

研究报告

基于 Box-Behnken 法的马桑香菇菌株培养条件优化

吴宸印^{1,2}, 欧成章¹, 杨迺嘉¹, 潘年琼¹, 杜成兴^{*1,2}

1 贵州省生物技术研究开发基地有限公司, 贵州 贵阳 550002

2 贵州省科晖检验检测研究院有限公司, 贵州 贵阳 550002

吴宸印, 欧成章, 杨迺嘉, 潘年琼, 杜成兴. 基于 Box-Behnken 法的马桑香菇菌株培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1632-1654.

WU Chenyin, OU Chengzhang, YANG Naijia, PAN Nianqiong, DU Chengxing. Optimization of culture conditions for *Lentinula edodes* based on Box-Behnken design[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1632-1654.

摘要: 【背景】野生香菇菌种资源的保护和开发将是稳固我国粮食安全的重要举措。【目的】明确马桑香菇菌株不同状态的培养条件, 为开发利用奠定基础。【方法】基于菌株生物学特性进行单因素筛选、正交试验及响应面法分析, 对菌株的固体培养及液体发酵的各参数进行优化。【结果】采集的野生菌株 Le.Msy 鉴定为香菇, 在 24 °C时生长状态良好, 菌丝生长偏好于 pH 5.0–6.0 的弱酸性环境, 培养基营养因子中对碳源没有强选择性, 氮源中除尿素外均可生长, 碳氮比为 20:1–30:1 时菌丝生长最好, 并且无机盐中对镁离子有嗜好性; 正交试验表明麦芽糖、麸皮、硫酸镁的组合最适宜菌株的生长; 通过响应面优化的菌种培养基中主要因子的用量为碳源 23.05 g/L、氮源 6.14 g/L 和无机盐 5.48 g/L, 7 d 菌落直径达(50.10 ± 1.02) mm; 基于优化的培养基配比做液体发酵参数优化, 生物量可作为稳定的预测指标, 最佳发酵培养参数为温度 26.71 °C、转速 127.21 r/min、接种量 9.69 块/100 mL, 此时生物量干重可达(5505.67 ± 93.22) mg/L。【结论】菌株 Le.Msy 对营养因子的适应性广, 固体培养时菌落直径能作为精准预测生长发育模型的响应指标; 而液体发酵时菌丝球密度、平均直径及有效接触面积只能在非极端温度范围内反应菌株状态, 菌丝球生物量干重在任何参数变化时均能精准反映菌丝生长发育状态。

关键词: 马桑香菇; 野生菌株; 培养条件优化; 液体发酵; Box-Behnken 法; 模型

资助项目: 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2022]一般 176 号); 贵州省科研机构创新能力建设专项资金(黔科合服企[2023]012); 贵州省重大科技成果转化项目(黔科合成果[2022]重点 002 号)

This work was supported by the Guizhou Provincial Science and Technology Support Program (Qiankehe Support [2022] General 176), the Guizhou Provincial Scientific Research Institutions' Special Funds for the Construction of Innovation Capacity (Qiankehe Service Enterprise [2023]012), and the Guizhou Provincial Major Scientific and Technological Achievement Transformation Project (Qiankehe Achievement [2022] Key 002).

*Corresponding author. E-mail: 2089532674@qq.com

Received: 2024-07-04; Accepted: 2024-08-02; Published online: 2024-08-28

Optimization of culture conditions for *Lentinula edodes* based on Box-Behnken design

WU Chenyin^{1,2}, OU Chengzhang¹, YANG Naijia¹, PAN Nianqiong¹, DU Chengxing^{*1,2}

1 Guizhou Biotechnology Research and Development Base Limited Company, Guiyang 550002, Guizhou, China

2 Guizhou Kehui Inspection and Testing Research Institute Limited Company, Guiyang 550002, Guizhou, China

Abstract: [Background] The conservation and development of wild *Lentinula edodes* germplasm resources is a crucial measure to ensure China's food security. [Objective] To clarify the culture conditions for different states of *L. edodes* and lay a foundation for the development and application. [Methods] We optimized the parameters of solid culture and liquid fermentation by single factor tests, orthogonal design, and response surface methodology based on the biological characteristics of the strain. [Results] The wild strain Le.Msy collected was identified as *L. edodes*. It exhibited good growth at 24 °C, with mycelial growth favoring a weakly acidic environment of pH 5.0–6.0. The strain showed no strong preference to carbon sources among the nutrients in the culture medium and could grow with other nitrogen sources except urea. The optimal carbon to nitrogen ratio for mycelial growth was within the range of 20:1 to 30:1, and the strain preferred magnesium ions among inorganic salts. The orthogonal experiment results indicated that the combination of maltose, wheat bran, and magnesium sulfate was most suitable for the strain growth. The medium formula optimized by the response surface methodology was composed of 23.05 g/L carbon source, 6.14 g/L nitrogen source, and 5.48 g/L inorganic salt, in which the colony diameter reached (50.10±1.02) mm after 7 days. Based on the optimized culture medium formula, liquid fermentation conditions were further optimized with biomass as the indicator. The optimal fermentation conditions were a temperature of 26.71 °C, a shaking speed of 127.21 r/min, and an inoculum amount of 9.69 pieces per 100 mL, under which the dry biomass reached (5 505.67±93.22) mg/L. [Conclusion] Le.Msy exhibits broad adaptability to nutrients. In solid culture, colony diameter can serve as an accurate indicator of growth and development. In liquid fermentation, the density, average diameter, and effective contact area of the mycelial pellets can only reflect the strains status within a non-extreme temperature range. The dry mycelial biomass can accurately reflect the growth and development status under any parameter changes.

Keywords: *Lentinula edodes*; wild strain; culture condition optimization; liquid fermentation; Box-Behnken design; modeling

香菇 [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] 是担子菌门 (*Basidiomycota*) 伞菌纲 (*Agaricomycetes*) 伞菌目 (*Agaricales*) 的典型物种。已融入我国饮食环境几百年之久, 因其独特的香气及丰富的营养成分备受喜爱。现代医学研究表明, 香菇作

为药食同源性的多组分混合物^[1], 富含多糖、抗氧化剂、膳食纤维和麦角甾醇等人体所需营养及药用成分, 具有抗菌、抗炎、抗病毒、降三高和提升免疫等功效^[2-5]。此外, 香菇还能在去除工业废水中酚类化合物、农业工业废弃物

重金属吸附等多方面进行开发利用^[6-7]。然而，作为我国年产量最高的食用菌物种^[8]，优质种较少，相较多同为香菇大国——日本的 203 个品种，我国仅 45 种^[9-10]。因此，对国内本土野生香菇菌种资源进行保护和开发将是我国食用菌产业可持续发展的重要举措。

马桑香菇(*Lentinula edodes*)是生长在马桑树枯枝上的野生香菇品种，最早由贵州科研者所报道^[11]；由于其风味、形态等与现今人工栽培种均存在较大差异，已被作为贵州道地食用菌野生种质资源进行研究^[12-14]；由于其高附加值特性，马桑香菇已在乡村振兴等工作中逐渐融入食用菌产业。然而，现有研究主要是针对马桑香菇同其他香菇的主要风味差异以及栽培方式^[15-17]，并未对最核心的菌种培养开展较为系统化的研究。

Box-Behnken 响应面法是一种借助因素和效应值的函数变化关系优化多变量适宜参数的统计方法，已被广泛运用于多种研究领域。在食用菌营养功能物质的提取工艺条件、加工配方优化、栽培条件优化等多方面均有不少成熟应用案例^[18-19]。本研究旨在基于响应面优化方法，系统研究贵州本土野生马桑香菇的菌丝固体培养及液体发酵过程。相较于传统一级种和二级种在香菇栽培中的有限使用，菌丝的液体发酵因其高效率制备、容易储运以及均一性稳定性更好等因素，在大规模工厂化生产中得以应用且具有重要意义。但作为菌种保藏的主要方式，固体菌种的培养也尤为重要，适宜的培养基能够保证菌株活力，防止菌种退化。因此，通过优化这些关键工艺，可以提高产品产量、优化产品质量和稳定生产过程，为香菇大规模产业化生产提供理论与技术支持。本研究基于菌种最佳培养条件和发酵参数的优化，以期推动马桑香菇资源的高效利用，促进贵州香菇产

业的可持续发展。

1 材料与方法

1.1 样品

新鲜野生马桑香菇子实体采自贵州省遵义市，春分前后散生于山地海拔 900—1 200 m、空气湿度 65%—90%且通气较好的马桑树灌木林枯枝上，属腐生型真菌。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基和马铃薯综合培养基(integrated potato medium, IPM)^[20]，青岛海博生物技术有限公司。

果糖、蔗糖、可溶淀粉、麦芽糖、红糖、乳糖、甘露醇、牛肉膏、尿素、酵母膏、蛋白胨、硫酸铵、硫酸锌、硫酸锰、硫酸镁、氯化钾、氯化镁、碳酸钙、碳酸钠和磷酸二氢钾，上海吉至生化科技有限公司；玉米浸粉和麸皮，北京鸿润宝顺科技有限公司；PCR 引物，北京擎科生物科技股份有限公司；核酸染料、琼脂糖、TAE 缓冲液和 2×Rapid Taq Master Mix，南京诺唯赞生物科技股份有限公司。Omega 真菌 DNA 提取试剂盒，广州飞扬生物工程有限公司。

生化培养箱和恒温摇床，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；电泳仪，北京六一生物技术有限公司；自动菌落计数仪，上海磐麦科技有限公司；微分干涉显微镜，Nikon 尼康精机(上海)有限公司。

1.3 菌株的分离纯化与鉴定

详细记录野生马桑香菇采集生境及子实体形态特征，采后冰袋冷藏带回实验室，将子实体表面消毒后用组织分离法挖取菌盖中心组织块置于 PDA 培养基上，25 °C 暗培养 4 d，再转接萌发的菌丝进行纯化培养，挑取前端幼嫩菌丝于微分干涉显微镜下(40×)观察菌丝结构。利用 Omega 真菌 DNA 提取试剂盒提取马桑香菇

纯化菌丝的 DNA, 基于真菌通用 ITS 引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GG AAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 进行 PCR。PCR 反应体系(25 μL): 2×Rapid Taq Master Mix 10 μL, DNA 模板(346.20 ng/μL) 2 μL, ITS 正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 11 μL。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 7 min。电泳检测后切取 1% 琼脂糖凝胶上大小约 750 bp 的目的条带送北京擎科生物科技股份有限公司测序, 返回序列提交 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 并利用 MEGA 11.0 生物学软件构建系统发育树。

1.4 菌株的生物学特性筛选

基于 IPM 培养基开展单因素筛选试验。将 20 g/L 的葡萄糖等量替换为果糖、蔗糖、可溶淀粉、麦芽糖、红糖、乳糖、甘露醇做碳源筛选; 分别添加 3 g/L 的蛋白胨、牛肉膏、尿素、酵母膏、硫酸铵、玉米浸粉、麸皮(过 60 目筛)做氮源筛选; 培养基中 KH₂PO₄ 和 MgSO₄ 替换为 3 g/L 的硫酸锌、硫酸锰、硫酸镁、氯化钾、氯化镁、碳酸钙、碳酸钠、磷酸二氢钾; 固定碳源用量, 添加不同用量氮源配制碳氮比(C/N)为 5:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 的培养基; 利用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节培养基酸碱度, pH 值分别调节为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0; 以 3 °C 为 1 个梯度, 设置 18–30 °C 的温度范围筛选适宜生长温度。

1.5 固体培养基配方的正交优化

基于单因素试验结果, 综合考虑不同营养因子影响下菌丝生长速率、气生菌丝密度和洁白度的差异, 筛选碳源、氮源、无机盐培养时菌落直径大且菌丝洁白浓密的因子各 3 个, 开展三因素三水平 $L_9(3^3)$ 正交试验, 培养基配比同 IPM 培养基。

1.6 菌丝固体培养基配比的响应面优化

基于单因素筛选试验及正交试验优化的结果, 选取菌株适宜的碳源(A)、氮源(B)、无机盐(C)作为 3 个试验因素, 设置三因素三水平响应面试验(表 1)。基于 Box-Behnken 试验设计配制 17 组固体培养基, 并接入新鲜菌块($\varphi=4$ mm)进行培养。以平板上生长的马桑香菇菌落直径大小为响应值, 进行方差分析与多元二次回归拟合分析, 并借助 design expert 11 软件针对代码化方程构建预测模型。通过模型三维图、等高线图及 17 组试验测得实际值与模型预测值的变化, 优化培养基配比。

