

DB37

山 东 省 地 方 标 准

DB 37/T 3747—2019

金针菇液体菌种生产技术规程

Technical progress of liquid spawn culture by *Flammulina velutiper*

地方标准信息服务平台

2019 - 12 - 05 发布

2020 - 01 - 05 实施

山东省市场监督管理局 发 布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省农业农村厅提出并组织实施。

本标准由山东省农业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：山东农业工程学院、山东省农业技术推广总站、山东益生园菌业有限公司、齐鲁师范学院、济宁市蔬菜工作指导站、金乡食用菌管理办公室、山东常生源菌业有限公司、济宁利马菌业有限公司。

本标准主要起草人：牛贞福、国淑梅、于安军、徐金强、曹健、颜亚男、崔艳秋、周爱国、常猛、张广龙。

地方标准信息服务平台

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*）液体菌种生产环境、厂房设施、生产设备、品种、工艺流程及贮藏等技术要求。

本标准适用于金针菇液体菌种的生产。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 钢制压力容器
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB 50073 洁净厂房设计规范
- NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程
- NY/T 1284 食用菌菌种中杂菌及害虫的检验
- NY 5099 无公害食品 食用菌栽培基质安全技术要求

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

液体菌种 liquid spawn

液体菌种是指在装有液体培养基的容器中，通过控制温度、不断通气搅拌或振荡，使菌丝短期内在液体中繁育并获得的大量菌丝体片段或菌丝球。

3.2

食用菌液体菌种培养器 cultivation apparatus for edible fungus liquid spawn

也称液体菌种培养罐，是指进行食用菌液体菌种培养的专用设备，包括固定式和可移动式两种类型。要求不锈钢材质，符合GB 150钢制压力容器标准。

3.3

食用菌液体菌种接种器 edible fungus-liquid interface trap inoculators

指能将液体菌种从培养器中按无菌操作要求转接到食用菌固体培养基物料上的设备。

4 技术要求

4.1 技术人员

具有食用菌菌种生产或检验人员从业资格证的专业技术人员。

4.2 生产环境

4.2.1 基本要求

空气优良、地势高燥、交通方便、通风良好、水源电源充足、排水畅通，其中水源应符合GB 5749的规定。

4.2.2 环境卫生要求

金针菇液体菌种生产场所应距工矿业“三废”及微生物、烟尘和粉尘等污染源500 m以上。生产场所有硬质路面、排水良好的道路。

4.2.3 液体菌种生产场所

液体菌种生产场所地面应能防水、防腐蚀、防渗漏、防滑，易清洗，应有 $1.0^{\circ} \sim 1.5^{\circ}$ 的排水坡度和良好的排水系统，排水沟应是圆弧式的明沟。墙壁和天花板应能防潮、防霉、防水、易清洗。

4.2.4 液体菌种接种间

液体菌种接种间应设置缓冲间和风淋消毒间，缓冲间入口处设置洗手、消毒和干手设施，设置与接种职工人数相适应的更衣室。接种车间设封闭式废物桶，安装排气管道或者排风设备，门窗应设置防蚊蝇纱网。

5 生产设施设备

5.1 生产设施

原料库、配料间、发菌间、冷却间、接种间、培养室、检测室规模要配套，布局合理，要有调温设施，设计符合GB 50073要求。

5.2 生产设备

液体菌种培养器、液体菌种接种器、高压蒸汽灭菌锅、蒸汽锅炉、超净工作台、恒温摇床、恒温培养箱、冰箱、普通光学显微镜、磁力搅拌机、磅秤、天平、酸度计等。其中液体菌种培养器、高压灭菌锅和蒸汽锅炉应使用经政府有关部门检验合格，符合国家压力容器标准的产品。

6 培养基质

应符合NY 5099的规定。

7 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，并清楚地追溯菌种来源。菌种生产过程应符合NY/T 528的要求。

