

戴建清. 双孢蘑菇 W192 液体菌种摇瓶培养过程中的生理生化分析 [J]. 福建农业学报, 2021, 36 (2): 182-187.

DAI J Q. Physiological and Biochemical Properties of *Agaricus bisporus* in Shaking Flask Culture [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36 (2): 182-187.

双孢蘑菇 W192 液体菌种摇瓶培养过程中的 生理生化分析

戴建清

(福建省农业科学院食用菌研究所/特色食用菌繁育与栽培国家地方联合工程研究中心, 福建 福州 350014)

摘 要:【目的】研究双孢蘑菇 W192 液体菌种摇瓶培养菌丝体生长规律, 为液体种子活力判断提供参考。

【方法】采用液体摇瓶培养, 分别测定了液体培养过程中双孢蘑菇菌丝体生物量、菌丝球数量和直径、发酵液 pH 值、还原糖和氨基氮含量、羧甲基纤维素酶、淀粉酶、酸性蛋白酶、漆酶胞外酶活性生理生化指标。【结果】摇瓶培养第 8 d 时, 双孢蘑菇菌丝体生物量最大, 为 $9.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 菌丝球数量最多, 为 $880 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$; 菌丝体平均直径最大, 为 0.809 mm ; 培养液中还原糖、氨基氮含量最高, 分别为 5.228 、 $0.079 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 羧甲基纤维素酶、淀粉酶、漆酶活性最高, 分别为 0.69 、 2.11 、 15.02 U 。摇瓶培养第 10 d 时, 酸性蛋白酶活性最高, 酶活性为 2.93 U 。将摇瓶培养 8 d 的液体种子转接液体培养基中进行模拟发酵罐液体菌种培养, 获得的菌丝球数量最多, 达 $115 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 菌丝体生物量最大, 达 $7.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。【结论】双孢蘑菇液体菌种活性与上述指标具有一定的相关性, 结合液体种子活力验证, 判断第 8 d 的液体菌种活力最高, 可作为液体种子用于发酵罐扩繁培养。

关键词: 双孢蘑菇; 液体菌种; 生理生化

中图分类号: S 646.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2021) 02-0182-06

Physiological and Biochemical Properties of *Agaricus bisporus* in Shaking Flask Culture

DAI Jianqing

(Edible Fungi Institute of Fujian Academy of Agricultural Sciences/National and Local Joint Engineering Research
Center for Breeding & Cultivation of Featured Edible Fungi, Fuzhou, Fujian 350014, China)

Abstract: 【Objective】Mycelial growth of *Agaricus bisporus* W192 in a shaking flask was monitored to determine viability of the culture method for scale-up application. 【Method】Physiological and biochemical properties of *A. bisporus* mycelia biomass in the liquid culture including the number and diameter of mycelium pellets, pH of fermentation broth, content of reducing sugar and amino nitrogen as well as the activity of extracellular carboxymethyl cellulase, amylase, acid protease, and laccase were monitored for the analysis. 【Result】On the 8th day of culture, the fungal biomass reached a maximum at $9.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the greatest number of mycelium pellets of $880 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, the largest average diameter of mycelium at 0.809 mm , the peak reducing sugar and amino nitrogen contents at 5.228 and $0.079 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, and the highest activities of carboxymethyl cellulase, amylase, and laccase of 0.69 , 2.11 , and 15.02 U , respectively. The acid protease activity of 2.93 U maxed on the 10th day. By transferring the mycelia in a simulated liquid fermentation tank after 8d of culture, $115 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ of mycelium pellets and $7.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in biomass were obtained. 【Conclusion】The mycelial growth of *A. bisporus* in the liquid shaking flask culture correlated with some of selected physiological and biochemical indices. The established method was deemed applicable for tank fermentation in propagating *A. bisporus* for large scale production of the mushroom.

