



青島農業大學

学士学位论文

题 目	鹿茸菇菌丝培养条件优化研究
姓 名	侯杰
学 号	20180203010
学 院	生命科学学院
专 业	生物技术(食用菌)
班 级	201801
指导教师	郭立忠

二〇二二年五月

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年 月 日

学位论文授权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：

年 月 日

指导教师（签名）：

年 月 日

鹿茸菇菌丝培养条件优化研究

摘要:以鹿茸菇为实验材料,探究不同营养条件以及环境条件对鹿茸菇菌丝体生长的影响,筛选最优的培养条件。单因素试验结果表明,葡萄糖为鹿茸菇菌丝体营养生长最适宜的碳源,麸皮是最适宜的氮源,最适培养温度是 24℃,最适 pH 值为 5.75。正交试验结果表明,鹿茸菇双核菌丝固体培养基最优配方为马铃薯 200.00g/L、葡萄糖 25.00g/L、麸皮 10.00g/L、 KH_2PO_4 1.50g/L、 MgSO_4 1.00g/L、琼脂 20.00g/L;鹿茸菇单核菌丝固体培养基的最优配方为马铃薯 200.00g/L、葡萄糖 25.00g/L、麸皮 10.00g/L、 KH_2PO_4 0.50g/L、 MgSO_4 0.50g/L、琼脂 20.00g/L。响应面法优化液体发酵培养基的实验结果表明,鹿茸菇菌丝体液体发酵培养基的最优配方为马铃薯 200.00g/L、葡萄糖 25.00g/L、麸皮 7.75g/L、 KH_2PO_4 1.50g/L、 MgSO_4 1.62g/L。

关键词:鹿茸菇;培养条件筛选;响应面;优化

Optimization of Mycelium Culture Conditions for *Lyophyllum decastes*

Abstract: Using *Lyophyllum decastes* as the experimental material, the effects of different nutritional conditions and environmental factors on the fungus growth of *Lyophyllum decastes* were explored, and then the optimal culture conditions were investigated. The univariate test results showed that glucose is the most suitable carbon source for nutrient growth, and bran is the most suitable nitrogen source, with the optimal culture temperature of 24°C and the optimal pH value of 5.75. The results of orthogonal test showed that the optimal formula of binucleate mycelium solid medium was potato 200.00g / L, glucose 25.00g / L, bran 10.00g / L, KH_2PO_4 1.50g / L, MgSO_4 1.00g / L and agar 20.00g / L; The optimal formula for mononuclear hyphae solid medium was potato 200.00g / L, glucose 25.00g / L, bran 10.00g / L, KH_2PO_4 0.50g / L, MgSO_4 0.50g / L, and agar 20.00g / L. The experimental results of optimizing liquid fermentation medium in response to surface method showed that the optimal formulation of liquid fermentation medium of *Lyophyllum decastes* was potato 200.00g / L, glucose 25.00g / L, bran 7.75g / L, KH_2PO_4 1.50g / L and MgSO_4 1.62g / L.

Key words: *Lyophyllum decastes*; Selection of culture conditions; response surface; optimization

目 录

1 文献综述	1
1.1 鹿茸菇简介	1
1.2 研究目的与意义	1
2 仪器材料	2
2.1 实验材料	2
2.2 实验仪器	2
3 实验方法	2
3.1 菌种复壮	2
3.2 鹿茸菇菌丝固体培养	3
3.2.1 碳氮比的筛选	3
3.2.2 碳源、氮源筛选	3
3.2.3 维生素筛选	4
3.2.4 培养温度筛选	5
3.2.5 酸碱度筛选	5
3.2.6 四因素三水平正交试验	5
3.2.7 添加菇根粉筛选	6
3.3 鹿茸菇菌丝液体发酵培养	6
4 结果分析	7
4.1 菌丝复壮结果	7
4.2 鹿茸菇菌丝固体培养结果	7
4.2.1 碳氮比筛选结果	7
4.2.2 碳源、氮源筛选结果	8
4.2.3 维生素筛选结果	11
4.2.4 培养温度筛选结果	12
4.2.5 酸碱度筛选结果	13
4.2.6 四因素三水平正交试验筛选结果	15
4.2.7 添加菇根粉筛选结果	17
4.3 鹿茸菇液体发酵培养结果	17

4.3.1	Box-Behnken 试验设计以及模型可行性分析	17
4.3.2	响应面分析	19
5	总结	21
5.1	鹿茸菇菌丝固体培养结果	21
5.2	鹿茸菇液体发酵培养结果	21
	参考文献	22
	致谢	24

1 文献综述

1.1 鹿茸菇简介

鹿茸菇，学名为荷叶离褶伞（*Lyophyllum decastes*），属担子菌亚门（Basidiomycotina），伞菌目（Agaricales），白蘑科（Tricholomataceae），离褶伞属（*Lyophyllum*）^[1]。野生鹿茸菇是一种珍贵的食用菌，广泛分布于北半球的温带地区，在我国的西藏、新疆、江苏、云南、甘肃等地都有分布^[2]。

鹿茸菇鲜美可口，营养丰富，营养价值高，子实体富含膳食纤维^[3]、粗蛋白和氨基酸，脂肪较少，且含有人体需要的多种微量元素^[4]。鹿茸菇还具有药用价值，其子实体含有多种活性物质，具有提高免疫力、抑制肿瘤的生长^[5]，抗菌作用^[6-7]、降低血糖和血脂^[8-9]等功效，在防治癌细胞和抑制先天性糖尿病具有显著的效果，对特异性皮肤炎具有非常好的抑制作用^[10]。

1.2 研究目的与意义

固体培养和液体培养是当前食用菌菌种培养的主要方式。固体培养基存在菌丝生长较慢的缺点，但是便于菌种的保存。能够在较短时间内培养出大量的菌丝体以及菌种发酵液是液体培养基的优势，用于制作液体菌种，在工厂化生产中，液体培养基在种子液的制备、接种操作和后期菌丝的生长中都具有较大的优势，但是液体菌种存在菌种老化快、不耐储存的缺点。

本课题以鹿茸菇单核和双核菌丝为研究对象，通过改变培养基的营养成分和菌丝生长环境条件，进行菌丝培养条件的优化，期望能够获得最适合菌丝体营养生长的培养基，从而获得优质的固体菌种和液体菌种，筛选出适合工厂化生产的优质高产菌株，对提高我国鹿茸菇产品的附加值有着重要意义，可为鹿茸菇工厂化生产提供一定的理论依据。

单核菌丝具有生长缓慢，菌丝致密度较低等缺点，不管是从菌丝培养还是在育种方面都是不利的因素，进行单核菌丝培养条件的筛选，获得适宜单核菌丝生长的培养条件，从而提高菌丝生长的速率等，这为以单核菌丝为研究对象的科研工作以及育种工作提供了便利。双核菌丝培养条件的优化主要应用于工厂化的生产中，通过对双核菌丝培养基的优化，获得生长活力旺盛的菌丝体及其培养条件，可以为工厂化生产提供理论依据。

2 仪器材料

2.1 实验材料

实验选用鹿茸菇的菌种：青岛农业大学农业应用真菌实验室保存的鹿茸菇菌株。

实验所需的主要试剂：葡萄糖、麦芽糖、可溶性淀粉、果糖、蔗糖、乳糖、蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、尿素、硫酸铵、麸皮、玉米粉、维生素、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、琼脂等。

