

暗褐脉柄牛肝菌菌种生产技术规范

地方标准信息服务平台

2024 - 03 - 01 发布

2024 - 06 - 01 实施

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专利的责任。

本文件由景洪宏臻农业科技有限公司提出。

本文件由云南省农业标准化技术委员会（YNTC07）归口。

本文件起草单位：景洪宏臻农业科技有限公司。

本文件主要起草人：纪开萍、曹旻、纪光燕、王秋兰、罗顺珍、高丽霞、纪光玉、晏汐蓓、陶玲。

地方标准信息服务平台

暗褐脉柄牛肝菌菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了暗褐脉柄牛肝菌（*Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn）菌种的生产条件、工艺流程、母种制备、药瓶液体菌种制备、发酵罐液体菌种制备、栽培种制备、记录与档案、标志、包装、运输。

本文件适用于暗褐脉柄牛肝菌菌种生产。

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 4806.7 食品安全国家标准 食品接触用塑料材料及制品
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范
- GB 50073 洁净厂房设计规范
- NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程
- DB53/T 491 暗褐网柄牛肝菌菌种

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

暗褐脉柄牛肝菌 *phlebopus portentosus*

又名暗褐网柄牛肝菌，拉丁文学名 *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn，商品名黑牛肝菌，隶属于牛肝菌目Boletales、小牛肝菌科Boletinellaceae、脉柄牛肝菌属*Phlebopus*。

3.2

暗褐脉柄牛肝菌菌种 *phlebopus portentosus* spawn

暗褐脉柄牛肝菌菌丝体及其生长基质组成的液体和（或）固体繁殖材料，包括母种、摇瓶液体菌种、发酵罐液体菌种、栽培种。

3.3

母种 stock culture

经组织分离、菌种选育等方式获得的，以玻璃试管或培养皿为培养容器，培养基质为营养液添加琼脂制成的固体培养基，具有结实性的菌丝体纯培养物及其继代培养物。

3.4

摇瓶液体菌种 conical flask liquid spawn

由母种扩繁而得的，以摇瓶为培养容器，培养基质为营养液，具有结实性的菌丝体纯培养物。

3.5

发酵罐液体菌种 fermenter liquid spawn

由摇瓶液体菌种扩繁而得的，以发酵罐为培养容器，培养基质为营养液，具有结实性的菌丝体纯培养物。

3.6

栽培种 cultivated spawn

由母种、摇瓶液体菌种或发酵罐液体菌种等扩繁而得的，以一定容量的瓶子或袋子为培养容器，培养基质为富含木质纤维素或谷物粒等天然有机物添加营养液，具有结实性的菌丝体纯培养物。

4 生产条件

4.1 人员

人员应符合GB 14881中的相关规定，并经专业技术培训后，掌握暗褐脉柄牛肝菌基础知识及暗褐脉柄牛肝菌菌种生产技术规程。

4.2 生产环境

生产环境应符合NY/T 528中的相关要求。

4.3 设施

4.3.1 主要设施

主要设施包括原材料堆场、原材料库、培养基配制室、灭菌室、摇瓶接种室、摇瓶培养室、发酵罐配料室、发酵罐冷却室、发酵罐接种室、发酵罐培养室、栽培种冷却室、栽培种接种室、栽培种培养室、化验室等。

4.3.2 设施要求

设施应符合以下要求：

- 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；
- 墙壁和天花板应能防潮、防霉、防水、易清洗；
- 门窗应设置防蚊蝇纱网；
- 入口处应设置洗手、消毒和干手、风淋等洁净设施，并设置二次更衣；
- 设置有排气管道；
- 设置与职工人数相适应的更衣室、浴室、厕所和工作休息室；
- 净化操作区域应符合 GB 50073 中的相关要求；
- 摇瓶接种室、摇瓶培养室、发酵罐配料室、发酵罐冷却室、发酵罐接种室、发酵罐培养室、栽培种冷却室、栽培种接种室、栽培种培养室为万级无菌净化操作区域；
- 开盖接种重点区域局部达到无菌级百级。

4.4 设备

4.4.1 生产设备

包括但不限于发电设备、调温设备、空气压缩机、空气过滤器、高压蒸汽灭菌锅、搅拌机、装瓶设备、超净工作台、恒温回旋式振荡器、液体菌种发酵罐、接种设备等。

4.4.2 检验设备

恒温培养箱、冰箱、显微镜、磁力搅拌机、电子天平、pH计等。

4.5 器具

4.5.1 玻璃三角瓶

容量500 mL~1 000 mL，耐126 °C高温，无色或近无色，配备硅胶塞。

4.5.2 聚丙烯塑料瓶

符合GB 4806.7的规定，容量1 400 mL~1 600 mL，可耐受126 °C，无色或近无色，瓶口直径6 cm~9 cm，瓶盖应预留通气孔，并可夹垫海绵片或无纺布以防止培养期的污染。

