

doi:10.11937/bfyy.20224215

裂褶菌的鉴定及液体发酵技术优化

鲁丽颖, 刘 峥, 申东晨, 刘思远, 徐 恒, 董爱荣

(东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:以采集到的裂褶菌标本为试材,采用正交实验和响应面优化试验,研究了裂褶菌液体发酵工艺,以期获得适于工厂化生产的液体发酵工艺技术。结果表明:该菌 PCR 产物长度为 615 bp,结合 ITS 序列比对确定该菌株为裂褶菌(*Schizophyllum commune*);以得到的菌种为研究对象进行液体发酵试验,以菌丝干质量为标准,通过正交实验确定了裂褶菌液体菌种发酵的最优培养基配方为可溶性淀粉 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,牛肉膏 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MgSO_4 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 自然;通过单因素筛选、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 试验得出最佳培养条件为温度 $26 \text{ }^\circ\text{C}$,装液量 109 mL,初始 pH 6.3。结合正交实验和响应面优化试验后,培养的菌丝球密度大、大小适宜、活力强,适合作为菌种进行工厂化栽培。

关键词:裂褶菌鉴定;液体菌种;培养基优化;发酵条件优化

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2023)12-0106-10

裂褶菌(*Schizophyllum commune*),别名白参、鸡毛菌、树花,是担子菌纲(Basidiomycetes)、伞菌目(Agriales)、裂褶菌科(Schizophyllaceae)、裂褶菌属(*Schizophyllum*)的一种珍稀食药两用菌,常见于热带、亚热带地区针、阔叶树的枯枝腐木上,我国多个省份均有分布^[1-3]。裂褶菌不仅味道鲜美,还具有多种营养成分,其子实体含有的多糖和酶类物质被广泛应用于医疗、美容、工业制造、食品加工等多个行业^[4-5]。但野生裂褶菌数量较少,供应难以得到保障^[6],人工栽培裂褶菌还未达到工厂化要求,因此裂褶菌的资源需求问题是目前急需解决的主要问题。

液体菌种具有生长周期短、成本低、工艺简单等多种优势,比固体菌种更加适合机械化、自动化

的工厂生产^[7]。液体发酵技术在食用菌领域的出现是由美国 Humfeid 以蘑菇进行液体发酵研究开始的^[8],我国最早进行该技术研究是 1960 年陈美聿对香菇液体发酵技术的探究^[9]。随后,液体发酵技术在食用菌领域大规模展开,目前液体菌种已应用于金针菇、杏鲍菇、黑木耳等食用菌的生产上^[10-11],但关于裂褶菌的液体发酵工艺国内报道较少。该研究以在东北林业大学林业示范中心水曲柳的枯木枝上采摘的一株野生裂褶菌标本为研究对象,进行了菌种的分离、纯化和鉴定,结合正交实验和响应面优化试验,确定了裂褶菌液体发酵工艺的最佳条件,为裂褶菌的进一步开发利用提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料

2021 年 9 月于东北林业大学林业示范中心在水曲柳枯枝上采集到子实体标本,放入标本盒内带回实验室。

第一作者简介:鲁丽颖(1998-),女,硕士研究生,研究方向为森林病理。E-mail:luliying_alu@163.com.

责任作者:董爱荣(1971-),男,博士,副教授,现主要从事森林病理等研究工作。E-mail:darlmy@tom.com.

基金项目:中央高校资助项目(2572020DR09)。

收稿日期:2022-10-17

1.1.2 供试药品与仪器

供试药品:葡萄糖、乳糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉、硫酸铵、硝酸钾、硝酸钠、氯化铵、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 (天津市永大化学试剂有限公司),琼脂 (PROMISE BIOCHEMICA),蛋白胨、牛肉膏、酵母膏 (北京奥博星生物技术有限责任公司)。

供试仪器:G1000 基因扩增仪 (上海博日科技有限公司),ZPQ-400 智能气候培养箱 (哈尔滨东拓科技开发有限公司),ZQZY-75BN 振荡培养箱 (上海智楚仪器有限公司),SW-CJ-1D 超净工作台 (江苏苏洁净化设备厂),DHG-9140A 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

1.1.3 供试培养基

PDA 及斜面培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 17~20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然。

液体基础培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 5 g, KH_2PO_4 2 g, MgSO_4 1 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的分离与纯化

采用组织分离法,在超净工作台内先用 75% 酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 5 次,用剪刀将子实体剪成 5 mm 内的组织块,用接种针接种在 PDA 平板上并封口,放入 25 °C 恒温培养箱黑暗培养,每天观察菌落生长情况。当菌落生长至 1 cm 左右时,将无污染的菌丝转接到试管,长满斜面后放入 4 °C 冰箱保存。

1.2.2 菌种的鉴定

根据子实体、菌丝生长形态等进行形态学初步鉴定。对菌丝体进行 PCR 扩增,取 5 μL PCR 扩增产物进行凝胶糖电泳检测,并将扩增产物交由上海生物工程技术公司进行测序。测序得到的 rDNA-ITS 序列在 NCBI 上用 BLAST 进行核酸序列同源性比对。结合形态学和分子生物学鉴定确定菌种的分类学地位。

