继代培养对灵芝胞外酶活力及品质的影响

周 州，宋 怡，罗 舒，姚 珂，罗 霞，许晓燕*
（四川省中医药科学院，四川 成都 610041）

摘要：为探究菌种继代培养对灵芝栽培过程中胞外酶活力和灵芝子实体品质的影响，采用比色法、高效液相色谱法等研究了不同传代次数菌种对灵芝胞外酶活力、子实体干基生物学效率、浸出物、多糖、三萜及甾醇、灵芝酸类成分的影响，并通过相关性分析探讨胞外酶活力和灵芝品质之间的相关性。结果表明，随着菌种继代培养次数的增加，灵芝漆酶、滤纸酶、纤维素酶和淀粉酶酶活力呈下降趋势；相关性分析表明，漆酶、滤纸酶、纤维素酶和淀粉酶酶活与子实体干基生物学效率、浸出物、多糖质量分数及灵芝酸 A、灵芝酸 D、灵芝酸 F、灵芝烯酸 A 和灵芝烯酸 D 质量浓度呈极显著正相关；进一步通径分析发现滤纸酶是影响灵芝干基生物学效率及多糖、灵芝酸 F 质量浓度的关键胞外酶，纤维素酶是影响灵芝烯酸 A 质量浓度的关键胞外酶。因此，在实际生产中，应将灵芝菌种继代培养次数控制在 5 代以内，基质中主要胞外酶具有高活力，灵芝干基生物学效率高且品质最好。

关键词：灵芝；继代培养；胞外酶；相关性；通径分析
中图分类号：TS 255.1　**文章编号：**1673-1689(2023)08-0068-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.08.009

Effects of Continuous Subculture on Extracellular Enzyme Activity and Quality of *Ganoderma lucidum*

ZHOU Zhou, *SONG Yi*, *LUO Shu*, *YAO Ke*, *LUO Xia*, *XU Xiaoyan**
(Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: This study investigated the effect of subculture of species on the viability of extracellular enzymes and the morphology, yield and quality of *Ganoderma lucidum* fruiting bodies during cultivation. The effects of subculture of species on the viability of extracellular enzymes, the biological efficiency of dry basis of fruiting bodies, and the contents of leachables, polysaccharides, triterpenes and sterols, and components of *G. lucidum* acid were investigated by colorimetry and HPLC. Correlation analysis was performed to explore the correlation between extracellular enzyme activity and quality of *G. lucidum*. The investigation showed that the activities of *G. laccase*, filter paper enzyme, cellulase and amylase showed a decreasing trend with the increase of subculture number of species. Correlation analysis showed that laccase, filter paper enzyme, cellulase and amylase activities were positively correlated with fruiting body dry based biological efficiency and

收稿日期：2021-07-15
基金项目：国家现代农业产业技术体系四川食用菌创新团队项目（SCCXTD-2020-07）；四川省省级科研院所基本科研业务费项目(2022JDKY0013)；四川省“十四五”科技计划资助项目(2021YFYZ0012)；四川省区域创新合作项目(2022YFQ0010)；菌类药材系统研究与转化创新团队项目(2022C004)。
* **通信作者：**许晓燕(1980—)，女，副研究员，主要从事食药用菌系统研究。E-mail：4086014@qq.com

the contents of leachables, polysaccharides, ganoderic acid A, ganoderic acid D, ganoderic acid F, ganoderenic acid A and ganoderenic acid D. Further pathway analysis identified the filter paper enzyme was the key extracellular enzyme affecting the biological efficiency of *G. lucidum* stem-based substrates, the content of polysaccharide and ganoderic acid F, and cellulase was the key extracellular enzyme affecting the content of ganoderenic acid A. Therefore, the subculture number of *G. lucidum* species should be controlled within 5 generations in practical production, so that the main extracellular enzymes in the matrix can maintain high viability, and the *G. lucidum* stem-based biology is of high efficiency and quality.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, subculture, extracellular enzyme, correlation, path analysis

灵芝（*Ganoderma lucidum*）为担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌，始载于《神农本草经》，我国在 20 世纪 50 年代首先成功实现了野生灵芝的驯化栽培。在栽培过程中，为满足自身生长发育的需求，灵芝菌丝需将木材等基质中的纤维素、木质素、蛋白质等大分子物质分解为小分子的营养物质，从而进行吸收和转化，这一分解利用和转化过程与菌丝分泌的胞外酶活性紧密相关。

近年来，随着灵芝成为我国受众最广、市场接受度最高的食药用菌之一，灵芝栽培在我国迅速发展，年产量已达约 12 万 t，灵芝产业年产值超百亿元[1]。随着灵芝产业规模化发展，继代培养在灵芝菌种保藏和扩繁中频繁使用，导致生产用灵芝菌种退化，造成灵芝减产，质量问题多发。因此，深入研究菌种继代培养对灵芝菌丝胞外酶活力变化规律的影响，明确胞外酶活与灵芝产量和品质的相关性非常必要。