1.7 菌株液体发酵条件的响应面优化

基于菌丝固体培养基优化的结果, 配制对应的液体培养基。设定摇瓶转速(r/min)、环境温度(°C)、接种量($\varphi=4$ mm 的菌块数)为调控因素(表 2), 开展 Box-Behnken 试验。液体发酵培养 10 d, 测定菌丝球生物量(mg/L/干重)、菌丝球密度(个/L)、菌丝球平均直径(mm)、菌丝球有效接触面积(mm²/mL)所得实际值并进行方差分析与多元二次回归拟合分析, 构建预测模型。发酵培养结束后, 用镊子随机夹取 20 个菌丝球, 紧密并排测定总直径并换算每个菌丝球平均直

表 1 固体培养基响应面法优化试验因素与水平设计

Table 1 Optimization of experimental factors and level design by response surface methodology for solid media

| 因素 Factor | 水平 Level | | |
|---------------------------------|----------|-------|-------|
| | -1 | 0 | 1 |
| 碳源 Carbon source (g/L) (A) | 10.00 | 35.00 | 60.00 |
| 氮源 Nitrogen source (g/L) (B) | 5.00 | 17.50 | 30.00 |
| 无机盐 Inorganic salt (g/L) (C) | 2.50 | 8.75 | 15.00 |

表 2 菌丝液体发酵响应面法优化试验的因素与水平设计

Table 2 Factor and level design of the response surface method optimization test for the liquid fermentation of mycelium

| 因素 Factor | 水平 Level | | |
|---|----------|-----|-----|
| | -1 | 0 | 1 |
| 温度 Temperature (°C) (A) | 21 | 27 | 33 |
| 转速 Rotational speed (r/min) (B) | 90 | 125 | 160 |
| 菌块接种量 | 1 | 8 | 15 |
| <u>Inoculum amount (piece/100 mL) (C)</u> | | | |

径；菌丝球密度则是充分混匀发酵液后吸取 20 mL，置于自动菌落计数仪中计数，并换算为每升发酵液菌丝球密度；基于菌丝球平均直径及密度测定值，将菌丝球视为球体，计算每毫升发酵液中菌丝球有效接触表面积；过滤发酵液后将菌丝球烘至恒重，测定生物量。

1.8 统计分析

使用 Adobe Photoshop 2020 绘制生理表型图像，用 IBM SPSS Statistics 22 分析不同处理之间的参数变化，采用最小显著性差异法 (least-significant difference, LSD) 法 ($P < 0.05$) 对不同处理进行差异显著性比较。采用 GraphPad Prism 8.0.2 绘制潜在误差和已知误差的直方图。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化与鉴定结果

采集到的马桑香菇野生菌株 Le.Msy 子实体偏小，菌盖直径(41.26 ± 2.14) mm，菌盖厚(8.56 ± 1.18) mm，菌柄长(31.21 ± 4.14) mm，菌柄直径(5.77 ± 1.24) mm，菌盖棕色光滑，菌柄乳白附着纤毛，菌柄中生或偏生，子实体单生，菌褶密度大(图 1)，经分离纯化后菌丝洁白浓密，辐射状延伸(图 1D)，并且显微观察菌丝结构可见明显锁状联合结构(图 1E)。从表型及显微结构初步鉴定为担子菌门(Basidiomycota)伞菌纲(Agaricomycetes)香菇属(*Lentinula*)真菌。经 ITS

序列扩增片段测序后 BLAST 结果显示与香菇序列相似率 $\geq 99.9\%$ ，选取北方小香菇(*Lentinellus ursinus*)作为外类群，基于相似的参比菌株及其他香菇种的 ITS 序列，用邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树(图 2)，可见菌株 Le.Msy 与 *Lentinula edodes* 聚在一个分支，并且遗传距离很近，说明是同一物种。

2.2 生物学特性单因素筛选

从单因素筛选生长 9 d 结果可知(图 3, 图 4)，马桑香菇菌株 Le.Msy 对碳源没有强选择性，试验中添加不同的 8 种碳源均能够正常生长，虽然气生菌丝密度有差异，但菌落直径之间不存在显著差异($P > 0.05$)；氮源单因素筛选中发现添加尿素时菌株不生长，不能够作为培养基中氮源供给。其余氮源均能生长，但硫酸铵作为氮源供给时菌落显著小于其余 5 种氮源($P > 0.05$)，推测铵态氮并不适宜作为马桑香菇生长的营养氮源；不同碳氮比单因素试验发现当培养基中 C/N 比值在 20:1 和 30:1 时菌株长势显著优于其他配比($P < 0.05$)；菌株对无机盐的利用能力差异较大，添加硫酸锌、硫酸锰、碳酸钠时菌株不生长，其余无机盐处理均能正常生长，并且硫酸镁、氯化镁作为唯一无机盐供给时，菌落直径显著大于氯化钾、碳酸钙和磷酸二氢钾($P < 0.05$)，推测菌株对镁离子有较强的嗜好性；马桑香菇 Le.Msy 对基质中酸碱度变化较为敏感，随着酸碱度升高菌落直径逐渐减小，pH 8.0 是临界值，大于该值时菌株不生长。此外，弱酸性条件适宜菌株生长，pH 5.0 时菌落直径为(62.10 ± 3.98) mm，显著高于其他处理($P < 0.05$)；但 pH 6.0 时气生菌丝密度更大，并且菌落直径为(58.00 ± 2.68) mm，仅次于 pH 5.0 处理组，所以在菌株培育过程中考虑将其作为最终酸碱度；菌株对温度的响应呈正态分布，低于 27 °C 时菌落圆整，高于此培养温度菌落长势不协调。24 °C



图 1 野生马桑香菇菌株 Le.Msy 表型及形态学鉴定 A1–A3: 野生状态子实体; B1–B4: 子实体表型; C: 孢子印; D: 纯化母种菌丝; E: 菌丝镜检($40\times$), 箭头指向位置为香菇典型的菌丝锁状联合结构。图中白色标尺表示长度 1 cm。

Figure 1 Phenotypic and morphological identification of wild shiitake strain Le.Msy. A1–A3: Wild state substrates; B1–B4: Substrate phenotypes; C: Spore prints; D: Mycelium of the purified parent species; E: Mycelium microscopy ($40\times$), the arrow points to the position of the typical mycelial lock-joint structure of *Lentinula edodes*. The white scale in the figure indicates a length of 1 cm.

时菌落直径为 (62.00 ± 0.98) mm, 显著高于其他培养温度($P<0.05$), 将其作为最终培养温度。

2.3 培养基正交优化

综合考虑气生菌丝密度和菌落直径(图 3,

图 4), 碳源中筛选甘露醇(A₁)、乳糖(A₂)、麦芽糖(A₃) 3 个水平, 氮源中筛选蛋白胨(B₁)、玉米浸粉(B₂)、麸皮(B₃) 3 个水平, 无机盐中筛选硫酸镁(C₁)、氯化镁(C₂)、磷酸二氢钾(C₃) 3 个水

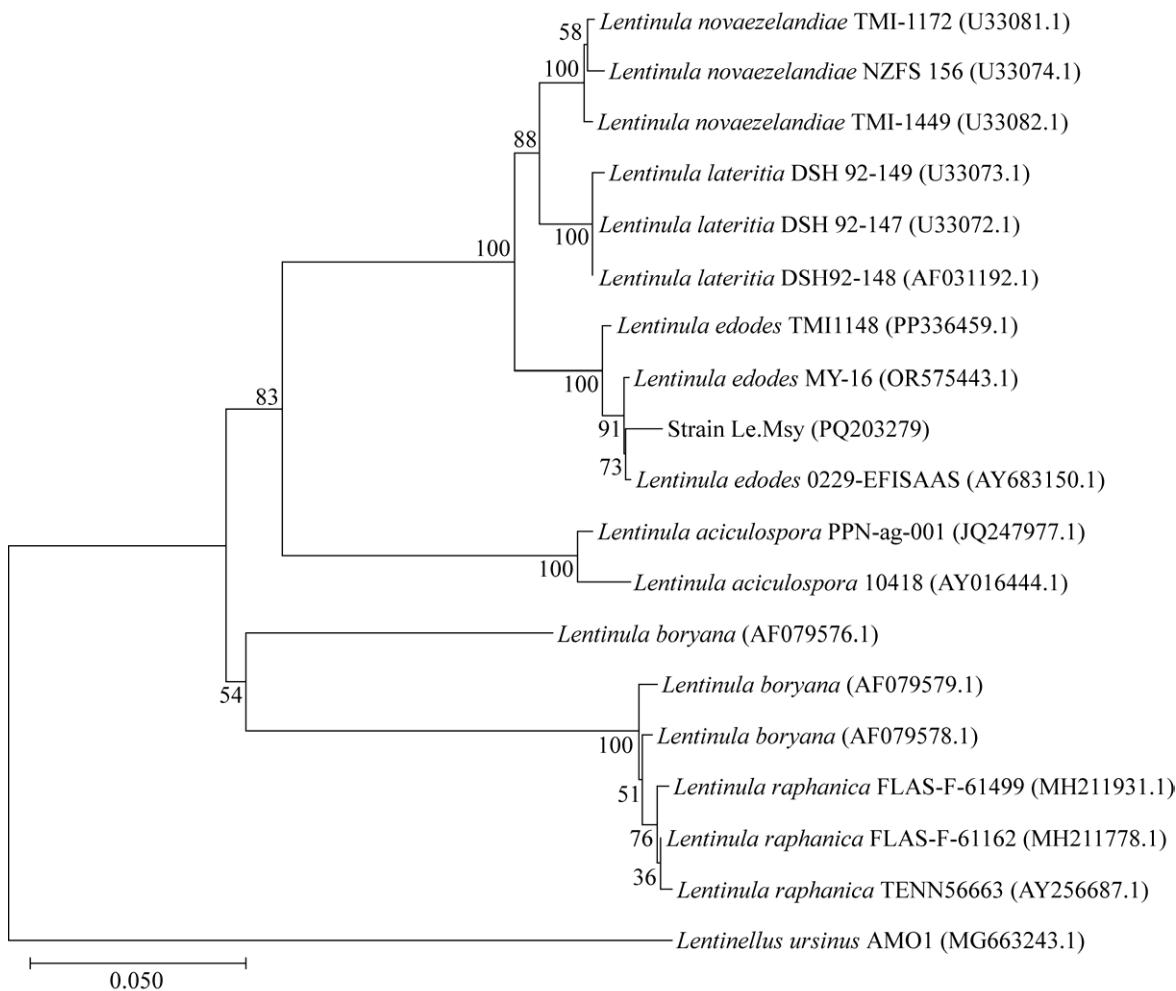


图 2 基于 ITS 序列采用 NJ 法构建的马桑香菇菌株 Le.Msy 的系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号；分支点上的数字代表 bootstrap 值，用于评估该分支的可信度；距离标尺表示每个核苷酸序列位置中碱基替换数。

Figure 2 Phylogenetic tree of strain Le.Msy constructed by NJ method based on ITS sequences. The GenBank accession number is in parentheses; The number on the branch point represents the bootstrap value, which is used to assess the confidence of the branch; The distance scale indicates the number of base substitutions in each nucleotide sequence position.

