3708

db 3708

ICS 65.020.20

CCS B 05

济宁市地方标准

发 布

济宁市市场监督管理局

20XX-XX-XX实施

20XX-XX-XX发布

液体菌种生产技术规程 第1部分：真姬菇

Production technical code of liquid spawn

——Part 1：hypsizygus marmoreus

DB 3708/Txxxx-xxxx

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由济宁市农业农村局提出、归口并组织实施。

引 言

食用菌是可食用的大型真菌的统称，如真姬菇、香菇、木耳、金针菇等。食用菌栽培使用的菌种是人工培育的纯菌丝体及其培养基的混合体，根据不同的培养基质又可分为固体菌种和液体菌种。不同食用菌的生物学特性不同，菌种生产条件差异较大，单一文件不能涵盖所有食用菌种类，为了规范我市食用菌液体菌种生产和使用，确保我市食用菌生产持续健康发展，特制定液体菌种生产技术系列规程，本文件为该系列规程的第一部分。

液体菌种生产技术规程　第1部分：真姬菇

1. 范围

本文件规定了真姬菇液体菌种生产的人员要求、生产环境、生产设施与设备、生产技术要求、液体菌种质量要求、菌种保存、生产档案等要求。

本文件适用于真姬菇液体菌种的制备。

1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 150（所有部分）　压力容器

GB 3095　环境空气质量标准

GB 5749　生活饮用水卫生标准

GB/T 12728-2006　食用菌术语

GB 19298　食品安全国家标准　包装饮用水

GB 50073　洁净厂房设计规范(附条文说明）

NY/T 528　食用菌菌种生产技术规程

NY/T 1846　食用菌菌种检验规程

1. 术语和定义

GB/T 12728界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

真姬菇　hypsizygus marmoreus

属担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、白蘑科、玉蕈属，外形美观，质地脆嫩，味道鲜美，具有海蟹味，又名玉蕈、斑玉蕈。目前我国市场上有“蟹味菇”“白玉菇”“海鲜菇”3个品系。

母种　stock culture

经各种方法选育得到的具有结实性的菌丝体纯培养物及其继代培养物，也称一级种、试管种。

[来源：GB/T 12728-2006，2.5.7]

液体菌种　liquid spawn

在摇瓶和发酵罐中通过液体发酵技术生产的液体形态的食用菌菌种。

空气压缩机　air compressor

为液体菌种生产提供压缩空气的设备。

空气过滤系统　air filtration system

对液体菌种生产所用空气中的油、水、杂质和杂菌等进行过滤，达到无菌洁净要求的设备，一般包括冷冻干燥机、吸附式干燥机、过滤器等。

罐压tank pressure

液体菌种生产过程中发酵罐内保持的空气压力，单位：MPa。

通气率aeration rate

液体菌种培养过程中每分钟通入发酵罐中无菌空气体积与实际发酵液体积的比值。用 vvm（每分钟通入无菌空气体积/发酵液体积）表示。

接种量　inoculation amount

接入的菌种体积与培养基体积的比值，用%表示。

液体菌种菌龄　cell age of liquid spawn

菌种接入培养基开始计算的液体菌种培养时间，用d表示。

发酵罐空消　sterilization for empty fermenter

对尚未加培养基的空发酵罐进行高压蒸汽灭菌。

投料　adding culture medium

将配制好的培养基投放到发酵罐中。

定容　constant volume

培养器中加入培养基后，加水至所要求体积。

发酵罐实消sterilization for fermenter

指对投料后的发酵罐进行高压蒸汽灭菌。

1. 人员要求

工作人员应熟练掌握菌种生产所需的专业技术，并注意保持个人卫生。进入净化车间应穿戴经清洗干净且消毒处理符合进入净化车间要求的工作服、口罩、鞋、帽等。

1. 生产环境
   1. 环境要求

环境空气质量应符合GB 3095要求。配制培养基用水宜使用纯净水，纯净水应符合GB 19298要求。其他生产用水应符合GB 5749要求。

* 1. 生产场地、厂房设置和布局

生产场地、厂房设置和布局应符合NY/T 528的要求。增设摇瓶菌种培养室、发酵罐菌种培养室。净化车间应符合GB 50073的要求。

1. 生产设施与设备

生产应具备NY/T 528 规定的相关设施设备，还应增加摇床、发酵罐系统。压力容器应使用经有资质部门生产与检验的安全合格产品，符合GB/T 150（所有部分）的规定。

1. 生产技术要求
   1. 工艺流程

真姬菇液体菌种生产工艺见图1。

母种培养基

无菌空气

摇瓶菌种

母种

原料

发酵罐培养基

液体菌种

保藏菌种

原料

摇瓶培养基

原料

配制

配制

配制

图１　真姬菇液体菌种生产工艺流程

* 1. 品种选择

从具有相应资质的供种单位引种，且种性清楚。引种后应进行适应性出菇试验验证，选用高产、优质、抗逆性强的真姬菇品种。

* 1. 母种生产
     1. 容器

使用18 mm×180 mm或20 mm×200 mm玻璃试管，试管应保持清洁、干燥。试管塞为棉塞（梳棉或化纤棉）或硅胶塞。

* + 1. 培养基配方

马铃薯200 g/L（煮汁），麦麸20 g/L（煮汁），葡萄糖20 g/L，酵母浸粉3 g/L，磷酸二氢钾1 g/L，硫酸镁0.5 g/L，琼脂20 g/L，纯净水1000 mL。

