



草菇 9715 液体菌种培养过程的生理变化及培养终点

余昌霞 陈明杰 李正鹏 赵妍* 汪虹* 杨焕玲 奚莉萍

上海市农业科学院食用菌研究所 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心
国家食用菌加工技术研发中心 上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海 201403

摘要:【背景】草菇是最具中国特色的食用菌品种之一,其消费量逐年增加,产业发展潜力巨大。液体菌种应用于草菇栽培是其工厂化生产的发展趋势,目前关于草菇液体菌种的研究主要集中在优化配方和生长条件,有关草菇液体菌种培养过程中菌丝活性的研究较少。【目的】研究草菇液体菌种培养过程中的生理活性变化,并确定其培养终点。【方法】对草菇液体菌种培养过程中菌丝体干重、蛋白含量、培养液 pH 值、糖度、还原糖含量、酶活性等进行测定与分析。【结果】草菇液体菌种在培养 84 h 后,菌丝干重增长减缓,pH 值、糖度、还原糖含量逐渐减少,纤维素酶和半纤维素酶活性逐渐降低,培养 96 h 后,菌丝体蛋白质含量呈下降趋势,培养液蛋白含量则呈上升趋势。【结论】草菇 9715 液体菌种培养终点应控制在 84–96 h,研究结果可为 9715 液体菌种应用于草菇工厂化生产提供重要参考。

关键词: 草菇, 液体菌种, 生理变化, 培养终点

Physiological changes of *Volvariella volvacea* 9715 during submerged spawn culture

YU Chang-Xia CHEN Ming-Jie LI Zheng-Peng ZHAO Yan* WANG Hong*
YANG Huan-Ling XI Li-Ping

Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Edible Fungal Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture; National Engineering Research Center of Edible Fungi, National R&D Center for Edible Fungal Processing, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201403, China

Abstract: [Background] Straw mushroom (*Volvariella volvacea*) is one of the most varieties of edible fungi with Chinese characteristics, and its consumption increased year by year, the potential industrial development for *V. volvacea* is tremendous. Liquid spawn used in straw mushroom cultivation is the development trend of factory production, the current research in liquid spawn of straw mushroom are

Foundation items: Youth Talent Development Plan of Shanghai Municipal Agriculture System (20170115); Shanghai Agriculture Research System (201909); Shanghai Agricultural Commission Program (2014-7-1-5)

*Corresponding authors: ZHAO Yan: Tel: 86-21-37196813; E-mail: jiandan289@126.com
WANG Hong: Tel: 86-21-62200747; E-mail: 62200747@163.com

Received: 30-03-2019; Accepted: 30-05-2019; Published online: 13-07-2019

基金项目: 上海市市级农口系统青年人才成长计划项目[沪农青字(2017)第 1-15 号]; 上海市现代农业产业技术体系[沪农科产字(2019)第 9 号]; 上海市科技兴农重点攻关项目应用基础类(2014 第 7-1-5 号)

*通信作者: 赵妍: Tel: 021-37196813; E-mail: jiandan289@126.com

汪虹: Tel: 021-62200747; E-mail: 62200747@163.com

收稿日期: 2019-03-30; 接受日期: 2019-05-30; 网络首发日期: 2019-07-13

mainly focus on the optimized formula and growth condition, however, less research was done on the mycelial activity during the cultivation process. **[Objective]** Study the physiological changes of straw mushroom in liquid spawn cultivation, and analyze the cultivation end-point. **[Methods]** Since cultivation 48 h, collection samples every 12 h, the biomass and protein content of mycelia were measured in 168 h. Moreover, pH value, sugar degree, reducing sugar contents, cellulase, hemicellulase and laccase activities of liquid spawn filtrate were determined and analyzed in the cultivation process. **[Results]** The results showed that after 84 h of cultivation, the growth rate of mycelia diminishing and the biomass increased slowly, the pH value, sugar degree and reducing sugar contents reduced gradually, cellulase and hemicellulase activities also declined gradually. After 96 h, the protein content of mycelia declined while protein content of filtrate rised obviously. **[Conclusion]** The research on physiological changes of 9715 liquid spawn indicated that 84–96 h was the cultivation end-point, and the results can provide important reference value for liquid spawn application in the straw mushroom 9715 factory production.

