

ICS 65.020.20
B 05
备案号: 58574-2018

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB21/T 2890—2017

黑木耳液体菌种生产操作规程



2017 - 12 - 07 发布

2018- 01 - 07 实施

辽宁省质量技术监督局 发布

前 言

本标准的编写原则是依据GB/T 1.1—2009给出的规程编写制定。

本标准由辽宁省农村经济委员会提出。

本标准由辽宁省农村经济委员会归口。

本标准起草单位：辽宁三友农业生物有限公司，沈阳农业大学。

本标准主要起草人：邹存兵，赵凯，范文丽，朱巍巍，张忠伟，张敏，陈飞，邓正正，王瑞景，唐志超，李颖，王维江，毕恺。



黑木耳液体菌种生产技术规程

1 范围

本标准规定了黑木耳液体菌种术语定义及生产的基本要求，主要包括生产场地、厂房和布局、设施设备、生产工艺流程、质量要求、技术要求、生产记录与存档、菌种贮藏。

本标准适用于黑木耳液体菌种的生产。

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。凡是注明日期的引用文件，仅所注明日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 12728 食用菌术语

GB 19169 黑木耳菌种

GB 150.1~150.4 压力容器

NY/T 1742 食用菌菌种通用技术要求

NY/T 1731 食用菌菌种良好作业规范

NY/T 528 食用菌菌种生产规程

NY/T 1846 食用菌菌种检验规程

3 术语和定义

GB/T 12728 界定的术语，以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 发酵罐

进行发酵培养的专用设备，也称发酵反应器。

3.2 罐压

指液体菌种培养过程中培养器内保持的空气压力，单位：Mpa。

3.3 通风量

指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）标示。

3.4 接种量

指接入培养器中的菌种的数量，以菌种体积与培养基体积的百分比标示。

3.5 摇瓶液体种

指装在玻璃三角瓶内在摇床上恒温振荡培养的液体菌种。

3.6 初始 pH 值

指液体培养基配制灭菌后未接种时的 pH 值。

4 要求

4.1 技术人员

应有液体菌种生产所需的专业技术人员和检验人员。

4.2 生产场地、厂房和布局

符合 NY/T 528 规定。

4.3 生产设施与设备

符合 NY/T 528 规定。

高压灭菌锅和蒸汽锅炉应符合 GB 150.1~150.4 压力容器规定，并经政府有关部门检验合格。

4.4 总生产工艺流程

母种 → 摇瓶液体种 → 发酵罐液体种。

4.5 培养基与母种

4.5.1 培养基

母种培养基使用附录 A 中 A.1 规定的马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）或 A.2 规定的综合马铃薯葡萄糖琼脂培养基（CPDA）。

液体种培养基根据黑木耳品种及当地原料的要求使用适宜配方（见附录 B），严格掌握初始 pH。

4.5.2 母种

母种继代培养后需按 NY/T 1846 规定抽样，并进行感官检验和菌丝微观特征检验，合格菌种进入生产流程。

母种质量要求符合 NY/T 1742 关于母种生产的规定。

4.6 摇瓶液体种技术要求

4.6.1 培养基分装及灭菌

摇瓶液体种培养基装量应为容器体积的 1/4 至 1/3，分装后应立即灭菌。按常规高压蒸汽灭菌锅操作规程，0.1Mpa~0.12Mpa（121℃~126℃），维持 25min。

4.6.2 灭菌效果的检查

灭菌后的摇瓶液体种培养基于 30℃±1℃ 培养箱恒温培养 48 小时后，观察确认无混浊、无异味，即可用于接种。

4.6.3 接种

严格按无菌操作程序，将母种斜面菌丝体切割成 2mm~4mm 颗粒，移入摇瓶培养基中，每 100 mL 液体培养基接种菌丝体颗粒 1 颗~3 颗。

4.6.4 培养条件

菌种培养温度 26℃±1℃，空气相对湿度 55%~65%，避光振荡培养。往复式摇床振荡频率 60 次~120 次/分；旋转式摇床振荡频率 150 转~180 转/分。

