

DB37

山东省地方标准

DB37/T 2616—2014

毛木耳液体菌种生产技术规程

Technical progress of liquid culture by *Auricularia polytricha*

2014-10-13 发布

2014-11-10 实施

山东省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省质量技术监督局提出。

本标准由山东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、章丘市食用菌研究所。

本标准主要起草人：岳凤丽、牛贞福、国淑梅、贾恩茂、颜亚男、刘敏。

山东省地方标准公开

毛木耳液体菌种生产技术规程

1 范围

本标准规定了毛木耳（*Auricularia polytricha*）液体菌种生产的厂房设施、生产设备、品种、生产工艺流程及储藏等技术要求。

本标准适用于山东省毛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 150.2 压力容器 第2部分：材料
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB 9687 食品包装用聚乙烯成型品卫生标准
- GB 9688 食品包装用聚丙烯成型品卫生标准
- GB 50073 洁净厂房设计规范
- 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/T 12728 食用菌术语
- 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
- 中华人民共和国国务院令 第304号 2001年5月23日 《农业转基因生物安全管理条例》

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

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。其基本结构参见附录B。

3.2

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

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。

3.3

空气压缩机 air compressor

能为培养器提供压缩空气的设备。

3.4

空气过滤器 air filter

能对培养器所用空气进行过滤的设备。

3.5

固体专用种 solid special spawn

在玻璃三角瓶或聚丙烯瓶固体培养基内生长的纯食用菌菌丝体培养物。专供接入液体菌种培养器用。

3.6

固体专用种并瓶 solid special strain combination

将检验合格的固体专用种按无菌操作要求，转移至装有无菌水的大三角瓶中，充分搅拌呈均匀的液态菌种的过程。

3.7

接种量 inoculation amount

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表示。

3.8

放罐 empty pot

培养结束，将液体菌种从培养器内排出，接种到三级固体种袋（瓶）或栽培袋中。

4 环境卫生要求

4.1 生产环境

4.1.1 应符合 NY/T 528 的规定。

4.1.2 毛木耳液体菌种生产场所应距工矿企业的“三废”及微生物、烟尘和粉尘等污染源 500 m 以上。

4.1.3 交通方便，水源和电源充足，有硬质路面排水良好的道路。

4.2 毛木耳液体菌种生产车间

4.2.1 地面应能防水、防腐蚀、防渗漏、防滑，易清洗，应有 1.0 %~1.5 % 的排水坡度和良好的排水系统，排水沟必须是圆弧式的明沟。

4.2.2 墙壁和天花板应能防潮、防霉、防水、易清洗。

4.3 毛木耳液体菌种接种间

4.3.1 应设置缓冲间，设置与职工人数相适应的更衣室。

4.3.2 车间入口处设置洗手、消毒和干手设施。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

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。

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、接种箱、恒温摇床、恒温培养箱、冰箱、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 品种选择

7.1 选用高产、优质、抗逆性强、商品性好的毛木耳品种，从具相应资质的供种单位引种，并清楚地追溯菌种来源。

7.2 菌种生产过程应符合 NY/T 528 的要求。

7.3 使用转基因技术育成的毛木耳菌种，应执行《农业转基因生物安全管理条例》的规定。

8 液体菌种生产技术要求

8.1 液体培养基制作

8.1.1 罐体夹层加水

8.1.1.1 首先对液体菌种培养罐夹层加水，方法是用硅胶软管连接水管和罐体下部的加水口，同时打开夹层放水阀进行加水，水量加至放水阀开始出水即可。

8.1.1.2 水质应符合 GB 5749 的规定。

8.1.2 液体培养基配方

8.1.2.1 毛木耳液体菌种培养基配方（120 L）：玉米粉 0.75 kg，豆粉 0.5 kg，均过 80 目筛。

8.1.2.2 液体培养基配制方法如下：

- 首先用温水把玉米粉、豆粉搅拌均匀，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 80 %为宜；
- 然后加入 20 mL 消泡剂，最后拧紧接种口螺丝。

8.1.3 液体培养基灭菌

8.1.3.1 液体培养基气动搅拌

8.1.3.1.1 基本要求如下:

- a) 调整控温箱温度至 125 °C, 打开罐体加热棒开始对罐体进行加热, 在 100 °C 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;
- b) 温度在 70 °C 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。

8.1.3.1.2 搅拌步骤为: 打开空气过滤器上方的进气阀、出气阀和下方的放气阀, 开气泵电源后, 关闭空气过滤器下方的放气阀, 打开罐体最下方的进气阀和最上方的放气阀。

8.1.3.2 关闭气泵

当罐体内培养基达 70 °C 时, 关闭气泵。具体方法如下:

- a) 先关罐底进气阀、开空气过滤器放气阀、关气泵电源;
- b) 把主管接到之前一直关闭的空气过滤器出气阀, 此时空气过滤器放气阀、进气阀、出气阀全关闭;
- c) 空气过滤器内可加入少量水, 水位在滤芯以下, 并关闭罐体放气阀。

