置 24 h 後，再以 150 rpm 條件振盪培養 3 d。另利用平板稀釋法分析菌落數 (colony-forming units mL<sup>-1</sup>; CFU mL<sup>-1</sup>)，同時取培養的菌絲團在光學顯微鏡下觀察菌絲團型態大小。

### 木屑菌種製作

取雜木屑與米糠按體積比 10:1 方式，加水調至 65% 含水量後，裝入四角玻璃瓶內，每瓶裝入量約 50 g 左右。在 121°C 及 1.2 kg cm<sup>-2</sup> 條件下滅菌 30 min，冷卻後在無菌操作台內，將經培養在 PDA 平板 10 d 的杏鮑菇 B012 與 ESPS 菌絲切割成小塊 (10 mm × 10 mm)，分別接種 1/2 平板的菌絲量到四角瓶培養基。置於 24°C 培養直到菌絲長滿瓶內基質為止，菌絲培養期間不照光。

### 瓶裝栽培基質的製作

篩取雜木木屑 (購買新鮮的雜木屑經堆積 4 mo 後，期間每個月加水翻堆 1 次) 濕重 400 kg，

同時取樣栽培所需的輔料麥麩與米糠，分別測定水分含量。以栽培基質乾物重計算，木屑乾物重占 60%，混合乾物重 25% 的麥麩與 15% 的米糠。將上述基質原料，以混合後拌入全重 1% 碳酸鈣，再混合攪拌槽中攪拌均勻，同時調整栽培基質含水量為 63% 左右。取一半的栽培基質以自動裝瓶機 (廣太原，台中市)，將基質裝瓶 (1,100 mL 聚丙烯塑膠瓶，口徑 80 mm，每瓶濕重約 750 g) 以機械在塑膠瓶基質中心打一個洞、封蓋，移入電腦自動程式控制的殺菌釜 (廣太原，台中市) 內滅菌 (121°C, 1.2 kg cm<sup>-2</sup>, 60 min) (Chen *et al.* 2005)。滅菌後送入冷卻室放冷至隔夜待接種。

### 接種不等量之液體菌種對於杏鮑菇於塑膠栽培瓶內走菌速度的影響

利用分注器分別吸取在 24°C 靜置 24 h 後再以 150 rpm 條件振盪培養 3 d 的杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株液體菌種，在接種室每 1 塑膠栽培瓶分別接種 5、10、20 及 30 mL 的液體菌種；並以接種匙接種 15 g 固體菌種作為對照，分別為 4 重複，每重複處理分別為 12 瓶。隨後將塑膠栽培瓶放置於 24°C 培養室培養，直到菌絲長滿塑膠栽培瓶，並調查每 1 處理的走菌完成所需天數。在杏鮑菇菌絲長滿栽培瓶後，打開瓶蓋進行菌絲生長的濃密度調查，按菌絲薄、稀少、密、厚、濃密外觀研判紀錄。隨後將菌瓶移入出菇室，控制溫度在 16°C ± 1°C，以超音波加濕機提高與維持栽培室的相對濕度在 90–93%，利用二氧化碳偵測器偵測栽培室內二氧化碳濃度，搭配外氣風門的控制，將二氧化碳濃度控制在 1,000–1,500 mg L<sup>-1</sup>，刺激菌絲扭結形成原基出菇。在菇體發育至菌傘尚未反捲前採收，每瓶只採收 1 次。採收時不分菇體大小一起採收，採收後的菇體切除基部附著之木屑，秤重並記錄。這期間調查各處理之菇體原基形成時間，在入庫降溫刺激後，每天觀察記錄每 1 處理的菌絲表面扭結成原基的所需天數，每 1 處理調查 4 重複，每 1 重複 12 瓶。觀察紀錄查出菇時間、產量，並比較出菇產量等特性 (Peng *et al.* 2000)。

### 生物效率 (Biological Efficiency) 之計算

生物效率 (%)

$$= \left( \frac{\text{採收菇體之鮮重}}{\text{接種時之栽培基質乾重}} \right) \times 100\%$$

### 產菇效率 (Production Efficiency) 之計算

產菇效率 (%)

$$= \left( \frac{\text{採收菇體之鮮重}}{\text{菌絲長滿栽培基質後未出菇前的基質乾重}} \right) \times 100\%$$