收稿日期: 2020-08-26 初稿; 2020-11-06 修改稿

作者简介: 戴建清 (1972-), 男, 高级工程师, 研究方向: 食用菌工厂化制种工艺研究 (E-mail: 317152396@qq.com)

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS20); 福建省属公益类科研院所基本科研专项 (2017R1020-2、2018R1020-2); 福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STIT2017-1-6); 福建省种业创新与产业化工程项目 (fjzycxny2017009)

Key words: *Agaricus bisporus*; liquid culture; physiological and biochemical properties

0 引言

【研究意义】双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 是世界上目前栽培地域最广、生产规模最大、产量最多的一种著名食用菌，有“世界菇”之称^[1]。据统计，2018年我国的双孢蘑菇年产量达300多万t，所需栽培种用量近7.2万t。双孢蘑菇 W192 是采用同核不育株间杂交技术选育而成，高产优质形状表现稳定，适合工厂化栽培，于2012年获得福建省新品种认定（闽认菌 2012007）^[2]。目前，双孢蘑菇菌种主要通过母种、原种、栽培种三级固体菌种进行逐级扩繁。相对固体菌种，液体菌种具有培养时间短、发菌快、菌龄整齐一致、接种方便等优点，利于食用菌自动化、工厂化、规模化生产。近年来，液体菌种被广泛地应用在工厂化食用菌生产如金针菇、杏鲍菇、海鲜菇等^[3-5]，与自动化接种设备相结合，推动了食用菌产业的快速发展。国内外食用菌研发机构和生产企业加大了对液体菌种的投入和研发力度^[6]。因此，为提高双孢蘑菇制种自动化、工厂化生产水平，丰富双孢蘑菇菌种生产工艺，对双孢蘑菇液体菌种的研究具有重要意义。【前人研究进展】1948年，Humfeld^[7]和Dijkstra等^[8]对蘑菇开展了液体发酵培养的研究，并指出液体培养的菌丝体适宜作为蘑菇培养的菌种。目前双孢蘑菇液体菌种的研究，如液体培养基和培养条件的优化等^[9-13]，已较为清楚，但尚未全面系统地掌握双孢蘑菇液体培养过程中生理生化变化规律，进而液体菌种作为原种扩繁栽培种也仅限于实验室条件下的小规模使用。

【本研究切入点】摇瓶菌种作为一级菌种，是发酵罐培养获得活力旺盛的二级液体菌种的关键。双孢蘑菇液体培养过程中的生理生化指标反映菌丝体物质代谢情况，根据生理生化指标，判断出菌丝体所处的生长阶段。通过分析双孢蘑菇摇瓶菌种的生理生化指标，掌握摇瓶液体发酵培养的液体种子生长规律，突破液体菌种在实验室条件下的瓶颈，为在工厂化条件下利用液体菌种大规模扩繁生产双孢蘑菇栽培种奠定基础。【拟解决的关键问题】本研究通过对双孢蘑菇 W192 液体种子摇瓶培养过程中的菌丝体生物量、菌丝球数量和直径、发酵液 pH 值、还原糖和氨基氮含量、胞外酶活性等主要生理指标进行测定分析，判断培养终点，以期获得菌丝体生物量大、菌丝球数量多、质量好、活力强的液体种子用于发酵罐深层发酵培养二级液体原种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) W192，由福建省农业科学院食用菌研究所育种室提供。

1.1.2 液体种子培养基配方 葡萄糖 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，小米粉 $7.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，蛋白胨 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，黄豆粉 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ， $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ， KH_2PO_4 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.1.3 主要仪器 奥林巴斯显微镜 CX22LED RFS1、奥豪斯 pH 计 STARTER3100、紫外分光光度计 UV-1300、电子分析天平 FA1104、洁净工作台 SW-CJ-2F、恒温摇床 BSD-YX2200、生化培养箱 SPX-250B-Z。

1.1.4 试验试剂 无水葡萄糖、硫酸镁、磷酸二氢钾等，分析纯，西陇化工股份有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 从保藏的试管菌种中切出 $0.2\text{ cm}\times 0.2\text{ cm}$ 大小的菌块接种于 PDA 平皿， $24\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养 20 d。

1.2.2 液体种子培养 250 mL 三角瓶装液量 100 mL ，于 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 、 0.12 MPa 压力下灭菌 30 min，冷却后将活化的 PDA 母种用打孔器打出直径 1 cm 大小的菌块，每瓶接 2 块菌块，在 $24\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的培养振荡器上旋转振荡培养，每隔 2 d 随机取 3 瓶检测各项指标。

1.2.3 菌丝体生物量测定 取 10 mL 发酵液，在 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下，离心 10 min，弃上清液，菌丝体经蒸馏水洗涤 3 次后，将菌丝体在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干至恒重，电子分析天平称重，重复 3 次，取平均数。

1.2.4 菌丝球数量测定 精密吸取 1 mL 培养液，用蒸馏水稀释 10 倍，再从中吸取 1 mL 悬浮液置于平皿中，皿下衬黑白相间方格纸计数，重复 3 次，取平均数。