2.2 实验仪器

实验使用仪器型号及公司见表 2.1。

表 2.1 使用仪器表

仪器名称	仪器公司
SW-CJ-2FD 型双人双面净化工作台	苏州净化设备有限公司
LDZF-75L 立式高压蒸汽灭菌器	上海申安医疗器材厂
DPX-9051B-1 电热恒温培养箱	上海福玛实验设备有限公司
震荡培养箱 ZQZY-A8 型	上海知楚仪器有限公司

3 实验方法

3.1 菌种复壮

保藏用的菌种为减缓菌丝退化，其菌种活力都较弱，在生产以及科研过程中为了获得菌丝长势较好、活力旺盛的菌丝，需要进行菌种的复壮。

菌种复壮所使用培养基为筛选实验中使用的的基础培养基：马铃薯 200.00g/L、葡萄糖 20.00g/L、蛋白胨 2.00g/L、 KH_2PO_4 1.00g/L、 MgSO_4 0.50g/L、琼脂 20.00g/L^[11]。

按照配方配制的培养基，于 121℃下高温高压灭菌 20 分钟。在无菌的单人双面净化工作台中倒平板，并完成接菌操作，在 25℃恒温培养箱中进行平板培养。

3.2 鹿茸菇菌丝固体培养

3.2.1 碳氮比的筛选

选择碳氮比有 15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、50:1，固定葡萄糖的用量，根据碳氮比计算蛋白胨的用量。配制培养基，将培养基于 121℃下灭菌 20 分钟。把直径为 5mm 的打孔器放在超净工作台中用酒精灯火焰上部灼烧灭菌，待其冷却后在菌种平板中打出菌饼，每个平板中间接种一个菌饼。接种完成后将平板放在 25℃恒温培养箱内培养，每个处理设置 5 次重复。通过“十”字法测定培养 15 天后的菌落直径，并计算平均生长速率^[12]。定期对菌落进行观察并记录。碳氮比筛选培养基配方见表 3.1。

表 3.1 筛选碳氮比的培养基配方

编号	C/N 比 g/L	葡萄糖 g/L	蛋白胨 g/L	KH ₂ PO ₄ g/L	MgSO ₄ g/L	琼脂 g/L
1	15:1	20.00	3.43	1.00	0.50	20.00
2	20:1	20.00	2.57	1.00	0.50	20.00
3	25:1	20.00	2.06	1.00	0.50	20.00
4	30:1	20.00	1.71	1.00	0.50	20.00
5	35:1	20.00	1.47	1.00	0.50	20.00
6	50:1	20.00	1.02	1.00	0.50	20.00

3.2.2 碳源、氮源筛选

碳源筛选和氮源筛选的培养基配方^[13]见表 3.2 和表 3.3，在 121℃下灭菌 20 分钟。接种、培养同 3.2.1 中的实验步骤，定期对菌落进行观察并记录。

表 3.2 筛选碳源的固体培养基配方

编号	碳源 g/L	马铃薯 g/L	蛋白胨 g/L	KH ₂ PO ₄ g/L	MgSO ₄ g/L	琼脂 g/L	
1	葡萄糖	20.00	200.00	2.57	1.00	0.50	20.00

2	麦芽糖	18.00	200.00	2.57	1.00	0.50	20.00
3	淀粉	16.20	200.00	2.57	1.00	0.50	20.00
4	果糖	18.00	200.00	2.57	1.00	0.50	20.00
5	蔗糖	17.10	200.00	2.57	1.00	0.50	20.00
6	乳糖	18.00	200.00	2.57	1.00	0.50	20.00
7	木糖	18.00	200.00	2.57	1.00	0.50	20.00
8	CK	0	200.00	2.57	1.00	0.50	20.00

表 3.3 筛选氮源的固体培养基配方

编号	氮源 g/L	马铃薯 g/L	葡萄糖 g/L	KH ₂ PO ₄ g/L	MgSO ₄ g/L	琼脂 g/L	
1	蛋白胨	2.57	200.00	20.00	1.00	0.50	20.00
2	酵母粉	3.00	200.00	20.00	1.00	0.50	20.00
3	牛肉膏	2.75	200.00	20.00	1.00	0.50	20.00
4	硫酸铵	1.70	200.00	20.00	1.00	0.50	20.00
5	尿素	0.75	200.00	20.00	1.00	0.50	20.00
6	麸皮	5.00	200.00	20.00	1.00	0.50	20.00
7	玉米粉	5.00	200.00	20.00	1.00	0.50	20.00
8	CK	0	200.00	20.00	1.00	0.50	20.00

3.2.3 维生素筛选

在基础培养基的配方的基础之上，添加不同的维生素，配制筛选维生素的固体培养基如表 3.4。接种、培养同 3.2.1 中的实验步骤，定期对菌落进行观察并记录。

表 3.4 筛选维生素的固体培养基配方

编号	VB ₁ g/L	VB ₂ g/L	VB ₆ g/L	VB ₁₂ g/L	马铃薯 g/L	葡萄糖 g/L	蛋白胨 g/L	KH ₂ PO ₄ g/L	MgSO ₄ g/L	琼脂 g/L
1	0.10				200.00	20.00	2.57	1.00	0.50	20.00
2		0.10			200.00	20.00	2.57	1.00	0.50	20.00
3			0.10		200.00	20.00	2.57	1.00	0.50	20.00
4				0.10	200.00	20.00	2.57	1.00	0.50	20.00

5	200.00	20.00	2.57	1.00	0.50	20.00
---	--------	-------	------	------	------	-------

3.2.4 培养温度筛选

设置温度梯度为 4℃、18℃、20℃、22℃、24℃、26℃、30℃。把直径为 5mm 的打孔器放在超净工作台中用酒精灯火焰灼烧灭菌，待其冷却后在菌种平板中打出菌饼，每个平板中间接种一个菌饼。完成接种后，将各组平板分别放入 4℃、18℃、20℃、22℃、24℃、26℃、30℃ 的恒温培养箱内进行培养，各处理设 5 个重复。经过 15 天的培养后，用“十”字法测量菌落直径并计算平均生长速率。

3.2.5 酸碱度筛选

通过测量培养基在自然情况下的酸碱度来确定酸碱度梯度，经测量的在自然条件下基础培养基的酸碱度为 5.75，设置的酸碱度梯度为：4.25、4.75、5.25、5.75、6.25、6.75、7.25^[4]。用 NaOH 和 HCL 调节培养基的酸碱度。配制培养基，将培养基放在 121℃ 下灭菌 20 分钟，接种和培养同 3.2.1 中的实验步骤，定期对菌落进行观察并记录。

3.2.6 四因素三水平正交试验

正交试验是在多因素试验中，通过分析试验数据和一些有代表性的处理组合，找出最佳水平组合的试验方法之一。

以鹿茸菇菌丝固体培养的得到的最佳碳源、最佳氮源以及 KH_2PO_4 、 MgSO_4 两种无机盐作为正交试验的影响因素，并制定因素水平表，见表 3.5，选择正交表 $L_9(3^4)$ ，见表 3.6。

表 3.5 四因素三水平表

水平	因素			
	葡萄糖 g/L	麸皮 g/L	KH_2PO_4 g/L	MgSO_4 g/L
1	15.00	10.00	0.50	0
2	20.00	20.00	1.00	0.50
3	25.00	30.00	1.50	1.00

按照正交试验的试验号配制相应固体培养基，将配制好的培养基放于 121℃ 下灭菌 20 分钟，分别接种鹿茸菇单核菌丝和双核菌丝进行培养观察，以及实验记录。接种和培养同 3.2.1 中的实验步骤，定期对菌落进行观察并记录。

表 3.6 正交表 L9(3⁴)

