

大球盖菇培养基的筛选及培养条件的优化

王旭彤, 方释慧, 邹莉, 王世新, 张国权

(东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 大球盖菇 (*Stropharia rugoso-annulata*) 具有很高的营养价值和药用价值, 但是目前对于大球盖菇培养基的筛选以及培养条件的优化研究还不够深入。本研究通过测定不同母种培养基配方下大球盖菇的菌丝生长速度、生长势以及菌落生长指数, 筛选出大球盖菇最适宜母种培养基; 测定不同液体培养基配方下大球盖菇菌丝球的生物量, 筛选出最适宜的液体培养基; 并在单因素试验的基础上, 以大球盖菇菌丝球生物量为响应值, 应用 Box-Behnken 中心组合法对大球盖菇液体菌种培养条件进行了优化。结果表明: 最适宜大球盖菇母种生长的配方为马铃薯 200 g、干稻草 150 g、蔗糖 20 g、玉米粉 10 g、蛋白胨 3 g、酵母膏 2 g、维生素 B₁ 5 mg、琼脂 20 g、水 1000 mL; 最适宜大球盖菇液体种生长的配方为蔗糖 20 g、玉米粉 30 g、稻草粉 15 g、蛋白胨 2 g、酵母膏 1 g、维生素 B₁ 5 mg、水 1000 mL (pH 自然); 液体菌种最佳培养条件为转速 140 r/min, 接种量 8%, 培养时间 12 d, 三次平行实验得到的实际的大球盖菇菌丝球生物量平均为 0.8108 g/100 mL, 与预测值 0.8282 g/100 mL 相符。

关键词: 大球盖菇; 母种培养基; 液体种培养基; 响应面法

文章编号: 1673-9078(2019)09-240-247

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.031

Screening of Culture Media and Optimization of Culture Conditions for *Stropharia rugoso-annulata*

WANG Xu-tong, FANG Shi-hui, ZOU Li, WANG Shi-xin, ZHANG Guo-quan

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: *Stropharia rugoso-annulata* has high nutritional value and medicinal value, but currently efforts on the screening of its culture medium and optimization of its culture conditions remain insufficient. In this study, the mycelial growth rate, growth potential and colony growth index of *Stropharia rugoso-annulata* were determined to screen the most suitable mother seed medium. The mycelial biomass was determined under different liquid medium formulas to screen the most suitable liquid medium for *Stropharia rugoso-annulata*. Based on the single-factor tests, the mycelial biomass of *Stropharia rugoso-annulata* was used as the response value, and the Box-Behnken and central-composite method was applied to the optimization of liquid culture conditions for *Stropharia rugoso-annulata*. The results showed that the most suitable formula of the mother seed medium for the growth of *Stropharia rugoso-annulata* was: potato 200 g, dried rice straw 150 g, sucrose 20 g, corn flour 10 g, peptone 3 g, yeast extract 2 g, vitamin B₁ 5 mg, and water 1000 mL; The most suitable formula of the liquid medium for the growth of *Stropharia rugoso-annulata* was: sucrose 20 g, corn flour 30 g, straw powder 15 g, peptone 2 g, yeast extract 1 g, vitamin B₁ 5 mg, and water 1000 mL (natural pH); The optimal culture conditions for the liquid strain were: rotation speed 140 r/min, inoculum quantity 8%, incubation time 12 d. The mean of the actual mycelial biomass values obtained from three parallel experiments was 0.8108 g/100 mL, which was in agreement with the predicted value (0.8282 g/100 mL).

Key words: *Stropharia rugoso-annulata*; seed medium; liquid medium; the Box-Behnken method

大球盖菇 (*Stropharia rugoso-annulata*), 别名皱环球盖菇、皱球盖菇、酒红大球盖菇、裴氏球盖菇、裴氏假黑伞, 属于担子菌门 (Basidiomycota), 层菌纲 (Hymenomycetes), 伞菌目 (Agaricales), 球盖菇科 (Strophariaceae), 球盖菇属 (*Stropharia*), 是一种珍

收稿日期: 2018-07-28

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (25720170F01)

作者简介: 王旭彤 (1994-), 女, 研究生在读, 研究方向: 资源微生物

通讯作者: 邹莉 (1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 资源微生物

稀的食药兼用菌^[1,2], 并且是联合国粮农组织 (FAO) 向发展中国家推荐栽培的食用菌之一^[3]。大球盖菇在自然界中分布广泛, 主要集中于亚欧等地区, 国内在西藏自治区、云南省、吉林省、四川省、陕西省、甘肃省等地^[4]。其色泽艳丽, 腿粗盖肥, 食味清香, 细腻脆嫩, 爽滑可口, 营养丰富, 干菇香味浓郁, 含有相当高的蛋白质和对人体有益的多种矿物质元素及维生素, 是倍受人们欢迎的营养食品^[5-9]。大球盖菇不仅具有很高的食用价值, 而且还具有很高的药用价值,

特别是在抗肿瘤方面具有很大的功效。据报道^[10], 该真菌多糖具有预防冠心病、助消化、缓解精神疲劳、清热解毒等功效, 而且对小白鼠 S-180 肉瘤及艾氏腹水癌的抑制率均达 70% 以上。大球盖菇还对农田废弃物如稻草、秸秆等具有很好的降解能力。