4.5.3 其他

培养皿、接种铲/针、打孔器、试管、量杯、容量瓶、玻璃漏斗、定量定性滤纸等。

5 工艺流程

工艺流程为：母种—接种摇瓶培养—摇瓶液体菌种—接种发酵罐培养—发酵罐液体菌种—接种栽培瓶培养—栽培种。

6 母种制备

6.1 母种制备应符合 NY/T 528 的规定。

6.2 母种质量要求应符合 DB53/T 491 中的规定。

6.3 母种培养基配方可参照附录 A。

7 摇瓶液体菌种制备

7.1 培养基配制与分装

培养基配参见附录A。用水符合GB 5749要求，以4.5.1中的玻璃三角瓶分装培养基，装液量不超过三角瓶容量的60%。

7.2 灭菌

灭菌温度121 °C，灭菌时间30 min。灭菌完毕后，应自然降压，不允许强制降压。

7.3 冷却

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

7.4 接种

在超净工作台上，使用打孔器和接种铲/针，按无菌操作要求接种。每瓶接2~3块，直径6 mm~8 mm 琼脂培养基的母种菌块。

7.5 培养

7.5.1 培养室准备

培养室使用的前两天，宜用臭氧发生器消毒。恒温回旋式振荡器以1.8 g/L~2.2 g/L新洁尔灭或75%酒精进行擦拭消毒。

7.5.2 培养方法

接种后，置于恒温回旋式振荡器培养6 d~7 d，振荡频率150 r/min~180 r/min，培养温度26 ℃~29 ℃为宜。

7.6 检查

培养期间每天检查，及时去除污染或异常的菌种，并应留样用于检验。

7.7 质量要求

培养结束时，摇瓶液体菌种应达到表1中的技术指标及表2中的理化指标。

表 1 摇瓶液体菌种技术指标

特征	指标
菌丝形态	菌丝体球状，呈淡黄色，菌球大小均匀，形状规则，均匀悬浮分布于菌液中。
菌液形态	菌液黄至黄褐色，黏度大，澄清，静置不分层。
菌液气味	有类似于暗褐脉柄牛肝菌菇体的的芳香气味，无异味，如酸、臭味等。
菌丝显微形态	有大量分枝，分枝角度小于 45°，菌丝纤细，有锁状联合，无霉菌菌丝、酵母和细菌菌体。

表 2 摇瓶液体菌种理化指标

性质	指标
终止 pH 值	3.9~4.5
菌丝干重（g/L）	2~3.5

8 发酵罐液体菌种制备

8.1 投料前准备

检查罐上全部阀门、安全阀、压力表，要求完好，工作正常。对罐体内、外和全部阀门用流水进行冲洗，内壁无任何培养料残余物、清洁无死角。

8.2 培养基制备

参照附录A中的培养基配方进行配制。用水应符合GB 5749要求。

8.3 投料定容

- 8.3.1 将原材料分别用水溶解，倒入或用泵抽入发酵罐中。
- 8.3.2 加水定容至所需体积，培养基投料量不超过罐体总容积的 70%。
- 8.3.3 清理加料口，不应有残留的物料，拧紧上料口盖。

8.4 发酵罐实消

对投料后的发酵罐进行高压蒸汽灭菌，蒸汽压力0.105 MPa~0.125 MPa，温度121 ℃~124 ℃，保持20 min~40 min。

8.5 冷却、调压

8.5.1 灭菌结束，将发酵罐移至冷却室，通入无菌空气，开启冷水阀门采用水淋降温，冷却水通过下水道排出。

8.5.2 待温度降至 26 ℃，关闭冷水阀门，调整排气口与无菌空气进气阀门，使罐内压力维持在 0.03 MPa。

8.6 接种

按下列步骤完成接种：

- a) 发酵罐接种口底部以 95%酒精点燃火焰圈，灼烧 3 min；
- b) 调节排气阀，使罐内压力降至 0.01 MPa；
- c) 打开发酵罐接种口盖，在火焰上打开摇瓶液体菌种，灼烧瓶口后倒入发酵罐中，接种量为 1：600（v/v）；
- d) 用火焰灼烧接种口盖后迅速拧紧，移走火焰圈，调整罐压保持在 0.03 MPa。

8.7 培养

接种完毕，立即进入培养阶段，应满足下列条件：

- a) 罐内换气量 1：0.5~1.2（v / v，料液体积 / 空气体积）；
- b) 罐压保持在 0.02 MPa~0.05 MPa；
- c) 培养温度 26 ℃~29 ℃；
- d) 机械搅拌式发酵罐所使用的磁力搅拌频率为 20 Hz；
- e) 培养 4 d~6 d 时，观测其培养状况，达到表 3 中的技术指标，及表 4 中的理化指标，即可终止。