### 統計分析

試驗資料分析以 SAS 統計分析套裝軟體 (SAS<sup>®</sup> Enterprise Guide 4.1, SAS Institute Inc.) 進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 後，以最小顯著差異性分析 (least significant difference test; LSD test)，在 5% 顯著水準下比較各處理平均值間之差異。

## 結果

### 最佳碳素源試驗

測試葡萄糖、蔗糖、麥芽糖、可溶性澱粉及甘油等 5 種碳素源對杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株菌絲生物量 (乾物重) 之影響，結果發現 B012 及 ESPS 二菌株以可溶性澱粉培養生物產量最高 (圖 1)。B012 及 ESPS 二菌株培養 7 d 後，比其他處理都高，生物量分別為 147.1 mg 與 142 mg。對葡萄糖與蔗糖的利用，二菌株的差異頗大，ESPS 菌株在可溶性澱粉、葡萄糖與蔗糖的利用上沒有顯著差異，但 B012 菌株則以可溶性澱粉生長最佳，葡萄糖與蔗糖次之。其他的碳素源，如麥芽抽出物，則生長較差，其中又以甘油培養效果最差。

### 最佳含氮營養源試驗

採用 B012 與 ESPS 二菌株表現都較佳的

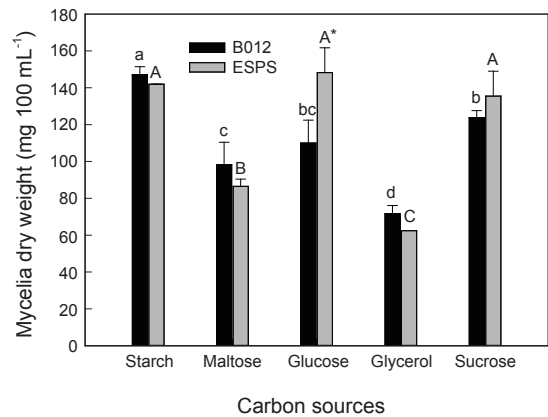


圖 1. 五種碳素源液體培養杏鮑菇 B012 和 ESPS 二品系對菌絲體乾物重之影響。

Fig. 1. Effect of five carbon sources on mycelial dry weight of the two king oyster mushroom strains B012 and ESPS in 100 milliliter liquid culture for 7 days. \* Means ( $n = 3$ ) among different carbon sources for each strain followed with the same letter are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by LSD test.

可溶性澱粉作為碳素源，再分別測試 0.3% 米糠、粉頭、硫酸銨、硝酸鈉、尿素及酵母抽出物等 6 種不同含氮營養源，結果發現杏鮑菇 B012 菌株在這 6 種含氮營養源中，以酵母抽出物與米糠的培養其菌絲生長表現較佳，其次為粉頭、硫酸銨與硝酸鈉，尿素對菌絲生長表現最差。杏鮑菇 ESPS 菌株，則以酵母抽出物培養菌絲生長最佳，生物量達 595 mg，其次為米糠，而粉頭與硫酸銨則再次之，在尿素與硝酸鈉的培養生長表現最差，尤其是硝酸鈉菌絲生物量最差僅達 97.6 mg。二支杏鮑菇菌株，都以酵母抽出物培養所得到之生物產量最高，而且 ESPS 品系生物產量比 B012 品系高出近 1 倍 (圖 2)。以上得知，二品系最佳液體培養氮素源以酵母抽出物為最佳。

### 杏鮑菇液體培養菌種對菌絲長滿栽培瓶的影響

杏鮑菇 B012 及 ESPS 二菌株接種液體培養基後，在 24°C 靜置培養 1 d 後，再震盪培養 3 d，經於光學顯微鏡下可觀察到菌絲團漸漸形成 (圖 3)。量測其液體菌種菌落數分別為  $2.83 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> 及  $2.16 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>，顯示利用液體培養生產之菌絲生長非常快速。

不同接種量的杏鮑菇液體菌種，其菌絲長滿塑膠栽培瓶的天數與固態菌種相比較，發現塑膠栽培瓶以液體菌種接種後，走菌完成天數隨著接種量增加而明顯縮短。其中，接種 20 mL 與 30 mL 之菌量的 B012 及 ESPS 栽培瓶生長速度最快，其平均長滿塑膠栽培瓶所需天數分別為 16.3、16.3、16.5 及 16.4 d；其次為 10 mL 接種量，菌絲平均長滿塑膠栽培瓶所需天

