

大球盖菇液体菌种生产操作规程

2025 - 08 - 08 发布

2025 - 11 - 07 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 生产要求 1

5 摇瓶菌种生产 2

6 发酵罐菌种生产 3

7 贮藏 4

8 留样 4

9 建档和追溯 5

附录 A（资料性） 大球盖菇液体菌种生产上常用配方 6

附录 B（资料性） 大球盖菇液体菌种检测方法指标 7

附录 C（资料性） 大球盖菇液体菌种放罐指标 8

附录 D（资料性） 大球盖菇液体菌种生产记录事项 9

参考文献 10

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由河南省农业农村厅提出。

本文件由河南省经济作物标准化技术委员会（HN/TC 31）归口。

本文件起草单位：商丘市农林科学院、河南金隆菇业有限公司、南阳市乡村振兴监测中心、河南省种业发展中心、商丘市乡村产业发展中心。

本文件主要起草人：黄海洋、利金站、王家才、郭蓓、孙喜云、杨密、张伟、侯磊、朱新利、曹依静、赵侠科、陈昆、黄新华。

大球盖菇液体菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了大球盖菇液体菌种生产要求、摇瓶菌种生产、发酵罐菌种生产、贮藏、留样、建档和追溯的内容。

本文件适用于大球盖菇液体菌种生产。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 150.1 压力容器 第1部分：通用要求
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- 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 1284 食用菌菌种中杂菌及害虫的检验
- NY/T 1742 食用菌菌种通用技术要求
- NY/T 1935 食用菌栽培基质质量安全要求
- NY/T 3819 农产品质量安全追溯操作规程 食用菌

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

液体菌种

培养基为液体状态的菌种。

3.2

液体菌种发酵罐

食用菌液体菌种培养专用设备。

3.3

发酵罐空消

对尚未加水投料的空发酵罐进行高压蒸汽灭菌。

3.4

发酵罐实消

对投料后的发酵罐进行高压蒸汽灭菌。

4 生产要求

4.1 工作人员要求

应具有一定的食用菌或微生物专业知识，掌握液体菌种生产等专业技能。

4.2 场地要求

选择交通便利，通风良好，远离污染源的农业生产区域，应符合NY/T 528的要求。

4.3 厂房要求

4.3.1 菌种生产场所

应有各自隔离的原材料库，配料分装室（场）、灭菌室、冷却室、接种室、培养室、菌种检验室等；设置摇瓶菌种和发酵罐液体菌种培养室。规模要配套，布局要合理，设计应符合GB 50073的要求。

4.3.2 菌种生产车间

菌种检验室和母种制作室要有相应的实验检测设备和灭菌设备；培养基配制室空间洁净度要达到万级以上；接种间应设置缓冲间和风淋室，缓冲间入口处设置洗手、消毒和干手设施，设置与接种人数相适应的更衣室，放置封闭式废物桶，安装排气管道或者排风设备，门窗悬挂防蚊蝇纱网；培养室要有调温设备以满足菌种生产的需要。

室内墙壁和天花板应具有防潮、防霉、防水等性能，且便于清洁；地面应具有防水、防腐蚀、防渗漏、防滑等性能，且便于清洁；需有 $1.0^{\circ} \sim 1.5^{\circ}$ 的排水坡度和良好的排水系统，排水沟采用圆弧式明沟设计。

4.4 设备要求

应有液体菌种发酵罐、空气压缩机、高效空气过滤器、液体菌种接种器、高压蒸汽灭菌锅、蒸汽锅炉、超净工作台、恒温摇床、恒温培养箱、除湿设备、调温设备、冰箱、普通光学显微镜、磁力搅拌机、磅秤、天平、酸度计和备用电源等设备。其中，高效空气过滤器对粒径 $0.1 \mu\text{m} \sim 0.2 \mu\text{m}$ 粒子的捕集效率在99.999%以上，且所有材质应耐 126°C 高温灭菌；液体菌种发酵罐、高压蒸汽灭菌锅和蒸汽锅炉应符合GB/T 150.1的要求。

5 摇瓶菌种生产

5.1 品种选择

选择来源可靠、种性清晰的大球盖菇品种。菌种质量应符合NY/T 528、NY/T 1742的要求。

5.2 培养基制作

根据生产规模选择合适容量的培养容器；常用培养基配方见附录A.1或购买成品培养基；制作培养基时将原料溶解，分装量不超过培养器容量的60%，瓶塞封口，并用牛皮纸包扎。培养基质应符合NY/T 528、NY/T 1935的要求，用水符合GB 5749的要求。

5.3 灭菌

液体培养基分装后应立即灭菌。将分装的摇瓶放入高压蒸汽灭菌锅内进行灭菌，锅内应留有一定空隙。当压力升至 0.05 MPa 时，打开放气阀排除冷空气，如此重复2次。压力升至 $0.11 \text{ MPa} \sim 0.14 \text{ MPa}$ 时，恒压维持 $30 \text{ min} \sim 40 \text{ min}$ 。灭菌结束后，自然焖锅降压，防止培养基外溢。