母种培养基是菌丝复壮的关键, 适宜的母种培养基可以使菌丝粗壮、抗逆性强、生长速度快, 并且可以提高液体菌种的质量^[11]。液体菌种菌丝球具有流动性, 各个菌丝球和菌丝片段可以流散在不同的部位萌发, 这样发育点多, 长满菌种瓶或袋所需的时间也就大大减少^[12], 并且液体菌种能有效避免来自农业残留物、土壤和水中污染物的积累^[13]。但是目前对于大球盖菇液体培养基及培养条件的筛选多采用单因素试验和正交试验, 这种试验方法只能对一个个孤立的试验点进行分析, 缺乏试验条件寻优过程中各个试验水平之间的交互作用对于整体水平的影响。本研究通过设置不同的接种量、转速、培养时间等因素, 利用响应面法优化液体菌种的培养条件, 以期为大球盖菇的推广提供科学依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大球盖菇 (*Stropharia rugoso-annulata*) 菌种取自东北林业大学森林保护学科实验室保藏菌种^[13]。

1.2 供试培养基

1.2.1 活化培养基制备

PDA 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、加水至 1000 mL、pH 自然。

PD 培养基: PDA 中去除琼脂。

将马铃薯去皮并切成小丁或者条状放入锅中煮沸 20~30 min (马铃薯熟而不烂)。用 3~5 层纱布过滤, 滤液中再加入其它配料煮沸至溶解, 加水定容至 1000 mL^[14]。

将 PDA 培养基分装到试管中, PD 培养基分装到三角瓶中, 放入高压蒸汽灭菌锅中, 在 0.105 MPa~0.125 MPa 下灭菌 20 min。PDA 培养基灭菌后摆放成的斜面培养基顶端应距试管口不少于 50 mm。

1.2.2 母种培养基制备

配方 1: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 15 g、琼脂 18 g、加水至 1000 mL、pH 自然;

配方 2: 蔗糖 20 g、玉米粉 10 g、豆饼粉 10 g、酵母膏 2 g、琼脂 20 g、加水至 1000 mL、pH 自然;

配方 3: 马铃薯 200 g、干稻草 150 g、蔗糖 20 g、

玉米粉 10 g、蛋白胨 3 g、酵母膏 2 g、维生素 B₁ 5 mg、琼脂 20 g、加水至 1000 mL、pH 自然;

配方 4: 马铃薯 200 g、麦麸 15 g、葡萄糖 20 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄ 0.5 g、琼脂 20 g、加水至 1000 mL、pH 自然;

配方 5: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、加水至 1000 mL、pH 自然。

将配方中玉米粉、马铃薯、干稻草和麦麸先放入锅中煮沸 20~30 min, 过滤后再加入其他配料煮沸、定容, 分装至三角瓶中。按照 1.2.1 的方法灭菌, 将每个配方的培养基倒入直径 90 mm 的培养皿中, 每个培养皿导入 20 mL, 冷却备用。

1.2.3 液体培养基制备

配方 A: 玉米粉 40 g、葡萄糖 20 g、麦麸 40 g、K₂HPO₄ 1.5 g、MgSO₄ 0.5 g、加水至 1000 mL、pH 自然;

配方 B: 蔗糖 20 g、玉米粉 30 g、稻草粉 (干稻草粉碎后过 2 号筛) 15 g、蛋白胨 2 g、酵母膏 1 g、维生素 B₁ 5 mg、加水至 1000 mL、pH 自然;

配方 C: 马铃薯 150 g、麦麸 50 g、红糖 7.5 g、葡萄糖 5 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄ 0.5 g、蛋白胨 2 g、维生素 A 5 mg、维生素 B₁ 2.5 mg、加水至 1000 mL、pH 自然;

配方 D: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、加水至 1000 mL、pH 自然。

按照 1.2.2 的方法制备。

1.3 方法

1.3.1 母种培养基的筛选

按照 1.2.1 和 1.2.2 配方制作培养基, 先将供试菌种接到 PDA 平板培养基和斜面培养基上活化, 17 d 左右菌丝长满平板后, 在菌落边缘用直径 5 mm 打孔器制成菌饼。将菌饼分别接种于不同的母种培养基平板中心, 25 °C 恒温培养。培养 2 d 后开始标记, 以十字画线法每日测量菌落直径至 17 d 菌丝长满平板, 并计算菌丝生长速率和菌落生长指数。

1.3.2 菌丝长势测量

菌丝生长速率 = $1/2 \times (\text{菌落直径} - \text{菌饼直径}) / (\text{菌丝生长时间})$ (mm)。

菌落生长指数 = $\text{菌落面积} (\text{mm}^2) \times \text{菌落长势评分} / 1 (\text{mm}^2)$ 。

菌落长势评分由差到好依次为 1 到 5 分: 5. 菌丝浓密; 4. 菌丝较浓密; 3. 菌丝较稀疏; 2. 菌丝稀疏; 1. 菌丝极稀疏^[15,16]。

1.3.3 液体培养基的筛选

将大球盖菇斜面菌种分割成若干个黄豆粒大小的菌块接种到 PD 培养基中,置于摇床中,转速 150 r/min, 温度 25 °C, 培养 7 d, 得到液体菌种。

按照 1.2.3 配方制作液体培养基。将培养好的液体种子转接到 4 种液体培养基中, 每种培养基设置 3 组重复。培养条件均为: 在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 液体培养基, 接种量为 6% (V/V), 转速 160 r/min, 温度 25 °C, 培养 10 d 后, 静止 2~3 h, 待菌丝球全部沉于三角瓶底部后测量其上清液高度; 再参照许峰等的方法^[17,18], 测量菌丝球的干重并计算其生物量, 筛选出最适宜液体培养基配方。