1.2.5 菌丝球直径测定 吸取 0.1 mL 稀释 10 倍的悬浮液置于载玻片上，用光学显微镜在低倍镜 (4×10) 下随机选取，测量菌丝球最长长度和最短长度，以菌丝球最长长度加最短长度的二分之一长度即为菌丝球直径，重复 3 次，取平均数。

1.2.6 培养液 pH 值测定 用 pH 计直接置于培养液中测量，重复 3 次，取平均数。

1.2.7 还原糖含量的测量 取不同培养时间的培养液，采用 DNS 法^[14]测定还原糖含量，重复 3 次，取平均数。

1.2.8 氨基氮含量的测量 取不同培养时间的培养

液, 采用茆三酮比色法^[15]测定氨基氮含量, 重复 3 次, 取平均数。

1.2.9 培养液胞外酶活的测定

1.2.9.1 羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活性测定 根据参考文献^[16]羧甲基纤维素酶活力单位为: 以每毫升培养液中的酶量与底物作用 30 min 释放出 1 mg 葡萄糖为 1 活力单位 (U)。

1.2.9.2 淀粉酶活性测定 根据参考文献^[16]淀粉酶活力单位定义为: 以每毫升培养液中的酶量与底物作用 30 min 释放出 1 mg 葡萄糖为 1 活力单位 (U)。

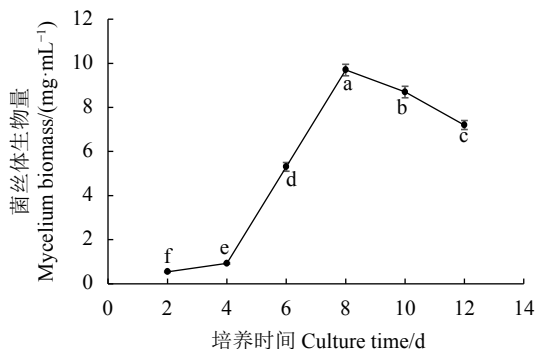
1.2.9.3 酸性蛋白酶活性测定 根据参考文献^[17]酸性蛋白酶活力单位为: 以每毫升培养液中的酶量与底物作用 10 min 引起 0.01 个吸光值改变为 1 活力单位 (U)。

1.2.9.4 漆酶活性测定 根据参考文献^[18]漆酶活力单位为: 以每毫升培养酶液与底物作用 30 min 内改变 0.1 个吸光值为 1 活力单位 (U)。

2 结果与分析

2.1 不同培养时间菌丝体生物量的变化情况

培养基接种后, 按照 2、4、6、8、10、12 d 培养时间, 分别测量不同培养时间菌丝体干重生物量。结果表明培养初期, 由于双孢蘑菇 PDA 母种菌丝块接入液体培养基, 菌丝块沉没在培养液中体积变大, 伴随回旋振荡释放菌丝片段, 菌丝片段开始在培养液中萌发生长。从图 1 可以看出, 培养时间 0~4 d 菌丝体生物量增长缓慢; 培养至 4~6 d, 随着菌丝片段不断增多, 菌丝球不断增大, 菌丝体增长旺盛。培养至第 8 d 菌丝体生物量达到最高峰, 达到 $9.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与其他培养时间的菌丝生物量差异显著 ($P < 0.05$); 随着发酵液中营养成分的减少、



注: 不同小写字母表示差异显著水平 ($P < 0.05$), 图 2~9 同。

Note: The different lowercase letters indicate the significant level of difference at $P < 0.05$. The same as Fig. 2-9.

图 1 不同培养时间菌丝体生物量的变化

Fig. 1 Changes on fungal biomass in flask culture

代谢产物的累积及菌丝活性的衰弱, 导致部分菌丝体发生自溶现象, 菌丝体生物量逐渐下降。

2.2 不同培养时间菌丝球数量的变化情况

作为液体种子, 菌丝球的数量决定萌发点的数量, 是液体菌种的重要生理指标。在 2、4、6、8、10、12 d 培养时间, 分别统计不同培养时间的菌丝球数量, 图 2 表明, 培养时间 0~4 d 菌丝球数量增加缓慢; 培养至 4~6 d, 随着从菌丝块断裂成菌丝片段增多, 菌丝片段生长成菌丝球, 菌丝球边缘菌丝再断裂在培养液中, 每个菌丝片段变成生长点, 繁殖形成新的菌丝球, 此时培养液中的营养物质还很丰富, 菌丝体的生长不受限制, 表现为菌丝体生长旺盛期。到第 8 d 菌丝体数量达到最高峰, 达 $880 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与其他培养时间的菌丝球数量差异显著 ($P < 0.05$), 之后随着培养液中营养成分的减少及菌丝活性的下降, 部分菌丝体自溶, 菌丝球数量逐渐下降。