1.2.3 菌种活化及母液制备

将保存于 4 °C 冰箱的菌种转接至 PDA 平板中,25 °C 活化 10 d。用 5 mm 打孔器在长满菌丝的平板最外缘打孔,挑取 3 块菌饼接种到装液量 100 mL 的 250 mL 锥形瓶中,25、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 5 d。

1.2.4 液体发酵培养基优化单因素试验

碳源及浓度筛选:分别以葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉代替液体基础培养基中的葡萄糖筛选最佳碳源,在此基础上设置 15、20、25、30、35、40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度。

氮源及浓度筛选:分别以蛋白胨、硫酸铵、硝酸钾、酵母膏、硝酸钠、氯化铵、牛肉膏代替液体基础培养基中的氮源筛选最佳氮源,在此基础上设置 2、4、6、8、10、12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度。

无机盐浓度筛选:分别设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度的 KH_2PO_4 和 MgSO_4 代替基础培养基中的无机盐。

以上试验均以 25、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养 5 d 后的菌丝干质量为标准,每处理 3 次重复。

1.2.5 正交实验

以单因素试验中筛选出的最佳碳源、氮源、 KH_2PO_4 及 MgSO_4 作为因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验,每处理 3 次重复,25、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养 5 d,测定菌丝干质量并取平均值,确定最优液体培养基配方。实验因素与水平见表 1。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素 Factor			
	A 可溶性淀粉	B 牛肉膏	C 磷酸二氢钾	D 硫酸镁
Level 1	20	7.0	0.25	0.25
2	25	8.0	0.50	0.50
3	30	9.0	0.75	0.75

1.2.6 发酵条件单因素试验

以 1.2.5 优化的液体培养基为基础,筛选温度 (21、23、25、27、29 °C)、装液量 (60、80、100、120、140 mL)、接种量 (2.5%、5.0%、7.5%、10.0%、12.5%)、转速 (110、130、150、170、190 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 及初始 pH (3、4、5、6、7、8、9) 5 个发酵条件。

基础发酵条件:温度 25 °C,转速 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,培养周期 5 d,以菌丝干质量为标准,每处理 3 次重复,取平均值。

1.2.7 Plackett-Burman 试验设计

在单因素试验基础上,设计 $N=12$ 的 Plackett-Burman 试验,对温度、装液量、接种量、转速、初始 pH 5 个因素取高 (1)、低 (-1) 2 个水平,设计 Plackett-Burman 试验,每处理 3 次重复,以菌丝干质量为标准,试验设计见表 2。

表2 Plackett-Burman 试验因素与水平

Table 2 Factors and levels of Plackett-Burman test

水平 Level	因素 Factor				
	A 温度 /°C	B 装液量 /mL	C 接种量 /%	D 转速 /(r·min ⁻¹)	E 初始 pH
-1	23	100	5	130	5
1	27	140	10	170	7

1.2.8 最陡爬坡试验

根据 PB 试验结果及效应大小筛选显著因素,设计最陡爬坡试验,使结果逼近最佳响应区域。

1.2.9 Box-Behnken 试验

以 Plackett-Burman 试验和最陡爬坡试验的结果来确定显著因素和水平,设计 Box-Behnken 试验,以菌丝干质量为响应值,Box-Behnken 试验设计因素及水平见表 3。

表3 Box-Behnken 试验因素与水平

Table 3 Factors and levels of Box-Behnken experiments design

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
温度 Temperature/°C	23	25	27
装液量 Liquid volume/mL	100	110	120
初始 pH Initial pH	6	6.5	7

1.2.10 菌丝干质量的测定

用纱布过滤菌丝球,蒸馏水冲洗 3~5 次,在 60 °C 烘箱中烘干至恒质量,分析天平称其质量,取平均值。

1.3 数据分析

利用 SPSS 20.0 软件进行正交实验设计和数据分析,采用 Design-Expert 10 软件进行响应面设计和方差分析,运用 Excel 2007 软件进行数据分析和制图。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定结果

2.1.1 形态学鉴定

由图 1 可知,采集到的野生裂褶菌子实体标本呈灰白色,扇形,无柄,肉薄,边缘微卷且伴有掌状开裂,菌褶从基部辐射状生长。菌落在 PDA 平板上为白色蓬松绒毛状,从中心向四周生长,气生菌丝多,生长速度快 10 d 左右即可长满平板,在显微镜下可以观察到明显的闭锁联合结构^[12],结合这些特征初步判断为裂褶菌(*Schizophyllum commune*)。



图1 裂褶菌子实体形态和菌落形态

Fig 1 Diagram of fruiting body morphology and colony morphology of *Schizophyllum commune*

2.1.2 分子生物学鉴定

PCR 扩增产物经电泳检测,可以清晰地看到基因组条带的长度在 500~750 bp。测序的 rDNA 长度为 615 bp,在 NCBI 上将测序结果进行 BLAST 同源性比对,发现与 *Schizophyllum commune* MN218205.1、MN856363.1 和 KU845337.1 的同源性达 99%。将序列下载用 MEGA 7.0.26 软件构建 ITS 序列的系统发育树。由图 2 可知,采集的目标菌种 A 与 *Schizophyllum commune* KU845337.1 在同一分支上,