表 3 发酵罐液体菌种技术指标

特征	指标
菌球形态	菌丝体球状或絮状，淡黄色，菌丝球悬浮，菌丝球细小，菌丝束多可见，均匀分布于菌液中
菌液形态	菌液淡黄至黄褐色，透明澄清，静置不分层。
菌液气味	有类似于暗褐脉柄牛肝菌菇体的的芳香气味，无异味，如酸、臭味等。
菌丝显微形态	有大量分枝，分枝角度小于 45°，菌丝纤细，有锁状联合，菌丝内原生质分布均匀，无霉菌菌丝、酵母和细菌菌体。

表 4 发酵罐液体菌种理化指标

特征	指标
终止 pH 值	4.2~4.6
菌丝干重（g/L）	1.5~3.0

9 栽培种制备

9.1 培养基制备

参照附录A中的培养基配方进行配制，用水应符合GB 5749要求。

9.2 装瓶

以4.5.2中的聚丙烯塑料瓶分装培养基，装瓶量为每瓶湿重1000 g~1080 g，料面距瓶口2 cm~3 cm，中间打4个孔。

9.3 灭菌

灭菌温度123 ℃，灭菌时间100 min。灭菌完毕后，应自然降压。

9.4 冷却

灭菌后的菌种瓶放入冷却室冷却至16 ℃~20 ℃。

9.5 接种

在无菌级百级区域内，使用无菌管道在0.15 MPa压力下，将发酵罐液体菌种注射接种到菌种瓶中，每瓶接入液体菌种25 ml~30 ml。接种完成后，应写明接种日期、批次，送入培养室。

9.6 培养

避光培养。温度26 ℃~29 ℃，CO₂浓度控制在1 500 ppm~2 000 ppm、相对空气湿度60%~70%，培养28 d~30 d，菌丝长满。

9.7 检查

在培养期间，每天抽样开盖观察菌种萌发、生长情况，并由菌瓶外壁观察菌丝生长情况，对生长异常的菌瓶开盖检查，及时去除污染或异常的菌种，并应及时留样用于检验。

9.8 质量要求

应符合DB53/T 491的规定。

10 记录与档案

生产各个环节应填写生产记录，生产记录表参见附录B。由具体操作人员现场记录填写，由技术负责人审核，签字后归档，档案保存至少2年。

11 标签、标志、包装、运输、贮存

标签、标志、包装、运输、贮存应符合DB53/T 491的规定。

附录 A

(资料性)

暗褐脉柄牛肝菌菌种生产培养基配方

A.1 母种培养基配方

蔗糖20 g、磷酸二氢钾0.5 g、硫酸镁1 g、马铃薯200 g (切片煮汁)、琼脂粉10 g~15 g、定容至1 L, pH值自然。

A.2 摇瓶液体菌种培养基配方

A.2.1 马铃薯200 g (切片煮汁)、酵母膏2 g、葡萄糖20 g, 定容至1 L, pH值自然。

A.2.2 蔗糖20 g、磷酸二氢钾0.5 g、硫酸镁1 g、马铃薯200 g (切片煮汁)、豆粕粉 (过100目筛, 筛孔直径0.15 mm) 2 g、定容至1 L, pH值自然。

A.2.3 马铃薯200 g (切片煮汁)、麦麸2 g、蔗糖20 g、硫酸亚铁1 g、定容至1 L, pH值自然。

A.3 发酵罐液体菌种培养基配方

A.3.1 马铃薯淀粉1.5 g/L、糖蜜2 g/L、硫酸镁0.5 g/L、酵母膏2 g/L、氯化钾1 g/L、消泡剂0.25 g/L, pH值4~6。

A.3.2 马铃薯100 g/L (切片煮汁)、蔗糖1.5 g/L、麦麸2 g/L、维生素C为50 mg/L、硫酸镁1 g/L、磷酸二氢钾1 g/L、消泡剂0.25 g/L, pH值4~6。

A.4 栽培种培养基配方

A.4.1 按质量占比木屑20%、谷粒4%、蔗渣8%、红壤土8%、硫酸镁0.04%、磷酸二氢钾0.04%、酵母膏0.04%、含水量60%, pH值自然。

A.4.2 按质量占比木屑20%, 麦粒4%, 玉米秸秆8%, 红壤土8%, 硫酸镁0.04%, 磷酸二氢钾0.04%; 酵母膏0.08%、含水量60%, pH值自然。

附 录 B
(资料性)

暗褐脉柄牛肝菌菌种生产记录表

暗褐脉柄牛肝菌菌种生产记录表见表B. 1。

表 B. 1 暗褐脉柄牛肝菌菌种生产记录表

菌种批次编号：菌种编号：

	接种日期	培养基	接种数量	接种人
母种				
摇瓶液体菌种				
发酵罐液体菌种				
栽培种				

技术负责人审核：

地方标准信息服务平台

地方标准信息服务平台