Keywords: *Volvariella volvacea*, Liquid spawn, Physiological changes, Cultivation end-point

草菇(*Volvariella volvacea* (Bull.) Singer), 又名兰花菇、稻草菇、中国菇等,是最具中国特色的食用菌品种之一,富含多种人体必需氨基酸、维生素和矿物质,也是一种高蛋白、低脂肪的健康食用菌,素有“放一片,香一锅”之美誉,并有免疫调节、抗肿瘤、降低胆固醇等药用功效^[1]。草菇栽培起源于我国南方,距今已有 300 多年的历史,其因味道鲜美而深受消费者欢迎,市场知名度高,消费量逐年增加,售价也一直居高不下,其产业发展潜力巨大^[2-3]。草菇目前虽实现了周年化栽培,但其特殊的生物学特性、菌种不稳定等原因导致发展十分缓慢^[4],其栽培模式还停留在以人工为主的劳动密集型产业,一直采用的固体制种方式也存在制种复杂、繁琐、周期长、操作不便、菌龄不一致等缺点^[5-7],将液体菌种应用于草菇栽培是草菇工厂化生产的发展方向。

有关草菇液体菌种的研究,已见报道的主要集中在针对特定品种优化草菇液体菌种培养基配方^[8-9]、筛选草菇液体菌种的最适生长条件^[10-12],最终达到液体菌种生长明显优于固体菌种的目的,有关草菇液体菌种培养过程中菌丝活性生理指标变化的研究较少。菌种质量会直接影响到后续菌丝的生长及出菇情况^[13-14],在一些关于液体菌种发酵终点的报道中,常将菌丝体重量作为唯一的衡量指

标^[15-16],然而菌丝生物量与菌丝活力之间并没有必然联系。张一帆等对草菇 V23 液体菌种培养终点进行研究,结果表明草菇 V23 液体菌种摇瓶的最佳培养终点时间为 6 d^[17],对于短菌龄的草菇而言,尚缺乏有效判断培养过程中菌丝活力的生理变化。本实验在此基础上,以草菇主栽品种 9715 菌株为研究对象,对培养 48–168 h 的草菇液体菌种进行试验,通过检测草菇液体菌种培养过程中菌丝体的各项理化指标变化,为工厂化草菇液体菌种生产过程的控制提供技术参考和理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

草菇菌株 9715 由上海市农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心提供,因其菌丝生长旺盛、生物学效率高,为生产上的主要栽培品种。

1.2 培养基

固体培养基为 PDA 培养基,购自 BD 公司,称取 39 g 加蒸馏水定容至 1 L。

液体培养基(g/L): 葡萄糖 25.0, 酵母浸粉 4.0, KH_2PO_4 1.0, MgSO_4 1.0, 加蒸馏水定容至 1 L, pH 调至 9.0, 用于摇瓶培养菌丝。

所有培养基均在 1×10^5 Pa 下灭菌 20 min。

1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 等均为分析纯,购

自国药集团化学试剂有限公司; 酵母浸粉, Oxoid 公司; 羧甲基纤维素酶试剂盒、半纤维素酶试剂盒、漆酶试剂盒, 上海索桥生物科技有限公司。冷冻干燥机, Thermo 公司; 酶标仪, Bio-Rad 公司。

1.4 草菇液体菌种生理指标的测定

1.4.1 草菇液体菌种的制备

将保存的菌种转接至 PDA 平板活化, 32 °C 恒温培养 3 d 可得母种。然后将活化的母种用直径为 9 mm 的打孔器沿菌落边缘打孔, 取 50 个菌块置于 100 mL 液体培养基中经均质仪打碎 30 s, 取培养基装液量 120 mL 的 250 mL 三角瓶, 每瓶接入 2.4 mL 菌液, 于 32 °C、150 r/min 摇床振荡培养 7 d, 接种 48 h 后, 每 12 h 收取 5 瓶为一组进行各项指标检测。

1.4.2 菌丝体质量的测定

接种后的液体菌种在恒温摇床中培养 48 h 时, 三角瓶中有明显的菌丝可供收集, 收集菌丝及培养液。用无纺布过滤培养的菌丝, 无菌水冲洗后, 于 -80 °C 冰箱冷冻过夜, 转入最低温保持在 -50 °C 的冷冻干燥机中充分干燥至恒重, 用分析天平称量菌丝体干重。

1.4.3 pH 值测定

采用 pH 计测定滤出培养液的 pH 值。

1.4.4 OD_{540} 值、糖度测定

将滤出的培养液于 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 取上清用酶标仪在波长 540 nm 处测定 OD_{540} 值, 同时采用糖度仪测定糖度。

1.4.5 还原糖的测定

培养液经 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 后, 采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法^[18-19]测定培养液的还原糖含量。