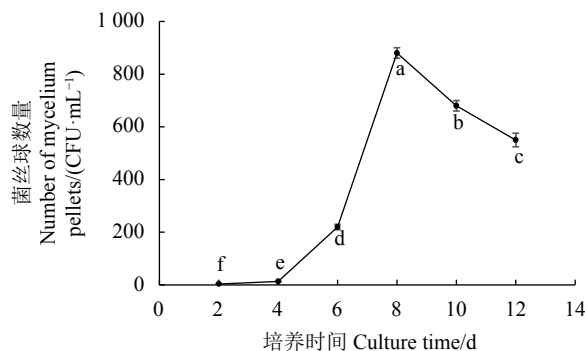


图 2 不同培养时间菌丝球数量的变化

Fig. 2 Changes on number of mycelium pellets in flask culture

2.3 不同培养时间菌丝球直径的变化情况

按照 2、4、6、8、10、12 d 培养时间, 分别测量不同培养时间的菌丝球直径, 图 3 显示, 培养时间 0~4 d 菌丝球平均直径较小, 主要是以菌丝片段出现, 此时菌丝体生长处于迟滞期; 培养时间 4~6 d 菌丝球平均直径逐渐增大, 此时菌丝体处于对数生长期, 表现为新生的菌丝团直径不断增大, 且边缘形成绒毛状菌丝; 培养时间 6~8 d 菌丝球平均直径趋于稳定, 培养时间第 8 d, 菌丝球平均直径达 0.809 mm , 与其他培养时间的菌丝球平均直径差异显著 ($P < 0.05$), 此时菌丝体生长处于平衡期, 表现为菌丝球密集, 边缘呈绒毛状突刺; 随后菌丝球直径有所减小, 此时处于衰退期, 菌丝有自溶现象发生, 菌丝体逐渐老化, 菌球边缘变光滑。

2.4 不同培养时间培养液 pH 值的变化情况

pH 值影响培养液营养成分及中间代谢物的解离、菌丝体细胞膜所带电荷和胞外酶活性, 是双

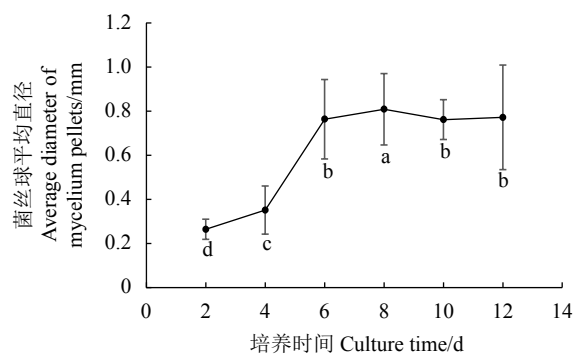


图 3 不同培养时间菌丝球直径的变化

Fig. 3 Changes on mycelium pellet diameter in flask culture

孢蘑菇液体培养的重要生化指标。按照培养时间，分别测定 2、4、6、8、10、12 d 的培养液 pH 值，根据测定结果，绘制双孢蘑菇 W192 液体种子生长过程中 pH 值的变化曲线图。图 4 显示，发酵液的 pH 值呈现先上升，后下降，再上升的变化规律。这可能是因为培养液初期由于菌丝对液体培养基质代谢产生碱性产物导致 pH 值略微上升，随后 6~10 d 培养时间，菌丝体对基质的分解生成部分有机酸，导致 pH 值略微下降；到培养末期，还原糖大量被消耗，同时菌丝球老化、自溶产生氨基氮等物质，从而使培养液的 pH 值有所升高。