8 液体菌种生产

8.1 液体菌种生产工艺流程

金针菇液体菌种生产工艺流程见图1。

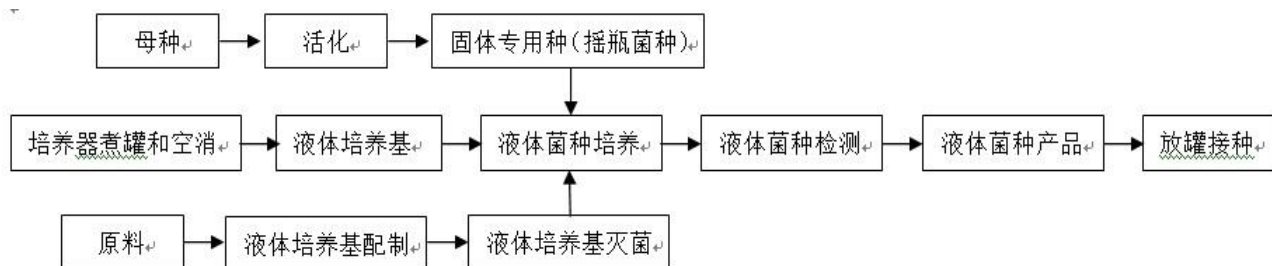


图1 金针菇液体菌种生产工艺流程图

8.2 液体菌种培养器维护

8.2.1 检查

检查培养器上全部阀门、安全阀、压力表，要求完好、正常。

8.2.2 清洗

对罐内、外和全部阀门用流水冲洗，达到无死角、内壁无任何残留物。

8.2.3 煮罐和空消

培养器初次使用、出现杂菌、长期放置、更换品种时，都要求煮罐和空消进行灭菌。煮罐和空消要求蒸气压力0.12 MPa、温度121℃、灭菌40 min。

8.3 液体菌种培养基配方

金针菇液体菌种生产推荐选用配方：

- 配方一：黄豆粉 10 g/L、蔗糖 3.0 g/L、 KH_2PO_4 1 g/L、 MgSO_4 0.5 g/L。
- 配方二：玉米粉 6 g/L、黄豆粉 4.5 g/L。
- 配方三：玉米粉 1.0 g/L，黄豆粉 1.5 g/L，葡萄糖 7.5 g/L，酵母膏 1.5 g/L，磷酸二氢钾 0.5 g/L，硫酸镁 0.25 g/L。

其中黄豆粉、玉米粉均过100目筛，筛孔直径0.15 mm。

8.4 投料和定容

首先用温水把玉米粉、黄豆粉和配方中其他成分搅拌均匀，不能有结块，通过吸管或漏斗加入罐体，液体量在罐体容量的70%~80%为宜。然后加入0.03%消泡剂，最后拧紧上料口盖。

8.5 液体培养基灭菌

8.5.1 气动搅拌

调整控温箱温度至125℃，打开罐体加热棒开始对罐体进行加热，在100℃之前一直开启罐体夹层出水阀，以放掉夹层里的虚压和多余的水。温度在70℃以下时打开空气压缩机通过其储气罐和空气过滤器对罐体培养基进行气动搅拌，防止液体结块。

8.5.2 灭菌

当罐体内培养基达70℃时，关闭气泵。当夹层出水阀出热蒸汽3 min~5 min后关闭。当罐体压力达到0.12 MPa开始计时，保持30 min~40 min，保持压力期间以温调压。

8.5.3 降温、放夹层热水

调整控温箱温度至25℃，关闭加热棒、罐底进气阀、空气过滤器夹层出气阀。用燃烧的酒精棉球烧空气过滤器出气阀40 s~50 s，在此期间可小开5 s~6 s空气过滤器出气阀，放蒸汽。在酒精棉球火焰的保护下把主管接回空气过滤器出气阀。打开空气过滤器出气阀和空气过滤器进气阀，小开罐体放气阀，通过夹层进水阀把夹层热水放掉，直至夹层压力表压力为0。

8.5.4 冷却

打开夹层放水阀，夹层进水阀通过硅胶软管接入水管，进行冷却。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，并使下部冷水向上冷却较快。通过罐体放气阀调节罐体压力在0以上直至罐体温度降至28℃，等待接种。

8.6 菌种制作

8.6.1 固体专用种生产

8.6.1.1 固体专用种的制作

金针菇液体菌种的固体专用种培养基配方（200 L）：过40目筛的阔叶木屑500 g、麸皮100 g、石膏10 g，料水比1:1.2。原料混合均匀后装入500 mL三角瓶内，高压灭菌后接入金针菇母种，洁净环境培养至菌丝长满培养基。金针菇母种制作、高压灭菌、接种、发菌应符合NY/T 528的规定。接种前应将培养好的固体专用种取样镜检或培养观察确定无杂菌后再做菌种使用。

8.6.1.2 无菌水的制作

1 000 mL的三角瓶加入500 mL~600 mL的自来水，用手提式高压灭菌锅在121℃、0.12 MPa条件下保持30 min即可制备无菌水。

8.6.1.3 固体专用种并瓶

将固体专用种的三角瓶壁用75%酒精棉球均匀擦拭消毒后，连同接种工具、无菌水放入接种箱或超净工作台中进行消毒，消毒20 min后进行接种。用75%酒精棉球擦手，用酒精灯火焰对接种工具进行灼烧灭菌。用灭菌后的接种工具在酒精灯火焰下去掉三角瓶固体专用种的表层部分。把菌种中下部分搅碎后在酒精灯火焰保护下分3~4次加入无菌水中，然后用手腕摇动三角瓶使菌种和无菌水充分接触，静置10 min后接入罐体。