1.3.4 液体培养条件单因素试验

(1) 使用上述试验中筛选出的最适宜液体培养基配方, 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 培养基, 接种量为 8% (V/V), 分别放入转速为 120 r/min、140 r/min、160 r/min、180 r/min 的摇床中, 每个处理设置 3 组重复, 25 °C 条件下震荡培养 7 d, 培养液刚进入澄清透明, 液中悬浮大量小菌丝球的状态。观察菌丝体的外观形态和在 40 倍显微镜下的显微形态, 并测量其生物量。

(2) 在其他培养条件保持不变的情况下震荡培养 7 d, 置于上述试验最适宜转速的摇床中培养, 分别改变接种量为 6%、8%、10%、12%, 设置 3 组重复, 测量其生物量。

(3) 在其他培养条件保持不变的情况下, 采用上述试验中最适宜的接种量, 从 2 d 开始取样 (每次 3 瓶), 此后每隔两天取样至 16 d, 测定菌液 pH 值和菌丝球的生物量。

1.3.5 响应面优化试验

根据单因素试验结果, 采用对菌丝球生物量影响较大的转速 (A)、接种量 (B) 及培养时间 (C) 作为响应面法的试验因素。根据 Box-Behnken 的中心

组合试验设计原理, 考虑分析各因素之间的交互作用以及对菌丝球生物量的影响, 并对培养条件进行优化。

1.3.6 数据统计分析

实验数据采用 Excel 进行数据统计分析和作图, 采用 SPASS 20.0 进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 母种培养基的筛选

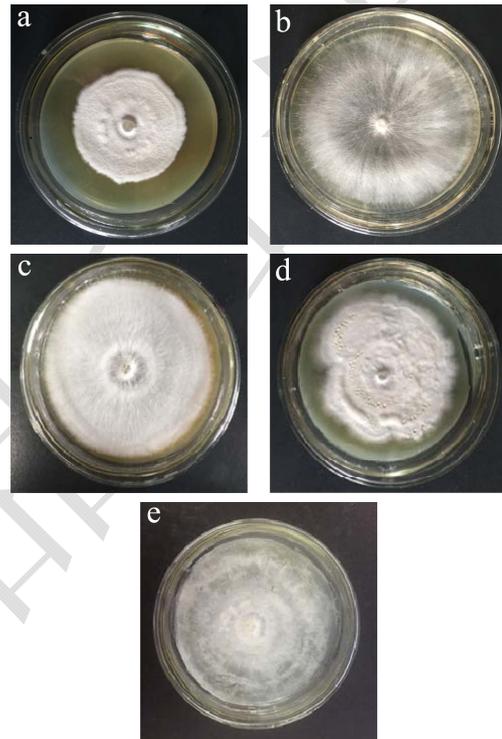


图 1 不同母种培养基对菌丝生长情况的影响

Fig.1 Effect of growth situation of mycelium on different mother seed medium

注: a: 配方 1; b: 配方 2; c: 配方 3; d: 配方 4; e: 配方 5。

表 1 不同母种培养基对菌丝生长速度与生长指数的影响

Table 1 Effect of mycelium growth rate and index on different mother seed medium

配方	菌落长势评分	菌丝生长速度/(mm/d)	菌落生长指数	满板天数/d
配方 1	2	1.83±0.07 ^{dD}	3546.12±257.78 ^{dD}	21.40±2.30 ^{cB}
配方 2	4	2.59±0.05 ^{bB}	14225.84±526.33 ^{bB}	15.40±1.67 ^{bA}
配方 3	4	2.95±0.03 ^{aA}	18425.76±385.05 ^{aA}	12.20±0.83 ^{aA}
配方 4	2	1.62±0.13 ^{eE}	2790.46±460.55 ^{eE}	24.00±3.39 ^{dC}
配方 5	3	2.19±0.08 ^{cC}	7618.93±543.94 ^{cC}	17.40±2.88 ^{bB}

注: 英文字母为不同配方间相同生长速率或菌落生长指数的差异性比较, 同列数据后标不同小写字母表示在 $p=0.05$ 水平差异显著, 同列数据后标不同大写字母表示在 $p=0.01$ 水平差异显著。

母种培养基是菌种扩繁的关键, 菌丝在母种培养基上生长速度快可以有效缩短大球盖菇的栽培期。大球盖菇菌丝在 5 种母种培养基上均能生长, 但菌丝生

长速度、菌落长势和菌落生长指数差异较大。由表 1 可以看出, 配方 3 的菌丝生长速度最快, 比配方 4 (最慢) 提高 82.10%, 并且与其他配方差异极显著; 配方

3 菌落生长指数最大, 与其它配方差异极显著, 并且满板时间最短。所以, 配方 3 是最适宜大球盖菇母种生长的培养基。

适宜的母种培养基不但可以提高菌丝生长速度, 还能使菌丝具有良好的生长情况, 有利于下一步液体菌种的生长。从菌落的形态和结构可以判断出母种培养基的优劣, 大球盖菇在 5 种不同母种培养基上菌落形状和结构差异显著。由表 2 可以看出, 配方 3 菌丝较浓密、均匀度好; 配方 2 和 5 菌丝稀疏, 均匀度较好; 配方 1 和 4 菌丝浓密, 均匀度差 (图 1)。综合考虑, 配方 3 是最适宜大球盖菇母种生长的培养基。

表 2 不同母种培养基对菌丝生长情况的影响

Table 2 Effect of growth situation of mycelium of on different mother seed medium

