(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105255736 A
(43)申请公布日 2016.01.20

(21)申请号 201510807362.6

(22)申请日 2015.11.19

(71)申请人 天津绿圣蓬源农业科技开发有限公司
地址 300400 天津市北辰区经济开发区双辰中路西

(72)发明人 陈启永 王旭峰 张红颖 杨华 何乐 班立桐 黄亮 王玉

(74)专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理有限公司 12211
代理人 李纳

(51)Int.Cl.
C12N 1/04(2006.01)
C12R 1/645(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种真姬菇菌种的保藏方法

(57)摘要

本发明提供一种真姬菇菌种的保藏方法，包括培养基的混合、培养基灭菌、菌种接种、菌种培养、菌种继代过程，所述菌种继代过程为所述菌种在所述培养基中每30-35天进行一次继代的过程，所述菌种培养基配方的重量百分比为：木屑20-25%、米糠10-15%、水65%，其中所述木屑、米糠重量百分比均为其干重重量的百分比，本发明所述的保藏方法所用培养基的原材料价格便宜，易于购买，储存方便，菌种保藏期长，利用此保藏方法保藏的菌种可连续使用10-20年，且菌种性状稳定。

CN 105255736 A

1. 一种真姬菇菌种的保藏方法，包括培养基的混合、培养基灭菌、菌种接种、菌种培养、菌种继代过程，其特征在于：所述菌种继代过程为所述菌种在所述培养基中每 30-35 天进行一次继代的过程。

2. 根据权利要求 1 所述的真姬菇菌种的保藏方法，其特征在于：所述培养基配方的重量百分比为：木屑 20-25％、米糠 10-15％、水 65％，其中所述木屑、米糠重量百分比均为干重重量的百分比。

3. 根据权利要求 2 所述的真姬菇菌种保藏方法，其特征在于：所述培养基配方的重量百分比为：木屑 22％、米糠 13％、水 65％，其中所述木屑、米糠重量百分比均为干重重量的百分比。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的真姬菇菌种的保藏方法，其特征在于：所述木屑包括杨木木屑和松木木屑，所述杨木木屑占木屑总干重比例的 30％ -50％，所述松木木屑占木屑总干重比例的 50％ -70％。

5. 根据权利要求 4 所述的真姬菇菌种的保藏方法，其特征在于：所述木屑包括杨木木屑和松木木屑，所述杨木木屑占总干重比例的 48％，所述松木木屑占木屑总干重比例的 52％。

6. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的真姬菇菌种的保藏方法，其特征在于：所述培养基灭菌过程为：首先 95℃灭菌 55-65 分钟，然后 105℃灭菌 25-35 分钟，之后 121℃灭菌 40-60 分钟，最后焖置 80-100 分钟。

7. 根据权利要求 6 所述的真姬菇菌种的保藏方法，其特征在于：所述培养基灭菌过程为：首先 95℃灭菌 60 分钟，然后 105℃灭菌 30 分钟，之后 121℃灭菌 50 分钟，最后焖置 90 分钟。

8. 根据权利要求 1 或 2 或 3 或 5 所述的真姬菇菌种的保藏方法，其特征在于：所述菌种接种的接种条件为将灭菌后的培养基冷却至 18-22℃，然后在无菌环境下进行接种。

9. 根据权利要求 8 所述的真姬菇菌种的保藏方法，其特征在于：所述菌种培养阶段的培养环境为：温度为 20-22℃，湿度为 60-70％，二氧化碳浓度为 1500-2500ppm。

一种真姬菇菌种的保藏方法

技术领域

[0001] 本发明属于菌种保藏技术领域，尤其是涉及一种真姬菇菌种的保藏方法。

背景技术

[0002] 真姬菇含有丰富的维生素和多种氨基酸，其中赖氨酸、精氨酸的含量高于一般菇类，有助于青少年益智增高，并具有抗癌、降低胆固醇的作用，由于真姬菇的价值较高，现已成为全国食用菌工厂化生产的重要品种之一，菌种作为一种重要的生物资源，为了保持其优良性状不变，应及时对其进行保藏，使微生物的代谢处于最不活跃或相对静止的状态，才能在一定的时间内使其不发生变异而又保持生活能力。

