

以提升品质为目标的中药材灵芝袋料栽培技术初探

魏巍¹, 余梦瑶¹, 许晓燕¹, 江南¹, 郑林用², 韩佳玉³, 罗霞^{1*} (1. 四川省中医药科学院, 四川成都 61041; 2. 四川省农业科学院, 四川成都 610066; 3. 四川大学生命科学学院, 四川成都 61064)

摘要 [目的] 研究中药材灵芝袋料栽培技术, 以提升灵芝药材品质。[方法] 以灵芝生物转化率、多糖含量和三萜含量为指标, 采用混料设计优化袋料栽培灵芝主料配方, 采用单因素试验优化石灰添加量和基质颗粒度。[结果] 当纯棉籽壳为主料、石灰添加量为 4%、基质颗粒度大于 1 cm 时, 袋料栽培灵芝生物转化率最高; 当杂木屑用量 25%、棉籽壳用量 25%、玉米芯用量 50%、石灰添加量为 1%、基质颗粒度大于 1 cm 时, 多糖含量最高; 当杂木屑用量 50%、棉籽壳用量 50%、石灰添加量为 2%、基质颗粒度小于 0.5 cm 时, 三萜含量最高。[结论] 栽培基质对袋料栽培灵芝品质影响较大, 可通过主料配方、石灰添加量及基质颗粒度控制袋料灵芝产量和品质。

关键词 灵芝(GANODERMA); 袋料栽培; 主料配方; 石灰添加量; 基质颗粒度

中图分类号 S567.3[†] **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)04-00981-02

The Cultivation Technique Studied for Improving the Quality of *Ganoderma lucidum*

WEI Wei, LUO Xia et al (Sichuan Academy of Chinese Medicine Science, Chengdu, Sichuan 610041)

Abstract [Objective] The cultivation technique was studied for improving the quality of *Ganoderma lucidum*. [Method] The main cultivation substrate was optimized use the mixture design, the ratio of lime in the cultivation substrate and the particle size of the substrate were optimized use the single factor experiment, while the optimization criterions are biological efficiency, polysaccharides and triterpenes content of *G. lucidum*. [Result] The results showed that the biological efficiency is highest while main cultivation substrate is cotton seed shell, the ratio of lime in the cultivation substrate is 4% and the particle size of the substrate is bigger than 1 cm; the polysaccharides content is highest while the main cultivation substrate is composed of 25% sawdust, 25% cotton seed shell, 50% corn cobs, the ratio of lime in the cultivation substrate is 1% and the particle size of the substrate is bigger than 1 cm; the triterpenes content is highest while the main cultivation substrate is composed of 50% sawdust, 50% cotton seed shell, the ratio of lime in the cultivation substrate is 2% and the particle size of the substrate is smaller than 1 cm. [Conclusion] The *G. lucidum* production and quality can be controlled from the main cultivation substrate formula, the ratio of lime in the cultivation substrate and the particle size of the substrate, because their effect influence was so significant.

Key words GANODERMA; Bag cultivation; Main cultivation substrate formulation; Ratio of lime; Substrate particle size

灵芝袋料栽培具有产量高、周期短、原料来源广泛等优点^[1], 已逐步取代椴木栽培成为灵芝人工栽培技术的研究热点。但是目前关于灵芝袋料栽培技术的研究主要集中在产量和农艺性状上面^[2-3], 针对灵芝内在品质的栽培技术研究鲜有报道。作为传统的名贵中药材, 灵芝(GANODERMA)在我国有着悠久的药用历史, 收录于《中华人民共和国药典》(2010 版), 主要的药效成分为灵芝多糖和三萜, 这些成分是评价灵芝品质的主要标准。笔者以提升灵芝品质为目标, 从灵芝栽培基质的主料配方、石灰添加量及基质颗粒度入手, 研究灵芝袋料栽培技术, 旨在为灵芝建立“中药材生产质量管理规范”(GAP)提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。灵芝(*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst), 由四川省中医药科学院细胞与分子生物学实验室分离保存。

1.1.2 主要试剂。杂木屑、棉籽壳、玉米芯、石膏和石灰粉

基金项目 菌类药材研究与开发四川省科技创新团队(2011JTD0021); 四川省十二五育种攻关项目“菌类药材优质种质资源的收集及新材料的选育”(2011NZ0098—12—04); 国家农业产业技术体系药用菌栽培岗位建设项目(农科教发[2007]12号); 四川省公益性科研院所基本科研课题“袋料灵芝营养代谢-药效成分时空关联模式的研究”; 四川省十二五育种攻关项目“菌类药材优质种质资源的收集及新材料的选育”(2011NZ0098—12—04); 四川省重大科技计划项目“食药菌现代产业链关键技术研究与产业化示范(2012NZ0003); 四川省农业微生物平台项目。

