

DB12

天 津 市 地 方 标 准

DB12/T 1012—2020

食用菌液体菌种生产技术规范

Technique standard for liquid spawn production of edible mushroom

地方标准信息服务平台

2020 - 12 - 17 发布

2021 - 01 - 16 实施

天津市市场监督管理委员会 发 布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准由天津市农业农村委员会提出并归口。

本标准起草单位：天津市林业果树研究所。

本标准主要起草人：罗莹、周永斌、钱磊、刘连强、王文治、李凤美、訾惠君、李淑芳。

地方标准信息服务平台

食用菌液体菌种生产技术规范

1 范围

本标准规定了食用菌液体菌种的生产场地、设备设施、工艺流程、生产技术规程、使用方法以及标签、贮存。

本标准适用于食用菌液体菌种的生产。

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 5749 生活饮用水卫生标准

GB/T 12728 食用菌术语

GB 50073 洁净厂房设计规范

NY 5099 无公害食品 食用菌栽培基质安全技术要求

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程

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

罐压 jar-pressure

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。

3.2

通风量 quantity of aeration

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。

3.3

接种量 inoculum

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。

3.4

液体菌种菌龄 age of liquid spawn

菌种接入培养基开始计算的液体菌种生长发育时间。

3.5

空消 sterilizing fermentor

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。

3.6

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。

3.7

摇瓶液体种 liquid spawn in shake flask

装在玻璃三角瓶内在摇床上恒温振荡培养的液体菌种。

4 要求

4.1 生产场地

4.1.1 基本要求

环境应干净整洁、空气优良、通风良好、水源充足且符合GB 5749 生活饮用水卫生标准、排水畅通、电源充足、交通便利。

4.1.2 环境卫生要求

应符合NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程的规定。

4.2 生产设备设施

4.2.1 厂房设置和布局应符合 NY/T528 食用菌菌种生产技术规程要求。

4.2.2 发酵间应按照 GB 50073 洁净厂房设计规范执行，地面应能防水、防腐蚀、防渗漏、防滑，易清洗，排水坡度 1.0%~1.5%，排水沟必须是圆弧式不锈钢的明沟；墙角为圆角，墙壁和天花板应能防潮、防霉、防水、易清洗。

4.2.3 接种间应按照 GB 50073 洁净厂房设计规范执行，液体菌种接种间设置缓冲间；入口处设置洗手、消毒和干手设施；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。

4.2.4 主要仪器设备应配备水处理设备、液体菌种培养器、空气压缩机、空气过滤器、液体菌种接种器、高压蒸汽灭菌锅、蒸汽锅炉、净化工作台、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。在经常停电的地方应有自备电源（发电机）。

4.2.5 主要生产用具应配备玻璃三角瓶、接种器、试管、量杯量瓶、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。

4.3 培养基质

原材料应符合NY 5099 无公害食品 食用菌栽培基质安全技术要求的规定。

4.4 生产品种

4.4.1 选用高产、优质、抗逆性强、商品性好的食用菌品种，使用经省级以上农作物品种审定委员会登记的品种，并且从具有相应技术资质的供种单位引种且种性清楚。

4.4.2 菌种生产过程应符合 NY/T528 食用菌菌种生产技术规程的要求。

5 液体菌种生产工艺

5.1 工艺流程

见图1。

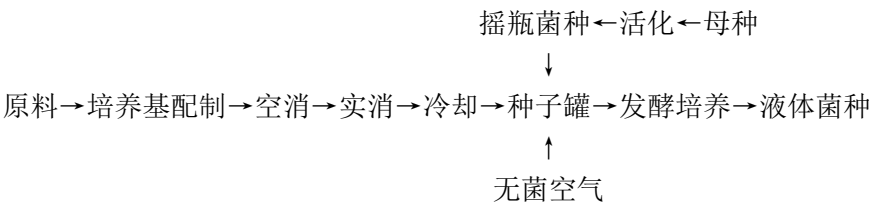


图1 液体菌种生产工艺流程

5.2 制备母种

5.2.1 容器

使用18mm×180mm或20mm×200mm玻璃试管, 试管应保持清洁、干燥。

5.2.2 培养基

根据不同微生物的营养需要配制不同的培养基, 常用的配方参见附录A。

5.2.3 灭菌

高压蒸汽灭菌, 在121℃, 0.11MPa~0.12MPa的压力下, 维持30min。

5.2.4 接种

在超净工作台上严格按无菌操作接种。接种完成后, 在试管上注明菌种名称、接种时间。

5.2.5 培养

根据食用菌菌种的生长要求, 给予其适宜的培养温度22℃~28℃, 保持空气相对湿度在65%~75%, 避光培养。

5.2.6 留样

菌种应留样备查, 留样的数量应以每个批次母种3支~5支。草菇在13℃~16℃贮存, 其他种类母种于4℃~6℃下贮存, 贮存至该批菌种出第一潮菇。

5.3 制备摇瓶液体种

5.3.1 容器

采用1000ml的常规三角瓶, 三角瓶应保持清洁、干燥。

5.3.2 装液量

每瓶装量为400ml, 用通氧砂芯硅胶塞封口。

5.3.3 培养基

根据食用菌品种的营养需要配制不同的摇瓶培养基, 常用的配方参见附录B。

5.3.4 灭菌

同5.2.3高压蒸汽灭菌法。

5.3.5 接种

将灭菌后的培养基冷却至30℃以下进行接种，每瓶接入0.5cm²的琼脂斜面母种3块～5块。

5.3.6 培养

将接种后的三角瓶放到摇床上进行振荡培养，根据食用菌品种的不同生长要求，给予其适宜的培养温度22℃～28℃，保持空气相对湿度在65%～75%，避光培养。频率随具体品种而定。