4.6.5 培养期的检查

每日检查生长状态，及时检出浑浊、异味、泡沫异常的不合格菌种。

4.6.6 培养结束

摇瓶静置 1 分钟后，菌丝球体积占比液体培养基体积的 4/5 以上，可结束培养。

4.7 发酵罐液体种技术要求

4.7.1 空气过滤器检查

滤芯在额定风量下，对粒径 0.1~0.2 μm 粒子的过滤效率，在 99.999%以上。空气阻力在 280pa 以下。所有材质耐 126℃高温。

使用前要拆分检查滤芯，要求无油污、料污、无破损，外壳内外壁要求无污物、光亮洁净。

4.7.2 发酵罐检查与清洗

检查罐上全部阀门、安全阀、压力表、要求完好，工作正常。

对罐体内、外和全部阀门用流水进行冲洗，达到无死角、内壁无任何培养料残余物的洁净程度。

4.7.3 煮罐和空消

发酵罐初次使用、出现染菌、长期放置、更换品种时，都要求煮罐和空消进行灭菌。有内置电加热棒的培养器加水至容积的 80% 加热至 121℃，维持 40min。用外源蒸汽灭菌的培养器，蒸汽压力达到 0.1Mpa~0.12Mpa（121℃~124℃），维持 40min。

4.7.4 投料与定容

将配制好的培养基材料搅拌均匀，倒入或用泵抽入发酵罐中，加水定容至所需体积。培养基投料总量为罐体总容积的 70%~80%。

4.7.5 培养基灭菌

按常规高压蒸汽灭菌方法操作，培养器内压力达到 0.1Mpa~0.12Mpa，培养基温度达到 121℃~124℃、保持时间 60 min~90 min。

4.7.6 冷却降温

灭菌结束将培养基降温至 24℃~28℃。降温过程中要及时向培养器内补充过滤空气，防止罐压回零。

4.7.7 接种

利用火焰保护接种，接种量为罐内培养基总量的 0.1%~0.5%。

4.7.8 液体菌种培养技术参数

通风量每分钟 1: 0.5~1.2 V/V(料液体积/空气体积)，调节罐压保持在 0.02 Mpa~0.04 Mpa，培养温度调节在 24℃~26℃。

特殊品种根据特殊需求具体设定。

4.7.9 培养时间

上述条件下培养 4d~6d 可达到黑木耳液体菌种成品标准。

5 抽样与检测

5.1 抽样

培养过程中定期从培养器中取出的样品，用作镜检和其它理化指标测定。

5.2 检测

按照 NY/T 1846 中感官检验、菌丝微观特征检验、霉菌、细菌检验进行。

5.3 合格液体菌种判定

5.3.1 感官指标

液体菌种球状菌丝体呈白色，滤液呈淡黄色。菌液稍粘稠，有大量球状菌丝体悬浮、分布均匀、菌球浓白清晰，有黑木耳液体菌种培养时特有的香气，无异味。

5.3.2 液体菌种 pH 值

终 pH 值在 4.5~5.5 之间。

5.3.3 菌丝生物量

每 100ml 液体菌种菌丝干重为 0.4~2.8g/100ml。

5.3.4 显微检测

黑木耳液体菌种菌丝形态和纯度鉴别。球状菌丝体大量分布，菌丝粗壮，菌丝内原生质分布均匀。

5.3.5 判定规则

感官检验、菌丝微观特征检验、霉菌、细菌检验、pH 值、菌丝生物量、显微检测均符合标准要求的，为合格菌种。

任何一项不符合标准要求的，为不合格菌种。

6 记录与存档

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，定期由主管领导审核，签字后归档保存。

7 贮藏

在培养器内通入无菌空气，保持罐压 0.02Mpa~0.04Mpa，可保存 24h。

附录 A
(规范性附录)
母种常用培养基及配方

A.1 PDA 培养基 (马铃薯葡萄糖琼脂培养基)

马铃薯 200g (用浸出汁), 葡萄糖 20g, 琼脂 20g, 水 1000 ML, pH6.5~7.0。

A.2 CPDA 培养基 (综合马铃薯葡萄糖琼脂培养基)

马铃薯 200g (用浸出汁), 葡萄糖 20g, 磷酸二氢钾 2g, 硫酸镁 0.5g, VB1 100mg, 水 1000 ML, pH6.5~7.0。



附录 B
(规范性附录)
黑木耳液体种常用培养基及配方

B.1 马铃薯葡萄糖培养基

马铃薯全粉 400g (100 目), 葡萄糖 2000g, 磷酸二氢钾 100g, 硫酸镁 50g, 水 100L, pH6.5~7.0。

B.2 蔗糖豆粕培养基

蔗糖 1200g, 葡萄糖 800g, 豆粕粉 350g, 磷酸二氢钾 70g, 硫酸镁 70g, 水 100L, pH6.5~7.0。

