

DB5117

四川省（达州市）地方标准

DB5117/T 94—2024

大球盖菇液体菌种生产技术规程

Technical regulations of liquid spawn culture by *Strophara rugosoannulata*

2024-03-28 发布

2024-04-15 实施

达州市市场监督管理局 发布

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。

本文件由达州市农业科学研究院提出。

本文件由达州市农业农村局归口。

本文件起草单位：达州市农业科学研究院。

本文件主要起草人：赵辉、孙传齐、何雪梅、李彪、王志德、马洁、付亮、赖泉溟、邓力。

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条件、菌种选择、液体菌种生产技术及工艺流程、档案记录与贮藏等技术。

本文件适用于大球盖菇液体菌种的生产。

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 钢制压力容器
GB 5749 生活饮用水卫生标准
GB 50073 洁净厂房设计规范
GB/T 12728 食用菌术语
GB/T 13554 高效空气过滤器
GB 22207 容积式空气压缩机安全要求
NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程
NY 5099 无公害食品食用菌栽培基质安全技术要求

3 术语和定义

GB/T12728 界定的下列术语和定义适用于本文件。

3.1

大球盖菇 liquid spawn of *strophara rugosoannulata*

别名皱环球盖菇、皱球盖菇、酒红球盖菇、裴氏球盖菇、赤松茸,隶属于担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、球盖菇科、球盖菇属食用菌(*strophara rugosoannulata*)。

3.2

液体菌种 liquid spawn

菌丝体及其生长基质组成的液体繁殖材料,包括用于发酵罐菌种扩繁的摇瓶液体菌种、用于代料栽培发酵罐菌种。

3.3

液体菌种发酵罐 cultivation apparatus for liquid spawn

也称液体菌种培养罐，进行液体菌种培养的不锈钢专用设备。

3.4

发酵罐空消 empty fermenter sterilization

对尚未加水投料的空发酵罐进行高压灭菌。

3.5

发酵罐实消 fermenter sterilization

对投料后的发酵罐进行高压蒸汽灭菌。

3.6

液体菌种接种器 liquid interface trap inoculators

将发酵罐中液体菌种转接到固体培养料的无菌设备。

3.7

接种量 inoculation amount

接入发酵罐的菌种数量，以菌种体积与培养基体积的百分比表示。

3.8

终止 pH initial pH value of medium

液体菌种达到放灌指标时的培养基 pH。

3.9

放罐 empty pot

液体菌种菌丝生长达到生长对数期时，从发酵罐通过传送管在 0.15MPa 无菌条件下将菌种注射到固体培养料中。

4 生产条件

4.1 技术人员

具有食用菌液体菌种生产或检验从业资格证专业技术人员。

4.2 生产环境

4.2.1 基本要求

空气优良、地势高燥、交通方便、通风良好、水源电源充足、排水畅通，其中水源应符合 GB 5749 的规定。

4.2.2 环境卫生要求

大球盖菇液体菌种生产场所应有硬质路面、排水良好，远离畜禽养殖场、排污口、工矿业“三废”及微生物、烟尘和粉尘等污染源。

4.2.3 液体菌种生产场所

地面应能防水、防腐蚀、防渗漏、防滑，易清洗，应有 $1.0^{\circ} \sim 1.5^{\circ}$ 的排水坡度和良好的排水系统，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。

4.3 生产设施、设备

4.3.1 设施

原料库、配料间、发菌间、冷却间、接种间、培养室、检测室规模配套，布局合理，有调温设施。设计应符合 GB 50073 的要求。

发菌间应配备水、电（停电需配备发电机）、蒸汽、空气四大动力系统，建立万级局部百级无菌室净化操作室，保障液体菌种生产。

4.3.2 设备

液体菌种培养器、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、冰箱、普通光学显微镜、磁力搅拌机、磅秤、天平、酸度计等。其中液体菌种培养器、高效空气过滤器、高压灭菌锅和蒸汽锅炉应检验合格，符合 GB 150、GB/T 13554、GB 22207 的要求。

