

DB36

江西省地方标准

DB36/T 1869—2023

香菇菌种生产技术规程

Technical regulation for spawn production of *Lentinula edodes*

地方标准信息服务平台

2023-11-08 发布

2024-05-01 实施

江西省市场监督管理局 发布

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 菌种生产要求 2

5 母种生产 3

6 原种、栽培种生产 5

7 贮存与菌种生产档案 9

地方标准信息服务平台

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。

本文件由江西省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：江西省农业科学院农业应用微生物研究所。

本文件主要起草人：王赞萍、张诚、马吉平、钟国祥、王素贞、肖银润、熊小文，李伟红。

地方标准信息服务平台

香菇菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了香菇（*Lentinula edodes*）菌种的术语和定义、菌种生产要求、母种生产、原种与栽培种生产、贮存与菌种生产档案等内容。

本文件适用于江西省区域香菇母种、原种和栽培种菌种生产要求。

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 9688 食品包装用聚丙烯成型品卫生标准

GB 19170 香菇菌种

GH/T 1013 香菇

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 1731 食用菌菌种良好作业规范

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

香菇 *Lentinula edodes*

香菇又名香蕈、香信、香苑、冬菇、椎茸(日本)。属担子菌门（Basidiomycota）、伞菌亚门（Agaricomycotina）、伞菌纲（Agaricomycetes）、伞菌目（Agaricales）、光茸菌科（Omphalotaceae）、小香菇属（*Lentinula*）的一类木腐菌，子实体肉质或近肉质。

[来源：GH/T 1013-2015，3.1，有改动]

3.2

菌种 spawn

通过生产试验具有特异性、均一性和稳定性，且丰产性好、抗逆性强，生长在适宜基质上的培养物，包括母种、原种和栽培种。

3.3

母种 stock culture

经分离、杂交、诱变等各种方法选育得到的具有结实性的香菇菌丝体纯培养物及其继代培养物，以玻璃试管为培养容器和使用单位，也称为一级种、试管种。

[来源：GB 19170-2003，3.1，有改动]

3.4

原种 mother spawn

由母种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物。常以玻璃菌种瓶或塑料菌种瓶或 $(12\sim17)\text{cm}\times(22\sim28)\text{cm}\times(0.004\sim0.005)\text{cm}$ 聚丙烯塑料袋为容器，也称为二级种。

3.5

栽培种 planting spawn

由原种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物。常以菌种瓶（玻璃瓶或塑料瓶）或 $(15\sim17)\text{cm}\times(33\sim35)\text{cm}\times(0.004\sim0.005)\text{cm}$ 聚丙烯塑料袋为容器。栽培种只能用于栽培，不可再次扩大繁殖菌种，也称为三级种。

3.6

固体菌种 solid spawn

以富含木质素、纤维素和淀粉等天然有机物为主要原料，添加适量的有机氮源和无机盐类，具一定水分含量的固体培养基培养的纯菌丝体。

3.7

液体菌种 liquid spawn

指采用与母种营养成份相似但不添加琼脂的液体培养基培养而得到的纯菌丝体，菌丝体在培养基中呈絮状或球状，液体菌种可以作为原种或栽培种使用。

4 菌种生产要求

4.1 人员要求

香菇菌种生产所需要的技术人员和检验人员应经过专业培训、掌握香菇基础知识及香菇菌种生产技术规程要求。

4.2 场所和厂房要求

香菇菌种生产应选择地势高、通风良好、空气清新、水源近、排水通畅和交通便利的场所。周边无污染源。

香菇菌种生产厂房要求有各自隔离的摊晒场、原材料库和配料分装库。配套有配料室、搅拌室、装袋（瓶）室、灭菌室、冷却室、接种室、培养室（通风好，有纱窗）、菌种检测室及菌种冷藏库等各环节的设施。冷却室、接种室和培养室都应要有净化设施和无菌设施。

4.3 生产设备要求

香菇菌种生产需要电子秤、搅拌机、装袋（瓶）机、高压灭菌锅或常压灭菌锅、臭氧离子发生器、超净工作台或接种箱、恒温培养箱、培养架、摇床、菌种发酵罐、冰箱、空调、显微镜等设备。

5 母种生产

5.1 生产流程

培养基配制→分装试管→灭菌→冷却→无菌检验→接种→培养→检验→母种。

5.2 容器

试管一般选用18 mm×180 mm或者20 mm×200 mm。

5.3 培养基

培养基配方如下：

配方一：PDA培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基）：马铃薯200 g，葡萄糖20 g，琼脂20 g，加水至1000 mL。如果配方中的葡萄糖替换成蔗糖，称为PSA培养基。