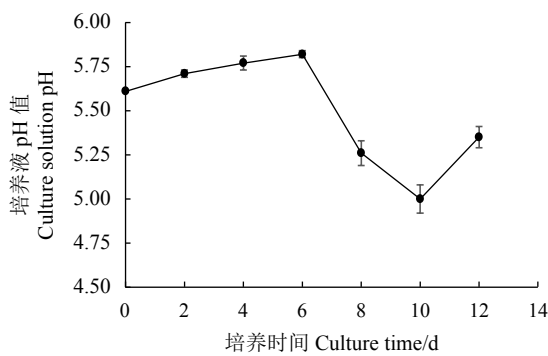


图 4 不同培养时间培养液 pH 值的变化

Fig. 4 Changes on medium pH in flask culture

2.5 不同培养时间还原糖含量变化情况

利用 DNS 法测定不同时间培养液还原糖含量，绘制培养液还原糖含量的变化曲线图。结果如图 5 所示，培养时间 2~8 d，随着菌丝体生物量不断增加，菌丝体代谢生成的还原糖大于消耗的还原糖，表现为还原糖含量不断增加趋势；培养时间第 8 d，培养液还原糖含量最高，与其他培养时间的培养液还原糖含量差异显著 ($P<0.05$)，培养时间 8~12 d，随着菌丝体生物量到达最大，随后培养液中碳源物质不断被消耗，表现为还原糖含量不断下降趋势。

2.6 不同培养时间培养液氨基氮含量变化情况

利用茚三酮法测定不同时间培养液氨基氮含

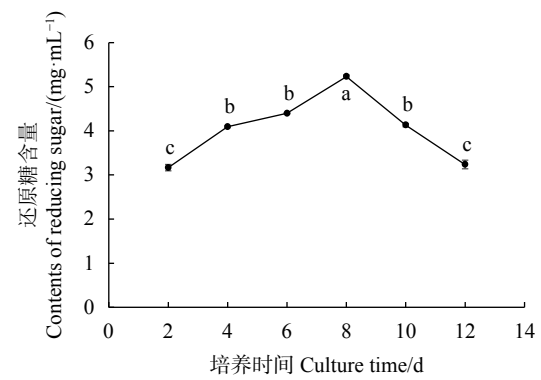


图 5 不同培养时间培养液还原糖含量的变化

Fig. 5 Changes on reducing sugar in medium in flask culture

量，绘制培养液氨基氮含量的变化曲线图。结果如图 6 所示，当培养至 2 d，菌丝体生物量较少，分泌的胞外蛋白酶也较少，菌丝体主要利用培养液中的原始氨基氮，代谢消耗培养液中的原始氨基氮大于分解培养液中氮源物质生成的氨基氮，表现为氨基氮含量不断下降趋势；培养至 6 d，培养液中氨基氮含量最低，随着菌丝体生物量不断增加，菌丝体分泌的胞外蛋白酶增多，为了满足菌丝体对氮源需求，代谢培养液中的氮源物质生成的氨基氮大于消耗的氨基氮，表现为氨基氮含量升高；培养至 8 d，培养液中氨基氮含量最高，与其他培养时间的培养液氨基氮含量差异显著 ($P<0.05$)，培养时间 8~12 d，随着菌丝体生物量到达最大，随后培养液中含氮物质不断被消耗，表现为氨基氮含量不断下降趋势。

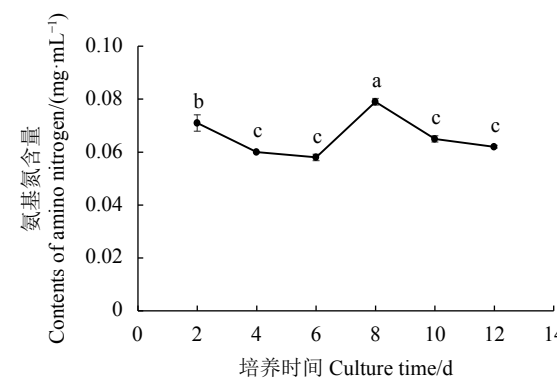


图 6 不同培养时间培养液氨基氮含量的变化

Fig. 6 Changes on amino nitrogen in medium in flask culture

2.7 不同培养时间胞外酶酶活变化情况

按照 2、4、6、8、10、12 d 培养时间，分别测定培养液中羧甲基纤维素酶、淀粉酶、酸性蛋白酶和漆酶的酶活，根据测定结果，绘制双孢蘑菇 W192 液体种子生长过程中酶活性的变化曲线，如图 7 所示。结果表明，菌丝体分泌的羧甲基纤维素酶、淀粉酶和漆酶活性在 8 d 到达峰值，酸性蛋白酶在 10 d 到达峰值。在深层培养的 2~4 d 内，菌丝体处于萌