亲缘关系最近,相似 100%,由此可以确定目标菌种 A 为裂褶菌(*Schizophyllum commune* Franch.)。

2.2 液体发酵培养基优化试验结果

2.2.1 碳源种类和浓度对菌丝干质量的影响

由图 3 可知,不同碳源种类和浓度对菌丝干质量有明显差距,可溶性淀粉对菌丝生长具有显著优势,菌丝干质量最大为 $0.426 \text{ g} \cdot (100\text{mL})^{-1}$;随可溶性淀粉浓度的增加菌丝干质量呈现先上升后下降的趋势,当浓度为 $2.50 \text{ g} \cdot (100\text{mL})^{-1}$ 时,菌丝干质量达到最大为 $0.556 \text{ g} \cdot (100\text{mL})^{-1}$ 。

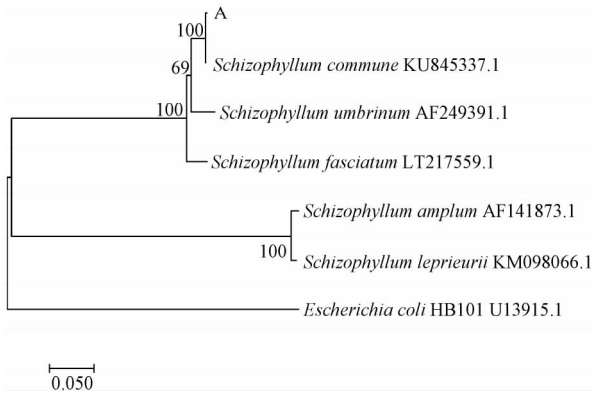


图 2 裂褶菌 ITS-rDNA 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ITS-rDNA of *Schizophyllum commune*

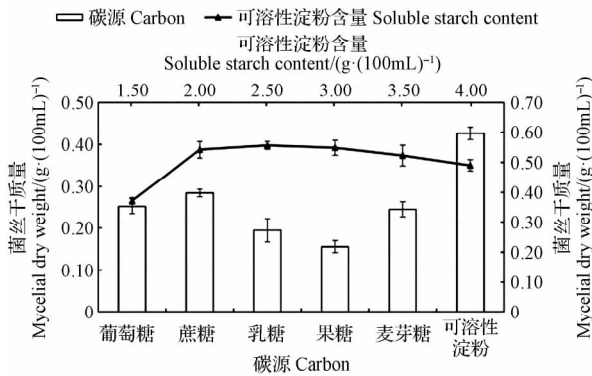


图 3 碳源种类及浓度

Fig. 3 Types and concentrations of carbon sources

2.2.2 氮源种类和浓度对菌丝干质量的影响

由图 4 可知,裂褶菌菌丝对有机氮源的利用率高于无机氮源,其中对牛肉膏的利用效果最高,菌丝干质量为 0.216 g · (100mL)⁻¹;当

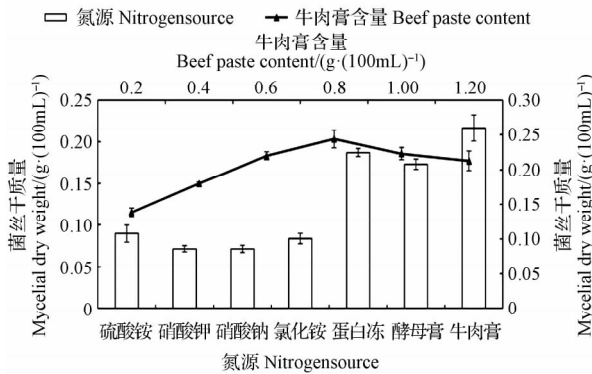


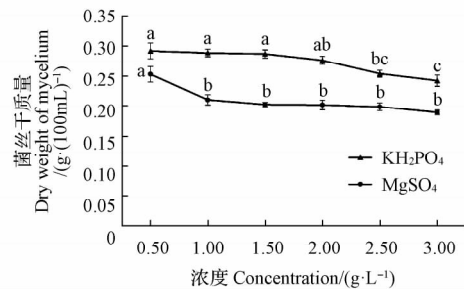
图 4 氮源种类及浓度

Fig. 4 Types and concentrations of nitrogen sources

牛肉膏浓度为 0.8 g · (100mL)⁻¹时,菌丝干质量最大为 0.244 g · (100mL)⁻¹。

2.2.3 KH₂PO₄ 和 MgSO₄ 浓度对菌丝干质量的影响

由图 5 可知,菌丝干质量随 KH₂PO₄ 和 MgSO₄ 浓度的增加均呈下降趋势,菌丝干质量最大值均出现在 0.50 g · L⁻¹ 浓度时,菌丝干质量分别为 0.292 g · (100mL)⁻¹ 和 0.253 g · (100mL)⁻¹。因此确定 KH₂PO₄ 和 MgSO₄ 的最佳浓度均为 0.50 g · L⁻¹。



注:不同小写字母代表差异显著(P<0.05)。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference (P<0.05).

