

斑玉蕈菌种生产技术规程

Technical progress of spawn culture by *Hypsizygus marmoreus*

(征求意见稿)

(本草案完成时间:)

在提交反馈意见时, 请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

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。

本文件由辽宁省农业农村厅提出。

本文件由辽宁省农业农村厅归口。

本文件起草单位：辽宁省农业科学院，沈阳恒生物科技发展有限公司

本文件主要起草人：

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（辽宁省沈阳市和平区太原北街2号），邮编：110001，联系电话：024-23447862。

文件起草单位通讯地址：辽宁省农业科学院（辽宁省沈阳市沈河区东陵路84号），邮编：110001，联系电话：024-31025879。

斑玉蕈菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了斑玉蕈固体和液体菌种生产条件、生产技术、抽样、检测、贮存以及生产记录等内容。本文件适用于斑玉蕈固体和液体菌种的生产。

2 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 5749 生活饮用水卫生标准

GB/T 12728 食用菌术语

GB 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB 4806.7 食品安全国家标准食品 接触用塑料材料及制品

GB 50073 洁净厂房设计规范

NY/T 391 绿色食品 产地环境质量

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程

NY 1731 食用菌菌种良好作业规范

3 术语和定义

GB/T 12728和NY/T 528界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

斑玉蕈 *Hypsizygus marmoreus* (Peck) H. E. Bigelow

又名真姬菇，商品名海鲜菇、蟹味菇、白玉菇等，隶属于担子菌门、伞菌纲、伞菌目、离褶伞科、玉蕈属真菌。子实体丛生，菌盖肉质，初为半球形，灰褐色，盖中央色稍深，有网状龟裂纹，边缘光滑。菌肉淡白色。菌柄白色，空心，骨质脆，中下部膨大。孢子无色，卵形有喙，表面光滑，无纹饰。

4 生产要求

4.1 生产条件

4.1.1 人员要求

具有食用菌菌种生产或检验的从业资格人员。

4.1.2 场地选择

菌种生产场地应符合NY/T 528规定，生产环境应符合NY 1731，生产用水应符合GB 5749。

4.1.3 生产设施与设备

满足食用菌菌种生产的基本需要，布局合理，规模配套，符合NY/T 528规定。接种室、培养室按照GB 50073规定执行。部分场所设施设备应达到如下要求：

- a) 接种室、固体培养室、液体培养室配备调温设施；
- b) 接种室、固体培养室空间洁净度达到万级；液体培养室空间洁净度达到十万级；
- c) 化验室和菌种保藏室具备相应实验检测设备和灭菌设施及常规用具。

4.1.4 原料

所用原料符合NY/T 528要求。液体菌种生产所需生物制剂和天然材料的水不溶性固体物料小于40目。

4.1.5 生产品种

选用经省级以上农作物品种审定委员会审（认）顶或登记（备案），优质、高产、稳定、抗逆性强、商品性号的斑玉蕈品种。从具备相应资质的单位引种。

5 生产技术

5.1 母种制备

5.1.1 培养基配方

马铃薯（去皮煮汁）200 g，葡萄糖20 g，蛋白胨1 g，磷酸二氢钾0.5 g，硫酸镁0.5 g，琼脂粉18~20 g，水定容至1000 mL，pH自然。

5.1.2 菌种接种与培养

母种固体培养按照NY/T 528中规定的PDA培养基配方进行制备。

5.2 摇瓶菌种制备

5.2.1 培养基配方

马铃薯（去皮煮汁）200 g煮汁，葡萄糖20 g，水定容至1000 mL，pH自然。

5.2.2 分装

使用500 mL耐121℃高温的无色玻璃三角瓶，装液量为三角瓶容积的1/3~3/5，放入直径3 mm~4 mm的玻璃珠5粒~8粒，使用棉塞、硅胶塞或透气滤膜封瓶口。

5.2.3 高压灭菌

使用牛皮纸封住分装好的三角瓶瓶口，将三角瓶装入高压蒸汽灭菌锅，在121℃条件下灭菌30 min。灭菌完毕后自然降压，温度降至70℃以下取出培养基移至接种室。

5.2.4 接种

培养基冷却至20℃~25℃时接种。无菌条件下，使用经火焰灼烧灭菌并冷却至室温的接种针挑取8块~10块30 mm³~40 mm³的母种菌块，迅速转接入摇瓶培养基中，封好瓶口，接种完成后贴好标签。

5.2.5 恒温培养

5.2.5.1 培养室消毒

培养室使用前2 d采用臭氧发生器消毒或紫外灯消毒，并用75%酒精擦拭恒温培养箱和恒温震荡摇床。

5.2.5.2 培养条件

将三角瓶放入25℃恒温箱中静置培养1 d，然后置于恒温摇床上培养，温度控制在 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，，转速140 rpm~160 rpm，培养时间8 d~10 d。