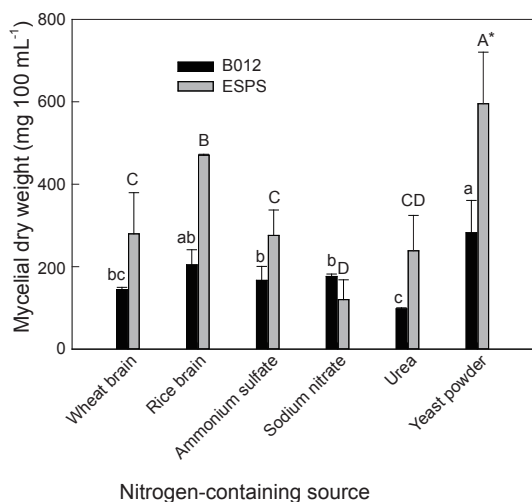


圖 2. 不同有機與無機含氮素營養源液體培養杏鮑菇 B012 與 ESPS 二品系 7 d 對菌絲生物量之影響。

**Fig. 2.** Effect of six nitrogen-containing sources on mycelial dry weight of the two king oyster mushroom strain B012 and ESPS in 100 milliliter liquid culture for 7 days at 24°C. \* Means ( $n = 3$ ) among different nitrogen sources for each strain followed with the same letter are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by LSD test.

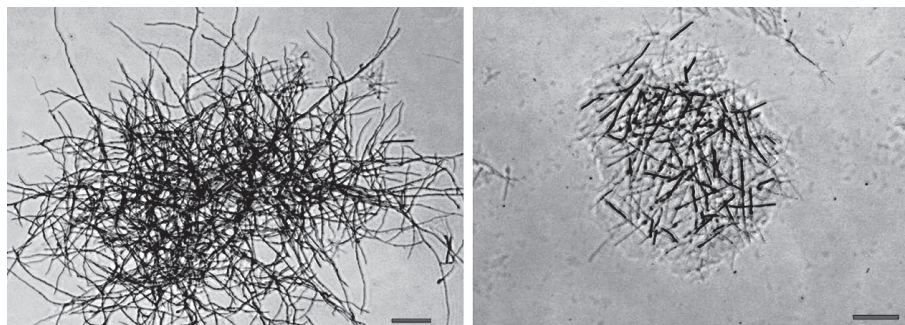


圖 3. 杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株液體培養 4 d 在光學顯微鏡下之菌絲團型態 (尺標為 0.1 mm)。

**Fig. 3.** Microscopic observation of morphology of two king oyster mushroom strains B012 (left) and ESPS (right) pellets obtained from shake-flask cultivation (Bar = 0.1 mm).

數分別為 21 d 及 22 d。B012 及 ESPS 菌株用 5 mL 菌種量接種者，其菌絲平均長滿塑膠栽培瓶所需天數分別為 21.9 d 及 22.7 d (圖 4)，但仍明顯比一般固態菌種接種，菌絲長滿栽培瓶所需的時間 22.7 d 與 23.5 d 快速。

### 接種不等量之液體菌種與固體菌種接種對於杏鮑菇於塑膠栽培瓶內走菌速度、產量與出菇特性的影響

在杏鮑菇的菌絲長滿栽培瓶後，移除塑膠瓶蓋，檢視杏鮑菇二菌株不同接種菌量對栽培瓶內菌絲生長影響。結果發現，杏鮑菇 B012

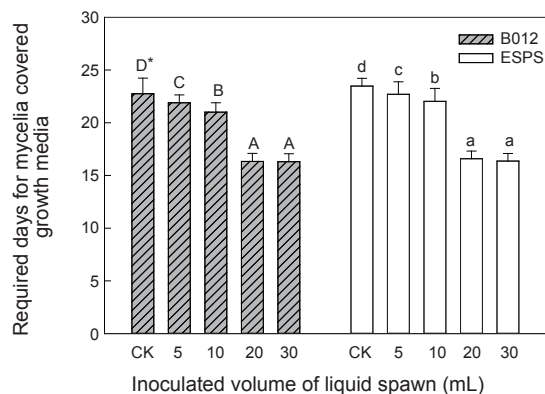


圖 4. 不同液態菌種接種量對杏鮑菇 B012 與 ESPS 二品系完成走菌長滿時間的影響。

**Fig. 4.** Effect of inoculated volume of liquid spawn of king oyster mushroom strains B012 and ESPS on the days required for mycelia to cover growth media at 21°C. Bar = standard error.