配方	菌丝形态	菌丝密度	菌丝均匀度	菌丝色泽
配方 1	绒毛状	+++	++	洁白色
配方 2	绒毛状	+	++	洁白色
配方 3	绒毛状	++	+++	洁白色
配方 4	绒毛状	+++	+	洁白色
配方 5	绒毛状	+	++	洁白色

注: +++表示程度高; ++表示程度较高; +表示程度低。

2.2 液体培养基的筛选

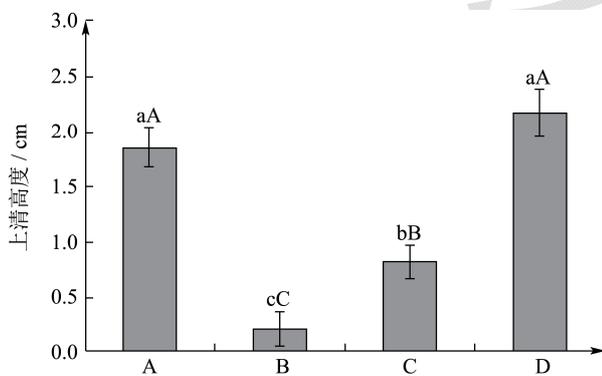


图 2 不同液体培养基对上清液高度的影响

Fig.2 Effect of height of supernate on different liquid culture medium

由于液体培养基具有流动性, 使得各个菌丝片断可以分散在培养基的不同部位萌芽, 菌种长满时间可大大减少, 并且菌丝体干重及菌丝球直径也会直接影响液体菌种的质量。当液体培养基中营养源不足时容易引起菌丝的衰老和自溶, 进而影响上清液高度和菌丝球的密度。由图 2 可以看出, 配方 B 上清液高度最低为 0.2 cm, 并且菌丝球密度最大、直径最小、分布较均匀; 配方 A 和配方 D 上清液高度明显高于配方 B, 菌丝球密度较小、菌丝球直径大, 且分布不均匀; 配方 C 菌丝球密度较大, 但是上清液高度较高 (图 3)。

由图 4 可以看出, 配方 B 菌丝球生物量最大为 0.8726 g/100 mL, 比配方 D (最小) 提高 282.89%。因此, 配方 B 菌丝球生长的液体培养基。

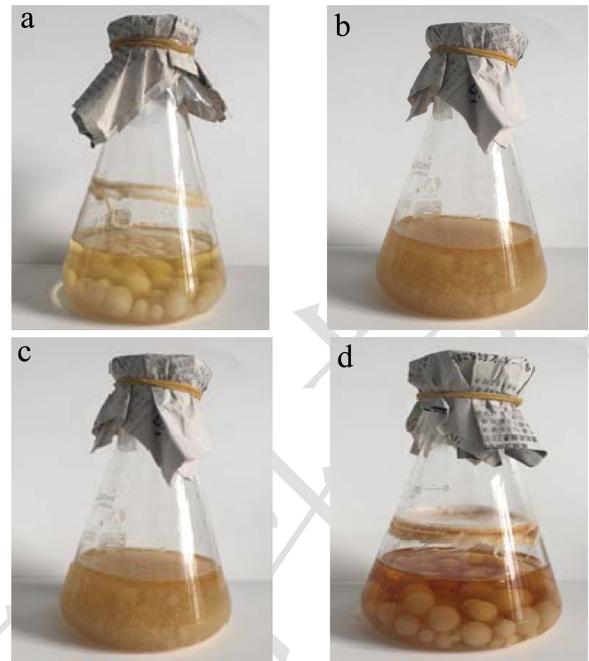


图 3 不同液体培养基对菌丝球生长状态的影响

Fig.3 Effect of growth situation of mycelium pellet on different liquid culture medium

注: a: 配方 A; b: 配方 B; c: 配方 C; d: 配方 D。

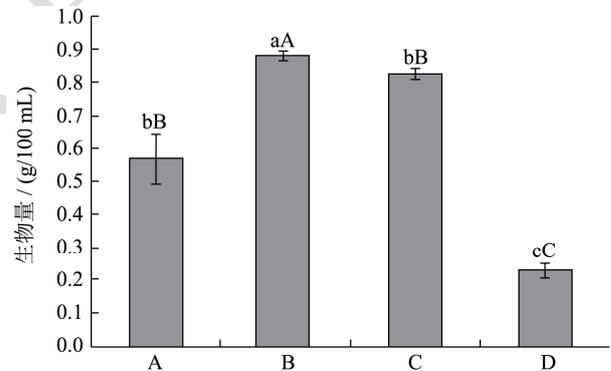


图 4 不同液体培养基对菌丝球的生物量的影响

Fig.4 Effect of mycelium biomass on different liquid culture medium

2.3 液体培养条件单因素试验

2.3.1 不同转速对菌丝球生长的影响

大球盖菇是一种好气菌, 菌丝生长需要大量的氧气, 调整转速可以影响发酵过程中的氧气含量, 进而影响菌丝球的生物量。由图 5 可以看出, 随着转速的增加, 其菌丝球的生物量也随之增加, 当转速为 140 r/min 时, 其菌丝球的生物量达到最大值为 0.667 g/100 mL; 随着转速的继续增加, 生物量趋于缓慢下降趋势, 引起这一现象的原因可能是在 140 r/min 的条件下, 培

