

## 试验研究

## 桑枝基质的灵芝优质高效栽培配方研究

肖建中 邹湘月 颜新培 邵元元 叶添梅 李霞

(湖南省蚕桑科学研究所, 湖南 长沙 410127)

摘要: 以桑枝和棉籽壳为主要培养基, 通过对灵芝主栽菌株 G1 不同的配方进行栽培试验和对其菌丝生长特性、农艺性状及子实体活性成分含量进行差异分析, 结果表明: 添加 50% 桑枝木屑、30% 棉籽壳、15% 麦麸的配方是适宜灵芝优质高效栽培的最优配方。

关键词: 桑枝 灵芝 配方 生长性能 活性成分

DOI:10.13886/j.cnki.sccy.2018.03.007

灵芝 (*Ganoderma lucidum*), 属担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌<sup>[1]</sup>, 又称“仙草”、“瑞草”, 自古以来就是我国的一味传统名贵药材。现代医学和临床研究结果表明, 灵芝具有保肝护肝、免疫调节和抑制肿瘤的药理作用<sup>[2-3]</sup>, 有关灵芝的开发利用备受关注。目前, 人工代料栽培灵芝的培养基质以木屑、棉籽壳为主, 随着食用菌产业规模的不断扩大, 原材料成本一路攀升, 寻求一种新的优质生产原料成为灵芝代料产业亟待解决的难题之一<sup>[4-5]</sup>。桑枝作为蚕桑产业中生物量最多的副产物, 富含纤维素、粗蛋白、桑黄酮、生物碱等多种营养物质和功能成分<sup>[6]</sup>, 理论上可作为灵芝代料栽培的上等培养原料, 也可使废弃桑枝得到合理有效的利用。本试验以桑枝和棉籽壳为主要培养基, 通过不同的配比栽培灵芝主栽菌株 G1, 并对其菌丝生长特性、农艺性状及子实体功能成分含量 (包括灵芝多糖、黄酮及三萜类物质) 进行差异分析, 以期获得以桑枝为主要基质高效栽培灵芝的最优配方, 为桑枝灵芝的进一步开发利用提供依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株。G1 为赤芝 (*Ganoderma lucidum*), 由湖南省蚕桑科学研究所保藏。

1.1.2 培养基。母种培养基 (PDA 加富培养基: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 15g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g,  $\text{MgSO}_4$  1.5g, 酵母膏 2g, 蛋白胨 2g, 水 1000ml, pH 自然), 121℃、0.1MPa 高压蒸汽下灭菌后备用。

原种培养基 (玉米粒 74%, 小米 25%, 石膏 1%, pH 自然), 121℃、0.1MPa 高压蒸汽下灭菌后备用。

1.1.3 主要试剂与仪器。马铃薯、玉米粒、棉籽壳、麦麸等购自本地农贸市场, 桑枝来源于湖南省蚕桑科学研究所桑树资源圃, 葡萄糖、酵母膏、琼脂、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、葱酮、硫酸、熊果酸、香兰素、冰醋酸、高氯酸、芦丁、甲醇、乙醇、氢氧化钠、硝酸铝等, 试剂均为分析纯。

YXQ-LS-50SII 型立式压力蒸汽灭菌锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), PL203 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-22-SYZ16)

作者简介: 肖建中 (1962-), 男, 高级农艺师, 从事蚕桑资源利用研究, 通讯作者为颜新培。

文献信息: 肖建中, 邹湘月, 颜新培, 等. 以桑枝为主要基质的灵芝优质高效栽培配方研究 [J]. 四川蚕业, 2018 (3): 20-23.

