



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115584323 A

(43) 申请公布日 2023.01.10

(21) 申请号 202211309369.1

C12Q 1/04 (2006.01)

(22) 申请日 2022.10.25

C12R 1/645 (2006.01)

(71) 申请人 辽宁省微生物科学研究所

地址 122000 辽宁省朝阳市朝阳县柳城街
道四段820号

申请人 辽宁蘑磨达食用菌科技有限公司

(72) 发明人 陈飞 王建民 池景良 苏明礼
韩冰 章瀚天 于广峰 冀宝营
陈顺

(74) 专利代理机构 北京中知星原知识产权代理
事务所(普通合伙) 11868

专利代理师 艾变开

(51) Int.Cl.

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种红托竹荪菌种快速分离培养基的制备
方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及红托竹荪菌种生产培养技术领域,具体而言,涉及一种红托竹荪菌种的分离方法以及红托竹荪菌种的生产方法。本发明采用了特定的分离培养基,可以增加红托竹荪菌种基内菌丝直径,提高红托竹荪组织分离菌种过程菌丝萌发和生长速度,缩短分离时间、提高效率。还可以在培养过程中通过观察培养基上菌落的透明圈,确定菌种产酶情况,在保证菌种代谢酶系完整的同时,避免了菌种的老化,保证了菌种的质量,实现了菌种的快速分离,保证了后续的生产需求。



1. 红托竹荪菌种的分离方法,其特征在于,包括以下步骤:

将红托竹荪的竹荪蛋内的白色菌柄(裙)组织接种至灭菌后的分离培养基上,封闭后进行分离培养;

其中,每1000mL所述分离培养基中,包括以下组份:由200~250g土豆提取得到的土豆提取液,葡萄糖20~25g,琼脂20~25g和谷物粉5~10g;

所述谷物粉包括麦芽粉和玉米粉;

所述土豆提取液的制备方法,包括:

(a) 将木屑浸泡在蒸馏水中,浸泡后去除木屑,得到木屑浸泡水;

(b) 将所述木屑浸泡水与土豆混合后煮沸,过滤后得到所述土豆提取液。

2. 根据权利要求1所述的红托竹荪菌种的分离方法,其特征在于,所述谷物粉由所述玉米粉和所述麦芽粉组成,所述玉米粉与所述麦芽粉的质量比为1~1.2:1。

3. 根据权利要求1所述的红托竹荪菌种的分离方法,其特征在于,所述白色菌柄(裙)组织的表面尺寸为(0.5~0.8) cm×(0.5~0.8) cm。

4. 根据权利要求1所述的红托竹荪菌种的分离方法,其特征在于,所述分离培养的条件为:在22~26℃下进行所述分离培养。

5. 根据权利要求1所述的红托竹荪菌种的分离方法,其特征在于,在步骤(a)中,所述木屑与所述蒸馏水的质量比为1:1.0~1.2。

6. 根据权利要求1所述的红托竹荪菌种的分离方法,其特征在于,在步骤(a)中,所述浸泡的时间为4~6小时;

优选地,所述浸泡的过程中煮沸所述木屑浸泡水。

7. 根据权利要求1所述的红托竹荪菌种的分离方法,其特征在于,在步骤(b)中,所述煮沸的时间为20~30分钟。

8. 根据权利要求1所述的红托竹荪菌种的分离方法,其特征在于,所述分离培养基的制备方法,具体包括以下步骤:

将煮沸后分离得到的所述土豆提取液补足至1000mL,加入葡萄糖、琼脂粉、麦芽粉和玉米粉,加热将所述琼脂粉融化后灭菌,得到所述分离培养基。

9. 红托竹荪菌种的生产方法,包括如权利要求1-8任一项所述的红托竹荪菌种的分离方法,其特征在于,将分离得到的红托竹荪菌种接种至灭菌后的生产培养基上进行生长。

10. 根据权利要求9所述的红托竹荪菌种的生产方法,其特征在于,所述生产培养基包括浸泡后的木屑70~75份,麸皮15~20份,麦芽粉3~8份和玉米粉3~8份。

一种红托竹荪菌种快速分离培养基的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及红托竹荪菌种生产培养技术领域,具体而言,涉及一种红托竹荪菌种的分离方法以及红托竹荪菌种的生产方法。

