



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101773052 A

(43) 申请公布日 2010.07.14

(21) 申请号 201010124418.5

(22) 申请日 2010.03.16

(71) 申请人 孟庆学

地址 122500 辽宁省凌源市宋杖子镇集体户

申请人 林树芳

范鸿基

(72) 发明人 孟庆学 林树芳 范鸿基

(51) Int. Cl.

A01G 1/04 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

冬虫夏草菌种制备与工厂化栽培

(57) 摘要

本发明提出了冬虫夏草菌种制备与工厂化栽培新技术方法,它是由2龄幼蚕做为冬虫夏草培养基的寄主,通过野生冬虫夏草组织分离制备菌种,浸染幼蚕,提供了适宜冬虫夏草生长发育的生态条件,栽培出野生冬虫夏草形状和各药食物质含量相似的冬虫夏草产品。本发明操作工艺简便,成活率高,栽培成本低。

1. 冬虫夏草菌种制备与工厂化栽培,其特征为:

1、林地下层沙壤土 50%、杂木屑 10%、谷糠 10%、杂草粉 20%、河沙 10%、磷酸二氢钾 40g、硫酸镁 60g、硫酸锌 60g、氯化钙 40g、蔗糖 1.5kg、VB₁100 片、VC100 片、黄粉虫浆 3kg、磁化水 1000kg;

2、用 UHT 杀菌机瞬间 0.5 秒杀菌消毒;

3、去皮土豆 230g、葡萄糖 20g、琼脂 20g、燕麦片 10g、水 1000ml;

4、葡萄糖 30g、蔗糖 10g、蛋白胨 15g、酵母粉 2g、氨基酸复合粉 10g、蚕蛹浆 10g、黄粉虫浆 10g、磷酸二氢钾 0.8g、硫酸镁 2g、硫酸锌 2g、氯化钙 1.5g、VB₁5 片、VC 5 片、消泡剂 2ml、水 1800ml;

5、用水溶性的医用消毒剂与无菌水稀释成 0.5 : 1 的消毒液;

6、将液体栽培菌种用无菌水稀释成菌与水 0.3 : 1 的浓度;

7、每隔 8 小时喷染 1 次,第 2 天时将桑叶与液体栽培菌种搅拌均匀后放入盆内,连续喷染 3 天;

8、用直径 2cm 的木棒扎 -45 度的斜坡洞穴,深度 4-5cm,穴与穴之间相隔 3cm,并向洞穴内喷洒液体栽培菌种,然后将浸染的幼蚕头朝上放入洞穴内,每穴放 1 条,向池床表面再喷洒 1 遍液体栽培菌种,上复一层 1.3cm 厚的灭菌栽培土;

9、灭菌的栽培土装入广口瓶内三分之二处,用 2cm 的木棒在广口瓶内直下扎 5 个洞穴,取 5 条浸染 5 天后的 2 龄幼蚕头朝上分别放入洞穴内,表面喷洒 1 次液体栽培菌种,上复一层 1.3cm 厚的灭菌栽培土。

冬虫夏草菌种制备与工厂化栽培

技术领域

[0001] 本发明是采用池床和广口瓶两种方式栽培冬虫夏草,是一种以桑蚕作寄主,通过菌液的浸染、培养,获得的与野生冬虫夏草相似的优质虫草产品。

背景技术

[0002] 天然冬虫夏草生长在我国西部与西南省区的高寒地区,生长环境特殊,资源有限。由于冬虫夏草的医疗和保健所具有的重要价值被国内外认同后,需求量不断增加。但由于天然资源数量不多,加上虫草产区生态环境严重恶化,以及人为的偷来滥挖,致使野生虫草资源数量锐减,产量不断下降,供求矛盾日益加剧,造成药食原料市场供求脱节,价格昂贵。近年,国内有很多虫草栽培户都在试验栽培冬虫夏草,但由于冬虫夏草生长的特殊性,许多栽培户都因诸多原因栽培失败,即使有的栽培成功,但也因生长畸形,子实体短小和成活率低等原因,导致栽培成本高,无法实行工厂化大面积栽培。