作者简介 魏巍(1982-), 男, 四川成都人, 助理研究员, 博士, 从事药用真菌研究。* 通讯作者, 副研究员, 博士, 从事药用真菌研究。

收稿日期 2014-01-11

等, 均购自当地农贸市场; 葡萄糖、萘酮、浓硫酸、香草醛、齐墩果酸、无水乙醇、NaHCO₃、冰醋酸和氯仿, 均为分析纯, 市售。

1.2 方法

1.2.1 主料配方的优化。主料配方优化采用混料设计法, 主料由杂木屑、棉籽壳和玉米芯组成, 设定各主料占有主料的质量百分比为 X_1' , X_2' 和 X_3' , 均满足基本约束条件: $0 \leq X_1' \leq 1; 0 \leq X_2' \leq 1; 0 \leq X_3' \leq 1; X_1' + X_2' + X_3' = 1$, 主料占配方的 90%, 则在实际生产过程中主料的添加量为 $X_1 = 0.9 \times X_1'; X_2 = 0.9 \times X_2'; X_3 = 0.9 \times X_3'$ 。辅料占 10%, 由 8% 麸皮、1% 石膏和 1% 石灰组成。考虑到各主料培养基对观测指标存在协同交互作用, 试验采用单纯形重心设计, 并通过轴点增强设计选取试验点进行混料设计, 共选取 10 个观察试验点, 具体设计见表 1。

表 1 灵芝栽培基质的主料配方设计表

配方 编号	编码值			实际值		
	X_1'	X_2'	X_3'	X_1	X_2	X_3
1	1	0	0	90	0	0
2	1/2	1/2	0	45	45	0
3	1/2	0	1/2	45	0	45
4	2/4	1/4	1/4	60	15	15
5	1/4	2/4	1/4	15	60	15
6	0	1	0	0	90	0
7	1/4	1/4	2/4	15	15	60
8	1/4	1/4	1/4	30	30	30
9	0	1/2	1/2	0	45	45
10	0	0	1	0	0	90

注: X_1 为杂木屑; X_2 为棉籽壳; X_3 为玉米芯。

1.2.2 石灰添加量的优化。基质配方采用15%杂木屑、60%棉籽壳、15%玉米芯、8%麸皮、1%石膏,装袋前按比例分别添加1%、2%、3%和4%生石灰,以不加石灰栽培为对照(CK)。

1.2.3 基质颗粒度的优化。基质配方采用15%杂木屑、60%棉籽壳、15%玉米芯、9%麦麸、石膏1%和1%石灰,以玉米芯和木屑颗粒直径为研究对象,设定处理1为颗粒直径 ≤ 0.5 cm,处理2为 0.5 cm \leq 颗粒直径 ≤ 1 cm,处理3为颗粒直径 ≥ 1 cm。

1.2.4 栽培方法。选用22 cm \times 42 cm \times 0.002 5 cm的聚丙烯袋,每个配方20袋,于121 $^{\circ}$ C高压灭菌2.5 h,冷却至室温后接种,在25 $^{\circ}$ C、空气相对湿度70%、避光培养至菌丝长满袋,菌丝满袋后移入出菇棚出芝。出菇棚温度为16~24 $^{\circ}$ C,湿度为65%~80%。

1.2.5 指标的检测。(1)灵芝生物转化率。采摘第1潮灵芝子实体,记录每袋收获干芝重量,计算生物转化率,生物转化率(%) = 干芝重量(g)/每袋干重(g) \times 100。(2)多糖含量测定^[4]。以葡萄糖作为标准,采用硫酸-蒽酮法测定。(3)三萜含量测定^[5]。以齐墩果酸作为标准,采用香草醛-高氯酸法测定。