图 5 KH₂PO₄ 和 MgSO₄ 浓度对菌丝干质量的影响

Fig. 5 Effects of concentrations of KH₂PO₄ and MgSO₄ on dry weight of mycelium

2.2.4 正交实验结果及分析

由表 4~5 可知,正交实验中表现最好的为方案 5,对方差进行分析,发现 A、B、C、D 因素 k 值最大分别为 k₃、k₂、k₃、k₁,所以最佳配方为:可溶性淀粉 30 g · L⁻¹,牛肉膏 8 g · L⁻¹,KH₂PO₄ 0.75 g · L⁻¹,MgSO₄ 0.25 g · L⁻¹。经验证,在该配方下培养后菌丝干质量为 0.556 g · (100mL)⁻¹ 优于组内最优结果 0.539 g · (100mL)⁻¹。

2.3 响应面优化结果及分析

2.3.1 单因素试验对菌丝干质量的影响

由图 6 可知,当温度为 25 °C,装液量 120 mL,接种量 7.5%,转速 150 r · min⁻¹,初始 pH 为 6 时,菌丝干质量分别达到最大值 0.578、0.568、0.501、0.535 g · (100mL)⁻¹ 和 0.553 g · (100mL)⁻¹。

2.3.2 Plackett-Burman 试验结果及分析

通过 Design-Expert10 软件对表 6 试验进行方差分析,得到回归模型 Y = 0.45 + 0.077 A +

0.032B+0.015C+0.015D-0.049E。由表7可知,该模型 $P=0.0035 < 0.01$, $R^2=9.160$,说明该模型是显著的,拟合较好。5个因素中,温度和

初始 pH 的 $P < 0.01$,是极显著的,装液量的 $P < 0.05$,是显著的,因此后续的最陡爬坡试验和响应面优化试验以这3个因素为研究对象,且温度和

表4 液体培养基正交实验优化结果

Table 4 Optimum orthogonal experimental scheme and result of the liquid medium

试验编号 Test number	A 可溶性淀粉 Soluble starch /(g·L ⁻¹)	B 牛肉膏 Beef pastt /(g·L ⁻¹)	C 磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄ /(g·L ⁻¹)	D 硫酸镁 MgSO ₄ /(g·L ⁻¹)	菌丝干质量 Mycelial dry weight /(g·(100mL) ⁻¹)
1	1(20)	1(7.0)	1(0.25)	1(0.25)	0.304
2	1	2(8.0)	2(0.50)	2(0.50)	0.296
3	1	3(9.0)	3(0.75)	3(0.75)	0.248
4	2(25)	1	2	3	0.320
5	2	2	3	1	0.539
6	2	3	1	2	0.457
7	3(30)	1	3	2	0.498
8	3	2	1	3	0.512
9	3	3	2	1	0.412
	k1	0.847	1.122	1.273	1.256
菌丝干质量 Mycelial dry weight/(g·(100mL) ⁻¹)	k2	1.316	1.347	1.028	1.250
	k3	1.422	1.117	1.285	1.079
	R	0.575	0.230	0.257	0.177
最优配方 Optimal formula			A3B2C3D1		

表5 正交实验方差分析结果

Table 5 Analysis of variance analysis in orthogonal test

源 Source	Ⅲ型平方和 Type III sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Significant
修正模型 Correction model	0.284a	8	0.035	13.081	**
可溶性淀粉 Soluble starch	0.187	2	0.094	34.487	**
牛肉膏 Beef paste	0.034	2	0.017	6.355	*
磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄	0.042	2	0.021	7.760	**
硫酸镁 MgSO ₄	0.020	2	0.010	3.722	*
误差 Error	0.049	18	0.003		
总计 Total	4.618	27			
修正后总计 Total after correction	0.333	26			
	$R^2=0.853$			$R_{adj}^2=0.788$	

注:**表示差异极显著($P < 0.01$);*表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note:** means extremely significant difference ($P < 0.01$);* means significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

表6 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 6 Design and results of Plackett-burman test

编号 Number	A 温度 Temperature /°C	B 装液量 Liquid volume/mL	C 接种量 Inoculum volume/%	D 转速 Rotation speed /(r·min ⁻¹)	E 初始 pH Initial pH	菌丝干质量 Mycelial dry weight /(g·(100mL) ⁻¹)
1	1(27)	1(140)	-1(3)	1(170)	1(7)	0.497
2	-1(23)	1(100)	1(5)	-1(130)	1	0.380
3	1	-1	1	1	-1(5)	0.576
4	-1	1	-1	1	1	0.329
5	-1	-1	1	-1	1	0.284
6	-1	-1	-1	1	-1	0.375
7	1	-1	-1	-1	1	0.411
8	1	1	-1	-1	-1	0.634
9	1	1	1	-1	-1	0.538
10	-1	1	1	1	-1	0.508
11	1	-1	1	1	1	0.497
12	-1	-1	-1	-1	-1	0.355

表 7 Plackett-Burman 试验方差分析

Table 7 Analysis of variance of Plackett-burman test

方差来源 Sources of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
回归模型 Regression model	0.120	5	0.024	13.09	0.003 5	**
A 温度 Temperature/℃	0.071	1	0.071	39.39	0.000 8	**
B 装液量 Liquid volume/mL	0.013	1	0.013	7.00	0.038 2	*
C 接种量 Inoculum volume/%	2.754×10^{-3}	1	2.754×10^{-3}	1.53	0.262 0	
D 转速 Rotation speed/(r·min ⁻¹)	2.698×10^{-3}	1	2.698×10^{-3}	1.50	0.266 3	
E 初始 pH Initial pH	0.029	1	0.029	16.01	0.007 1	**
Residual	0.011	6	1.797×10^{-3}			
Cor total	0.130	11				