平。生长 7 d 后 T3 组合长势最佳，菌落直径为 (51.20 ± 0.40) mm (图 5A、5B)，与其他组合形成显著差异 ($P < 0.05$)。正交表分析结果显示(表 3)，无机盐的极差最大 ($R=6.73$)，其次为碳源 ($R=0.60$)，氮源极差值最小 ($R=-3.87$)，3 个营养因子对菌丝生长程度的影响权重为 $C > A > B$ ，综合考虑各因素水平的效应大小，确定最终培养基配

方为 A_3 ($k=43.20$)、 B_3 ($k=44.33$)、 C_1 ($k=47.13$)，即麦芽糖、麸皮、硫酸镁。

2.4 固体培养基响应面优化与验证分析

构建添加了不同营养因子不同含量的马桑香菇菌落直径的预测模型代码化方程为 $Y=44.4-1.25A-5.25B-0.5C+2.25AB+0.25AC+2.75BC-2.075A^2-0.575B^2-3.075C^2$ 。回归方程系数显著

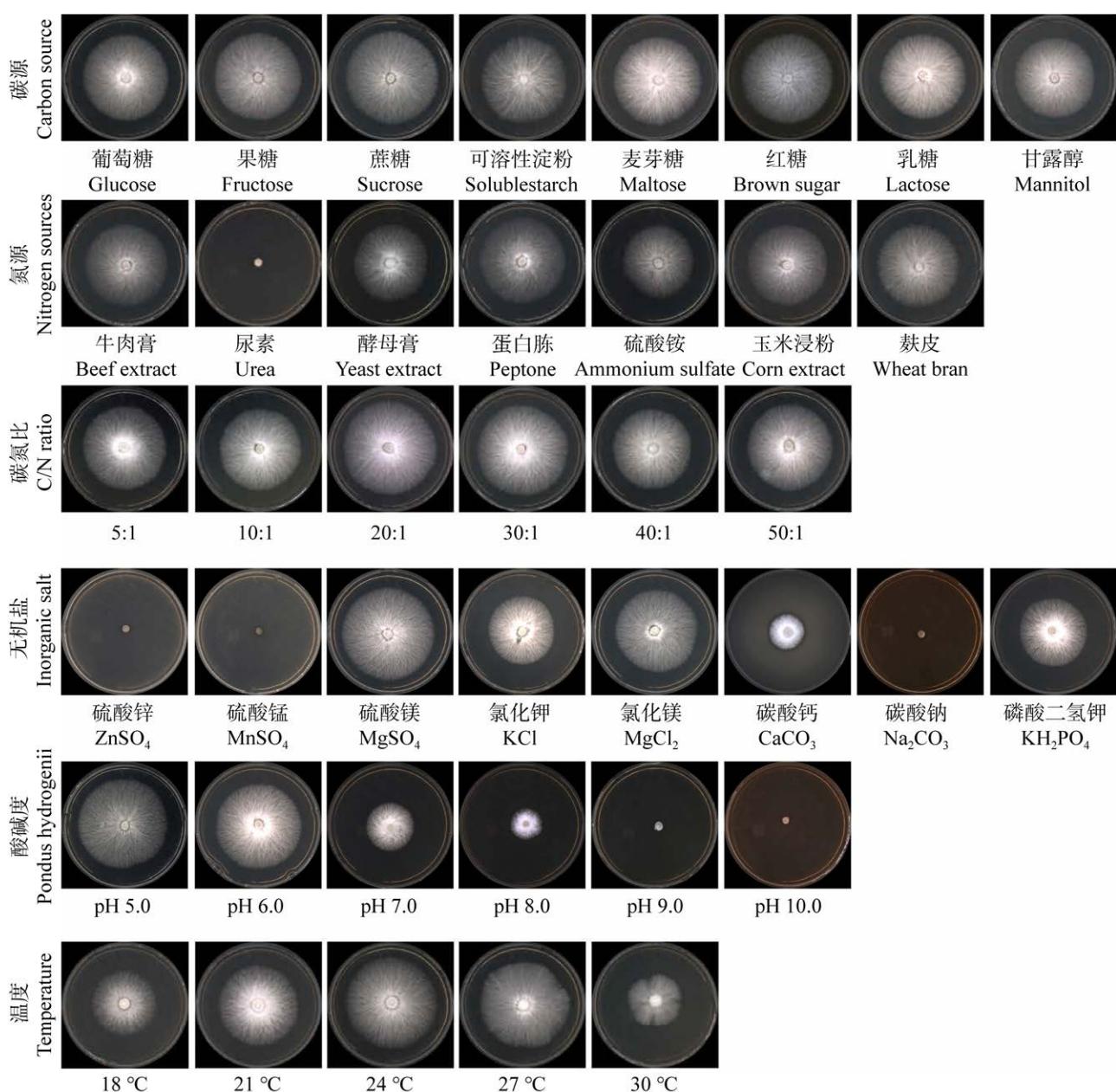


图 3 马桑香菇菌株 Le.Msy 的菌丝生物学特性单因素筛选表型

Figure 3 One-factor screening of mycelial phenotypes for biological characterization of strain Le.Msy.

性验证结果表明(表 4, 表 5), 预测模型的 F 值为 73.54 且 $P<0.0001$, 达显著水平; 而失拟项 F 值为 2.78 且 $P=0.1744$, 未达显著水平($P>0.05$)。此外, 预测模型的 $R^2=0.9895$, adjusted $R^2=0.9761$ 、predicted $R^2=0.8816$, 两个参数差值小于 0.2, Adeq precision=30.9358>4 且变异系数(coefficient

of variation, CV)=1.74<10, 表明所构建预测模型的拟合效果理想, 98.95%的试验数据可被该模型精确预测马桑香菇在平板培养基中营养因子和用量变化时的菌落直径。此外, 在不同添加量情况下(表 1, 表 5), 因素 B (F value=417.16)>因素 A (F value=23.65)>因素 C (F value=3.78),

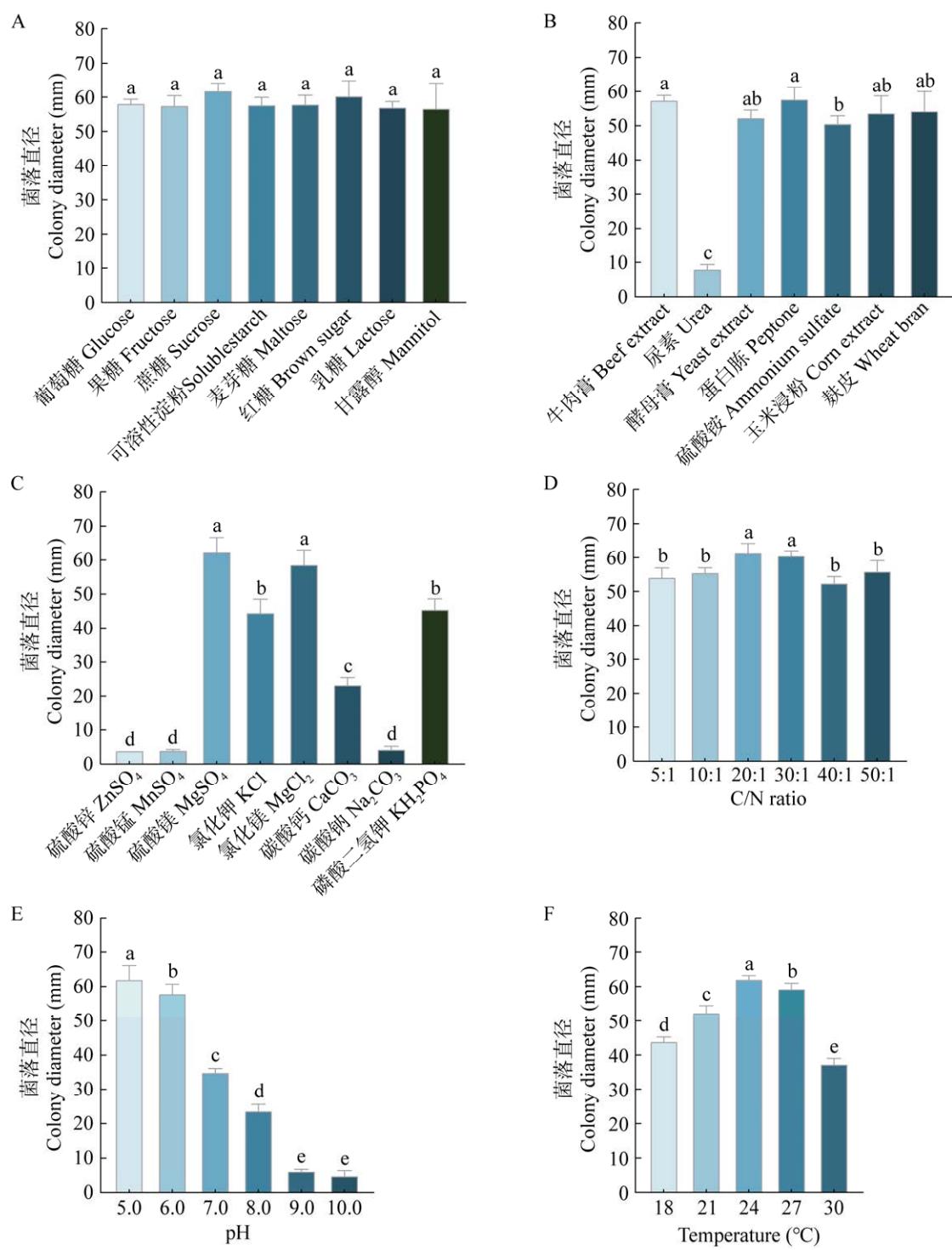


图 4 菌株 Le.Msy 的单因素筛选结果 A: 碳源; B: 氮源; C: 无机盐; D: C/N 比值; E: 酸碱度; F: 温度。不同小写字母表示处理组间差异显著($P<0.05$), 下同。

Figure 4 Results of one-factor screening of strain Le.Msy. A: Carbon source; B: Nitrogen source; C: Inorganic salt; D: C/N ratio, E: pH; F: Temperature. Different lowercase letters indicate significant differences between treatment groups ($P<0.05$), the same below.

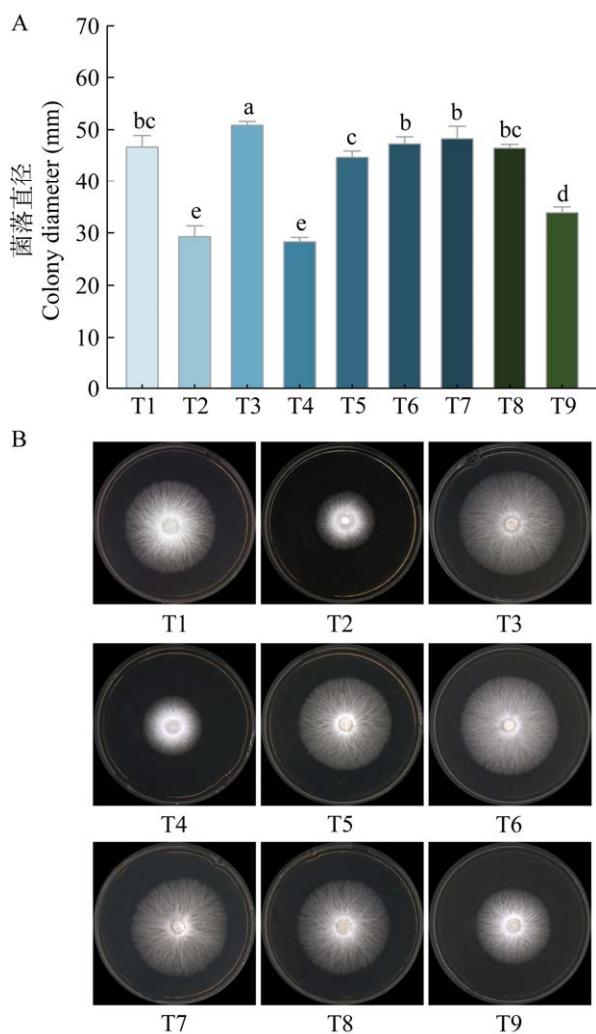


图5 菌株 Le.Msy 菌丝适宜营养因子的正交结果
A: 正交生长 7 d 的菌落直径; B: 正交试验结果表型。T1–T9: 不同因素间(碳源、氮源、无机盐)的搭配, 见表 3 中因素组合情况。

Figure 5 Orthogonal results of suitable nutrient factors for mycelium of the parent strain Le.Msy. A: Colony diameter for 7 d of orthogonal growth; B: Phenotype of orthogonal test results. T1–T9 indicate the pairing between different factors (carbon source, nitrogen source, and inorganic salt), as shown in the factor combinations in Table 3.