[0003] 本发明旨在通过改变原有冬虫夏草的小型栽培基础上,经多年栽培实验,又一适合工厂化大面积栽培与野生冬虫夏草相似的工艺方法,由于培养土、菌种、温湿度、PH值、光照等各方面环境因素与营养更接近野生冬虫夏草生长条件,致使培育成活率达92%以上。

发明内容

[0004] 本发明冬虫夏草菌种制备与工厂化栽培,其主要是采用天然野生冬虫夏草子座经组织分离制备种源,采用2龄的幼蚕做为冬虫夏草培养基的寄生,添加适宜冬虫夏草生长所需的各种有机养分和无机养分,在模拟野生冬虫夏草产区的生态环境,即相适应的温度、湿度、光照度和PH值的条件下,栽培和获取与野生冬虫夏草形状、药食用物质含量相似的虫草资源,其目的地是为国内外药食用市场提供人工栽培的中国冬虫夏草产品。其方法是:

[0005] 1、培养设备

[0006] 本发明采用床架式和容器两种栽培方式,这两种栽培方式都适合在室内和塑料大棚内。室内设有立体4层床架,长度按室内或大棚的实际面积自定,用5cm×5cm的三角钢焊接成宽1米的框架,床架上层设置若干个长1.4米,宽0.8米的小池床,池床内用压缩板固定,池床四周用木制板条半固定,池床高为14cm,以便边框可以取下,方便采收虫草,设置立体4层,每层间隔0.8米。

[0007] 2、栽培土配制

[0008] (1) 配方,野生冬虫夏草多生长在针阔混交林地上,上层林有松、杉、栎、槐、榆类树种,下层有灌木层及草本植物,土壤疏松湿润,土粒较细,PH值在5-7。为了达到与野生冬虫夏草相适应的生长条件,本发明采用无污染的林地下沙壤土50%,杂木屑10%,谷糠10%,杂草粉20%,河沙10%,混合后过筛,清除杂质。

[0009] (2) 灭菌处理:将磷酸二氢钾40g、硫酸镁60g、氯化钙40g、硫酸锌60g、VB₁100片,VC100片、蔗糖1.5kg、黄粉虫浆3kg、磁化水1000kg,混合搅拌溶解,喷洒在过筛的栽培土上,搅拌均匀,这时土与水比为1:0.6,达到手握成团,略有水珠不滴,土团落地散开即可,

PH 值 7.2, 然后通过 UHT 杀菌机瞬间 0.5 秒杀菌消毒, 对各种杂菌、病毒、虫卵杀死率为 100%, 这样不仅减少了化学药物处理时产生的气化与异味的污染, 适应了菌丝的生长, 同时灭菌彻底, 省时省力, 为栽培进度提前了时间。

[0010] (3) 菌种制备

[0011] ①试管菌种: 去皮土豆 230g、葡萄糖 20g、琼脂 20g、燕麦片 10g、水 1000ml, 合并水煮浓缩 500ml 后, 分别装入长 20cm, 口径 2cm 的试管内, 装入量为试管长度的 1/3, 然后用棉球封口捆扎, 放入 110℃ 灭菌罐内, 灭菌 50 分钟后, 摆放斜面, 待凝固后, 将野生冬虫夏草子座用酒精浸泡 5 秒种再用灭菌水反复冲洗数遍, 用灭菌刀片切成短丝状, 取少量接种于试管斜面中心段封口, 移入 28℃ 的恒温箱内, 暗光下培养 10 天, 待见到试管培养基表面出现星芒状白色菌落时, 即可进行试管移接。当二次移接菌丝布满试管后, 在从中挑选优质菌种丝进行第三次转管扶壮培养, 第三次复壮菌丝成熟后, 方可转扩栽培菌种。由于菌丝的无性繁殖及多次转管和栽培的冬虫夏草菌种, 其母本基因容易发生变异, 具体表现为子座多畸形、子座矮小, 质量和产量下降。因此, 在正常栽培中要定期对冬虫夏草菌种进行一次有性繁殖, 即子座组织分离或孢子分离培养, 这样可有效的避免杂菌污染和菌种退化。