目前关于灵芝栽培技术的研究主要集中在高产菌种选育[2-5]、栽培基质筛选[6-8]、栽培技术[9]等方面，尚未见菌种继代培养对灵芝胞外酶活力及品质影响的深入研究报道。作者通过灵芝菌种连续继代培养，研究传代次数对菌丝胞外酶活力的影响，探讨胞外酶活力与子实体产量和品质之间的相关性，为灵芝高产、高质栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

LDZX-30KBS 型立式蒸汽压力灭菌器：上海申安医疗器械厂产品；RTOP 型人工气候箱：浙江托普仪器有限公司产品；MODULYOD-230 型冷冻干燥机：赛默飞世尔科技公司产品；AL104 型电子分析天平：梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司产品；5810R 型台式冷冻离心机：德国艾本德公司产品；2802S 型紫外可见分光光度计：尤尼柯（上海）仪器有限公司产品；Waters 1525 高效液相色谱仪：美国 Waters 公司产品。

1.2 试剂

马铃薯葡萄糖琼脂（Potato Dextrose Agar，PDA）培养基：购自北京奥博鑫生物技术有限责任公司；总蛋白质定量测定试剂盒（考马斯亮蓝法）：购自南京建成生物工程研究所；2，2-二氮-双（3-乙基苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐（ABTS）和木聚糖：购自 Sigma 公司；齐墩果酸对照品和 *D*-无水葡萄糖对照品：购自中国食品药品检定研究院；灵芝酸 A 对照品、灵芝酸 D 对照品：灵芝酸 F 对照品、灵芝烯酸 A 对照品、灵芝烯酸 D 对照品：均购自成都普思生物科技股份有限公司；木屑、棉籽壳、玉米芯、麦麸、石灰：购自农资市场；乙腈，色谱纯：购自安徽天地高纯溶剂有限公司；硫酸、蒽酮等：国产分析纯，购自成都科隆化学品有限公司。

1.3 供试菌株

灵芝菌株由四川省中医药科学院菌类药材系统研究与开发实验室保藏和提供。

1.4 供试培养基

1.4.1 PDA 综合培养基 PDA 培养基 37 g、蛋白胨 2 g、磷酸二氢钾 1.5 g、硫酸镁 0.5 g、蒸馏水 1 L。

1.4.2 菌袋培养料 木屑质量分数 20%、棉籽壳质量分数 55%、玉米芯质量分数 15%、麦麸质量分数 9%、石灰质量分数 1%，水质量分数 60%~65%，pH 5~6。棉籽壳和玉米芯预湿 24 h 后，加入木屑和麦麸，混合均匀，并堆料发酵 3 d，掺入石灰拌匀，选用 17 cm× 33 cm×0.05 cm 的聚丙烯袋，每袋装湿料 0.8 kg，121 ℃高压灭菌 3 h。

1.5 方法

1.5.1 菌种继代培养 将灵芝菌种（F_0）接于 PDA 综合培养基斜面上，置于 24 ℃人工气候箱中培养至

菌丝长满斜面,记为 F_1;继续将菌种 F_1 接于 PDA 综合培养基斜面上,培养至菌丝长满斜面,记为 F_2;以此类推继代接种培养,并依次编号 F_3、F_4、…、F_{11}、F_{12}。

1.5.2 栽培管理 将灵芝菌种 F_0 至 F_{12} 分别接种于菌袋培养料中,置于 25 ℃人工气候箱中培养,湿度 65%,每代菌种接 40 个菌袋。

1.5.3 菌丝胞外酶活测定

1)粗酶液制备 灵芝菌丝长满菌袋后,每代菌种各取 20 个菌袋。取上层 5 cm 基质,冷冻干燥后低温粉碎过 20 目筛,混合均匀后取适量基质粉末,按质量体积比 1:10 加入蒸馏水或提取液,40 ℃恒温水浴浸提 2 h,8 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液[10]。

2)酶活测定 采用 Bradford 法测定粗酶液中的蛋白质含量[11];采用 ABTS 法测定漆酶活力[12],将每毫克蛋白质每分钟氧化 1 μmoL 底物 ABTS 所需的酶量定义为一个酶活力单位;采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定滤纸酶、纤维素酶、木聚糖酶和淀粉酶活力[13-16],将每毫克蛋白质每分钟催化产生 1 mg 葡萄糖所需的酶量分别定义为一个滤纸酶、纤维素酶和淀粉酶酶活力单位;每分钟催化产生 1 μmol 木糖所需的酶量定义为一个木聚糖酶酶活力单位。

1.5.4 产量和质量分析

1)出芝管理及子实体采收 灵芝菌丝长满菌袋后,每代菌种各取 20 个菌袋,置于 27 ℃人工气候箱中出芝培养,湿度 80%,光照 800 lx。子实体成熟后采收,置于 50 ℃干燥箱中干燥,备用。

