

研究报告

混料设计优化黑木耳菌丝生长的农业剩余物配方

权泉¹, 刘佳², 荆瑞勇¹, 李喜梅¹, 吴楠^{*1}, 田风华^{*3}

1 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319

2 黑龙江八一农垦大学应用科技学院, 黑龙江 大庆 163319

3 贵州大学农学院植物病理教研室, 贵州 贵阳 550025

权泉, 刘佳, 荆瑞勇, 李喜梅, 吴楠, 田风华. 混料设计优化黑木耳菌丝生长的农业剩余物配方[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3417-3428.

QUAN Quan, LIU Jia, JING Ruiyong, LI Ximei, WU Nan, TIAN Fenghua. Optimization of “agricultural residue” formula for *Auricularia auricula* mycelium growth by mixture design[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3417-3428.

摘要:【背景】菌林矛盾日益突出, 农业剩余物资源丰富, 可作为食用菌栽培主要基质。【目的】筛选出适合黑木耳菌丝生长的农业剩余物配方。【方法】以大豆秸秆、油菜秸秆、玉米秸秆、花生秸秆、小麦秸秆和杂木屑等 6 种基质为原料, 运用单纯形格子法进行配方设计, 分析不同基质交互作用对黑木耳菌丝生长速率、菌丝生长指数、漆酶酶活、多酚氧化酶酶活和纤维素酶酶活的影响。【结果】在这些农业剩余物基质中, 大豆秸秆基质最适合黑木耳菌丝生长, 其次是油菜秸秆。3 种主料共同作用可以优化出最适合黑木耳菌丝生长的基质配比。【结论】最终优化出一个适合黑木耳菌丝生长的农业剩余物配方: 杂木屑 49.4%、油菜秸秆 16.4%、大豆秸秆 12.2%、麦麸 20%、蔗糖 1%、CaSO₄ 1%。本研究为“以草代木”栽培黑木耳提供了理论基础。

关键词: 农业剩余物; 黑木耳; 单纯形格子法; 基质配比

资助项目: 黑龙江省大学生创新创业项目(202110223108); 贵州省教育厅特色领域项目(黔教合 KY 字[2021] 054); 贵州省科技计划(黔科合重大专项字[2019] 3005-1); 大庆市指导性科技计划(zd-2021-78)

This work was supported by the Heilongjiang University Student Innovation and Entrepreneurship Project (202110223108), the Characteristic Field Project of Guizhou Provincial Education Department ([2021] 054), the Guizhou Provincial Science and Technology Project ([2019] 3005-1), and the Daqing Guiding Science and Technology Project (zd-2021-78).

*Corresponding authors. E-mail: WU Nan, Nawuhljedu@126.com; TIAN Fenghua, fhtian@gzu.edu.cn

Received: 2022-10-22; Accepted: 2022-11-03; Published online: 2022-12-13

Optimization of “agricultural residue” formula for *Auricularia auricula* mycelium growth by mixture design

QUAN Quan¹, LIU Jia², JING Ruiyong¹, LI Ximei¹, WU Nan^{*1}, TIAN Fenghua^{*3}

1 College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

2 College of Applied Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

3 Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: [Background] The contradiction between edible fungi and forest is increasingly prominent, and the agricultural residues are rich in resources, which can be used as the main substrate for the cultivation of edible fungi. [Objective] To screen out the agricultural residue formula suitable for the growth of *Auricularia auricula* mycelia by using common agricultural residues. [Methods] Six substrates, including soybean straw, rape straw, corn straw, peanut straw, wheat straw, and sawdust, were used as raw materials in this study, and the formula was designed using the simplex-lattice method. The effects of different substrate interactions on the mycelial growth rate, mycelial growth index, laccase activity, polyphenol oxidase activity, and cellulase activity of *A. auricula* were analyzed. [Results] Among the substrates of agricultural residues, soybean straw was the most suitable for the growth of *A. auricula* mycelia, followed by rape straw. The combination of the three main ingredients optimized the substrate ratio which was most suitable for the growth of *A. auricula* mycelia. [Conclusion] This study has finally optimized an agricultural residue formula suitable for the growth of *A. auricula* mycelia (49.4% sawdust, 16.4% rape straw, 12.2% soybean straw, 20% wheat bran, 1% sugar, and 1% CaSO₄). This study provides a theoretical basis for the cultivation of *A. auricula* with grass instead of wood.

Keywords: agricultural residues; *Auricularia auricula*; simplex-lattice method; substrate ratio

黑木耳(*Auricularia auricula*)隶属于真菌界(Fungi)担子菌门(*Basidiomycetes*)蘑菇纲(*Agaricomycetes*)木耳目(*Auricularia*)木耳科(*Auriculariaceae*)木耳属(*Auricularia*)^[1]。黑木耳又名木耳、光木耳、木鸡^[2],具有润肺养胃、滋阴补血、提高机体免疫力、抗衰老、降血糖、降血脂等功效,有很大的食用价值和药用价值^[2-6]。我国是世界黑木耳第一生产国,占世界黑木耳总产量90%以上^[7]。

我国是农业生产大国,每年农作物秸秆产量约6亿t,常见的秸秆处理方法是直接焚烧或

就地掩埋,这些处理不仅污染环境,而且还造成一定的资源浪费,因此,农业剩余物的高效利用和环境保护已经成为农业发展亟待解决的重大问题^[8]。传统黑木耳生产基质主要以杂木屑为主,随着黑木耳产业的快速发展,林业资源日益紧张,“菌林矛盾”问题加剧,寻找新的基质替代杂木屑进行黑木耳栽培迫在眉睫^[9]。因此,利用豆秸秆、小麦秸秆等纤维素和木质素含量丰富的农业剩余物栽培黑木耳,不仅缓解了原料的来源问题,而且资源利用率高、成本低、收益快,既能帮助农民增加收益,又能

改善生态环境^[10]。近年来,我国已有许多利用农业剩余物栽培食用菌的报道,如桑黄^[11]、猴头菇^[12]、秀珍菇^[13]、金针菇^[14]等。因此,利用农业剩余物栽培黑木耳具有一定的理论基础。

本研究评价不同“农业剩余物”作为基质对黑木耳菌丝生长的影响,并进行基质组分统计优化,运用 Design-Expert 8.0.6.1 中单纯形格子法进行配方设计,探究各主料交互作用对胞外酶活、菌丝生长速率和菌丝生长指数的影响,以期筛选出一个适合黑木耳菌丝生长的农业剩余物配方。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株