1.2.6 数据分析。混料设计试验根据结果建立回归方程,求观测指标 Y 与影响因子 X 的数学模型,计算线性回归方程,应用Minitab 15软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 主料配方的优化 采用软件对试验数据进行回归分析,并采用逐步法和后退法减少不显著变量,对回归方程进行显著性检验(F 检验)。当 $P < 0.01$ 时,回归模型在统计学上才有意义。根据上述条件和结果,建立生物转化率 Y 与主料各成分 X' 之间关系的数学模型为: $Y = 3.69 X_1' + 6.78 X_2' + 4.39 X_3'$, $R^2 = 0.7999$,说明试验数据的变异性基本可以用此回归模型来解释。将多糖、三萜与各主料各成分 X' 关系的数学模型经过显著性检验可知, $P > 0.01$,说明2个模型的拟合度差,不描述多糖含量和配方之间的关系,但是通过优化结果可知,配方7的多糖含量最高;配方2的三萜含量最高(表2)。

表2 不同配方的袋料灵芝的生物转化率、子实体多糖和三萜含量

配方编号	转化率/%	多糖含量/mg/g	三萜含量/mg/g
1	4.39	1.99	1.85
2	4.92	2.69	2.41
3	3.71	2.36	1.20
4	3.59	1.41	0.93
5	6.60	3.68	1.60
6	6.45	2.97	1.07
7	4.57	3.80	1.64
8	5.00	2.64	0.94
9	5.85	2.15	1.78
10	4.48	2.76	0.86

2.2 石灰添加量的优化结果 图1表明,随着石灰添加量的增加,袋料栽培灵芝生物转化率有增加的趋势,在灵芝栽

培基质中添加4%生石灰时生物转化率最高,达到4.3%。当石灰添加量为2%的时候,灵芝三萜含量最高,为0.76 mg/g。当石灰添加量低于或高于2%的时候,三萜含量均略有降低。在添加量为1%~3%时,灵芝多糖含量随石灰添加量增加而降低;当石灰添加量为1%的时候多糖含量最高,为3.24 mg/g。

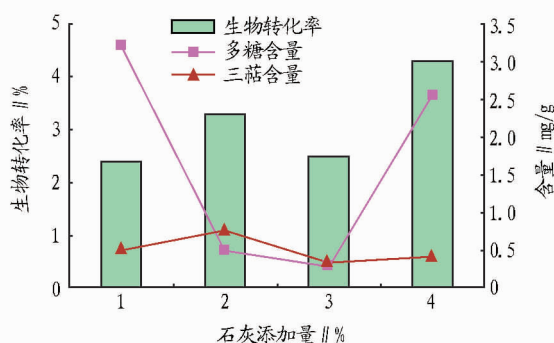


图1 不同生石灰添加量灵芝的生物转化率、子实体多糖和三萜含量

2.3 基质颗粒度优化结果 图2表明,随着颗粒度增加,袋料栽培灵芝的生物转化率和多糖含量增加,颗粒度大于1 cm时,生物转化率最高为4.3%,多糖含量最高,为1.61 mg/g。在颗粒度为0.5~1 cm时三萜含量最高,为1.37 mg/g。

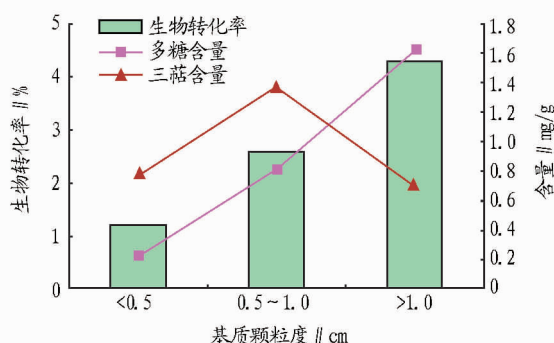


图2 不同基质颗粒度灵芝的生物转化率、子实体多糖和三萜含量

3 结论与讨论

研究表明,不同灵芝栽培方式和基质对灵芝品质具有明显影响^[6-7]。试验通过灵芝栽培基质的主料配方、石灰添加量及基质颗粒度的研究,以提升品质为目标对中药材灵芝袋栽培技术进行初探。通过混料试验设计,得到了灵芝代料栽培主料配方与生物转化率之间回归方程,在灵芝主料配方的通过回归方程的系数可以看出,影响灵芝生化转化率的因素作用大小为棉籽壳 $>$ 玉米芯 $>$ 杂木屑,该结果与蒋冬花的研究结果基本相同^[8]。通过该方程计算出灵芝生物转化率最高的主料配方为:90%棉籽壳,预测生物转化率最高为6.78%。虽然试验没有得到主料配方与灵芝品质(多糖含量和三萜含量)的准确关系,但是发现主料配方对灵芝品质(多糖含量和三萜含量)具有明显影响。