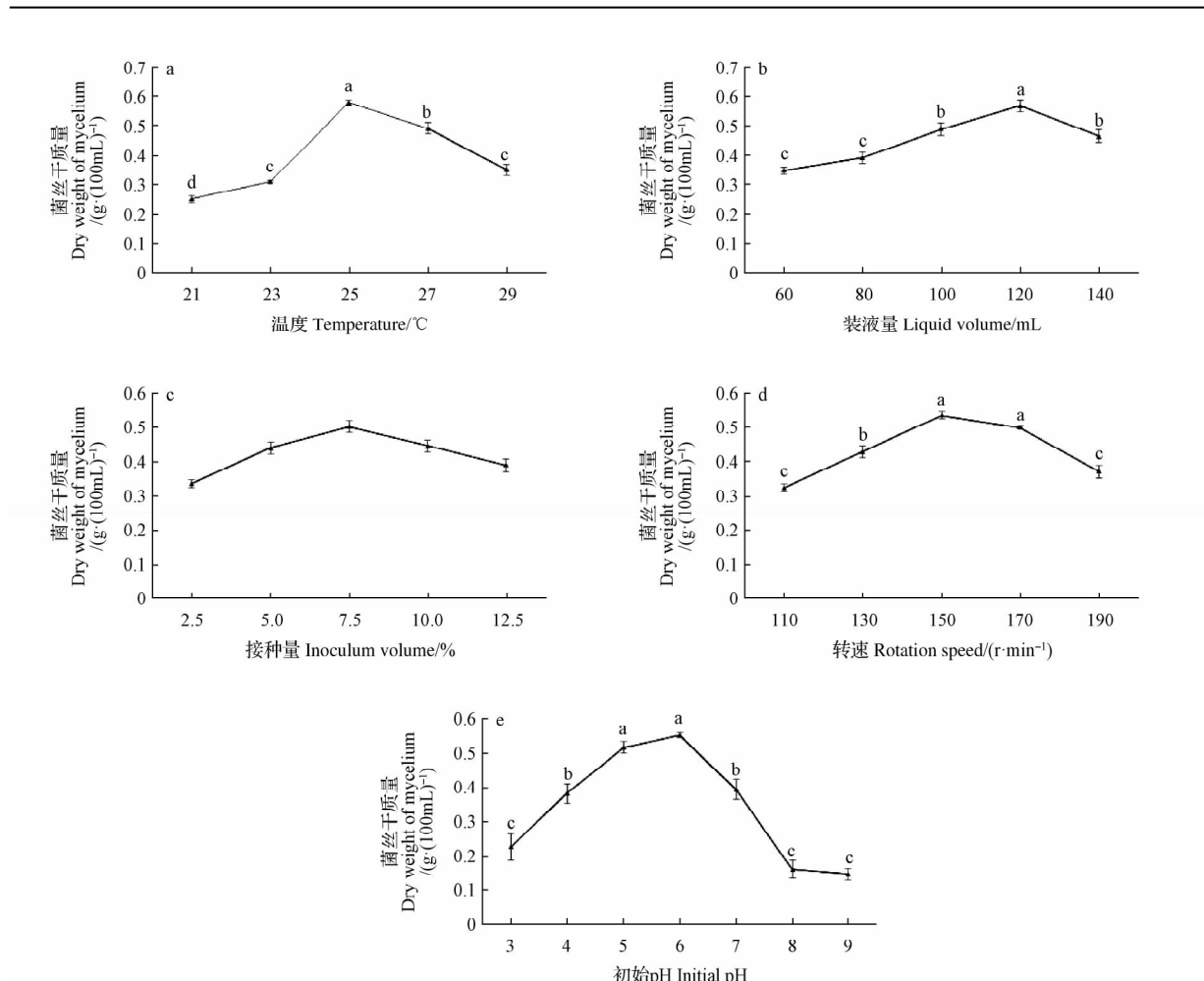
 $R^2 = 9.160$ 

图 6 温度(a)、装液量(b)、接种量(c)、转速(d)及初始 pH(e)对菌丝干质量的影响

Fig. 6 Effects of temperature (a), liquid volume (b), inoculum volume (c), rotation speed (d) and initial pH (e) on the dry weight of mycelium

装液量为正效应, 初始 pH 为负效应。

2.3.3 最陡爬坡试验

依据 PB 试验确定了对菌素干质量影响显著

的各因素方向和步长, 设计最陡爬坡试验使结果逼近最佳响应值^[13]。由表 8 可知, 菌丝干质量在试验 2 附近达到最大而后减小, 因此以试验 2 作

为中心点进行响应面优化试验。

2.3.4 Box-Behnken 试验

对表 9 的结果进行分析得到菌丝干质量关于温度、装液量和初始 pH 的回归方程:

$$Y = 0.63 + 0.049A + 0.022B - 0.061C - 0.051AB - 0.028AC + 0.027BC - 0.084A^2 - 0.051B^2 - 0.087C^2。$$

由表 10 可知, 响应面模型极显著 ($P=0.0001 < 0.01$) 具有统计学意义, 失拟项不

表 8 最陡爬坡试验设计及结果

Table 8 Design and results of steepest climbing test

编号 Number	温度 Temperature /°C	装液量 Liquid volume/mL	初始 pH Initial pH	菌丝干质量 Mycelial dry weigh /(g · (100mL) ⁻¹)
1	23	100	7	0.437
2	25	110	6.5	0.587
3	27	120	6	0.550
4	29	130	5.5	0.492
5	31	140	5	0.450