背景技术

[0002] 红托竹荪 (*Dictyophora rubrovoluta*) 属真菌界、担子菌亚门 (*Basidiomycotina*)、腹菌纲 (*Gasteromycetes*)、鬼笔目 (*Phallales*)、鬼笔科 (*Phallaceae*)、竹荪属 (*Dictyophora*),是一种名贵食药两用的真菌。红托竹荪子实体和竹荪蛋中富含大量的氨基酸、蛋白质、维生素等营养物质,还具有抗氧化和抗糖化、抗肿瘤、降血糖和抗衰老、抗疲劳和免疫调节等生物活性。因其口感清鲜脆嫩、风味独特、营养丰富,受到了大众的喜爱。

[0003] 随着红托竹荪需求的扩大,提高产量和提升品质成为红托竹荪产业面临的主要问题,而分离筛选高产量高品质的红托竹荪菌种是解决问题的有效方法。现阶段红托竹荪菌种的分离筛选主要是从竹荪蛋中挑取组织块培养获得。组织分离获得菌种具有方法简单,得到的菌种能基本保持原来菌株的优良特性,后代不易发生变异等优点,但由于红托竹荪菌种菌丝生长缓慢,造成菌种生产周期长、菌丝老化、代谢酶系缺失、菌丝一致性差、成本高、污染率高等问题。

[0004] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明的第一目的在于提供一种红托竹荪菌种的分离方法,采用了特定的分离培养基,可以增加红托竹荪菌种基内菌丝直径,提高红托竹荪组织分离菌种过程菌丝萌发和生长速度,缩短分离时间、提高效率。还可以在培养过程中通过观察培养基上菌落的透明圈,确定菌种产酶情况,在保证菌种代谢酶系完整的同时,避免了菌种的老化,保证了菌种的质量,实现了菌种的快速分离。

[0006] 本发明的第二目的在于提供一种红托竹荪菌种的生产方法,采用所述红托竹荪菌种的分离方法分离得到的高质量菌种,提高生产质量,缩短红托竹荪菌的繁殖周期。

[0007] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0008] 本发明所提供的红托竹荪菌种的分离方法,包括以下步骤:

[0009] 将红托竹荪菌的竹荪蛋内的白色菌柄(裙)组织接种至灭菌后的分离培养基上,封闭后进行分离培养;

[0010] 其中,每1000mL所述分离培养基中,包括以下组份:由200~250g土豆提取得到的土豆提取液,葡萄糖20~25g,琼脂20~25g和谷物粉5~10g;

[0011] 所述谷物粉包括麦芽粉和玉米粉;

[0012] 所述土豆提取液的制备方法,包括:

[0013] (a) 将木屑浸泡在蒸馏水中,浸泡后去除木屑,得到木屑浸泡水;

[0014] (b) 将所述木屑浸泡水与土豆混合后煮沸,过滤后得到所述土豆提取液。

[0015] 本发明所提供的红托竹荪菌种的分离方法,采用了特定的分离培养基,可以增加红托竹荪菌种基内菌丝直径,提高红托竹荪组织分离菌种过程菌丝萌发和生长速度,缩短分离时间、提高效率,实现了菌种的快速分离。

[0016] 优选地,所述谷物粉由所述玉米粉和所述麦芽粉组成,所述玉米粉与所述麦芽粉的质量比为1~1.2:1。

[0017] 优选地,所述白色菌裙组织的表面尺寸为(0.5~0.8) cm×(0.5~0.8) cm。

[0018] 优选地,所述分离培养的条件为:在22~26℃下进行所述分离培养。

[0019] 优选地,在步骤(a)中,所述木屑与所述蒸馏水的质量比为1:1.0~1.2。

[0020] 优选地,在步骤(a)中,所述浸泡的时间为4~6小时。

[0021] 优选地,所述浸泡的过程中煮沸所述木屑浸泡水。

[0022] 优选地,在步骤(b)中,所述煮沸的时间为20~30分钟。

[0023] 优选地,所述分离培养基的制备方法,具体包括以下步骤:

[0024] 将煮沸后分离得到的所述土豆提取液补足至1000mL,加入葡萄糖、琼脂粉、麦芽粉和玉米粉,加热将所述琼脂粉融化后灭菌,得到所述分离培养基。

[0025] 本发明所提供的红托竹荪菌的生产方法,将分离得到的红托竹荪菌种接种至灭菌后的生产培养基上进行生长。

[0026] 优选地,所述生产培养基包括浸泡后的木屑70~75份,麸皮15~20份,麦芽粉3~8份和玉米粉3~8份。

[0027] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0028] (1) 本发明所提供的红托竹荪菌种的分离方法,采用了特定的分离培养基,可以增加红托竹荪菌种基内菌丝直径,提高红托竹荪组织分离菌种过程菌丝萌发和生长速度,缩短分离时间、提高效率,实现了菌种的快速分离。

[0029] (2) 本发明分离培养基将配制用水改为木屑浸泡水进行培养基的配置,同时添加麦芽粉和玉米粉,不仅满足红托竹荪菌种对木质素、纤维素需求,还丰富了红托竹荪菌种所需的营养,缩短了生长时间,提高了菌种生长速度。

[0030] (3) 本发明所提供的红托竹荪菌种的分离方法,可通过观察培养基透明圈的情况确定菌种产酶的情况,在保证菌种代谢酶系完整的同时,避免了菌种老化,保证了菌种的质量,有利于后续的红托竹荪菌的批量生产。

[0031] (4) 本发明所提供的红托竹荪菌的生产方法,采用所述红托竹荪菌种的分离方法分离得到的高质量菌种,提高木屑菌种生长速度,提高生产质量,减少木屑菌种生产步骤,缩短菌种的生产周期。

附图说明

[0032] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0033] 图1为本发明实施例1所提供的菌落生长的照片;

[0034] 图2为本发明对比例1所提供的菌落生长的照片；

[0035] 图3为试验例3中实施例5和对比例2的菌丝生长的照片。

具体实施方式

[0036] 下面将结合附图和具体实施方式对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,但是本领域技术人员将会理解,下列所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例,仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0037] 本发明所提供的红托竹荪菌种的分离方法,包括以下步骤:

[0038] 将红托竹荪菌的竹荪蛋内的白色菌柄(裙)组织接种至灭菌后的分离培养基上,封闭后进行分离培养;

[0039] 其中,每1000mL所述分离培养基中,包括以下组份:由200~250g土豆提取得到的土豆提取液,葡萄糖20~25g,琼脂20~25g和谷物粉5~10g;

[0040] 所述谷物粉包括麦芽粉和玉米粉;

[0041] 所述土豆提取液的制备方法,包括:

[0042] (a) 将木屑浸泡在蒸馏水中,浸泡后去除木屑,得到木屑浸泡水;

[0043] (b) 将所述木屑浸泡水与土豆混合后煮沸,过滤后得到所述土豆提取液。

[0044] 本发明将传统PDA固体培养基配制用水改为木屑浸泡水进行配制,同时添加麦芽粉和玉米粉,并且通过所述成分的合理搭配,可以合理提供红托竹荪菌生长所需营养。可以增加红托竹荪菌种基内菌丝直径,提高红托竹荪组织分离菌种过程菌丝萌发和生长速度,缩短分离时间、提高效率,实现红托竹荪菌种的快速分离。