5.4 接种

将冷却后的培养基放置于消毒过的超净工作台上,严格按照无菌操作规程,用经酒精灯火焰灼烧并冷却后的接种针挑取3~4块直径为2 mm~3 mm的母种块迅速转接于待接种摇瓶培养基内,接种结束后迅速封口,及时贴好标签。

5.5 培养

培养室使用前2 d,采用药物或者紫外线灯进行消毒处理。将接好的摇瓶菌种放入25℃恒温培养箱中静置培养1 d,然后置于磁力搅拌器或恒温摇床上培养,温度控制在25℃,转速140 r/min~160 r/min,培养6 d~7 d。

5.6 检验

摇瓶菌种培养期间,从摇瓶菌种中取样,分别在无菌琼脂平板上培养,35℃~38℃培养18 h~24 h,检测有无细菌菌落生长;25℃~28℃倒置培养3 d~5 d,观察有无霉菌、酵母菌等杂菌生长。每天检查和记录,及时拣出不合格菌种,检测项目和指标见附录B,检验方法应符合NY/T 1284的要求。

6 发酵罐菌种生产

6.1 发酵罐检查

选择生产上常用的气升式发酵罐,检查其全部阀门及压力表,要求完好、正常。重点检查空气过滤器,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。

6.2 发酵罐空消

使用前对发酵罐内、外和全部阀门用流水冲洗,达到无死角、内壁无任何残留。通入蒸汽进行空消,要求压力达到0.11 MPa~0.14 MPa时,灭菌40 min。

6.3 培养基配制

6.3.1 培养基配方

生产上常用配方见附录A.2。不溶于水的物料应过100目筛,培养基原料应符合NY/T 528的要求,用水符合GB 5749的要求。

6.3.2 投料与定容

首先培养基中的固形物用温水溶解,搅拌均匀,通过吸管或漏斗加入罐体,加水定容至所需体积(一般培养基投料量为罐体容量的70%~80%为宜),然后加入0.03%消泡剂,装料时保持进气管压0.05 MPa~0.10 MPa,通入无菌空气鼓动液体基料,使其混合均匀,灭菌料温上升至90℃时,关闭进气管。清理加料口,擦净残留的物料,拧紧上料口盖。

6.4 发酵罐实消

投料定容完成后,发酵罐夹层通入冷水,水位低于排水口20 cm,关闭进水阀后加热。待夹层蒸汽压力达到0.05 MPa时,缓慢排气,降压至0 MPa,关闭排气阀,再次升压至0.10 MPa~0.14 MPa,如此操作2次。同时打开空气过滤器灭菌,微开排气阀,维持50 min~60 min。

实消结束后，关闭空气过滤器灭菌阀和排气阀，缓慢打开夹层放水阀，夹层进水阀通过硅胶软管接入水管，通入冷水，进行冷却。当罐体压力表压力降至0.05 MPa时，打开气泵及时向发酵罐内通入无菌空气，防止罐体在冷却过程中产生负压造成污染，并使下部冷水较快向上冷却。通过罐体放气阀调节压力至0 MPa，直至罐体温度降至26℃~28℃，等待接种。

6.5 接种

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，制成火焰圈。打开罐体放气阀使压力降至0 MPa，把火焰圈套在接种口上，点燃火焰圈后关闭放气阀，在火焰的保护下用镊子去掉接种管上的牛皮纸和瓶塞，打开接种口，然后快、稳、轻的接入摇瓶液体菌种，然后拧紧接种口的螺丝。接种时间应控制在10 s以内，接种量为0.5%~1.0%。

6.6 培养

通过气泵充气和调整放气阀来调节罐体压力，前2 d调压力至0.02 MPa~0.03 MPa，第3 d起调压至0.05 MPa，温度控制在23℃~25℃，通气量逐步提高到1: (0.8~1)，进行液体菌种培养。大球盖菇液体菌种在上述条件下培养6 d~7 d可达到培养指标。

6.7 检测

6.7.1 取样

接种后第2 d开始隔天取样，用酒精灯外焰灼烧取样阀，弃掉最初流出的液体菌种，用酒精灯火焰封口取50 mL液体流入无菌三角瓶内，塞紧瓶塞，备用。取样后用酒精灯火焰将取样阀烧干。

6.7.2 检测

将所取样品接入无菌平板培养基上进行培养检测，检测方法参照5.6，检测项目和指标见附录B。

6.8 放罐

放罐前24 h进行检测，符合液体菌种放罐指标要求时，即可放罐接种，放罐指标见附录C。

7 贮藏

液体菌种生产好后，应立即使用，若因某些原因不能立即使用时，需降温保压处理。在培养器内通入无菌空气，保持罐压0.02 MPa~0.03 MPa，液温6℃~10℃可保存3 d，11℃~15℃可保存2 d。