[0003] 食用菌菌种保藏方法主要有液氮低温保藏法、斜面定期移植法、液体石蜡法、砂土管保藏法以及自然基质宝藏法等，液氮低温保藏法是目前比较先进的一种方法，但费用较高，无法普及应用在工厂化生产中，目前在工厂化生产中，一般是以 PDA 培养基进行试管培养，放置于 4℃冰箱中，每 90 天进行一次继代培养，其菌种的保藏期一般为 1-2 年，存在着培养基成本高、栽培周期长、品质差、污染率高等问题，因此迫切需要一种简单有效的菌种保藏方法，在有效保持菌种性状的前提下，还可以使用较长时间。

发明内容

[0004] 有鉴于此，本发明旨在提出一种简单有效、保藏期长、成本低的真姬菇菌种的保藏方法，避免现有的保藏方法成本高等缺点。

[0005] 为达到上述目的，本发明的技术方案是这样实现的：一种真姬菇菌种的保藏方法，包括培养基的混合、培养基灭菌、菌种接种、菌种培养、菌种继代过程，所述菌种保藏培养基配方的重量百分比为：木屑 20-25％、米糠 10-15％、水 65％，所述木屑、米糠均为干重重量的百分比，将上述组分按比例混合均匀进行配制培养基，将配制好的培养基放入灭菌装置中进行灭菌，将真姬菇菌种接种到灭菌的培养基上进行培养，每 30-35 天进行一次继代，即每 30-35 天将菌种再接种到配制好的上述菌种培养基上进行继代培养，重复循环菌种的继代培养过程。

[0006] 作为优选的，所述木屑包括杨木木屑和松木木屑，其中杨木木屑占木屑总干重比例的 30％ -50％，松木木屑占木屑总干重比例的 50％ -70％。

[0007] 作为更优选的，所述培养基配方的重量百分比为：木屑 22％、米糠 13％、水 65％，其中所述木屑、米糠重量百分比均为干重重量的百分比。

[0008] 作为优选的，所述培养基配方的重量百分比为：木屑 20-25％、米糠 10-15％、水 65％，其中所述木屑、米糠重量百分比均为干重重量的百分比。

[0009] 作为更优选的，所述木屑包括杨木木屑和松木木屑，所述杨木木屑占总干重比例的 48％，所述松木木屑占木屑总干重比例的 52％。

[0010] 作为优选的，所述培养基灭菌过程为：首先 95℃灭菌 55-65 分钟，然后 105℃灭菌 25-35 分钟，之后 121℃灭菌 40-60 分钟，最后焖置 80-100 分钟。

[0011] 作为更优选的，所述培养基灭菌过程为：首先 95℃灭菌 60 分钟，然后 105℃灭菌 30 分钟，之后 121℃灭菌 50 分钟，最后焖置 90 分钟。

[0012] 作为优选的，所述菌种接种过程的接种条件为将灭菌后的培养基冷却至 18-22℃，然后在无菌环境下进行接种。

[0013] 作为更有选的，所述真姬菇菌种的生长环境为：温度为 20-22℃，湿度为 60-70％，二氧化碳浓度为 1500-2500ppm，在实际生产中，二氧化碳浓度为 2000ppm 是最优方案。

[0014] 继代培养是对来自于外植体所增殖的培养物（包括细胞、组织或其切段）通过更换新鲜培养基及不断切割或分离，进行连续多代的培养。

[0015] 本发明具有的优点和积极效果是：与现有技术相比，本发明的保藏方法的原材料价格便宜，易于购买，储存方便，菌种保藏期长，利用此保藏方法保藏的菌种可连续使用 10-20 年，且菌种性状稳定，采用此法所培养的真姬菇菌种生产周期短，菌丝长势旺盛，活力强，接种到栽培料后，定植快，污染率低，不易老化。