2)干基生物学效率测定 测定每袋灵芝子实体质量,计算干基生物学效率。

$$W=\frac{m_1}{m_2}\times 100\%$$

式中:W 为干基生物学效率,%;m_1 为每袋子实体干品质量,g;m_2 为每袋干培养料质量,g。

3)品质评价 观察子实体形态,测定大小;采用热浸法[17]测定子实体的浸出物质量分数;采用硫酸蒽酮法[18]测定子实体多糖质量分数;采用齐墩果酸法[17]测定子实体三萜及甾醇质量分数;参照张景丽等[19]的方法测定子实体灵芝酸质量浓度。

1.5.5 数据统计 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 继代培养对菌丝胞外酶活的影响

灵芝菌丝通过分泌纤维素酶、木聚糖酶、漆酶等降解酶分解基质中的纤维素、木质素等糖类营养物质,用于满足生长代谢需要。由图 1 可知,纤维素酶、漆酶、滤纸酶和淀粉酶的活力随着灵芝菌种继代培养次数的增加而降低。由于这些降解酶酶活力的下降,大分子营养物质的分解利用和转化能力降低,菌丝生长速度减慢,浓密度减弱,对外界环境污染的抵抗力下降。菌丝胞外木聚糖酶的酶活力未随菌种继代培养次数的增加而变化,但整体酶活力较低。

2.2 继代培养对灵芝产量、品质的影响

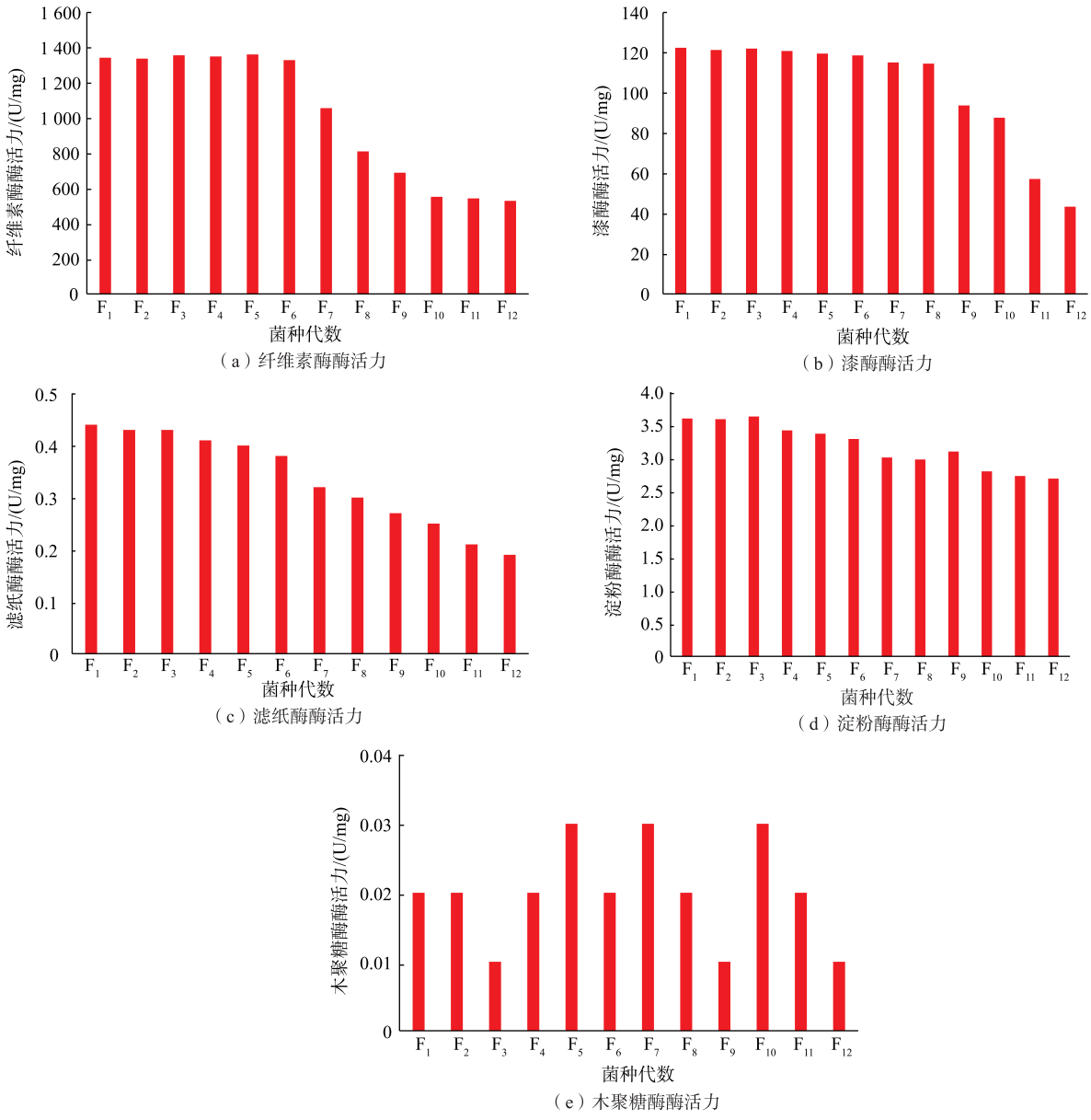
如表 1~3,通过干基生物学效率和成分测定可以发现,菌种继代培养次数不影响子实体三总萜及甾醇质量分数。但随着继代培养次数的增加,灵芝干基生物学效率下降,子实体形态由大变小,出现分枝、原基不开片等现象,多糖和浸出物质量分数降低,灵芝酸 A、灵芝酸D、灵芝酸 F、灵芝烯酸 A、灵芝烯酸 D 质量浓度降低。可见,继代培养对灵芝产量和品质影响较大。