表明所添加的氮源浓度对马桑香菇 Le.Msy 的菌落直径影响最大, 其次是碳源浓度, 无机盐浓度的影响最小。各因素之间交互作用对菌落

表 3 马桑香菇营养因子正交优化试验结果分析
Table 3 Analysis of the results of orthogonal optimization experiments on nutritional factors of *Lentinula edodes*

| Item | 因素组合 | | | 菌落直径 (mm) |
|---------------------|----------------------|--------|--------|---------------------|
| | Factor combination | | | |
| T1 | A_1 | B_1 | C_1 | 47.00 ± 1.90 bc |
| T2 | A_1 | B_2 | C_3 | 29.60 ± 1.74 e |
| T3 | A_1 | B_3 | C_2 | 51.20 ± 0.40 a |
| T4 | A_2 | B_1 | C_3 | 28.60 ± 0.49 e |
| T5 | A_2 | B_2 | C_2 | 45.00 ± 0.89 c |
| T6 | A_2 | B_3 | C_1 | 47.60 ± 1.02 b |
| T7 | A_3 | B_1 | C_2 | 48.60 ± 2.06 b |
| T8 | A_3 | B_2 | C_1 | 46.80 ± 0.40 bc |
| T9 | A_3 | B_3 | C_3 | 34.20 ± 0.75 d |
| K_1 | 127.80 | 124.20 | 141.40 | |
| K_2 | 121.20 | 121.40 | 121.20 | |
| K_3 | 129.60 | 133.00 | 92.40 | |
| k_1 | 42.60 | 41.40 | 47.13 | |
| k_2 | 40.40 | 40.47 | 40.40 | |
| k_3 | 43.20 | 44.33 | 30.80 | |
| 极差 | 0.60 | -3.87 | 6.73 | |
| Range (R) | $C > A > B$ | | | |
| 因素权重 | Weighting of factors | | | |
| 最优组合 | $A_3B_3C_1$ | | | |
| Optimal combination | | | | |

直径的影响也存在较大差异, 从响应面验证试验结果可知, 因素 AB 交互三维图坡度陡峭, 等高线为椭圆形, 交互作用显著且浓度偏低反而能促进菌丝生长(图 6A); 因素 AC 交互三维图坡度平缓, 等高线近圆形, 表明该两因素交互作用并不显著(图 6B); 因素 BC 交互三维图坡度最陡峭, 等高线椭圆, 表明该两因素交互作用显著(图 6C)。

以菌落直径为优化指标, 当其达最大值时模型预测的最佳培养基配方配比为碳源 23.05 g/L、

表 4 马桑香菇固体培养基响应面试验回归方程系数显著性验证

Table 4 Validation of the significance of the coefficients of the regression equations of the response surface test for the solid medium of *Lentinula edodes*

| 方差来源 Source | 平方和 Sum of squares | 自由度 df | 均方 Mean square | F 值 F value | P 值 P value | 显著性 Significance |
|-----------------|-----------------------|-----------|-------------------|----------------|----------------|---------------------|
| 模型 Model | 349.83 | 9 | 38.87 | 73.54 | <0.000 1 | * |
| A | 12.50 | 1 | 12.50 | 23.65 | 0.001 8 | * |
| B | 220.50 | 1 | 220.50 | 417.16 | <0.000 1 | * |
| C | 2.00 | 1 | 2.00 | 3.78 | 0.092 8 | - |
| AB | 20.25 | 1 | 20.25 | 38.31 | 0.000 4 | * |
| AC | 0.25 | 1 | 0.25 | 0.47 | 0.513 8 | - |
| BC | 30.25 | 1 | 30.25 | 57.23 | 0.000 1 | * |
| A^2 | 18.13 | 1 | 18.13 | 34.30 | 0.000 6 | * |
| B^2 | 1.39 | 1 | 1.39 | 2.63 | 0.148 6 | - |
| C^2 | 39.81 | 1 | 39.81 | 75.32 | <0.000 1 | * |
| 残差 Residual | 3.70 | 7 | 0.53 | | | |
| 失拟项 Lack of fit | 2.50 | 3 | 0.83 | 2.78 | 0.174 4 | - |
| 纯误差 Pure error | 1.20 | 4 | 0.30 | | | |
| 总离差 Cor total | 353.53 | 16 | | | | |

 $R^2=0.989\ 5$; Adjusted $R^2=0.976\ 1$; Predicted $R^2=0.881\ 6$; Adeq precision=30.935 8; *: Significant; -: Not significant.

表 5 马桑香菇固体培养基响应面法试验设计和结果

Table 5 Experimental design and results of response surface methodology for *Lentinula edodes* solid medium

| 处理 Treatment | 因素 Factor | | | 菌落直径 Colony diameter (mm) | 处理 Treatment | 因素 Factor | | | 菌落直径 Colony diameter (mm) |
|-----------------|-----------|----|----|------------------------------|-----------------|-----------|----|----|------------------------------|
| | A | B | C | | | A | B | C | |
| T1 | -1 | -1 | 0 | 49.80±0.40 | T10 | 0 | 1 | -1 | 33.33±0.47 |
| T2 | 1 | -1 | 0 | 42.75±0.75 | T11 | 0 | -1 | 1 | 43.33±0.47 |
| T3 | -1 | 1 | 0 | 36.00±0.71 | T12 | 0 | 1 | 1 | 36.70±0.60 |
| T4 | 1 | 1 | 0 | 38.33±0.47 | T13 | 0 | 0 | 0 | 45.00±0.63 |
| T5 | -1 | 0 | -1 | 40.60±0.49 | T14 | 0 | 0 | 0 | 44.38±0.41 |
| T6 | 1 | 0 | -1 | 38.50±0.50 | T15 | 0 | 0 | 0 | 45.00±1.00 |
| T7 | -1 | 0 | 1 | 40.00±0.89 | T16 | 0 | 0 | 0 | 43.88±0.54 |
| T8 | 1 | 0 | 1 | 38.00±0.63 | T17 | 0 | 0 | 0 | 44.20±0.98 |
| T9 | 0 | -1 | -1 | 50.38±0.41 | | | | | |

氮源 6.14 g/L、无机盐 5.48 g/L, 菌落直径 50.60 mm, 可信度达 100%。对模型进行确认, 设定此优化配方配比开展 5 次试验, 菌落直径大小有 95% 可能性介于 49.26–51.92 mm。开展验证试验, 培养 7 d 测得菌落直径为(50.10±1.02) mm, 置于该区间, 表明模型预测能力可行。

2.5 液体发酵响应面优化与验证分析

液体发酵 10 d 后测定结果及观察菌丝表型(表 6, 图 7), 获得以菌丝球生物量干重为响应值时预测模型代码化方程为 $Y=5\ 330.22-272.03A+222.51B+540.43C-94.30AB-50.00AC-151.79BC-3\ 001.19A^2-1\ 508.37B^2-1\ 103.41C^2$ 。对试验结果

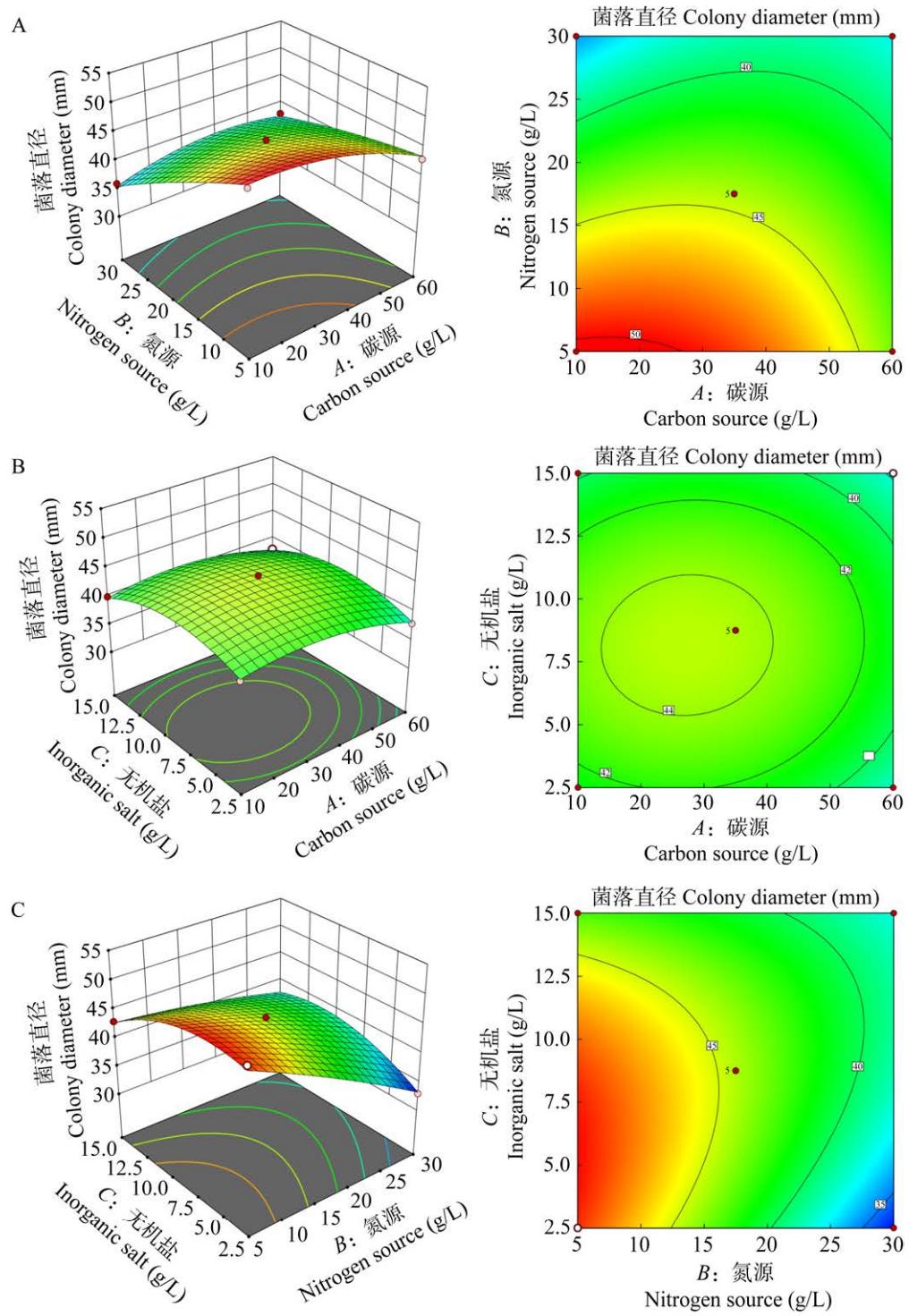


图 6 固体培养基因素之间交互作用对马桑香菇菌落直径影响的相应图 A: A 和 B 两因子交互关系; B: A 和 C 两因子交互关系; C: B 和 C 两因子交互关系。左侧是三维图, 右侧是等高线图。下同。

Figure 6 Corresponding plot of the effect of interaction between plate medium factors on colony diameter of *Lentinula edodes*. A: Two factor interactions of A and B; B: Two factor interactions of A and C; C: Two factor interactions of B and C. The left side is the graphic model and the right side is the contour map. The same below.

进行统计分析(表 7), 预测模型的 F 值为 174.91 且 $P<0.000\ 1$, 达显著水平, 而失拟项 F 值为 4.30 且 $P=0.096\ 5$, 未达显著水平($P>0.05$)。此外, 预测模型的 $R^2=0.995\ 6$, Adjusted $R^2=0.989\ 9$ 、Predicted $R^2=0.944\ 3$, 两个参数差值小于 0.2, Adeq precision=32.553 6>4 且 CV=7.31<10, 表明该方程合理可靠。该模型中, 接种量 C (F value=60.42)>温度 A (F value=15.31)>转速 B (F value=10.24), 说明以生物量为指标时, 接种量的影响最大。图 8 可直观展现影响发酵的 3 个关键因素两两交互作用, 三维图中 3 个因素对干重影响均为先升后降, 并均有极值。而等高线图则显示出转速和接种量的响应面坡度更陡, 说明这 2 个因素的影响较大(图 8A、8B)。经等高

线形状判断, BC 交互时等高线近圆形, 表明两因素交互作用并不显著(图 8C)。

针对马桑香菇液体发酵的菌丝球密度预测模型代码化方程为 $Y=12\ 773.33-434.46A+1\ 298.46B+693.00C-262.17AB-410.42AC+858.25BC-7\ 195.92A^2-5\ 257.08B^2-5\ 010.00C^2$ 。预测模型的 F 值为 41.27 且 $P<0.000\ 1$, 而失拟项 F 值为 35.72 且 $P=0.002\ 4$, 2 个参数均显著水平($P<0.05$), 说明该以密度为指标的模型不能精确地预测液体发酵的菌丝球生长状态。但从响应面试验结果不难看出, 菌丝球密度变化趋势仍同预测结果较为一致(表 6, 图 7, 图 9), 可知转速和接种量对菌丝球密度的影响大于温度, 在以菌丝球密度为优化目标时, 优先考虑转速和接种量的影响效果。