[0012] ②液体栽培菌种设备: 本发明设计一组三管式简易发酵装置。目前, 真菌类工业化大罐发酵技术, 主要是以生产药用及保健用虫草菌丝体为目的。但是, 工业深层发酵工程投资大, 工序复杂, 技术条件要求高, 而且主要是生产药食用菌丝体, 一旦灭菌不彻底及杂菌污染, 即可造成整罐发酵液培养失败, 这种发酵装置即使在工厂化大面积栽培的情况下, 也不宜采用。针对这种情况, 为了在较短时间内生产出大量优质供人工栽培用的冬虫夏草液体菌种, 就必须设计出一种新型发酵装置, 它具有投资少, 操作简便, 生产周期短, 菌丝质量好等优点。本发明设计的是一种三管组合式发酵装置, 它改革了工厂化栽培需进购昂贵的大型发酵设备, 以及常规培养所用的摇床之类装置, 只需配备交直两用的小气量通气装置电磁泵、空气过滤器、3000ml 的烧瓶、玻璃导管、橡胶管、橡胶瓶塞、灭菌棉球、分叉多通管、皮管夹、工作台、负离子空气杀菌器、紫外线杀菌灯。然后进行组合连接, 按每天的栽培量, 制备几个一组至十几个一组的烧瓶发酵装置, 当冬虫夏草菌种接种于液体培养基中时, 经过直接吹氧, 起到上下浮动和通气的作用, 即可进行液体菌种的深层培养。本装置的优点是, 一是装置造价低, 代替了发酵罐装置中的无油气体压缩机通气装置以及液体培养中所用的摇床之类装置, 从而大大降低了成本, 造价仅为摇床的一半, 比小型发酵罐装置造价的 1/15 还低。另外本装置中注入的培养液总量占发酵瓶容量的 60%, 其有效利用率比摇瓶提高 3 倍以上; 二是制备菌种时间短, 从一、二、三级液体培养到栽培菌种形成只需 15 天, 大大缩短了制种时间; 三是菌龄一致, 固体菌种上下菌龄难以均一, 而液体菌种上下一致, 菌龄短, 菌丝发育健壮, 用于固体栽培, 易于定植, 萌发快, 生长发育好; 四是接种简便快速, 减少污染; 五是不受电源限制, 由于采用的是交直两用型电磁泵、即是停电、也能正常工作。

[0013] ③液体栽培菌种的制备: 葡萄糖 30g、蔗糖 10g、蛋白胨 15g、酵母粉 2g、氨基酸复合粉 10g、蚕蛹浆 10g、黄粉虫浆 10g、磷酸二氢钾 0.7g、硫酸镁 2g、氯化钙 1.8g、硫酸锌 2g、VB₁5 片、VC5 片、消泡剂 2ml、水 1800ml。本发明液体培养基中采用了鲜活蚕蛹和鲜活黄粉虫、打浆过滤后, 做为冬虫夏草菌丝生长所需的氮源组分, 这两种昆虫内含丰富的蛋白质、氨基酸、矿物质、生物素以及亚油酸、亚麻酸等不饱和脂肪酸, 还有几丁质、天然激素和各种酶类物质, 是冬虫夏草菌丝体极易吸收利用的氮源养分。消泡剂是为避免在培养过程中产

生大量泡沫,而影响空气的通入和造成代谢不正常、易导致冬虫夏草菌丝自溶,对冬虫夏草菌丝的生长危害较大,故此采用植物葵花子油做为消泡剂效果较好。

[0014] ④栽培车间消毒

[0015] 接种前 2 天将车间内腾空、墙壁、顶棚、地面清扫干净,并打开门窗通风换气,次日封闭门窗,将来苏儿按规定量以水稀释成消毒液,用喷雾器喷洒在栽培车间墙壁、顶棚和地面上,在车间内以每 20m² 内设 -40w 紫外线杀菌灯、灭菌 3 小时。在接种前用排气扇排空室内臭氧异味,这样,培养车间内空气净化度可达 8 万级以上,最大限度的减少空气污染。