2.3 胞外酶活与灵芝产量和质量的相关性分析

为考察不同胞外酶活对灵芝产量和质量的影响,采用 SPSS 26.0 软件对灵芝菌种继代培养过程中的 5 种胞外酶酶活力与所得灵芝子实体的干基生物学效率、浸出物质量分数、多糖质量分数等 9 个指标进行 Peaeson 相关性分析。结果如表 4 所示,纤维素酶、漆酶、滤纸酶和淀粉酶的酶活力与灵芝子实体干基生物学效率(产量指标)及浸出物、多糖、灵芝酸 A、灵芝酸 D、灵芝酸 F、灵芝烯酸 A 和灵芝烯酸 D 质量浓度等 7 个灵芝质量指标呈极显著正相关($P<0.01$),与三萜及甾醇质量分数的相关性不显著($P>0.05$)。木聚糖酶酶活力与灵芝子实体质量分数指标和质量指标的相关性不显著($P>0.05$)。

2.4 胞外酶活与灵芝品质的通径分析

相关性分析可以解释胞外酶活与灵芝品质之间的直接关系,但对不同胞外酶之间相互作用对灵芝产量和质量的影响没有直观表现。作者在分析胞外酶活与灵芝品质相关性基础上,采用通径分析进一步研究不同胞外酶活的相互作用对灵芝品质的效应大小。



（a）纤维素酶酶活力　（b）漆酶酶活力　（c）滤纸酶酶活力　（d）淀粉酶酶活力　（e）木聚糖酶酶活力

图 1　菌种继代培养对菌丝胞外酶活力的影响

Fig. 1　Effects of subculture on extracellular enzyme activity of mycelium

表 1　菌种继代培养对灵芝形态大小与干基生物学效率的影响

Table 1　Effects of subculture on morphological size and biological efficiency of *G. lucidum*

菌种代数	灵芝形态	菌盖直径/cm	干基生物学效率/%
F_1	菌盖呈肾形、半圆形	14~18	5.47±0.16
F_2	菌盖呈肾形、半圆形	14~18	5.45±0.19
F_3	菌盖呈肾形、半圆形	14~18	5.40±0.25
F_4	菌盖呈肾形、半圆形	12~15	5.29±0.18
F_5	菌盖呈肾形、半圆形	12~14	5.22±0.22
F_6	菌盖呈半圆形	11~13	5.18±0.29
F_7	菌盖呈半圆形	7~10	4.99±0.38
F_8	菌盖呈半圆形、扇形	3~5	4.88±0.43

续表 1

菌种代数	灵芝形态	菌盖直径/cm	干基生物学效率/%
F_9	菌盖呈扇形	2~3	4.51±0.40
F_{10}	出现分枝,菌盖不展开	—	4.33±0.69
F_{11}	出现分枝,菌盖不展开	—	4.03±0.64
F_{12}	出现分枝,菌盖不展开	—	3.96±0.72

表 2　菌种继代培养对灵芝浸出物、多糖和三萜及甾醇质量分数的影响

Table 2　Effects of subculture on contents of extract, polysaccharide, triterpene and sterol of *G. lucidum*

菌种代数	浸出物质量分数/%	多糖质量分数/%	三萜及甾醇质量分数/%
F_1	11.4±0.23	1.33±0.14	0.64±0.08
F_2	11.2±0.18	1.28±0.16	0.65±0.09
F_3	11.5±0.22	1.29±0.20	0.69±0.12
F_4	11.0±0.13	1.18±0.11	0.65±0.06
F_5	10.9±0.28	1.07±0.19	0.62±0.08
F_6	10.6±0.34	0.98±0.22	0.60±0.07
F_7	10.2±0.30	0.89±0.25	0.63±0.10
F_8	9.6±0.33	0.77±0.26	0.68±0.11
F_9	9.4±0.57	0.79±0.22	0.66±0.06
F_{10}	8.9±0.72	0.76±0.21	0.63±0.08
F_{11}	8.1±0.69	0.62±0.29	0.63±0.12
F_{12}	8.4±0.81	0.65±0.28	0.64±0.13