及 ESPS 二菌株接種液體菌種 5 mL 的栽培基質表面，其菌絲生長情形較接種一般固態菌種稀疏，而在接種量 10、20 及 30 mL 的栽培瓶表面菌絲生長則較為濃密 (表 1)，與一般固體菌種相似，顯示 5 mL 接種量偏低。在菇體原

基形成時間，杏鮑菇 B012 菌株以接種量 10 mL 與 20 mL 最快形成菇體原基，分別為 11.5 d 與 11.8 d，而接種 5 mL 與 30 mL 菌量的則在 13.3 d 與 13.5 d 形成原基，但仍比固體菌種形成原基需 17.8 d 快速。ESPS 菌株在形成菇體原基的時間，則以接種菌量 5、10 及 20 mL 的最快形成，分別為 10.5、11.0 及 10.5 d，而接種量 30 mL 與固體菌種則較晚形成。

**表 1.** 接種不同菌量液體菌種與固體菌種後對杏鮑菇菌絲的生長情形與菇體原基形成影響。

**Table 1.** Effect of liquid spawn quantity and solid spawn of two king oyster mushroom strains on the mycelial growth and primordial induction.

Strain	Treatment (mL)	Mycelial growth	Days from stimulating to primordia formation
B012	5	++ <sup>z</sup>	13.3 ± 1.0 b <sup>y</sup>
	10	+++	11.5 ± 0.6 c
	20	+++	11.8 ± 1.0 c
	30	+++	13.5 ± 0.6 b
	Solid (CK)	+++	17.8 ± 1.7 a
ESPS	5	++	10.5 ± 0.6 b
	10	+++	11.0 ± 0.8 b
	20	+++	10.5 ± 0.6 b
	30	+++	11.5 ± 1.3 a
	Solid (CK)	+++	12.5 ± 1.0 a

<sup>z</sup> Mycelial growth: +: few and thin; ++: general dense; +++: dense and thick.

<sup>y</sup> Means ( $n = 4$ ) with the same letter in a column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

在出菇特性方面，接種 5、10、20 及 30 mL 液體菌種菌量的栽培瓶，B012 菌株之子實體平均產量分別為 174.7、186.5、185.6 及 174.1 g，其生物效率分別為 66、67.8、66.2 及 69.0%；對照組平均產量為 169.6 g，生物效率為 61.2%。接種 5、10、20 及 30 mL 菌量於 ESPS 菌株之子實體，平均產量分別為 186.1、181.2、190.2 及 186.3 g，其生物效率分別為 69.6、65.9、67.9 及 68.3%；對照組平均產量為 179.0 g，生物效率為 65.6% (表 2)。在入庫降溫刺激出菇至採收所需天數，B021 菌株以接種菌量 20 與 30 mL 所需生長日數較短，分別為 17.5 d 與 17.7 d，而接種菌量在 5 mL 處理由刺激出菇至採收所需生長日數為 19.6 d，與用固體菌種相同，接種菌量 10 mL 則需達 21.7 d。在 ESPS 菌株不同接種菌量由

**表 2.** 杏鮑菇不同液體菌種接種量對出菇特性與產量之影響。

**Table 2.** Effects of various liquid spawn volumes on the fruiting characteristics of two strains of king oyster mushroom.

Strain	Treatment <sup>z</sup> (mL)	Average yield <sup>y</sup> (g bootle <sup>-1</sup> )	Biological efficiency (%)	Production efficiency (%)	Days from treated to 1st picking
B012	5	174.7 ± 3.7 b <sup>x</sup>	66.0 ± 1.6 ab	69.3 ± 1.7 b	19.6 ± 1.3 b
	10	186.5 ± 1.6 a	67.8 ± 0.8 ab	78.1 ± 1.0 a	21.7 ± 0.5 a
	20	185.6 ± 3.1 a	66.2 ± 1.3 ab	71.1 ± 1.4 b	17.5 ± 1.9 c
	30	174.1 ± 1.5 b	69.0 ± 3.6 a	75.1 ± 3.9 ab	17.7 ± 1.7 c
	Solid (CK)	169.6 ± 4.0 b	61.2 ± 1.9 b	62.4 ± 1.9 c	19.6 ± 1.0 b
ESPS	5	186.1 ± 2.0 ab	69.6 ± 0.6 a	77.0 ± 0.7 ab	18.6 ± 0.8 a
	10	181.2 ± 3.7 ab	65.9 ± 1.5 a	73.8 ± 1.6 b	18.6 ± 0.5 a
	20	190.2 ± 3.2 a	67.9 ± 1.1 a	79.6 ± 1.3 a	18.7 ± 0.8 a
	30	186.3 ± 4.2 ab	68.3 ± 1.8 a	76.1 ± 2.0 ab	17.2 ± 0.4 b
	Solid (CK)	179.0 ± 2.7 b	65.6 ± 1.7 a	67.0 ± 1.7 c	19.4 ± 2.0 a