8 留样

菌种和培养基均应留样，2℃~4℃下贮存，保存7 d以上备查，具体抽样要求如下：

- 每个批号的母钟留5支试管，于4℃~6℃下贮存；
- 摇瓶菌种，每个批号取样50 mL，用三角瓶留存；
- 发酵罐实消后的空白培养基，每个批号取样50 mL，用三角瓶留存；
- 放罐前24 h的发酵罐菌种，每个批号取样50 mL，用三角瓶留存；
- 发酵终止后的发酵罐菌种，每个批号取样50 mL，用三角瓶留存。

大球盖菇母种、摇瓶菌种和发酵罐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。生产档案记录项目参见附录D。

9 建档和追溯

建立生产档案记录、投入品档案记录、物候期档案记录，发现问题时便于追溯，保存期为3年，以备查阅。产品质量安全追溯执行NY/T 3819。

附 录 A

(资料性)

大球盖菇液体菌种生产上常用配方

A.1 摇瓶液体培养配方

配方一：马铃薯（煮汁）200 g，葡萄糖20 g，磷酸二氢钾1.5 g，硫酸镁1.5 g，水1 000 mL，pH自然；

配方二：马铃薯（煮汁）200 g，葡萄糖20 g，蛋白胨2.5 g，磷酸二氢钾1.0 g，硫酸镁1.0 g，维生素B1 10 mg，水1 000 mL，pH自然。

A.2 大球盖菇液体菌种生产上常用配方

配方一：黄豆粉8 g，玉米粉15 g，葡萄糖25 g，蛋白胨4 g，酵母膏5 g，磷酸二氢钾2 g，硫酸镁3 g，维生素B1、B6各2片，水1 000 mL，pH自然；

配方二：玉米粉10 g，麦麸100 g（煮沸取其滤液），蛋白胨4 g，葡萄糖15 g，磷酸二氢钾2 g，硫酸镁0.8 g，维生素B1、B6各2片，水1 000 mL，pH自然。

其中黄豆粉、玉米粉均过100目筛。

附 录 B
(资料性)

大球盖菇液体菌种检测方法及其指标

大球盖菇液体菌种检测方法及其指标见表B. 1。

表B. 1 大球盖菇液体菌种检测方法及其指标

检验项目	检验方法	具体指标
菌液色泽、形态及气味	感官检查	色泽：菌丝体白色，菌液淡黄色；形态：菌液粘稠不分层、清澈透明，菌丝体分布均匀，菌丝球悬浮均匀细小，固形物体积≤30%，菌丝球直径2 mm～3 mm；气味：有大球盖菇特有香气，无酸味、臭味等异味
细菌、霉菌、酵母菌等杂菌	平板培养检测和显微镜检测	不得检出细菌、霉菌、酵母菌等杂菌
菌丝球和菌丝形态	显微镜检测	菌丝生长旺盛，球状和丛状菌丝体大量分布；菌丝粗壮，有隔膜，可见锁状联合，菌丝结构特点一致，无异常形态菌丝
pH值测定	pH试纸或pH计测定	菌液pH应在5. 5～6. 5

附 录 C
(资料性)

大球盖菇液体菌种放罐指标

大球盖菇液体菌种放罐指标见表C. 1。

表C. 1 大球盖菇液体菌种放罐指标

项目	指标
菌液色泽	菌丝体呈白色，菌液呈淡黄色
菌液形态	菌液粘度高不分层，清澈透明；菌丝体分布均匀；菌丝球悬浮均匀、细小，固形物体积≤30%，菌丝球直径2 mm~3 mm
菌液气味	有大球盖菇培养时特有的香气，无酸味、臭味等异味，发酵罐排气口气味正常
菌丝湿重（g/L）	12~20
显微镜下菌丝形态和杂菌鉴别	球状菌丝体大量分布，菌丝粗壮，有隔膜，可见锁状联合，菌丝结构特点一致。无霉菌菌丝、酵母和细菌菌体
终止pH值	5.5~6.5

附 录 D

(资料性)

大球盖菇液体菌种生产记录事项

D.1 产地环境条件

包括空气质量、水源质量、菌种生产设施、配套设备及器具。

D.2 生产投入品使用情况

包括大球盖菇液体菌种配方、固体专用种配方、摇瓶菌种配方、菌种。

D.3 液体菌种生产关键环节

包括培养基灭菌、接种、培养、菌种检测、贮藏、留样。

D.4 其他

包括生产场所名称、菌种数量、记录人、入档日期。

参 考 文 献

- [1] GB/T 12728 食用菌术语
 - [2] DB 1310/T 345—2024 平菇液体菌种制备技术规范
-