多数食药菌对钙具有富集作用^[9-11]。高明侠等报道钙离子对灵芝的生长具有促进作用^[12],这与试验结果相似:随着石灰的添加量增加灵芝的生物转化率提高。在灵芝袋 (下转第991页)

试验采用试剂盒方法提取小家鼠新鲜冰冻材料的基因组 DNA,提取效果较好,用特异引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果很好,上海生工生物公司对 PCR 产物进行测序顺利,结果很好,将测序得到的结果与 GenBank 中已有的小家鼠序列进行比较,结果表明,扩增和测序结果正确。

通过序列对比发现,20 个中国小家鼠个体的细胞色素 *b* 基因长为 1 144 bp,其碱基序列及含量相差很小,A、T、G、C 的平均含量分别为 31.6%、29.2%、12.2% 和 27.0%;AT 含量(60.8%)大于 GC 含量(39.2%),存在显著的 AT 偏性,每个个体间碱基组成几乎无差别。20 个个体的 1 144 个碱基中,TW1、WH、PX、KM、TW2、TW3、GX、GZ 这 8 个个体有 18 处碱基不同于 HZ、YA、DT、CZ、UQ、HF、KZ、CY、SL、LY、BT 和 MH 这 12 个个体;此外,还有极少数的几个碱基序列不一致,其余均相同。

试验所用的小家鼠分别来自长江以南,包括台湾省在内的 6 个地区,以及长江以北的 12 个地区。其中,大家鼠 *Rattus norvegicus* (X14848) 在发育树中处于最外 1 个分支,与发育树内其他 2 个分支关系较远;发育树中第 2 个分支包括 *M. m. castaneus* (EF108342) 和长江以南 6 个地区的 8 个个体 (TW1、WH、PX、KM、TW2、TW3、GX、GZ),说明这 8 个个体属于 *M. m. castaneus* 亚种;长江以北 12 个地区的 12 个个体 (HZ、YA、DT、CZ、UQ、HF、KZ、CY、SL、LY、BT 和 MH) 与 *M. m. musculus* (EF108345) 构成第 3 个分支,说明这 12 个个体属于 *M. m. musculus* 亚种。UQ 与 HF、MH 与 CY、SL 与 DT 以及 WH 与 PX、TW2 与 TW3、GX 与 GZ 两两分别具有相同的支长,说明其 DNA 序列相同,表明它们来自同一母系祖先。这

(上接第 982 页)

料栽培种添加石灰,除为食用菌的生长补充钙外,主要作用是调节基质 pH 值。研究发现,液体发酵灵芝在较低 pH 值时有利于多糖和三萜的形成^[13-14],这就解释试验中灵芝多糖和三萜在石灰添加量较少时反而更高的现象。

玉米芯和木屑在基质中除了起到营养物质的作用外,还具有支撑基质的作用,有利于气体和热量的交换,因此基质的颗粒度越大,越有利于菌丝生长。在杏鲍菇栽培基质的研究中也发现相似的结果^[15],随着大颗粒玉米芯含量的增加,生物学效率增加。研究发现,液体培养灵芝在较高的摇床转速时,有利于胞外多糖的形成^[16],推测多糖的合成需要充足的氧气,而静置培养更利于三萜的形成^[17],推测三萜合成需要低氧环境,这可以解释为什么袋料栽培灵芝时,多糖含量随基质颗粒度增加而增加,但三萜含量却降低。

试验结果发现,栽培环节对灵芝品质影响较大,可通过主料配方、石灰添加量及基质颗粒度可控制袋料灵芝产量和品质。虽然试验结果不是很全面,还有很多参数尚待研究,但是对建立灵芝 GAP 袋料栽培技术具有重要的参考价值。

参考文献

[1] 池小妹. 我国灵芝人工栽培技术研究现状[J]. 时珍国医国药,2005,16(8): 791-792.

些结果显示,中国小家鼠基因来源较复杂,以长江为界,可分为南北 2 大亚种:南方为 *M. m. castaneus* 亚种,北方为 *M. m. musculus* 亚种。但由于所用分子标记有限,要想得到更详尽的数据,应进一步扩大采样范围与样品数量,并使用更多的分析标记来进行分析。

参考文献

[1] GÜNDÜZ I, AUFRAY J C, BRITTON-DAVIDIAN J, et al. Molecular studies on the colonization of the Madeiran archipelago by house mice [J]. Molecular Ecology, 2001, 10(8): 2023-2029.