1.4.6 菌丝体及培养液蛋白质含量测定

取冻干后的菌丝体 0.1 g, 加提取液经冷冻研磨仪研磨至匀浆, 定容至 10 mL, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 采用考马斯亮蓝法测定菌丝体蛋白质含量^[20-21]。取滤出培养液同上离心后取上清, 采用考马斯亮蓝法测定培养液蛋白质

含量。

1.4.7 漆酶活性测定

取 10 mL 培养液同上离心后取上清液, 按照漆酶试剂盒说明书测定培养液中的漆酶活性^[22-23]。

1.4.8 羧甲基纤维素酶活性测定

取 10 mL 培养液同上离心后取上清液, 按照羧甲基纤维素酶试剂盒说明书测定培养液中的纤维素酶活性^[22,24]。

1.4.9 半纤维素酶活性测定

取 10 mL 培养液同上离心后取上清液, 按照半纤维素酶试剂盒说明书测定培养液中的半纤维素酶活性^[22]。

2 结果与分析

2.1 草菇液体菌种菌丝体干重的变化

草菇液体菌种在培养过程中菌丝体干重的变化结果(图 1)表明, 菌丝体干重随培养时间的延长呈显著($P < 0.05$)上升趋势, 在培养 48–60 h 期间的菌丝干重无显著($P > 0.05$)变化, 60–84 h 时菌丝干重迅速增多, 84 h 后菌丝生长速率变慢, 菌丝干重增长减缓, 156 h 时菌丝体干重达到最大值, 为 0.471 8 g/100 mL, 168 h 时菌丝体干重有所下降。

2.2 草菇液体菌种培养液 OD_{540} 值的变化

草菇液体菌种在培养过程中培养液的 OD_{540}

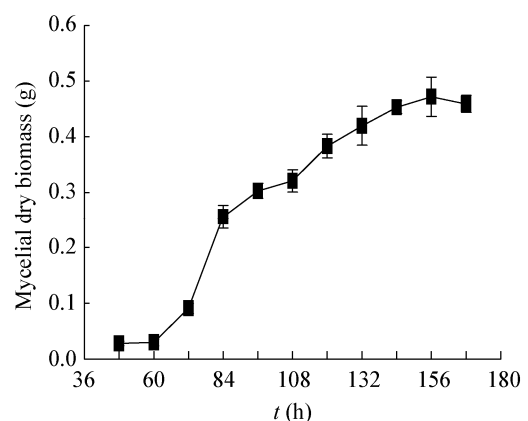


图 1 草菇液体菌种培养过程中菌丝体干重

Figure 1 Mycelial dry biomass of *Volvariella volvacea* in liquid spawn cultivation

值变化结果(图 2)表明, OD_{540} 值随培养时间的延长呈先上升后下降再升高的趋势, 在培养 72–108 h 期间稳定在 0.16 左右, 108 h 后波动较大, OD_{540} 值在培养后期仍有上升, 与草菇菌丝老化产生的色素有关, 表明可在此之前结束草菇液体菌种的培养。

2.3 草菇液体菌种培养液 pH 值的变化

草菇液体菌种培养液的 pH 值随培养时间的延长呈下降趋势(图 3), 培养前期 pH 值保持稳定趋势, 培养 108 h 后 pH 值有较明显的下降, 且 120 h 时 pH 值小于 7.0, 说明菌丝体生长过程中产生的酸性代谢物在培养液中积累逐渐增多, 导致了培养液

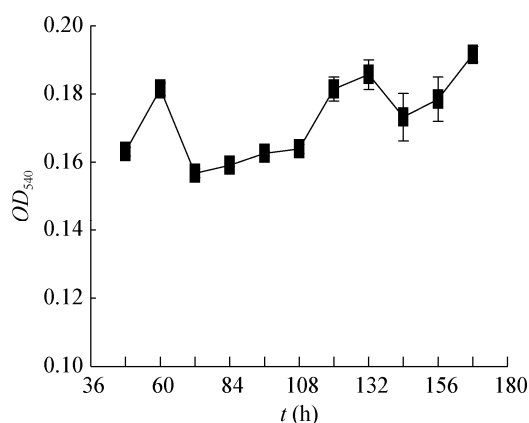


图 2 草菇液体菌种培养过程中培养液 OD_{540} 值的变化
Figure 2 OD_{540} value of *Volvariella volvacea* in liquid spawn cultivation