表 6 马桑香菇液体发酵响应面法试验设计和结果

Table 6 Experimental design and results of response surface methodology for liquid fermentation of *Lentinula edodes*

| 处理 Treatment | 因素 Factor | | | 生物量 Biomass (mg/L) | 密度 Density (piece/L) | 菌丝球平均直径 Mean diameter of mycelium ball (mm) | 有效接触面积面积 Effective contact surface area (mm ² /mL) |
|-----------------|--------------|----|----|--------------------------|----------------------------|---|---|
| | A | B | C | | | | |
| T1 | -1 | -1 | 0 | 901.63 | 107.67 | 6.17 | 12.88 |
| T2 | 1 | -1 | 0 | 463.79 | 8.33 | 5.13 | 0.69 |
| T3 | -1 | 1 | 0 | 1 366.14 | 1 156.67 | 1.22 | 5.42 |
| T4 | 1 | 1 | 0 | 551.08 | 8.67 | 5.33 | 0.77 |
| T5 | -1 | 0 | -1 | 996.31 | 295.67 | 3.00 | 8.35 |
| T6 | 1 | 0 | -1 | 634.65 | 2.33 | 5.12 | 0.19 |
| T7 | -1 | 0 | 1 | 1 916.59 | 1 953.33 | 2.17 | 28.94 |
| T8 | 1 | 0 | 1 | 1 354.92 | 18.33 | 5.13 | 1.52 |
| T9 | 0 | -1 | -1 | 1 588.87 | 62.33 | 5.79 | 6.56 |
| T10 | 0 | 1 | -1 | 2 506.58 | 3 015.00 | 3.07 | 89.12 |
| T11 | 0 | -1 | 1 | 3 233.89 | 281.00 | 4.64 | 19.05 |
| T12 | 0 | 1 | 1 | 3 544.43 | 6 666.67 | 3.19 | 213.60 |
| T13 | 0 | 0 | 0 | 5 533.18 | 12 833.33 | 2.28 | 209.58 |
| T14 | 0 | 0 | 0 | 5 198.47 | 13 016.67 | 2.28 | 212.57 |
| T15 | 0 | 0 | 0 | 5 299.61 | 12 450.00 | 2.28 | 203.51 |
| T16 | 0 | 0 | 0 | 5 266.33 | 13 083.33 | 2.27 | 212.47 |
| T17 | 0 | 0 | 0 | 5 353.51 | 12 483.33 | 2.28 | 203.37 |

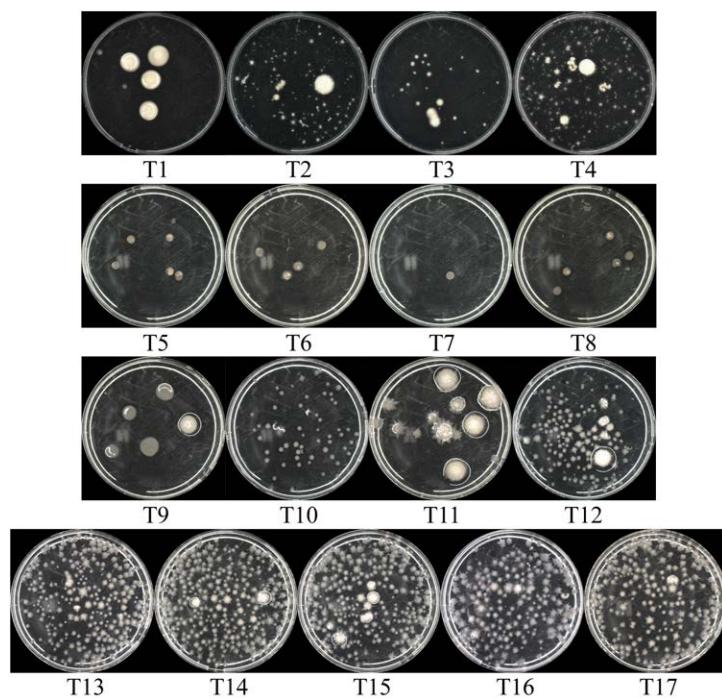


图 7 马桑香菇液体发酵响应面 17 组试验的菌丝球状态

Figure 7 Mycelial sphere status of the response surface of liquid fermentation of *Lentinula edodes* in 17 groups of experiments.

表 7 马桑香菇液体发酵响应面试验生物量干重回归方程系数显著性验证

Table 7 Validation of the significance of the coefficients of the biomass dry weight regression equation for the response surface test of *Lentinula edodes* liquid fermentation

| 方差来源 Source | 平方和 Sum of squares | 自由度 <i>df</i> | 均方 Mean square | F 值 F value | P 值 P value | 显著性 Significance |
|-----------------|-----------------------|------------------|-------------------|----------------|----------------|---------------------|
| 模型 Model | 60 870 000.00 | 9 | 6 764 000.00 | 174.91 | <0.000 1 | * |
| A | 592 000.00 | 1 | 592 000.00 | 15.31 | 0.005 8 | * |
| B | 396 100.00 | 1 | 396 100.00 | 10.24 | 0.015 1 | * |
| C | 2 336 000.00 | 1 | 2 336 000.00 | 60.42 | 0.000 1 | * |
| AB | 35 573.73 | 1 | 35 573.73 | 0.92 | 0.369 4 | - |
| AC | 10 001.00 | 1 | 10 001.00 | 0.26 | 0.626 7 | - |
| BC | 92 163.85 | 1 | 92 163.85 | 2.38 | 0.166 5 | - |
| A^2 | 37 920 000.00 | 1 | 37 920 000.00 | 980.73 | <0.000 1 | * |
| B^2 | 9 580 000.00 | 1 | 9 580 000.00 | 247.73 | <0.000 1 | * |
| C^2 | 5 126 000.00 | 1 | 5 126 000.00 | 132.57 | <0.000 1 | * |
| 残差 Residual | 270 700.00 | 7 | 38 670.16 | | | |
| 失拟项 Lack of fit | 206 600.00 | 3 | 68 859.67 | 4.30 | 0.096 5 | - |
| 纯误差 Pure error | 64 112.15 | 4 | 16 028.04 | | | |
| 总离差 Cor total | 61 150 000.00 | 16 | | | | |

$R^2=0.995\ 6$; Adjusted $R^2=0.989\ 9$; Predicted $R^2=0.944\ 3$; Adeq precision=32.553 6; *: Significant; -: Not significant.

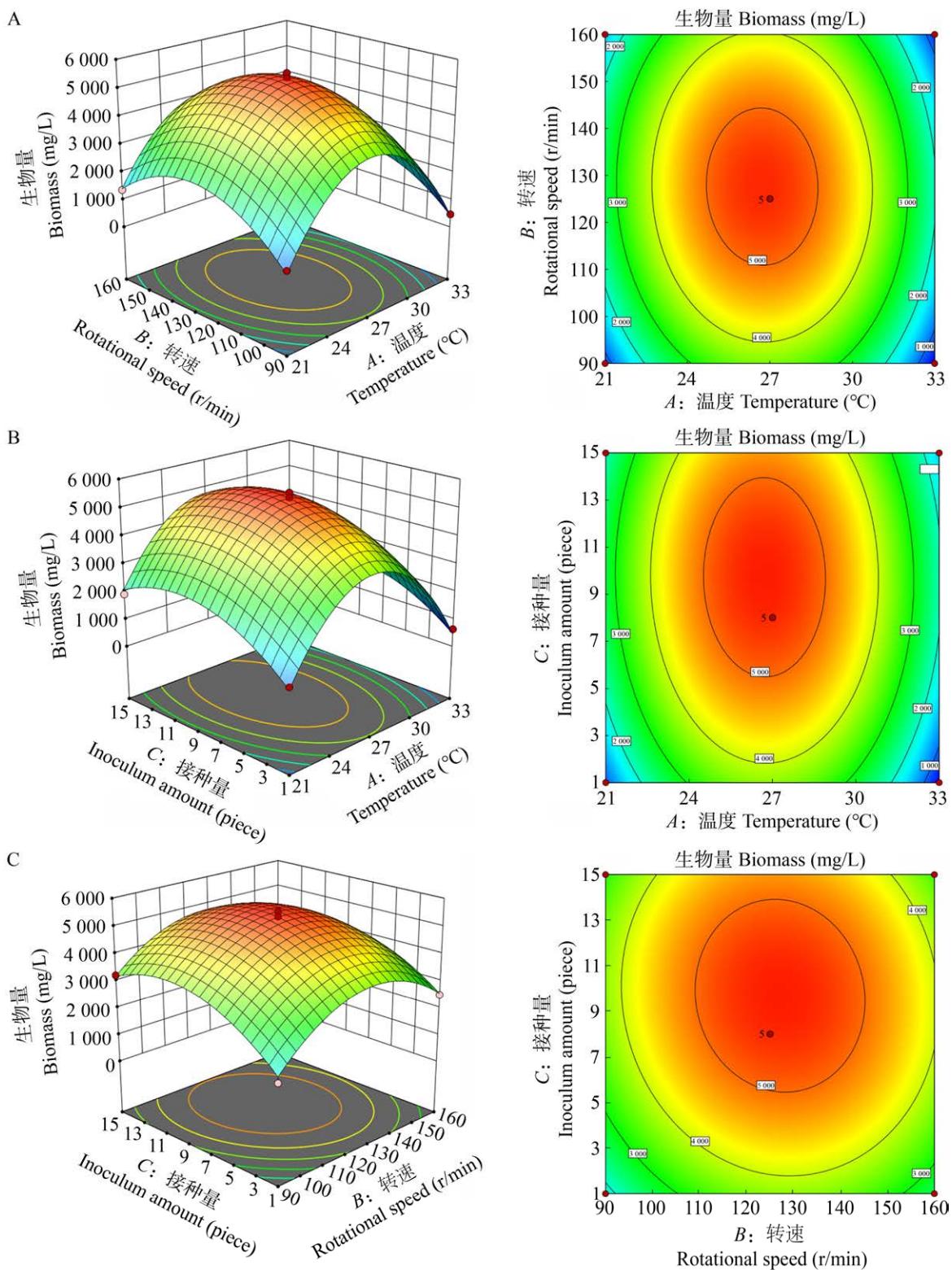


图 8 马桑香菇液体发酵因素交互作用的菌丝球生物量干重响应结果

Figure 8 Results of mycelial bulb biomass dry weight response to the interaction of *Lentinula edodes* liquid fermentation factors.

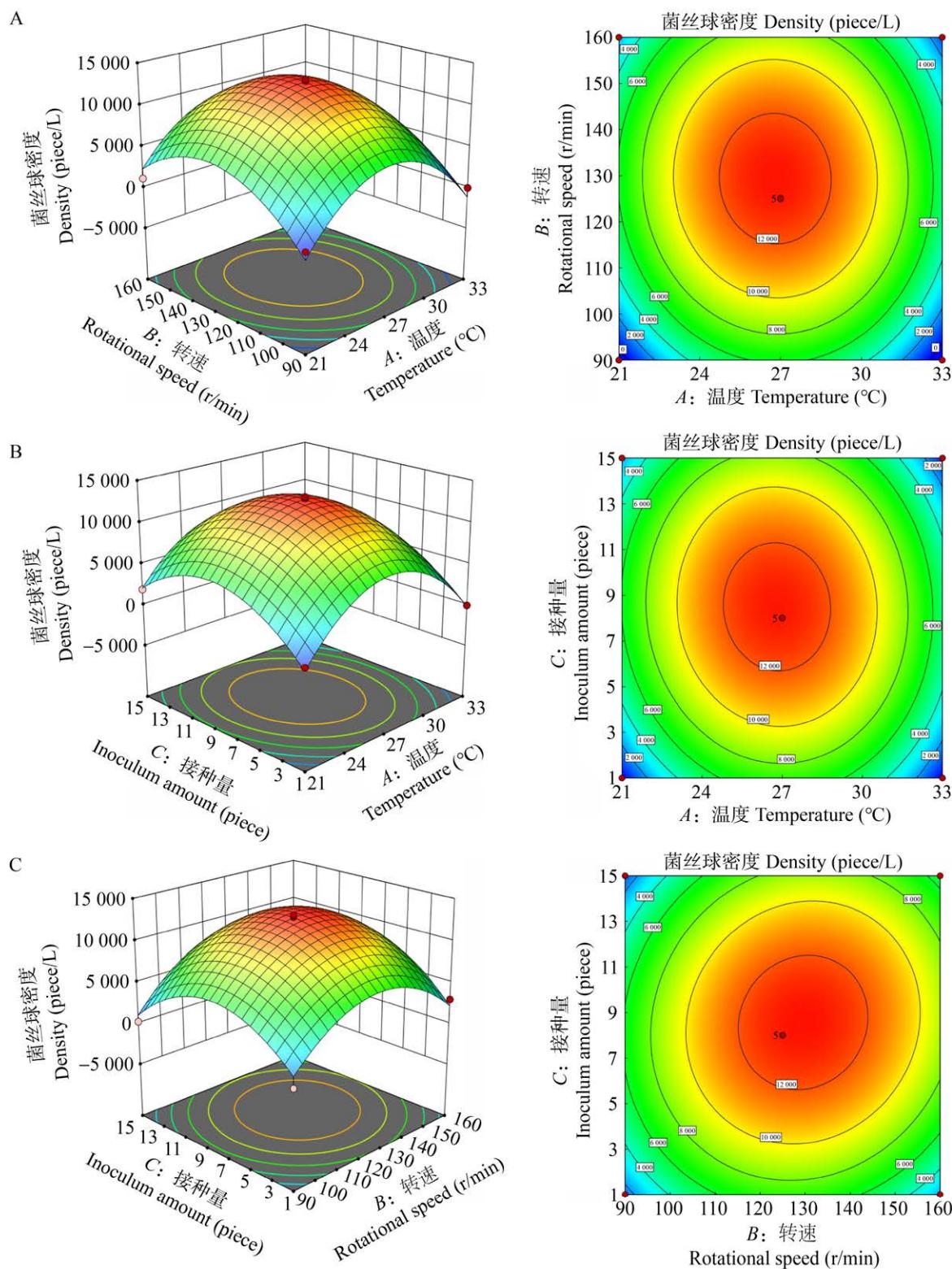


图 9 马桑香菇液体发酵因素交互作用的菌丝球密度响应结果

Figure 9 Results of mycelial bulb density response to the interaction of factors in liquid fermentation of *Lentinula edodes*.