发状态,对胞外酶的分泌处于调整期,胞外酶酶活的增长比较缓慢。在培养 4~6 d 内,菌丝体开始进入生长旺盛期,此时菌丝的分裂增殖速度加快,分泌大量的胞外酶以分解培养液中的营养物质,此时的胞外酶酶活开始增加,培养到第 8 d,羧甲基纤维素酶、淀粉酶和漆酶活性达到峰值,此时羧甲基纤维素酶酶活为 0.69 U,淀粉酶酶活为 2.11 U,漆酶酶活为 15.02 U,其中第 8 d 的漆酶活性与其他培养时间的漆酶活性差异显著 ($P<0.05$)。第 8~10 d,菌丝体处于生长的平衡时期,氮源成分被大量消耗,通常认为蛋白酶是在基质中可吸收氮源缺乏的情况下,为了获得蛋白质中的氮素而产生的^[19]。因此,酸性蛋白酶被大量诱导出来,活性达到峰值,酶活为 2.93 U,其他胞外酶活性逐渐减弱。随后菌丝体进入生长衰亡期,对胞外酶活的分泌也急速下降,此时菌丝球的活力逐渐减弱。

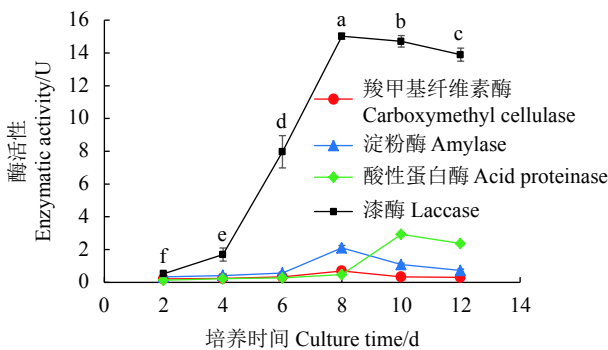


图 7 不同培养时间胞外酶酶活性的变化

Fig. 7 Changes on extracellular enzyme activities in flask culture

2.8 液体种子活力验证

分别将 2、4、6、8、10、12 d 培养时间的液体种子转接至 250 mL 三角瓶装液量为 100 mL 的液体培养基中进行模拟发酵罐液体菌种培养,接种量 1%,在 24 ℃、180 r·min⁻¹ 的培养振荡器上旋转振荡培养,培养 6 d,计算菌丝球数量和菌丝体生物量,试验结果如图 8、9 所示,培养 8 d 的液体种子转接液体培养基获得的菌丝球数量最多,达 115 个·mL⁻¹,与培养时间为 2、4、6、10、12 d 的液体种子对液体菌种菌丝球数的影响呈显著性差异 ($P<0.05$);同时,培养 8 d 的液体种子转接液体培养基获得的菌丝体生物量最大,达 7.56 mg·mL⁻¹,虽与培养 6 d 的液体种子转接液体培养基获得的菌丝体生物量的差异不显著 ($P>0.05$),但与培养时间为 2、4、10、12 d 的液体种子获得的菌丝体生物量的差异显著 ($P<0.05$)。验证试验结果表明,培养 8 d 的液体种子活力最强,可作为发酵罐培养的种源扩繁液体原种。