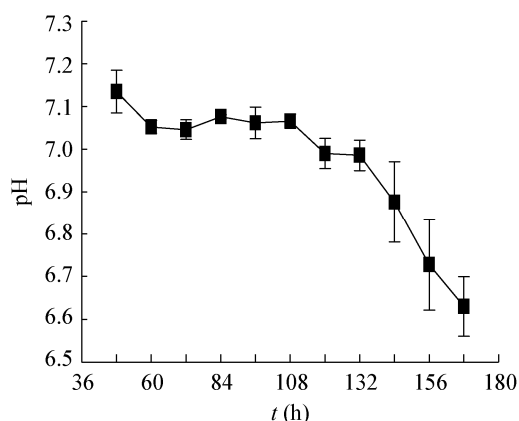


图 3 草菇液体菌种培养过程中培养液 pH 值的变化
Figure 3 pH value of *Volvariella volvacea* in liquid spawn cultivation

pH 值的降低。草菇适宜在偏碱性的环境下生长, 在液体环境变得不适合草菇菌丝生长或存活之前结束培养, 有利于液体菌种的应用及保存。

2.4 草菇液体菌种培养液糖度的变化

培养液的糖度反应了菌丝体对碳源的消耗和利用情况, 如图 4 所示, 培养液的糖度随培养时间的延长呈下降趋势, 从培养 72 h 起, 有明显 ($P<0.05$) 的下降趋势, 168 h 时有所回升, 这与菌丝体干重在培养过程中变化的时间点基本一致, 而变化趋势相反。

2.5 草菇液体菌种培养液还原糖含量的变化

草菇液体菌种在整个培养过程中, 培养液的还原糖含量随培养时间的延长呈先上升再下降的趋势(图 5), 在培养 48–84 h 期间, 还原糖的含量呈显著 ($P<0.05$) 上升趋势, 84–96 h 期间有所下降, 96–108 h 时又有所上升, 并在 108 h 时达最大值 83.19 mg/mL, 之后呈下降趋势并保持稳定。培养初期, 菌丝分解碳源的能力较强, 还原糖的生成量大于利用量, 因此还原糖含量呈上升趋势, 而随着培养时间的延长, 菌丝进一步生长, 碳源物质也被逐渐消耗, 导致还原糖含量下降。

2.6 草菇液体菌种菌丝体及培养液蛋白含量的变化

草菇液体菌种在培养过程中, 菌丝体蛋白质含

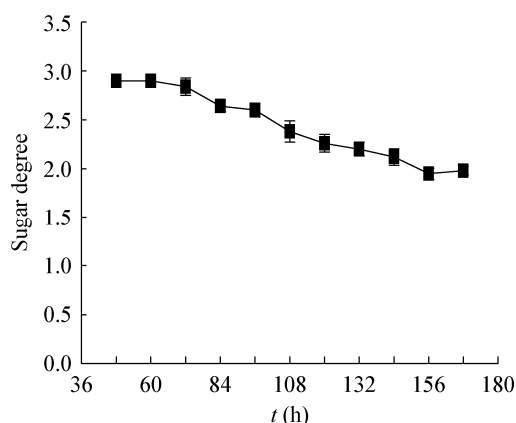


图 4 草菇液体菌种培养过程中糖度的变化
Figure 4 Sugar degree of filtrate in cultivation liquid spawn of *Volvariella volvacea*

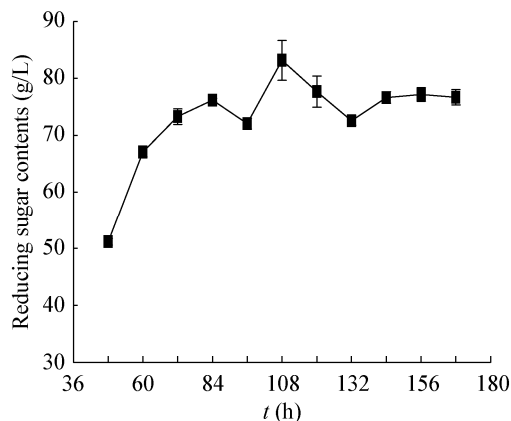


图 5 草菇液体菌种培养过程中培养液还原糖含量的变化

Figure 5 Reducing sugar contents of filtrate in cultivation liquid spawn of *Volvariella volvacea*

量总体呈先上升, 之后趋于平稳, 然后再下降的趋势(图 6)。在培养 48–72 h 期间, 菌丝体蛋白质含量呈现上升趋势, 说明在此阶段菌丝体蛋白质在合成; 72–96 h 期间, 菌丝体蛋白质含量的总体变化较小, 84 h 时有所下降, 但在 96 h 又有所回升, 并达到最大值 19.22 mg/g; 96–168 h 期间, 草菇液体菌种菌丝体蛋白质含量总体呈下降趋势。