表 3　菌种继代培养对灵芝酸质量浓度的影响

Table 3　Effect of subculture of strain on content of ganoderma acid

菌种代数	灵芝酸 A 质量浓度/(mg/g)	灵芝酸 D 质量浓度/(mg/g)	灵芝酸 F 质量浓度/(mg/g)	灵芝烯酸 A 质量浓度/(mg/g)	灵芝烯酸 D 质量浓度/(mg/g)
F_1	11.13	3.37	1.13	1.60	1.54
F_2	11.11	3.42	1.09	1.58	1.49
F_3	11.09	3.29	1.12	1.63	1.52
F_4	11.01	3.18	1.03	1.62	1.46
F_5	10.53	3.02	0.92	1.65	1.38
F_6	10.41	2.93	0.86	1.66	1.33
F_7	9.28	2.71	0.77	1.32	1.18
F_8	7.47	2.61	0.75	0.96	0.90
F_9	6.98	2.34	0.69	0.87	0.82
F_{10}	6.73	2.17	0.63	0.83	0.79
F_{11}	5.33	1.93	0.41	0.77	0.48
F_{12}	2.17	1.04	0.18	0.34	0.32

表 4　胞外酶活与灵芝产量和质量的 Peaeson 相关性分析

Tabel 4　Peaeson analysis of correlation between extracellular enzyme activity and yield and quality of *G. lucidum*

指标	纤维素酶酶活力	漆酶酶活力	滤纸酶酶活力	淀粉酶酶活力	木聚糖酶酶活力
纤维素酶酶活力	1.000	0.857**	0.972**	0.925**	0.132
漆酶酶活力	0.857**	1.000	0.897**	0.824**	0.285
滤纸酶酶活力	0.972**	0.897**	1.000	0.972**	0.109
淀粉酶酶活力	0.925**	0.824**	0.972**	1.000	−0.085

续表 4

指标	纤维素酶酶活力	漆酶酶活力	滤纸酶酶活力	淀粉酶酶活力	木聚糖酶酶活力
木聚糖酶酶活力	0.132	0.285	0.109	–0.085	1.000
干基生物学效率	0.959**	0.948**	0.984**	0.938**	0.150
浸出物质量分数	0.967**	0.902**	0.989**	0.965**	0.072
多糖质量分数	0.913**	0.791**	0.966**	0.975**	–0.005
三萜及甾醇质量分数	–0.018	0.150	0.115	0.221	–0.542
灵芝酸 A 质量分数	0.932**	0.945**	0.960**	0.905**	0.269
灵芝酸 D 质量分数	0.897**	0.946**	0.955**	0.915**	0.215
灵芝酸 F 质量分数	0.893**	0.936**	0.966**	0.944**	0.138
灵芝烯酸 A 质量分数	0.970**	0.899**	0.959**	0.897**	0.258
灵芝烯酸 D 质量分数	0.962**	0.934**	0.987**	0.942**	0.199

注：** 表示在 $P<0.01$ 水平上显著相关。

分别以灵芝品质指标——干基生物学效率、浸出物质量分数、多糖质量分数、三萜和甾醇质量分数、灵芝酸 A 质量浓度、灵芝酸 D 质量浓度、灵芝酸 F 质量浓度、灵芝烯酸 A 质量浓度和灵芝烯酸 D 质量浓度为因变量 Y_1、Y_2、Y_3、Y_4、Y_5、Y_6、Y_7、Y_8 和 Y_9，纤维素酶、漆酶、滤纸酶、淀粉酶和木聚糖酶酶活力为自变量 X_1、X_2、X_3、X_4 和 X_5，采用偏回归分析法建立 Y_1、Y_2、Y_3、Y_4、Y_5、Y_6、Y_7、Y_8 和 Y_9 的最优多元回归方程（剔除偏回归系数不显著的自变量），分别为 $Y_1=2.803+0.007X_2+4.159X_3$（$F=424.148$，$P<0.001$），$Y_2=3.022+0.001X_2+0.010X_2+1.523X_4$（$F=156.063$，$P<0.001$），$Y_3=-0.022-0.004X_2+5.425X_3$（$F=135.340$，$P<0.001$），$Y_4=-0.650-5.886\times10^{-5}X_1+0.010X_2-2.510X_5$（$F=3.734$，$P<0.1$），$Y_5=-13.221+0.042X_2+4.999X_4+81.230X_5$（$F=82.850$，$P<0.001$），$Y_6=-1.665+0.015X_2+0.861X_4$（$F=89.848$，$P<0.001$），$Y_7=-0.468-0.001X_1+0.003X_2+4.578X_3$（$F=217.878$，$P<0.001$），$Y_8=-0.164+0.001X_1+0.004X_2$（$F=102.328$，$P<0.001$），$Y_9=-1.717+0.004X_2+0.605X_4+7.487X_5$（$F=169.466$，$P<0.001$），除 Y_4（三萜和甾醇质量分数）外，其余 8 个方程的显著性检验表明具有显著差，进一步做通径分析。

由表 5 可见，与干基生物学效率（Y_1）的简单相关性中，自变量滤纸酶（X_3）大于漆酶（X_2），直径和间接通径作用 $X_3>X_2$，同时两个变量的直径和间接通径系数均为正值，说明漆酶和滤纸酶对灵芝干基生物学效率均表现为正效应，栽培基质中的漆酶和滤纸酶活力高时，将增加灵芝干基生物学效率。决策系数是通径分析中的决策指标，用于自变量对因变量的综合作用进行排序，确定主要决策变量和限制变量[20-21]。自变量 X_3 对 Y_1 的决策性大于 X_2，说明滤纸酶变量对 Y_1 的综合作用是最大的，这种影响效应包括直接作用以及与其他胞外酶的协同作用。