黑木耳编号为 2020112004, 贵州大学农学院植物病理教研室提供。

1.1.2 供试材料

大豆秸秆粉、油菜秸秆粉、小麦秸秆粉、花生秸秆粉、玉米秸秆粉、杂木屑、麦麸、蔗糖、石膏,均由贵州大学农学院植物病理教研室提供。

1.1.3 主要试剂和仪器

漆酶酶活试剂盒、多酚氧化酶酶活试剂盒、纤维素酶酶活试剂盒,苏州梦犀生物医药科技有限公司。高压灭菌锅,上海博迅实业有限公司;超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;多功能酶标仪,伯腾仪器有限公司;电子天平,上海精密科学仪器有限公司;生化培养箱,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司。

1.1.4 培养基

称取大豆秸秆粉、小麦秸秆粉、油菜秸秆粉、花生秸秆粉、玉米秸秆粉和杂木屑各 15 g,作为配方的主要成分,其他辅料成分不变(对照配方^[15]:杂木屑 78%,麦麸 20%,石灰粉 1%,蔗糖 1%)。每种配方等量分装于 3 个直径为 90 mm

的培养皿中,含水量 60%,pH 7.0,121 °C 灭菌 120 min,冷却至室温备用。

1.2 方 法

1.2.1 粗酶液的提取

粗酶液提取参照吴周斌等^[16]的方法。

1.2.2 酶活的测定

漆酶酶活的测定参照韩增华等^[17]的方法。漆酶酶活力单位定义为:以每毫升培养酶液与底物作用 30 min 内改变 0.1 光密度值为 1 个活力单位 U。多酚氧化酶酶活测定参照 Tang 等^[18]的方法。多酚氧化酶酶活力单位定义为:每分钟每克组织在每毫升反应体系中使 525 nm 处吸光值变化 0.005 为 1 个酶活力单位 U。纤维素酶酶活的测定参照李静等^[19]的方法。纤维素酶酶活力单位定义为:每克组织每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为 1 个酶活力单位 U。

1.2.3 配方设计

运用单纯形格子法(simplex-lattice design)^[20]将应变变量(Y)与自变量(X)进行关联,限制主料成分上下界,对初筛出的 3 种主料进行配方设计,最终设计出 10 个配方(表 1)。0%≤X₁≤100%; 0%≤X₂≤100%; 0%≤X₃≤100%; X₁+X₂+X₃=100%。

表 1 混料配方设计

Table 1 Design of substrates formula

配方 Formulation	主料基质配比 Main material matrix ratio (%)		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33.3	33.3	33.3
8	16.7	16.7	66.7
9	16.7	66.7	16.7
10	66.7	16.7	16.7

X₁: 杂木屑; X₂: 油菜秸秆; X₃: 大豆秸秆

X₁: Sawdust; X₂: Oilseed rape straw; X₃: Soybean straw.

1.2.4 评价指数

测定黑木耳菌丝生长过程中的 5 个评价指标：漆酶酶活、多酚氧化酶酶活、纤维素酶酶活、菌丝生长速率和菌丝生长指数，3 种酶活都在菌丝生长第 7 天测定。

菌丝生长速率^[21]：采用划线法，按菌丝生长速率=菌落平均半径(mm)/培养时间(d)，计算各菌株在供试培养基上的菌丝生长速度。

菌丝生长指数^[22]：菌丝生长速率(mm/d)×菌丝长势评分。

2 结果与分析

2.1 初筛结果

由初筛结果(图 1)可知，杂木屑基质菌丝生长速率最高，显著高于农业剩余物基质，达到 2.9 mm/d，推测产生此结果的原因是杂木屑的 C/N 更适合黑木耳菌丝生长；其次是大豆秸秆和油菜秸秆，分别为 2.42 mm/d 和 2.15 mm/d。由此筛选出杂木屑、大豆秸秆和油菜秸秆 3 种

基质做主料，进行下一步回归模型方差分析。

2.2 各配方长势评分结果

对各平板菌落长势进行评分，结果如表 2 所示。菌落长势评分依据：1 分表示菌丝长势稀疏，不均匀；2 分表示菌丝长势较稀疏，不均匀；3 分表示菌丝长势较稀疏，较均匀；4 分表示菌丝长势较浓密，均匀；5 分表示菌丝长势浓密，均匀^[22]。

2.3 各评价指数二次多项回归模型方差分析

2.3.1 菌丝生长速率

菌丝生长速率回归方程为：

$$Y = 4.35X_1 + 2.44X_2 + 2.86X_3 + 2.17X_1X_2 + 1.86X_1X_3 + 0.22X_2X_3 + 5.47X_1^2X_2X_3 + 37.00X_1X_2^2X_3 - 43.95X_1X_2X_3^2, R^2 = 0.9271。$$

由表 3 可知，主料 X_1X_2 (杂木屑和油菜秸秆)、 X_1X_3 (杂木屑和大豆秸秆)、 $X_1X_2^2X_3$ (杂木屑、油菜秸秆和大豆秸秆)、 $X_1X_2X_3^2$ (杂木屑、油菜秸秆和大豆秸秆)的交互作用成极显著水平($P < 0.01$)，表明这 4 种交互作用可以显著影响

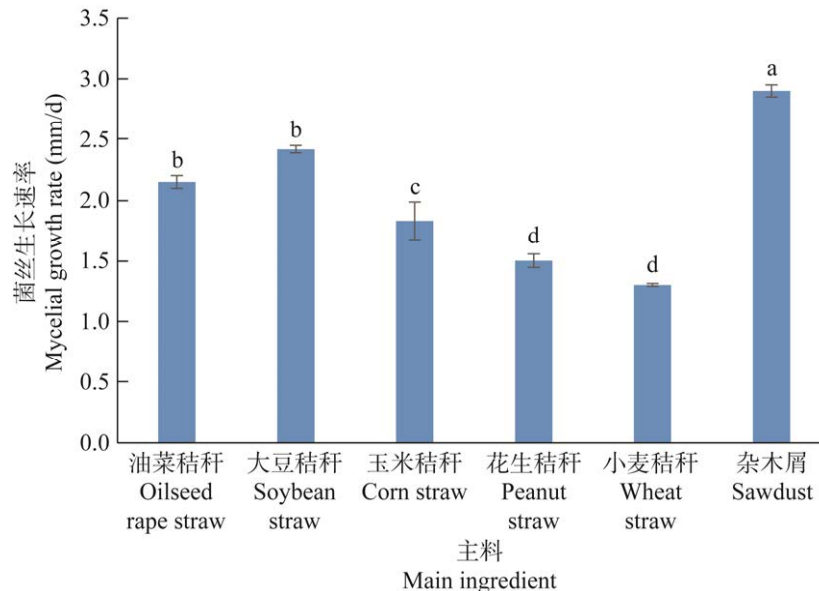


图 1 初筛配方黑木耳菌丝生长速率差异显著性分析 不同小写字母代表差异显著

Figure 1 Analysis on the difference of growth rate of mycelium of *Auricularia heimuer* with initial screening formula. Different lowercase letters indicate significant differences.