培养液中蛋白含量随培养时间的延长则呈显著($P < 0.05$)上升趋势, 在培养 48–72 h 期间, 其蛋

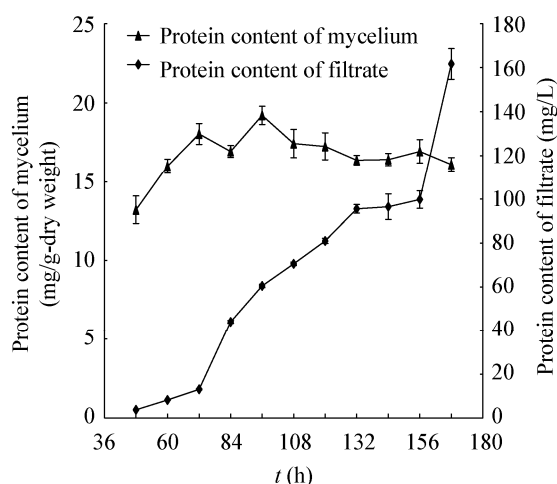


图 6 草菇液体菌种菌丝体和菌液的蛋白含量变化

Figure 6 Protein content of *Volvariella volvacea* mycelial and filtrate in liquid spawn cultivation

白含量缓慢增长; 72–168 h 时, 培养液的蛋白质含量迅速增长, 并在 156–168 h 期间增长最快, 168 h 时达到最大值, 结合菌丝体干重在 156–168 h 期间有下降趋势, 可以推断草菇液体菌种培养后期菌丝球老化, 菌丝体的结构性蛋白质发生分解, 导致培养液中可溶性蛋白含量迅速增高。

2.7 草菇液体菌种培养液的酶活性变化

草菇液体菌种培养过程中, 培养液的纤维素酶活性总体呈先上升再下降的趋势, 在培养 48–84 h 期间呈上升趋势, 并在 84 h 时活性最大, 然后迅速下降; 半纤维素酶活性变化趋势和纤维素酶活性一致, 总体也呈先上升再下降的趋势, 在培养 48–84 h 期间呈上升趋势, 且在 84 h 时活性最大(图 7)。草菇液体菌种在培养前期, 菌丝生长迅速, 需要更多的养分, 从而分泌出大量的酶, 基质分解速度加快, 纤维素酶和半纤维素酶活性随之升高; 培养 84 h 后, 菌丝生长速度减缓, 纤维素酶和半纤维素酶活性也随之呈下降趋势, 其生长逐渐进入衰退期, 对养分的需求变小或培养液不能再提供充足的养分, 菌丝活力随之下降。草菇培养液中的漆酶活性在整个培养过程中总体呈下降趋势, 在培养 72–84 h 期间下降幅度较大, 之后下降幅度变小并基本保持稳定。

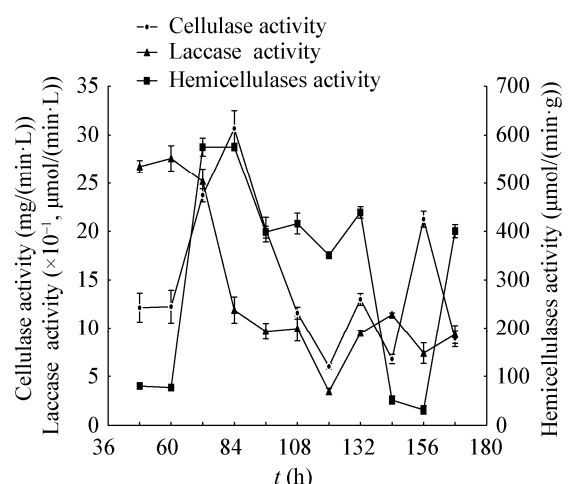


图 7 草菇液体菌种培养液酶活性变化

Figure 7 Enzyme activity of filtrate in liquid spawn cultivation of *Volvariella volvacea*