由表 6 可见，与浸出物质量分数（Y_2）的简单相关性中，3 个自变量与 Y_2 的相关性系数 $X_1>X_4>X_2$，直径通径作用的系数 $X_4>X_1>X_2$；分析各间接通径系数可知，3 个变量的间接通径系数均为正值，且 $X_4>X_1>X_2$（0.791>0.653>0.377），同时，X_4 对 Y_2 的决策系数最高为 0.895，由此可知 X_4 对 Y_2 的综合作用最大，说明淀粉酶对灵芝浸出物质量分数有最大影响。

由表 7 可见，与多糖质量分数（Y_3）的简单相关性中，2 个自变量与 Y_3 的相关性系数 $X_3>X_2$（0.966>0.791），直径通径作用的系数 $X_3>X_2$，其中 X_2 与 Y_3 的直接通径系数和间接通径系数分别为 –0.436、–0.391，X_2 对 Y_3 综合作用表现抑制；滤纸酶对灵芝多糖质量分数的综合影响最大。

灵芝酸类成分是灵芝的主要功效成分，其中灵芝酸 A、灵芝酸 D、灵芝酸 F、灵芝烯酸 A、灵芝烯酸 D 是常见的灵芝酸，常用于灵芝质量检测[22-26]。由表

表 5　以干基生物学效率为因变量的通径分析

Tabel 5　Path analysis with biological efficiency of fruiting body as dependent variable

自变量	与 Y_1 简单相关系数	直接通径系数	间接通径系数合计			决策系数
			X_2	X_3	间接通径系数合计	
X_2	0.948	0.333		0.299	0.299	0.310
X_3	0.984	0.685	0.614		0.614	1.310

8 可知,与灵芝酸 A 质量浓度(Y_5)的简单相关性中,3 个自变量与 Y_5 的相关性系数 X_2>X_4>X_5;直接和间接通径作用的系数 X_4>X_2>X_5;决策系数 X_4>X_2>X_5,表明 X_4 对 Y_5 的综合作用影响较大。对间接通径作用分析可知,X_4 通过 X_2、X_5 分别对 Y_5 的作用为 0.494、−0.051,表明淀粉酶与漆酶的交互对提升灵芝酸 A 具有正相关影响,淀粉酶通过木聚糖酶的间接作用对灵芝酸 A 质量浓度有抑制作用。

表 6 以浸出物质量分数为因变量的通径分析

Tabel 6 Path analysis with extract content as dependent variable

自变量	与 Y_2 的简单相关系数	直接通径系数	间接通径系数				决策系数
			X_1	X_2	X_4	间接通径系数合计	
X_1	0.967	0.366	—	0.314	0.339	0.653	0.612
X_2	0.902	0.224	0.192	—	0.185	0.377	0.219
X_4	0.965	0.442	0.427	0.364	—	0.791	0.895

表 7 以多糖含量为因变量的通径分析

Tabel 7 Path analysis with polysaccharide content as dependent variable

自变量	与 Y_3 简单相关系数	直接通径系数	间接通径系数合计			决策系数
			X_2	X_3	间接通径系数合计	
X_2	0.791	−0.436	—	−0.391	−0.391	0.531
X_3	0.966	1.910	1.713	—	1.713	10.192

表 8 以灵芝酸 A 质量浓度为因变量的通径分析

Tabel 8 Path analysis with ganoderic acid A content as dependent variable

自变量	与 Y_5 的简单相关系数	直接通径系数	间接通径系数				决策系数
			X_2	X_4	X_5	间接通径系数合计	
X_2	0.945	0.393	—	0.324	0.112	0.436	0.497
X_4	0.905	0.599	0.494	—	−0.051	0.443	0.890
X_5	0.269	0.208	0.059	−0.018	—	0.041	0.060

由表 9 可见,与灵芝酸 D(Y_6)的简单相关性中,自变量漆酶(X_2)大于滤纸酶(X_4),直接和间接通径作用均 X_2>X_4,同时两个变量的间接通径系数均为正值,说明漆酶和淀粉酶对灵芝酸 D 质量浓度均有影响。其中漆酶对灵芝的灵芝酸 D 质量浓度的综合影响最大,表明提高栽培基质中的漆酶活力,能够提升灵芝酸 D 质量浓度。

由表 10 可见,与灵芝酸 F(Y_7)的简单相关性中,3 个自变量与 Y_7 的相关性系数 X_3>X_2>X_1,直径通径作用的系数 X_3>X_2>X_1,其中 X_1 对 Y_7 直接通径作用和间接通径作用均为负值,这表明 X_1 对 Y_7 的直接通径作用和间接通径作用呈现负影响,而 X_2 和