配方二：CPDA培养基（综合马铃薯葡萄糖琼脂培养基）：马铃薯200 g，葡萄糖20 g，磷酸二氢钾2 g，硫酸镁0.5 g，琼脂20 g，加水至1000 mL。

5.4 分装

分装培养基至试管1/4~1/3处，用棉塞或硅胶塞封闭试管口，每5支试管为1捆，牛皮纸或报纸包棉塞，棉线扎紧，棉塞向上放置。棉塞应采用梳棉，不能使用脱脂棉。

5.5 灭菌

放入高压灭菌锅灭菌，在121℃~124℃（0.11 MPa~0.12 MPa）下灭菌25 min。

5.6 冷却

灭菌后温度降到55℃~65℃时，在空气清洁的室内摆斜面，要求斜面长度不超过试管长度的2/3。

5.7 无菌检验

抽取3%~5%冷却的试管，在28℃下培养48 h，无微生物长出为灭菌合格。

5.8 母种制备

5.8.1 超净工作台消毒

先用75%酒精棉球将超净工作台以及接种工具表面擦拭消毒，再打开紫外灯照射30 min。

5.8.2 香菇菌种分离

挑选生长长势良好、形状规则、未开伞、无虫蛀的香菇子实体作为种菇，用75%的酒精棉球对种菇表面擦洗消毒，并用无菌滤纸充分吸干后放置在洁净的培养皿中。用双手将菇体掰开，用无菌接种刀，在菌盖与菌柄交界处切取10 mm×5 mm“目”字形组织小块为接种材料。用接种针挑取一小块组织片，迅速地接入试管斜面培养基的中央，然后将试管口和棉塞在酒精灯火焰上过火灭菌后塞好，将接种后的试管放入25℃的恒温箱内培养，2 d~3 d后组织块及周围便长出白色的菌丝，待菌丝长满试管斜面即可。

5.8.3 转管培养

选取斜面上菌丝茁壮、长势优良的试管，用接种工具挑取（3~5）mm×（3~5）mm的菌块，按无菌操作要求，转接到新的试管培养基中，置于25℃的培养箱中培养15 d~20 d，当菌丝长满培养基表面，即成母种，可用于生产原种。

5.8.4 菌种检查

接种48 h后应做首次检查，挑拣出未萌发或污染母种。母种菌落长至直径2 cm左右时，进行第二次检查，待菌丝长满培养基前再检查一次，剔除或丢弃污染、生长不良的菌种。

5.8.5 母种检查要求

母种形态要求见表1。

表 1 香菇母种形态要求

项目	要求	检验方法
容器	完整、无破损、无裂纹、洁净	肉眼观察
棉塞或硅胶塞	干燥、整洁、松紧适度	肉眼观察
菌丝生长量	长满培养基	肉眼观察
菌丝体特征	洁白、平整、无角变	肉眼观察
菌落边缘	整齐	肉眼观察
菌丝体分泌物	无	肉眼观察
杂菌菌落	无	肉眼观察，必要时使用 5×放大镜观察
斜面背面外观	培养基不干缩，颜色均匀，无暗斑、无色素	肉眼观察

6 原种与栽培种生产

6.1 生产技术流程

培养基配制→装袋（瓶）→灭菌→冷却→接种→培养→检查→原种（栽培种）。

6.2 固体菌种生产

6.2.1 培养基配方

培养基配方如下：

- a) 配方一：杂木屑 78%、麦麸 20%、石膏粉 1%、白糖或红糖 1%；
- b) 配方二：杂木屑78%、麦麸18%、玉米粉2%、石膏1%、白糖或红糖1%；
- c) 配方三：杂木屑79%、麦麸20%、石膏1%；
- d) 配方四：杂木屑63%、棉籽壳15%、麦麸20%、石膏1%、白糖或红糖1%；

e) 配方五：杂木屑63%、玉米芯粉15%、麦麸20%、白糖或红糖1%、石膏1%。
所有原料应符合NY/T 1935规定。

6.2.2 拌料

按照培养料配方准确称取生产所需各种原材料。将原料加水混合后充分拌匀。培养料含水量控制在60%~65%。

6.2.3 容器

原种采用850 mL以下、瓶口直径 ≤ 4 cm、耐126℃高温的透明玻璃瓶，或采用(12~17) cm×(22~28) cm×(0.004~0.005) cm的聚丙烯塑料袋。

