

黑木耳液体菌种生产技术规程

Production technical regulations for liquid spawn on black wood ear

2018 - 07 - 30 发布

2018 - 08 - 30 实施

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由吉林省农业委员会提出并归口。

本标准起草单位：吉林农业大学、吉林省海外农业投资开发集团有限公司。

本标准主要起草人：李玉、姚方杰、鲁丽鑫、张友民、李丹、方明、王鹏、姜婉竹、张伟彤、陆甲、孙鹏、孔祥会、杨笑然、姚允武、刘宏宇、孟晶晶。

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

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生产中的生产条件、生产工艺、运输、记录与档案。
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 压力容器
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB 12728 食用菌术语
- 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 2375 食用菌生产技术规范
- DB22/T 2638 黑木耳菌种质量可追溯规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

黑木耳液体菌种 liquid spawn of black wood ear

用于生产和销售的黑木耳菌丝体及其生长基质组成的液体繁殖材料，包括摇瓶液体菌种、发酵罐菌种。

注1：摇瓶菌种用于发酵罐菌种扩繁；

注2：发酵罐菌种用于代料栽培。

3.2

液体菌种发酵罐 cultivation apparatus for liquid spawn

进行食用菌液体菌种培养的专用设备。要求不锈钢材质，应符合GB 150要求。

3.3

起始 pH initial pH value

液体培养基配制后尚未灭菌的pH。

3.4

发酵罐实消 full fermenter cultivation apparatus

对投料后的发酵罐进行高压蒸汽灭菌。

3.5

接种量 inoculation amount

接入发酵罐中的食用菌菌种的数量，以菌种体积与培养基体积的百分比表示。

3.6

放罐 empty pot

液体菌种菌丝生长旺盛，达到生长对数期时结束培养，在无菌条件下从发酵罐通过传送管在0.15 MPa压力下，注射接种到栽培袋中。

3.7

终止 pH terminate pH value

液体菌种达到放罐指标时的培养基pH。

4 生产条件

4.1 人员要求

4.1.1 培训要求

从事液体菌种生产的各级操作人员，严格按照“菌类园艺工国家职业标准”的要求进行专业培训，并取得相应的职业资格证书，经培训合格后上岗。

4.1.2 卫生要求

操作人员应该保持良好的个人卫生，并严格遵守车间内管理制度。

4.2 厂房

4.2.1 设计应符合 GB 50073 要求。厂址要求黑木耳液体菌种生产车间应建在交通方便，水源和电源充足，无污水、废气、废渣、烟尘和粉尘污染源远离垃圾场、畜禽场舍的地方，有硬质路面排水良好的道路。

4.2.2 液体发酵车间要求：动力系统完备需：水、电（停电需配备发电机）、蒸汽、空气四大系统配备完善保证生产。需建万级局部百级无菌室净化操作室。

4.2.3 车间符合下列要求：

- a) 地面应能防水、防腐蚀、防渗漏、防滑，易清洗，有适当的排水坡度（1.0%~1.5%）和良好的排水系统，排水沟应是圆弧式的明沟；
- b) 墙壁和天花板应能防潮、防霉、防水、易清洗；
- c) 门窗应设置防蚊蝇纱网；
- d) 车间入口处应设置洗手、消毒和干手设施；
- e) 车间安装排气管道或者排风设备；
- f) 无菌接种室应设置缓冲间；
- g) 应设置与职工人数相适应的更衣室、浴室、厕所和工作休息室；
- h) 车间设封闭式废物桶；
- i) 发酵罐培养室、无菌接种室应按照 GB 50073 执行，无菌接种室洁净度要求百级。

4.3 生产设施与设备

4.3.1 设施

菌种配制室、灭菌室、无菌接种室、恒温培养室、摇瓶培养室、发酵配料室、发酵罐培养室、化验室和菌种室规模要配套，布局合理，要有调温设施。化验室和菌种室要有相应的实验检测设备和制种用的灭菌设施和常规用具。