表 9 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 9 Design and result of Box-Behnken experiments

编号 Number	A 温度 Temperature/°C	B 装液量 Liquid volume/mL	C 初始 pH Initial pH	菌丝干质量 Mycelial dry weigh/(g · (100mL) ⁻¹)
1	0	0	0	0.611
2	0	1	1	0.480
3	-1	0	1	0.394
4	0	1	-1	0.576
5	-1	-1	0	0.387
6	1	1	0	0.507
7	0	0	0	0.625
8	0	-1	1	0.361
9	0	-1	-1	0.565
10	1	0	1	0.436
11	-1	1	0	0.512
12	0	0	0	0.670
13	-1	0	-1	0.434
14	1	-1	0	0.587
15	0	0	0	0.628
16	0	0	0	0.634
17	1	0	-1	0.589

表 10 Box-Behnken 试验方差分析

Table 10 Analysis of Box-Behnken test ANOVA

方差来源 Sources of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型	0.15	9	0.017	27.12	0.0001	**
A 温度 Temperature/°C	0.019	1	0.019	31.19	0.0008	**
B 装液量 Liquid volume/mL	3.809×10^{-3}	1	3.809×10^{-3}	6.19	0.0417	*
C 初始 pH Initial pH	0.030	1	0.030	49.10	0.0002	**
AB	0.011	1	0.011	17.07	0.0044	**
AC	3.158×10^{-3}	1	3.158×10^{-3}	5.13	0.0579	
BC	2.900×10^{-3}	1	2.900×10^{-3}	4.71	0.0666	
A ²	0.030	1	0.030	48.21	0.0002	**
B ²	0.011	1	0.011	18.13	0.0038	**
C ²	0.032	1	0.032	51.34	0.0002	**
Residual	4.308×10^{-3}	7	6.155×10^{-4}			
Lack of fit	2.342×10^{-3}	3	7.805×10^{-4}	1.59	0.3250	not significant
Pure error	1.967×10^{-3}	4	4.917×10^{-4}			
Cor total	0.15	16				
	$R^2 = 9.721$				C.V. (%) = 4.69	
	$R_{Adj}^2 = 9.363$				Adeq precisor = 13.532	

显著($P=0.325>0.05$); $R^2=0.9721$, $R^2_{Adj}=0.9363$, 说明该模型相关性较好, 可以解释 93.63% 情况的响应值变化; 精密度 13.532>4, 表明该模型可用于预测。各因素间有交互作用, 其中 AB、 A^2 、 B^2 、 C^2 对菌丝干质量的影响是极显著的, AC、BC 是不显著的, 且各因素对菌丝干质量的影响为 $C>A>B$ 。

2.3.5 响应曲面图分析

3D 响应面图和 2D 等高线图能够清楚地反映 2 个独立因素之间的交互作用对响应值的影响^[14]。等高线越接近椭圆, 表示 2 个因素的交互作用越明显; 等高线越接近圆形, 则代表 2 个因素之间的交互作用不明显^[15-16]。从图 7 可以看出,