表 2 各配方长势评分结果

Table 2 Growth scoring results of each formula

配方 Formulation	黑木耳 <i>Auricularia auricula</i>			
	菌落颜色 Colony color	密度 Thickness	均匀度 Uniformity	长势评分 Growth score
1	白色 White	较稀疏 Thinly sparse	较均匀 Uniform	3
2	白色 White	较浓密 Dense	均匀 Evenly	4
3	白色 White	较浓密 Dense	均匀 Evenly	4
4	白色 White	较稀疏 Thinly sparse	较均匀 Uniform	3
5	白色 White	较稀疏 Thinly sparse	较均匀 Uniform	3
6	白色 White	较浓密 Dense	均匀 Evenly	4
7	白色 White	较浓密 Dense	均匀 Evenly	4
8	白色 White	较浓密 Dense	均匀 Evenly	4
9	白色 White	较浓密 Dense	均匀 Evenly	4
10	白色 White	较浓密 Dense	均匀 Evenly	4

表 3 菌丝生长速率二次多项回归模型方差分析

Table 3 ANOVA for fitted quadratic polynomial model of mycelium growth rate

变异源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
模型 Model	13.17	8	1.65	61.00	<0.000 1
线性混合模型 Linear mixed model	11.22	2	5.61	207.80	<0.000 1
X_1X_2	0.59	1	0.59	21.88	0.000 1
X_1X_3	0.44	1	0.44	16.14	0.000 6
X_2X_3	0.01	1	0.01	0.23	0.635 4
$X_1^2X_2X_3$	0.01	1	0.01	0.32	0.579 6
$X_1X_2^2X_3$	0.39	1	0.39	14.47	0.001 0
$X_1X_2X_3^2$	0.55	1	0.55	20.35	0.000 2
残差 Residual	0.57	21	0.03		
失拟项 Lack of fit	0.12	1	0.12	5.48	0.029 7
纯误差 Pure error	0.45	20	0.02		
总和 Cor total	13.74	29			

菌丝生长速率。结合回归方程可知, X_1X_2 ($K=2.17$)、 X_1X_3 ($K=1.86$)、 $X_1X_2^2X_3$ ($K=37.00$)的 K 值大于 0, 表明这 3 种交互作用可以显著提高菌丝生长速率, $X_1X_2X_3^2$ ($K=-43.95$)的 K 值小于 0, 表明这种交互作用可以显著降低菌丝生长速率。等高线图颜色越趋近于红色表明数值越高, 也说明对菌丝生长速率贡献率越高; 越

趋近于蓝色表明数值越低, 也说明对菌丝生长速率贡献率越低。由图 2 可知, 3 种主料贡献率最高为杂木屑, 其次是大豆秸秆和油菜秸秆。由菌丝生长速率实测值与预测值线性相关性图可知, 所有数据点都分布在中间的直线周围, 说明模型实测值和预测值拟合度较好, 可以很好地拟合菌丝生长速率和主料之间的关系。

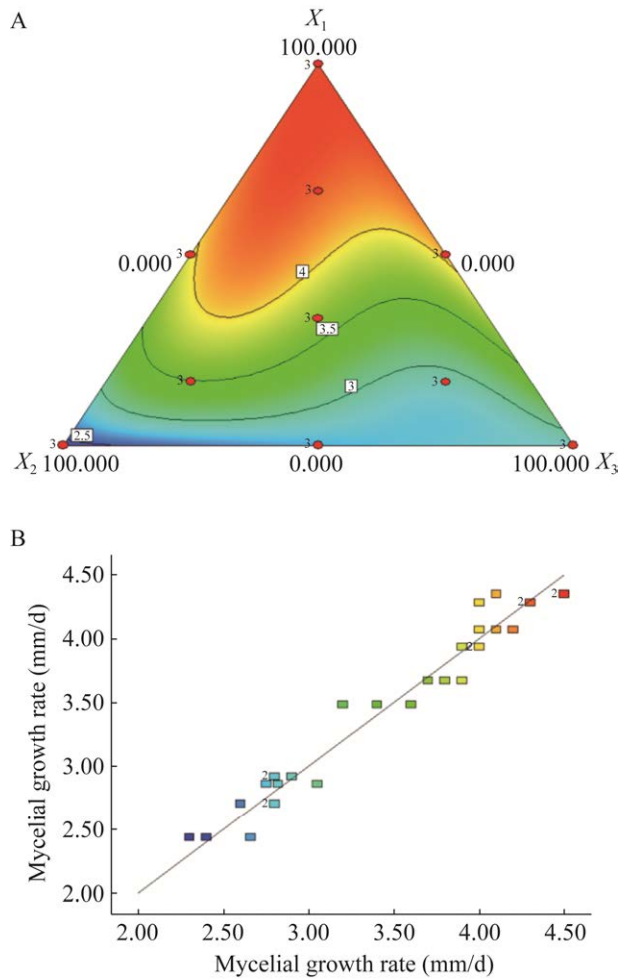


图2 菌丝生长速率等高线图(A)及其实测值与预测值线性相关图(B)

Figure 2 Contour map of mycelial growth rate (A) and linear correlation (B) between measured and predicted values.