[0045] 其中,每1000mL所述分离培养基是指琼脂粉固化前的液体体积。

[0046] 一优选的实施方式中,白色菌柄(裙)组织经过消毒处理,优选地,可以采用酒精对所述白色菌柄(裙)组织进行擦拭。

[0047] 一优选的实施方式中,所述谷物粉由所述玉米粉和所述麦芽粉组成,并且所述玉米粉与所述麦芽粉的质量比为1~1.2:1,包括1:1、1.1:1和1.2:1,但是不限于此。

[0048] 一优选的实施方式中,所述白色菌裙组织的表面尺寸为(0.5~0.8)cm×(0.5~0.8)cm,例如0.5×0.5cm、0.6×0.8cm、0.8×0.8cm、0.8×0.7cm,但不限于此。进一步地,厚度可以在0.3~0.5cm之间。

[0049] 一优选的实施方式中,所述白色菌柄(裙)组织的数量可以是1个或多个,例如2个,3个,4个,5个。

[0050] 一优选的实施方式中,所述分离培养的条件为:在22~26℃下进行所述分离培养,进一步地,采用避光培养。

[0051] 一优选的实施方式中,在步骤(a)中,所述木屑与所述蒸馏水的质量比为1:1.0~1.2,所述浸泡的时间为4~6小时,浸泡充分,可以使水中富含木屑中的营养。还可以在浸泡的过程中煮沸所述木屑浸泡水,促进木屑中的营养溶入水中。

[0052] 一优选的实施方式中,在步骤(b)中,所述煮沸的时间为20~30分钟。

[0053] 一优选的实施方式中,所述分离培养基的制备方法,具体包括以下步骤:

[0054] 将煮沸后分离得到的所述土豆提取液补足至1000mL,加入葡萄糖、琼脂粉、麦芽粉和玉米粉,加热将所述琼脂粉融化后灭菌,得到所述分离培养基。

[0055] 该培养基可以在培养过程中通过观察培养基上菌落的透明圈,确定菌种产酶情况,在保证菌种代谢酶系完整的同时,避免了菌种的老化,保证了菌种的质量。

[0056] 本发明所提供的红托竹荪菌种的生产方法,将分离得到的红托竹荪菌种接种至灭菌后的生产培养基上进行生长。

[0057] 一优选的实施方式中,所述生产培养基包括浸泡后的木屑70~75份,麸皮15~20份,麦芽粉3~8份和玉米粉3~8份。

[0058] 实施例1

[0059] 本实施例采用以下培养基对红托竹荪菌的竹荪蛋内的白色菌柄(裙)组织进行分离培养:

[0060] (1)取大小为(0.3~0.5)cm×(0.3~0.5)cm的木屑,按照木屑:蒸馏的质量比为1:1.2加入蒸馏水,浸泡6时,将木屑过滤,得到木屑浸泡水;

[0061] (2)取200g土豆切片后加入(1)中的木屑浸泡水1000mL煮沸30min,过滤取滤液补足至1000mL,加入20g葡萄糖、20g琼脂粉、5g麦芽粉和5g玉米粉,小火加热至琼脂粉融化后装入500mL三角瓶中,装量为300mL/瓶,121℃灭菌,得到分离培养基;

[0062] (3)将灭菌后的本发明制备的培养基分装至90mm×90mm培养皿中,20mL/个平皿,凝固后,备用;

[0063] (4)取竹蛋,在无菌条件下,用灭菌器具取(0.5~0.8)cm×(0.5~0.8)cm竹蛋内白色组织,接种于(3)制备的培养皿中,每个培养皿接种3个组织块,3个接种点呈等边三角形,接种点距离培养皿边缘0.8~1.0cm;

[0064] (5)在25℃下进行培养。

[0065] 实施例2

[0066] 实施例2与实施例1的接种和培养条件相同,不同的是分离培养基的组成为:

[0067] 取250g土豆切片后加入(1)中的木屑浸泡水1000mL煮沸20min,过滤取滤液补足至1000mL,加入25g葡萄糖、25g琼脂粉、4g麦芽粉和4.8g玉米粉,小火加热至琼脂粉融化后装入500mL三角瓶中,装量为300mL/瓶,121℃灭菌,得到分离培养基。

