

红托竹荪液体菌种生产操作规程

Technical inspection of liquid spawn of *Phallus rubrovolvatus*

地方标准信息服务平台

2024 - 05 - 15 发布

2024 - 09 - 01 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 生产技术条件 2

5 生产技术要求 2

6 摇瓶液体菌种生产技术 3

7 发酵罐菌种生产技术 4

8 贮藏 6

9 记录和存档 6

附录 A（资料性） 红托竹荪液体菌种生产工艺流程 7

附录 B（资料性） 红托竹荪液体菌种 8

附录 C（资料性） 红托竹荪干重测定方法 9

附录 D（资料性） 红托竹荪液体菌种 10

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。

本文件由贵州省农作物品种资源研究所提出。

本文件由贵州省农业农村厅归口。

本文件起草单位：贵州省农作物品种资源研究所、纳雍县农业农村局、剑河县农业农村局、贵州省果树蔬菜工作站。

本文件主要起草人：桂阳、黄万兵、朱国胜、刘宏宇、张军、周韬、卢颖颖、龚光禄、杨通静、杨铎沂、王沁、周剑南、尚念杰、黄晓润、李彪、刘倾城、胡腾文。

地方标准信息服务平台

红托竹荪液体菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了红托竹荪液体菌种生产术语和定义、生产技术要求、液体菌种生产工艺与流程、贮藏、记录和存档等。

本文件适用于红托竹荪液体菌种的生产。

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 150.2 压力容器 第2部分：材料
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- 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 1742 食用菌菌种通用技术要求
- NY/T 1846 食用菌菌种检验规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

红托竹荪 *Phallus rubrovolvatus* (M. Zang, D.G. Ji & X.X. Liu) Kreisel

红托竹荪，属于担子菌门、腹菌纲、鬼笔目、鬼笔科、鬼笔属。多数群生或丛生，由菌盖、菌柄、菌裙和菌托组成，可食用。

3.2

液体菌种 liquid spawn

用于生产和销售的菌丝体及其生长基质组成的液体繁殖材料，包括摇瓶液体菌种和发酵罐菌种。

3.3

液体菌种发酵罐 cultivation apparatus for liquid spawn

进行液体菌种培养的专用设备，符合GB 150.2要求。

3.4

液体菌种接种器 liquid interface trap inoculator

能将液体菌种从培养器中按无菌操作要求转接到固体培养基物料上的设备。

3.5

固体种 solid spawn

在玻璃试管/平皿上固体培养基内生长的纯菌丝体培养物。

4 生产技术条件

4.1 液体菌种生产场所选择

4.1.1 液体菌种生产场所要求

生产场所符合NY/T 528的环境要求。且建在交通便利、水源和电源充足，无有害气体、烟雾和灰沙，远离垃圾场和畜禽场舍厂房。发酵车间增设摇瓶菌种培养室和发酵罐菌种培养室，设计符合GB 50073的要求。

4.1.2 液体菌种生产车间要求

4.1.2.1 液体菌种生产车间地面应防水、防滑、防腐蚀、防渗漏和易清洗，有适当的排水坡度（1.0%~1.5%）和良好的排水系统。墙壁和天花板应防潮、防霉、防水和易清洗。入口处应设置洗手、消毒和干手设施，用水符合GB 5749的要求。应安装排气管道、进水管、蒸汽管道、热水循环管道和排风设备，配置封闭式废物桶，用水符合GB/T 6682的要求。

4.1.2.2 液体菌种接种间应设置缓冲间。灭菌间、冷却间和培养间应符合NY/T 528要求。

4.2 生产设备与设施

4.2.1 生产设备

包括液体菌种发酵罐、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、净化工作台、恒温摇床、恒温培养箱、除湿机和自备电源（发电机）等。其中液体菌种发酵罐、高压灭菌锅和蒸汽锅炉应符合GB 150.2要求；高效空气过滤器应对粒径 $0.1\ \mu\text{m}$ ~ $0.2\ \mu\text{m}$ 粒子的捕集效率在99.999%以上。

