

# 双孢菇培养基堆制产热过程中微生物变化对其理化性质的影响

刘 灿<sup>1</sup>, 生吉萍<sup>1</sup>, 邹积华<sup>2</sup>, 王鸿磊<sup>2</sup>, 丁 强<sup>2</sup>, 申 琳<sup>1,\*</sup>

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学烟台研究院, 山东 烟台 264067)

**摘 要:** 对双孢菇培养基非热灭菌制备过程中的微生物数量及培养基的理化性质进行检测, 研究双孢菇培养基发酵产热过程中微生物的生长对底物性质的影响。在培养基二次发酵过程中, 在原料浴湿后、第1、2、3、4次倒料时及后发酵结束时6个关键点进行取样, 对培养基中细菌、放线菌和霉菌3类微生物的数量进行培养计数, 同时测定培养基样品的气味、颜色、韧度的物理感官特性及含水量、pH值、硝态氮含量的化学成分变化。结果表明, 双孢菇培养基中的微生物数量大小顺序依次为: 细菌>放线菌>霉菌, 并且都呈先减少后增加的趋势; 培养基的酸味逐渐减小, 氨味先增加后减少, 颜色由黄色逐渐变为棕黑色, 白色的面积增加, 能够承受的拉力逐渐减小, 并且蜡质的易去除率增加, 水分含量逐渐减少, pH值和硝态氮含量均先减少后增加。

**关键词:** 双孢蘑菇; 培养基; 堆制; 微生物; 理化性质; 二次发酵

## Effects of Microbial Changes on Physical and Chemical Characteristics of *Agaricus bisporus* Compost during Fermentation

LIU Can<sup>1</sup>, SHENG Ji-ping<sup>1</sup>, ZOU Ji-hua<sup>2</sup>, WANG Hong-lei<sup>2</sup>, DING Qiang<sup>2</sup>, SHEN Lin<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Yantai Research Institute, China Agricultural University, Yantai 264067, China)

**Abstract:** The microbial numbers and physical and chemical characteristics of *Agaricus bisporus* compost during fermentation were detected to study the effect of microbial growth on substrate properties. Samples of *Agaricus bisporus* compost were collected at 6 key points throughout the entire two-phase fermentation to measure their microbial (total bacterial count, total count of actinomycetes and mold count), sensory (odor, color and physical toughness) and chemical characteristics (water content, pH and nitrate content). The results indicated that the microbial numbers of 6 collected samples of *Agaricus bisporus* compost all decreased in the following order: bacteria > actinomycetes > molds and the numbers of all of the microbial species initially decreased and then increased during fermentation. The sour smell of *Agaricus bisporus* compost gradually became weak. The ammonia smell presented a change trend opposite to that of microbial numbers. The color displayed a gradual change from yellow to brown-black and the white area increased. The toughness and water content gradually decreased, whereas the percentage wax removal increased. The pH and nitrate content both initially declined and then rose.

**Key words:** *Agaricus bisporus*; medium; composting; microbe; physical and chemical characteristics; two-phase fermentation  
中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2010)13-0240-04

双孢蘑菇[*Agaricus bisporus* (Large) Sing]是目前世界上人工栽培最广泛、产量最高、消费量最大的食用菌<sup>[1]</sup>。双孢菇培养料发酵分为一次发酵和二次发酵, 目前国内外都以二次发酵为主, 二次发酵的主流是采用发

酵仓系统模式进行的<sup>[2]</sup>。机械化生产双孢菇时, 培养基发酵主要采用现在室外简易棚中进行前发酵, 然后在隧道中进行后发酵, 后发酵的隧道采用电脑自动控制生产, 控温、控湿、控气<sup>[3]</sup>。通过二次发酵, 培养料

收稿日期: 2010-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671471); 农业部公益性行业(农业)科技专项(200803033);

“十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD89B09-10)