2.3.2 菌丝生长指数

菌丝生长指数回归方程为:

$$Y = 13.14X_1 + 9.86X_2 + 11.54X_3 + 1.95X_1X_2 + 0.19X_1X_3 + 1.30X_2X_3 + 324.78X_1^2X_2X_3 + 146.67X_1X_2^2X_3 - 172.11X_1X_2X_3^2, R^2 = 0.8886。$$

由表4可知,主料 $X_1^2X_2X_3$ 、 $X_1X_2^2X_3$ 、 $X_1X_2X_3^2$ 的交互作用成极显著水平($P < 0.01$),可以显著影响菌丝生长指数。结合回归方程可知, $X_1^2X_2X_3$ ($K=324.78$)和 $X_1X_2^2X_3$ ($K=146.67$)交互作用可以

表4 菌丝生长指数二次多项回归模型方差分析
Table 4 ANOVA for fitted quadratic polynomial model of mycelial growth index

变异源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	117.56	8	14.70	41.91	<0.000 1
线性混合模型 Linear mixed model	36.56	2	18.28	52.13	<0.000 1
X_1X_2	0.48	1	0.48	1.36	0.257 0
X_1X_3	0.00	1	0.00	0.01	0.911 5
X_2X_3	0.21	1	0.21	0.60	0.446 8
$X_1^2X_2X_3$	30.11	1	30.11	85.88	<0.000 1
$X_1X_2^2X_3$	6.14	1	6.14	17.50	0.000 4
$X_1X_2X_3^2$	8.42	1	8.42	24.02	<0.000 1
残差 Residual	7.36	21	0.35		
失拟项 Lack of fit	1.18	1	1.18	3.80	0.065 3
纯误差 Pure error	6.19	20	0.31		
总和 Cor total	124.93	29			

显著提高菌丝生长指数, $X_1X_2X_3^2$ ($K=-172.11$)交互作用可以显著降低菌丝生长指数。3种主料贡献率最高为杂木屑,其次是大豆秸秆和油菜秸秆;模型实测值和预测值拟合度较好,可以很好地拟合菌丝生长指数和主料之间的关系(图3)。

2.3.3 漆酶酶活

漆酶酶活回归方程为:

$$Y = 9.00X_1 + 18.02X_2 + 55.32X_3 + 1068.65X_1X_2 + 636.51X_1X_3 + 961.13X_2X_3 + 27247.98X_1^2X_2X_3 - 5088.64X_1X_2^2X_3 - 13289.51X_1X_2X_3^2, R^2 = 0.9815。$$

由表5可知,主料 X_1X_2 、 X_2X_3 、 $X_1^2X_2X_3$ 的交互作用成极显著水平($P < 0.01$),可以显著影响漆酶活性。由回归方程可知, X_1X_2 ($K=1068.65$)、 X_2X_3 ($K=961.13$)和 $X_1^2X_2X_3$ ($K=27247.98$)这3种交互作用可以显著提高漆酶活性。3种主料对

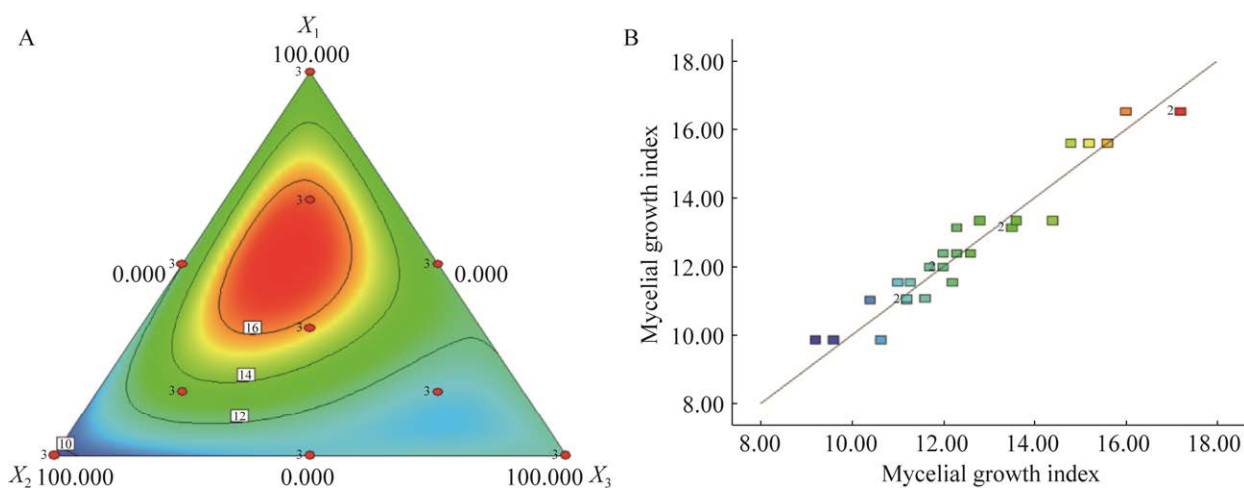


图 3 菌丝生长指数等高线图(A)及其实测值与预测值线性相关图(B)

Figure 3 Contour map of mycelial growth index (A) and linear correlation (B) between measured and predicted values.

表 5 漆酶酶活二次多项回归模型方差分析

Table 5 ANOVA for fitted quadratic polynomial model of laccase activity

变异源	平方和	自由度	均方	F	P
Source	Sum of squares	df	Mean square		
模型 Model	773 090.17	8	96 636.27	7.78	<0.000 1
线性混合模型 Linear mixed model	18 858.30	2	9 429.15	0.76	0.480 3
X_1X_2	143 216.05	1	143 216.05	11.54	0.002 7
X_1X_3	50 808.38	1	50 808.38	4.09	0.056 0
X_2X_3	115 854.23	1	115 854.23	9.33	0.006 0
$X_1^2X_2X_3$	211 934.62	1	211 934.62	17.07	0.000 5
$X_1X_2^2X_3$	7 386.94	1	7 386.94	0.60	0.449 1
$X_1X_2X_3^2$	50 215.35	1	50 215.35	4.05	0.057 3
残差 Residual	260 697.71	21	12 414.18		
失拟项 Lack of fit	252 200.88	1	252 200.88	593.64	<0.000 1
纯误差 Pure error	8 496.83	20	424.84		
总和 Cor total	1 033 787.88	29			