试验号	因素			
	葡萄糖	麸皮	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

3.2.7 添加菇根粉筛选

以正交实验筛选的固体培养基（马铃薯 200.00g/L、葡萄糖 25.00g/L、麸皮 10.00g/L、KH₂PO₄ 1.50g/L、MgSO₄ 1.00g/L、琼脂 20.00g/L）为基础培养基，在此基础上添加菇根磨碎过筛后得到的菇根粉，实验组是添加菇根粉的培养基，空白对照组是未添加菇根粉的培养基，将两种培养基进行 121℃、20 分钟的灭菌处理。分别在实验组和对照组中接入一个菌饼，每组做 5 个重复。验证菇根粉对鹿茸菇单核菌丝以及双核菌丝生长情况的影响。

3.3 鹿茸菇菌丝液体发酵培养

鹿茸菇液体培养基筛选使用响应面法进行筛选，响应面分析是一种利用多个二次回归方程拟合影响因素与响应值的函数关系来求解多个变量问题的统计方法。根据固体培养基正交试验筛选的结果进行响应面实验的设计。

以正交试验筛选出的最优组合配方为基础，选择因素排序靠前的三个因素为响应实验的因素，三个因素分别是葡萄糖、麸皮、MgSO₄。运用 Design expert 12.0.3 软件，基于 Box-Behnken 试验的原理，选取三个因素和三个水平进行了响应面优化试验的设计^[15-18]。试验因素及水平如表 3.7 所示。

表 3.7 响应面实验因素水平表

编码水平	因子 A	因子 B	因子 C
	葡萄糖 g/L	麸皮 g/L	MgSO ₄ g/L
-1	22.00	5.00	1.20
0	25.00	10.00	1.50
1	28.00	15.00	1.80

4 结果与分析

4.1 菌丝复壮结果

复壮菌种在转接培养 15 天后，菌丝洁白粗壮，菌丝长势较好，菌丝较为致密，菌落颜色洁白，菌丝的活力较为旺盛。

4.2 鹿茸菇菌丝固体培养结果

4.2.1 碳氮比筛选结果

在不同的碳氮比的固体培养基上鹿茸菇菌丝体的生长情况见表 4.1 。

表 4.1 不同碳氮比对鹿茸菇菌丝生长的影响

碳氮比	菌丝生长速率 cm/d	菌丝长势	菌落颜色	菌落形状
15:1	0.303	++	灰白	整齐规则圆形
20:1	0.331	++	灰白	整齐规则圆形
25:1	0.321	++	灰白	整齐规则圆形
30:1	0.336	++	灰白	整齐规则圆形
35:1	0.353	++	灰白	整齐规则圆形
50:1	0.408	++	灰白	整齐规则圆形

注：菌丝长势中的++、菌丝的长势较为旺盛；菌丝较致密；

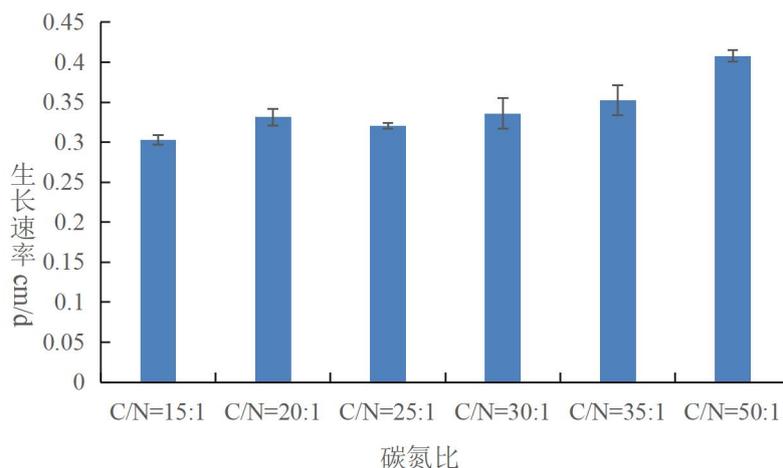


图 4.1 不同碳氮比对鹿茸菇菌丝生长速率的影响

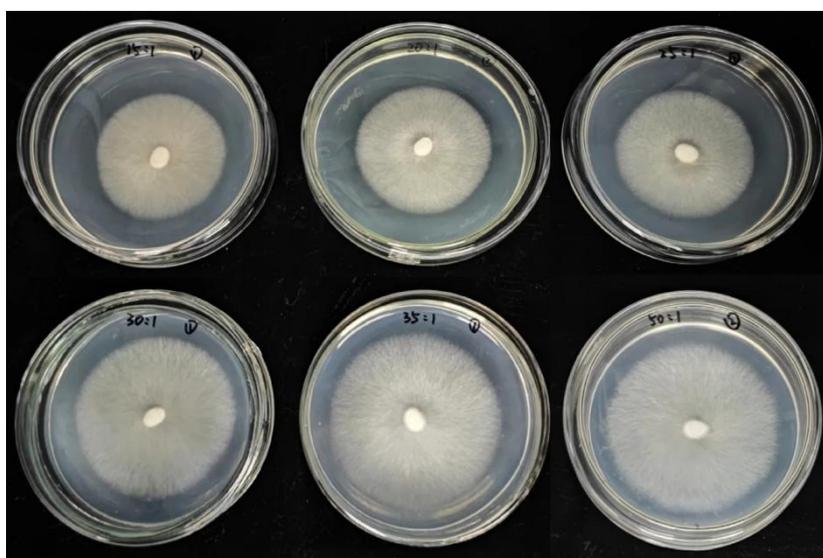


图 4.2 不同碳氮比培养基中鹿茸菇菌丝生长情况

由表 4.1 可知鹿茸菇菌丝在碳氮比为 15:1~50:1 的固体培养基上均能生长，且菌丝的生长速率整体上呈现逐渐递增的趋势，菌丝颜色均为灰白色，但是随着碳氮比的不断增大菌丝颜色逐渐变浅，从总体上看，碳氮比在 20:1~35:1 时，鹿茸菇菌丝的长势较为旺盛，菌丝较为粗壮、菌丝较为致密。

4.2.2 碳源、氮源筛选结果

鹿茸菇菌丝在含有不同的碳源的固体培养基上的生长情况见表 4.2。

表 4.2 不同碳源培养基对鹿茸菇菌丝生长的影响

碳源种类	菌丝生长速率 cm/d	菌丝长势	菌落颜色	菌落形状
------	----------------	------	------	------

葡萄糖	0.435	+++	浓白	整齐规则圆形
麦芽糖	0.391	++	白色	整齐规则圆形
淀粉	0.440	++	灰白	整齐规则圆形
果糖	0.359	++	白色	整齐规则圆形
蔗糖	0.425	+++	白色	整齐规则圆形
乳糖	0.267	+	浓白	不规则
木糖	0.208	+	浓白	整齐规则圆形
CK	0.428	+	灰白	整齐规则圆形