<sup>z</sup> Each sawdust medium containing 60% sawdust, 25% wheat brain, and 15% rice brain (dry weight).

<sup>y</sup> The spawn running period required for fruiting was about 30 days. There were 5 replicates and each replicate consisted of 12 bottles of substrate.

<sup>x</sup> Means with the same letter in a column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

刺激至採收所需生長日數，則以接種 30 mL 所需的 17.2 d 最快，其餘的處理則在 18.6 d 左右，而用固體菌種的栽培菌瓶，由刺激至採收所需生長日數為 19.4 d，但二者並無顯著差異 (表 2)。

## 討論

本研究以液體培養方式生產二株杏鮑菇菌株的菌種，探討液體培養基最適合的碳氮素源，以及培養 4 d 後接種至塑膠栽培瓶後菌絲生長情形與出菇特性，並以一般傳統固態培養方式所製作的固體菌種接種至塑膠栽培瓶作為對照。碳素源主要作用為構成細胞物質，亦為生產代謝產物所供給菌種所需的碳基能源，由供試杏鮑菇 B012 與 ESPS 二支菌株探討碳素源對其菌絲生長的影響。結果發現二支杏鮑菇菌株對於碳素源的利用上有差異，B012 菌株利用優劣順序為澱粉、蔗糖、葡萄糖、麥芽抽出物與甘油，而 ESPS 菌株則是以葡萄糖、澱粉與蔗糖同為最佳，其次是麥芽抽出物、甘油。此與前人研究碳原的優劣順序為葡萄糖、蔗糖、果糖、麥芽糖、澱粉與甘油 (Liu *et al.* 2009b) 之結果不完全相同，這可能與試驗所採用的杏鮑菇菌株不同，對於碳素源的利用性有所差異所致，而甘油較不適合供作杏鮑菇菌絲生長。氮素源是構成菇類蛋白質和核酸的主要元素，以 6 種有機、無機的含氮營養源進行試驗，發現有機含氮營養源比無機氮素源更適合杏鮑菇菌絲生長。在杏鮑菇 B012 與 ESPS 二支菌株，皆以酵母抽出物為氮源菌絲生物量表現最佳，其次為米糠與粉頭，而無機態的氮素源如硫酸銨、硝酸鈉與尿素，則明顯比較差。試驗結果類似於 Liu *et al.* (2009b) 及 Jin & Yu (2007) 的研究。有機含氮營養源酵母抽出物、米糠、粉頭的培養基，含有蛋白質、維生素 B 群、微量元素和膳食纖維等，在高溫滅菌中蛋白質分解成胺、肽、胺基酸，又含其他營養物質，因此杏鮑菇菌絲利用率較高。無機態氮源硫酸銨，雖然可以  $\text{NH}_4^+$  方式被杏鮑菇利用，但利用率則較低；而硝酸鈉以  $\text{NO}_3^-$  形式存在，也較難被杏鮑菇菌絲吸收利用。此一結果與 Liu *et al.* (2009b) 的研究相同。

