

DB61

陕 西 省 地 方 标 准

DB 61/T 1158.4—2018

桑黄标准综合体 第 4 部分：液体菌种生产技术规程

Integrated Standards of *Phellinus* spp.—

Part 4: Technical Rules for Liquid Inoculum Preparation

2018 – 05 – 01 发布

2018 – 06 – 01 实施

陕西省质量技术监督局

发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 栽培场地 1

4 栽培环境 1

5 栽培设施 2

附录 A（规范性附录） 食用菌生产场所处理方法 3

前 言

DB61/T 1158—2018《桑黄标准综合体》分为六个部分：

- 第1部分：生产环境；
- 第2部分：菌种；
- 第3部分：菌种生产技术规程；
- 第4部分：液体菌种生产技术规程；
- 第5部分：桑黄栽培技术规程；
- 第6部分：子实体干品质量要求。

本部分为 DB61/T 1158—2018 的第 4 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由陕西省农业厅提出并归口。

本部分起草单位：陕西省微生物研究所、杨凌康宇生物科技有限公司、陕西省园艺蚕桑工作站。

本部分主要起草人：雷萍、吴亚召、张文隽、渠敬峰、王周平、张伟兵、霍国琴、赵玉鹏、马莹、杜艳。

本部分由陕西省微生物研究所负责解释。

本部分首次发布。

联系信息如下：

单位：陕西省微生物研究所

地址：西安市雁塔区西影路 76 号

邮编：710043

电话：029-82357027

桑黄标准综合体 第4部分：液体菌种生产操作规程

1 范围

DB61/T 1158 的本部分规定了桑黄液体菌种的生产条件、生产工艺及标签、贮存。

本部分适用于袋料栽培的桑黄液体菌种生产。

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 4789.28 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB 5749 生活饮用水卫生标准

NY/T 528 食用菌菌种生产操作规程

NY 5099 无公害食品 食用菌栽培基质安全技术要求

DB61/T 1158.3 桑黄标准综合体 第3部分：菌种生产操作规程

《食用菌菌种管理办法》中华人民共和国农业部第62号令（2006年3月27日）

3 生产条件

3.1 技术人员

按照《食用菌菌种管理办法》的规定配备菌种生产的专业技术人员。

3.2 生产场地

3.2.1 地势干燥、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、交通便利，电源充足，有硬质路面排水良好的道路。

3.2.2 环境卫生应符合 NY/T 528 的规定。300m 之内无禽畜舍，无垃圾场，无污水、粉尘污染源。

3.3 生产厂房

3.3.1 液体菌种生产车间

3.3.1.1 地面应防水、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。

3.3.1.2 墙壁和天花板应具有防潮、防霉、防水功能，且易清洗；电力满足生产要求，通风良好。

3.3.2 液体菌种接种间

3.3.2.1 应设置缓冲间及与接种人数相适应的更衣室。

3.3.2.2 车间入口处设置洗手、消毒和干手设备。放置封闭式废物桶，安装排风设备，门窗应安装防蚊蝇纱网。

3.3.3 发酵室

内壁和房顶光滑易清洗和消毒。

3.4 设施设备

按照DB61/T 1158.3中3.3要求配备。

3.5 培养基质

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 生产工艺

4.1 工艺流程

母种→摇瓶种制备→种子罐菌种制备→液体菌种发酵→菌种检测。

4.2 摇瓶种制备

4.2.1 培养基

按照附录A规定配制。

4.2.2 装液量

采用500mL的常规三角瓶，每瓶装量为100mL~150mL，八层纱布和牛皮纸封口。

4.2.3 灭菌

在121℃~126℃，0.14MPa~0.17MPa的压力下，保持30分钟。

4.2.4 接种

将灭菌后的培养基冷却至30℃以下，无菌条件下每瓶接入0.3cm²~0.5cm²母种1块。

4.2.5 培养

(27±1)℃静止培养24h后，移至摇床130r/min~150r/min振荡频率下培养48h，再调至150r/min~180r/min，继续培养72h~96h。

4.2.6 移种标准

4.2.6.1 菌体形态：桑黄菌丝长分支，发酵液清香，颜色清亮、浅褐色，菌丝球多，菌液稍有黏稠。

4.2.6.2 菌丝量：10%~15%（湿重）。

4.2.6.3 酸碱度：发酵液 pH5.0~5.5。

4.2.6.4 镜检：平皿检验无杂菌。

4.3 种子罐菌种制备

4.3.1 培养基

按照附录A规定配制。

4.3.2 装液量

发酵罐体积的60%。

4.3.3 灭菌

用夹层预热培养基至80℃后，蒸汽进罐升温至121℃~124℃，0.11MPa~0.14MPa保压恒温40min。

4.3.4 接种

在无菌条件下接种，接种量为10%~15%；接种后调节进、排气阀，使罐压保持在0.02MPa~0.04MPa之间。

4.3.5 培养

搅拌转速120r/min~150r/min，温度 (27 ± 1) ℃培养120h。定时用肉汤培养基（按照附录C规定配制）检查发酵液的无菌情况，显微镜检查菌体的状况。