具体实施方式

[0016] 实施例一

[0017] 培养基配制：培养基配方的重量百分比为：木屑 22％、米糠 13％、水 65％，其中木屑、米糠的重量百分比均为干重重量百分比，杨木木屑占木屑总干重比例的 40％，松木木屑占木屑总干重比例的 60％，将上述组分按比例进行配制培养基，首先将杨木木屑、松木木屑、米糠加入拌料锅中；搅拌 30-40 分钟混合均匀，然后按照配方含水比例进行加水，继续搅拌至拌料锅中培养料含水量一致。

[0018] 培养基灭菌：将配制好的培养基装入培养瓶中，选取 200 瓶进行试验，将培养基放入灭菌装置中进行灭菌，首先 95℃灭菌 60 分钟，然后 105℃灭菌 30 分钟，之后 121℃灭菌 50 分钟，最后焖置 90 分钟。

[0019] 菌种接种：将灭菌后的培养基冷却至 18-22℃，将冷却后的培养基放置于超净工作台上，将真姬菇菌种接种到灭菌的培养基上。

[0020] 菌种培养环境：将接种后的真姬菇菌种放置于培养室，培养室温度为 20-22℃，湿度为 60-70％，二氧化碳浓度为 2000ppm，培养时间为 30 天。

[0021] 菌种继代：将培养后的菌种在无菌环境下再接种到灭菌后的培养基中，每 30 天进行一次继代培养，重复循环，菌种性状可保持 10 年不退化。

[0022] 用此菌种进行工厂化生产，可直接进行定植，定植后污染率为 0.3％。

[0023] 对比例

[0024] 培养基的配制：PDA 培养基配方百分比如下：土豆 17％，葡萄糖 1.6％，琼脂 1.4％，水 80％，按培养基配方比例逐一称取，将土豆切成小块放入器皿中然后加水，在加热器上加热至沸腾，维持 20-30 分钟，用纱布在量杯上进行过滤，过滤后再补充水分至所需量，用 10％的 NaOH 或 HCl 进行调节 pH 值至 6-7，加入葡萄糖、琼脂进行加热，并用玻棒不断搅拌，待琼脂完全溶解后，再补充水分至所需量，将配制的培养基分装入试管内，分装量约为试管高度的 1/5，分装数量为 200 个。

[0025] 培养基灭菌：在 104kPa 压力下灭菌 20-30 分钟。

[0026] 菌种接种：待灭菌后的培养基冷却至 18-22℃，将冷却后的试管培养基放置于超

净工作台上，将真姬菇菌种接种到灭菌的试管培养基上。

[0027] 菌种培养环境：将接种后的试管倾斜放置于4℃冰箱中进行培养，培养时间为90天。

[0028] 菌种继代培养：将培养后的菌种在无菌环境下再接种到PDA培养基中。每90天进行一次继代培养，重复循环。

[0029] 用此保藏方法保藏的菌种进行工厂化生产，定植后污染率为1％。

[0030] 效果试验

[0031] 分别选取实施例一和对比例中的200瓶菌种作为效果试验，通过表1可以看出，实施例一在第2年的出菇率为89％，保持了较高的出菇率，实施例一在第10年的出菇率为46.8％，从第10年开始退化现象严重。

[0032] 对比例在第2年的出菇率为35％，菌种出现了严重的退化现象，需要重新购买菌种进行后续生产。

[0033] 通过比较可以看出，用实施例一的方法制备的菌种培养基及保藏方法可以维持10年以上的使用，为大规模的工厂化生产节约了成本。

[0034] 表1 实施例一与对比例的出菇率比较

[0035]

时间	出菇率（%）	
	实施例一	对比例
第1年	95%	61.4%
第2年	89%	35%
第5年	71.2%	-
第10年	46.8%	-

[0036] 以上对本发明的实施例进行了详细说明，但所述内容仅为本发明的较佳实施例，不能被认为用于限定本发明的实施范围。凡依本发明申请范围所作的均等变化与改进等，均应仍归属于本发明的专利涵盖范围之内。