[0016] ⑤接种

[0017] 将 2 龄幼蚕 0.6kg 放入 -60 目的尼龙筛内,用一种水溶性的医用消毒剂与无菌水稀释成 0.5 : 1 的消毒液,这种医用消毒剂属中性的杀菌剂,无刺激性、无挥发性物质,对幼蚕体表无损伤,无毒,而且冲洗数遍后,无残留,对各种细菌病毒的杀死率为 99.9%。用喷壶喷洒在幼蚕体表上,反复喷洒消毒 30 秒钟后,用无菌水反复喷淋冲洗数遍,自然晾干后放下一直径 60cm 的塑料大盆内,将液体栽培菌种用无菌水稀释成菌与水 0.3 : 1 的浓度,喷洒在幼蚕体表上,用黑色塑料布封严,在暗光下培养,每隔 8 小时喷染 1 次,连续喷染 3 天,为了获得更多的感染机会,第 2 天时将桑叶与液体栽培菌种混拌后放入盆内,使其边吃边感染,内外结合感染成功率更高,培养 5 天后,幼蚕体表出现白色菌丝并处于半死亡状态,即可移入栽培车间进行复土栽培。

[0018] ⑥栽培管理:将灭菌的塑料布铺在池床内,放入灭菌的栽培土,土要疏松,不能压实,高度为 9cm,用直径 2cm 的木棒扎 -45 度斜坡洞穴,深度为 4-5cm,穴与穴之间相隔 3cm,并向洞穴内喷洒菌种液,然后将浸染的幼蚕头朝上放入洞穴内每穴内放一条,几乎每平方米内放入 400 多条幼蚕,最后向池床表面喷洒液体菌种,上复一层 1.3cm 的厚的灭菌栽培土,用木尺轻轻刮平,不能压实,再用黑色塑料布封严,暗光下培养,一个月内调节室温 15-23℃,空气湿度 55-70%,培养土 PH 值 6.8,1-1.5 个月内室温调到 16-25℃,空气湿度 62-75%,1 个半月后,幼虫头部开始裂开,萌发生长虫草子座基部并露出土面,这时应取下蒙盖的塑料布,调节室温 16-29℃,空气湿度 80-90%,这时的 PH 值为 6.5,此阶段要经常打开门窗通风换气,并调节光照度为 190-240 勒克斯,以利于冬虫夏草子座生长发育。再经 1.5 个月 -2 个月的栽培,子座长到 6-12cm 高,粗 1.4-4mm,形状呈棍棒状,颜色为黄褐色,孢子囊形成即可采收。

[0019] (3) 采收:人工栽培冬虫夏草从接种到子座成熟需 110-120 天,经 3 个半月至 4 个月的栽培管理,一个栽培生长期即告结束。将池床四边的半固定木制板条取下,用塑制铲轻轻扒开泥土,小心地将冬虫夏草取出,然后用清水洗净泥土和菌丝,待表面水珠消失后,用市售的黄酒喷洒在冬虫夏草体表上,使其软化,然后将其整理平直,自然风干,即为冬虫夏草产成品。

[0020] 6、容器栽培

[0021] (1) 容器栽培采用广口瓶为好,也可用塑制盆,塑制桶、盘;

[0022] (2) 培养土与床池培养土相同;

[0023] (3) 培养土装瓶时不要填得太多,太实,一般要求装入瓶容量的三分之二处即可,土质疏松有利于菌丝和子座生长;

[0024] (4) 接种,用 2cm 的木棒在广口瓶内直下扎 5 个洞孔,将接种 5 天后的 2 龄幼蚕头

朝上分别放入洞孔内表面喷洒 1 次液体菌种,上复一层 1.3cm 厚的灭菌栽培土,用塑料布封口暗光下培养,室温调为 16-23℃,湿度为 50-60%,10 天后幼蚕全部僵化,体表菌丝感染全部覆盖幼蚕全身。