作者简介: 刘灿(1988—), 女, 博士研究生, 主要从事食品生物技术与食用菌微生物研究。E-mail: liucan88723@126.com

\* 通信作者: 申琳(1964—), 男, 副教授, 博士, 主要从事农产品综合利用研究。E-mail: pingshen@cau.edu.cn

中存在着复杂的生物降解作用,不同种类的微生物群落交替作用,结合各种化学反应,使得培养料成为有利于蘑菇菌丝生长的选择性基质<sup>[4]</sup>。

目前,对于培养料二次发酵过程是一个非人工加热而自产热过程,其中微生物交替及代谢起到非常重要的作用。前发酵过程中,一些中温微生物首先利用原料中简单的有机质,产生有机酸、CO<sub>2</sub>和热量,使料温上升,嗜热微生物开始代替中温微生物,成为优势群落。在堆制前期料温升至60℃以上时,细菌能大量繁殖,培养料中易挥发固体和大量简单的易被降解的糖由细菌分解掉<sup>[5]</sup>,这时很少分离到真菌<sup>[6]</sup>。在堆制后期,随料中营养物质的分解转化,料温下降,许多嗜热或耐热放线菌及霉菌在此营养和生态环境下开始大量繁殖<sup>[7]</sup>。后发酵大致可以分为4个阶段:平衡温度、巴氏杀菌、空气调节和冷却<sup>[8]</sup>。一方面通过巴氏杀菌杀死病虫危害及其虫卵和一些有害的微生物及孢子,另一方面通过空气调节促进培养料进一步转化为利于蘑菇菌丝吸收利用而竞争性杂菌不易利用的选择性培养料<sup>[9]</sup>。

针对双孢菇培养料工厂化制备的二次发酵过程中,微生物自动产热,其中微生物及培养基理化性质变化的研究目前很少见报道,本实验监测双孢菇培养料二次发酵过程中的细菌、霉菌、放线菌的数量变化,包括物理感官特性、含水量、pH值、硝态氮含量这些理化指标,为更全面了解在此过程中微生物对于培养基中底物的降解及产物生成的促进作用并通过微生物调控提高发酵效率提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

双孢菇培养料,取自山东省九发食用菌股份有限公司的培养料制备车间。培养料配方见表1。

表1 双孢菇培养料成分

Table 1 Components of the *Agaricus bisporus* compost used in this study

项目	湿质量/kg	含水量/%	干质量/kg	灰分/%	含氮质量/kg	含碳质量/kg
麦秸秆	26000	11	23140	6.72	139	9710
鸡粪	21000	70	6300	52.8	309	1340
石膏	1800		1800			
尿素	150		150		69	
总质量	48950		31390		517	11050
碳氮比	C%=35.20		N%=1.65		C/N=21.33	

注: C% 为总碳质量占培养料总干质量的百分数; N% 为总氮质量占培养料总干质量的百分数; C/N 为碳氮的总质量比。

### 1.2 培养基

营养琼脂(NA)培养基用于细菌的培养; 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基用于霉菌的培养; 高氏一号培养基

用于放线菌的培养。

### 1.3 样品编号及取样时间

表2 双孢菇培养料样品编号及取样时间

Table 2 Collection time points of *Agaricus bisporus* compost and corresponding numbers

样品编号	f <sub>0</sub>	f <sub>1</sub>	f <sub>2</sub>	f <sub>3</sub>	f <sub>4</sub>	f <sub>5</sub>
取样时间	拌料浴 湿后	第1次 倒料时	第2次 倒料时	第3次 倒料时	第4次 倒料时	后发酵 结束时
料温/℃	56	75	72	67	66	30
发酵阶段	室外 堆积	前发酵 4d 时	前发酵 8d 时	前发酵 11d 时	前发酵 14d 时	后发酵 8d 时

注: 第1、2、3次倒料是在前发酵过程中进行; 第4次倒料后培养料进入后发酵阶段。

### 1.4 双孢菇培养料的采集

在每次倒料过程中分别每5~7铲车取样100g, 使得能够取到培养料堆各部位的样品。取样后放入液氮中速冻后于-80℃保存。

### 1.5 方法

#### 1.5.1 细菌总数测定

参照 GB/T 13093 — 1991 《饲料中细菌总数的测定方法》进行测定。无菌称取10.0g样品, 放入含有90mL 无菌水的三角瓶内(瓶内预先加有适量的玻璃珠), 200r/min 振荡30min, 制成1:10的混匀稀释液。吸取10<sup>-1</sup> 稀释液1mL, 沿管壁慢慢注入含有9mL 稀释液的试管内, 混合均匀做成1:100的稀释液。另取一支1mL 灭菌吸管, 按上述操作顺序, 做10倍递增稀释, 如此依次稀释。选择3个适宜稀释度, 吸取该稀释度的1mL 稀释液于固体培养基的平皿内, 用涂布棒涂布均匀。细菌选择10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 这3个稀释度涂布, 用NA培养基于适宜温度下培养(表3)。计数, 同时做3个平行。