4.2.2 基本设施

液体菌种生产车间应包含配料间、灭菌室、冷却间、接种间、培养间、发酵间、化验室和菌种室等，其规模要配套，布局合理，有调温设施。化验室有相应的实验检测设备，菌种室有灭菌设施和常规用具。

5 生产技术要求

5.1 菌种选择

选用高产、优质、抗逆性强和商品性好的红托竹荪品种，生产质量符合NY/T 1742的要求。引种应进行适应性出菇验证。

5.2 培养原料

符合NY/T 528要求，生物制剂及水不溶天然物料应不小于60目。

5.3 生产工艺流程

见附录 A。

6 摇瓶液体菌种生产技术

6.1 培养基配方

见附录B。

6.2 分装

摇瓶液体培养基分装量不超过摇瓶容积的60%。

6.3 灭菌

在0.120 MPa~0.140 MPa、温度121℃时，灭菌 30 min~40 min。

6.4 冷却

冷却间使用前应进行清洁和除尘处理。将灭菌后摇瓶液体培养基放置在冷却间，液体培养基温度冷却到室温到25℃。

6.5 接种

在净化工作台上用接种工具挑取3~5块红托竹荪固体种（3 mm×3 mm~4 mm×4 mm）到摇瓶液体培养基中，贴标签。

6.6 培养

6.6.1 培养条件

使用摇床培养室的前两日，采用药物或者紫外灯消毒。应在振频120 r/min~125 r/min，振幅6 cm~10 cm，恒温25℃的摇床上，培养12 d~15 d。

6.6.2 培养期检查

摇瓶液体菌种培养期间应定期检查，看其是否符合表1和表2指标，拣出不合格菌种，并留样。

表1 摇瓶液体菌种感官指标

项 目	指 标
菌液色泽	菌液呈淡黄色，澄清透明。
菌液形态	菌液稍粘稠，菌丝球较稠密，并且在2 h~3 h间均匀悬浮于液体中，不分层。
菌液气味	浓烈的红托竹荪菌香味，无酸味、无臭味、无异味。发酵罐排气口的气味正常，无明显改变。

表2 摇瓶液体菌种理化指标

项 目	指 标
pH 值	培养液灭菌前初始 pH 值4.3左右，灭菌后4.2左右，发酵结束时为3.0~3.9左右。
菌丝干重（g/100 ml）	≥1.0 g/100 mL。
菌丝形态和杂菌鉴别	有菌丝球和丛状菌丝体，菌丝粗壮，显微镜下见锁状联合结构；无霉菌、酵母菌和细菌菌体。
留存样品无菌检查	平板上红托竹荪菌丝生长，无霉菌、酵母菌和细菌等杂菌生长。

7 发酵罐菌种生产技术

7.1 空气过滤器的检查与灭菌

7.1.1 检查

空气过滤器滤芯使用前应拆分检查，无油污、料污、无破损，外壳内外壁无污物、光亮洁净。

7.1.2 灭菌

空气过滤器应高压蒸汽灭菌，压力0.120 MPa~0.140 MPa、温度121℃下，灭菌时间40 min~50 min。

7.2 发酵罐检查与清洁

7.2.1 检查

检查罐上的安全阀和压力表，应工作正常。

7.2.2 清洗

用流水冲洗罐体内、外，无培养料残余物。

7.2.3 空消

在发酵罐罐体压力0.120 MPa~0.140 MPa和温度121℃的条件下，灭菌30 min~40 min。

7.3 菌种培养基要求与制作

7.3.1 原料要求

同 5.2。

7.3.2 培养基配方

见附录A。

7.3.3 投料与定容

将配制好的液体培养基原料充分溶解，加适量温水搅拌均匀，倒入或用泵抽入发酵罐中，加水定容至不超过罐体总容积的80%，加入0.03%消泡剂。装料时保持进气管压0.10 MPa~0.15 MPa，通气鼓动液体基料，使料混匀，至灭菌料温上升到90℃时，关闭进气管。清理加料口，拧紧上料口盖。