栽培种采用同原种要求的玻璃瓶子，或(15~17) cm×(33~35) cm×(0.004~0.005) cm的聚丙烯塑料袋。

以上聚丙烯塑料袋均要求符合GB 9688要求。

6.2.4 装袋(瓶)

采用装袋(瓶)机或人工进行装袋(瓶)，人工装袋(瓶)需用打孔器在袋口处打孔，孔直径1 cm~1.5 cm，深度为8 cm~12 cm，每袋(瓶)装培养基500 g~600 g。

6.2.5 灭菌

培养基装袋(瓶)后4 h内进行灭菌。高压灭菌：培养基在121℃~124℃(0.11 MPa~0.14 MPa)下灭菌2 h。常压灭菌：在3 h之内使灭菌温度达到100℃，保持100℃ 10 h~12 h。

6.2.6 冷却

灭菌完成后取出，置于净化冷却区域冷却至室温。

6.2.7 接种

6.2.7.1 接种前准备

先用75%酒精棉球将接种袋(瓶)以及接种工具表面擦拭消毒，放入接种箱或接种室内，再对接种箱或接种室进行消毒。

6.2.7.2 接种操作

6.2.7.2.1 原种

接种前一天备好母种，严格按照无菌操作要求，将接种工具在酒精灯火焰上方灼烧灭菌，冷却后挑取2 cm²左右的菌块到菌袋(瓶)中，每支母种接原种6~8袋(瓶)。

6.2.7.2.2 栽培种

接种前一天备好原种，严格按照无菌操作要求，将接种工具在酒精灯火焰上方灼烧灭菌，冷却后挑取5 g~6 g块状原种到菌袋(瓶)中，每袋(瓶)原种接栽培种60~100袋(瓶)。

6.2.8 培养

温度控制在22℃~26℃，空气湿度在60%~75%，通风避光培养。

6.2.9 质量检查

原种及栽培种在培养期间，按照NY/T 1284要求进行检查。

6.2.10 原种和栽培种形态要求

原种和栽培种形态要求见表2。

表 2 香菇原种、栽培种形态要求

项目	要求	检验方法
容器	完整、无破损、无裂纹	肉眼观察
棉塞或无棉盖体	干燥、整洁、松紧适度、能满足透气和滤菌要求	肉眼观察
培养基上表面距袋（瓶）口的距离	50 mm±5 mm	肉眼观察
菌丝生长量	长满培养基	肉眼观察
菌丝体特征	菌丝体洁白、浓密、粗壮，生长均匀，无高温抑制线	肉眼观察
菌落边缘	紧贴瓶（袋）壁、无干缩	肉眼观察
菌丝分泌物	允许少量无色至棕黄色水珠	肉眼观察
杂菌菌落	无	肉眼观察，必要时使用 5× 放大镜观察
子实体原基	无	肉眼观察

6.3 液体菌种生产

6.3.1 摇瓶液体菌种生产

6.3.1.1 培养基配方

培养基配方如下：

1) 配方一：葡萄糖20 g，蛋白胨5 g，酵母膏3 g，磷酸二氢钾3g，硫酸镁1.5 g，维生素B1 5mg，加水至1000 mL，pH 6.0~6.5；

2) 配方二：玉米粉20 g，葡萄糖20 g，酵母膏5 g，牛肉膏4 g，磷酸二氢钾2 g，硫酸镁1 g，维生素B1 5 mg，加水至1000 mL，pH 6.0~6.5。

玉米粉应过20目筛。

6.3.1.2 培养基配制

按液体培养基配方配制，玉米粉先用水搅拌均匀，装入三角瓶中，混合均匀，装液量为摇瓶容量的2/5~3/5，封口膜（耐高温组培封口膜）或棉塞封口，棉塞需用硫酸纸或牛皮纸包扎。

6.3.1.3 灭菌

将分装好的摇瓶放入灭菌锅内，锅内留有一定的空隙。灭菌蒸汽压力升至0.1 MPa~0.12 MPa，恒压维持35 min~40 min。

6.3.1.4 接种与培养

待培养基冷却后置于消毒过的超净工作台上，用经火焰消毒并冷却后的接种针挑取5~6块（3~5）mm ×（3~5）mm的母种块迅速转接于待接种摇瓶培养基内。将接种后的三角瓶置于摇床上振荡培养，转速为160 rpm，23℃~25℃下培养7d。摇瓶培养期间应定期检查，及时剔除污染杂菌的三角瓶。