比較杏鮑菇液體菌種與固體菌種對菌絲長滿基質的時間，結果液體菌種顯著的比固體木屑菌種快速，縮短 6–7 d 左右的時間，與 Liu *et al.* (2009a) 研究結果相似。而在接種杏鮑菇不同液體菌種量至塑膠栽培瓶對菌絲長滿時間的影響，發現菌絲生長速度因菌株不同而有所差異，液體接種量並非愈多愈好。研究發現 B012 菌株接種量在 5 mL 時菌絲長滿時間需要 21.9 d，EPSP 菌株也需要 22.7 d。在菌絲長滿栽培瓶後，可發現基質表面菌絲較為稀疏，但隨著接種量增加而縮短走菌長滿基質時間，同時菌絲生長也較為濃密；如杏鮑菇 B012 菌株接種量 20 mL 只需 16.3 d，而 ESPS 菌株也只要 16.6 d。但是，接種量提高至 30 mL 時，菌絲長滿栽培瓶時間並無再縮減，且菌絲濃密度相同。顯示接種量 20 mL，即可達到栽培瓶最快生長所需的菌種量。一般固體菌種的製作流程需由試管接種至滅菌後麥粒或木屑瓶，在經過 15–20 d 形成麥粒菌種或木屑菌種，而後再將菌種接種至滅菌後之木屑培養瓶經過 20 d 擴增成為木屑菌種，最後將此木屑菌種接種至塑膠栽培瓶。菌種經過多次轉管，菌種純度與活力易受影響，不但耗時費力，又需維持一定庫房空間用來培養菌種。食用菌液體菌種與固體菌種相比，液體菌種具有培養時間短、走菌快、菌齡整齊和接種方便等優點 (Liu *et al.* 1997)，主要原因在於液體菌種中片段多萌發生長點也多，分散度大，吃料生長快速，且在培養料中呈現立體生長模式，而使菌絲可快速長滿基質。

本研究以液體菌種方式接種培養，不僅長滿菌瓶時間縮短，在菇體原基形成時間，也顯著比固體菌種所需時間短。其中，以 10 mL 或 20 mL 的接種菌量為最快，但在接種量 30 mL 時，則會延緩。在 ESPS 菌株原基形成時間甚至與固體菌種無顯著差異，顯示過多接種量是不需要，且會延遲菇原基的形成。是否與養分提供較高或通氣性差異有關，確實原因仍需進一步研究。對於接種不同液體菌種量對出菇特性表現上，以液體菌種接種走菌完成後的栽培瓶，經刺激出菇的子實體，其外觀相較於對照固體菌種接種者在外觀表現無差異。

在 B012 與 ESPS 菌株的出菇產量，以接種 10 mL 或 20 mL 的平均產量明顯高於其他處理與固體菌種（對照組），但是在刺激出菇至採收所需日數，二菌株表現有所差異。B012 菌株以 20 mL 或 30 mL 接種量為最快，而 ESPS 菌株則是以接種 30 mL 菌量的所需時間為最短。杏鮑菇在目前商業生產多以冷房環控生產方式進行，大都以採收 1 次為原則，對於杏鮑菇走菌培養的時間，刺激出菇至採收所需時間與出菇產量等就非常重要。縮短培養與出菇時間，不僅可降低栽培庫房的能源耗損，節省生產成本，也有助於栽培庫房的利用率提升。研究發現液體菌種的接種量在 20 mL 時，對於杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株以 1,100 mL 塑膠栽培瓶，具有最佳的效果，在菌絲長滿培養瓶所需時間上比固體菌種縮短 6–7 d，在刺激至出菇採收所需時間也縮短 1–2 d，出菇產量則每瓶提高 11–16 g 以上。由此顯示，每瓶最佳液體菌種每瓶接種量為 20 mL。在杏鮑菇 B012 與 ESPS 二支菌株，由生長的溫度與菌落大小、不同碳氮素源的生物量表現及接種後菌絲長滿時間與出菇產量等特性，均以 ESPS 菌株較優，顯示出杏鮑菇不同菌株間的表現會有所不同。是否能以相同培養基在同一溫度下其菌落生長大小來做為菌種生長活力與產量的評估，仍需再多做一些品系與重複，才有助於研判，但整體上而言，菌株的生長活力表現仍可作生產菌種篩選的參考。

傳統的食用菇類生產過程中，使用的菌種大多是固態（體）菌種。固體菌種一般生產模式為試管母種繁殖至生產原種，再由原種擴增培養生產栽培種（塑膠瓶或袋）。這樣的傳統菌種生產模式，一般要經過 60–90 d 的時間才能進行栽培生產，生產週期較長，而且培養成本也較高，生產受季節和氣候影響較大，而且菌種品質仍有很大需改善之處。相較於固體菌種，應用液體菌種於菇類，除可縮短培養時間、菌絲生長快速、菌齡整齊及增加庫房設施使用效率等優點外，還有利於食用菇類生產的規模化及工廠化（Shih *et al.* 2011），又具有降低栽培成本而提高收益。中國大陸學者 Guo & Liu (2011) 計算以液體菌種栽培食用菌，每栽