4.3.3 培养基质

应符合 NY 5099 的规定。

5 菌种选择

应选用经省级以上非主要农作物品种审定委员会审（认）定或登记（备案）的高产、优质、抗逆性强、商品性好的品种，菌种生产应符合 NY/T 528 的规定。

6 液体菌种生产技术要求

6.1 液体菌种生产工艺流程图

液体菌种生产工艺流程图见图 1。

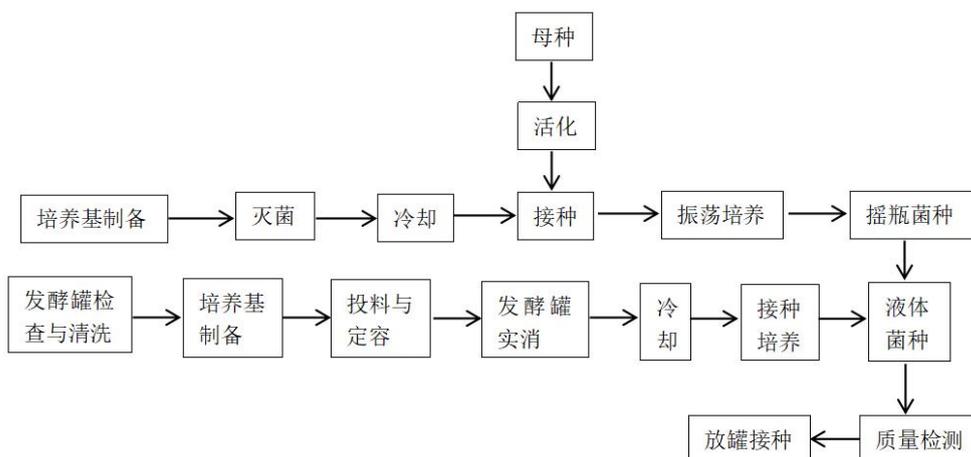


图 1 液体菌种生产工艺流程图

6.2 生产要求

6.2.1 母种制备

应符合 NY/T 528 要求。母种培养基配方：马铃薯（煮汁）200g/L，葡萄糖 20g/L，琼脂粉 20g/L，pH 自然。

6.2.2 摇瓶菌种制备

6.2.2.1 培养基配制与分装

按照附录 A 中 A.1 的配方配制培养基，用水应符合 GB 5749 的要求。培养基用 500ml 三角瓶分装，装量为每瓶 150ml~250ml，瓶口用 14cm×14cm PP 聚丙烯膜封口并用耐高温塑料胶圈扎紧。

6.2.2.2 灭菌

123℃、0.14MPa 灭菌 30min，期间在压力升到 0.1 MPa 时，打开放气阀排尽冷空气。灭菌结束后，自然焖锅降压，防止培养基外溢。

6.2.2.3 冷却

将灭菌后的液体培养基放入超净工作台中，冷却至 20℃~25℃。

6.2.2.4 接种

在无菌条件下，严格按无菌操作要求接种。用接种针挑取 5~6 块 3mm~5mm 的母种块迅速转接于摇瓶培养基内，每支母种接 5 瓶~7 瓶，接种后及时贴好标签。

6.2.2.5 培养

接种前 2d，用臭氧发生器和 75%酒精分别对培养室及培养器消毒。接种后放入 25℃恒温箱中静置培养 1d，后置于恒温摇床上培养，温度控制在 25℃~28℃，转速 140 r/min~160r/min，培养时间 6 d~7 d 至菌液出现直径 3mm~5mm 均匀菌丝球。期间每天观察，及时去除污染菌种。

6.2.3 液体菌种制备

6.2.3.1 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。对罐内、外和全部阀门用流水冲洗，达到无死角、内壁无任何残留物。在发酵罐中加入适量的水（距离观察窗下边缘 5cm 左右），完全打开罐体上排气阀门，将排气管接入下水管道，将无菌空气接入发酵罐底部的进气口，通入无菌空气，让进口气压表维持 0.01Mpa。