5.4 发酵罐检查与清洗

5.4.1 检查

检查罐上全部阀门、安全阀、压力表，要求完好，工作正常。

5.4.2 清洗

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。

5.5 煮罐和空消

培养器初次使用、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℃，灭菌40min。用外源蒸汽灭菌的培养器，蒸汽压力达到0.11Mpa～0.12Mpa、温度121℃～124℃、灭菌40min。

5.6 液体菌种培养基配方

具体配方根据原料资源和生产品种的营养需求，使用适宜的配方，准确掌握加水量，加入适量的消泡剂。用水应符合GB 5749生活饮用水卫生标准。常用的配方见附录B。

5.7 投料与定容

将配制好的培养基，加适量的水，搅拌均匀，放入培养器中，加水定容，培养基投料量为罐体总容积的70%～80%，然后拧紧上料口盖。

5.8 培养器实消和培养基灭菌

培养器内蒸汽压力达到0.11Mpa～0.12Mpa，培养基温度达到121℃～124℃、保持时间40min。

5.9 冷却降温

灭菌结束通过冷却系统，使培养基降温至24℃～28℃。保持压力平稳，防止罐压回零。

5.10 接种

菌种罐接种处设置百级层流罩，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%的酒精，套在接种口上点燃。打开液体摇瓶种瓶塞，用火焰灼烧瓶口30～40秒，打开接种口盖，将液体摇瓶种迅速倒入罐中，迅速盖好接种口，拧紧。

5.11 液体菌种培养条件

5.11.1 通风量

通过进气阀和排气阀将通风量调节至1: 0.5V / V～1: 1.2V / V(料液体积 / 空气体积)。

5.11.2 罐压

罐压保持在0.02Mpa~0.04Mpa。

5.11.3 温度

常见品种培养温度调节在24℃~28℃，少数品种根据特殊需求具体设定。

5.11.4 培养时间

菌种培养时间由品种而定。

5.12 留样与检测

5.12.1 留样

摇瓶液体菌种样品；培养器灭菌后的空白培养基样品；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。上述样品放4℃冰箱内保存一周以上。

5.12.2 无菌检测

对上述留存样品应在无菌检测琼脂平板上划线培养，在28℃恒温培养2d~5d，每天观察菌落生长情况，若划痕上没有细菌、霉菌、酵母菌菌落生长，则表明该样品无杂菌。对留样样品应在取样后及时镜检，确定菌丝生长发育状态和有无杂菌污染。

5.12.3 pH 值

采用酸度计测定，应在正常发酵液PH值范围之内。

5.12.4 菌丝湿重

采用Φ15cm的定量滤纸，将100ml液体菌液，过滤至无水滴滴下，称重后减去滤纸湿重。

5.12.5 镜检

观察菌丝生长状况和有无杂菌污染。

5.13 液体菌种放罐指标

5.13.1 经镜检和其它理化指标等方法检验质量合格即可放罐接种。

5.13.2 感官指标见表 1。

表1 感官指标

项目	指标
菌液色泽	球状菌丝体呈白色，滤液呈棕色。
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、不迅速分层，菌球间液不混浊。
菌液气味	有食用菌液体培养液特有的香气，无异味，如酸、臭味等。培养器排气口气味正常，无明显改变。

5.13.3 理化指标见表 2

表2 理化指标

项目	指标
pH值	在该品种正常范围内
菌丝湿重（g / 100ml）	>8
显微镜下菌丝形态和杂菌鉴别	可见食用菌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。
留存样品无菌检查	有食用菌菌丝生长，划痕处无霉菌、酵母菌、细菌菌落生长。

6 使用方法

将待接种的食用菌三级固体种袋（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液体菌种注入，每个接种点15ml～30ml。移至发菌室培养。

7 标签、贮存

7.1 标志

注明菌种种类、级别、品种、生产单位、接种日期。

7.2 贮存

7.2.1 摇瓶种保存方法

摇瓶培养的液体菌种用牛皮纸包好，放在4℃的温度下可保存5天～7天。

7.2.2 种子罐液体菌种保存方法

15℃～20℃室温可保存1天～2天。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(资料性附录)
常用母种培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(简称PDA培养基) 马铃薯200 g, 葡萄糖20 g, 琼脂(凝固剂)20 g, 水1000mL, pH值依据菌种调配。

综合马铃薯葡萄糖琼脂培养基(CPDA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, 琼脂20g, 水1000mL, pH值依据菌种调配。

地方标准信息服务平台

附 录 B
(资料性附录)
常用摇瓶种培养基

葡萄糖3.0%，豆饼粉2.0%，玉米粉1.0%，酵母粉0.5%，磷酸二氢钾0.1%，碳酸钙0.2%，硫酸镁0.05%，pH值依据菌种调配。

可溶性淀粉3.0%~6.0%，蔗糖1.0%，磷酸二氢钾0.3%，硫酸镁0.15%，酵母膏0.1%，pH 6适合于多种食用菌。

地方标准信息服务平台