* + 1. 培养基配制

以配制1000 mL培养基为例。选无青皮、未发芽的新鲜马铃薯洗净、去皮、去芽眼，切成薄片，加水1000 mL左右，麦麸用纱布包裹，与马铃薯共同煮20 min～30 min，用预湿的4层纱布过滤。取滤液加入20 g琼脂，边煮边搅拌至琼脂全部融化。加入其它配料搅拌溶化，加水定容至1000 mL。趁热分装，装量为试管长度的1/5～1/4，管口不能粘上培养基。

* + 1. 培养基灭菌

将分装好的试管直立放入灭菌锅内，用牛皮纸包住试管塞，锅内留有一定的空隙。检查锅内水位，及时灭菌。压力升到0.05 MPa时，打开放气阀排除冷空气，如此重复一次。压力升至0.1 MPa～0.12 MPa，恒压35 min～40 min。

* + 1. 摆斜面

灭菌结束，自然降压至零。打开锅盖，利用余热烘干试管塞，将试管的一端斜放在1 cm厚的木条上摆出斜面，斜面顶端距试管口不少于50 mm。

* + 1. 接种培养

检查、核对菌种。于消毒后的接种箱或超净工作台上，用经火焰消毒并冷却后的接种针切取（3～5）mm×（3～5）mm的一块母种迅速转接于待接种试管斜面中央，接完种及时贴好标签，置于18 ℃～20 ℃的恒温培养箱内培养。接种后2 d～3 d，观察发菌情况，及时检出杂菌污染、长势不良的试管。一般培养10 d～14 d、菌丝长满斜面后，及时使用或置于0 ℃～4 ℃冰箱中保存。

* + 1. 母种质量要求

菌丝白色、整齐、均匀、无角变、粉孢子少、无杂菌，生活力强，培养基不萎缩。应符合NY/T 1846要求。

* 1. 摇瓶液体菌种生产
     1. 容器

使用1000 mL无色或近无色专用玻璃菌种瓶，瓶塞为棉塞（梳棉或化纤棉）或硅胶塞或专用封口透气膜。

* + 1. 培养基配方

蟹味菇配方：马铃薯200 g/L（煮汁），葡萄糖20 g/L，玉米粉20 g/L，酵母浸粉3 g/L，磷酸二氢钾1 g/L，硫酸镁0.5 g/L，纯净水1000 mL。

海鲜菇配方：马铃薯 200 g/L，葡萄糖 10 g/L，蛋白胨4 g/L，硫酸镁1 g/L，磷酸二氢钾 2 g/L，纯净水1000 mL。

白玉菇配方：蔗糖20 g/L，豆粕粉3 g/L，硫酸镁0.6 g/L，磷酸氢二钾0.25 g/L，磷酸二氢钾0.5 g/L，纯净水1000 mL。

* + 1. 培养基配制

以配制1000 mL培养基为例。蟹味菇、海鲜菇：选无青皮、未发芽的新鲜马铃薯洗净、去皮、去芽眼，切成薄片，加水1000 mL左右，煮20 min～30 min，用预湿的4层纱布过滤、定容至1000 mL。玉米粉提前用温水搅拌均匀，不能有结块，加入滤液中煮沸，再加入其余的原料至溶解。培养基分装入摇瓶中，装液量为摇瓶容量的2/5～3/5，将瓶口用棉塞或硅胶塞或专用透气封口膜封口，并用牛皮纸包扎。白玉菇：按配方比例称取原料加水搅拌均匀，分装入摇瓶中，装液量为摇甁容量的2/5～3/5，将瓶口用棉塞或硅胶塞或专用透气封口膜封口，并用牛皮纸包扎。

* + 1. 灭菌

按7.3.4要求执行。

* + 1. 接种培养

检查、核对菌种。待培养基冷却后于消毒过的接种箱或超净工作台上，用经火焰消毒并冷却后的接种针切取（3～5）mm×（3～5）mm的一块母种迅速转接于待接种摇瓶培养基内，每瓶接种5～6块。接种结束后封口，置摇床上震荡培养，摇床温度控制在21 ℃～22 ℃，震荡频率为150 rpm～180 rpm，培养时间6 d～7 d。

* + 1. 摇瓶液体菌种检验

每日检查菌液颜色、菌球形态和气味，及时检出浑浊、异味、泡沫异常的不合格菌种。

* + 1. 摇瓶菌种质量要求

菌液澄清，不浑浊，无杂菌、无异味；镜检无杂菌、菌丝形态光滑、丰满；菌丝球、菌丝片段密集，静置10 min～15 min，菌丝球体积占比不低于整个菌液的80 %，可结束培养。