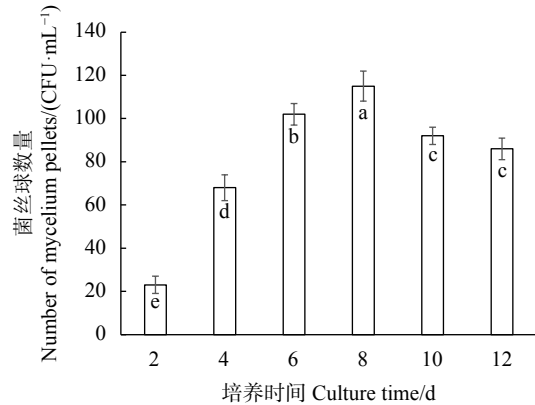


图 8 不同培养时间的液体种子对液体菌种菌丝球数量的影响

Fig. 8 Effect of culture time on number of mycelium pellets

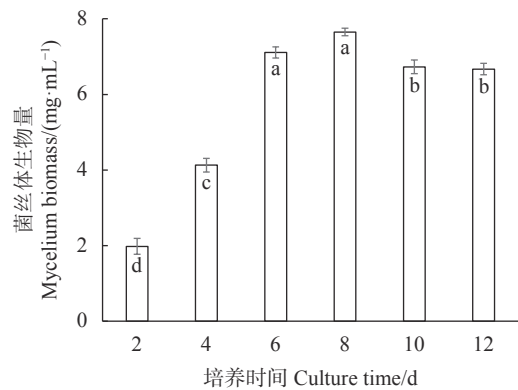


图 9 不同培养时间的液体种子对液体菌种菌丝生物量的影响

Fig. 9 Effect of culture time on fungal biomass

3 讨论与结论

双孢蘑菇 W192 液体种子摇瓶培养过程中,菌丝体生物量、菌丝球数量、平均直径、还原糖和氨基氮含量等生理生化指标在第 8 d 均达到峰值,随后随着培养液中营养成分的减少以及菌丝活性的减弱,以上 5 种生理指标开始下降,到第 12 d,菌丝体老化,并产生自溶现象,这符合双孢蘑菇液体培养的一般生长规律,也反映出第 8 d 的双孢蘑菇菌丝体活力最高,若继续培养则菌丝体活力下降。同时羧甲基纤维素酶、淀粉酶、酸性蛋白酶和漆酶的酶活性生化指标也具有相同的变化趋势,说明胞外酶的酶活变化规律与菌丝体生长趋势基本符合。在整个摇瓶培养过程中,甲基纤维素酶、淀粉酶和酸性蛋白酶活性的变化不明显,而漆酶活性变化明显。漆酶是降解木质素大分子物质的主要酚氧化酶,能加速木质素芳香族高分子化合物的分解,提供菌丝所需的营养,漆酶活性越高,菌株分解能力越强^[19]。因此,漆酶活性可作为反映双孢蘑菇菌丝体活性的指标,也可作为有效可靠的检测指标。孙建华等^[20]对丝状真菌发酵过程中的形态学研究指出:菌丝体

形态的变化影响其在液体培养环境下营养的消耗和摄氧率,进而影响菌丝体继续生长以及代谢产物的生成,因此后续研究有必要从生理形态学角度研究菌丝生长规律及形态变化和各生理指标的关系。综上所述,本试验结果为双孢蘑菇 W192 液体种子摇瓶培养过程的控制提供了比较可靠的技术参数,并确定培养终点为第 8 d,可以获得菌丝活力旺盛、生物量大的液体种子用于扩繁发酵罐液体菌种。

参考文献:

- [1] 王贺祥. 食用菌栽培学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 300-304.
- [2] 王泽生, 廖剑华, 陈美元, 等. 我国双孢蘑菇育种研究与产业发展[J]. 食用菌学报, 2010 (SI): 19-20.
WANG Z S, LIAO J H, CHEN M Y, et al. Research of *Agaricus bisporus* breeding and industrial development in China [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2010 (SI): 19-20. (in Chinese)
- [3] 张鹏, 许占伍, 倪小军, 等. 金针菇工厂化生产液体菌种培养基的配方研究[J]. 食药菌, 2012, 20 (5): 296-297.
ZHANG P, XU Z W, NI X J, et al. Study on the formula of liquid culture medium for the industrial production of *Flammulina velutipes* [J]. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 2012, 20 (5): 296-297. (in Chinese)
- [4] 沈敏, 李文生, 周雷. 杏鲍菇液体菌种研制与工厂化栽培应用[J]. 中国农技推广, 2011, 27 (6): 14-15.
SHEN M, LI W S, ZHOU L. Development and application of liquid spawn of *Pleurotus edodes* [J]. *China Agricultural Technology Extension*, 2011, 27 (6): 14-15. (in Chinese)
- [5] 李武辉. 海鲜菇工厂化生产工艺优化[D]. 太原: 山西农业大学, 2017.
LI W H. Optimization of the industrial production process of *Hypsizygus marmoreus* [D]. Taiyuan: Shanxi Agriculture University, 2017. (in Chinese)
- [6] 戴建清, 曾志恒. 食用菌液体菌种研究现状及发展趋势[J]. 中国食用菌, 2012, 31 (5): 1-3.
DAI J Q, ZENG Z H. Research status and development trends of liquid spawn of edible mushroom [J]. *Edible Fungi of China*, 2012, 31 (5): 1-3. (in Chinese)
- [7] HUMFELD H. The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture [J]. *Science*, 1948, 107 (2780): 373.
- [8] DIJKSTRA F I, SCHEFFERS W A, WIKÉN T O. Submerged growth of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1972, 38 (1): 329-340.
- [9] 胡贵权. 双孢蘑菇液体菌种培养基配方试验[J]. 食用菌, 1999, 21 (6): 13.
HU G Q. Experiment on the medium formula of liquid spawn of *Agaricus bisporus* [J]. *Edible Fungi*, 1999, 21 (6): 13. (in Chinese)
- [10] 罗帷. 双孢蘑菇 2796 菌株液体菌种的工艺研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
LUO W. Studies on the technics of liquid spawn of *Agaricus bisporus* strain 2796 [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [11] 黄爱荣, 缪礼鸿, 边银丙. 双孢蘑菇液体菌种发酵工艺研究[J]. 食用菌, 2009, 31 (5): 12-13.
HUANG A R, MIAO L H, BIAN Y B. Study on fermentation technology of liquid spawn of *Agaricus bisporus* [J]. *Edible Fungi*, 2009, 31 (5): 12-13. (in Chinese)
- [12] 马忠友, 周盘龙, 祝嫦娥, 等. 双孢蘑菇液体菌种培养基的优化[J]. 安徽科技学院学报, 2012, 26 (2): 23-27.
MA Z Y, ZHOU P L, ZHU C W, et al. Optimization of media for *Agaricus bisporus* in liquid culture [J]. *Journal of Anhui Science and Technology University*, 2012, 26 (2): 23-27. (in Chinese)
- [13] 曾志恒, 程翊, 曾辉, 等. 双孢蘑菇 W192 菌株液体发酵培养的研究[J]. 福建农业学报, 2013, 28 (8): 763-769.
ZENG Z H, CHENG Y, ZENG H, et al. Study on fermentation of *Agaricus bisporus* strain W192 [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28 (8): 763-769. (in Chinese)
- [14] 曾志恒, 曾辉, 程翊, 等. 双孢蘑菇发酵液还原糖和总糖的含量测定[J]. 中国食用菌, 2018, 37 (6): 40-43, 49.
ZENG Z H, ZENG H, CHENG Y, et al. Determination of reducing sugar and total sugar content in fermentation liquid of *Agaricus bisporus* [J]. *Edible Fungi of China*, 2018, 37 (6): 40-43, 49. (in Chinese)
- [15] 曾志恒, 曾辉, 程翊, 等. 双孢蘑菇发酵液氨基氮含量测定方法的研究[J]. 食用菌, 2019, 41 (5): 77-80.
ZENG Z H, ZENG H, CHENG Y, et al. Study on determination of amino nitrogen content in in fermentation liquid of *Agaricus bisporus* [J]. *Edible Fungi*, 2019, 41 (5): 77-80. (in Chinese)
- [16] 王玉万, 王云. 构菌栽培过程中对木质纤维素的降解和几种多糖分解酶活性的变化[J]. 微生物学通报, 1989, 16 (3): 137-140, 187.
WANG Y W, WANG Y. Degradation of lignocellulose and changes in the activities of several polysaccharide decomposing enzymes of *Flammulina velutipes* during the cultivation process [J]. *Microbiology*, 1989, 16 (3): 137-140, 187. (in Chinese)
- [17] 韩增华, 张丕奇, 孔祥辉, 等. 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 Z H, ZHANG P Q, KONG X H, et al. 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] 宋爱荣, 韩立忠, 刘作亭, 等. 七个白色金针菇菌株发酵液中四种胞外酶活性的测定与分析[J]. 中国食用菌, 1998, 18 (4): 31-34.
SONG A R, HAN L Z, Liu Z T, et al. Test and analysis of four kinds of extracellular enzyme activation in fermented liquid of seven white *Flammulina velutiper* strains [J]. *Edible Fungi of China*, 1998, 18 (4): 31-34. (in Chinese)
- [19] 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.
QIN J Z, WEI Y J, 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)
- [20] 孙建华, 宇克莉, 路福平, 等. 丝状真菌 Sr18 发酵过程中的形态学研究[J]. 天津科技大学学报, 2005, 20 (4): 1-5.
SUN J H, YU K L, LU F P, et al. Study on the morphology of filamentous fungus Sr18 in submerged fermentation [J]. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 2005, 20 (4): 1-5. (in Chinese)

(责任编辑: 黄爱萍)