|  |  |
| --- | --- |
| ICS  |   |
| 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6部分：滑菇

Technical regulation for the preparation of liquid spawn

Part6：Huagu(Nameko)

2024.10.08

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](#_Toc165206279)

[1 范围 1](#_Toc165206280)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc165206281)

[3 术语和定义 1](#_Toc165206282)

[4 生产要求 1](#_Toc165206283)

[5 生产技术 2](#_Toc165206284)

[6](#_Toc165206285) 标签、[记录与存档](#_Toc165206290) 4

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。

本标准由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

本标准起草单位：辽宁省农业科学院，辽宁三友农业科技有限公司。

本标准起草人：：张敏、宋莹、刘娜、邹冰、王红、李跃、张季军、吕立涛、邓会超

本标准发布实施后，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

标准起草单位通讯地址：辽宁省农业科学院（辽宁省沈阳市沈河区东陵路84号），邮编：110001，联系电话：024-31025879。

液体菌种生产技术规程 第6部分：滑菇

* 1. 范围

本标准规定了滑菇（*Pholiota microspora*）液体菌种的术语和定义、生产要求、生产技术、标签、记录和存档等内容。

本标准适用于辽宁省内滑菇液体菌种生产。

* 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 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 12728-2006 界定的术语和定义适用于本文件。

* 1. 生产要求

4.1 人员要求

应有经过专业培训且掌握基础理论知识、菌种生产和检验技术菌种生产所需要的技术人员和检验人员。

4.2 场地环境要求

场地交通便利、远离垃圾场、畜禽场舍等污染源。菌种生产场地应符合NY/T 528规定，生产环境应符合NY 1731，生产用水应符合GB 5749。

4.3 生产设备与设施要求

生产设备和设施布局合理、规模配套，符合NY/T 528规定。接种室、培养室按照GB 50073要求设计建造。

部分场所设施设备应达到如下要求：

1. 接种室、固体菌种培养室、液体菌种培养室配备调温设施；
2. 接种室、固体菌种培养室空间洁净度达到万级；液体菌种培养室空间洁净度达到十万级；
3. 化验室和菌种保藏室具备相应检测设备、灭菌设施及常规实验用具。

4.4 培养原料

化学试剂类、生物制剂及天然材料类应符合NY/T 528要求，不溶于水固体物料小于40目。

4.5 菌种

从具备相应资质的单位引种。选用优质、高产、稳定、抗逆性强、商品性好的滑菇品种，且种性清楚。菌种应符合NY/T 528要求。

* 1. 生产技术

5.1母种制作

5.1.1推荐培养基配方

马铃薯200 g，锯末50 g，麦麸50 g，葡萄糖20 g，蛋白胨2 g，VB1  0.01g，磷酸二氢钾 1.5 g，硫酸镁 0.75 g，琼脂粉18 g~20 g，水定容至1000 mL，pH自然。

5.1.2培养基配置

按照生产量和配方5.1.1比例要求进行原料称量。容器内加水，锯末和麦麸用纱布包好后放在容器内共同煮，将去皮切片马铃薯置沸水中煮15 min~20 min，四层纱布过滤、定容至生产用量，加入琼脂充分融化后，再加入其他原料，分装到生产用试管中，分装量为试管长1/4~1/5，塞上胶塞，进行灭菌（0.11 MPa~0.12 MPa，灭菌30 min），将灭菌后试管趁热摆放在斜面板上冷却，试管中培养基斜面长度为试管长度1/2~2/3。母种的容器、灭菌、灭菌效果的检查符合NY/T 528要求。试管冷却后，试管内无明显水珠后用于下一步接种使用。

5.1.3接种和培养

按照1:20～1:30的比例，对保藏的母种进行转管接种，将接种后的试管放在培养温度为18 ℃～21 ℃、空气相对湿度为75%以下、避光、通风良好的条件下培养。

5.1.4母种检验

按照NY/T1846 规程进行检验。培养期间每天检查2次，及时淘汰染菌或劣势菌种。逐支进行检验，肉眼观察要求菌丝棉絮状、较短，厚薄均匀一致、无角变，菌丝长势强，尖端菌丝一致、整齐；显微镜观察菌丝粗壮、无杂菌、无虫及无虫卵。菌丝长满，质量符合NY/T 1742要求的菌种进入下一步生产流程。

5.1.5 贮存及留样

将制备好的母种放置于温度4 ℃、空气相对湿度60 %～70 %、通风、清洁、避光的条件下贮存。母种应留样备查，留样的数量应以每个批号3~5支为宜，留样至经液体菌种转接的栽培种（菌棒）出菇结束。