司), DH G-9140 恒温干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), SW-CJ-2FO 净化工作台(苏州净化设备有限公司), LRH-150 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司), KA-1000 型台式离心机(日本日立公司), UV-1800 型紫外可见分光光度仪(日本岛津公司), 其他为实验室常规设备。

## 1.2 试验方法

1.2.1 母种活化与原种培养。按无菌化操作要求分别取黄豆粒大小 G1 灵芝母种的菌种, 转接于 PDA 母种培养基中央, 28℃ 培养箱暗培养 6d, 取生长边缘的旺盛菌丝再接种于新培养基内, 反复转接至菌丝恢复生长活力, 保存备用。

在灭菌后备用的玉米粒原种培养基中依次接种, 做好标记, 置 25℃ 组培室中暗培养 20 d 左右, 待菌丝长满菌袋后保存在 4℃ 冰箱备用。

1.2.2 栽培种的制作。将桑枝粉碎加工成直径小于 5mm 的木屑颗粒, 按照各种配方要求(详见表 1) 与棉籽壳、麦麸等混合装在规格为 17cm × 33cm 的聚丙烯袋中, 每袋干料 0.5Kg, 每个配方 30 袋, 共 3 次重复, 121℃、0.1MPa 高压蒸汽下灭菌 2 h 后备用。

表 1 桑枝灵芝栽培基质配方

配方	主料 (%)			辅料
	桑枝木屑	棉籽壳	麦麸	
1	65	15	15	石灰 3%、石膏 2%
2	50	30	15	石灰 3%、石膏 2%
3	35	45	15	石灰 3%、石膏 2%
4 (CK)		80	15	石灰 3%、石膏 2%

1.2.3 发菌培养。把在无菌条件下接种的灵芝菌袋放置在 25℃、相对湿度为 60% ~ 70% 且通风良好的组培室中进行避光发菌, 每天观察菌丝的生长及污染情况, 发现杂菌污染的菌包及时剔除, 定期记录灵芝菌丝生长速度、菌丝外观、长势及发菌时间等生长特性。

1.2.4 出芝管理。待菌丝长满菌袋后, 表面菌丝由白色逐渐转为乳白或浅黄色, 便开始揭盖进行出芝管理。培养温度严格控制在 25℃ ~ 30℃, 定时通风, 现蕾期的空气湿度为 80% ~

90%, 在菌盖分化期启用加湿器保持恒定空气相对湿度 85% ~ 90%。当菌盖边缘白色生长线消失、子实体长成, 开始及时采收。出芝期间观察并记录各配方各重复子实体的农艺性状, 包括现蕾时间、菌盖直径厚度、菌柄长度、孢子弹射量, 并计算单袋平均产量及生物学转化率。

1.2.5 灵芝子实体活性物质含量的测定。子实体中灵芝多糖的提取与检测, 以葡萄糖为标准品, 绘制标准曲线回归方程  $y = 0.579x + 0.077$  测定多糖含量<sup>[7]</sup>; 灵芝三萜的提取与检测, 以熊果酸为标准品, 绘制标准曲线回归方程  $y = 0.510x - 0.005$  测定总三萜含量<sup>[8]</sup>; 子实体中黄酮的提取与检测, 以芦丁为标准品, 绘制标准曲线回归方程  $y = 0.319x + 0.047$  测定总黄酮的含量<sup>[9]</sup>。

1.2.6 数据处理。试验数据采用 Excel 2003 进行初步统计, 用 SPASS 18.0 统计处理软件进行方差分析及显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同配方对灵芝菌丝生长特性的影响

在培养条件一致的情况下, 不同的配方对灵芝菌株 G1 的菌丝生长情况影响较大(见表 2)。在配方 4 中(CK) 的纯棉籽壳培养基中, 灵芝菌丝的生长速度最快, 为  $4.17 \pm 0.29$  mm/d, 且长势良好, 表明棉籽壳的营养结构及 C/N 比较适合灵芝菌丝的生长发育; 而在添加了 50% 桑枝木屑的配方 2 中, 菌丝生长速度也高达  $4.02 \pm 0.34$  mm/d, 仅次于对照组, 无显著差异, 且菌丝外观浓密、洁白、长势旺盛, 从菌丝表现来看也可以作为菌株 G1 的最优配方。菌丝生长速度较慢的是配方 1 和配方 3, 平均生长速度都在 4.0 mm/d 以下, 与对照组差异显著, 且菌丝长势一般。从表 2 可知, 菌丝生长情况并没有随着桑枝木屑添加量的增加而逐渐减弱, 反而在配方 2 中达到最优, 分析其中的原因可能是虽然桑枝没有棉籽壳内的营养成分和 C/N 比合适, 但灵芝为好气性真菌, 一定量的桑枝木屑可以增加袋内的空气流动, 促进了菌丝生长, 而当桑枝木屑添加过多(配方 1) 难以给灵芝菌丝提供充足的养分, 导致其生长