8.1.3.3 灭菌

8.1.3.3.1 当夹层出水阀出热蒸汽 3 min~5 min 后关闭。当夹层压力表达 0.05 MPa 时, 打开空气过滤器夹层出气阀, 再打开罐体进气阀, 然后小开罐体放气阀。

8.1.3.3.2 当主管烫手后, 关闭罐体放气阀。当罐体压力表达达到 0.15 MPa 开始计时, 保持 30 min~40 min, 保持压力期间可以温调压。

8.1.3.4 降温

8.1.3.4.1 调温至 25 °C, 关闭加热棒、罐底进气阀、空气过滤器夹层出气阀。

8.1.3.4.2 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。

8.1.3.4.3 在酒精棉球火焰的保护下把主管接回空气过滤器出气阀。

8.1.3.5 放夹层热水

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。

8.1.4 冷却

8.1.4.1 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。

8.1.4.2 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。

8.1.4.3 开气泵顺序为: 打开空气过滤器下部放气阀, 开空气过滤器上方出气阀, 开气泵、关空气过滤器放气阀、开罐体进气阀, 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 °C 以下, 等待接种。

8.2 接种

8.2.1 固体专用种

8.2.1.1 毛木耳液体菌种的固体专用种培养基配方（120 L）：过40目筛的木屑500 g、麸皮100 g、石膏10 g，料水比1:1.2。

8.2.1.2 原料混合均匀后装入500 mL三角瓶内，高压灭菌后接入毛木耳母种，洁净环境培养至菌丝长满培养基。毛木耳母种制作、高压灭菌、接种、发菌应符合NY/T 528的规定。

8.2.2 制备无菌水

1000 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既可制备无菌水。冷却后等待把固体专用种接入。

8.2.3 固体专用种并瓶

8.2.3.1 接种用具

酒精灯、75 %酒精、尖嘴镊子、接种工具、棉球。

8.2.3.2 消毒

旋转固体专用种的三角瓶壁用酒精灯火焰均匀地进行消毒后，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。

8.2.3.3 接种

8.2.3.3.1 消毒20 min后进行接种。

8.2.3.3.2 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。

8.2.3.3.3 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。

8.2.3.3.4 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。

8.2.4 菌种接入罐体

8.2.4.1 制作火焰圈

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。

8.2.4.2 接种

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、轻地接入菌种，然后拧紧接种口的螺丝。

8.3 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24 ℃~26 ℃等条件下进行液体菌种培养。毛木耳液体菌种在上述条件下培养96 h~100 h可达到培养指标。

8.4 液体菌种检测

8.4.1 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。

8.4.2 将样品带入接种箱经无菌操作分别接于GB 4789.28规定的试管斜面或培养皿的培养基上，放入28 ℃恒温培养2 d~5 d，采用显微镜和感官观察菌丝生长状况和有无杂菌污染。

8.4.3 若无细菌、霉菌等杂菌菌落生长，则表明该样品无杂菌污染。

8.5 优质液体菌种指标

8.5.1 感官指标

感官指标见表1。

表1 毛木耳液体菌种感官指标

项目	感官指标
菌液色泽	球状菌丝体呈白色，菌液呈棕色。
菌液形态	菌液稍粘稠，有大量片状或球状菌丝体悬浮、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	有毛木耳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。

8.5.2 理化指标

理化指标见表2。

表2 毛木耳液体菌种理化指标

项目	理化指标
pH 值	5.5~6.0
菌丝湿重 (g/L)	≥8
显微镜下菌丝形态和杂菌鉴别	可见毛木耳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	有毛木耳菌丝生长，培养基无霉菌、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的要求。

9.2 液体菌种接种器消毒

毛木耳液体接种器高压灭菌后使用。

9.3 接种

将待接种的毛木耳三级固体种袋（瓶）或栽培袋放置在输送带，输入至无菌接种区。在接种区用接种器将毛木耳液体菌种注入，每个接种点15 mL~30 mL。菌种瓶为符合GB 9687规定的白色半透明塑料菌种瓶，菌种袋为符合GB 9688规定的聚丙烯塑料袋。

10 记录与存档

毛木耳母种、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本批次菌种栽培出耳为止。生产档案记录项目参见附录A。