培袋成本可降低 0.732 元人民幣，成本利潤率提高 42.08% (Guo & Liu 2011)。綜合本研究結果，得知以液體菌種方式栽培生產杏鮑菇，可節省其菌種之製備時間、接種後菌絲培養與出菇採收所需時間，較傳統固體菌種栽培方式縮短約 30–32 d。此外，亦可降低培養基之成本，栽培庫房每年又可提高 4–5 次利用率，總此提高其產量的效益。

杏鮑菇為農業試驗所育成的商業化菇類品種 (Peng *et al.* 2000)，近年來產量持續成長，依據農糧署統計資料估算目前產值已達新台幣 10 億元以上，為台灣重要生產菇類之一。有關國內應用液體菌種生產食用菇類的研究剛起步，本研究初步利用振盪培養方式生產液體菌種，顯示其應用在栽培上具可行性與進步性。本系列研究後續將利用大型發酵槽方式探討商業生產菌種之生產方法，期望開發杏鮑菇以液體菌種作為主要生產模式，全面提高國內杏鮑菇的生產技術，並推廣至菇類產業應用。

## 誌謝

本研究承農委會經費 (98 農科-1.1.1-農 C3) 支持，對於參與研究工作之菇類研究室同仁的協助，謹此誌謝。

## 引用文獻

- Chen, J. T., S. Y. Chien, J. T. Peng, and M. H. Chen. 2005. Recycling application of spent king oyster mushroom substrate for production of *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. *J. Taiwan Agric. Res.* 54:235–244. (in Chinese with English abstract)
- Chen, S. Y., K. J. Ho, Y. J. Hsieh, J. L. Wang, and J. L. Mau. 2012. Contents of lovastatin, gamma-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT-Food Sci. Technol.* 47:274–278.
- Eyal, J., W. R. Grace, and C. Conn. 1991. Mushroom mycelium grown in submerged culture- Potential food applications. p.31–64. *in: Biotechnology and Food Ingredients.* (Goldberg, I. and R. Williams, eds.) Van Nostrand Reinhold Pub. New York. 577 pp.
- Fang, Y. D. and C. J. Tsai. 2011. Mushroom industrial policy and guidance measures. p.1–8. *in: Proceedings of the Symposium on Mushroom.* October 24, 2011. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No.

- 155, Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)
- Friel, M. T. and A. J. McLoughlin. 2000. Production of a liquid inoculum spawn of *Agaricus bisporus*. *Bio-technol. Lett.* 22:351–354.
- Guo, J. L. and X. Liu. 2011. Comparison between liquid culture and solid culture technologies for edible mushroom spawn production and analysis on their economic benefits. *Sci. Agric. Sin.* 44:835–841. (in Chinese with English abstract)
- Jin, P. and Y. Yu. 2007. Effect of cultural conditions on mycelia growth of *Pleurotus eryngii*. *J. Univ. Sci. Technol. Suzhou* 24:59–62. (in Chinese with English abstract)
- Kawai, G., H. Kobayashi, Y. Fukushima, and K. Ohsaki. 1995. Effect of liquid mycelial culture used as a spawn on sawdust cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*). *Mycoscience* 37:201–207.
- Leatham, G. F. and T. J. Griffin. 1984. Adapting liquid spawn *Lentinus edodes* to oak wood. *Appl. Microbiol. Biot.* 20:360–363.
- Li, H., X. G. Wang, Y. F. Li, and Z. G. Liu. 2012. Research progress on production of edible fungus strain in liquid. *Hortic. Seed* 6:123–125.
- Liu, G. H., J. Tu, J. C. Zhang, and Y. L. Jia. 2009a. A study on the preparation of liquid spawn of *Pleurotus eryngii*. *Northern Hortic.* 11:230–232. (in Chinese with English abstract)
- Liu, M. S., H. Y. Chen, and H. B. Sun. 1997. A survey of studies on edible fungi by submerged culture technology. *Jiangxi Sci.* 15:193–198. (in Chinese with English abstract)
- Liu, T., Z. M. Diao, and Y. Q. Qi. 2009b. Study on the effects of different carbon sources and nitrogen sources of *Pleurotus eryngii*. *Northern Hortic.* 6:222–224. (in Chinese with English abstract)
- Peng, J. T. 1993. Studies on the preparation of substrate for the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. p.116. *in: Proceeding of First International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products.* August 23, 1993. Hong Kong. The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong.
- Peng, J. T., M. C. Dai, and Y. F. Tsai. 2000. Effect of different methods for controlling humidification on the production of *Pleurotus eryngii* using bottle cultivation technology. *J. Agric. Res. China* 49(3):54–59. (in Chinese with English abstract)
- Peng, J. T., M. C. Dai, Y. F. Tsai, M. H. Chen, and J. T. Chen. 2001. Selection and breeding of king oyster mushroom. *J. Agric. Res. China* 50(4):43–58. (in Chinese with English abstract)
- Ruan, X. D., X. L. Zhang, and H. W. Zhang. 2008. Development and application of liquid strain in edible fungi. *Liaoning Agric. Sci.* 1:32–35. (in Chinese with English abstract)
- Shih, H. D., J. T. Chen, and C. J. Chen. 2011. Development and application of the liquid spawn for mushroom industry. p.37–43. *in: Proceedings of the Symposium on Mushroom.* October 24, 2011. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 155, Taichung. (in Chinese with English abstract)
- Singer, R. 1986. *The Agaricales in Modern Taxonomy.* 4th ed. Koeltz Scientific Books Press. Koenigstein, Germany. 981 pp.
- Szuecs, J. 1958. Method of Growing Mushroom Mycelium and the Resulting Products. U.S. Patent 2850841. United States Patent Office. Alexandria, VA. 3 pp.
- Yamanaka, K. 2011. Mushroom cultivation in Japan. *WSMBMP Bull.* 4:1–10.
- Yan, M. J., C. H. Jiang, and S. X. Tsai. 2002. Nutrient analysis of *Pleurotus eryngii*. *Edible Fungi* 24(2):11–12. (in Chinese)