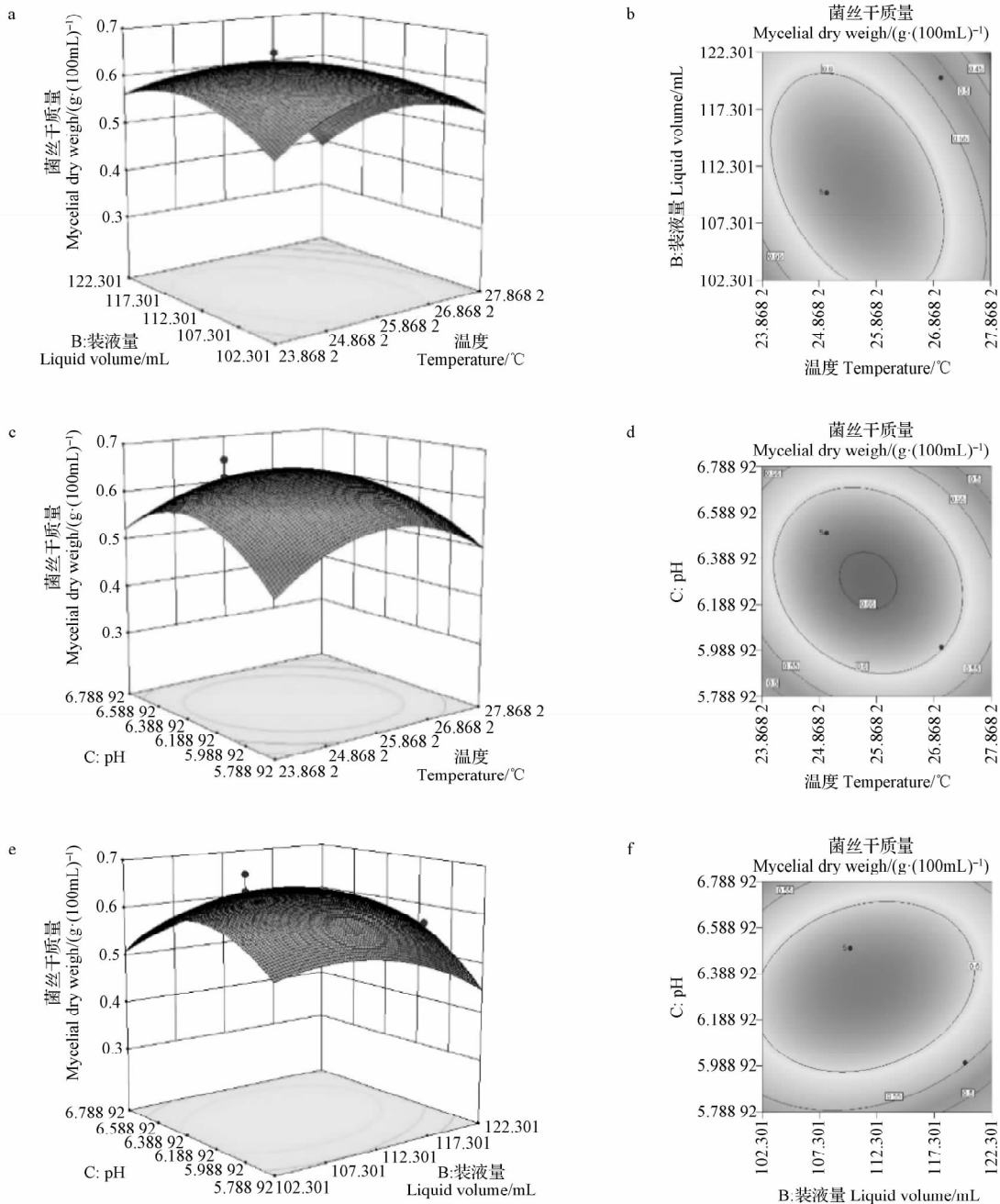


图 7 温度、装液量和初始 pH 两两因素交互作用对菌丝干质量的影响

Fig 7 Effects of pairwise interaction of temperature, liquid volume and initial pH on dry weight of mycelium

图 7a~b 的等高线呈椭圆形,曲线斜率较大,表示温度和装液量的交互作用是极显著的;图 7c~f 的等高线更接近圆形,曲线斜率较小,说明温度和初始 pH、装液量和初始 pH 的交互作用不显著,对菌丝干质量的影响较小。

2.3.6 验证试验

通过 DEXIGN-Expert 10 软件对回归方程进行求解,得到裂褶菌液体菌种最佳发酵条件为:温度 25.790 ℃,装液量 109.024 mL,初始 pH 6.283,此时预测的菌丝干质量为 $0.655 \text{ g} \cdot (100\text{mL})^{-1}$ 。为了操作方便将条件修正为:温度 26 ℃,装液量 109 mL,初始 pH 6.3,此时菌丝干质量为 $0.648 \text{ g} \cdot (100\text{mL})^{-1}$,与预测值接近,说明模型有效,该培养条件具有可行性和可操作性。

3 讨论与结论

改变液体发酵的培养基和培养条件是液体深层发酵和扩大培养来获得理想产物的一种手段,在后续的研究中均有较大优势^[17]。营养条件和环境条件均是影响食用菌生长的重要因素,国内关于裂褶菌液体菌种的研究相对较少,马布平等^[18]等优化了裂褶菌种子液培养条件,并进行扩大培养,得到的种子液可以出菇并缩短了出菇时间;周莹等^[19]通过优化裂褶菌液体培养的培养基和培养参数,使优化后的菌丝生物量提高了近 2.5 倍。液体菌种萌发点多、生长快是未来食用菌研发的趋势,因此培养出优质的种子液是进行工厂化生产的基础。

参考文献

[1] LEA T, ANNE W, GEORG S R, et al. Survival of the basidiomycete *Schizophyllum commune* in soil under hostile environmental conditions in the Chernobyl Exclusion Zone[J]. Journal of

Hazardous Materials, 2020, 403(5):124002.

[2] 牛四坤,王健,余思君,等.一株野生裂褶菌的鉴定及生物学特性探索[J].分子植物育种,2021,19(16):5435-5441.

[3] 杨珍福,刘春丽,尚陆娥,等.一株野生裂褶菌的分离鉴定和培养特性初探[J].中国食用菌,2021,40(4):8-12,22.

[4] 马琳静,方晓红,吕彦飞,等.豫西南地区裂褶菌栽培技术要点[J].食用菌,2019,41(2):60-61,70.

[5] 岳诚,马静,邱彦芳.裂褶菌生物学特性及栽培研究现状[J].食药菌,2019,27(2):117-121.

[6] 刘明广,李东林,李琳.裂褶菌杂交菌株‘阜裂 2 号’选育[J].食用菌学报,2022,29(3):19-27.

[7] 杨学英.金耳液体制种及袋料栽培技术研究[D].汉中:陕西理工大学,2021.

[8] HUMFELD H. The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture[J]. Science, 1948, 107(2780):373.

[9] 罗智文.蜜环菌培养条件优化及液体深层发酵工艺探究[D].昆明:昆明理工大学,2021.

[10] 林金盛,蒋宁,李辉平,等.工厂化袋栽杏鲍菇液体菌种制作与应用[J].山西科技,2017,32(6):143-145.