[0068] 实施例3

[0069] 实施例3与实施例1的接种和培养条件相同,不同的是分离培养基的组成为:

[0070] 取200g土豆切片后加入(1)中的木屑浸泡水1000mL煮沸20min,过滤取滤液补足至1000mL,加入22g葡萄糖、23g琼脂粉、3g麦芽粉和3g玉米粉,小火加热至琼脂粉融化后装入500mL三角瓶中,装量为300mL/瓶,121℃灭菌,得到分离培养基。

[0071] 实施例4

[0072] 实施例4与实施例1的分离培养基组分相同,不同的是步骤(4)的培养温度为22℃。

[0073] 实施例5

[0074] 实施例5采用实施例1得到的菌种进行生产培养,具体包括:

[0075] (a)将步骤(1)中浸泡后的木屑75g、麸皮15g、麦芽粉5g、玉米粉5g,配制红托竹荪菌种的生产培养基,培养基含水量60%~65%;

[0076] (b) 将实施例1得到的菌种接种至(a)中的培养基中,每个培养皿3个菌落分别接种于3个菌种瓶接种口内,接种后,用接种口周边生产培养基覆盖接种口,在25℃下培养。

[0077] 对比例1

[0078] 对比例1与实施例1的接种和培养条件相同,不同的是分离培养的培养基使用现有PDA培养基:

[0079] 包括:土豆200克,葡萄糖20克,琼脂粉20克和蒸馏水1000毫升。

[0080] 对比例2

[0081] 对比例2与实施例5的使用的生产培养基相同,但是菌种采用对比例1中得到的菌种,接种条件和培养条件也同实施例5。

[0082] 试验例1

[0083] 对实施例1和对比例1的菌丝进行观察,培养36天,显微测定基内菌丝直径,结果如表1所示。

[0084] 表1显微测定基内菌丝直径的测试结果

编号	基内菌丝直径 (μm)				平均值(μm)
	1	2	3	4	
[0085] 对比例 1	14.90	10.37	14.92	14.67	13.72
实施例 1	24.25	18.07	24.60	24.33	22.81

[0086] 实验结果表明,经过相同时间的培养,本发明所提供的分离方法培养的菌落的菌丝直径相较于对比例1提高了66.25%,可以快速增长,满足其生长需求。

[0087] 试验例2

[0088] 测定实施例1和对比例1的生长速度,结果如表2所示。

[0089] 表2平皿培养生长速度测试结果

编号	对比例 1 (mm)	实施例 1 (mm)	培养时间 (d)
1	14.04	11.76	36
2	6.27	9.27	36
3	11.89	12.92	36
4	9.93	9.29	36
[0090] 5	6.59	10.93	36
6	6.75	9.39	36
7	6.04	13.27	36
8	5.90	9.90	36
9	10.3	10.78	36

[0091]	10	4.41	10.70	36
	11	5.97	10.77	36
	12	8.61	9.91	36
	平均值 (mm/d)	0.2238	0.2984	-

[0092] 实验结果表明,经过相同时间的培养,本发明所提供的分离方法培养的菌落的菌丝生长速度相较于对比例1提高了33.48%,可以快速增长,满足其生长需求。

[0093] 另外,通过图1和图2照片的对比,本申请实施例1所提供的分离方法得到的菌落,周末具有明显的透明圈,证明此时,菌落生长的既快,又保持了菌种酶系完整性,并且还可以根据透明圈的大小判断酶的活性,为后续的生产步骤提供高质量的菌种。而图2中采用PDA培养基培养的菌种,未见明显透明圈,生长速度慢,菌种代谢活性差。

[0094] 试验例3

[0095] 对比实施例5和对比例2,对比结果照片如图3所示,左边为对比例2中的菌丝生长情况,右边为实施例5的菌丝生长情况。显然,本发明人所提供的分离方法得到的菌种,生长速度更快,具体对比其生长速度,生长速度测定结果如表3所示。