[2] SAGE R D, ATCHLEY W R, CAPANNA E. House mice as models in systematic biology [J]. Systematic Biology, 1993, 42(4): 523-561.

[3] BAINES J F, HARR B. Reduced X-linked diversity in derived populations of house mice [J]. Genetics, 2007, 175(4): 1911-1921.

[4] GERALDES A, BASSET P, SMITH K L, et al. Higher differentiation among subspecies of the house mouse (*Mus musculus*) in genomic regions with low recombination [J]. Molecular Ecology, 2011, 20(22): 4722-4736.

[5] ELLERMAN J R, MORRISON-SCOTT T C S. Checklist of Palaearctic and Indian mammals, 1758 to 1946 [M]. London: British Museum (Natural History), 1966.

[6] PRAGER E M, ORREGO C, SAGE R D. Genetic variation and phylogeography of central Asian and other house mice, including a major new mitochondrial lineage in Yemen [J]. Genetics, 1998, 150(2): 835-861.

[7] AVISE J C, WALKER D E, JOHNS G C. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography [J]. Biological Sciences, 1998, 265(1407): 1707-1712.

[8] ANDREWS T D, JERMIN L S, EASTEAL S. Accelerated evolution of cytochrome b in simian primates: adaptive evolution in concert with other mitochondrial proteins? [J]. Journal of Molecular Evolution, 1998, 47(3): 249-257.

[9] LIU X, WEI F, LI M, et al. Molecular phylogeny and taxonomy of wood mice (genus *Apodemus* Kaup, 1829) based on complete mtDNA cytochrome b sequences, with emphasis on Chinese species [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 33(1): 1-15.

[10] LUO J, YANG D, SUZUKI H, et al. Molecular phylogeny and biogeography of Oriental voles: genus *Eothenomys* (Muridae, Mammalia) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 33(2): 349-362.

[11] 李菁菁, 张亚平. 小家鼠的遗传与进化研究进展 [J]. 动物学研究, 2001, 22(5): 406-412.

[2] 胡景平. 黄土高原代料栽培灵芝筛选实验研究 [J]. 北方园艺, 2008(3): 228-229.

[3] 甘双杨, 桂珍, 刘碧源, 等. 袋料栽培灵芝配方优化实验 [J]. 现代农业科技, 2013(3): 83-84.

[4] 戚雁飞. 灵芝中灵芝多糖的含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 852-853.

[5] 王伟, 尚德静, 温磊. 灵芝发酵菌丝三萜类化合物含量的测定 [J]. 中国食用菌, 2006, 25(1): 30-32.

[6] 陈璐. 不同栽培基质和生长期的灵芝药效品质特异性研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2008: 51-67.

[7] 刘松洁, 郑林用, 许晓燕, 等. 培养基原料和配方对不同生产方式下灵芝品质的影响 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3674-3676.

[8] 蒋冬花. 培养基配方与栽培方式对灵芝产量和质量的影响 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2001, 19(1): 76-79.

[9] 曾雨雷, 胡家俊, 杨波, 等. 液态发酵冬虫夏草菌制备生物活性钙的研究 [J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(2): 16-19.

[10] 王伟霞, 李福后, 陈立国. 茯苓菌丝体富集钙的研究 [J]. 食用菌, 2007(1): 9-10.

[11] 卜庆梅, 王丽娟, 刘林德, 等. 3 种食用菌菌丝体富钙的研究 [J]. 食品科学, 2009(21): 172-174.

[12] 高明侠, 秦卫东, 苗敬芝, 等. 富钙灵芝的深层培养 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18(4): 641-643.

[13] 刘冬, 李世敏. pH 值及溶解氧对灵芝多糖深层液态发酵的影响与控制 [J]. 食品与发酵工业, 2001(6): 7-10.

[14] 凌庆, 枝王林, 魏兆军, 等. pH 值控制灵芝发酵产生灵芝酸的研究 [J]. 中国酿造, 2009(3): 117-120.

[15] 李正鹏. 杏鲍菇培养阶段基质理化特性变化的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.

[16] 李平作, 徐柔, 章克昌. 灵芝液体发酵过程中菌体形态与胞外多糖产量的关系 [J]. 工业微生物, 2000, 30(3): 20-23.

[17] 余素萍, 张劲松, 杨焱, 等. 灵芝胞内三萜高产菌株的筛选及发酵条件的优化 [J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 57-61.