漆酶活性贡献率最高为大豆秸秆，其次是油菜秸秆和杂木屑；漆酶酶活的实测值和预测值拟合度较好，可以很好地拟合漆酶酶活和主料之间的关系(图 4)。

2.3.4 多酚氧化酶酶活

多酚氧化酶酶活回归方程为：

$$Y = 150.92X_1 + 567.68X_2 + 450.37X_3 + 908.57X_1X_2 - 583.85X_1X_3 - 750.37X_2X_3 + 72\,378.71X_1^2X_2X_3 - 49\,057.07X_1X_2^2X_3 - 7\,219.54X_1X_2X_3^2, R^2 = 0.9315。$$

由表 6 可知，主料 $X_1^2X_2X_3$ 和 $X_1X_2^2X_3$ 的交互作用成极显著水平($P < 0.01$)，可以显著影响多

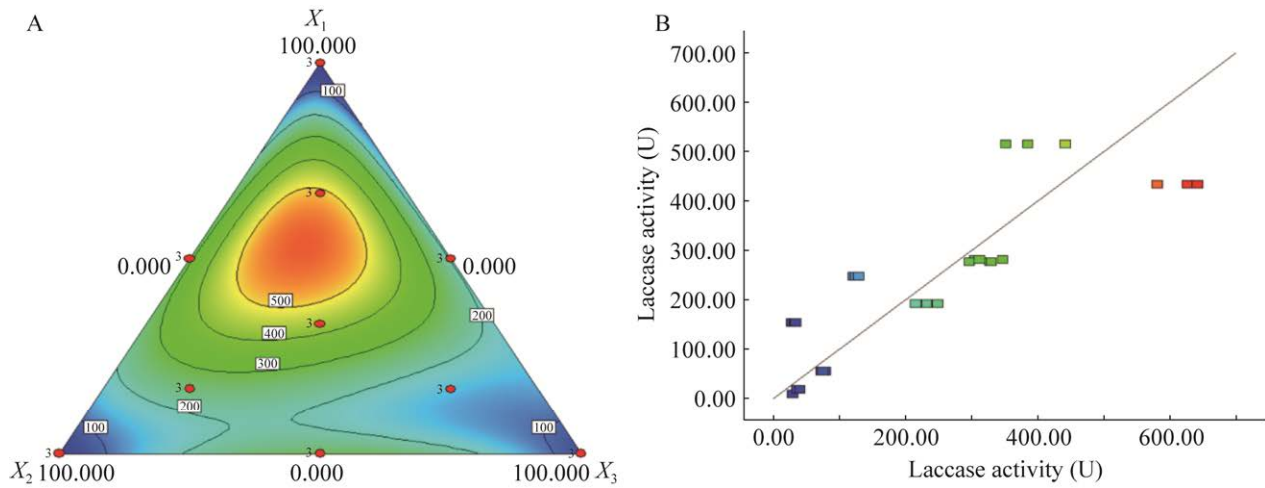


图 4 漆酶活性等高线图(A)及其实测值与预测值线性相关图(B)

Figure 4 Contour map of laccase activity (A) and linear correlation (B) between measured and predicted values.

表 6 多酚氧化酶酶活二次多项回归模型方差分析

Table 6 ANOVA for fitted quadratic polynomial model of polyphenol oxidase activity

变异源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	2 099 084.62	8	262 385.58	7.72	<0.000 1
线性混合模型 Linear mixed model	62 171.26	2	31 085.63	0.91	0.416 1
X_1X_2	103 522.95	1	103 522.95	3.05	0.095 6
X_1X_3	42 748.95	1	42 748.95	1.26	0.274 8
X_2X_3	70 616.25	1	70 616.25	2.08	0.164 3
$X_1^2X_2X_3$	1 495 391.00	1	1 495 391.00	43.99	<0.000 1
$X_1X_2^2X_3$	686 537.04	1	686 537.04	20.20	0.000 2
$X_1X_2X_3^2$	14 819.65	1	14 819.65	0.44	0.516 3
残差 Residual	713 884.53	21	33 994.50		
失拟项 Lack of fit	632 785.27	1	632 785.27	156.05	<0.000 1
纯误差 Pure error	81 099.26	20	4 054.96		
总和 Cor total	2 812 969.14	29			

酚氧化酶活性。由回归方程可知,交互作用 $X_1^2X_2X_3$ ($K=72\ 378.71$)可显著提高多酚氧化酶活性,交互作用 $X_1X_2^2X_3$ ($K=-49\ 057.07$)可显著降低多酚氧化酶活性。3种主料对多酚氧化酶活性贡献率最高为油菜秸秆,其次是大豆秸秆和杂木屑;多酚氧化酶酶活的实测值和预测值拟合度较好,可以很好地拟合多酚氧化酶酶活和3种主料之间的关系(图5)。

2.3.5 纤维素酶酶活

纤维素酶酶活回归方程为:

$$Y = 279.11X_1 + 99.20X_2 + 83.43X_3 - 443.75X_1X_2 - 319.20X_1X_3 - 99.45X_2X_3 - 3583.21X_1^2X_2X_3 + 6098.81X_1X_2^2X_3 + 2426.62X_1X_2X_3^2, R^2 = 0.8717。$$

由表7可知,主料 X_1X_2 、 X_1X_3 、 $X_1^2X_2X_3$ 和 $X_1X_2^2X_3$ 的交互作用成极显著水平($P<0.01$),

可以显著影响纤维素酶活性。由回归方程可知, 交互作用 X_1X_2 ($K=279.11$)和 $X_1X_2^2X_3$ ($K=6\ 098.81$)可显著提高纤维素酶活性, 交互作用 X_1X_3 ($K=-319.20$)、 $X_1^2X_2X_3$ ($K=-3\ 583.21$)可显著降低纤维素酶活性。3 种主料对多酚氧化酶活性贡献率最高为杂木屑, 其次是油菜秸秆和大豆秸秆秸秆; 模型拟合度较好, 可以很好

地拟合纤维素酶活和 3 种主料之间的关系(图 6)。

2.4 最优配方预测

通过限制成分上下界, 设定各评价指标期望响应值范围, 最终预测出一个最优配方: 杂木屑 49.4%, 油菜秸秆 16.4%, 大豆秸秆 12.2%, 麦麸 20.0%, 蔗糖 1.0%, $CaSO_4$ 1.0%。