缓慢、菌丝稀疏、不整齐等外观表现。

表2 不同配方灵芝菌丝生长情况

配方	生长速度 (mm/d)	发菌时间 (d)	菌丝外观	菌丝长势
1	2.74 ± 0.45c	49	稀疏、较白、较整齐	++
2	4.02 ± 0.34a	34	浓密、洁白、整齐	++++
3	3.18 ± 0.22b	42	浓密、洁白、较整齐	+++
4 (CK)	4.17 ± 0.29a	32	浓密、洁白、整齐	++++

注: 同列数据后小写字母不同者表示  $P < 0.05$  水平的差异显著性, 下同。表中“++”表示长势较弱, “+++”表示长势中等, “++++”表示长势旺盛。

## 2.2 不同配方对灵芝子实体农艺性状及产量的影响

在不同比例桑枝添加量的培养基中, 灵芝子实体的农艺性状及产量等各项生长指标存在一定差异 (见表3)。在菌丝长满并开口后, 配方2培养基中的灵芝现蕾最早, 平均6d可完成现蕾, 比对照组早1d; 在配方1、配方2、配方3之间, 在菌盖直径、菌盖厚度和孢子粉弹射量的指标上存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 其中, 配方2的这3项性状指标 (菌盖直径  $11.58 \pm 0.65\text{cm}$ , 厚度  $1.63 \pm 0.15\text{mm}$ , 弹孢量  $4.28 \pm 0.36\text{g}$ ) 优于其它配方, 仅次于对照组, 表现突出, 理论上灵芝孢子粉的弹射量随着菌盖直

径及厚度的增大而增加, 从表中数据可以看出, 该试验结果符合一般规律; 但在短柄灵芝品种G1的菌柄长度上, 配方1和配方2的表现优于配方3和对照, 其中各项生长指标均较弱的配方1培养的灵芝子实体菌柄最长, 为  $3.56 \pm 0.24\text{cm}$ ; 以配方2培养基培养的灵芝子实体鲜重为  $123.95 \pm 5.58\text{g}$ , 与对照配方灵芝无显著差异, 在配方1培养基中生长的灵芝子实体鲜重最低, 只有  $85.66 \pm 5.36\text{g}$ ; 生物转化率与子实体鲜重产量是呈正相关的, 其顺序依次为: 配方1 < 配方3 < 配方2 < CK, 而配方2与对照配方无显著差异。

表3 不同配方灵芝菌丝农艺性状及产量情况

配方	现蕾时间 (d)	菌盖直径 (cm)	菌盖厚度 (mm)	菌柄长度 (cm)	孢子弹射量 (g)	鲜重重量 (g)	生物转化率 (%)
1	10	7.98 ± 0.94d	1.35 ± 0.12c	3.56 ± 0.24a	2.65 ± 0.18c	85.66 ± 5.36c	17.1
2	6	11.58 ± 0.65b	1.63 ± 0.15b	3.01 ± 0.19a	4.28 ± 0.36a	123.95 ± 5.58a	248
3	9	8.96 ± 0.78c	1.28 ± 0.08c	1.86 ± 0.14c	3.76 ± 0.18b	98.28 ± 6.21b	19.7
4 (CK)	7	12.04 ± 0.71a	1.76 ± 0.11a	2.35 ± 0.23b	4.55 ± 0.29a	128.56 ± 8.96a	25.7

## 2.3 不同配方对子实体活性成分的影响

多糖、三萜和黄酮作为灵芝的主要活性物质, 其含量是衡量灵芝品质好坏的重要指标, 同一个菌株的活性成分含量由于基质配方、培养条件、环境或培管方法不同而存在差异。分

别对上述4种不同配方的灵芝子实体进行活性成分的检测 (见表4) 可知, 添加桑枝木屑的配方灵芝比CK组灵芝的所测活性成分含量明显提高, 除了灵芝三萜外, 多糖和黄酮含量随着桑枝木屑的比例增加呈现一定的上升趋势,