[0025] (5) 管理,为了有效节省空间及充分利用率,接种后的广口瓶全部移入床架上暗光下培养,1.5 个月后,幼蚕头部长出了子实体基座并露出土面,这时可在蒙盖广口瓶的塑料布中间扎一个洞孔,以利通风换气,调温 18-26℃湿度为 70-80%,培养到 2 个半月后,可将蒙盖广口瓶的塑料布取下,此阶段应每天打开门窗 5-6 小时通风换气,增加折射光照时间 10 小时以上,光强度为 190-230 勒,温度调于为 19-31℃,湿度为 80-90%。待生长到 110 天-120 天,子座长到 6-12cm、粗 1.4-4mm 时,形状呈棍棒状,颜色为黄褐色,孢子囊形成即可采收,用塑制铲在冬虫夏草子座外围处直挖到底,轻轻取出,洗净、用黄酒喷软,风干,即为冬虫夏草产成品。

[0026] 本发明在完全人工控制的条件下实现冬虫夏草生长发育的全过程,就必须具备适应野生冬虫夏草生长的特殊生态条件,以及菌种的纯正,充足的营养,温湿度和光照度,从栽培土,制备菌种到接种栽培各方面的工序须在无菌的状态下进行操作,才能实现人工栽培冬虫夏草产成品的成功。

具体实施方式

[0027] 冬虫夏草菌种制备与工厂化栽培,其方法是:

[0028] 1、栽培设备

[0029] 用 5cm×5cm 的三角钢焊接成长 6 米、宽 1 米、高 3.2 米的金属框架,立体 4 层,每层间隔 0.8 米,每层床架上焊接 4 个长 1.4 米、宽 0.8 米的小池床,池床内用压缩板固定,池床四周用木制板条半固定,池床边高度 14cm;

[0030] 2、栽培土配制

[0031] 采用无污染的林地下层沙壤土 50%、杂木屑 10%、谷糠 10%、杂草粉 20%、河沙 10%,混合过筛,然后将磷酸二氢钾 40g、硫酸镁 60g、硫酸锌 60g、氯化钙 40g、蔗糖 1.5kg、VB₁100 片、VC100 片、黄粉虫浆 3kg、磁化水 1000kg,混合搅拌溶解后,喷洒在过筛的栽培土上,土与水比为 1 : 0.6,搅拌均匀后,用 UHT 杀菌机瞬间 0.5 秒杀菌消毒,在这时培养土 PH 值为 7.2,再用塑料布盖严,待用;

[0032] 3、菌种制备

[0033] (1) 试管菌种:去皮土豆 230g、葡萄糖 20g、琼脂 20g、燕麦片 10g,水 1000ml,合拼水煮浓缩 500ml,过滤后,分别装入长 20cm,口径 2cm 的试管内,装入量为试管的 1/3,封口捆扎放入高压灭菌罐内加温 110℃,灭菌 50 分钟后,取出,摆斜面凝固;将野生冬虫夏草用酒精浸泡 5 秒钟,再用无菌水反复冲洗数遍,用灭菌刀将其切成短丝状接种于试管斜面中间,封口后移入 28℃ 的恒温箱内暗光下培养 10 天,待白色菌落形成时,取优质菌丝,进行二次和三次转管扶壮,待用;

[0034] (2) 液体栽培菌种制备:取葡萄糖 30g、蔗糖 10g、蛋白胨 15g、酵母粉 2g、氨基酸复合粉 10g、蚕蛹浆 10g、黄粉虫浆 10g、磷酸二氢钾 0.8g 硫酸镁 2g、硫酸锌 2g、氯化钙 1.5g、VB₁5 片、VC5 片、消泡剂 2ml,水 1800ml,将其混合溶解后,注入 3000ml 的三角瓶内封口,高压灭菌 110℃,50 分钟后取出,放入三管式组合工作台上,取经三次转管扶壮的试管菌种

2cm 块菌丝放入三角瓶内,这时,接入通氧泵,给氧管、排气管、取样管,并将空气杀菌过滤器分别安装在三个导管中间,封闭瓶口在暗光下静置 48 小时,调节室内温度 15-28℃,湿度为 50-60%,2 天后进行不间断给氧,培养 10 天,待液内长满白色菌丝时,停止给氧,取下待用;

[0035] 4、栽培车间消毒

[0036] 接种前 2 天将车间内清扫干净,打开门窗通风,次日封闭门窗,用来苏儿与水按药物说明书中规定的量稀释成消毒液,用喷雾器喷洒墙壁、顶棚、地面、同时将全部紫外线杀灭菌灯打开,灭菌 3 小时;