5.3 固体菌种生产

枝条菌种是目前广泛应用的固体菌种，由杨木等软质树种加工成枝条，菌丝长入枝条后作为菌种。

5.3.1 枝条浸泡

将枝条浸泡在石灰水中，待水分充分渗入枝条中心后可以使用，防止“夹干”导致灭菌不彻底。

5.3.2 制作木屑料

木屑45%~50%，玉米芯25%~29%，麦麸18%~20%，石灰0.5%~1.0%，含水量63%~65%，pH6.0~6.5。

5.3.3 装袋

将塑料袋装入适量木屑料，避免枝条刺破袋底，再加入枝条，撒上木屑料，尽量使木屑料充满枝条间隙，最后在枝条上面覆盖一层木屑料，套紧颈圈，插入打孔棒，盖上塑料盖。

5.3.4 灭菌

高压灭菌， 121°C 维持2.5 h~3 h。自然降温，取出菌种袋一如预先清洁和消毒的冷却室冷却，冷却至 25°C 时接种。

5.3.5 接种

检查、核对菌种。接种前，接种人员清洗双手，用75%酒精消毒，拿取摇瓶菌种再火焰上方拔掉瓶塞，灼烧瓶口10 s~13 s后将菌种菌袋中，接种量为20 mL~25 mL，酒精灯焰上方2 cm~3 cm灼烧无棉塑料盖封口3 s~5 s后封口，贴标签。

5.3.6 培养

将接种后的菌包移至 $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养室培养50d~60 d，直至长满。

5.4 液体菌种生产

5.4.1 液体培养基制备

配方蔗糖20 g/L，豆粕280 g/L~290 g/L，玉米粉40 g~45 g，硫酸镁48 g~52 g，磷酸二氢钾48 g~52 g。原料符合GB 4789.28中的规定，用水符合GB 5749中的要求。

5.4.2 发酵罐检查及发酵罐空消

具体操作与要求如下：

- 检查液体菌种发酵罐上全部阀门及压力表，要求无损坏并能正常工作；
- 清洗待用发酵罐内壁、用水冲洗安全阀、压力表、罐盖，确保无杂物、无菌皮；

- c) 发酵罐存在初次使用、出现杂菌、长期放置或更换品种等情况任一时，进行发酵罐空消，要求在蒸汽压力 0.12 MPa、温度 121℃条件下灭菌 40 min。

5.4.3 投料定容

使用漏斗通过上料口将原料加入发酵罐中，装液量为罐体容量的60%~70%，加入0.02%~0.03%消泡剂，通入空气搅拌1 min~2 min混合均匀，将罐口擦干后盖上罐盖，拧紧螺丝，再次检查发酵罐各部位安装与连接是否合格。

5.4.4 发酵罐实消

打开蒸汽阀门给发酵罐通蒸汽，罐内温度达到90℃时关闭空气压缩机，继续加热使发酵罐温度达到121℃并保持80 min。

5.4.5 冷却和调压

实消结束后，关闭蒸汽阀门停止加热，开启冷水阀门开始降温，当温度降至110℃、压力降至接近0 Mpa时，打开空气压缩机开关，给发酵罐通入无菌空气，当温度降至25℃时关闭冷却水。

5.4.6 接种

具体操作步骤与要求如下：

- a) 接种前，接种人员清洗双手，用75%酒精消毒；
- b) 关闭室内通风系统，接种结束后再开启；
- c) 调整发酵罐微量进气，保持正压；
- d) 用酒精棉擦拭接种口附近，并用酒精喷灯消毒；
- e) 接种口周围放置酒精棉并点燃，关闭排气阀，打开接种口，拿取摇瓶菌种再火焰上方拔掉瓶塞，灼烧瓶口10 s~13 s后将菌种倒入发酵罐中，接种量为1:1000~2:1000；
- f) 灼烧接种口盖子8 s~10 s后盖好接种口；
- g) 打开排气阀，调整进气量。

5.4.7 培养

罐内换气量1:0.4V/V~1.2V/V（料液体积/空气体积），接种后1 d~2 d内微量进气，3 d后逐渐加大进气量，5 d~6 d后加大进气量，6 d~7 d进气速度不变。罐内温度控制在23℃~25℃，罐压保持在0.03 MPa ~0.05 MPa，搅拌速度140 r/min~160 r/min，培养7 d~8 d。

6 菌种质量检测

6.1 菌丝形态观察

固体菌种菌丝洁白，菌丝生长速度一致。

液体菌种静置10 min后观察，菌球下沉率超过90%，且呈白色，上清液澄清透明，表面无或有少量泡沫，菌球颗粒大小均匀一致、表面菌丝呈刺球状。

6.2 锁状联合观察

从检验样本中挑取少量菌丝，置于载玻片上，做成水封片。在10×20~10×40倍的光学显微镜下，观察锁状联合数量，每一检样应观察不少于50个视野。

6.3 细菌检测

按照GB 4789.28中的规定，接种后置于28℃~30℃恒温培养24 h~48 h，观察是否有细菌污染，同时进行镜检。

6.4 霉菌检测

按照GB 4789.28中的规定，接种后置于23℃~25℃恒温培养48 h~72 h，观察是否有霉菌污染，同时进行镜检和感官检测。

6.5 pH测定

用pH试纸或pH计测定菌液酸碱度，pH在5.0~5.5。

7 贮存

7.1.1 固体菌种贮存

固体菌种培养好后，如不能立即使用，需在3℃~5℃条件下避光贮藏。贮藏时间30 d~90 d。

7.1.2 液体菌种贮存

菌种培养好后应立即使用，如不能立即使用需进行在4℃~10℃条件下避光贮藏。液体菌种在发酵罐内应持续通入无菌空气，保持罐压0.01 MPa~0.03 MPa，存放不超过48 h。

8 记录与档案

母种、摇瓶液体菌种、固体菌种、和发酵罐液体菌种生产的每个环节都要有详实的记录，由具体操作人员现场填写记录，定期由主管领导审核，签字后归档保存，档案应保存3年以上。