表3 双孢菇培养料的微生物培养温度

Table 3 Culture temperatures of microbes from samples of *Agaricus bisporus* compost collected during fermentation

菌种	样品编号					
	f <sub>0</sub>	f <sub>1</sub>	f <sub>2</sub>	f <sub>3</sub>	f <sub>4</sub>	f <sub>5</sub>
细菌	37	50	50	50	50	50
霉菌	28	50	50	50	50	50
放线菌	28	50	50	50	50	50

#### 1.5.2 霉菌及放线菌总数测定

参照 GB/T 13092 — 1991 《饲料中霉菌的检验方法》进行测定。霉菌选择10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 这3个稀释度涂布于PDA培养基平皿, 放线菌选择10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 这3个稀释度涂布于高氏一号培养基平皿, 霉菌和放线菌的培养温度见表3。

### 1.5.3 培养基的物理感官特征评定

每次取样时,记录培养基的气味、颜色及韧度。其中气味分为酸味、氨味、霉味及发酵香味4种,强度分为强、中、弱;颜色有棕黄、棕黑、青、白4种;韧性以秸秆能够承受的最大拉力大小判断,分为强、中、弱;蜡质去除率以秸秆表面能够直接被手捻掉的蜡质面积占总面积的比值计算。

### 1.5.4 含水量测定

参照 GB/T 6435—2006《饲料中水分和其他挥发性物质含量的测定》进行测定。按四分法取样品5.00g,置于95~105℃干燥箱中,瓶盖斜放于瓶边,加热(4±0.1)h,取出盖好,放在干燥器中冷却0.5h,称其质量。

$$\text{含水量}/\% = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100$$

式中: $m_1$ 为称样皿和样品的质量; $m_2$ 为称样皿和样品干燥后的质量; $m$ 为样品的质量。

### 1.5.5 pH值测定

参照王旭明等<sup>[10]</sup>的方法测定。准确称取样品10.00g,加入100mL重蒸水中,充分混匀后静置15min,过滤后测滤液的pH值。

### 1.5.6 硝态氮含量测定

参照 GB/T 5009.33—2003《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》进行测定。采用盐酸萘乙二胺法测定样品中亚硝酸盐的质量,采用隔柱法测定样品中硝酸盐的质量,亚硝酸盐与硝酸盐的质量和即为培养料中硝态氮的质量,计算培养料干质量中的硝态氮质量。

### 1.5.7 数据分析

每组测定做3个平行,结果以平均值±标准差表示。采用SPSS统计软件(SPSS 13.0)对测定数据进行方差分析(ANOVA)与多重比较分析,组间比较采用 $t$ 检验,并用Excel软件对数据进行制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 双孢菇培养基中微生物的变化

双孢菇培养基在工厂化制备过程中,即二次发酵期间细菌、霉菌及放线菌的数量变化如图1所示。

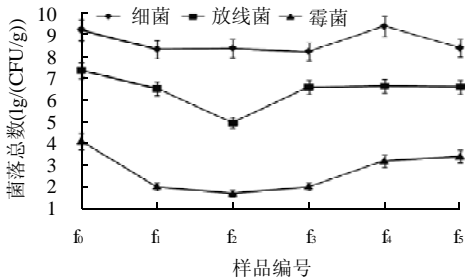


图1 发酵期间培养基中微生物数量的变化  
Fig.1 Changes in microbial numbers during fermentation of Agaricus bisporus compost

