|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 65.020.20 |
| CCS  | B05 |

|  |
| --- |
|  21 |

辽宁省地方标准

DB 21/T XXXX—2024

液体菌种生产技术规程第5部分：红托竹荪

Technical regulations for the preparation of liquid spawn

Part 5:Hong tuo zhu sun

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

辽宁省市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc169077251)

[1 范围 1](#_Toc169077252)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc169077253)

[3 术语和定义 1](#_Toc169077254)

[4 生产技术要求 2](#_Toc169077255)

[5 生产工艺流程 3](#_Toc169077256)

[6 母种制备 3](#_Toc169077257)

[7 摇瓶液体菌种生产技术 3](#_Toc169077258)

[8 发酵罐液体菌种生产 4](#_Toc169077259)

[9 放罐接种 5](#_Toc169077260)

[10 液体菌种贮藏 6](#_Toc169077261)

[11 记录与存档 6](#_Toc169077262)

[附　录　A 7](#_Toc169077263)

[附　录　B 8](#_Toc169077264)

[附　录　C 9](#_Toc169077265)

1. 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。

本文件是DB21/T XXXX《液体菌种生产技术规程》的第5部分。DB21/T XXXX已发布或计划发布以下部分：

——第1部分：平菇；

——第2部分：金针菇；

——第3部分：大球盖菇；

——第4部分：长根菇；

——第5部分：红托竹荪；

——第6部分：滑菇；

…………

请注意本文件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。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

本文件起草单位：辽宁省微生物科学研究院、辽宁蘑磨达食用菌科技有限公司。

本文件起草人：韩冰、陈飞、钟丽娟、桓明辉、冀宝营、于广峰、柴林山、苏明礼、王建民、章翰天、王洪奇、李丰硕、孙玉禄。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862。

本文件起草单位通讯地址：辽宁省微生物科学研究院（朝阳市双塔区龙山街四段820号），联系电话：0421-2976867。

液体菌种生产技术规程

第5部分：红托竹荪

* 1. 范围

本文件规定了红托竹荪（学名为红托鬼笔，*Phallus rubrovolvatus* (M.Zang,D.G.Ji & X.X.Liu) Kreisel）液体菌种的术语和定义、生产基本要求、生产工艺流程、摇瓶液体菌种生产技术、发酵罐菌种生产技术、放罐接种等内容。

本文件适用于红托竹荪液体菌种的生产。

* 1. 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 压力容器

GB 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

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

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程

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 1846 食用菌菌种检验规程

* 1. 术语和定义

GB/T 12728和NY/T 528界定的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（学名为红托鬼笔，*Phallus rubrovolvatus* (M.Zang,D.G.Ji & X.X.Liu) Kreisel），又称织金竹荪，隶属真菌门Eumycota、担子菌亚门Basidiomycotina、腹菌纲Gasteromycetes、鬼笔目Phallales、鬼笔科Phallaceae、鬼笔属*Phallus*。

3.2

固体菌种 solid spawn

在玻璃试管、培养皿或聚丙烯瓶等固体培养基内生长的纯食用菌菌丝体培养物。

3.3

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、发酵罐液体菌种。

3.4

液体菌种发酵罐 cultivation apparatus for liquid spawn

进行液体菌种培养的专用发酵设备，应符合GB 150要求。

3.5

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。

3.6

发酵罐实消 fermenter sterilization

对投料后的发酵罐进行高压蒸汽灭菌。

3.7

罐压 jar pressure

在液体菌种发酵制备过程中发酵罐内保持的空气压力（表压），单位：MPa。

3.8

通风量 ventilation volume

液体菌种培养过程中每分钟通入发酵罐中无菌空气体积与发酵罐实际料液体积的比例。用 V/V表示。

* 1. 生产技术要求

4.1 人员要求

具有食用菌菌种生产从业资格的人员，包括检验人员，操作符合NY/T 1731要求。

4.2 场地环境要求

 生产场地符合NY/T 528的要求，场地开阔、交通方便、水源和电源充足、路面硬化、卫生清洁、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。

4.3 生产车间要求

液体菌种生产车间应包含原料库、配料间、灭菌室、冷却间、接种间、培养室、化验室、菌种室等，并配备相应设施设备，规模配套，布局合理，设计符合 GB 50073 要求。车间地面要具备防水、防腐、防渗漏、防滑性能，易清洗，应有 1.0°~1.5°的排水坡度和良好的排水系统。墙壁和天花板应具有防潮、防霉、防水性能。门窗应设置防蚊蝇纱网。车间安装排气管道或者排风设备。车间设封闭式废物桶。