3 讨论与结论

液体菌种用于工厂化生产是食用菌产业发展的必然趋势,菌种质量是决定食用菌生产成败的关键。食用菌菌种随培养时间的延长,菌丝易老化甚至退化,菌种的活力与其生理生化活性密切相关^[14]。食用菌菌丝在生长过程中不断分解利用培养基中的养料,从而达到自身物质和能量积累使其生物量产生变化,菌丝生物量可用来表征微生物的生长状况,菌丝体干重也常被用来作为液体菌种培养终点的指标^[15-16]。本试验草菇液体菌种菌丝体干重随培养时间的延长呈总体上升趋势,在培养60–84 h时菌丝干重迅速增多,84 h后菌丝生长速率变慢,菌丝干重增长减缓。培养前期,即60 h之前菌丝量较少,说明菌丝在接入液体培养基后要对新环境有所适应,待菌丝活力恢复、吸收养分后菌丝量得到积累,随培养时间的延长,培养液中的养分不足或菌丝代谢活性降低,导致菌丝量增长缓慢。pH值是食用菌生长及代谢的一个重要环境条件,pH值过高或过低都会影响菌丝正常生长。草菇是喜偏碱性环境的食用菌,其菌丝生长最适pH值为7.0–7.5,张丽蓉^[14]对草菇菌种质量的研究结果表明,灭菌后pH值低于7.0与高于7.0的草菇菌种相比,出菇产量显著降低。本试验中草菇液体菌种在培养108 h后培养液的pH开始有较明显的下降趋势,120 h时pH小于7.0,说明到108 h时液体培养环境中酸性代谢物积累增多,开始不利于草菇菌丝进一步生长。糖类是液体培养基中的主要碳源物质,为菌丝生长代谢活动提供能量,因此测定液体菌种培养液糖度和还原糖含量可反映菌丝的生长情况。本试验液体菌种培养液的糖度下降与菌丝体干重上升的趋势截然相反,但发生变化的时间点高度吻合,说明菌丝不断利用培养液中的糖类物质以达到自身生长的目的,168 h时菌丝体干重变少、糖度回升,表明液体菌种到达衰亡期,菌丝细胞释放出的多糖类物质导致培养液的糖度升高。培养液还原糖含量变化整体呈先上升后下降

趋势,60 h之前,还原糖含量上升明显,说明菌丝对新环境处于适应期,对碳源的利用较小,还原糖的生成量远远大于利用量;60–84 h期间,菌丝开始大量生长,对碳源的利用加大,还原糖的消耗量也变多,但菌丝活力较强,仍有大量还原糖生成,84 h后主要呈下降趋势并在132 h之后趋于稳定,说明培养液中的营养物质已被大量消耗。

蛋白质是生物体的重要组成部分,参与构成生物体的结构和重要的生理活动,蛋白质的含量变化可以反映液体菌种菌丝的活力。对草菇液体菌种培养过程中菌丝体蛋白质含量及培养液蛋白含量的测定显示,在培养前96 h内,两者均随培养时间的延长呈上升趋势,96 h后两者变化趋势相反,菌丝体蛋白质呈下降趋势并在132–156 h保持稳定,156–168 h骤减,培养液蛋白含量在96 h后仍呈上升趋势,132–156 h也保持稳定,156–168 h骤增,蛋白质是通过消耗培养基中的氮源来合成的,说明前期菌丝体利用培养基中的氮源合成蛋白质,并将可溶性蛋白释放到培养液中,二者的蛋白质含量均升高;培养后期草菇菌丝出现老化,菌丝体结构性蛋白质分解,菌丝干重减少,释放到培养液中的蛋白质含量增多,使得培养液中蛋白含量上升。草菇是一种草腐类真菌,具有较完备的纤维素酶系^[25]和半纤维素酶系^[26],同时具有一定的漆酶活性^[27-28]。草菇胞外木质纤维素酶活性对其生物转化率具有重要影响,纤维素酶对纤维素的分解,以及半纤维素酶对半纤维素的分解利用可为草菇菌丝生长提供更多的养分,因此两种酶活性的高低可以反映菌丝活性的强弱^[22,29]。漆酶是降解木质素大分子物质的主要酚氧化酶,通过对木质素物质的分解为菌丝提供所需养分,胞外漆酶活性越高,菌株分解能力越强,菌丝生长速度越快。本试验培养液的纤维素酶活性及半纤维素酶活性均在84 h时最大,之后呈下降趋势,说明可在此时结束草菇液体菌种的培养。本研究的漆酶活性在整个培养过程中呈下降趋势,这与雷德柱等^[27]的研究结

果相似,其筛选产漆酶的草菇菌株,表明草菇产漆酶的时间主要集中在前 5 天,第 5 天之后漆酶活性逐渐降低;据已有的报道,草菇漆酶可能与子实体的形态构建有关^[22],其与草菇液体菌种菌丝活力的关系还有待进一步研究。本试验的结果说明漆酶活性不能作为草菇液体菌种活力的指标。