表明桑枝作为一种培养基质有利于灵芝子实体的次生代谢产物的分泌合成,起到一定的诱导作用,其中,配方2中的灵芝三萜及黄酮含量达到最高,分别为 $4.71 \pm 0.42 \text{ mg/g}$ 和 $0.43 \pm 0.09 \text{ mg/g}$ ,与其他配方存在显著差异,而在灵芝多糖的含量上,配方1的多糖含量最高,为 $0.63 \pm 0.04 \text{ mg/g}$ ,配方2中灵芝多糖仅次于配方1,无显著差异。因此在活性成分的比较上,可选择配方2为灵芝菌株G1的最佳配方。此外从表4可知,该菌株的三萜含量明显高于多糖和黄酮类物质,CK组的灵芝三萜也高达 $2.44 \pm 0.87 \text{ mg/g}$ ,出现这一结果应该与品种特性有关,在应用上可将菌株G1作为获得高剂量灵芝三萜的加工专用型菌种。

表4 不同配方的灵芝活性成分含量

配方	含量 (mg/g)		
	灵芝多糖	灵芝三萜	灵芝黄酮
1	$0.63 \pm 0.04a$	$3.37 \pm 0.61b$	$0.40 \pm 0.12a$
2	$0.58 \pm 0.10a$	$4.71 \pm 0.42a$	$0.43 \pm 0.09a$
3	$0.39 \pm 0.11b$	$3.63 \pm 0.40b$	$0.25 \pm 0.16b$
4 (CK)	$0.22 \pm 0.07c$	$2.44 \pm 0.87c$	$0.12 \pm 0.08c$

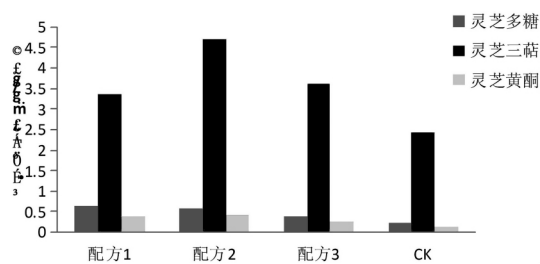


图1 不同配方的灵芝活性成分含量

### 3 小结与讨论

本试验以桑枝和棉籽壳为主要培养基,通过不同的配比培育灵芝主栽菌株G1,对其菌丝生长特性、农艺性状、产量及子实体活性成分

含量(包括灵芝多糖、黄酮及三萜类物质)等指标进行差异分析,结果表明添加50%桑枝木屑、30%棉籽壳、15%麦麸的配方是适宜灵芝主栽菌株G1优质高效栽培的最优配方。

通过本试验筛选了以桑枝木屑为主要基质适宜灵芝主栽菌株G1栽培的最优配方,以桑枝木屑为主要基质培育其它灵芝主栽菌株的最优配方需要在以后的试验中进一步研究。

### 参考文献

- [1] 吴兴亮,戴玉成. 中国灵芝图鉴 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [2] 林志彬. 灵芝的现代研究 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2015.
- [3] Liang ZE, Yi YJ, Guo YT, et al. Inhibition of migration and induction of apoptosis in LoVo human colon cancer cells by polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (5): 7629-7636.
- [4] 杨丽秋, 范锦琳, 刘欣怡, 等. 菌草对灵芝生长状况及营养成分的影响 [J]. *福建农业学报*, 2017, 32 (5): 508-511.
- [5] 金鑫, 黄文丽, 李小林, 等. 不同果树枝条栽培灵芝基质配方研究 [J]. *中国农学通报*, 2015, 31 (36): 156-160.
- [6] 董桂清. 桑枝的综合效益分析 [J]. *广西农学报*, 2013, 28 (6): 66-67.
- [7] 刘晓艳, 陈艺煊, 吴林秀, 等. 菌草灵芝多糖提取工艺优化及抗氧化活性研究 [J]. *农产品加工*, 2016, (10): 41-44.
- [8] 徐雪峰, 张玉, 闫浩, 等. 灵芝多糖和三萜的提取工艺研究 [J]. *包装与食品机械*, 2016, 34 (5): 5-10.
- [9] 伍鸿强, 王娟娟, 庄玮婧, 等. 响应面法优化灵芝黄酮酶辅助提取工艺及抗氧化活性研究 [J]. *福建农业学报*, 2017, 32 (1): 87-92.