[0096] 表3生产培养基中菌丝的生长速度测试结果

编号	生长日期	天数	生长速度					合计	数值	平均值	生长速度 (cm/d)	平均生长速度 (cm/d)
			1	2	3	4	5					
[0097] 对 比 例 2	3.4-4.25	55	3.40	4.20	2.30	0.00	0.00	9.90	5.00	1.98	0.04	0.06
	4.18-4.25	8	0.90	1.10	0.00	0.00	0.00	2.00	5.00	0.40	0.05	
	4.25-5.2	10	1.50	1.30	1.60	0.00	0.00	4.40	5.00	0.88	0.09	
实	3.4-4.25	55	5.40	4.80	3.20	3.90	2.40	19.70	5.00	3.94	0.07	0.13
[0098] 施 例 5	4.18-4.25	8	1.90	1.30	1.00	1.00	1.00	6.20	5.00	1.24	0.16	
	4.25-5.2	10	2.00	1.90	1.70	1.40	1.30	8.30	5.00	1.66	0.17	

[0099] 结果表明,本申请所提供的分离方法的得到菌落与对比例1所提供的菌落在同样的培养基下进行生产培养,由于本申请所提供的分离方法的得到菌落生长速度快、酶活性高,其生长速度较对比例提高116.67%

[0100] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明,然而应意识到,以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;本领域的普通技术人员应当理解:在不背离本发明的精神和范围的情况下,可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围;因此,这意味着在所附权利要求中包括属于本发明

范围内的所有这些替换和修改。

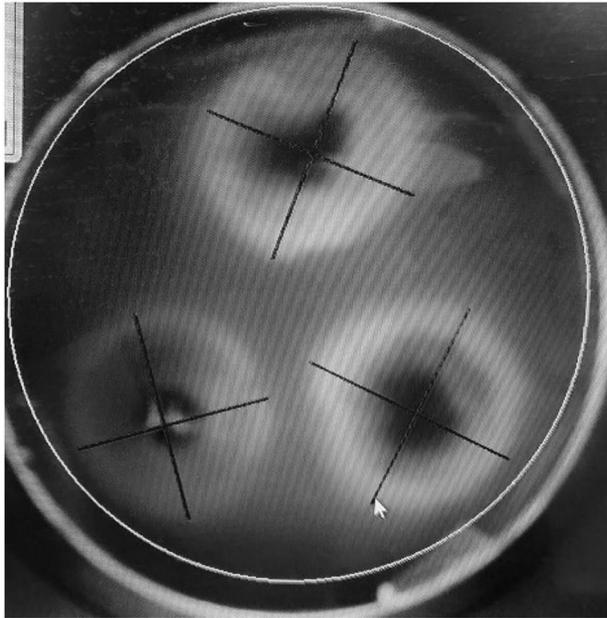


图1

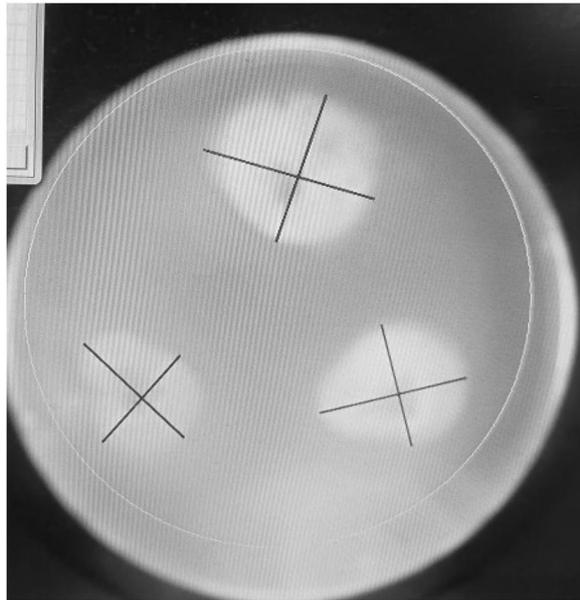


图2



图3