[11] 黄蓓蓓.猴头菇液体菌种发酵罐内培养条件的研究[J].中国食用菌,2020,39(1):25-28.

[12] 李方方.洋底深部裂褶菌生长特性及降解菲、荧蒽能力的研究[D].南京:南京大学,2016.

[13] 康超,郑旋,杨玲,等.响应面法优化六妹羊肚菌液体培养基配方[J].北方园艺,2022(2):111-120.

[14] 李琪,张慧,安超,等.响应面法优化苦瓜甙的提取工艺及其 HPLC 测定[J].安徽农业大学学报,2022,49(1):175-180.

[15] 许瀛引,王勇,彭卫红,等.六妹羊肚菌工厂化制备液体菌种繁育条件的优化[J].菌物学报,2019,38(6):863-874.

[16] 惠靖茹,程洋洋,黄占旺.响应面优化茶树菇发酵调味料的制曲工艺[J].中国调味品,2022,47(4):97-116.

[17] 赵瑞华,贺晓龙,田茜.羊肚菌菌丝体液体发酵及其应用的研究进展[J].食品研究与开发,2020,41(12):190-195.

[18] 马布平,李朝东,闻绍峰,等.裂褶菌液体菌种培养技术研究[J].中国食用菌,2019,38(11):17-22.

[19] 周莹,李兴红,严红,等.裂褶菌液体培养条件的初步研究[J].中国农学通报,2012,28(1):187-190.

Identification of *Schizophyllum commune* and Optimization of Liquid Fermentation Technology

LU Liying, LIU Zheng, SHEN Dongchen, LIU Siyuan, XU Heng, DONG Airong
(School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: The collected samples of *Schizophyllum commune* were used as test materials, orthogonal test and response surface optimization test were used to study the liquid fermentation technology of *Schizophyllum commune*, in order to obtain the liquid fermentation technology suitable for industrial production.

doi:10.11937/bfyy.20224093

无菌水长期保藏黑木耳菌种性状研究

焦 枋 禾, 马 银 鹏, 王 凤 利, 张 丕 奇, 戴 肖 东

(黑龙江省科学院 微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘 要:以 1994 年利用无菌水保藏的 44 株黑木耳菌种和同时期同种 4 °C 继代保藏黑木耳菌种为试材,采用生长状态测定、ISSR(inter-simple sequence repeat)、酯酶同工酶的方法,研究无菌水保藏方法对黑木耳菌种性状的影响,以期对黑木耳菌种的无菌水保藏方法优劣的判断提供参考依据。结果表明:44 株黑木耳在无菌水中常温保藏 28 年,有 36 株保持活性,复活率达到 81.8%,菌种继代培养后菌丝恢复正常生长状态,并能够正常出耳;与 4 °C 保藏菌种相比,同一菌株间酯酶同工酶和 ISSR,总体具有一致性,个别菌株具有一定的差异,不同菌株反映不同。

关键词:黑木耳;菌种保藏;ISSR 标记;酯酶同工酶

中图分类号:S 646.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2023)12-0115-07

黑木耳(*Auricularia heimuer*)具有很高的药用价值^[1],如抗肿瘤、抗凝血、抗氧化、降血脂、免疫调节、抗炎等^[2-4]。黑木耳是中国的第二大食用

菌生产品种,据中国食用菌协会统计,2020 年全国黑木耳产量达到 706 万 t,约占食用菌总产量的 18%。菌种作为黑木耳生产的“芯片”,对于产业的持续、稳定发展起到至关重要的作用。黑木耳属于分散式生产,很多生产者以自繁自育方式生产菌种,即便是大型企业也不具备液氮、超低温冰箱等菌种保藏的技术条件。由于贮存、保藏不当,黑木耳菌种容易引起活性降低、退化甚至变异、失活,对生产造成严重影响。采用简单可行的保藏方式保持生产菌种的稳定,对企业来说具有实际意义。课题组从 20 世纪 70 年代开始,采用营养液^[5]、木屑^[6]、麦粒^[7]等方法进行黑木耳菌种长期

第一作者简介:焦枋禾(1996-),女,硕士研究生,研究方向为食用菌种质资源评价。E-mail:18785086093@139.com.

责任作者:戴肖东(1972-),男,博士,研究员,现主要从事食用菌种质资源评价等研究工作。E-mail:heiweihlj@126.com.

基金项目:黑龙江省科学院科学研究基金资助项目(KY2021SW02)。

收稿日期:2022-10-09

The results showed that the length of PCR product was 615 bp, and the strain was determined as *Schizophyllum commune* by ITS sequence alignment. Liquid fermentation test was carried out with the obtained strains as the research object, and the optimal medium formula of liquid strains fermentation was determined by orthogonal test with the mycelium dry mass as the standard, soluble starch 30 g · L⁻¹, beef paste 8 g · L⁻¹, KH₂PO₄ 0.75 g · L⁻¹, MgSO₄ 0.25 g · L⁻¹, pH natural. The optimal culture conditions were obtained by single factor screening, Plackett-burman test, steepest climb test and Box-behnken test, temperature 26 °C, liquid loading 109 mL, initial pH 6.3. Combined with orthogonal test and response surface optimization test, the cultured mycelium pellets had large density, suitable size and strong vitality, which were suitable for industrial cultivation.

Keywords: Schizophylla; liquid strain; media optimization; fermentation condition optimization