注：菌丝长势中的+++、++、+分别表示菌丝的长势旺盛，菌丝致密；菌丝的长势较旺盛；菌丝较致密；菌丝的长势弱、菌丝稀疏。

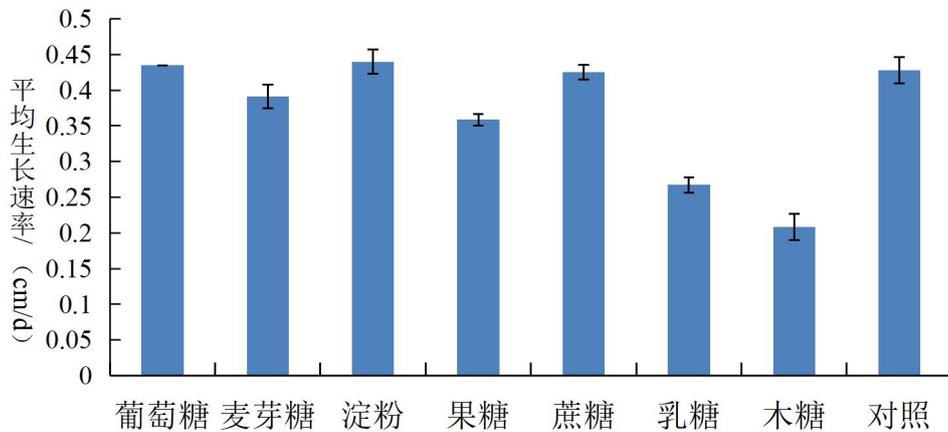


图 4.3 不同碳源培养基对鹿茸菇菌丝生长速率的影响

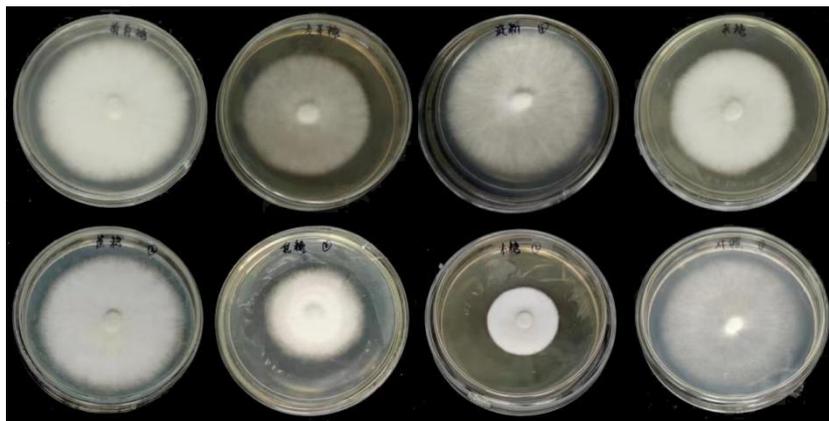


图 4.4 鹿茸菇菌丝体在不同碳源培养基中生长

根据表 4.2 和图 4.3 的结果显示，鹿茸菇菌丝的生长情况因培养基中的碳源不同而存在显著差异。通过对不同碳源培养基菌丝生长速率的比较可知，葡萄糖和可溶性淀粉为碳源的菌丝生长速率最快，两者的长势相似，蔗糖为碳源和对照

组菌丝生长速率次之，最慢的是以乳糖和木糖为碳源的。比较不同碳源培养基菌丝的长势可以看出，以葡萄糖为碳源的菌丝浓密、粗壮、洁白、生长旺盛、菌落的边缘整齐，菌落为规则的圆形，其次为果糖、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖和对照。因此，综合多种因素考虑，鹿茸菇菌丝生长的最佳碳源是葡萄糖。

在不同的氮源的固体培养基上鹿茸菇菌丝的生长情况见表 4.3。

表 4.3 不同氮源对鹿茸菇菌丝生长的影响

氮源种类	菌丝生长速率 cm/d	菌丝长势	菌落颜色	菌落形状
蛋白胨	0.410	+++	浓白	整齐规则圆形
酵母粉	0.403	+++	浓白	整齐规则圆形
牛肉膏	0.365	+++	浓白	整齐规则圆形
玉米粉	0.441	++	灰白	整齐规则圆形
麸皮	0.449	+++	白色	整齐规则圆形
硫酸铵	0.291	+	浓白	整齐规则圆形
尿素	0.321	+	浓白	整齐规则圆形
CK	0.440	+	灰白	整齐规则圆形

注：菌丝长势中的+++、++、+分别表示菌丝长势旺盛，菌丝致密；菌丝长势较旺盛；菌丝较致密；菌丝长势弱、菌丝稀疏。

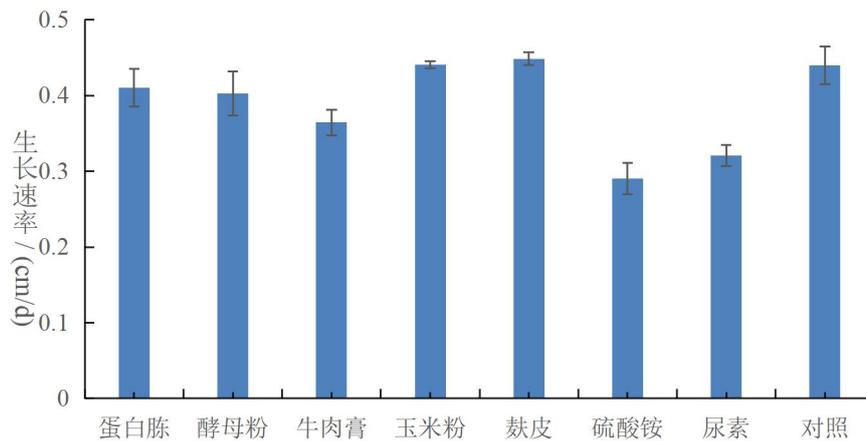


图 4.5 不同氮源对鹿茸菇菌丝生长速率的影响

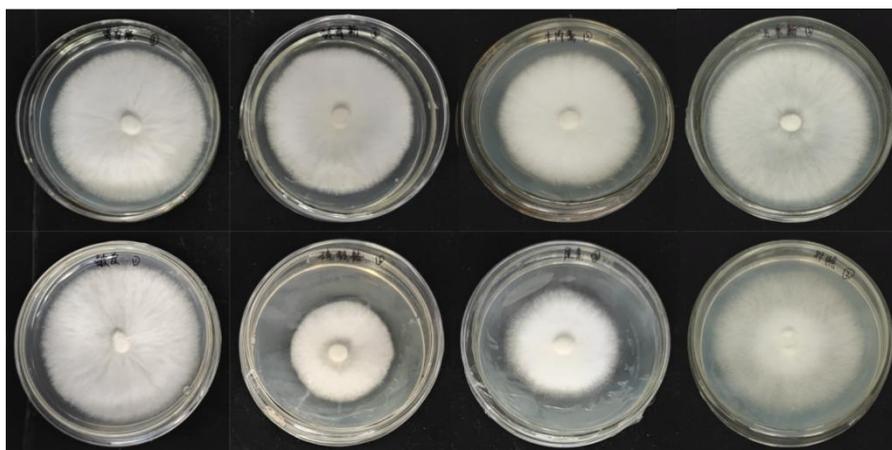


图 4.6 鹿茸菇菌丝在不同氮源培养基上的生长情况

由表 4.3 和图 4.5 所示，在不同氮源的固体培养基中鹿茸菇菌丝的生长速率存在显著差异。从菌丝生长速率来看，以麸皮、玉米粉为氮源的最快，二者之间的差异不显著；其次是以蛋白胨和酵母粉为氮源的，最慢的是以尿素和硫酸铵为氮源的培养基。从菌丝长势来看，以麸皮、蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、尿素为氮源的菌丝洁白、菌丝致密，菌落边缘整齐，且呈规则的圆形；以玉米粉为氮源的菌丝较为致密；对照组菌丝稀疏。因此，综合多种因素来看，鹿茸菇菌丝生长最佳的氮源为麸皮。

4.2.3 维生素筛选结果

鹿茸菇菌丝在添加不同维生素的固体培养基上的生长情况见表 4.4。

表 4.4 不同维生素对鹿茸菇菌丝生长的影响

维生素种类	菌丝生长速率 cm/d	菌丝长势	菌落颜色	菌落形状
维生素 B ₁	0.372	++	白色	整齐规则圆形
维生素 B ₂	0.388	++	白色	整齐规则圆形
维生素 B ₆	0.412	+++	白色	整齐规则圆形
维生素 B ₁₂	0.343	+	白色	整齐规则圆形
CK	0.398	++	白色	整齐规则圆形