## Preliminary Studies on the Development of Liquid Spawn for *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél.

Jin-Tong Chen<sup>1</sup>, Chi-Chu Cheng<sup>2</sup>, Jian-Tan Huang<sup>3</sup>, and Hsin-Der Shih<sup>4,\*</sup>

### Abstract

Chen, J. T., C. C. Cheng, J. T. Huang, and H. D. Shih. 2016. Preliminary studies on the development of liquid spawn for *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):136–145.

Liquid spawn of king oyster mushrooms (*Pleurotus eryngii*) was cultured in shake flasks, and then the effects of different carbon and nitrogen sources on the mycelium growth in culture medium of the B012 and ESPS strains of the mushrooms were assessed. In addition, the effects of inoculating different amounts of the liquid spawn of the B012 and ESPS strains of king oyster mushroom on the time required for mycelia to completely cover the growth media and on the fruiting characteristics were examined. Results showed that soluble starch was the optimal carbon source while yeast extract was the optimal nitrogen source for mycelia growth of the king oyster mushroom. The minimum days required to achieve complete coverage of mycelia over the growth media were, on average, 16.3 to 16.5 days, with 20 mL or 30 mL of liquid spawn of king oyster mushroom inoculation. The control checks were solid spawn, which required 22.8–23.5 days before the king mushroom mycelia completely covered the growth media. The data showed that mycelium growth with liquid spawn was substantially faster than that with solid spawn. Regarding fruiting characteristics, the B012 strain, when inoculated with 10 mL or 20 mL of king oyster mushroom liquid spawn, exhibited highest yields of 186.5 g and 185.6 g, respectively, per bottle on average. The ESPS strain, which was inoculated with 20 mL of liquid spawn, showed the optimal yield, with 190.2 g per bottle on average. The bottle production results showed that the average yield was substantially higher with liquid spawn than with solid spawn. Cultivating king oyster mushrooms with liquid spawn saves time in preparing the spawn, waiting for the mycelia to cover the growth media, and harvesting. The liquid-spawn cultivation technique is 30 to 32 days shorter than the solid-spawn cultivation technique for cultivating king oyster mushrooms. The technique reduces medium cultivation costs while increasing the utilization of the cultivation room by 4–5 times per year.

**Key words:** King oyster mushroom, Liquid spawn, Yield.

---

Received: June 24, 2015; Accepted: September 14, 2015.

\* Corresponding author, e-mail: tedshih@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Associate Technician Specialist, Department of Agriculture and Tourism, Puli Township Office, Nantou, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.