6.2.3.2 培养基制备

应符合 NY/T528、GB5749 要求。培养基配方见附录 A 中 A.2，其中黄豆粉、玉米粉需过直径 0.15 mm 的孔筛。

6.2.3.3 煮罐和空消

培养器初次使用、出现杂菌、长期放置、更换品种时，都要在 121℃、0.12 MPa 下灭菌 40 min 进行煮罐和空消。

6.2.3.4 投料和定容

将附录 A 中 A.2 的原材料用温水溶解后倒入发酵罐中。加水定容至所需体积，培养基投料量为罐体总容积的 70%，加入 0.03 %消泡剂后清理加料口至无残留物料，拧紧上料口盖。

6.2.3.5 气动搅拌

调整控温箱温度至 125℃，打开罐体加热棒开始对罐体进行加热，在 100℃之前一直开启罐体夹层出水阀，以放掉夹层里的虚压和多余的水。温度在 70℃以下时打开空气压缩机通过储气罐和空气过滤器对罐体培养基进行气动搅拌，防止罐内液体结块。

6.2.3.6 液体培养基灭菌

当罐体内培养基达 70℃时，关闭气泵。当夹层出水阀出热蒸汽 3 min~5 min 后关闭。发酵罐内蒸汽压力达到 0.105Mpa~0.125Mpa，温度达到 121℃~124℃，保持时间 1 小时。

6.2.3.7 冷却、调压

灭菌结束，开启冷水阀门将冷水通入发酵罐夹层或者内置冷却系统中循环降温，夹层内冷却循环水排出。待温度降至 100℃，罐压降至 0.08 Mpa，开始通入无菌空气，打开上排气阀，持续通入冷凝水。待温度降至 26℃，停止通入冷凝水，调整排气口与无菌空气进气阀门，使罐内压力维持在 0.05Mpa。

6.2.3.8 接种

接种应按照下列步骤完成：

- 在接种口底部点燃火焰圈；
- 调节排气阀，使罐内压力降至 0.01Mpa；
- 打开进料口盖，在火焰上打开摇瓶菌种，灼烧瓶口后倒入发酵罐中，接种量为 0.5%~1%；
- 用火焰灼烧接种口盖，迅速拧紧进料口盖，移走火焰圈，调整罐压保持在 0.05 Mpa。

6.2.3.9 菌种培养

通过气泵充气和调整放气阀调节罐体压力至 0.02 MPa~0.03 MPa，温度控制在 24±1℃、通气量为 1:0.8 条件下进行液体菌种培养。

6.2.3.10 检验

接种后第 4 d 进行检测，感官检验指标（见附录 B）。首先用酒精火焰球灼烧取样阀 30 s~40 s 后，弃掉最初流出的少量液体菌种，然后用酒精火焰封口直接放入经灭菌的三角瓶中，塞紧棉塞，取样后用酒精火焰把取样阀烧干，以免杂菌进入造成污染。将样品带入接种箱接入试管斜面或平板培养基上，放入 25℃恒温培养 48 h~72 h，观察菌丝生长状况和有无杂菌污染；若无细菌、霉菌等杂菌菌落生长，则表明该样品无杂菌污染。

6.2.3.11 放罐接种

培养 6d~7 d 后，观察培养状况，达到放罐指标（见附录 C）即可放罐。放罐前 48 小时应对液体菌种进行批次抽样检测，质量合格即可用于接种。终止发酵后，罐内外温度均应保持在 24℃±1℃，4 小时内完成接种。接种环境应符合 GB 50073 标准要求，液体接种器应经高压灭菌后使用，每袋（瓶）接种量 15 mL~30 mL。