菌丝球平均直径为指标的预测模型代码化方程为 $Y=2.28+1.02A-1.11B-0.2293C+1.29AB+0.2115AC+0.318BC+0.9334A^2+1.25B^2+0.6421C^2$ 。预测模型的 F 值为 55.33, 失拟项 F 值为 0.183 6 且 P 值均 <0.0001 , 2 个参数均达显著水平 ($P<0.05$), 说明该以菌丝球平均直径为指标的模型也不适合精确地预测液体发酵的菌丝球生长状态。但从菌丝球表型结果及预测趋势来看(表 7, 图 7, 图 10), 转速($F=126.27$)和温度($F=105.92$)作为调节因素时, 相较于接种量($F=5.34$)对菌丝球直径有更明显的影响, 并且 AB 交互时影响效果显著($P<0.05$)。随着转速的增大, 菌丝球直径逐渐减小(图 10A、10C); 温度增加, 菌丝球直径则先减小后增大(图 10A、10B); 接种量对菌丝球直径的影响也呈微量的先减小后增大趋势(图 10B、10C), 表明模型预测趋势可行, 但具体参数范围仍需调节。

菌丝球有效接触表面积主要基于菌丝球密度及直径进行延伸, 其预测模型代码化方程为 $Y=208.30-6.55A+33.72B+19.86C+1.89AB-4.82AC+28.00BC-137.85A^2-65.51B^2-60.70C^2$ 。模型的 F 值为 9.16 且 $P=0.004$, 结果显著, 而失拟项 F 值为 186.41 且 $P<0.0001$, 也达显著水平, 说明该以菌丝球有效接触面积的指标不适宜用于液体发酵种状态的预测。由于是基于密度与直径测得结果参数进行的预测, 关联性较强。改变 3 个因素, 菌丝球有效接触表面积变化趋势均是先增大后减小(图 11), 与密度趋势呈正相关, 直径趋势呈负相关。

以菌丝球生物量干重为指标, 当其达最大值时模型预测发酵培养的最佳条件是温度 26.71 °C、转速 127.21 r/min、接种量 9.69 块/100 mL, 此时预测发酵培养 10 d 将有 97.6% 的可能性得到的结果是菌丝球生物量干重 5 409.11 mg/L、菌丝球密度 12 733.07 个/L、菌丝球平均直径

2.15 mm、菌丝球有效接触表面积 211.90 mm²/mL。设定验证预测试验 3 次发酵试验, 预测结果为生物量干重有 95% 可能介于 5 070.78–5 747.44 mg/L 范围、密度有 95% 可能介于 10 712.00–14 754.10 个/L 范围内、菌丝球平均直径有 95% 可能介于 1.66–2.63 mm 范围之间、有效接触表面积有 95% 可能介于 140.97–282.84 mm²/mL 范围内。摇瓶发酵验证结果为生物量干重(5 505.67±93.22) mg/L、密度(13 300.00±204.12) 个/L、菌丝球平均直径 (2.19±0.04) mm、有效接触表面积 (201.47±8.33) mm²/mL, 介于预测范围内, 说明以生物量为核心指标的预测模型精准, 并且非极端培养温度环境下其他 3 个指标的预测也可行。

3 讨论

菌株生物学特性主要分为营养因子及环境因子两大类别, 并且不同菌株差异明显, 但同一种属菌株的环境因子较为一致。杨术江等^[21]研究香菇 818 的菌丝在温度 22–28 °C、pH 5.5–6.0 范围内生长良好; 李宏月等^[22]在对多个野生香菇生物学特性开展考察时也发现大多数菌株在 25 °C 时菌丝生长速度最快; 熊雪等^[23]对野外采集的一株马桑香菇的生物学特性开展研究, 也发现其在 23–25 °C 范围内生长良好。试验中马桑香菇 Le.Msy 的菌丝在 24 °C、pH 5.0–6.0 的弱酸性环境因子下生长良好, 这一结果同其他人对香菇菌种的研究结果相似, 同其他香菇菌株之间的营养因子存在一定共性。菌株对营养因子的需求有较大差异, 不同营养因子会对菌丝及子实体有不同影响, 有研究表明单一的碳源有利于必需氨基酸的产生, 而混合碳源有利于鲜味 5'-核苷酸及生物量的积累, 甚至不同配比的碳源能影响菌丝的耐热性^[24]。高碳氮比有利于海藻糖、阿拉伯糖醇、苹果酸和琥珀酸的产生, 而低比值则有利于甘露醇和柠檬酸的产

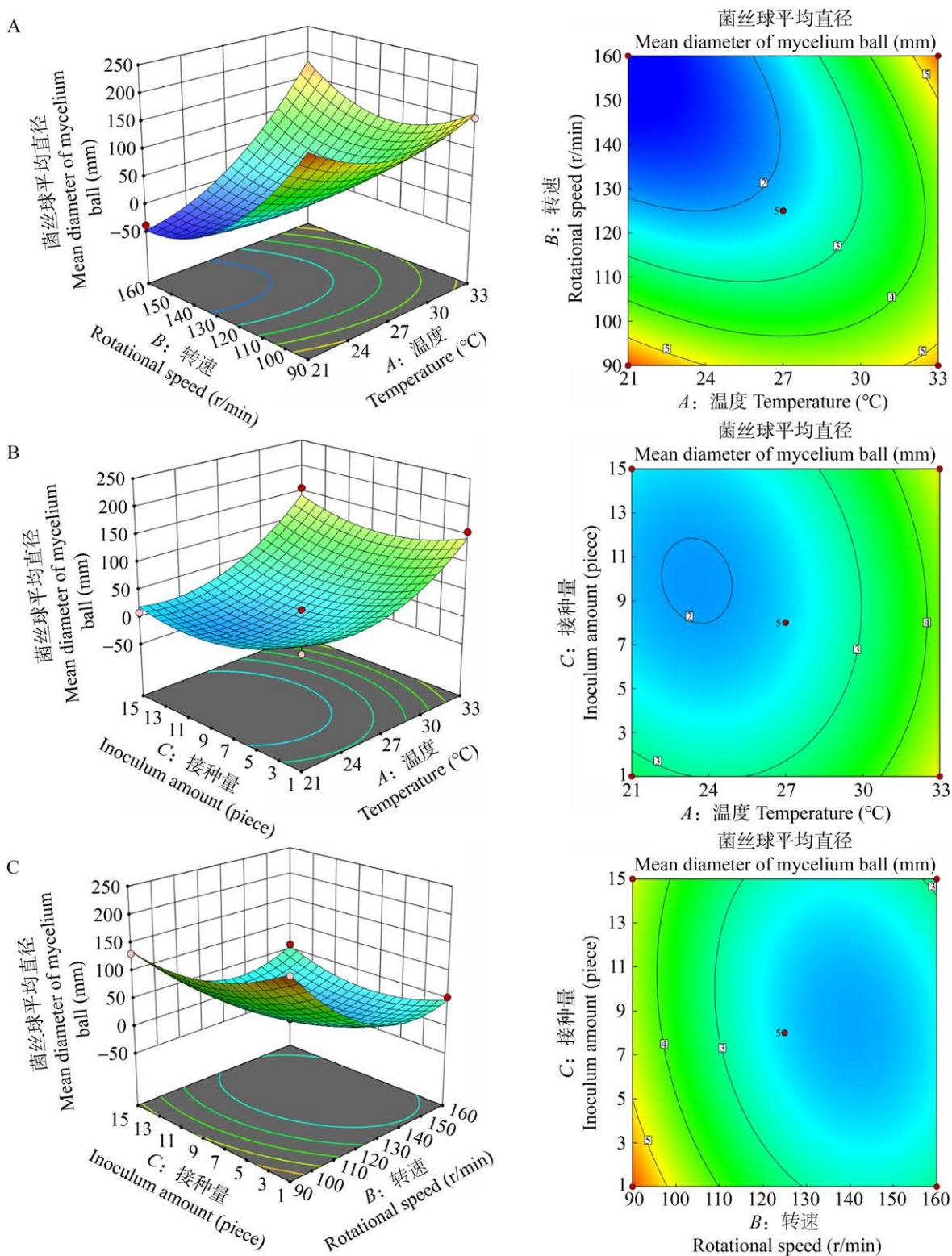


图 10 马桑香菇液体发酵因素交互作用的菌丝球平均直径响应结果

Figure 10 Results of the mean diameter response of mycelial bulb to the interaction of shiitake liquid fermentation factors.

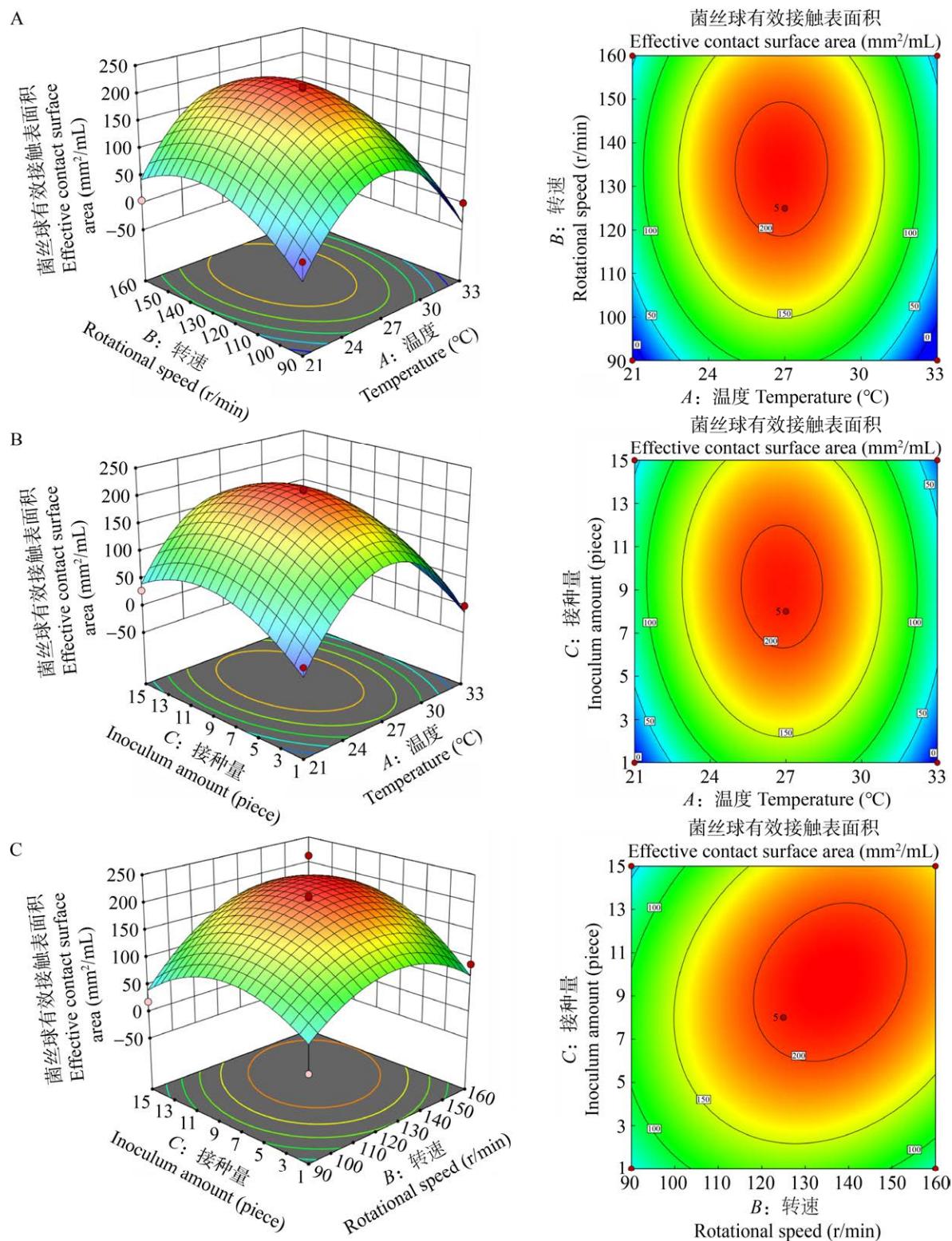


图 11 马桑香菇液体发酵因素交互作用的菌丝球有效接触表面积响应结果

Figure 11 Response results of effective contact surface area of mycelial spheres in response to the interaction of factors in liquid fermentation of *Lentinula edodes*.