7.3.4 实消

投料定容完成后，利用外源蒸汽实消。在0.120 MPa~0.140 MPa和培养基温度121 ℃，灭菌30 min~40 min（发酵罐容积100 L~1000 L）。

7.3.5 冷却和调压

实消灭菌结束后将冷水通入发酵罐夹层或者内置冷却系统中，使培养基降温至24 ℃~26 ℃。当压力降到0.05 MPa时，及时向发酵罐内通无菌空气，并维持罐压0.02 MPa~0.04 MPa。

7.4 接种

火焰接种法。把火圈放在投料口的上方点燃，打开进料口盖，把摇瓶液体菌种迅速投入罐中，接种量为1%~3%，迅速盖好进料口盖、拧紧，移走火焰圈。

7.5 发酵罐菌种培养条件

培养中控制进气阀的无菌空气通风量1 m³/h~2.5 m³/h，保持罐压0.02 MPa ~ 0.04 MPa、罐体 CO₂ 浓度不高于1500 ppm，培养温度 24 ℃~25 ℃，培养10 d~12 d。

7.6 留样及检测

7.6.1 留样

固体种应留样备查，按照NY/T 528要求留样，数量应以每个批号3~5 支或皿。每个批号摇瓶菌种取1 mL装于2 mL的冻存管，留存12 支。每个批号发酵罐灭菌后的空白培养基取样取1 mL装于2 mL的冻存管，留存12 支；每个批号放罐前48 h从发酵罐中取1 mL装于2 mL的离心管，留存12 支；每个批号发酵终止后取样1 mL装于2 mL的冻存管，留存12 支；样品均放置在4 ℃~6 ℃下保存7 d以上。

7.6.2 无菌检测

7.6.2.1 摇瓶液体菌种样品和发酵罐灭菌后的空白培养基样品应在无菌检测琼脂平板上 25℃恒温培养 2 d~5 d，及时观察有无杂菌生长，按照 NY/T 1846 操作。

7.6.2.2 培养过程中从发酵罐中取出的样品应及时镜检与无菌检测，确定菌丝生长状态。

7.7 发酵罐菌种放罐指标

7.7.1 菌种感官指标

应符合表3的要求。

表3 感官指标

项 目	指 标
菌液色泽	菌丝球从淡黄色转变为白色，菌液呈白色，澄清透明。
菌液形态	菌液稍粘稠，菌丝球稠密，均匀悬浮于液体中，并且在2 h~3 h不分层。
菌液气味	浓烈的红托竹荪香味，无酸味、无臭味、无异味。发酵罐排气口的气味正常。

7.7.2 菌种理化指标

发酵罐菌种理化指标见表2。

表4 理化指标

项 目	指 标
pH值	发酵罐培养时灭菌前pH值4.3左右，灭菌后4.2左右。发酵结束为3.0~3.9左右。
菌丝干重（g/100 ml）	≥1.3 g/100mL。
菌丝形态和杂菌鉴别	显微镜下大量菌丝球，菌丝粗壮，有锁状联合结构。无霉菌、酵母菌和细菌菌体。
留存样品无菌培养	平板有红托竹荪菌丝生长，无霉菌、酵母菌和细菌等杂菌生长。