6.2.3.12 留样与检验

菌种和培养基均应留样，2℃~4℃保存 7d 备查。

母种应以每个批号 3 支~5 支，于 4℃~6℃下贮存，贮存至经转接的栽培袋正常发菌；

摇瓶菌种使用时取样 30 mL~40 mL，用三角瓶留存；

发酵罐实消后的空白培养基取样 30 mL~40 mL，用三角瓶留存；

放罐前 48 小时从发酵罐中取样 30 mL~40 mL，用三角瓶留存；

发酵终止后取样 80 mL~100 mL，用三角瓶留存。

7 档案记录

母种、摇瓶液体种和发酵罐液体菌种生产的每个环节应由具体操作人员现场填写详实的生产记录，定期审核、签字后归档，生产记录档案应保留至本批次菌种栽培出菇为止。

8 贮藏与运输

8.1 贮藏

8.1.1 不能立即使用，应进行贮藏。贮藏环境温度应低于 20°C。

8.1.2 发酵罐内液体菌种，持续通无菌空气，保持罐压 0.02MPa~0.03MPa，可存放 2d。

8.2 运输

大球盖菇液体菌种不宜长途运输，生产后应立即使用。

附 录 A
(资料性)
大球盖菇液体菌种培养基建议配方

A.1 摇瓶液体培养基配方

摇瓶液体培养基配方如下：

- a) 马铃薯（煮汁）200g/L，葡萄糖20g/L，磷酸二氢钾1.5g/L，硫酸镁1.5g/L，pH自然。
- b) 葡萄糖20g/L，蛋白胨2.5g/L，磷酸二氢钾1.0g/L，硫酸镁1.0g/L，维生素B₁ 10mg/L，pH自然。

A.2 发酵罐液体培养基配方

发酵罐液体培养基配方如下：

- a) 蔗糖8.75g/L，葡萄糖8.75g/L，淀粉3.1g/L，VB₁ 5 mg/L，麸皮2.5g/L，豆粉1.25g/L，酵母膏0.5g/L，磷酸二氢钾1.25g/L，硫酸镁0.125g/L，消泡剂0.15g/L，pH自然。
- b) 玉米粉1.0 g/L，黄豆粉1.5 g/L，葡萄糖7.5 g/L，酵母膏1.5 g/L，磷酸二氢钾0.5 g/L，硫酸镁0.25 g/L，pH自然。
- c) 葡萄糖20g/L、蛋白胨3g/L、磷酸二氢钾 1g/L、硫酸镁0.5g/L、维生素B₁ 5mg/L、消泡剂0.3g/L，pH自然。
- d) 马铃薯汁200g/L、葡萄糖20g/L、磷酸二氢钾1g/L、硫酸镁0.5g/L、维生素B₁10mg/L、消泡剂0.3g/L，pH自然。

附 录 B
(资料性)
检验项目

检验项目参见表 B.1。

表 B.1 检验项目

项目	指标	检验方法
菌液颜色	菌液淡黄色或黄褐色。	肉眼观察
菌液形态、透明度	菌液均匀不分层，菌丝体稠密，菌丝球均匀、细小；菌液清澈透明。	肉眼观察
菌液气味	排气口气味正常，无酸、臭味、酒精味等。	鼻嗅
杂菌检测	划痕处无霉菌、细菌、酵母菌等菌落生长	取样接种至 PDA 培养基上划线，在 25℃ 恒温培养 24h~48h，观察是否有污染

附 录 C
(资料性)
放罐指标

放罐指标参见表 C.1。

表 C.1 放罐指标

项目	指标
菌液颜色和透明度	球状菌丝体白色，菌液呈淡黄色或黄褐色，清澈透明。
菌液形态	菌液粘度高，静置基本不分层；菌丝体稠密，菌球悬浮力好、在菌液中分布均匀，菌球大小均匀，菌球间液不混浊。
菌液气味	无异味，如酸、臭味、发酵酒精味等，发酵罐排气口气味正常，有大球盖菇菌丝特有芳香气或无明显改变。
菌丝显微形态和杂菌鉴别	可见大球盖菇菌种液体培养中特有的菌丝形态，大量分枝菌丝分布，菌丝粗壮，有锁状联合，菌丝内原生质分布均匀、染色剂着色深。无霉菌菌丝、酵母和细菌菌体。
终止 pH	5.5~6.5
菌丝干重 (g/100ml)	> 0.8