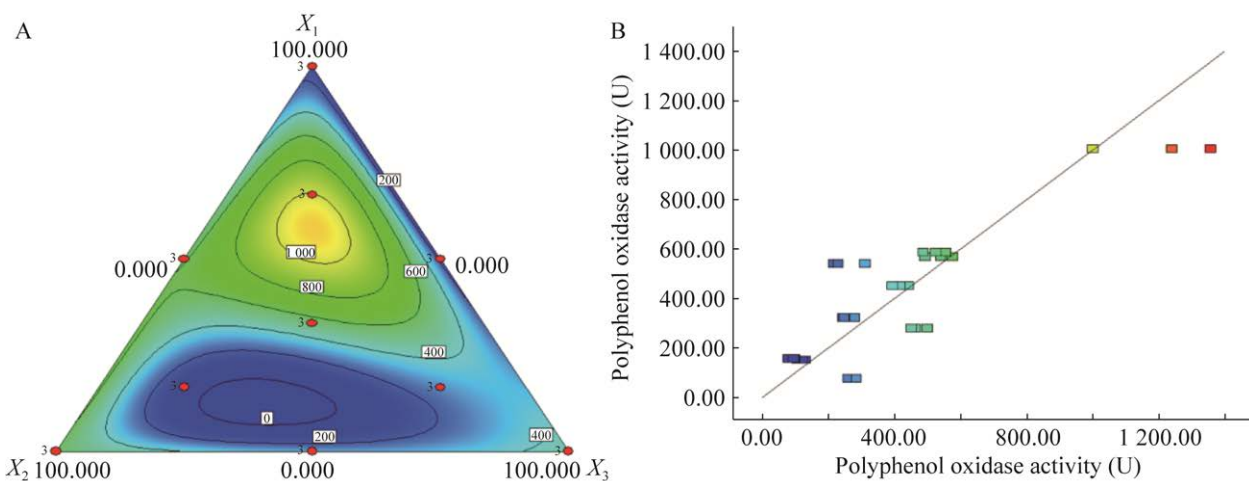


图 5 多酚氧化酶活性等高线图(A)及其实测值与预测值线性相关图(B)

Figure 5 Contour map of polyphenol oxidase activity (A) and linear correlation (B) between measured and predicted values.

表 7 纤维素酶活二次多项回归模型方差分析

Table 7 ANOVA for fitted quadratic polynomial model of cellulase activity

变异源	平方和	自由度	均方	F	P
Source	Sum of squares	df	Mean square		
模型 Model	97 759.26	8	12 219.91	34.16	<0.000 1
线性混合模型 Linear mixed model	52 834.44	2	26 417.22	73.84	<0.000 1
X_1X_2	24 693.94	1	24 693.94	69.03	<0.000 1
X_1X_3	12 777.46	1	12 777.46	35.72	<0.000 1
X_2X_3	1 240.29	1	1 240.29	3.47	0.076 7
$X_1^2X_2X_3$	3 665.04	1	3 665.04	10.24	0.004 3
$X_1X_2^2X_3$	10 610.86	1	10 610.86	29.66	<0.000 1
$X_1X_2X_3^2$	1 674.26	1	1 674.26	4.68	0.042 2
残差 Residual	7 512.75	21	357.75		
失拟项 Lack of fit	1 507.81	1	1 507.81	5.02	0.036 5
纯误差 Pure error	6 004.94	20	300.25		
总和 Cor total	105 272.02	29			

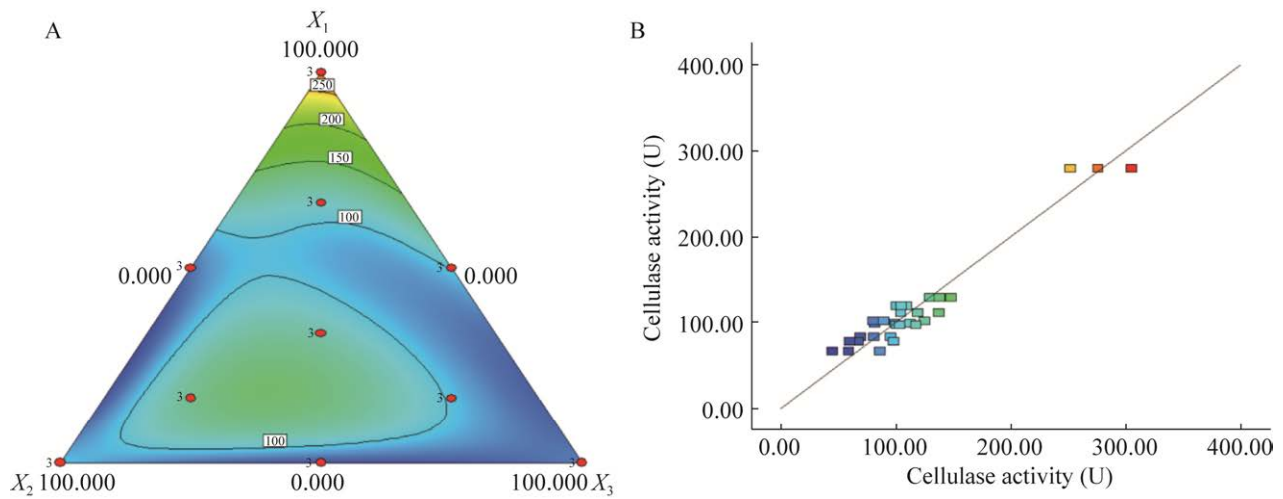


图 6 纤维素酶活性等高线图(A)及其实测值与预测值线性相关图(B)

Figure 6 Contour map of cellulase activity (A) and linear correlation (B) between measured and predicted values.