4.3.2 设备

4.3.2.1 生产设备

发酵罐、空气压缩机、空气过滤器、高压蒸汽灭菌锅、净化工作台、恒温回旋式振荡器。应有备用电源（发电机）。

4.3.2.2 检验设备

恒温培养箱、冰箱、显微镜、磁力搅拌机、磅秤、天平、酸度计等。

4.3.3 生产用具

玻璃三角瓶、接种用火环圈、试管、量杯、容量瓶、玻璃漏斗、定量定性滤纸、精密pH试纸等生物实验室常规用品。

4.4 培养原料

应符合NY/T 528 要求，生物制剂和天然材料的水不溶性固体物料应过 40 目筛。

4.5 生产品种

经省级以上农作物品种审定委员会审（认）定或登记（备案）的品种应符合NY/T 528 的规定，其他应符合DB22/T 2638 的规定。

5 生产工艺

5.1 工艺流程

按照图1的工艺流程进行黑木耳液体菌种生产。

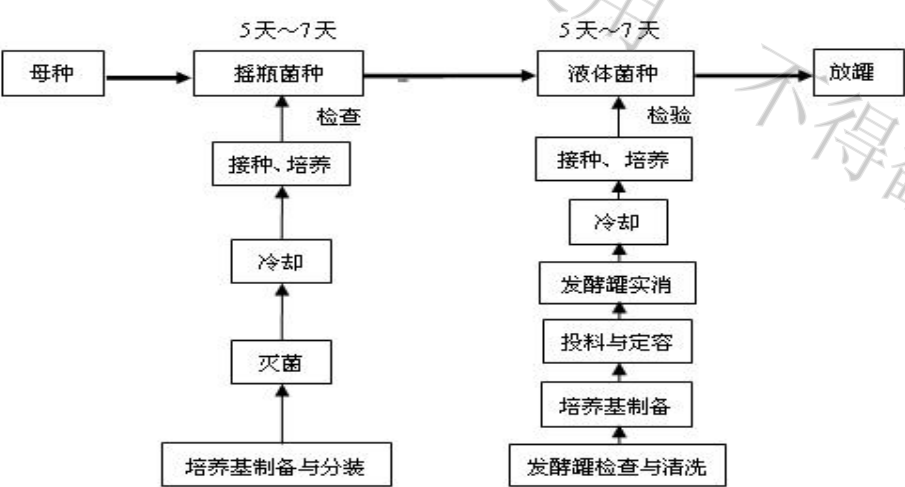


图1 液体菌种生产工艺流程

5.2 生产要求

5.2.1 母种制备

应符合NY/T 528要求。使用PDA培养基。

5.2.2 摇瓶菌种制备

5.2.2.1 培养基配制与分装

按照附录 A.1 配方配制培养基，严格掌握含水量和pH，用水应符合GB 5749要求。使用 500 mL~1000 mL、耐126 °C 高温的无色或近无色的三角瓶。使用棉塞，棉塞外要加盖4层纱布，灭菌时纱布外加盖牛皮纸防潮。培养基装量应为容器容量的三分之一至五分之三，放置玻璃珠5 个~15 个。

5.2.2.2 灭菌

121 °C，灭菌30 min。装容量较大时，灭菌时间要适当延长。灭菌完毕后，应自然降压，不应强制降压。

5.2.2.3 冷却

将灭菌后的液体培养基放入接种室内超净工作台中进行冷却，冷却至25 °C~20 °C。

5.2.2.4 接种

在无菌条件下，严格按无菌操作要求接种。每支母种接4 瓶~6 瓶，每瓶接4 块~6 块，接种完成后及时贴好标签。

5.2.2.5 培养

5.2.2.5.1 培养室处理

在使用培养室的前两天，采用臭氧发生器消毒。恒温培养箱和恒温回旋式振荡器用毛巾浸泡新洁尔灭水或75%酒精擦拭消毒，两种定期分开使用。

5.2.2.5.2 培养条件

接种后，恒温回旋式振荡器培养6 天~7 天，振荡频率每分钟150 转~180 转，培养温度以25 °C~28 °C为宜。

5.2.2.5.3 检查

定期检查，及时去除污染或异常的菌种，并应及时留样用于检验。

5.2.3 液体菌种制备

5.2.3.1 投料前准备

5.2.3.1.1 检查罐上全部阀门、安全阀、压力表，要求完好，工作正常。

5.2.3.1.2 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。

5.2.3.1.3 在发酵罐中加入适量的水（距离观察窗下边缘 5 cm 左右），完全打开罐体上排气阀门，将排气管接入下水管道，将无菌空气接入发酵罐底部的进气口，通入无菌空气，让进气气压表维持 0.01 Mpa。

5.2.3.2 培养基制备

应符合 NY/T 528 要求。准确掌握加水量，用水符合 GB 5749 要求。培养基配方见附录 A.2。

5.2.3.3 投料定容与 pH 调节

5.2.3.3.1 将原材料分别用水溶解，倒入或用泵抽入发酵罐中。加水定容至所需体积，培养基投料量为罐体总容积的 70%。

5.2.3.3.2 用盐酸调节培养基起始 pH 至 6.5~6.8。清理加料口，不应有残留的物料，拧紧上料口盖。

5.2.3.4 发酵罐实消

发酵罐内蒸汽压力达到 0.105 Mpa~0.125 Mpa，温度达到 121℃~124℃，保持时间 1 小时。

5.2.3.5 冷却、调压

灭菌结束，开启冷水阀门将冷水通入发酵罐夹层或者内置冷却系统中循环降温，夹层、内冷却循环水出口排出。待温度降至 100℃，罐压降至 0.08 Mpa，开始通入无菌空气，打开上排气阀，持续通入冷凝水。待温度降至 26℃，停止通入冷凝水，调整排气口与无菌空气进气阀门，使罐内压力维持在 0.05 Mpa。