4.4 主要生产设备要求

应具有磅秤、天平、高压蒸汽灭菌锅、发酵罐、液体菌种接种器、超净工作台、调温设备、除湿设备、恒温培养箱、恒温摇床或磁力搅拌器、冰箱、显微镜等灭菌设备及常规用具。压力容器应经政府有关部门检验合格，符合GB 150要求。应具有备用电源。

4.5 生产原料

化学试剂类、生物制剂及天然材料类应符合NY/T 528要求，同时水不溶物物料需过40目筛；生产用水应符合GB 5749要求。

* 1. 生产工艺流程

工艺流程见图1



图1液体菌种生产工艺流程

* 1. 母种制备

按照附录 A.1 配方制备培养基，母种培养操作流程应符合NY/T 528要求，并按NY/T 1846规定抽样，进行感官检验和菌丝微观特征检验，合格菌种进入生产流程。母种质量要求符合NY/T 1742关于母种质量的规定。

* 1. 摇瓶液体菌种生产技术

7.1 液体培养基的制作

7.1.1培养基配制与分装

按照附录 A.2 配方配制培养基，培养物料先用水搅拌均匀后，装入摇瓶中，装液量为150mL/500mL，瓶口用12~16层纱布塞封口，外用 15cm×15cm 聚丙烯膜或牛皮纸包扎，并用线绳扎紧。

7.1.2灭菌

将分装好的三角瓶放入灭菌锅内，锅内留有一定的空隙。检查锅内水位，立即灭菌。灭菌蒸汽压力升至0.1 MPa~0.12 MPa，温度达121℃时，灭菌30min。

7.1.3冷却

将灭菌后的液体培养基放入超净工作台中，冷却至室温。

7.2接种

在超净工作台中严格按无菌操作规程，将合格的母种斜面菌丝体切割成（3~5）mm×（3~5）mm的菌块，接种到已冷却的摇瓶液体培养基中，每150 mL液体培养基中接入20块~30块。接种完成后及时贴好标签，即为一级液体菌种。取检测合格的一级液体菌种，按照10%的接种量接入摇瓶液体培养基中，培养可制备二级液体菌种。

7.3 培养

菌种培养温度26℃，避光振荡培养，摇床转速150r/min。每日检查生长状态，及时检出不合格菌种。

摇瓶静置1min后，菌丝球体积占比液体培养基体积的80%以上，可结束培养。培养时间约为15d左右。

7.4 摇瓶菌种检验

期间每天观察，及时去除污染菌种。培养液应澄清透明，无杂菌、无异味；镜检无杂菌、菌丝形态正常；菌丝球、菌丝片段密集，菌球均匀悬浮于液体培养基中不分层。

7.5 入库与记录

完成培养的摇瓶液体菌种应登记入库。摇瓶液体菌种生产各环节应详细记录。

7.6 留样

菌种应留样备查，留样的数量应以每个批号3份~5份，于4 ℃下贮存，贮存至经发酵罐菌种转接的菌棒出菇结束为止。

* 1. 发酵罐液体菌种生产

8.1 空气过滤器的检查

使用前应拆分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。

8.2 发酵罐检查与清洗

检查罐上全部阀门、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，达到无死角、内壁无任何培养料残余物的洁净程度。

8.3 空消灭菌

发酵罐空消条件：罐体压力0.120Mpa~0.140Mpa、温度达121℃~126℃时，高压蒸汽灭菌30min。

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，需进行间歇空消，即空消一次后间隔2h~3h再空消一次。

8.4 投料定容

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，加水定容至所需体积（液体培养基占罐体总容积的70%），拧紧上料口盖。

8.5 实消与冷却

投料定容完成后，利用外源蒸汽实消灭菌。灭菌条件：罐压0.120 Mpa~0.140 Mpa、灭菌温度121 ℃，灭菌时间30min。

 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循环，使液体培养基降温至26 ℃以下。降温过程中及时向发酵罐内通无菌空气防止罐压回零。

8.6 接种

利用火焰保护接种法接入摇甁菌种，接种量为5 ~10%。把火圈放在投料口的上方点燃，此时打开进料口盖，把摇瓶液体菌种迅速投入罐中，迅速盖好进料口盖、拧紧。移走火焰圈，液体菌种进入培养阶段。