注：菌丝长势中的+++、++、+分别表示菌丝长势旺盛，菌丝致密；菌丝长势较旺盛；菌丝较致密；菌丝的长势弱、菌丝稀疏。

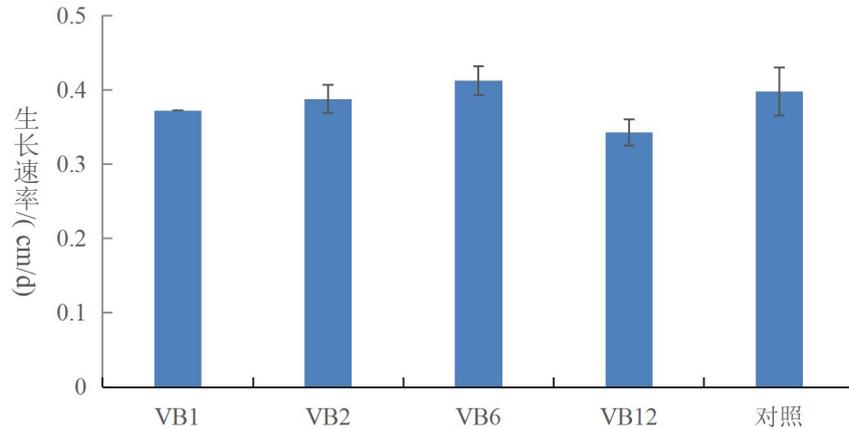


图 4.7 添加不同维生素对鹿茸菇菌丝生长速率的影响

由表 4.4 所示，维生素对鹿茸菇菌丝体生长的影响不显著。从菌丝生长速率方面看，生长速率最快的是添加维生素 B₆ 的培养基，其他的依次为不添加维生素的对照组、添加维生素 B₂、添加维生素 B₁、添加维生素 B₁₂ 的培养基，且每组之间的差异不显著。从菌丝的长势来看，添加不同维生素的和对照均菌丝致密、洁白，菌落边缘整齐，且呈规则的圆形。综合多种因素，添加维生素 B₆ 的培养基菌丝生长的最佳，但是与对照组相比，维生素对鹿茸菇菌丝的生长影响较小。

4.2.4 培养温度筛选结果

鹿茸菇菌丝在不同温度条件下的生长情况见表 4.5。

表 4.5 不同温度对鹿茸菇菌丝生长的影响

温度	菌丝生长速率 cm/d	菌丝长势	菌落颜色	菌落形状
4°C	0	-	无	无
18°C	0.273	+	灰白	整齐规则圆形
20°C	0.403	++	白色	整齐规则圆形
22°C	0.407	++	灰白	整齐规则圆形
24°C	0.450	+++	白色	整齐规则圆形
26°C	0.403	++	灰白	整齐规则圆形
30°C	0.149	+	浓白	整齐规则圆形

注：菌丝长势中的+++、++、+、-分别表示菌丝的长势旺盛，菌丝致密；菌丝的长势较旺盛；菌丝较致密；菌丝的长势弱、菌丝稀疏；菌不生长。

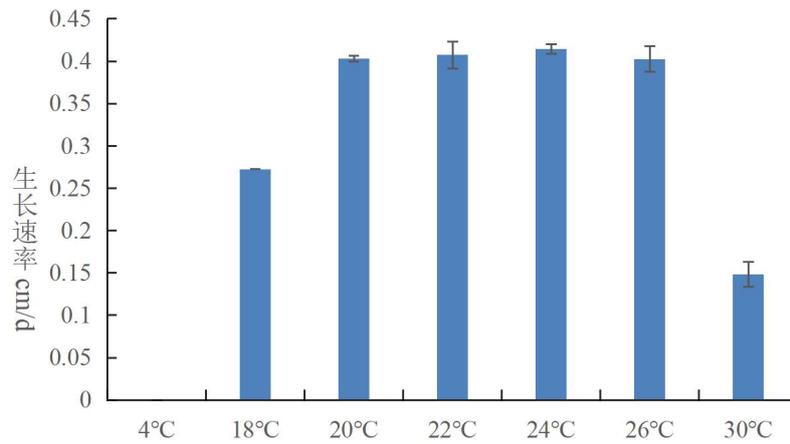


图 4.8 不同培养温度对鹿茸菇菌丝生长速率的影响

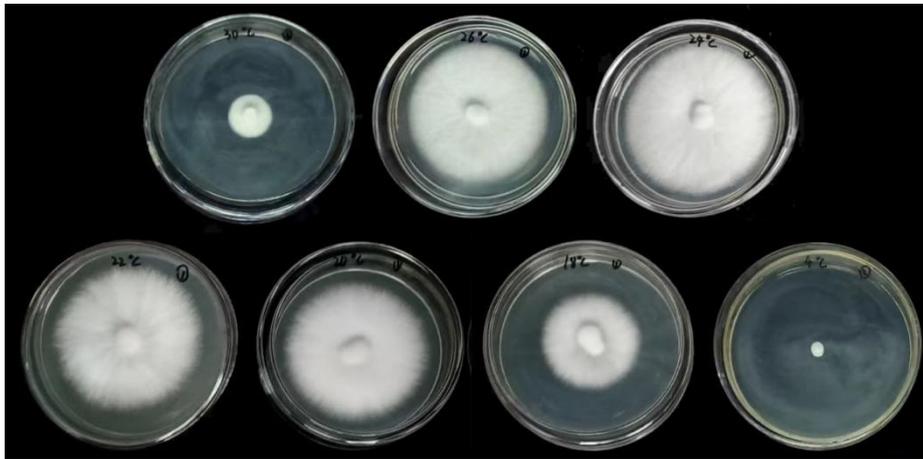


图 4.9 鹿茸菇菌丝在不同温度条件下的生长情况

如表 4.5 所示，鹿茸菇菌丝在 18~26°C 之间都能生长，在 24°C 时菌丝的生长速率最快，菌丝长势最佳，菌丝浓密、洁白，菌落边缘整齐，菌落为规则的圆形。在温度低于 24°C 时，随温度降低，菌丝的生长速率渐渐降低，菌丝致密度降低，在温度低至 4°C 时，菌丝几乎停止生长。当温度高于 24°C 时，随温度上升，菌丝生长速率渐渐降低。因此，综合多种因素，鹿茸菇菌丝的最适生长温度为 24°C。

4.2.5 酸碱度筛选结果

鹿茸菇菌丝在不同 pH 下的生长情况见表 4.6。

表 4.6 不同 pH 对鹿茸菇菌丝生长的影响

酸碱度 (pH)	菌丝生长速率 cm/d	菌丝长势	菌落颜色	菌落形状
----------	----------------	------	------	------

4.25	0.238	+	浓白	整齐规则圆形
4.75	0.337	++	白色	整齐规则圆形
5.25	0.347	++	白色	整齐规则圆形
5.75	0.401	+++	白色	整齐规则圆形
6.25	0.374	++	白色	整齐规则圆形
6.75	0.358	++	白色	整齐规则圆形
7.25	0.379	++	白色	不整齐、规则圆形