[0037] 5、接种

[0038] 将 2 龄幼蚕 0.6kg 放入 60 目的尼龙筛内,用水溶性的医用消毒剂与无菌水稀释成 0.5 : 1 的消毒液,喷洒在幼蚕体表上,反复喷洒消毒 30 秒钟后,用无菌水反复喷淋冲洗数遍,自然晾干后放入一直径 60cm 的塑料大盆内,将液体栽培菌种用无菌水稀释成菌与水 0.3 : 1 的浓度,装入灭菌的小喷雾器内,均匀喷洒在幼蚕体表上,用黑色塑料布封严,暗光下培养,室温调至为 26℃,湿度为 50-60%,每隔 8 小时喷染 1 次,第 2 天时将桑叶与液体栽培菌种搅拌均匀后放入盆内,连续喷染 3 天,5 天后幼蚕体表略有白色菌丝出现时,移入栽培车间进行复土栽培;

[0039] 6、栽培与管理

[0040] 将已灭菌的塑料布铺在池床内,放入灭菌的栽培土,厚度为 9cm,用直径 2cm 的木棒扎 45 度的斜波洞穴,深度 4-5cm,穴与穴之间相隔 3cm,并向洞穴内喷洒液体栽培菌种,然后将浸染的幼蚕头朝上放入洞穴内,每穴放 1 条,向池床表面再喷洒 1 遍液体栽培菌种,上复一层 1.3cm 厚的栽培土,用木尺轻轻刮平,再用黑色塑料布封严,暗光下培养,1 个月内室温保持 15-23℃,空气湿度 55-70%,这时栽培土中的 PH 值为 6.8 ;1-1.5 个月内室温调至 16-25℃,空气湿度 62-75% ;1 个半月后,冬虫夏草子座生长露出土面,这时取下蒙盖的黑色塑料布,调节室温 16-29℃,空气湿度为 80-90%,这时栽培土中 PH 值为 6.5,此阶段经常打开门窗通风换气,并调节光照度,要求散射光或灯光,光照时间每天 10 小时,光照强度为 190-240 勒,再经 1.5-2 个月的栽培,子座长到 6-12cm,粗 1.4-4mm 形状呈棍棒状,颜色为黄褐色,孢子囊形成时即可采收;

[0041] 7、采收

[0042] 将池床四边半固定的木制板条取下,用塑制铲轻轻扒开泥土,小心地将冬虫夏草取出,然后用清水洗净泥土和伏着的菌丝,待表面水珠消失后,用黄酒喷洒在冬虫夏草体表上,使其软化,然后整理平直,自然风干,

[0043] 8、容器栽培

[0044] (1) 将灭菌的栽培土装入广口瓶内三分之二处,用 2cm 的木棒在广口瓶内直下扎 5 个洞穴,取 5 条浸染 5 天后的 2 龄幼蚕头朝上分别放入洞穴内,表面喷洒 1 次液体栽培菌种。上复一层 1.3cm 厚的灭菌栽培土,用塑料布封口,暗光下培养,室温调至 16-23℃,湿度为 50-60%,10 天后幼蚕全部僵化,体表菌丝感染全部幼蚕并覆盖虫体全身;

[0045] (2) 管理与采收

[0046] 接种后的广口瓶在暗光下培养 1.5 个月后,幼蚕头部长出子实体基座并露出土面时,在蒙盖广口瓶口的塑料布,中间扎一洞孔,调温 18-26℃,湿度为 70-80%,培养到 2 个半月后,将蒙盖广口瓶的塑料布取下,此阶段要打开门窗 5-6 小时通风换气,增设散射光照

时间 10 小时以上,光强度为 190-230 勒,温度调至为 19-31℃,湿度为 80-90%,待长到 110 天 -120 天,子座长到 6-12cm 高,粗 1.4-4mm 时,形状呈棍棒状,颜色为黄褐色,孢子囊形成时即可采收;用塑制铲在冬虫夏草子座外围处直挖到底,轻轻取出,洗净泥土,用黄酒喷洒软化,然后整理平直,自然风干,即为瓶栽的冬虫夏草产成品。