

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

DB 21

辽宁省地方标准

DB XX/T XXXX—XXXX

金针菇液体菌种生产技术规程

Technical progress of liquid spawn culture by *Flammulina velutiper*

(征求意见稿)

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。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发布

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。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

本文件起草单位：沈阳恒生生物科技发展有限公司、辽宁省农业科学院食用菌研究所

本文件主要起草人：肖军、黄飏、肇莹、金浩、陈珣、秦红梅、黄竹青、龚娜、郑剑玲、马晓颖、刘国丽、齐贺、刘颖

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：沈阳市康平县辽宁康平经济开发区，邮编：118100，联系电话：024-27345767。

金针菇液体菌种生产技术规程

1 范围

本标准规定了金针菇（*Flammulina velutiper*）液体菌种生产基本要求、液体菌种制备、液体菌种质量指标、贮藏、记录及存档等技术要求。

本标准适用于金针菇液体菌种的生产。

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 150.1 压力容器 第1部分：通用要求

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 5749 食品安全国家标准 生活饮用水卫生标准

GB/T 12728 食品安全国家标准 食用菌术语

GB/T 37671 食品安全国家标准 金针菇菌种

NY/T 528 食品安全国家标准 食用菌菌种生产技术规程

NY/T 1731 食品安全国家标准 食用菌菌种良好作业规范

3 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。

3.1

摇瓶液体菌种 liquid spawn culturing by Erlenmeyer flask on a shaker

由母种转接到液体培养基中在摇床上恒温振荡扩大培养而成的菌丝体纯培养物。

3.2

发酵罐液体菌种 liquid spawn culturing by fermentation tank

由摇瓶液体菌种转接到发酵罐液体培养基中恒温培养而成的菌丝体纯培养物。

3.3

发酵罐 fermentation bioreactor

进行发酵培养的专用设备，也称发酵反应器。

3.4

罐压 pressure of fermentation bioreactor

食用菌液体菌种培养过程中培养器保持的空气压力，单位：Mpa。

3.5

通风量 ventilation volume

液体菌种培养过程中每分钟通入培养基中的无菌空气的量。用V/V（培养基体积/通入空气体积）表示。

3.6

空消 empty fermenter sterilization

利用蒸汽对无物料的发酵罐及附属设备进行加热灭菌的过程。

3.7

实消 intermittent sterilization

将蒸汽通入装有培养基的发酵罐中进行加热灭菌的过程。

4 生产基本要求

4.1 工作人员

具有食用菌菌种生产技术的专业技术人员和检验人员。

4.2 场地

菌种生产场地应符合NY/T 528的规定。环境卫生应符合NY/T 1731的规定。

4.3 厂房

生产厂房应符合NY/T 528 的规定。

4.4 生产设施与设备

设备与设施应符合NY/T 528 的规定。液体种发酵罐质量应符合GB 150.1的规定。

4.5 培养原料

培养基原料应符合NY/T 528 的规定。生产用水标准应符合GB 5749要求。

4.6 生产品种

选用高产、优质、抗逆性强、商品性好的金针菇品种，从具相应资质的供种单位引种或本单位选育，并能清楚地追溯菌种来源。菌种生产过程应符合NY/T 528的要求。

5 液体菌种制备

5.1 母种制备

5.1.1 培养基配方

马铃薯（去皮煮汁）200 g/L，葡萄糖20 g/L，琼脂20 g/L， pH自然。

5.1.2 菌种接种与培养

母种活化操作流程应符合NY/T 528要求。

将保存的母种切割成2 mm~4 mm接种到培养基中，培养温度19 °C~22 °C，避光恒温培养7 d~9 d，菌丝长满试管或者培养皿检验合格即可使用。活化后母种质量应符合GB/T 37671要求。