8 贮藏

液体菌种应立即使用。否则，应向发酵罐内持续通气保持罐压 0.02 MPa~0.04 MPa，常温下可保存 1 d。

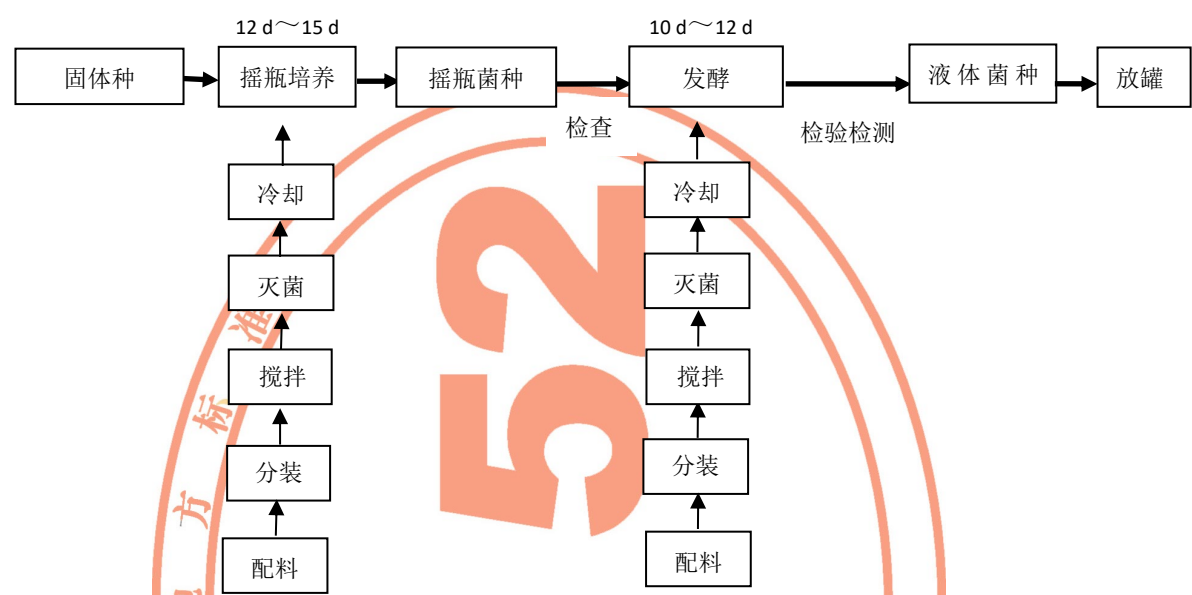
9 记录和存档

发酵罐菌种生产的每个环节都要有详实的生产记录，并归档保存至少一个生产周期。

地方标准信息服务平台

附录 A
(资料性)
红托竹荪液体菌种生产工艺流程

见图A. 1。



图A. 1 红托竹荪液体菌种生产工艺流程

附 录 B
(资料性)
红托竹荪液体菌种

B.1 红托竹荪平板培养基配方

红托竹荪平板培养基配方包括但不限于：

葡萄糖5 g、果糖25 g、蛋白胨2.5 g、硫酸铵2.5 g、竹叶20 g（煮汁）、VB₆0.16 g、IAA1.6 mg、琼脂8 g、木屑100 g、马铃薯50 g汁液（煮汁）、马尾松屑20 g（煮汁）、玉米粉10 g、水1000 mL、pH自然。将马尾松、竹叶、马铃薯（切片）准确称取后用电磁炉煮汁（20 min~30 min），用4层纱布过滤留汁，倒入锅中在电磁炉中加热，加入其它试剂，煮沸，装入锥形瓶中，于高压灭菌锅中121℃灭菌30 min，出锅后于超净工作台中倒平皿备用。

B.2 红托竹荪液体菌种培养基配方

红托竹荪液体菌种培养基配方包括但不限于：

葡萄糖5 g、果糖25 g、蛋白胨5 g、酵母粉1 g、硫酸铵2.5 g、磷酸二氢钾1 g、木屑70 g（煮水过滤）、玉米粉5 g、自来水1 L，调pH值至4.3左右。

地方标准信息服务平台

附 录 C
(资料性)
红托竹荪干重测定方法

C.1 红托竹荪干重测定方法

红托竹荪液体发酵菌丝体收集及干重测定方法包括但不限于：

用60 目筛网或2 层纱布过滤收集菌丝球，用蒸馏水反复冲洗干净，置于60 ℃电热恒温鼓风干燥箱中烘干至恒重，用电子天平称量菌丝干重。



附 录 D
(资料性)
红托竹荪液体菌种

D. 1 红托竹荪液体菌种

见图D. 1和D. 2。



图D. 1 摇瓶菌种



图D. 2 发酵罐菌种

地方标准信息服务平台