8.6.2 摇瓶菌种生产

8.6.2.1 容器

使用无色或近无色三角瓶，可用棉塞（梳棉或化纤棉）、硅胶塞、专用封口透气膜封口。

8.6.2.2 培养基配方

以配制1 000 mL培养基计，马铃薯200 g（煮汁）、葡萄糖20 g、蛋白胨20 g、酵母粉2 g、磷酸二氢钾1 g、硫酸镁0.5 g，pH自然。

8.6.2.3 培养基配制

选无青皮、未发芽的新鲜马铃薯洗净、去皮、去芽眼，切成2 cm大小的块状，加水煮沸，文火维持30 min，用预湿的4层纱布过滤。再加入其余的原料至溶解，定容。培养基分装到摇瓶中，装液量为摇瓶容量的2/5~3/5，在摇瓶中放一粒转子，瓶塞封口，并用硫酸纸或牛皮纸包扎。

8.6.2.4 灭菌

将分装好的摇瓶放入高压蒸汽灭菌锅内进行灭菌，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0.12 MPa、温度121 ℃时，维持30 min~40 min。

8.6.2.5 接种培养

待培养基冷却后置于消过毒的净化工作台上，用经火焰消毒并冷却后的接种针挑取5~6块 3 mm~5 mm×3 mm~5 mm的母种块迅速转接于待接种摇瓶培养基内。接种结束后封口，放入25 ℃恒温箱中静置培养1 d，然后置于磁力搅拌器或恒温摇床上培养，温度控制在25 ℃~28 ℃，转速140 r/min~160 r/min，培养时间6 d~7 d。

8.7 菌种接入罐体

用带有手柄的内径略大于接种口的铁丝圈缠绕纱布，蘸上95 %酒精，制成火焰圈。打开罐体放气阀使压力降至0，把火焰圈套在接种口上，点燃火焰圈后关闭放气阀。打开接种口，然后快、稳、轻地接入固体专用种或摇瓶菌种，然后拧紧接种口的螺丝。接种时间应控制在10 s以内，接种量为1 %~2 %。

8.8 液体菌种培养

通过气泵充气和调整放气阀调节罐体压力表压力在0.02 MPa~0.03 MPa，温度控制在20±1 ℃、通气量为1:0.8条件下进行液体菌种培养。金针菇液体菌种在上述条件下培养144 h~168 h可达到培养指标。

8.9 液体菌种检测

接种后第4 d进行检测，首先用酒精火焰球灼烧取样阀30 s~40 s后，弃掉最初流出的少量液体菌种，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。将样品带入接种箱制片镜检或分别接入到试管斜面或培养皿的培养基上，放入28 ℃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杂菌污染；若无细菌、霉菌等杂菌菌落生长，则表明该样品无杂菌污染。应在罐培结束前完成。

8.10 合格液体菌种指标

8.10.1 感官指标

感官指标见表1。

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。

表 1 金针菇液体菌种感官指标（续）

项目	感官指标
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 2~3 mm、分布均匀、不上浮、不下沉、不迅速分层，菌球间液体不浑浊。
菌液气味	有金针菇液体培养时特有的香气，无异味，如酸、臭味等，培养器排气口气味正常，无明显改变。

8.10.2 理化指标

理化指标见表2。

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
菌丝湿重（g / ml）	0.1~0.15
菌丝干重率（%）	2~3
显微镜下菌丝形态和杂菌鉴别	可见金针菇菌种液体培养中特有的菌丝形态，球状和丛状菌丝体大量分布，菌丝粗壮，菌丝内原生质分布均匀、染色剂着色深。无霉菌菌丝、酵母和细菌菌体，检测方法参照 NY/T 1284。
留存样品无菌检查	有金针菇菌丝生长，划痕处无霉菌、酵母菌、细菌菌落生长。

9 放罐接种

9.1 接种环境

应符合GB 50073标准要求。

9.2 液体菌种接种器消毒

金针菇液体接种器高压灭菌后使用。

9.3 接种

将待接种的金针菇三级固体种袋（瓶）或栽培袋放置在输送带上，输入至无菌接种区。在接种区用接种器将金针菇液体菌种注（喷）入，每袋（瓶）接种量15 mL~30 mL。

10 记录与存档

金针菇母种、固体专用种、摇瓶液体种和培养器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。生产档案记录项目参见附录A。

11 贮藏

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，若因某些原因不能立即使用时，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。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(资料性附录)
金针菇液体菌种生产记录事项

A.1 产地环境条件

包括空气质量，水源质量，菌种生产设施、配套设备及器具。

A.2 生产投入品使用情况

包括金针菇液体菌种配方，固体专用种配方，摇瓶菌种配方、菌种。

A.3 金针菇液体菌种生产关键环节

包括培养基灭菌，接种，培养，菌种检测，贮藏，留样。

A.4 其它

包括生产场所名称，菌种数量，记录人，入档日期。

地方标准信息服务平台