5.2 摇瓶液体菌种制备

5.2.1 摇瓶液体菌种容器

使用1000 mL的无色或近无色的玻璃三角瓶，用棉塞、硅胶塞、专用封口透气膜封口。

5.2.2 培养基配方

豆粕粉10 g/L，蔗糖25 g/L，硫酸镁0.5 g/L，磷酸二氢钾0.5 g/L，pH自然。

5.2.3 培养基配制

按液体培养基配方配制，混合均匀，装入摇瓶中，装液量为摇瓶容量的50%~60%，摇瓶中放置磁力搅拌棒，封口。

5.2.4 灭菌

将分装好的摇瓶放入高压灭菌锅内，检查锅内水位，立即灭菌。灭菌蒸汽压力升至0.11 MPa~0.12 MPa，恒压维持30 min~40 min。

5.2.5 接种

待培养基冷却至25℃以下，在无菌条件下，用打孔器打孔（5 mm孔径）或接种钩取（5 mm×5 mm）4块活化的母种菌块迅速转接于摇瓶培养基内，封口。

5.2.6 培养

摇瓶接种后移至恒温摇床中，培养温度19℃~22℃，转速150 r/min，避光培养7 d，菌种长满后置于1000 r/min磁力搅拌器上搅拌10 min。

5.2.7 摇瓶液体菌种质量要求

菌丝体白色、分布均匀；菌液澄清透明，无酸、臭、霉等异味，有金针菇特有的香味；镜检无杂菌、菌丝形态正常。

5.3 发酵罐液体菌种制备

5.3.1 容器

使用耐126℃高温的不锈钢发酵罐。

5.3.2 发酵罐清洗

5.3.2.1 检查

罐上全部阀门、安全阀、压力表等要求完好，工作正常。

5.3.2.2 清洗

以流水无死角地清洗罐体内外，达到内壁无任何培养料残余物的洁净程度。滤芯无油污、料污、无破损，外壳洁净。

5.3.3 发酵罐空消

发酵罐初次使用、出现杂菌、长期放置及更换品种时，应进行空消灭菌。蒸气压力0.11 MPa~0.14 MPa，恒压维持40 min。

5.3.4 培养基配方

豆粕粉10 g/L，蔗糖25 g/L，硫酸镁0.5 g/L，磷酸二氢钾0.5 g/L，pH自然。

5.3.5 投料与定容

用温水将5.3.4配方中原料按比例搅拌均匀，加入罐内，加水定容至罐体总容积的70%~80%，然后加入0.01%~0.03%消泡剂，最后拧紧上料口盖。

5.3.6 发酵罐实消

液体种发酵罐内蒸汽压力控制在0.11 MPa~0.12 MPa，恒压维持60 min~90 min。

5.3.7 冷却

灭菌结束后将冷水通入发酵罐夹层或者内置冷却系统中循环，使培养基温度降至22℃~24℃。当罐体压力表压力降至0.05 MPa时，打开气泵以防止罐体在冷却过程中产生负压造成污染。

5.3.8 接种

将发酵罐接种口用75%酒精消毒，用95%酒精的火焰圈套在接种口上，调小进气阀门，使发酵罐罐内压力为0.01 MPa。点燃火焰圈，在火焰保护下用镊子去掉瓶塞，打开接种口阀门，将摇瓶菌种匀速倾倒入发酵罐中，接种量为0.1%~0.2%，接种后迅速关闭接种阀门，去掉火焰圈，继续通入无菌空气。

5.3.9 发酵培养

根据菌丝生长情况，适时调节进气阀门，通入适量无菌空气，通气量一般为1: 0.8 V/V•min~1: 1 V/V•min，同时调节排气阀，维持罐压0.01 MPa~0.02 MPa，培养温度20℃~22℃，培养6 d~7 d。

5.3.10 检测

发酵后第4 d开始定期检测，采用显微镜和感官观察菌丝生长状况和有无杂菌污染。

6 液体菌种质量指标

6.1 感官指标

应符合表1的要求。

表1 金针菇液体菌种感官指标

项目	感官指标
菌液色泽	球状菌丝体呈白色，菌液呈棕色（滤液清澈）
菌液形态	菌液稍粘稠，有大量片状、球状菌丝体悬浮，固形物体积≥80%，菌丝球直径2 mm~3 mm、分布均匀
菌液气味	有金针菇液体培养时特有的香气，无酸、臭、霉、甜等异味，发酵罐排气口气味正常

6.2 理化指标

应符合表2的要求。

表2 金针菇液体菌种理化指标

项目	理化指标
pH 值	5.5~6.0

项目	理化指标
菌丝湿重 (g/L)	≥120
显微镜下菌丝形态观察	菌丝粗壮, 有球状、片状或丛状菌丝体, 可见锁状联合
杂菌菌丝	无

6.3 液体菌种检测方法

6.3.1 形态学观察

通过肉眼观察菌球形态, 通过显微镜观察菌丝体形态。

6.3.2 锁状联合

从检验样本中挑取菌丝少许, 置于洁净的载玻片上做成水封片, 用不低于10×40的光学显微镜对水封片进行观察, 每一检样应观察不少于50个视野。

6.3.3 霉菌检验

按照无菌操作从取样阀取少量培养液, 接种于GB 4789.28中规定的PDA培养基中, 置于28℃~30℃恒温培养48 h~72 h, 采用显微镜和感官观察菌丝生长状况和有无霉菌污染, 必要时进行水封片镜检。

6.3.4 细菌检验

按照无菌操作从取样阀取少量培养液, 接种于GB 4789.28中规定的营养肉汤培养液中, 置于28℃~30℃恒温培养24 h~48 h, 观察是否有细菌污染, 必要时进行镜检和划线培养检验。

6.3.5 pH测定

用pH计或pH试纸测定菌液酸碱度。

6.3.6 菌丝湿重测定

称取一定体积的培养液, 经10000 r/min离心5 min, 称重。

7 贮存

7.1 标签

生产的菌种必须贴有质量合格标签, 其内容包含菌种种类、级别、品种、生产单位、接种日期。

7.2 贮存条件

7.2.1 母种保存

母种在0℃~4℃条件下贮存, 贮存期不超过60 d。

7.2.2 摇瓶菌种保存

摇瓶菌种生产好后, 应立即进入菌种生产, 若不能立即使用时, 需降温保存, 暗光条件下4℃可保存5 d~7 d。

7.2.3 发酵罐液体菌种保存

发酵罐液体菌种生产好后，应立即进入栽培瓶（袋）接种使用，若不能立即使用时，需降温保压处理。在培养器内通入无菌空气，保持罐压0.02 MPa~0.04 MPa，液温6℃~10℃可保存3 d，11℃~15℃可保存2 d。

8 记录与存档

发酵罐液体菌种生产的每个环节都要有详实的生产记录，由具体操作人员现场记录填写，定期由技术主管审核，签字后归档保存，生产记录档案应保留至本批次菌种栽培出菇为止。