生^[25]，并且低于 30 的 C/N 比更能有效诱导香菇菌丝漆酶合成^[26]，更好利用培养基质。王宇星等^[27]在针对香菇菌株‘沪香 F2’开展不同碳氮源对菌种生长发育影响时发现，此菌株以红糖和糖蜜为碳源或以酵母膏为氮源时，有利于香菇菌丝的生长；曾茜等^[28]对香菇‘黔香筛 5 号’开展生物学特性探究时发现最佳碳源为葡萄糖，并且无法利用甘露醇和硝态氮作为营养物质，硫酸铵、蛋白胨作为氮源时更有利于‘黔香筛 5 号’菌丝体生物量的积累。而本试验供试菌株 Le.Msy 在添加 8 种碳源时均能够正常生长，而除尿素外其余氮源也能生长，C/N 比值 20:1 和 30:1 时菌丝状态更佳，可见该菌株对碳源、氮源的供给并没有专一性，栽培时适应的基质类型多、栽培难度低，是一株适宜推广的菌株。无机盐对菌丝生长速度、关键酶酶活、多糖关键酶基因转录表达水平等有较大影响^[29-31]，试验发现菌株 Le.Msy 添加硫酸镁、氯化镁时菌丝长势优于其他无机盐，对镁离子有嗜好性，在母种培养或栽培时适当添加含镁无机盐能提高菌丝活力。

通过优化菌种培养条件，能有效提高菌种活力和稳定性、提升优良菌种产量和质量、缩短培养周期、提高菌种的抗逆性和竞争力从而减少污染风险、降低生产成本、提高母种一致性^[32-35]。通过正交试验，确认了菌株 Le.Msy 菌丝培养的最佳碳氮源与无机盐的组合为麦芽糖、麸皮、硫酸镁，并通过基于菌落直径为指标构建的生长预测模型确认了菌种适宜的固体培养基主要配比用量为麦芽糖 23.05 g/L、麸皮 6.14 g/L、硫酸镁 5.48 g/L。然而王颖等^[36]发现香菇‘808’菌株添加蔗糖 14.36 g/L、玉米粉 30.00 g/L、麦麸 28.10 g/L、酵母膏 0.70 g/L 且 180 r/min 振荡培养 10 d 时菌丝生物量最佳。由此不难看出，在菌株 Le.Msy 进行大规模发酵培养时，碳氮源总用量较少，并且优化后的培养基能保证该菌

株在此条件下长势最佳，能维持菌种最佳活力；相较一些香菇菌株，生产时能节约大量成本，同时根据预测模型和单因素筛选的结果更换其他对长势影响相近的营养源，防止菌种退化，为良种保藏奠定基础。

液体菌种在适宜的条件下可以迅速增殖，大大缩短了菌种培养的时间，提高了生产效率，并且菌种均匀性好^[37]。目前已在大球盖菇、杏鲍菇、木耳等多种食用菌工厂化栽培中广泛应用^[38-40]。谢婷等^[41]对香菇菌株森源 16 进行液体发酵条件优化时得出最优转速为 170 r/min；韩冰等^[42]发现香菇菌株辽香 6 号上摇床前静置 24 h，摇床转速 150 r/min 时为最佳发酵培养条件；李春霞等^[43]针对香菇进行液体发酵优化结果显示，菌株 0912 静置 24 h、转速 180 r/min 时最佳，并且培养 10 d 时菌丝干重达到 210 mg/L；徐思炜等^[44]则发现 180 r/min 是最佳发酵转速，并且液体发酵时转速对菌丝球生物量的影响大于接种量。我们也对菌株 Le.Msy 液体发酵的关键因素进行了参数优化，通过构建以生物量干重为指标的模型能够预测发酵菌种的状态，最终确定温度 26.71 °C、转速 127.21 r/min、接种量 9.69 块/100 mL 为最适的液体发酵条件，这一结果同魏雅冬等^[45]得出的结果相近。由此可见，菌种 Le.Msy 相较于森源 16、辽香 6 号、0912 等菌株，其发酵转速约 130 r/min 时就能达到最佳状态，并且同样发酵 10 d，菌丝球生物量就已高达(5 505.67±93.22) mg/L，相较 0912 的 2 103 mg/L 而言高出约 2.62 倍。不难看出菌株 Le.Msy 相较大多数香菇菌株而言，液体发酵时较低的转速即可获得理想状态，并且从表 7 得知以生物量干重为衡量指标时 3 个因素的影响能力为接种量($F=60.42$)>温度($F=15.31$)>转速($F=10.26$)；而徐思炜等^[44]对其他香菇菌种的研究发现转速的影响能力最强，这表明生产时菌株 Le.Msy 不仅需要转速较低，并且能通过提高

接种量来达到最佳状态，能大大节省发酵培养时设备的能源消耗。

试验中液体培养时所需温度高于固体平板，猜测是由于液体比热容导致的差异。此外，转速越大菌丝球越细小，意味着接种后菌种的有效接触面积更多，以菌丝球直径最小值为指标，发现转速高于 120 r/min 后菌丝球直径基本一致，再加大转速也不会产生明显影响；接种量也对菌丝球状态有明显影响，较多或较少的接种量并不会显著增加菌丝球密度，需要给菌种适宜的生长密度空间。在发酵参数条件优化时，以菌丝球生物量干重为指标建立的模型能够精确预测发酵状态，而以菌丝球密度、直径、有效接种面积为指标的模型却无法精确预测，这是由于在试验中设置 33 °C 的培养温度下(响应处理 T2、T4、T6、T8 组)，接入液体的菌种块由于温度胁迫，生长极其缓慢，导致在相同培养期间菌块仅萌发，从而影响了模型的预测。但除去这一极端温度条件作为培养参数时，其余的生理表型均能同模型预测值基本对应，因此并非模型不能预测，而是未在合理范围内，若将温度参数调整至合理区间，仍能准确预测马桑香菇 Le.Msy 的发酵状态。

4 结论

本文对野生马桑香菇菌株 Le.Msy 进行分离纯化，经鉴定是香菇(*Lentinula edodes*)。对菌株母种培养条件系统化研究，通过单因素试验确定菌株 Le.Msy 在 24 °C 和 pH 5.0–6.0 的环境中生长最佳，并且对碳源的选择性不强，但对氮源表现出一定的偏好，其中尿素不能作为其生长发育所需的元素供给，当碳氮比为 20:1 和 30:1 时，菌丝生长最为理想。此外，菌株对无机盐中镁离子的需求最为明显，有典型的嗜好性。基于正交试验明确菌株生长的最佳培养基

碳源、氮源、无机盐为麦芽糖、麸皮、硫酸镁，响应面优化其用量为碳源 23.05 g/L、氮源 6.14 g/L、无机盐 5.48 g/L。菌株液体发酵条件的参数优化为温度 26.71 °C、转速 127.21 r/min、接种量 9.69 块/100 mL，此时菌丝球的密度大、直径小，并且利用菌丝球干重为指标构建的响应面模型能准确反映了菌丝的发育情况。这为马桑香菇的低成本高效率生产提供了有价值的参考，并奠定了开发应用的理论基础。

REFERENCES

- [1] LINDEQUIST U. Medicinal mushrooms as multicomponent mixtures-demonstrated with the example of *Lentinula edodes*[J]. Journal of Fungi, 2024, 10(2): 153.
- [2] 李玉花, 杨明, 张银凤, 王书, 徐先锋. 香菇化学成分及药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(4): 967-971.
LI YH, YANG M, ZHANG YF, WANG S, XU XF. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Lentinus edodes*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2024, 35(4): 967-971 (in Chinese).
- [3] 张淇淇, 周良, 朱俊豪, 黄凯丰. 香菇的药用价值及其产品发展前景[J]. 长江蔬菜, 2020(2): 38-43.
ZHANG QQ, ZHOU L, ZHU JH, HUANG KF. Medicinal value and product development prospects of *Lentinus edodes*[J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2020(2): 38-43 (in Chinese).
- [4] CHAKRABORTY S, BEURA M, SHARMA SK, SINGH A, DAHUJA A, KRISHNAN V. Lentinan, β -glucan from shiitake (*Lentinula edodes*): a review on structure, conformational transition, and gastro-intestinal interaction contributing towards its anti-diabetic potential[J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 142: 104224.
- [5] AHMAD I, ARIF M, XU MM, ZHANG JY, DING YT, LYU F. Therapeutic values and nutraceutical properties of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 134: 123-135.
- [6] ROSA FM, MOTA TFM, BUSSO C, de ARRUDA PV, BRITO PEM, MIRANDA JPM, TRENTIN AB, DEKKER RFH, Da CUNHA MAA. Filamentous fungi as bioremediation agents of industrial effluents: a systematic review[J]. Fermentation, 2024, 10(3): 143.
- [7] KUMAR P, EID EM, AL-HUQAIL AA, ŠIRIĆ I, ADELODUN B, ABOU FAYSSAL S, VALADEZ-BLANCO R, GOALA M, AJIBADE FO, CHOI KS, KUMAR V. Kinetic studies on delignification and heavy metals uptake by shiitake (*Lentinula edodes*) mushroom cultivated on agro-industrial wastes[J]. Horticulturae, 2022, 8(4): 316.
- [8] 孙波, 赵会长, 周洪英, 刘启燕, 吴建志, 王卓仁. 香菇