由图1可见,细菌的数量最多,达到 $10^8$ 数量级之上;其次是放线菌,达到 $10^5 \sim 10^6$ 数量级;霉菌的数量最少,为 $10^2 \sim 10^3$ 数量级。当原料浴湿混匀后( $f_0$ ),微生物的数量最多,细菌总数为 $1.45 \times 10^9$ CFU/g,放线菌总数为 $2.09 \times 10^7$ CFU/g,霉菌总数为 $1.20 \times 10^4$ CFU/g。进入前发酵阶段后培养料的温度上升至70~80℃,微生物数量下降,嗜热微生物开始繁殖,其中细菌总数的下降程度最小,在第3次倒料时( $f_3$ )为 $1.50 \times 10^8$ CFU/g;放线菌总数在第2次倒料时( $f_2$ )下降最多,为 $8.50 \times 10^4$ CFU/g,随后在第3次倒料时又增加到 $3.60 \times 10^6$ CFU/g;霉菌总数在第2次倒料时下降为50CFU/g,在第3次倒料时又增加到100CFU/g。二次发酵期间( $f_1 \sim f_5$ )的微生物都是在50℃的高温下培养的,为嗜热微生物。第4次倒料( $f_4$ )时嗜热细菌、放线菌及霉菌的数量都有所上升,分别为 $2.10 \times 10^9$ 、 $4.00 \times 10^6$ CFU/g和 $1.50 \times 10^3$ CFU/g。而经过后发酵的巴氏杀菌过程,嗜热的细菌和霉菌数量有所下降,分别变为 $2.20 \times 10^8$ CFU/g和 $3.70 \times 10^6$ CFU/g;而嗜热霉菌的数量有所上升,为 $2.40 \times 10^3$ CFU/g。

### 2.2 培养基的物理感官特征变化

双孢菇的培养料在二次发酵期间物理感官特征的变化如表4所示。结果表明,在前发酵期间的高温环境下,随着微生物对于培养基中物质的分解及培养基自身物质的高温化学反应,使得酸味逐渐减小,氨味先增加后减少,当前发酵结束时( $f_4$ )培养基中无酸味和氨味并

表4 发酵期间培养基的物理感官特征变化

Table 4 Changes in physical and sensory characteristics during fermentation of Agaricus bisporus compost

样品编号	物理感官指标			
	气味	颜色	韧性	蜡质去除率/%
f <sub>0</sub>	酸、氨味强	大部分为棕黄色,少量棕黑色夹白色,极少量青色	韧性强	0
f <sub>1</sub>	酸味中,氨味强	大部分棕黄色,少量棕黑色带白色,极少量青色	韧性强	0
f <sub>2</sub>	无酸味,氨味中	大部分棕黑色,夹杂部分白色	韧性强	20
f <sub>3</sub>	无酸、氨味,发酵香味弱	大部分棕黑色,夹杂部分白色	韧性中	30
f <sub>4</sub>	发酵香味中,霉味中	少部分棕黑色,大部分白色	韧性弱	60

产生了发酵的香味,后发酵结束时( $f_5$ )一些嗜热霉菌的生长使得培养基的霉味增加。培养基的颜色由黄色逐渐地变为棕黑色,并且随着放线菌的生长使得培养基中白色的面积增加,后发酵结束后培养基中白色占总面积的60%。随着发酵的进行培养基中秸秆的纤维被分解,能够承受的拉力逐渐减小,并且蜡质易去除率增加,到后发酵结束时达到60%,此时的麦秸纤维手捻可散。

### 2.3 培养基的化学成分变化

双孢菇培养料在二次发酵期间的含水量、pH值及硝态氮含量的变化如表5所示。

表5 发酵期间培养基化学成分变化  
Table 5 Changes in chemical characteristics during fermentation of *Agaricus bisporus* compost

项目	样品编号					
	$f_0$	$f_1$	$f_2$	$f_3$	$f_4$	$f_5$
含水量/%	76.8±0.3	71.8±0.1	72.7±0.3	70.9±0.3	67.3±0.6	64.8±0.5
pH	7.11±0.09	7.08±0.07	7.03±0.15	7.68±0.10	7.40±0.17	7.76±0.14
硝态氮/(mg/kg)	35.62±0.12	15.31±0.11	9.63±0.18	4.23±0.11	18.77±0.17	14.41±0.08