5.2.3.6 接种

按下列步骤完成：

- 在接种口底部点燃火焰圈；
- 调节排气阀，使罐内压力降至 0.01 Mpa；
- 打开进料口盖，在火焰上打开摇瓶菌种，灼烧瓶口后倒入发酵罐中，接种量为 1:1000；
- 用火焰灼烧接种口盖，迅速拧紧进料口盖，移走火焰圈，调整罐压保持在 0.05 Mpa。

5.2.3.7 液体菌种培养

5.2.3.7.1 接种完毕，立即进入培养阶段。应满足下列条件：

- 罐内换气量 $1:0.5V/V \sim 1.2V/V$ (料液体积 / 空气体积)；
- 罐压保持在 0.05 Mpa；
- 培养温度 24℃~28℃。

5.2.3.7.2 培养 4.5 天~6 天时，观察培养状况，达到放罐指标（见附录 B）即可放罐。放罐前 48 小时应对液体菌种进行批次抽样检测，质量合格即可用于接种。终止发酵后，罐内外温度均应保持在 25℃ $\pm$ 1℃，4 小时内完成接种。

5.2.4 留样与检验

5.2.4.1 留样

菌种和培养基均应留样备查：

- 母种应以每个批号 3 支~5 支，于 4℃~6℃ 下贮存，贮存至经转接的栽培袋正常发菌；
- 摇瓶菌种使用时取样 30 mL~40 mL，用三角瓶留存；
- 发酵罐实消后的空白培养基取样 30 mL~40 mL，用三角瓶留存；

- d) 放罐前 48 小时从发酵罐中取样 30 mL~40 mL, 用三角瓶留存;
- e) 发酵终止后取样 80 mL~100 mL, 用三角瓶留存。

注: 样品放置 2℃~4℃ 保存 7 天。

5.2.4.2 检验

检验项目、指标、方法见附录 C。

6 运输

不宜长途运输。

7 记录与档案

母种、摇瓶液体种和发酵罐液体菌种生产的每个环节应按照 DB22/T 2638 要求, 填写详实的生产记录, 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, 档案保存至少 2 年。

附 录 A

(资料性附录)

黑木耳液体菌种培养基建议配方

A.1 摇瓶液体培养基配方：土豆 200 g，葡萄糖 20 g，蛋白胨 3 g，磷酸二氢钾 1 g，硫酸镁 0.5 g，水 1000 mL。

A.2 发酵罐液体培养基配方：蔗糖 0.875%，葡萄糖 0.875%，淀粉 0.31%，VB1 5 mg/L，麸皮 0.25%，豆粉 0.125%，酵母膏 0.05%，磷酸二氢钾 0.125%，硫酸镁 0.0125%，消泡剂 0.015%。

附录 B
(资料性附录)
放罐指标

放罐指标见表B.1。

表B.1 放罐指标

项目	指标
菌液颜色和透明度	球状菌丝体因品种而异，一般呈白色，滤液呈淡黄色或黄褐色，清澈透明。
菌液形态	菌液粘度高，静置基本不分层；菌丝体稠密，菌球悬浮力好、在菌液中分布均匀，菌球大小均匀，菌球间液不混浊。
菌液气味	无异味，如酸、臭味、发酵酒精味等。 发酵罐排气口气味正常，有黑木耳菌丝特有芳香气或无明显改变。
菌丝显微形态和杂菌鉴别	可见黑木耳菌种液体培养中特有的菌丝形态，大量分枝菌丝分布，菌丝纤细，有锁状联合，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。
终止 pH	5.0~5.5
菌丝干重 (g/100 mL)	>0.8

附 录 C
(资料性附录)
检验项目

检验项目见表C.1。

表C.1 检验项目

项目	指标	检验方法
菌液颜色和透明度	球状菌丝体因品种而异，一般呈白色，滤液呈淡黄色或黄褐色，清澈透明。	肉眼观察
菌液形态	菌液粘度高，静置基本不分层；菌丝体稠密，菌球悬浮力好、在菌液中分布均匀，菌球大小均匀，菌球间液不混浊。	肉眼观察
菌液气味	无异味，如酸、臭味、发酵酒精味等。 发酵罐排气口气味正常，有黑木耳菌丝特有芳香气或无明显改变。	鼻嗅
菌丝显微形态和杂菌鉴别	可见黑木耳菌种液体培养中特有的菌丝形态，大量分枝菌丝分布，菌丝纤细，有锁状联合，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。	显微镜（低倍镜、高倍镜、油镜）
菌丝活力	黑木耳菌丝在固体培养基上正常生长，无杂菌生长。	取样接种到装有无菌的木屑培养基三角瓶中，28℃恒温培养 2 天~5 天，每天观察菌落生长情况。
杂菌检测	黑木耳菌丝生长，划痕处无霉菌、酵母菌、细菌菌落生长。	取样接种到肉汤培养基、营养琼脂培养基划线培养，分别在 28℃和 37℃恒温培养 2 天~5 天，每天观察菌落生长情况。