

DB52

贵 州 省 地 方 标 准

DB52/T 1445—2019

冬荪液体菌种生产技术规程

Rules of production-technique about liquid strain of Dong sun

2019 - 11 - 11 发布

2020 - 01 - 01 实施

贵州省市场监督管理局

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 生产技术要求 2

5 摇瓶液体菌种生产技术 3

6 发酵罐菌种生产技术 4

7 放罐接种 6

8 记录和存档 6

9 液体菌种贮藏 7

附录 A（资料性附录） 冬荪液体菌种培养基配方 8

附录 B（资料性附录） 冬荪液体菌种 9

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准由贵州省农作物品种资源研究所提出。

本标准由贵州省食用菌标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：贵州省农作物品种资源研究所、贵州省食用菌育种重点实验室、贵州利康农科技有限公司、黔西南州利康农科技发展有限公司、大方县丽军林下种植中药材专业合作社、贵州乌蒙腾菌业有限公司。

本标准主要起草人：黄万兵、桂阳、张丽娜、朱国胜、刘宏宇、卢颖颖、龚光禄、杨通静、王沁、陈娅娅、胡腾文、王万军、潘成、尚念杰。

冬荪液体菌种生产操作规程

1 范围

本标准规定了冬荪（*Phallus impudicus*、*Phallus fragrans*、*Phallus flavocostatus*）液体菌种生产术语和定义、摇瓶液体菌种生产技术、发酵罐菌种生产技术、放罐接种、记录和存档、液体菌种贮藏。
本标准适用于冬荪液体菌种的生产。

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 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 12728 食用菌术语
GB 50073 洁净厂房设计规范
NY/T 2375 食用菌生产技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

冬荪 Dong Sun

是白鬼笔*Phallus impudicus*、重脉鬼笔*Phallus flavocostatus*和香笔菌*Phallus fragrans*的统称，又称无裙竹荪，隶属于真菌门（Eumycota）、担子菌亚门（Basidiomycotina）、腹菌纲（Gasteromycetes）、鬼笔科（Phallaceae）、鬼笔属（*Phallus*）。

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、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。

3.4

液体菌种接种器 liquid interface trap inoculator

将液体菌种从发酵罐中按无菌操作要求转接到固体培养基物料上的设备。

3.5

固体专用种 solid special 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，专供接入液体培养基使用。

4 生产技术要求

4.1 液体菌种生产厂房

4.1.1 液体菌种生产场址要求

液体菌种生产厂房设计达到GB 50073的规定。液体菌种生产场址应建在交通方便，水源和电源充足，无有害气体、烟雾、灰沙，远离垃圾场、畜禽场舍等有污染的地方，且道路路面硬化、排水良好。

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能防水、防滑、防腐蚀、防渗漏、易清洗，有适当的排水坡度（1.0%~1.5%）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。门窗应设置防蚊蝇纱网。车间入口处应设置洗手、消毒和干手设施。车间安装排气管道或者排风设备，设封闭式废物桶。

4.1.2.2 发酵间、接种间按照 GB 50073 执行。液体菌种接种间应设置缓冲间。灭菌间、冷却间、培养间符合 NY/T 2375 的规定。

4.2 生产设备与设施

4.2.1 主要生产设备

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、玻璃三角瓶、玻璃平皿、自备电源（发电机）等。液体菌种发酵罐、高压灭菌锅和蒸汽锅炉应符合GB 150.2的规定；高效空气过滤器：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，且所有材质应耐126℃高温灭菌；玻璃三角瓶容积250 ml~5000 ml、耐126℃高温灭菌。