表 9 以灵芝酸 D 质量浓度为因变量的通径分析

Tabel 9 Path analysis with ganoderic acid D content as dependent variable

自变量	与 Y_6 简单相关系数	直接通径系数	间接通径系数合计			决策系数
			X_2	X_4	间接通径系数合计	
X_2	0.946	0.598	—	0.493	0.493	0.947
X_4	0.915	0.423	0.349	—	0.349	0.474

表 10 以灵芝酸 F 质量浓度为因变量的通径分析

Tabel 10 Path analysis with ganoderic acid F content as dependent variable

自变量	与 Y_7 的简单相关系数	直接通径系数	间接通径系数				决策系数
			X_1	X_2	X_3	间接通径系数合计	
X_1	0.893	−0.739	—	−0.633	−0.718	−1.351	2.543
X_2	0.936	0.299	0.256	—	0.268	0.524	0.403
X_3	0.966	1.415	1.375	—	1.027	2.402	8.800

X_3 对 Y_7 的综合影响呈正向性。

表 11 表明纤维素酶对灵芝烯酸 A 质量浓度的综合影响最大。

由表 12 可见，与灵芝烯酸 D 质量浓度（Y_9）的简单相关性中，3 个自变量与 Y_9 的相关性系数、直接通径和间接通径作用的系数排序均为 X_4>X_2>X_5。其中 X_2 对 Y_5 的综合作用呈正相关，表明漆酶可能是影响灵芝烯酸 D 的重要因素，在提高以灵芝烯酸 D 为品质提升的目标中应着重把握；间接通径作用分析可知，X_4 通过 X_2、X_5 分别对 Y_5 的作用为0.405、–0.042，表明淀粉酶与漆酶的交互对提升灵芝烯酸 D 具有正相关影响，淀粉酶通过木聚糖酶的间接作用对灵芝烯酸 D 质量浓度有呈抑制作用，但负影响较小，同时由决策系数大小为 X_4>X_2>X_5 可知，X_4 对 Y_5 的综合作用影响较大，表明淀粉酶对提升灵芝的灵芝烯酸 D 质量浓度具有重要影响。

表 11　以灵芝烯酸 A 质量浓度为因变量的通径分析

Tabel 11　Path analysis with ganoderentic acid A content as dependent variable

自变量	与 Y_8 简单相关系数	直接通径系数	间接通径系数合计			决策系数
			X_1	X_2	间接通径系数合计	
X_1	0.970	0.749	—	0.642	0.642	1.523
X_2	0.899	0.257	0.220	—	0.220	0.179

表 12　以灵芝烯酸 D 质量浓度为因变量的通径分析

Tabel 12　Path analysis with ganoderentic acid D content as dependent variable

自变量	与 Y_9 的简单相关系数	直接通径系数	间接通径系数				决策系数
			X_2	X_4	X_5	间接通径系数合计	
X_2	0.934	0.271	—	0.223	0.077	0.300	0.236
X_4	0.942	0.491	0.405	—	–0.042	0.363	0.598
X_5	0.199	0.130	0.037	–0.011	—	0.023	0.023

3 结　语

食药用菌在菌丝生长阶段，通过分解基质内的纤维素、木质素等来合成、储存子实体发育所需的能量物质[27]，胞外酶酶活力的强弱常能反映出菌丝生理生化的活跃程度，影响食药用菌生长发育[21]。通过对灵芝菌种继代培养过程中胞外酶活力、灵芝子实体产量与质量的测定，发现菌种连续继代培养会引起漆酶、滤纸酶、纤维素酶和淀粉酶的酶活力降低，进而减少灵芝子实体产量，引起灵芝品质下降，与斑玉蕈[28]、真姬菇[29]、草菇[30]、蚕花[31]等食药用菌的研究结果相似。

为进一步研究胞外酶酶活力与灵芝子实体品质之间的关系，作者在分析漆酶、滤纸酶等胞外酶酶活力与灵芝干基生物学效率、浸出物、多糖等品质指标的相关性基础上，采用逐步线性回归法进行通径分析。结果发现，纤维素酶、漆酶、滤纸酶和淀粉酶的酶活力与灵芝子实体产量及浸出物、多糖、灵芝酸A、灵芝酸D、灵芝酸 F、灵芝烯酸 A 和灵芝烯酸 D 质量浓度呈极显著正相关，但与三萜及甾醇质量分数相关性不显著；通径分析进一步表明，滤纸酶是影响灵芝产量及多糖质量分数、灵芝酸 F 质量浓度的关键胞外酶，纤维素酶是影响灵芝烯酸 A 质量浓度的关键胞外酶。

综上所述，随着灵芝菌种继代培养次数的增加，基质中主要胞外酶酶活力降低，进而降低灵芝子实体产量和品质。因此，在实际生产中，为获得高产、优质的灵芝子实体，应将灵芝菌种继代培养次数控制在 5 代以内。同时，鉴于滤纸酶、纤维素酶等胞外酶与灵芝品质之间的相关性，还可以通过调节栽培温度、改良基质配方等技术手段，提升滤纸酶、纤维素酶等胞外酶酶活力，以达到提产增质的目的。

参考文献：

[1] 李明焱. 灵芝全产业链质量控制规范的研究与制定[J]. 食药用菌，2015，23(5)：276-279.
[2] 唐明先，陈杭，罗孝贵，等. 灵芝新品种康定灵芝选育研究[J]. 中国食用菌，2018，37(5)：84-86.
[3] 王盼，许晓燕，余梦瑶，等. 灵芝新品种宇泽灵芝的选育研究[J]. 时珍国医国药，2018，29(4)：987-989.
[4] 陈秀炳，周洁，张波，等. 灵芝新品种‘川圆芝1号’[J]. 园艺学报，2017，44(11)：2239-2240.