2.5 验证实验

将预测配方和对照配方重新进行一次平板实验, 每个配方 3 个重复, 测定菌丝生长速率、菌丝生长指数、漆酶酶活、多酚氧化酶酶活和纤维素酶酶活(表 8)。由表 8 可知, 预测配方的菌丝生长速率、菌丝生长指数和漆酶酶活均高于对照配方, 表明预测配方可以替代对照配方进行黑木耳菌丝培养。

3 讨论与结论

混料设计是比较适合食用菌配方优化的一种方法, 可以优化出最适合食用菌菌丝生长的基质配比。近年来, 许多学者都利用混料设计方法优化常见食用菌配方, 如艾啸威^[23]利用混料

设计方法优化出适合海鲜菇生长的油茶壳配方; 范冬雨等^[24]利用混料设计方法优化出适合玉米耳生长的人工林配方; 王倩等^[25]利用混料均匀设计方法优化出双孢菇覆土材料最优配方; 叶建强等^[26]利用混料设计方法优化出最适合灰树花栽培的农业剩余物配方。因此, 本实验利用混料设计中的单纯形格子法优化适合黑木耳菌丝生长的“以草代木”配方, 具有一定的理论基础。本研究结果表明, 在 5 种农业剩余物中, 大豆秸秆最适合黑木耳菌丝生长, 其次是油菜秸秆。杂木屑、油菜秸秆和大豆秸秆三者之间的交互作用可显著影响菌丝生长速率、菌丝生长指数、漆酶酶活、多酚氧化酶酶活和纤维素酶酶活, 其中交互作用 $X_1^2X_2X_3$ 可显著提

表 8 验证实验结果分析

Table 8 Analysis of validation experiment results

配方 Formulation	菌丝生长速率 Mycelium growth rate (mm/d)	菌丝生长指数 Mycelial growth index	漆酶酶活 Laccase activity (U)	多酚氧化酶酶活 Polyphenol oxidase activity (U)	纤维素酶酶活 Cellulase activity (U)
预测配方 Predictive formula	4.300±0.058	17.200±0.231	137.733±5.094	65.120±6.961	177.693±9.974
CK	4.230±0.133	16.933±0.533	35.836±1.810	589.640±20.534	434.059±14.166

高菌丝生长指数、漆酶酶活和多酚氧化酶酶活, 可显著降低纤维素酶酶活; 交互作用 $X_1X_2^2X_3$ 可显著提高菌丝生长速率、菌丝生长指数和纤维素酶酶活, 可显著降低多酚氧化酶酶活; 交互作用 $X_1X_2X_3^2$ 可显著降低菌丝生长速率和菌丝生长指数。由此可知, 不同基质配比对不同酶活的影响也不同, 这与吴周斌等^[16]研究结果相似。推测不同基质配比的 C/N 不同, 所以对不同农艺形状的影响有差异。不同交互作用菌丝生长速率和菌丝生长指数的影响相似, 表明菌丝生长速率是影响菌丝生长指数的主要因素。

分析各农艺形状二次回归模型, 限制不同成分上下界, 设定不同农艺形状期望响应值, 最终优化出适合黑木耳菌丝生长的农业剩余物配方: 杂木屑 49.4%, 油菜秸秆 16.4%, 大豆秸秆 12.2%, 麦麸 20.0%, 蔗糖 1.0%, CaSO_4 1.0%。通过验证实验表明该配方可以替代对照配方进行黑木耳菌丝培养, 本研究结果可以为今后黑木耳草腐化栽培提供理论依据。

REFERENCES

- [1] 李玉, 李泰辉, 杨祝良, 图力古尔, 戴玉成. 中国大型菌物资源图鉴[M]. 郑州: 中原农民出版社, 2015.
LI Y, LI TH, YANG ZL, BAU T, DAI YC. Atlas of Chinese Macrofungus Resources[M]. Zhengzhou: Central Plains Farmers Press, 2015 (in Chinese).
- [2] 赵玉红, 林洋, 张智, 王振宇. 碱溶酸沉法提取黑木耳蛋白质研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(16): 32-36.
ZHAO YH, LIN Y, ZHANG Z, WANG ZY. Optimization of alkali extraction of protein from *Auricularia auricula*[J]. Food Research and Development, 2016, 37(16): 32-36 (in Chinese).
- [3] 刘雅静, 袁延强, 刘秀河, 刘可春. 黑木耳营养保健研究进展[J]. 中国食物与营养, 2010, 16(10): 66-69.
LIU YJ, YUAN YQ, LIU XH, LIU KC. Research advances on nutrition and health care of *Auricularia auricula*[J]. Food and Nutrition in China, 2010, 16(10): 66-69 (in Chinese).
- [4] 罗小芳, 吴敏文, 李昕霖, 吴美生, 陈炳智, 江玉姬. 黑木耳子实体粉代替部分膳食对高脂模型小鼠营养性肥胖预防作用[J]. 菌物学报, 2022, 41(7): 1099-1111.
LUO XF, WU MW, LI XL, WU MS, CHEN BZ, JIANG YJ. Preventive effects of powder of *Auricularia heimuer* fruiting bodies on nutritional obesity of high-fat model mice[J]. Mycosystema, 2022, 41(7): 1099-1111 (in Chinese).
- [5] 周慧萍, 陈琼华, 王淑如. 黑木耳多糖和银耳多糖的抗衰老作用[J]. 中国药科大学学报, 1989(5): 303-306.
ZHOU HP, CHEN QH, WANG SR. Anti aging effect of *Auricularia auricula* polysaccharides and *Tremella fuciformis* polysaccharides[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1989(5): 303-306 (in Chinese).
- [6] 刘永昶, 刘永宏. 黑木耳的营养保健作用及深加工[J]. 中国食用菌, 2005, 24(6): 51-52.
LIU YC, LIU YH. Nutrition and health care function of *Auricularia auricula* and its deep processing[J]. Edible Fungi of China, 2005, 24(6): 51-52 (in Chinese).
- [7] 李文枫, 毕洪文, 黄峰华. 我国黑木耳产业发展现状及对策建议[J]. 北方园艺, 2021(7): 142-147.
LI WF, BI HW, HUANG FH. Present situation and countermeasures and recommendations of development of *Auricularia auricula* industry in China[J]. Northern Horticulture, 2021(7): 142-147 (in Chinese).
- [8] 张鹏, 邹亚杰, 赵鹤, 潘春磊, 于海洋, 王延锋. 秸秆栽培黑木耳研究进展[J]. 北方园艺, 2021(4): 124-128.
ZHANG P, ZOU YJ, ZHAO H, PAN CL, YU HY, WANG YF. Research progress in straw cultivation of *Auricularia heimuer*[J]. Northern Horticulture, 2021(4): 124-128 (in Chinese).
- [9] SONG B, YE JQ, SOSSAH FL, LI CT, LI D, MENG LS, XU S, FU YP, LI Y. Assessing the effects of different agro-residue as substrates on growth cycle and yield of *Grifola frondosa* and statistical optimization of substrate components using simplex-lattice design[J]. AMB Express, 2018, 8(1): 46.
- [10] 吴楠, 田风华, 贾传文, 王悦, 李长田. 混料设计优化红平菇菌丝生长的“以草代木”配方[J]. 微生物学通报, 2019, 46(6): 1390-1403.
WU N, TIAN FH, JIA CW, WANG Y, LI CT. Substrate optimization for mycelium growth of *Pleurotus djamori* in the concept of “replacing wood by grass”[J]. Microbiology China, 2019, 46(6): 1390-1403 (in Chinese).
- [11] 王鑫淼, 荆瑞勇, 吴楠, 闫权, 李喜梅, 王丽艳. 不同基质对桑黄菌丝生长及酶活性的影响[J]. 北方园艺, 2022(9): 109-114.
WANG XM, JING RY, WU N, YAN Q, LI XM, WANG LY. Effects of different substrates on mycelial