培养基中溶氧高, 适合菌丝快速生长, 但过高的转速又会对菌丝造成机械损伤, 因此当转速为 160 r/min 时, 菌丝球生物量显著降低。综上所述, 筛选出大球盖菇菌丝球生长最适宜的转速为 140 r/min, 依此数据响应面优化试验选择的最佳转速区域为 120~160 r/min。

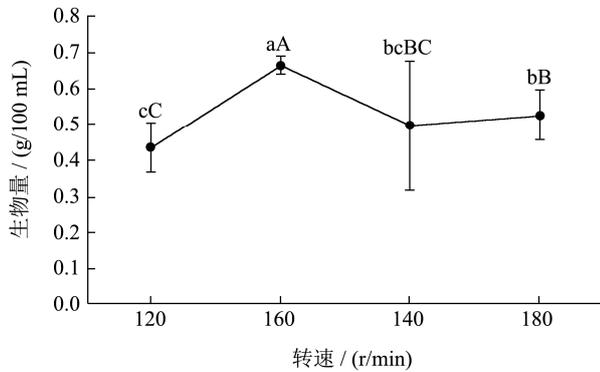


图5 不同转速对菌丝球生物量的影响

Fig.5 Effect of mycelium biomass on different speed

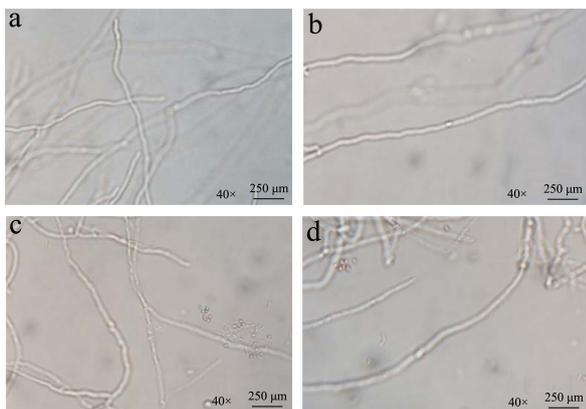


图6 不同转速菌丝显微图

Fig.6 Micrograph of mycelium on different speed

注: a: 转速 120 r/min; b: 转速 140 r/min; c: 转速 160 r/min; d: 转速 180 r/min。

对菌丝的显微观察可以进一步确定菌丝质量, 防止转速过高造成菌丝细弱, 对大球盖菇不同转速条件下的菌丝体的显微形态在 40 倍显微镜下进行观察。由图 6 可以看出转速对于大球盖菇的菌丝体微观形态并无明显的改变, 菌丝粗壮程度和浓密程度均无明显差异, 这说明这四种转速均不会对菌丝造成机械损伤, 只会影响菌丝球密度。

2.3.2 不同接种量对菌丝球生长的影响

菌种浓度过低, 往往会导致生长缓慢, 而菌种浓度过高则会引起菌体过早进入衰亡期, 导致发酵能力下降^[9]。由图 7 可以看出, 当接种量从 6% 增加到 8% 时, 菌丝球的生物量有明显的上升趋势; 接种量从 8% 增加到 12% 时, 菌丝球的生物量的增长趋于平缓。接种量为 8% 时, 生物量为 0.7875 g/100 mL; 接种量为 12% 时, 生物量为 0.7905 g/100 mL; 接种量从 8% 到

12% 菌丝球生物量只增加了 0.003 g/100 mL。考虑到成本问题, 大球盖菇菌丝球生长的最适宜的接种量为 8% (V/V)。因此, 响应面优化试验选择的最佳接种量区域为 6%~10% (V/V)。

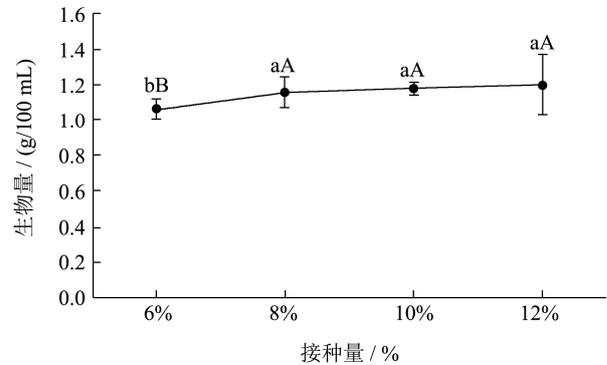


图7 不同接种量对菌丝球生物量的影响

Fig.7 Effect of mycelium biomass on different inoculation quantity

2.3.3 不同培养时间对菌丝球生长和菌液 pH 值的影响

根据不同培养时间对菌丝球生物量的影响, 以培养时间为横坐标, 以生物量为纵坐标得到典型的生长曲线。由图 8 可以看出, 大球盖菇液体菌种生长曲线为: 延缓期 0~2 d, 快速生长期 2~10 d, 稳定期 10~14 d, 14 d 之后开始衰亡期。生物量在第 12 d 时达到最大值, 之后缓慢下降。大球盖菇菌丝球生长最适宜的培养天数为 12 d, 12 d 后摇瓶内氧气和营养物质减少, 菌丝逐渐老化自溶, 生物量开始下降, 因此响应面优化试验选择的最佳培养时间区域为 10~14 d。

大球盖菇在 pH 值为 4~11 的范围内均可生长, 随着培养时间的延长菌液的 pH 值也有所变化。在 0~2 d 时 pH 值较为平缓, 在 2~6 d 时 pH 值下降, 在 6 d 后 pH 值回弹, 在 16 d 时与初始 pH 大小接近, 整个生长过程中 pH 值最低降到 4.71。