4.2.2 主要基础设施

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、菌种室等，并配备相应设施设备。

4.3 培养原料

化学试剂类、生物制剂及天然材料类应符合NY/T 2375要求，同时水不溶物物料需过100目筛。

4.4 生产菌种

生产菌种符合NY/T 2375要求，术语符合GB/T 12728的规定。

4.5 液体菌种生产工艺流程

冬荪液体菌种生产工艺流程见图1。

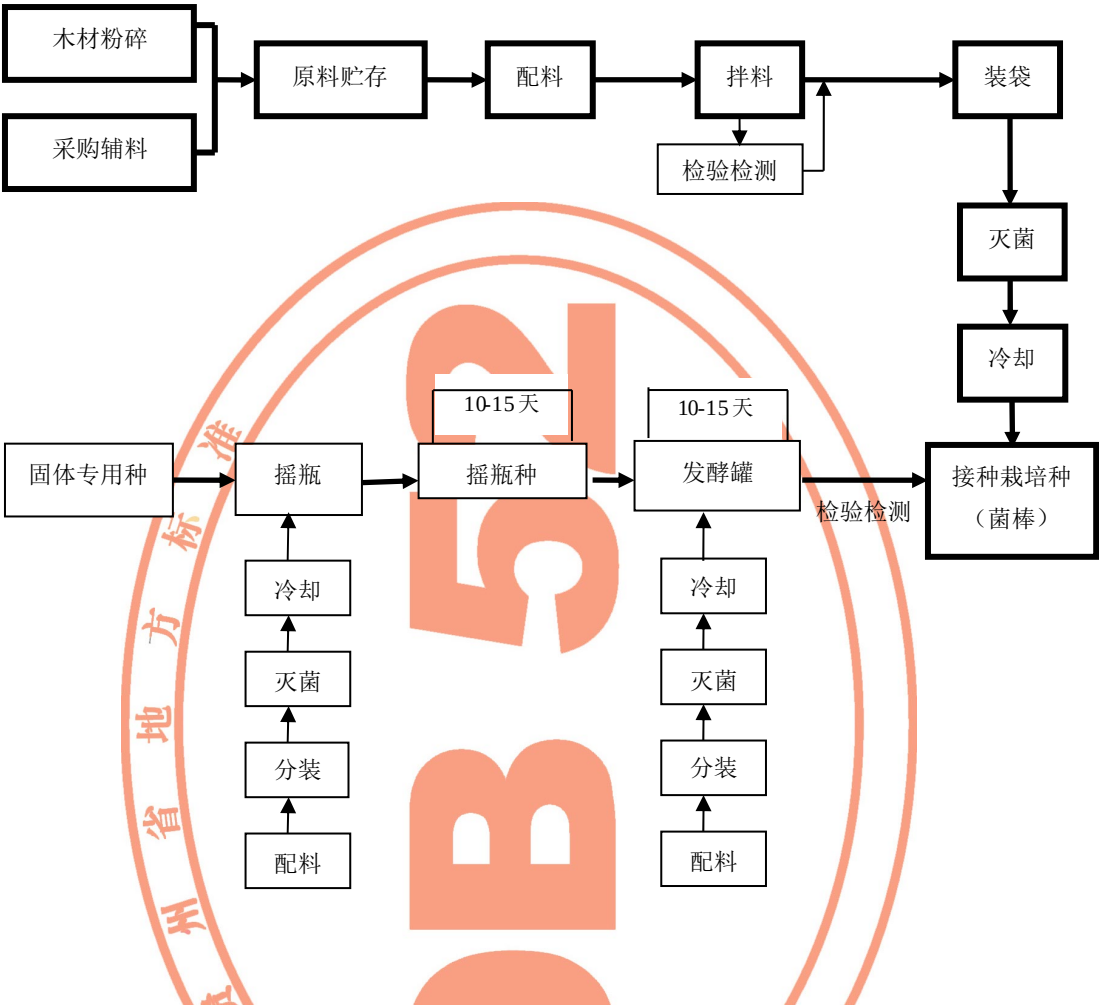


图1 冬荪液体菌种生产工艺流程

5 摇瓶液体菌种生产技术

5.1 液体培养基配方及制作

5.1.1 液体培养基配方

液体培养基配方见附录A：葡萄糖10 g、磷酸二氢钾0.9 g、硫酸镁1.8 g、马铃薯360 g（切薄片煮汁）、酵母粉0.5 g、蛋白胨2.5 g、VB₁ 0.03 mg，自来水补足至1 L。

5.1.2 分装

摇瓶液体培养基分装量应为摇瓶容积的60%。

5.1.3 灭菌

液体培养基配制分装后应立即灭菌。灭菌条件：0.120 Mpa~0.140 Mpa、温度达121℃时，高压蒸汽灭菌30 min。

5.1.4 冷却

冷却室使用前要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室中，冷却到液体培养基降温至室温（≤25℃）。

5.1.5 接种

在净化工作台上严格按无菌操作规程，将合格的冬荪固体专用种接种到摇瓶液体培养基中（接种量的质量比为1%~3%）。接种完成后及时贴好标签。

5.2 培养

5.2.1 培养条件

在使用培养室的前两天，采用药物或者紫外灯消毒。摇瓶液体菌种应置于摇床上震荡培养，震荡频率150 r/min，恒温25℃。

5.2.2 培养期检查

摇瓶液体菌种培养期间应定期检查，及时拣出不合格菌种。

5.2.3 入库与记录

10 d~15 d后，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。

5.3 留样

冬荪固体专用种应留样备查，留样的数量应以每个批号3~5支，于4℃下贮存，贮存至经发酵罐菌种转接的栽培种（菌棒）出菇结束。

6 发酵罐菌种生产技术

6.1 空气过滤器的检查与灭菌

6.1.1 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。

6.1.2 灭菌

检查完后空气过滤器应高压蒸汽灭菌，灭菌条件：0.120 Mpa~0.140 Mpa、温度达121℃时，高压蒸汽灭菌30 min。

6.2 发酵罐检查与清洗

6.2.1 检查

检查罐上全部阀门，安全阀、压力表、要求完好，工作正常。

6.2.2 清洗

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。

6.2.3 空消

发酵罐初次使用、出现染菌、长期放置、更换品种时，都要求利用外源蒸汽空消进行灭菌。灭菌条件：发酵罐罐体压力0.120 Mpa~0.140 Mpa、温度达121℃时，高压蒸汽灭菌30 min。