本试验在张一帆等^[17]的研究基础上,进一步研究了草菇液体菌种培养液的还原糖含量、蛋白含量及酶活性变化,由于草菇生长迅速、菌龄短,从有明显菌丝球产生的 48 h 起,每隔 12 h 进行取样,对草菇液体菌种进行系统研究,综合各检测指标结果,表明草菇 9715 液体菌种的培养时间应控制在 84–96 h (即 3–4 d),与张一帆等的研究结果草菇 V23 菌株的培养时间 6 d 不同。本研究显示,培养 156 h 时,草菇 9715 液体菌种已进入衰亡期,菌丝球老化,培养时间过长的草菇菌丝活性下降,不利于草菇的栽培生产。本研究结果初步阐明了草菇 9715 液体菌种培养过程中的生理变化,对草菇液体菌种在实际生产中的菌种质量控制具有指导意义,并为液体菌种应用于草菇工厂化生产提供重要参考。

REFERENCES

- [1] Liu XM, Liao ST, Chen ZY. Research advance in chemical properties, pharmacological activity of straw mushroom as well as fresh keeping and processing technologies for it[J]. Food Science, 2011, 32(1): 260-264 (in Chinese)
刘学铭, 廖森泰, 陈智毅. 草菇的化学特性与药理作用及保鲜与加工研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 260-264
- [2] Liu Z, Zhang K, Lin JF, et al. Breeding cold tolerance strain by chemical mutagenesis in *Volvariella volvacea*[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130(1): 18-24
- [3] Zhang JX, Chen Q, Huang CY, et al. History, current situation and trend of edible mushroom industry development[J]. Mycosystema, 2015, 34(4): 524-540 (in Chinese)
张金霞, 陈强, 黄晨阳, 等. 食用菌产业发展历史、现状与趋势[J]. 菌物学报, 2015, 34(4): 524-540
- [4] Yang XB, Zheng GY, Hu ZS, et al. Research on industrial cultivation key technology of *Volvariella volvacea*[J]. Edible Fungi of China, 2015, 34(1): 20-25 (in Chinese)
杨小兵, 郑国杨, 胡泽生, 等. 草菇工厂化栽培关键技术的研究[J]. 中国食用菌, 2015, 34(1): 20-25
- [5] Yang H, Tan Q, Song CY, et al. Optimization of a culture medium for producing liquid *Hypsizygus marmoreus* spawn[J]. Acta Edulis Fungi, 2012, 19(4): 49-51 (in Chinese)
杨慧, 谭琦, 宋春艳, 等. 斑玉蕈液体菌种培养条件及搔菌时间的筛选[J]. 食用菌学报, 2012, 19(4): 49-51
- [6] Huang ZQ, Zheng JL, Deng TH, et al. Liquid spawn preparation and factory production application of white *Flammulina velutipes*[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(2): 75-79 (in Chinese)
黄竹青, 郑剑玲, 邓铁宏, 等. 白色金针菇液体菌种制备及工厂化生产应用初探[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(2): 75-79
- [7] Wang T, Tan Q, Li Y, et al. Optimization of process parameters for application of liquid spawn of *Pleurotus eryngii*[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2019, 35(1): 33-37 (in Chinese)
王涛, 谭琦, 李玉, 等. 杏鲍菇液体菌种应用工艺参数的优化研究[J]. 上海农业学报, 2019, 35(1): 33-37
- [8] Li C, Li SZ, Xie YZ, et al. Research on liquid cultivation and fruiting experiment of *Volvariella volvacea* strain[J]. Edible Fungi, 2012(2): 16-18 (in Chinese)
李崇, 李森柱, 谢意珍, 等. 草菇菌种液体培养及出菇试验研究[J]. 食用菌, 2012(2): 16-18
- [9] Chen DY, Zhang YF, Shao MC, et al. Production and fruiting experiment on industrial liquid spawn of *Volvariella volvacea*[J]. Edible Fungi of China, 2012, 31(1): 13-14, 23 (in Chinese)
陈多扬, 张一帆, 邵满超, 等. 草菇工厂化液体菌种制作与出菇试验[J]. 中国食用菌, 2012, 31(1): 13-14, 23
- [10] Du SL, Quan WF, Liu GJ. Optimization of a culture medium for production liquid spawn of *Volvariella volvacea*[J]. Edible Fungi, 2004(1): 19-20 (in Chinese)
杜姝莲, 全卫丰, 刘广建. 草菇液体菌种最佳生长因子试验[J]. 食用菌, 2004(1): 19-20
- [11] Ren HX, Yang P, Qu L, et al. Optimization of liquid culture conditions for *Volvariella volvacea*[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2014, 46(1): 58-60 (in Chinese)
任海霞, 杨鹏, 曲玲, 等. 草菇液体菌种培养条件优化研究[J]. 山东农业科学, 2014, 46(1): 58-60
- [12] Wang F, Tao H, Chen M, et al. Effect on mycelial biomass of *Volvariella volvacea* under different liquid culture conditions[J]. Journal of Agriculture, 2011(2): 40-43 (in Chinese)
王芳, 陶鸿, 陈明, 等. 不同培养条件对草菇菌丝生物量的影响[J]. 农学学报, 2011(2): 40-43
- [13] Li YJ, Sun GQ, Guo JF, et al. Latest research progress on the degradation mechanism and preventive measures of edible fungus strains[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2018(2): 136-139 (in Chinese)
李亚娇, 孙国琴, 郭九峰, 等. 食用菌菌种退化机制及预防