注：菌丝长势中的+++、++、+分别表示菌丝长势旺盛，菌丝致密；菌丝长势较旺盛；菌丝较致密；菌丝长势弱、菌丝稀疏。

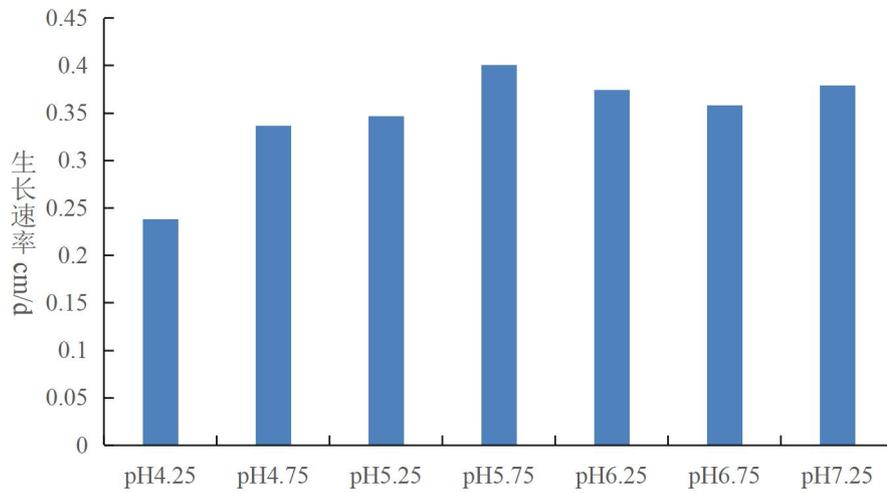


图 4.10 不同酸碱度对鹿茸菇菌丝生长速率的影响

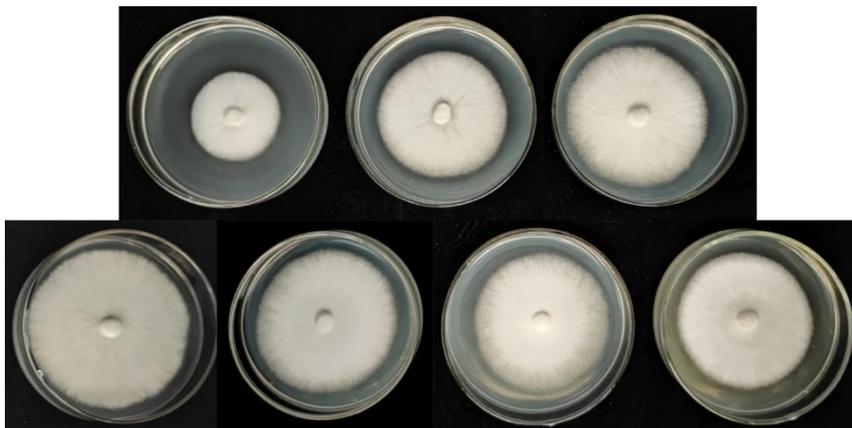


图 4.11 鹿茸菇菌丝在不同酸碱度下的生长情况

注：图中从左到右的 pH 依次为 4.25、4.75、5.25、5.75、6.25、6.75、7.25。

如表 4.6 所示，鹿茸菇菌丝在 pH 4.25~7.25 的固体培养基中均能生长。在 pH

为 5.75 时，菌丝长势最好，菌丝生长速率最快，菌丝浓密、洁白，菌落边缘整齐，菌落为规则的圆形。在 pH 4.25~5.25 之间时，随着 pH 的升高，菌丝的生长速率逐渐变快；在 pH 6.25~7.25 之间时，随着 pH 的升高，菌丝的生长速率逐渐变慢。但是菌丝均较为浓密、菌丝洁白、菌落成整齐规则的圆形。因此，综合以上的分析，鹿茸菇菌丝最适的 pH 为 5.75。

4.2.6 四因素三水平正交试验筛选结果

以上述实验中筛选出的最优碳源、氮源和 KH_2PO_4 、 MgSO_4 两种无机盐进行四因素三水平正交试验的设计，鹿茸菇单核菌丝固体培养基筛选与双核菌丝固体培养基筛选正交实验因素水平的搭配见表 4.7。

表 4.7 正交试验因素与水平

水平	因素/ (g/L)			
	葡萄糖 (A)	麸皮 (B)	KH_2PO_4 (C)	MgSO_4 (D)
1	15.00	10.00	0.50	0
2	20.00	20.00	1.00	0.50
3	25.00	30.00	1.50	1.00

鹿茸菇双核菌丝固体培养基优化正交试验结果见表 4.8。

表 4.8 鹿茸菇双核菌丝培养优化正交实验结果

编号	因素/ (g/L)				结果 (cm/d)
	A	B	C	D	
1	15 (1)	10 (1)	0.5 (1)	0 (1)	0.439
2	15 (1)	20 (2)	1 (2)	0.5 (2)	0.411
3	15 (1)	30 (3)	1.5 (3)	1 (3)	0.435
4	20 (2)	10 (1)	1 (2)	1 (3)	0.463
5	20 (2)	20 (2)	1.5 (3)	0 (1)	0.427
6	20 (2)	30 (3)	0.5 (1)	0.5 (2)	0.364
7	25 (3)	10 (1)	1.5 (3)	0.5 (2)	0.453
8	25 (3)	20 (2)	0.5 (1)	1 (3)	0.454
9	25 (3)	30 (3)	1 (2)	0 (1)	0.421

K1	0.428	0.452	0.419	0.429
K2	0.418	0.431	0.432	0.409
K3	0.443	0.407	0.438	0.451
极差	0.025	0.045	0.019	0.042

如表 4.8 所示, 鹿茸菇双核菌丝各种因素水平的最佳配比为 $A_3B_1C_3D_3$, 即葡萄糖 25.00g/L、麸皮 10.00g/L、 KH_2PO_4 1.50g/L、 $MgSO_4$ 1.00g/L。本次正交实验中没有该组合。由数据分析可得, 影响鹿茸菇双核菌丝生长速率因素的排序为 $B>D>A>C$ 。

鹿茸菇单核菌丝固体培养基正交实验结果见表 4.9。

表 4.9 鹿茸菇单核菌丝培养优化正交实验结果

编号	因素/ (g/L)				结果 (cm/d)
	A	B	C	D	
1	15 (1)	10 (1)	0.5 (1)	0 (1)	0.239
2	15 (1)	20 (2)	1 (2)	0.5 (2)	0.247
3	15 (1)	30 (3)	1.5 (3)	1 (3)	0.234
4	20 (2)	10 (1)	1 (2)	1 (3)	0.240
5	20 (2)	20 (2)	1.5 (3)	0 (1)	0.211
6	20 (2)	30 (3)	0.5 (1)	0.5 (2)	0.234
7	25 (3)	10 (1)	1.5 (3)	0.5 (2)	0.247
8	25 (3)	20 (2)	0.5 (1)	1 (3)	0.246
9	25 (3)	30 (3)	1 (2)	0 (1)	0.230
K1	0.240	0.242	0.240	0.227	
K2	0.228	0.235	0.239	0.243	
K3	0.241	0.233	0.231	0.240	
极差	0.013	0.009	0.009	0.016	

如表 4.9 所示, 鹿茸菇单核菌丝各种因素水平的最佳配比为 $A_3B_1C_1D_2$, 即葡萄糖 25.00g/L、麸皮 10.00g/L、 KH_2PO_4 0.50g/L、 $MgSO_4$ 0.50g/L。本次正交实验中没有该组合。由数据分析可得, 影响鹿茸菇双核菌丝生长速率因素的排序为 D、A、B、C。