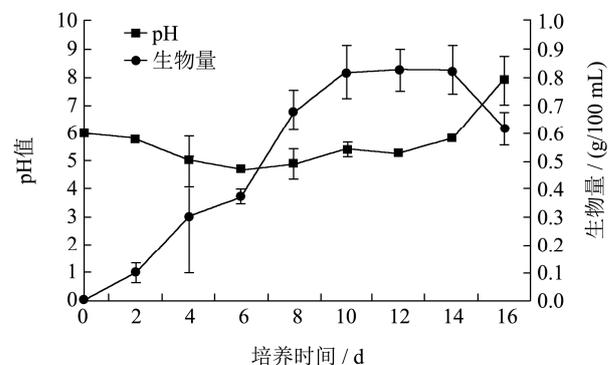


图8 不同培养时间对菌丝球生长曲线及 pH 的影响

Fig.8 Effect of growth curve and pH in different cultivation time

2.4 响应面优化试验

2.4.1 模型建立

表3 Box-Behnken 试验因素及水平设计表

Table 3 Factors and levels of response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A/(r/min)	120	140	160
B/%	6	8	10
C/d	10	12	14

表4 Box-Behnken 设计方案及结果

Table 4 Design and results of Box-Behnken

试验号	A/(r/min)	B/%	C/d	Y/(g/100 mL)
1	0 (140)	-1 (6)	-1 (10)	0.6325
2	0 (140)	1 (10)	1 (14)	0.7425
3	0 (140)	0 (8)	0 (12)	0.8386
4	-1 (120)	-1 (6)	0 (12)	0.6256
5	0 (140)	0 (8)	0 (12)	0.8135
6	-1 (120)	0 (8)	-1 (10)	0.6123
7	-1 (120)	1 (10)	0 (12)	0.6497
8	1 (160)	0 (8)	1 (14)	0.6722
9	0 (140)	0 (8)	0 (12)	0.8089
10	1 (160)	1 (10)	0 (12)	0.7016
11	1 (160)	0 (8)	-1 (10)	0.6936
12	1 (160)	-1 (6)	0 (12)	0.6305
13	-1 (120)	0 (8)	1 (14)	0.6691
14	0 (140)	-1 (6)	1 (14)	0.7263
15	0 (140)	1 (10)	-1 (10)	0.7212
16	0 (140)	0 (8)	0 (12)	0.8112
17	0 (140)	0 (8)	0 (12)	0.8478

根据前期单因素试验,以转速(A)、接种量(B)和培养时间(C)为考察因素,以大球盖菇菌丝球的生物量(Y)为响应值,根据 N=15 的 Box-Behnken 试验设计原理,设计 3 因素 3 水平响应面试验,试验因素和水平见表 3。设计试验方案及大球盖菇菌丝球的生物量试验结果如表 4 所示,共有 17 个试验点,12 个分析点,5 个零点以估计误差。

为了考察各影响因素及其交互作用对大球盖菇菌丝球的生物量影响,利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 4 中的数据进行多元回归拟合,得出大球盖菇菌丝球生物量(Y)对转速(A)、接种量(B)、培养时间(C)的二次多项回归模型方程: $Y=0.82+0.018A+0.025B+0.019C+0.012AB-0.02AC-0.018BC-0.11A^2-0.064B^2-0.054C^2$ 。

由方差分析可知(表 5),模型的 $F=35.86$ 、

$p<0.0001$,表明二次多项式模型对大球盖菇菌丝球生物量的影响显著。本试验 p 值为 $0.5012>0.05$,无失拟因素存在,因此可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。方程中 A, B, C, A^2 , B^2 , C^2 影响最为显著,表明实验因子对响应值不是简单的线性关系,二次项对响应值也有很大的关系,交互作用的影响相对较小。这和模型回归中的平方项影响显著相对应。

表5 回归方程的方差分析结果

Table 5 Regression models and variance analysis

项目	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	0.1	9	35.86	< 0.0001
A	0.0024	1	7.99	0.0255
B	0.005	1	16.05	0.0051
C	0.0028	1	9.08	0.0196
AB	5.552E-004	1	1.77	0.2250
AC	1.529E-003	1	4.9	0.0624
BC	1.314E-003	1	4.21	0.0792
A^2	0.049	1	157.47	< 0.0001
B^2	0.017	1	55.59	0.0001
C^2	0.012	1	36.69	0.0004
残差	0.0022	7		
失拟项	9.010E-004	3	0.94	0.5012
纯误差	1.282E-003	4		
总误差	0.10	16		

2.4.2 响应面交互作用分析与优化

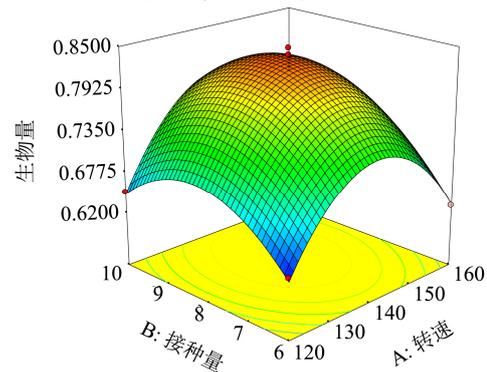


图9 转速与接种量对菌丝球生物量的交互作用影响

Fig.9 Combined effects of speed and inoculation quantity for mycelium biomass

结合 Box-Behnken 试验设计方案,利用 RSM 研究各因素对大球盖菇液体培养菌丝球的生物量的影响,做响应面图(图 9、10、11)。由 SAS 分析得到最大响应值(Y)时 A、B、C 对应的编码值分别为 $A=141.59$ r/min、 $B=8.37\%$ 、 $C=12.26$ d。与其相对应的大球盖菇液体菌种培养的最佳条件为转速 140 r/min,接种量 8%,培养时间 12 d,理论最佳大球盖菇菌丝