- 工厂化生产研究进展[J]. 北方园艺, 2024(18): 122-128.
- SUN B, ZHAO HC, ZHOU HY, LIU QY, WU JZ, WANG ZR. Research progress on factory cultivation of *Lentinus edodes*[J]. Northern Horticulture, 2024(18): 122-128 (in Chinese).
- [9] 张清洋, 李文学, 杨军, 盛立柱, 朱姝蕊, 朱星考. 我国食用用菌新品种保护现状与基本对策: 以植物新品种保护条例为法律渊源[J]. 食药用菌, 2020, 28(2): 98-102.
- ZHANG QY, LI WX, YANG J, SHENG LZ, ZHU SR, ZHU XK. Status and measures of the protection of new varieties of edible and medicinal mushroom in China[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2020, 28(2): 98-102 (in Chinese).
- [10] 朱姝蕊, 张清洋. 日本森产业株式会社食用菌品种权布局分析[J]. 食用菌, 2021, 43(1): 1-5, 10.
- ZHU SR, ZHANG QY. Analysis on distribution of edible fungi strain right of Mori Industry Limited Company[J]. Edible Fungi, 2021, 43(1): 1-5, 10 (in Chinese).
- [11] 王英杰, 邹大伦. 贵州高寒地区马桑香菇的调查[J]. 食用菌科技, 1983, 2(1): 40-42.
- WANG YJ, ZOU DL. Investigation on mushroom of *Coriaria sinica* in Guizhou alpine region[J]. Edible Fungi of China, 1983, 2(1): 40-42 (in Chinese).
- [12] 吴宸印. 马桑菌(*Lentinula edodes*)子实体不同发育阶段转录组分析及开伞相关基因预测[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2023.
- WU CY. Analysis of the transcriptome at various phases of "Masangjun" (*Lentinula edodes*) fruit body development and identification of genes associated with pileus opening[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2023 (in Chinese).
- [13] 龙汉武, 潘高潮, 乔东生, 邹方伦, 孙燕. 贵州省一种野生马桑香菇香气成分分析[J]. 中国食用菌, 2019, 38(1): 107-108.
- LONG HW, PAN GC, QIAO DS, ZOU FL, SUN Y. Analysis of aroma components in a wild mushroom of *Coriaria* in Guizhou Province[J]. Edible Fungi of China, 2019, 38(1): 107-108 (in Chinese).
- [14] 刘妮, 李浪, 孙燕, 王玉珠, 陈宵. 9种食用菌菌丝不同生长阶段形态观察[J]. 贵州科学, 2021, 39(5): 21-23.
- LIU N, LI L, SUN Y, WANG YZ, CHEN X. Morphological observation of 9 kinds of edible fungi at different growth stages[J]. Guizhou Science, 2021, 39(5): 21-23 (in Chinese).
- [15] 刘远伦, 曾庆庆, 吴康, 周丹, 兰宣莲. 不同树种培养料对马桑香菇菌丝生长及产量的影响[J]. 食药用菌, 2023, 31(3): 187-190.
- LIU YL, ZENG QQ, WU K, ZHOU D, LAN XL. Effects of different tree species culture materials on the mycelial growth and yield of wild *Lentinula edodes*[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2023, 31(3): 187-190 (in Chinese).
- [16] 刘远伦, 欧胜平, 曾庆庆, 吴康, 周丹, 兰宣莲. 马桑香菇的栽培技术[J]. 食用菌, 2023, 45(3): 35-37.
- LIU YL, OU SP, ZENG QQ, WU K, ZHOU D, LAN XL. Cultivation techniques of *Lentinus edodes* grown on *Coriaria sinica*[J]. Edible Fungi, 2023, 45(3): 35-37 (in Chinese).
- [17] 熊雪, 李鹏, 张贵合, 向准, 陶文广, 周光燕, 和耀威. 不同栽培基质诱导对香菇液体发酵产漆酶活性的影响[J]. 生物技术通报, 2021, 37(12): 50-59.
- XIONG X, LI P, ZHANG GH, XIANG Z, TAO WG, ZHOU GY, HE YW. Effects of different cultivation substrates on the laccase activities of *Lentinula edodes* during liquid fermentation[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(12): 50-59 (in Chinese).
- [18] 张扬, 钱磊, 訾惠君, 周永斌, 张志军. 响应面分析法在食用菌领域的应用[J]. 中国食用菌, 2021, 40(5): 1-4.
- ZHANG Y, QIAN L, ZI HJ, ZHOU YB, ZHANG ZJ. Application of response surface analysis in the field of edible fungi[J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(5): 1-4 (in Chinese).
- [19] 周武, 王丽, 李鸣雷. 响应面法在食用菌研究中的应用概述[J]. 食用菌, 2024, 46(3): 4-8.
- ZHOU W, WANG L, LI ML. Overview of application of response surface methodology in the study of edible fungi[J]. Edible Fungi, 2024, 46(3): 4-8 (in Chinese).
- [20] ZHAO FY, WANG QL, AN XM, TAN QF, YUN JM, ZHANG YB. Oxidative damage from repeated tissue isolation for subculturing causes degeneration in *Volvariella volvacea*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1210496.
- [21] 杨术江, 郝荣月, 赵建荣, 李天琴. 香菇 818 生物学特性及栽培技术要点[J]. 食用菌, 2017, 39(5): 61-62.
- YANG SJ, HAO RY, ZHAO JR, LI TQ. Biological characteristics and cultivation techniques of *Lentinus edodes* 818[J]. Edible Fungi, 2017, 39(5): 61-62 (in Chinese).
- [22] 李宏月, 欧小云, 刘斌. 野生香菇菌株鉴定及其栽培菌株的生物学特性比较[J]. 广东农业科学, 2023, 50(9): 59-67.
- LI HY, OU XY, LIU B. Identification of two wild *Lentinula edodes* strains and their biological characteristics comparing with the cultivated strains[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2023, 50(9): 59-67 (in Chinese).
- [23] 熊雪, 李鹏, 廖小峰, 向准, 邓春英, 汪建文. 野生马桑香菇的鉴定及其生物学特性[J]. 北方园艺, 2021(4): 118-123.
- XIONG X, LI P, LIAO XF, XIANG Z, DENG CY, WANG JW. Identification and biological characteristics of wild *Lentinus edodes*[J]. Northern Horticulture, 2021(4): 118-123 (in Chinese).
- [24] MAHMUD A, OHMASA M. Effects of cultural conditions on high temperature tolerance of *Lentinula edodes* mycelia[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2008, 11(3): 342-350.
- [25] LI W, CHEN WC, YANG Y, ZHANG JS, FENG J, YU HL, ZHOU S, LI XB, LIU YF. Effects of culture substrates on taste component content and taste quality of *Lentinula edodes*[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2017, 52(4): 981-991.
- [26] D'AGOSTINI ÉC, MANTOVANI TRD, DO VALLE JS, PACCOLA-MEIRELLES LD, COLAUTO NB, LINDE GA. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation[J]. Scientia Agricola, 2011, 68(3): 295-300.
- [27] 王宇星, 董浩然, 章炉军, 李玉, 李巧珍, 谭琦, 赵勇, 周峰. 不同碳氮源对香菇液体菌种生长的影响[J]. 上海农业学报, 2024, 40(1): 40-46.
- WANG YX, DONG HR, ZHANG LJ, LI Y, LI QZ, TAN Q, ZHAO Y, ZHOU F. Effects of different carbon and nitrogen sources on liquid spawn growth of *Lentinula edodes*[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2024,

- 40(1): 40-46 (in Chinese).
- [28] 曾茜, 陈旭, 杨雨, 杨仁德, 王晓敏. 野生香菇黔香5号菌丝的生物学特性及抗氧化活性[J]. 西南农业学报, 2022, 35(3): 558-563.
- ZENG Q, CHEN X, YANG Y, YANG RD, WANG XM. Biological characteristics and antioxidant activities of wild *Lentinula edodes*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2022, 35(3): 558-563 (in Chinese).
- [29] 侯诗瑶, 何茂兰, 辜运富, 陈强, 向泉桔. 钾和锰对香菇菌丝体多糖含量及多糖合成关键酶的影响[J]. 四川农业大学学报, 2024, 42(3): 580-588.
- HOU SY, HE ML, GU YF, CHEN Q, XIANG QJ. Study on the effect of potassium and manganese on the content of *Mycelium* polysaccharide and activities of key enzymes related to polysaccharide biosynthesis of *Lentinula edodes*[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2024, 42(3): 580-588 (in Chinese).
- [30] 袁思明, 房丽丽, 何德, 李翠新. 一株野生香菇的鉴定及菌丝最佳生长条件研究[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2016, 34(1): 77-80.
- YUAN SM, FANG LL, HE D, LI CX. Identification of a strain of wild *Lentinula edodes* and study on the optimum growth conditions of its *Mycelium*[J]. Journal of HuBei Minzu University (Natural Science Edition), 2016, 34(1): 77-80 (in Chinese).
- [31] 姜海云, 孙振英, 刘贵巧. 锌诱导对香菇菌丝生长速度及金属硫蛋白含量的影响[J]. 中国无机分析化学, 2024, 14(1): 18-25.
- JIANG HY, SUN ZY, LIU GQ. Effect of zinc induction on the growth rate and metallothionein content of shiitake mushroom hyphae[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2024, 14(1): 18-25 (in Chinese).
- [32] FLORES-MARTIN SN, ISLA A, AGUILAR M, BARRIENTOS CA, BLANCO JA, RAUCH MC, ENRÍQUEZ R, ARCOS C, YAÑEZ AJ. Optimizing culture medium to facilitate rapid *Renibacterium salmoninarum* growth[J]. Aquaculture, 2024, 587: 740798.
- [33] 王逸初, 白妍, 贺晓龙, 刘月芹, 靳鹏飞, 高小朋. 北虫草液体菌种培养基优化及胞外多糖抗氧化性初探[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2024, 43(1): 1-7.
- WANG YC, BAI Y, HE XL, LIU YQ, JIN PF, GAO XP. Optimization of liquid culture medium and study on the antioxidant activity of exopolysaccharides of *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Yan'an University (Natural Science Edition), 2024, 43(1): 1-7 (in Chinese).
- [34] 陈飞, 韩冰, 于广峰, 钟丽娟, 柴林山, 郭玲玲. 红托竹荪菌种快速分离培养基优化[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(6): 54-61.
- CHEN F, HAN B, YU GF, ZHONG LJ, CHAI LS, GUO LL. Optimization of culture medium for rapid strain isolation of red *Volva dictyophora* (*Dictyophora rubrovolvata*)[J]. Journal of Microbiology, 2023, 43(6): 54-61 (in Chinese).
- [35] BIKO OD, VILJOEN-BLOOM M, van ZYL WH. Medium optimization for enhanced production of recombinant lignin peroxidase in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Letters, 2023, 45(1): 105-113.
- [36] 王颖, 陈琰, 陈文强, 彭浩, 邓百万, 解修超, 何强. 基于胞外多糖和菌丝生物量的香菇发酵培养基优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(12): 176-181.
- WANG Y, CHEN Y, CHEN WQ, PENG H, DENG BW, XIE XC, HE Q. Optimization of fermentation medium for extracellular polysaccharides and biomass by *Lentinus edodes*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(12): 176-181 (in Chinese).
- [37] 李真进. 食用菌液体菌种培养与应用技术要点[J]. 世界热带农业信息, 2024(5): 19-21.
- LI ZJ. Key points of liquid strain culture and application of edible fungi[J]. World Tropical Agriculture Information, 2024(5): 19-21 (in Chinese).
- [38] 陆兰芳, 王杰, 谌金吾, 李琳琪, 孙厚静, 王明鸾, 郭显会. 大球盖菇液体菌种筐式栽培初探[J]. 食用菌, 2024, 46(2): 57-59.
- LU LF, WANG J, CHEN JW, LI LQ, SUN HJ, WANG ML, GUO XH. A preliminary study on the basket cultivation of liquid strains of *Stropharia rugosoannulata*[J]. Edible Fungi, 2024, 46(2): 57-59 (in Chinese).
- [39] 李玉, 刘四海, 尚晓冬, 李巧珍, 宋春艳, 周峰, 谭琦. 我国香菇工厂现状及液体菌种技术在产业中的实践[J]. 食药用菌, 2023, 31(4): 213-218.
- LI Y, LIU SH, SHANG XD, LI QZ, SONG CY, ZHOU F, TAN Q. Current situation of industrial production and application of liquid culture technology of *Lentinula edodes* in China[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2023, 31(4): 213-218 (in Chinese).
- [40] 张翠娥, 赵书光, 张亚楠. 杏鲍菇工厂化液体菌种生产技术探讨[J]. 农业开发与装备, 2023(8): 164-165.
- ZHANG CE, ZHAO SG, ZHANG YN. Discussion on industrial liquid strain production technology of *Pleurotus eryngii*[J]. Agricultural Development & Equipments, 2023(8): 164-165 (in Chinese).
- [41] 谢婷, 何娟, 张顺凯, 焦海涛, 边银内, 肖扬. 香菇液体菌种培养基及摇瓶培养条件优化[J]. 食药用菌, 2021, 29(3): 242-249.
- XIE T, HE J, ZHANG SK, JIAO HT, BIAN YB, XIAO Y. Optimization of liquid spawn media and shake flask culture conditions of *Lentinula edodes*[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2021, 29(3): 242-249 (in Chinese).
- [42] 韩冰, 陈顺, 于广峰, 王洪奇, 冀宝营, 孙立梅, 关艳丽, 郭玲玲. 香菇液体深层发酵优化研究[J]. 食用菌, 2019, 41(4): 19-21.
- HAN B, CHEN S, YU GF, WANG HQ, JI BY, SUN LM, GUAN YL, GUO LL. Optimization of submerged fermentation of *Lentinus edodes*[J]. Edible Fungi, 2019, 41(4): 19-21 (in Chinese).
- [43] 李春霞, 吴建金, 黄亮, 孙宁, 王玉, 班立桐. 香菇0912液体菌种培养基及摇瓶发酵条件的筛选[J]. 天津农业科学, 2019, 25(2): 1-6.
- LI CX, WU JJ, HUANG L, SUN N, WANG Y, BAN LT. Screening of liquid medium and fermentation conditions for *Lentinus edodes* 0912 by shaking flask[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2019, 25(2): 1-6 (in Chinese).
- [44] 徐思炜, 张君胜, 周雯. 香菇液体菌种培养条件优化[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 290-292.
- XU SW, ZHANG JS, ZHOU W. Optimization of liquid culture conditions of *Lentinus edodes*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(12): 290-292 (in Chinese).
- [45] 魏雅冬, 王广慧, 郭海滨, 李贺, 李艳芳. 香菇液体发酵培养基的优化研究[J]. 北方园艺, 2015(12): 136-138.
- WEI YD, WANG GH, GUO HB, LI H, LI YF. Study on optimization of mushrooms liquid fermentation medium[J]. Northern Horticulture, 2015(12): 136-138 (in Chinese).