4.2.7 添加菇根粉筛选结果

鹿茸菇双核菌丝在未添加菇根粉的培养基中的生长速率为 0.403cm/d，在添加菇根粉的培养基中的菌丝生长速率为 0.392cm/d。比较二者之间的生长情况可知，二者的生长速率差异较小，但是添加菇根粉的菌丝更为浓白，菌丝致密程度较高。综合来看，添加菇根粉的培养基鹿茸菇双核菌丝长势更好。

鹿茸菇单核菌丝在未添加菇根粉的培养基中的生长速率为 0.217cm/d，在添加菇根粉的培养基中的菌丝生长速率为 0.199cm/d。比较二者之间的生长情况可知，二者生长的速率相近，在菌落颜色和致密度方面差异较小，添加菇根粉的培养基菌丝致密度略高一点。综合来看，菇根粉的培养基鹿茸菇单核菌丝长势稍好一些，但菇根粉对鹿茸菇单核菌丝生长的影响较小。

4.3 鹿茸菇液体发酵培养结果

4.3.1 Box-Behnken 试验设计和模型的可行性分析

根据 Box-Behnken 试验的原理，进行响应面优化鹿茸菇液体培养基的试验设计，按照响应面的试验设计方案，设计了 17 个菌丝液体发酵培养实验组。试验设计的组合以及实验的结果如表 4.10 所示，用响应面法对试验结果进行回归方程的方差分析如表 4.11 所示，鹿茸菇菌丝液体发酵培养基的多项式回归方程：

$$Y=1.06-0.0254A-0.0396B-0.0227C-0.0146AB+0.0578AC-0.0559BC-0.0234A^2-0.0854B^2-0.0731C^2$$

式中，A 为葡萄糖的用量；B 为麸皮的用量；C 为 $MgSO_4$ 的用量；Y 为鹿茸菇菌丝的生物量。

由表 4.11 可知，在因素 A、B、C 以及 AB、AC、BC 的交互组合中，A、C 和 AB 因素影响为不显著，其它项在模型中均达到了显著水平。本实验使用的模型的 P 值为 0.0037，P 值小于 0.01，表明该模型为极显著，同时失拟项的 P 为 0.9817，P 值大于 0.05，表明本模型失拟项并不显著，表明本实验所使用的模型与试验所拟合的结果无显著差异，说明此模型可以用来对鹿茸菇菌丝培养基的组分进行优化。信噪比较高，为 10.3698，说明将本实验的模型用于预测鹿茸菇菌丝体生物量是可行的。正交系数 R^2_{Adj} 为 82.48%，说明该模型存在 17.52% 的变异度，使用本实验所得的多项式回归方程可以解释 82.48% 的试验数据。此多项式回归方程模型的判定系数为 92.34%，表明本实验所建立的模型的拟合度较好。因此，将多项式回归方程用于分析和预测鹿茸菇液体发酵培养所得菌丝体的生物量是可行的。

表 4.10 Box-Behnken 试验设计结果

试验编号	A	B	C	菌丝生物量/ (g)
1	-1	-1	0	1.0107
2	1	-1	0	0.9788
3	-1	1	0	0.9546
4	1	1	0	0.8643
5	-1	0	-1	1.0624
6	1	0	-1	0.9061
7	-1	0	1	0.9070
8	1	0	1	0.9819
9	0	-1	-1	0.9085
10	0	1	-1	0.9473
11	0	-1	1	0.9693
12	0	1	1	0.7845
13	0	0	0	1.0974
14	0	0	0	0.9832
15	0	0	0	1.0947
16	0	0	0	1.0739
17	0	0	0	1.0555

表 4.11 响应面回归模型方程分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.1091	9	0.0121	9.37	0.0037
A	0.0052	1	0.0052	4.00	0.0855
B	0.0125	1	0.0125	9.68	0.0170
C	0.0041	1	0.0041	3.19	0.1174
AB	0.0009	1	0.0009	0.6590	0.4436
AC	0.0134	1	0.0134	10.33	0.0148

BC	0.0125	1	0.0125	9.66	0.0171
A ²	0.0023	1	0.0023	1.79	0.2229
B ²	0.0307	1	0.0307	23.73	0.0018
C ²	0.0225	1	0.0225	17.41	0.0042
残差	0.0091	7	0.0013		
失拟项	0.0003	3	0.0001	0.0530	0.9817
纯误差	0.0087	4	0.0022		
总和	0.1182	16			
R ² _{Adj}	82.48%				
信噪比	10.3698				

4.3.2 响应面三维图和等高线图分析

为了能较为直观地显示出各个因素之间交互作用的强度，将因素 A、B、C 两两交互作用对鹿茸菇菌丝体生物量影响绘制成三维响应面图和等高线图。从图 4.12 可看出，各个因素的交互作用对鹿茸菇菌丝体生物量影响的响应面均呈现抛物线状，这表明拟合出的回归模型存在最大值。葡萄糖添加量与麸皮添加量的交互作用对鹿茸菇菌丝体生物量没有显著影响（ $P=0.4436>0.05$ ），其余各因素两两相互作用鹿茸菇菌丝体生物量有显著影响。

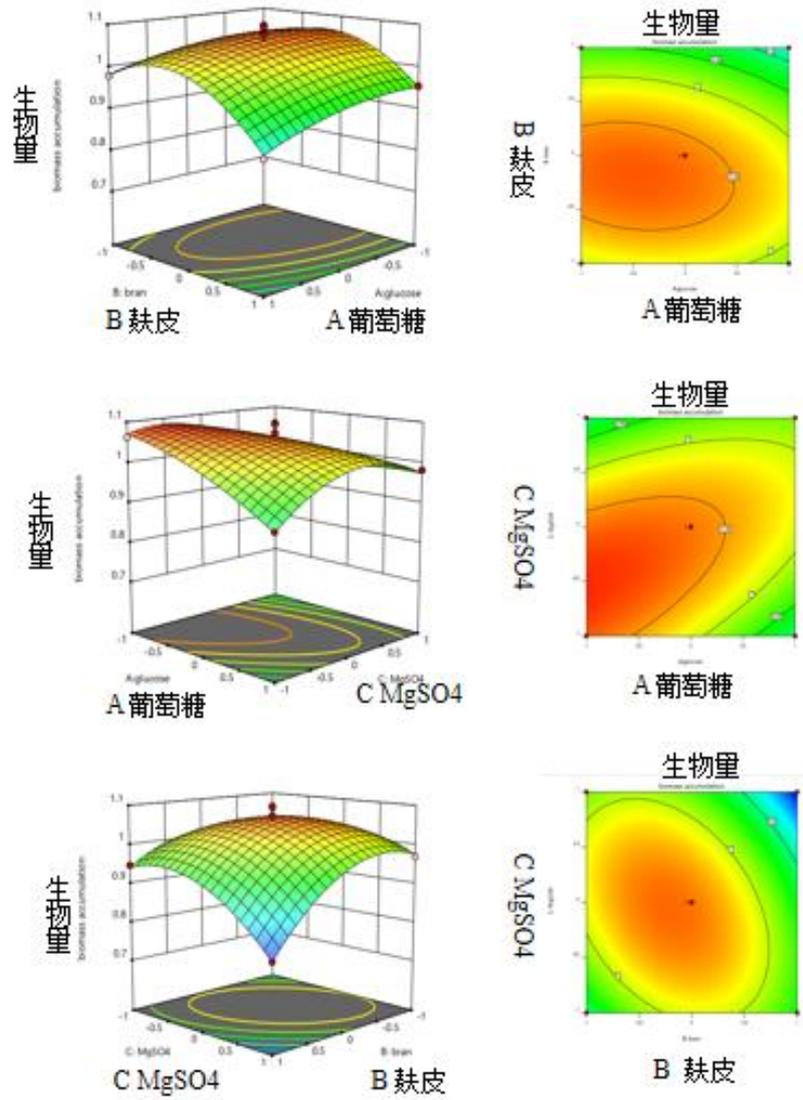


图 4.12 三维响应面图和等高线图

通过 Design expert 12.0.3 软件分析所得鹿茸菇液体发酵培养的最佳试验条件：葡萄糖的添加量为 25.00g/L、麸皮的添加量为 7.75g/L、MgSO₄ 的添加量为 1.62g/L，在此条件下鹿茸菇菌丝体生物量理论值为 1.085g。鹿茸菇液体发酵培养基的最优配方为马铃薯 200g.00g/L、葡萄糖 25.00g/L、麸皮 7.75g/L、KH₂PO₄ 1.50g/L、MgSO₄ 1.62g/L。