5.2摇瓶菌种制备

5.2.1推荐培养基配方

红糖20 g，豆粉6 g，磷酸二氢钾3 g，硫酸镁1.5 g，水定容至1000 mL，pH自然。

5.2.2 培养基配置

按照生产量和配方5.2.1比例要求进行原料称量。容器内加水，豆粉用纱布包好后放在容器内共同煮，将去皮切片马铃薯置煮沸的水中，煮15 min~20 min，四层纱布过滤，滤液按照生产量定容，加入其他原料，分装至摇瓶中，装液量为摇甁容量的1/5~2/5，胶塞封口，并用硫酸纸或牛皮纸包扎，培养基配置后应在4 h内高压灭菌，0.11 MPa~0.12 MPa，灭菌30 min。灭菌效果的检查符合NY/T 528要求。

5.2.3 接种和培养

培养基冷却至25 ℃以下，按无菌操作规程，用接种铲从母种培养基斜面上切取（3~5）mm×（3~5）mm的菌种块，接种到摇瓶液体培养基中，每100 mL液体培养基中接入6~8块。接种完成后及时贴好标签，静置培养24 h后，置于摇床上进行震荡培养。培养条件为温度18 ℃～21 ℃，避光，旋转式摇床振荡频率150 r/min，培养时间7 d~9 d。

5.2.4 菌种检验

按照NY/T 1846-的要求进行菌种检查。培养期间每天检查1次，如发现有异味、培养基浑浊等不正常现象应及时淘汰。

5.2.5 贮存及留样

将制备好的液体菌种置于温度4 ℃、空气相对湿度60 %～70 %、通风、清洁、避光的条件下贮存，贮存期不超过10 d。留样的数量一般每个批号3瓶，留至生产者正常生产条件下该菌种出第一潮菇。

5.3发酵罐液体菌种生产

5.3.1 推荐培养基配方

红糖20 g，玉米粉6 g，磷酸二氢钾3 g，硫酸镁1.5 g，水定容至1000 mL，pH自然。

5.3.2 发酵罐检查与清洗

检查发酵罐上全部阀门、安全阀、压力表，要求完好，工作正常。空气过滤器滤芯应无油污、料污、无破损，外壳内外壁要求无污物、光亮洁净。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。

5.3.3 空消灭菌

如遇发酵罐初次使用、出现杂菌、长期放置、更换品种等情况之一时，需对发酵罐进行空消灭菌。要求罐体压力0.120 Mpa~0.140 Mpa、温度121 ℃~126 ℃时，灭菌时间30 min~40 min。

5.3.4 投料定容

按照配方5.3.1比例准备培养料，用水符合GB 5749要求，培养基质符合NY/T 528要求。用热水将原料充分搅拌溶解，倒入或用泵抽入发酵罐中，加水定容至罐体总容积的60 %~80 %，拧紧上料口盖，再次检查发酵罐各部位安装是否合格。

5.3.5 实消灭菌与冷却

投料定容完成后，利用外源蒸汽实消灭菌。按高压蒸汽灭菌方法操作，发酵罐内压力达到0.11 Mpa～0.12 Mpa，培养基温度达到121 ℃～123 ℃、保持时间为60 min～90 min。

实消灭菌结束后，将培养基降温至25 ℃以下。降温过程中要及时向培养器内补充无菌空气，保持发酵罐正压。

5.3.6 接种

接种时，两人配合操作，利用火焰保护接种法接入摇甁菌种，接种量为0.5 %~1.5 % V/V。具体方法如下：用75 %酒精将接种口的外盖和周围擦拭两遍，用95 %酒精浸湿发酵罐投料口使用的火圈，开大排气阀，当罐压降到接近于0时，迅速关闭排气阀并点燃放在投料口的上方火圈，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。罐内升压后移走火焰圈，液体菌种进入培养阶段。

5.3.7 培养

培养时控制进气阀的通风量为1：0.5~1.2 V/V(料液体积/空气体积)，罐压保持在0.02 Mpa ~0.05 Mpa之间、培养温度为23 ℃~25 ℃。培养5 d~8 d后，发酵罐菌种即可达到放罐指标。

5.3.8 检验

培养开始3 d后从发酵罐中取样进行检测，检测方法同5.2.4。如异常情况则排空罐内培养物，空消灭菌，重新生产。

5.3.9 留样

液体菌种在发酵罐内应持续通入无菌空气，保持罐压0.01 MPa~0.03 MPa，存放不超过48 h。培养过程中定期从发酵罐中取出样品，和培养结束用于下一步生产的菌种样品留样，留样至生产者正常生产条件下该菌种出第一潮菇，留样的数量一般每个批号3瓶。

* 1. 标签、记录与存档

菌种标签符合NY/T 1742要求，母种、摇瓶液体菌种、发酵罐液体菌种生产的每个环节都要有详实的记录，由具体操作人员现场填写记录，定期审核，签字后归档保存，档案应保存3年以上。