每隔8h或12h取样液进行一次无菌检验。用2支肉汤试管及1只培养皿（培养基按照附录D规定配制）同时检验。肉汤连续3次发生变色反应（由红色变为黄色）或产生混浊，平板培养连续3次有杂菌菌落出现为染菌。肉汤阳性反应不明显，发酵液各项参数表明确有可疑的染菌反应，经镜检证实有杂菌存在，也应判断为染菌。

4.4 液体菌种发酵

4.4.1 液体培养基制作

4.4.1.1 按照附录B规定配制。水质应符合GB 5749的规定。

4.4.1.2 灭菌按照发酵罐厂家型号使用说明书的要求进行操作。

4.4.2 菌种接入罐体

在无菌条件下接种，接种量为10%~15%。

4.4.3 液体菌种培养

罐温： (28 ± 2) ℃。

罐压： $(0.3\sim 0.4)\times 10^5\text{Pa}$ 。

通气量： $1:0.5V/V\cdot\text{min}$ 。

搅拌速度：150r/min~180r/min。

培养时间：96h~120h。

4.5 液体菌种检测

接种后第4d进行检测，按照无菌操作取样，将样液接于GB 4789.28规定的试管斜面或培养皿的培养基上， (28 ± 2) ℃培养2d~5d，采用显微镜和感官观察菌丝生长状况。若无细菌、霉菌等杂菌菌落生长，则表明该样品无杂菌污染。

5 液体菌种合格指标

5.1 感官指标

5.1.1 菌丝形态与色泽：具有“毛刺”的球状菌丝体呈米白色，菌液呈棕色。

5.1.2 菌液形态：菌液稍粘稠，有大量菌丝体悬浮、分布均匀、不上浮、不下沉、不迅速分层，菌球间液体不浑浊。

5.1.3 菌液气味：有桑黄菌液体培养时特有的香气，无酸、臭味等，培养器排气口气味正常。

5.2 理化指标

5.2.1 酸碱度：pH 值 5.5~6.0。

5.2.2 菌丝量：菌丝湿重 (g/L) ≥ 80 。

5.2.3 菌丝形态和杂菌鉴别：显微镜下可见桑黄菌种液体培养中特有的菌丝形态，初始阶段菌丝壁薄，黄绿色透明，顶端钝圆，有一主干，极少分支，具不明显的简单分隔，原生质丰富，直径 $0.3\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ 。老熟菌丝隔膜处常隆起，骨棒状，菌丝分支处偶有直角分支。深层发酵培养菌丝体大量分布，菌丝缠绕结成球状，表面有凸起的菌刺，菌刺形状分支较多。菌丝无锁状联合。无霉菌菌丝、酵母和细菌菌体。

6 标签、贮存

6.1 标签

生产的菌种必须贴有菌种质量合格标签，注明菌种种类、级别、品种、生产单位、接种日期。

6.2 贮存

6.2.1 摇瓶种保存

4℃、暗光条件下可保存5d~7d。

6.2.2 种子罐液体菌种保存

15℃~20℃可保存1d~2d。

附 录 A
(规范性附录)
常用摇瓶种培养基

A.1 常用摇瓶种培养基

A.1.1 葡萄糖3%，豆饼粉2%，玉米粉1%，酵母粉0.5%，磷酸二氢钾0.1%，碳酸钙0.2%，硫酸镁0.05%，pH值6.0。玉米粉，豆饼粉均过80目筛。

A.1.2 可溶性淀粉3%~6%，白砂糖1%，磷酸二氢钾0.3%，硫酸镁0.15%，酵母膏0.1%，pH值6.0。

附 录 B
（规范性附录）
常用发酵罐培养基

B.1 常用发酵罐培养基

- B.1.1** 葡萄糖3%，豆饼粉2%，玉米粉1%，酵母粉0.5%，磷酸二氢钾0.1%，碳酸钙0.2%，硫酸镁0.05%，pH值6.0。玉米粉，豆饼粉均过80目筛。
- B.1.2** 可溶性淀粉3%~6%，白砂糖1%，磷酸二氢钾0.3%，硫酸镁0.15%，酵母膏0.1%，pH值6。
- B.1.3** 玉米粉1%、麸皮1%、葡萄糖2%、蛋白胨0.5%、酵母膏0.5%、KH₂PO₄溶液0.1%、MgSO₄溶液0.05%、维生素B₁10mg/100mL、pH自然。玉米粉，麸皮粉碎均过80目筛。

附 录 C
(规范性附录)
肉汤培养基

C.1 肉汤培养基

C.1.1 牛肉膏3g, 氯化钠5g, 蛋白胨10g, 酚红溶液2mL, 葡萄糖3g, 水1000mL, pH7.3~7.6 (灭菌前)。

C.1.2 酚红溶液: 取酚红1g, 用10mL95%乙醇溶解, 加90mL蒸馏水。

附 录 D
(规范性附录)
平板杂菌检验培养基

D.1 平板杂菌检验培养基

牛肉膏3g，氯化钠5g，蛋白胨10g，琼脂20g，葡萄糖3g，水1000mL。