6.3.2 发酵罐液体菌种生产

6.3.2.1 煮罐、空消

发酵罐初次使用、出现杂菌、长期放置、更换品种等情况出现其一时，应煮罐和空消。蒸汽压力0.15 MPa、温度126℃，维持40 min。

6.3.2.2 液体菌种培养基配方

培养基配方如下：

a) 配方1：玉米粉20 g，葡萄糖20 g，酵母膏5 g，牛肉膏4 g，磷酸二氢钾2 g，硫酸镁 1 g，维生素B1 5 mg，消泡剂0.3 g，加水至1000 mL，PH 6.0~6.5。

b) 配方2：马铃薯100 g（煮汁），葡萄糖10 g，麦麸40 g（煮汁），蛋白胨2 g，磷酸二氢钾2 g，硫酸镁1 g，消泡剂0.3 g，加水至1000 mL，pH 6.0~6.5。

c) 配方3：玉米粉20 g，麦麸20 g（煮汁），葡萄糖20 g，蛋白胨5 g，磷酸二氢钾2 g，硫酸镁1 g，消泡剂0.3 g，加水至1000 mL，pH 6.0~6.5。

玉米粉应过20目筛。

6.3.2.3 投料和定容

用水把淀粉、玉米粉等原料搅拌均匀，不能有结块，通过吸管或漏斗加入罐体，装液量为罐体容量的70 %~80 %，加入0.03 %消泡剂，通入空气搅拌1 min~2 min，混合均匀，拧紧上料口盖。

6.3.2.4 灭菌

发酵罐加热层通入冷水，水位低于排水口20 cm，关闭进、排水阀门加热。待加热层蒸汽压力达到0.05 MPa时，缓慢打开排气阀降压至0 MPa，关闭排气阀，再次升压至0.11 MPa，待发酵罐培养层蒸汽压力达到0.05 MPa时，缓慢打开排气阀降压至0 MPa，关闭排气阀，再次升压至0.11 MPa，同时打开空气过滤器灭菌，微开排气阀，维持50 min~60 min。

6.3.2.5 冷却

灭菌结束，关闭空气过滤器灭菌阀与排气阀，缓慢打开空气过滤器排水阀降压至0 MPa，加热层通入冷水降温；同时缓慢打开发酵罐培养层排气阀降压，待压力接近0 MPa时向培养层内通入无菌空气，调整排气阀，维持罐压0.04 MPa~0.05 MPa，培养液温度降至25℃以下时，关闭加热层进水阀。

6.3.2.6 接种与培养

接入摇瓶菌种，接种量为2 %~4%。将摇瓶接种管和发酵罐接种口用75 %酒精消毒，用95 %酒精的火焰圈套在接种口上，轻微打开呼吸器阀门，使发酵罐压力为0 MPa。点燃火焰圈，在火焰保护下用镊子

去掉接种管上的牛皮纸和瓶塞，打开接种口阀门，将接种管插入接种口，将摇瓶菌种注入发酵罐。拔出接种管，关闭接种阀门，去掉火焰圈，打开空气压缩机。

根据菌丝生长情况，适时调节进气按钮，通入适量无菌空气，同时调节排气阀，维持罐压0.01 MPa～0.03 MPa，培养温度控制在23℃～25℃，培养9 d～10 d。

6.3.3 液体菌种形态要求

液体菌种形态要求见表3。

表 3 香菇液体菌种种形态要求

项目	要求	检验方法
菌液色泽	菌丝球或菌丝片段呈白色，菌液呈浅棕色	肉眼观察
菌液形态	培养液澄清透明，菌丝球、菌丝片段均匀悬浮于液体中，不分层，直径小于 3.5 mm	肉眼观察
菌液气味	有香菇液体培养时特有的香气，无酸、臭等异味，发酵罐排气口气味正常，无明显改变	肉眼观察
菌丝形态	可见香菇菌种液体培养中特有的菌丝形态，菌丝粗壮，分支较少，无杂菌	显微镜观察

7 贮存与菌种生产档案

7.1 贮存

固体菌种在1℃～4℃下避光保藏，保藏期不超过50 d。液体菌种生产后应立即使用，如不能立即使用，需进行贮藏，贮藏环境温度低于20℃。发酵罐内液体菌种，持续通无菌空气，保持罐压0.01 MPa～0.03 MPa，可存放2 d。

7.2 菌种生产档案

生产档案应载明生产地点、时间、数量、培养基配方、培养条件、菌种来源、操作人、技术负责人、检验记录、菌种流向等内容。生产档案应当保存至菌种售出后2年。