[5] LIU S R,KE B,ZHANG W R,et al. Breeding of new *Ganoderma lucidum* strains simultaneously rich in polysaccharides and triterpenes by mating basidiospore-derived monokaryons of two commercial cultivars[J]. **Scientia Horticulturae**,2017,216:58-65.
[6] 吴鸿雪,唐庆九,吕旭聪,等. 栽培条件对灵芝子实体的三萜组成及其活性的影响[J]. 菌物学报,2020,39(1):144-154.
[7] 唐振,周洁,谭伟,等. 培养料锌含量对灵芝子实体品质的影响[J]. 中国食用菌,2019,38(10):12-16.
[8] ATILA F. Comparative study on the mycelial growth and yield of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) Karst. on different lignocellulosic wastes[J]. **Acta Ecologica Sinica**,2020,40(2):153-157.
[9] 文冬华,刘善红,盛立柱,等. 灵芝覆盖新土的栽培效果试验[J]. 食药用菌,2017,25(2):125-127.
[10] 韩嘉钰,魏巍,余梦瑶,等. 不同栽培基质对灵芝基质营养物质及胞外酶活的影响[J]. 时珍国医国药,2016,27(3):715-719.
[11] LIAU C Y,LIN C H. A modified coomassie brilliant blue G250 staining method for the detection of chitinase activity and molecular weight after polyacryl amide gelelectrophoresis[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2008,106(1):111-113.
[12] 刘禹,兰进,徐新然,等. 灵芝属不同菌种漆酶活性的比较[J]. 中药材,2016,39(8):1692-1695.
[13] 赵玉萍,杨娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):116-118.
[14] 安琪,吴雪君,吴冰,等. 不同碳源和氮源对金针菇降解木质纤维素酶活性的影响[J]. 菌物学报,2015,34(4):761-771.
[15] MANAVALAN T,MANAVALAN A ,THANGAVELU K P,et al. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse[J]. **Journal of Proteomics**,2012,77:298-309.
[16] 崔云龙. 筛选具有淀粉酶活力的菌株及其诱变[J]. 生物化工,2017,3(6):32-34.
[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015 年版.[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
[18] 李瑞勤,王琼,沈梦烨,等. α-PGM 过表达对灵芝多糖发酵的影响[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(11):18-24.
[19] 张景丽,罗霞,郑林用,等. 运用色谱指纹图谱与化学计量学方法对灵芝进行分类[J]. 色谱,2009,27(6):776-780.
[20] 袁志发,周静芋,郭满才,等. 决策系数——通径分析中的决策指标[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2001,29(5):131-133.
[21] 陈岗,詹永,杨勇,等. 温度对银耳胞外酶活力及营养品质特性的影响[J]. 食品科学,2017,38(23):113-120.
[22] LIU W,ZHANG J S,HAN W,et al. One single standard substance for the simultaneous determination of 17 triterpenes in *Ganoderma lingzhi* and its related species using high-performance liquid chromatography[J]. **Journal of Chromatography B**,2017,1068:49-55.
[23] WANG X M,YANG M,GUAN S H,et al. Quantitative determination of six major triterpen oidsin *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography[J]. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**,2006,41(3):838-844.
[24] 杨志空,韩伟,冯娜,等. HPLC 法测定灵芝孢子粉中三萜含量[J]. 菌物学报,2020,39(1):184-192.
[25] 来李娟,崔田,邓祖磊,等. HPLC-ELSD 法测定灵芝中灵芝酸 A 的含量[J]. 广东药科大学学报,2017,33(5):617-619.
[26] 贾红岩,王亚涛,张芝华,等. 高效液相色谱法测定不同产地及品种灵芝三萜类成分的含量[J]. 微生物学通报,2017,44(1):238-244.
[27] OBODAI M,CLELAND OKINE J,VOWOTOR K A. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**,2003,30(3):146-149.
[28] 林辉,詹森然,李佳欢,等. 斑玉蕈菌种连续传代对其生产性能的影响[J]. 河南农业科学,2018,47(5):89-93.
[29] 崔驰浩,黄亮,王玉,等. 真姬菇继代培养中的退化研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2018,39(3):60-66.
[30] 张政. 草菇菌丝体继代保藏菌种的退化研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2016.
[31] 彭凡. 蚕花菌种退化对其代谢的影响[D]. 合肥:安徽农业大学,2014.