- 措施的最新研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2018(2): 136-139
- [14] Zhang LR. Study on quality control technology of *Volvariella volvacea* spawn[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2011 (in Chinese)
张丽蓉. 草菇菌种质量控制技术研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2011
- [15] Li WH, Yu LL, Han F, et al. Determination of the fermentation end-point of two mushroom species by quality changes[J]. China Brewing, 2010(11): 160-162 (in Chinese)
李维焕, 于兰兰, 韩峰, 等. 2 种食用菌液体菌种发酵终点的质量变化检测方法[J]. 中国酿造, 2010(11): 160-162
- [16] Lin ZX, Fu YQ, Zeng XX. Convenient test way of edible mushroom liquid spawn fermentative end-point[J]. Edible Fungi of China, 2006, 25(4): 25-26 (in Chinese)
林增祥, 付永前, 曾宪贤. 食用菌液体菌种发酵终点的简便检测方法[J]. 中国食用菌, 2006, 25(4): 25-26
- [17] Zhang YF, Chen DY, Zhou ZH, et al. Study of the Chinese straw mushroom liquid spawn[J]. Seed, 2012, 31(12): 9-13, 20 (in Chinese)
张一帆, 陈多扬, 周振辉, 等. 草菇液体菌种培养过程的变化和培养终点的研究[J]. 种子, 2012, 31(12): 9-13, 20
- [18] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428
- [19] Wood LP, Elliston A, Ryden P, et al. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay[J]. Biomass and Bioenergy, 2012, 44: 117-121
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [21] Wang XP, Xing SL. Determination of protein quantitation using the method of coomassie brilliant blue[J]. Tianjin Chemical Industry, 2009, 23(3): 40-42 (in Chinese)
王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化工, 2009, 23(3): 40-42
- [22] Wu SJ, Wang CQ, Wang Q, et al. Extracellular enzyme production by *Volvariella volvacea* during its growth and development[J]. Edible Fungi of China, 2015, 34(1): 53-56 (in Chinese)
吴圣进, 王灿琴, 汪茜, 等. 草菇生长发育过程中胞外酶活性变化[J]. 中国食用菌, 2015, 34(1): 53-56
- [23] Qin JZ, Wei YJ, Chen H, et al. A study on the detection indexes of *Flammulina velutipes* liquid strains during the culture process[J]. Acta Edulis Fungi, 2003, 10(1): 12-16 (in Chinese)
秦俊哲, 魏颖杰, 陈合, 等. 金针菇液体菌种培养过程检测指标的研究[J]. 食用菌学报, 2003, 10(1): 12-16
- [24] Mandels M, Hontz L, Nystrom J, et al. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(1): 1-25
- [25] Li X, Wu HW, Shao WL. Inducement, distribution and properties of cellulase from mushroom (*Volvariella volvacea*)[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2002, 21(6): 622-625 (in Chinese)
李讯, 吴华伟, 邵蔚蓝. 草菇纤维素酶系统的诱导、分布及初步定性[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(6): 622-625
- [26] Pei JJ, Hu YH, Shao WL. Inducement, distribution and properties of hemicellulases from *Volvariella volvacea*[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2003, 22(1): 61-64 (in Chinese)
裴建军, 胡沂淮, 邵蔚蓝. 草菇半纤维素酶系统的诱导、分布及初步定性[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(1): 61-64
- [27] Lei DZ, Long JX, Tian CE. Screening for new resource of laccase producing strains from *Volvariella volvacea*[J]. Industrial Microbiology, 2008, 38(3): 51-55 (in Chinese)
雷德柱, 龙嘉欣, 田长恩. 产漆酶的草菇菌株的筛选[J]. 工业微生物, 2008, 38(3): 51-55
- [28] Chen SC, Ma DB, Ge W, et al. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218(1): 143-148
- [29] Ahlawat OP, Gupta P, Dhar BL, et al. Profile of the extracellular lignocellulolytic enzymes activities as a tool to select the promising strains of *Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) sing[J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(3): 389-396