11 贮藏

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。

山东省地方标准公开

附 录 A
(资料性附录)
毛木耳液体菌种生产记录事项

A.1 产地环境条件

- A.1.1 空气质量
- A.1.2 水源质量
- A.1.3 菌种生产设施、配套设备及器具

A.2 生产投入品使用情况

- A.2.1 毛木耳液体菌种配方
- A.2.2 固体专用种配方
- A.2.3 菌种

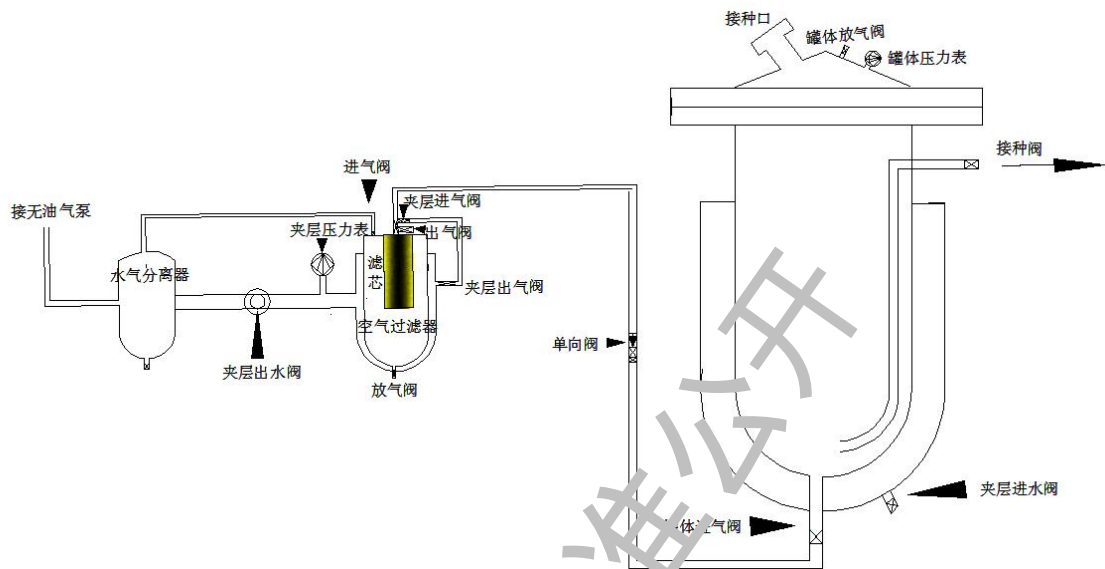
A.3 毛木耳液体菌种生产关键环节

- A.3.1 培养基灭菌
- A.3.2 接种
- A.3.3 培养期间
- A.3.4 菌种检测
- A.3.5 贮藏期间
- A.3.6 留样期间

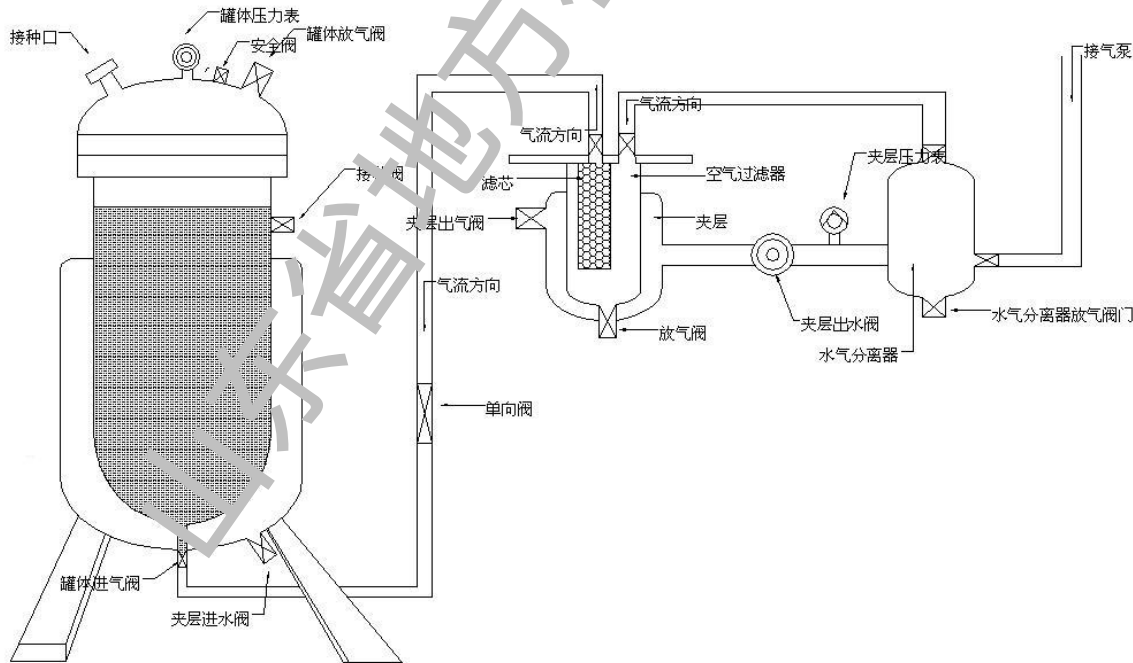
A.4 其它

- A.4.1 生产场所名称
- A.4.2 菌种数量
- A.4.3 记录人
- A.4.4 入档日期

附 录 B
(资料性附录)
毛木耳液体菌种培养器



图B.1 毛木耳液体菌种培养器示意图



图B.2 毛木耳液体菌种培养器剖面图