由表5可见,在二次发酵过程中,含水量呈减少趋势,由开始的76.8%显著减少至64.8%( $P \leq 0.05$ )。在前发酵期间,培养料为碱性,pH值先呈下降趋势,由7.11降为7.03,但差异不显著( $P > 0.05$ ),第3次倒料时上升为7.68,与 $f_0$ 差异显著( $P \leq 0.05$ ),前发酵结束时( $f_4$ )又降为7.40,后发酵结束时又增为7.76。硝态氮含量先由原料浴湿后的35.62mg/kg显著降低至第3次倒料时的4.23mg/kg( $P \leq 0.05$ ),然后在第4次倒料时增加为18.77mg/kg,与 $f_0$ 差异显著( $P \leq 0.05$ ),后发酵结束时为14.41mg/kg。

## 3 讨 论

工厂化制备双孢菇培养基是一个非人工加热而自产热灭菌的二次发酵过程,通过嗜热微生物的生长代谢和群落交替作用结合人工对于温度的控制将培养基中的成分转化为利于蘑菇吸收、利用的基质<sup>[4]</sup>。前发酵过程中一些中温性的微生物生长,利用原料中较为简单的有机质,产生热量,料温迅速上升,使得细菌、放线菌和霉菌的数量都有所降低,同时产生了有机酸使得培养料的pH值随之下降并且有酸味。随着料温的继续升

高,嗜热微生物开始大量繁殖,因此细菌、放线菌和霉菌的数量在第2次倒料后,开始呈上升趋势,同时培养基中氨气使得培养基的pH值开始升高并且培养料开始有刺鼻的氨味。另外由于微生物的降解作用,使培养基中的硝态氮含量减少。同时,在高温环境下,培养料中的碳水化合物发生焦糖化反应使得培养基的颜色由黄色变为棕黑色,并且随着嗜热放线菌的大量繁殖,培养基中呈白色的面积增加。

经过后发酵的巴氏杀菌过程,细菌和放线菌的数量减少,霉菌的耐热性较强,霉菌数量增加,因此培养基有霉味。由于高温下水分的挥发,培养基的水分含量一直呈下降趋势。细菌和真菌能够降解木质素<sup>[11]</sup>,因此经过二次发酵后培养料中的秸秆用手捻即可散开。由于培养基中的氨化物被嗜热放线菌固定,最终以富含氮的木质素-腐殖质复合体的形式存在<sup>[12]</sup>,因此后发酵结束时硝态氮的含量较前发酵期间显著增加。

### 参考文献:

- [1] 杨新美. 中国食用菌栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 1988: 247.
- [2] BEYER D M. Basic procedures for *Agaricus* mushroom growing[M]. Philadelphia, Penn State: College of Agricultural Sciences Research, 2003: 5-7.
- [3] 严泽湘, 刘建先. 蘑菇堆肥发酵新技术[J]. 农村经济与科技, 2001, 12(4): 35-37.
- [4] 何丽鸿. 双孢蘑菇培养料二次发酵过程中的细菌群落结构研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [5] STROM P F. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting[J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 50(4): 899-905.
- [6] CHANG Y, HUDSON H J. The fungus of wheat straw compost, II. Biochemical and physiological studies[J]. Trans Br Mycol Soc, 1967, 50(4): 667-677.
- [7] 姜成, 王泽生. 蘑菇培养料堆制过程中微生物的演替及作用[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(1): 56-58.
- [8] de FEIJTER J, van NIEUWENHUIZEN B. Small-scale mushroom cultivation-2: *Agaricus* and *Volvariella*[M]. Wageningen, the Netherlands: Digigrafi, 2007: 38-41.
- [9] 孔祥君, 王泽生. 中国蘑菇生产[M]. 北京: 农业出版社, 2000: 140-165.
- [10] 王旭明, 倪永珍, 李维炯, 等. 有效微生物群(EM)对饲料pH值及营养价值的影响[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2002, 28(4): 431-434.
- [11] 曾光明, 黄国和, 袁兴中, 等. 堆肥环境生物与控制[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 109-111.
- [12] CHANG S T, QUIMIO T H. Tropical mushrooms: biological nature and cultivation methods[M]. Hongkong: The Chinese University of Hongkong Press, 1982: 5-8.