球生物量为 0.8282 g/100 mL。为了检验响应面法的可行性,采用得到的最佳培养条件对大球盖菇菌丝球的生物量进行验证实验。

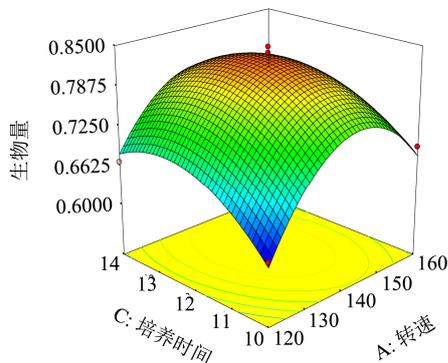


图 10 转速与培养时间对菌丝球生物量的交互作用影响

Fig.10 Combined effects of speed and cultivation time for mycelium biomass

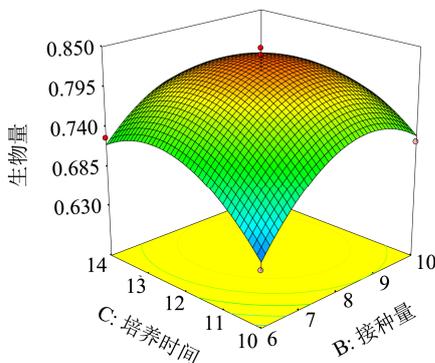


图 11 接种量与培养时间对菌丝球生物量的交互作用影响

Fig.11 Combined effects of inoculation quantity and cultivation time for mycelium biomass

按照最佳条件进行 3 次平行实验,得到的实际的大球盖菇菌丝球生物量平均为 0.8108 g/100 mL,与理论值相差 2.07%。因此,响应面法对大球盖菇液体菌种培养条件的优化是可行的,得到的大球盖菇液体菌种培养条件具有实际应用价值。

3 结论

3.1 本研究筛选出大球盖菇最适宜母种培养基为配方 3。在此培养基上菌丝生长速度为 2.947 mm/d,满板天数为 13 d。本研究筛选出的母种培养基配方与赵洁等^[20]的研究结果相比,菌丝生长速度提高 56.76%。干稻草和玉米粉中均含有可溶性淀粉等,可以为菌丝生长提供所需的碳源。大球盖菇属草腐菌,配方中增加了干稻草更适合大球盖菇菌丝生长,从原料的角度来讲,干稻草为农业废弃角料,用于母种培养基的配方中,起到了废物利用的作用。

3.2 为了实现大球盖菇工厂化栽培,本研究进一步筛选出大球盖菇最适宜的液体培养基为配方 B。张琪林

等^[21]研究发现大球盖菇液体培养碳源以淀粉为佳,纤维素次之,单双糖以蔗糖为最好,葡萄糖次之。氮源以蛋白胨为佳。本研究采用的碳源与张琪林等的研究相比增加了玉米粉和稻草粉,该结果也与母种培养基配方筛选结果一致,材料营养成分更丰富,培养出的菌丝球密度大、直径小、分布均匀,便于今后应用在工业化的大规模连续生产。

3.3 传统菌种生产一般采用原种作为生产栽培种,生产成本高、效率低,而液体菌种简化了生产工艺,缩短了生产周期。并且接种面积大、萌发点多、抗杂性强,且可避免由于多次转接而引起的菌种退化问题^[22,23],目前针对大球盖菇液体菌种没有系统详细的研究。本研究根据绘制的大球盖菇液体菌丝球的生长曲线可知,生长延缓期为 0~2 d,快速生长期为 2~10 d,稳定期为 10~14 d,14 d 之后开始衰亡期。

3.4 为了得到最佳的培养条件,利用单因素试验得出试验最佳区域,最佳转速区域为 120~160 r/min,最佳接种量区域为 6%~10%,最佳培养时间区域为 10~14 d。通过 Box-Behnken 响应面试验设计方法对大球盖菇液体菌种培养条件进行了优化,具体参数为转速 140 r/min,接种量 8%,培养时间为 12 d。在最佳条件下得到实际的大球盖菇菌丝球生物量平均为 0.8108 g/100 mL,与预测值 0.8282 g/100 mL 相符。

参考文献

- [1] Hawksworth D L, Kirk B C, Pegler D N, et al. Dictionary of the Fungi VIII [M]. CABI, 1996
- [2] 黄年来.大球盖菇的分类地位和特征特性[J].食用菌,1995, 6:11
HUANG Nian-lai. Taxonomic Status and feature of *Stropharia rugoso-annulata* [J]. Edible Fungi, 1995, 6: 11
- [3] 苗元振,马继波,贾乐,等.大球盖菇硒多糖体内抗氧化能力检测[J].生物技术通报,2009, S1:181-183
MIAO Yuan-zhen, MA Ji-bo, JIA Le, et al. The antioxidant activity determination of Se-polysaccharid from *Stropharia rugoso-annulata* SQ-01 in vivo [J]. Biotechnology Bulletin, 2009, S1: 181-183
- [4] 何华奇,曹晖,潘迎捷.大球盖菇菌株形态学观察[J].安徽技术师范学院学报,2003,4:327-329
HE Hua-qi, CAO Hui, PAN Ying-jie. Test on the morphology of *Stropharia rugoso-annulata* [J]. Journal of Anhui Science and Technology University, 2003, 4: 327-329
- [5] 闫培生,李桂舫,蒋家慧,等.大球盖菇菌丝生长的营养需求及环境条件[J].食用菌学报,2001,1:5-9
YAN Pei-sheng, LI Gui-fang, JIANG Jia-hui, et al. Effects of