5 总结

5.1 鹿茸菇菌丝固体培养结果

在鹿茸菇菌丝固体培养基中，碳氮比在 20:1~35:1 时，菌丝较为致密，长势较好；葡萄糖为鹿茸菇菌丝生长的碳源时，鹿茸菇菌丝的生长速率较大，菌丝洁白浓密，与其它碳源相比长势较好；麸皮为鹿茸菇菌丝生长的氮源时，鹿茸菇菌丝的生长速率较大，菌丝洁白浓密，与其它氮源相比长势较好；维生素对鹿茸菇菌丝生长的影响较小，添加维生素 B₆ 鹿茸菇长势较好；鹿茸菇菌丝生长的最适和的温度为 24℃；最适 pH 为 5.75。

通过正交试验可知，鹿茸菇双核菌丝固体培养基的最优配方为马铃薯 200.00g/L、葡萄糖 25.00g/L、麸皮 10.00g/L、KH₂PO₄ 1.50g/L、MgSO₄ 1.00g/L、琼脂 20.00g/L；鹿茸菇单核菌丝固体培养基的最优配方为马铃薯 200.00g/L、葡萄糖 25.00g/L、麸皮 10.00g/L、KH₂PO₄ 0.50g/L、MgSO₄ 0.50g/L、琼脂 20.00g/L。

5.2 鹿茸菇液体发酵培养结果

本实验在固体培养基筛选的基础上使用响应面优化的方法进行的液体培养基的筛选，从响应面分析的结果看，鹿茸菇菌丝体液体发酵培养基的最优配方为马铃薯 200.00g/L、葡萄糖 25.00g/L、麸皮 7.75g/L、KH₂PO₄ 1.50g/L、MgSO₄ 1.62g/L。

本实验中碳氮比、碳源和氮源的试验结果与魏生龙等^[19]的研究结果是相似的，最佳碳源都是葡萄糖，最佳氮源同样都是麸皮；温度筛选和 pH 筛选的实验结果与张凌珊^[20]的实验结果是相似的，最适温度为 24℃；最适 pH 为 5.75；但是在菌丝的生长情况上，本实验所筛选的结果菌丝长势更好一些。本实验中单核菌丝筛选结果可用于鹿茸菇的育种试验，可在一定程度上提高育种的效率；双核菌丝培养基的优化，获得生长活力旺盛的菌丝体及其培养条件，可以为工厂化生产提供理论依据。

参考文献

- [1] 李文佼,温世勇,张洪勇,朱金英,裴艳婷,魏龙雪,陆学东,王秀芬,张书良.鹿茸菇研究进展[J].中国食用菌,2022,41(03):1-5.
- [2] 李永红,柴红梅,何德,赵永昌.荷叶离褶伞菌丝最佳生长条件研究[J].西南农业学报,2009,22(02):437-439.
- [3] 席亚丽,茆爱丽,王晓琴,等.荷叶离褶伞子实体、菌丝体及发酵液蛋白质营养价值[J].菌物学报,2010,29(4):603-607.
- [4] 张凌姗.鹿茸菇生态学特性与液体菌种配方的优化研究[J].食药菌,2020,28(06):425-427+439
- [5] Ukawa Y, Ito H, Hisamatsu M. Antitumor Effects of (1→3) β -D-Glucan and (1→6)- β -D-Glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji(Lyophyllum decastes Sing.) [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2000, 90(1) : 98-104.
- [6] Pushpa H, Purushothama KB. Antimicrobial activity of Lyophyllum decastes an edible wild mushroom[J]. World Journal of Agricultural Sciences, 2010, 6 (5) :506-509.
- [7] 王晓琴,曹礼,郑秀芳,等.荷叶离褶伞多糖的提取工艺及其抑菌作用的研究[J].中国食品工业,2009(12):51-53.
- [8] Miura T, Kubo M, Itoh Y, et al. Antidiabetic activity of Lyophyllum decastes in genetically type 2 diabetic mice[J]. Bio-logical & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(9) : 1234-1237.
- [9] Ukawa Y, Furuichi Y, Kokean Y, et al. Effect of Hatakeshimeji(Lyophyllum decastes Sing.) mushroom on serum lipid levels in rats[J]. Journal of Nutritional Science & Vitaminology, 2002,48 (1) : 73-76
- [10] 周会明,张焱珍,陈银辉,席亚丽,魏生龙.荷叶离褶伞液体发酵菌株筛选研究[J].北方园艺,2014(03):134-138.
- [11] 王守现,刘宇,许峰,赵爽,耿小丽,王兰青,孟莉莉.荷叶离褶伞菌株的 ITS 鉴定及生物学特性研究[J].中国农学通报,2012,28(28):148-152.
- [12] 刘媛,黄海峰,潘湖生.香菇优良菌株筛选试验[J].现代农业科技,2021(15):58-65.
- [13]李林玉,李荣春.荷叶离褶伞菌丝营养条件的初步研究[J].中国食用菌,2005(03):30-32.
- [14] 席亚丽,王治江,魏生龙,张汉焱.荷叶离褶伞摇瓶发酵条件研究[J].河西学院学报,2011,27(02):68-74+57.
- [15] 赵航轲,陈杭,马薇,羊玉蓉,降初拉尔布,唐瑶,唐明先.响应面法优化羊肚菌液体发酵营养条件[J].食用菌,2021,43(02):11-15.
- [16] 翟宏伟,陈晓明.响应面法优化杏鲍菇液体发酵培养基[J].天津农业科学,2018,24(09):52-55.

- [17] 吴琪,张宇慧,苏荣荣,孙波,吴秋云,夏志兰.响应面法优化巴西蘑菇液体培养基的研究[J].中国农业科技导报,2019,21(03):152-160.
- [18] 张朝正,李意,赵华.响应面法优化壳聚糖酶发酵培养基[J].中国酿造,2022,41(01):197-203.
- [19] 魏生龙,王治江,于海萍,陈叶.荷叶离褶伞生物学特性研究[J].菌物学报,2006(01):101-108.
- [20] 张凌珊.鹿茸菇生态学特性与液体菌种配方的优化研究[J].食药菌,2020,28(06):425-427+439.

致谢

时光转瞬即逝，四年的大学生即将结束，马上就要毕业离开校园。在这里首先要感谢我的指导老师郭立忠老师，以及徐丽丽老师，在老师的指导下我顺利的完成了毕业论文，还教会了我许多知识和实验技能。其次是要感谢带我做实验的师姐邱田美师姐，感谢师姐在我实验出现问题时给予我的帮助，并教会了我许多实验技能和实验数据处理等方面的知识。然后是要感谢实验室中的诸位老师、各位师兄师姐以及同学们，感谢大家在过去四年中给与我的帮助。最后要感谢我的家人和舍友们给与我的支持以及在我遇到问题是给与我建议。