- growth and enzyme activity of *Pleurotus linteus*[J]. Northern Horticulture, 2022(9): 109-114 (in Chinese).
- [12] 张鹏, 史磊, 刘姿彤, 盛春鸽, 赵静, 王延锋. 汉麻秸秆替代木屑对猴头菇生长发育和营养品质的影响[J]. 北方园艺, 2022(7): 114-118.
ZHANG P, SHI L, LIU ZT, SHENG CG, ZHAO J, WANG YF. Effects of hemp stalk instead of sawdust on the growth development and nutritional quality of *Hericium erinaceus*[J]. Northern Horticulture, 2022(7): 114-118 (in Chinese).
- [13] WU N, TIAN FH, MOODLEY O, SONG B, JIA CW, YE JQ, LV RN, QIN Z, LI CT. Optimization of agro-residues as substrates for *Pleurotus pulmonarius* production[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 184.
- [14] 张鹏, 熊炳辉, 赵光辉, 袁涛, 陈朝文, 林金秀, 庄卫东. 混料设计优化金针菇栽培配方[J]. 食用菌学报, 2016, 23(2): 31-36.
ZHANG P, XIONG BH, ZHAO GH, YUAN T, CHEN CW, LIN JX, ZHUANG WD. Optimization of *Flammulina velutipes* cultivation substrate using mixture design[J]. Acta Edulis Fungi, 2016, 23(2): 31-36 (in Chinese).
- [15] 孟丽. 食用菌常用培养料配方 200 种[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
MENG L. There Are 200 Kinds of Commonly Used Edible Fungi Culture Materials[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999 (in Chinese).
- [16] 吴周斌, 张健, 王佳敏, 苏德伟, 林兴生, 林占熿. 不同培养料对真姬菇胞外酶活性的影响[J]. 北方园艺, 2015(8): 145-149.
WU ZB, ZHANG J, WANG JM, SU DW, LIN XS, LIN ZX. Effect of different cultivation substrates on extracellular enzyme activities of *Hypsizygus marmoreus*[J]. Northern Horticulture, 2015(8): 145-149 (in Chinese).
- [17] 韩增华, 张丕奇, 孔祥辉, 马庆芳, 戴肖东, 张介驰. 黑木耳胞外酶活变化与栽培性状比较的研究[J]. 食用菌学报, 2007, 14(4): 41-46.
HAN ZH, ZHANG PQ, KONG XH, MA QF, DAI XD, ZHANG JC. Extracellular enzyme activities, mycelial growth rates and fruit body yields of ten *Auricularia auricula* strains[J]. Acta Edulis Fungi, 2007, 14(4): 41-46 (in Chinese).
- [18] TANG W, NEWTON RJ. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in *Virginia* pine (*Pinus virginiana* Mill.)[J]. Plant Science, 2004, 167(3): 621-628.
- [19] 李静, 崔景东, 李维华. 采用蒽酮法测定纤维素酶活力的最适条件[J]. 产业用纺织品, 2015, 33(10): 39-43.
LI J, CUI JD, LI WH. Optimal conditions for cellulase activity measurement with anthrone method[J]. Technical Textiles, 2015, 33(10): 39-43 (in Chinese).
- [20] SCHEFFE H. The simplex-centroid design for experiments with mixtures[J]. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological), 1963, 25(2): 235-263.
- [21] 罗莹, 张志军, 周永斌, 钱磊, 王文治. 食用菌菌丝在不同谷物培养基上的生长研究[J]. 北方园艺, 2020(13): 124-128.
LUO Y, ZHANG ZJ, ZHOU YB, QIAN L, WANG WZ. Study on the mycelial growth of edible fungi in the grain medium[J]. Northern Horticulture, 2020(13): 124-128 (in Chinese).
- [22] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997.
XU JT. Medicinal Mycology of China[M]. Beijing: Beijing Medical University, China Union Press of Peking Union Medical University, 1997 (in Chinese).
- [23] 艾啸威. 油茶壳瓶栽海鲜菇配方优化及其工厂设计[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2016.
AI XW. Formula optimization and factory design of *Camellia oleifera* shell bottled *Pleurotus ostreatus*[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [24] 范冬雨, 贾传文, 吴楠, 李长田. 混料设计优化玉木耳的木屑栽培配方[J]. 食用菌学报, 2019, 26(4): 57-63.
FAN DY, JIA CW, WU N, LI CT. Optimization of sawdust substrate for *Auricularia cornea* (yumuier) cultivation by mixture design[J]. Acta Edulis Fungi, 2019, 26(4): 57-63 (in Chinese).
- [25] 王倩, 田益华, 朱燕华, 曹晖, 陈明杰, 汪虹, 张津京, 黄建春. 基于持水特性应用混料均匀设计优化双孢蘑菇覆土材料[J]. 上海农业学报, 2017, 33(6): 11-17.
WANG Q, TIAN YH, ZHU YH, CAO H, CHEN MJ, WANG H, ZHANG JJ, HUANG JC. Optimization of *Agaricus bisporus* casing materials based on the water holding properties using uniform design[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2017, 33(6): 11-17 (in Chinese).
- [26] 叶建强, 宋冰, 李玉, 付永平, 李丹, 李长田. 灰树花秸秆栽培基质配方的优化[J]. 菌物研究, 2019, 17(1): 50-56.
YE JQ, SONG B, LI Y, FU YP, LI D, LI CT. The optimizal formula of *Grifola frondosa* cultivation with straw substrate[J]. Journal of Fungal Research, 2019, 17(1): 50-56 (in Chinese).