6.3 发酵罐菌种培养基要求与制作

6.3.1 原料要求

发酵罐菌种培养基原料应符合NY/T 2375要求，同时水不溶物物料应过100目筛。推荐使用5.5.1液体培养基配方。用水符合GB 5749的规定。

6.3.2 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，加水定容至所需体积（液体培养基占罐体总容积的60%~70%），拧紧上料口盖。

6.3.3 发酵罐实消

投料定容完成后，利用外源蒸汽实消灭菌。灭菌条件：发酵罐罐体压力0.120 Mpa~0.140 Mpa、培养基温度达到121℃时，高压蒸汽灭菌30 min（发酵罐容积50 L~100 L）。

6.3.4 冷却降温

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24℃~26℃。降温过程中及时向发酵罐内通无菌空气防止罐压回零。

6.4 接种

利用火焰保护接种法。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（接种量的体积比为1%~3%），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。

6.5 发酵罐菌种培养条件

培养时控制进气阀的无菌空气通风量至0.5 m³/h（发酵罐容积50 L~100 L）、罐压保持在0.03 Mpa~0.05 Mpa之间、培养温度24℃~26℃范围内。培养10 d~15 d后，发酵罐菌种即可达到放罐指标。

6.6 留样及检测

6.6.1 留样

6.6.1.1 摇瓶液体菌种样品。

6.6.1.2 发酵罐灭菌后的空白培养基样品。

6.6.1.3 培养过程中定期从发酵罐中取出的样品，均用作镜检和无菌检测。

6.6.1.4 上述样品应放 4℃冰箱内保存一周以上。

6.6.2 无菌检测

6.6.2.1 摇瓶液体菌种样品、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，及时观察有无细菌、霉菌、酵母菌等杂菌生长。

6.6.2.2 培养过程中定期从发酵罐中取出的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。

6.7 发酵罐菌种放罐指标

6.7.1 菌种感官指标

发酵罐菌种感官指标见表1。

表1 感官指标

项 目	指 标
菌液色泽	球状菌丝体呈白色或者棕色，滤液呈半透明状。
菌液形态	菌液稍粘稠，有大量球状菌丝体悬浮、分布均匀、不上浮、不下沉、不迅速分层，菌球间液不浑浊。冬荪液体菌种见附录B。
菌液气味	除浓烈的菌香味外无异味，如酸、臭味等。 发酵罐排气口气味正常，无明显改变。

6.7.2 菌种理化指标

发酵罐菌种理化指标见表2。

表2 理化指标

项 目	指 标
pH值	3.0~4.5
菌丝湿重 (g / 100ml)	>8
显微镜下菌丝形态和杂菌鉴别	可见冬荪菌种液体培养中特有的菌丝形态，球状和丛状菌丝体大量分布，菌丝粗壮。无霉菌菌丝、酵母和细菌菌体。
留存样品无菌检查	平板有冬荪菌丝生长，无霉菌、酵母菌、细菌等杂菌生长。

7 放罐接种

7.1 接种环境

按照GB 50073的规定。

7.2 接种程序

开启液体菌种接种器，进入自动消毒程序。消毒完后将待接种的栽培种（菌棒）放置于接种器输送带，输送至接种器的接种舱内。在接种器接种舱内，用接种枪将冬荪液体菌种注入栽培种（菌棒）。执行接种器接种规程，接种动作迅速、准确，接种量为15 ml~30 ml/栽培种（菌棒）。

8 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，由具体操作人员现场记录填写，定期由主管领导审核，签字后归档保存。

9 液体菌种贮藏

在发酵罐内通入无菌空气，保持罐压0.04 Mpa~0.05 Mpa时，料温6℃~10℃可保存3 d，11℃~15℃可保存2 d。



附 录 A
(资料性附录)
冬荪液体菌种培养基配方

A.1 冬荪液体菌种培养基配方

冬荪液体菌种培养基配方包括但不限于：

葡萄糖10g、磷酸二氢钾0.9g、硫酸镁1.8g、马铃薯360g（切薄片煮汁）、酵母粉0.5g、蛋白胨2.5g、VB₁ 0.03mg，自来水补足至1L。

附 录 B
(资料性附录)
冬荪液体菌种

B.1 冬荪液体菌种

部分冬荪液体菌种见图1。



图B.1 冬荪液体菌种