- nutrients and environmental factors on the mycelial growth of *Stropharia rugoso-annulata* [J]. Acta Edulis Fungi, 2001, 1: 5-9
- [6] Brodzinska Z, Lasota W. Chemical composition of cultivated mushrooms Part I .*Stropharia rugoso-annulata* farlow ex. murr. [A]. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 1981, 14(3-4): 229-238
- [7] 陈君琛,李怡彬,吴俐,等.大球盖菇黄酮类化合物提取及抑菌性研究[J].北京工商大学学报(自然科学版),2010,28(6):9-13
CHEN Jun-shen, LI Yi-bin, WU Li, et al. Extraction of flavonoids from *Stropharia rugoso-annulata* and the antibacterial activity [J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2010, 28(6): 9-13
- [8] 余冬芳,樊卫国,徐彦军.白灵菇和大球盖菇的营养分析与比较[J].食用菌,2007,4:57-58
SHE Dong-fang, FAN Wei-guo, XU Yan-jun. Analysis and compare of nutritive component of *Pleurotus nebrodensis* and *Stropharia rugoso-annulata* [J]. Edible Fungi, 2007, 4: 57-58
- [9] 王晓炜,詹巍,陶明焯,等.大球盖菇营养成分、抗氧化活性物质分析[J].食用菌,2007,6:62-63
WANG Xiao-wei, ZHAN Wei, TAO Ming-xuan, et al. Analysis of nutritive component and antioxidative substance of *Stropharia rugoso-annulata*[J]. Edible Fungi, 2007, 6: 62-63
- [10] 于萍,孙萌,傅嫦娥,等.大球盖菇栽培期间胞外酶活性变化研究[J].中国食用菌,2014,33(1):48-50
YU Ping, SUN Meng, FU Chang-e, et al. Extracellular enzyme production by *Stropharia rugosoannulata* farlow during cultivation on raw materials [J]. Edible Fungi of China, 2014, 33(1): 48-50
- [11] 陈少珍.大球盖菇菌种制作技术要点[J].农业科技通讯, 2003,10:18
CHEN Shao-zhen. Essential of seed production of *Stropharia rugoso-annulata* [J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2003, 10: 18
- [12] 杨丽维.杏鲍菇液体菌种生产技术的研发与应用[D].中国农业科学院,2014
YANG Li-wei. The study and application on production technology of liquid spawn of *Pleurotus eryngii* [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2014
- [13] 张健,张国权,邹莉,等.大球盖菇的分离纯化及 ITS 序列鉴定[J].江苏农业科学,2017,45(1):120-123
ZHANG Jian, ZHANG Guo-quan, ZOU Li, et al. Isolation and purification of *Stropharia rugosoannulata* and ITS sequence identification[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(1): 120-123
- [14] 于延申,任梓铭,王隆洋,等.大球盖菇菌种生产技术[J].吉林蔬菜,2018,4:34-36
YU Yan-shen, REN Zi-ming, WANG Long-yang, et al. Production technology of mushroom of *Stropharia rugosoannulata* [J]. Jilin Vegetables, 2018, 4: 34-36
- [15] 马璐.杏鲍菇工厂化生产关键因素研究[D].西北农林科技大学,2010
MA Lu. Studies on key factors of industrialized production for *Pleurotus eryngii* [D]. Northwest A&F University, 2010
- [16] 张晶,张园园.大杯蕈菌丝对不同碳氮源利用的对比研究[J].食用菌,2018,40(1):18-20,27
ZHANG Jing, ZHANG Yuan-yuan. A comparative study of different carbon sources by *Clitocybe maxima* [J]. Edible Fungi, 2018, 40(1): 18-20, 27
- [17] Almeida S M, Umeo S H, Marcante R C, et al. Iron bioaccumulation in mycelium of *Pleurotus ostreatus* [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2015, 46:195- 200
- [18] 许峰.大球盖菇富硒液体培养条件优化及抗氧化能力初步研究[D].泰安:山东农业大学,2006
XU Feng. Optimizing liquid culture condition of *Stropharia rugoso-annulata* accumulated selenium and studies on its anti-oxidative activities [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2006
- [19] 王夫杰,赵金杨,张金兰,等.响应面法优化食用菌农平 1 号固态发酵豆渣的条件[J].食品科学,2015,36(9):89-96
WANG Fu-jie, ZHAO Jin-yang, ZHANG Jin-lan. Application of response surface methodology to optimize fermentation conditions of okara by *Pleurotus ostreatus* Nongping 1 [J]. Food Science, 2015, 36(9): 89-96
- [20] 赵洁.大球盖菇优化栽培技术研究[D].河北大学,2010.
ZHAO Jie. Cultivated techniques of *Stropharia rugoso-annulata* [D]. Hebei University, 2010
- [21] 张琪林,王红.大球盖菇液体培养生育条件研究[J].农业与技术, 2008,1:46-49
ZHANG Qi-lin, WANG Hong. Research on growing conditions of *Stropharia rugoso-annulata* in liquid culture [J]. Agriculture and Technology, 2008, 1: 46-49