* 1. 发酵罐液体菌种生产
     1. 容器

气升式不锈钢发酵罐，体积根据生产规模自定。

* + 1. 发酵罐清洗

发酵罐在每次使用后或再次使用前应彻底清洗后才能投料使用。

* + 1. 发酵罐空消

发酵罐初次使用、出现杂菌、长期放置、更换品种等情况出现其一时，应进行空消灭菌。发酵罐内层及夹层加水至视镜中线，启动加热器加热。首先排完夹层和内层的冷空气，然后关闭所有的阀门升温升压，在温度升至100 ℃、0.05 MPa压力下，打开接种口放气，排放罐内冷空气。当温度达到121 ℃～126 ℃、压力在0.12 MPa～0.15 MPa时，维持40 min。

* + 1. 空气过滤系统检查

使用前，检查空气过滤系统工作是否正常，检查空气滤芯，要求滤芯无油污、无料污、无破损，外壳无污物、无破损。

* + 1. 培养基配方

蔗糖20 g/L，豆粕粉4 g/L，硫酸镁0.5 g/L，磷酸氢二钾1 g/L，消泡剂20 uL/L ~30 uL/L。

* + 1. 培养基配制与投料、定容

按配方称取原料。用温水把豆粕粉搅拌均匀，不能有结块，再加入其它配料，搅拌均匀，通过吸管或漏斗加入罐体，加水定容至所需体积。培养基投料量为罐体总容积的70 %～80 %，最后拧紧上料口盖。

* + 1. 发酵罐实消与培养基灭菌

开启加热器对发酵罐夹层及内层加热，当压力达到0.05 MPa时，打开接种口放冷气至接种口蒸汽变直时关闭接种口，待培养液温度升至95 ℃时，打开气泵对发酵液搅拌2 min，气泵停止通气。当压力达到0.12 MPa～0.15 MPa、温度为121 ℃开始计时，维持40 min。

* + 1. 降温

培养基灭菌完毕，迅速通水降温。降温过程中发酵罐要适当通气。一方面搅拌降温，另一方面加压，使发酵罐维持正压，尽快使培养液温度降至30 ℃以下。

* + 1. 接种

接入摇瓶种子，接种量为0.1 %～0.3 %。将摇瓶接种管和发酵罐接种口用75 %酒精消毒，用95 %酒精的火焰圈套在接种口上，轻微打开呼吸器阀门，使发酵罐压力为0。点燃火焰圈，摇瓶接种管放在火焰上方。用镊子去掉接种管上的牛皮纸和棉塞，将胶管插入接种口，打开接种口阀门，将摇瓶菌种注入发酵罐。关闭接种阀门，然后拔出接种胶管，去掉火焰圈，打开气泵。

* + 1. 培养

培养温度18 ℃～20 ℃。根据菌丝生长情况，通入适量无菌空气，通气量为1:0.8～1:1，使内罐压力稳定在0.01 MPa～0.03 MPa，培养周期为6 d～7 d。

* + 1. 发酵罐液体菌种检测

接种后第4天进行检测。先用酒精火焰球灼烧取样阀30 s～40 s后，弃掉最初流出的50 mL～100 mL液体菌种，然后用酒精火焰封口直接放入经灭菌的三角瓶中，塞紧棉塞，取样后用酒精火焰把取样阀烧干，以免杂菌进入造成污染。

将样品带入接种箱或超净工作台经无菌操作分别划线接于试管斜面或培养皿的培养基上，放入28 ℃恒温培养1 d～3 d，采用显微镜和感官观察菌丝生长状况和有无杂菌污染。若无细菌、酵母菌、霉菌等杂菌菌落生长，则表明该样品无杂菌污染。

* + 1. 发酵罐液体菌种质量要求

按7.4.7要求执行。

1. 菌种保存
   1. 母种

置于2 ℃～4 ℃冰箱中保存，每隔3～5个月转管移接一次。

* 1. 摇甁液体菌种

置于2 ℃～4 ℃冰箱中可保存5 d～7 d。

* 1. 发酵罐液体菌种

发酵罐液体菌种生产好后，应立即进入菌种生产或栽培袋接种使用；不能立即使用时，应在发酵罐内通入无菌空气降温保压处理，保持罐压0.02 MPa～0.04 MPa，液温12 ℃～15 ℃，可保存1 d～2 d。

1. 生产档案

母种、摇瓶液体菌种和发酵罐液体菌种生产的每个环节应有完整详实的生产档案。记录生产投入品、菌种生产、菌种使用、设备状况等内容，留存至少2年。有条件的宜使用电子生产记录。生产档案记录事项见附录A。

2. （规范性）  
   真姬菇液体菌种生产档案记录事项
   1. 生产投入品使用情况

包括以下事项：

1. 名称；
2. 来源；
3. 批次；
4. 用法用量；
5. 使用日期；
6. 使用人。
   1. 菌种生产

包括以下事项：

1. 培养基制作；
2. 高压灭菌；
3. 接种；
4. 培养；
5. 取样；
6. 杂菌发生情况。
   1. 贮存过程及杂菌发生情况
   2. 菌种生产主要设备及工作状况
   3. 生产场所名称、菌种使用日期、 菌棒接种数量、记录人、入档日期