8.7 培养

培养时控制进气阀的无菌空气通风量1：1 V/V、罐压保持在0.02 Mpa ~0.05 Mpa之间、培养温度26 ℃。培养约10 d后，发酵罐菌种即可达到放罐指标。

8.8 留样、取样及检测

8.8.1 留样、取样

留存摇瓶液体菌种样品，发酵罐灭菌后的空白培养基样品，定期取样，进行镜检和无菌检测，上述样品应放 4 ℃冰箱内保存一周以上。

8.8.2 检测

培养过程中定期从发酵罐中取出样品应及时镜检与无菌检测，同时确定菌丝生长发育状态与排除杂菌污染。

a)按照GB 4789.28中的规定，接种后置于28℃~30℃恒温培养24h~48h，观察是否有细菌污染，同时进行镜检和感官检测。

b)按照GB 4789.28中的规定，接种后置于23℃~25℃恒温培养48h~72h，观察是否有霉菌污染，同时进行镜检和感官检测。

8.9 发酵罐菌种放罐指标

发酵罐菌种放罐感官与理化指标见附录B。

* 1. 放罐接种

液体菌种达到放罐指标并经镜检等检验合格后即可放罐。使用液体菌种接种器将液体菌种注入菌棒。按照接种器接种规程，接种动作迅速、准确，接种量为25mL~30mL/菌棒（17cm×33 cm）。

* 1. 液体菌种临时储存

液体菌种生产后应及时使用，如不能及时使用，需进行储存。在发酵罐内通入无菌空气，保持罐压0.02Mpa~0.05Mpa时，料温4℃保存小于6d。

* 1. 记录与存档

母种、摇瓶液体菌种和发酵罐液体菌种生产的每个环节（如：灭菌、培养、检测环节）都要有详实的记录，由具体操作人员现场填写，定期审核，签字后归档保存，档案应保存3年以上。

1. （资料性）

红托竹荪液体菌种培养基建议配方

A.1母种培养基配方（1L）：

柞木屑20g（小于40目，加水1.1~1.2L煮沸15~20min，4层纱布过滤）、葡萄糖20g、蛋白胨2g、磷酸二氢钾1g、硫酸镁0.5 g、琼脂20 g，加水定容至1L，pH自然。

A.2 液体培养基配方（1L）：

柞木屑40g（小于40目，加水1.1~1.2L煮沸15~20min，4层纱布过滤），红糖30g，蛋白胨3g，磷酸二氢钾2.0g，硫酸镁1.0g，加水定容至1L，pH自然。

1. （规范性）

放罐指标

放罐感官指标参见表 B.1，放罐理化指标参见表 B.2。

表 B.1 放罐感官指标

|  |  |
| --- | --- |
| 项 目 | 要 求 |
| 菌液色泽 | 菌丝球或菌丝片段呈淡黄色，菌液呈淡黄色至浅棕色 |
| 菌液形态 | 菌液粘稠、半透明，菌丝球、菌丝片段均匀悬浮于液体中，不分层 |
| 菌液气味 | 有红托竹荪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 |

表 B.2 放罐理化指标

|  |  |
| --- | --- |
| 理 化 指 标 | 要 求 |
| pH | 3.0~5.0 |
| 菌丝湿重（g/mL） | ≥0.15 |
| 显微镜下菌丝形态 | 可见红托竹荪液体菌种培养中特有的菌丝形态，大量分枝菌丝分布，有锁状联合。无霉菌菌丝、酵母和细菌菌体。 |
| 留存样品无菌检查 | 平板上有红托竹荪菌丝生长，无霉菌、酵母菌、细菌等杂菌生长。 |

1. （规范性）

液体菌种生产记录事项

1. 生产投入品使用情况（包括液体菌种制作的培养基质、营养辅料、所用菌种、菌瓶）：
	1. 名称；
	2. 来源；
	3. 用法、用量；
	4. 使用、停用的日期。
2. 菌种生产（培养基制作、灭菌、接种、培养）及杂菌发生情况：
	1. 培养基制作；
	2. 高压灭菌；
	3. 接种；
	4. 培养。
3. 贮藏过程及杂菌发生情况；
4. 主要菌种生产设备及用具：
	1. 主要菌种生产设备；
	2. 主要菌种生产用具。
5. 生产场所名称、菌种数量、记录人、入档日期。