

HNNY

湖南省农业技术规程

HNNY372-2023

杏鲍菇液体菌种生产技术规程

Code for producing liquid strains of *Pleurotus eryngii*

2023-06-28 发布

2023-06-28 实施

湖南省农业农村厅发布

目 次

前言	1
1 范围	2
2 规范性引用文件	2
3 术语和定义	2
4 设施条件	3
5 生产工艺	3
6 技术要求	4
7 标识与贮存	6
8 质量检测与留样	6
9 档案管理	7
附录 A（资料性） 杏鲍菇菌种培养基配方	8
附录 B（规范性） 杏鲍菇液体菌种生产记录	9

前 言

本文件按《湖南省农业技术规程制定与发布管理规范》相关规定起草。

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。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会提出并技术归口。

本文件起草单位：湖南果秀食品有限公司，湖南省宇秀生物科技有限公司。

本文件主要起草人：姬建军，阳国秀，沈凡超，易恢满，唐伍平，陈盛，蒋路翔，谢海鹰，
张林。

杏鲍菇液体菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*) 液体菌种生产的设施条件、工艺流程、技术要求、标识与贮存、质量检测与档案管理等要求。

本文件适用于湖南杏鲍菇液体菌种的生产。

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 150.1	压力容器
GB/T 5749	生活饮用水卫生标准
GB/T 4789.28	食品卫生微生物学检验
GB/T 19489	实验室生物安全通用要求
GB 50073	洁净厂房设计规范
GB 50457-2019	医药工业洁净厂房设计标准
NY/T 528	食用菌菌种生产技术规程
NY/T 1935	食用菌栽培基质质量安全要求
NY/T 2375	食用菌生产技术规范
NY/T 5010	无公害农产品种植业产地环境条件
SN/T 1538.1	培养基制备指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 杏鲍菇液体菌种 *pleurotuseryngii* liquid spawn

适合于杏鲍菇液体培养的培养基质，接种后通过震荡或通气深层液体培养方法培育得到杏鲍菇双核纯菌丝体。

3.2 菌球 the fungus ball

圆形、稳定、规则的菌丝体聚结体，杏鲍菇菌球直径一般在0.5 mm~3.0mm,因培养基及培养参数不同表面呈现光滑或略带有一定的毛刺状。

3.3 静置培养 static culture

是指摇瓶培养基内转接PDA菌种块后，培养液放置一天左右的时间，使受伤的菌丝萌发、恢复生长，便于后续的摇动或搅动培养。

4 设施条件

4.1 环境条件

应符合NY/T 5010的规定。

4.2 设备条件

厂房设计和布局应符合NY/T528标准要求；发酵间应按照GB50073洁净厂房规范执行；接种间按照GB50073洁净厂房设计规范执行；主要设备包括培养器、空气压缩机、空气过滤器、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、烘干箱、磨粉机、冰箱、医用冷藏柜、显微镜、磁力搅拌器、除湿机、氧气源臭氧消毒器、磅秤、天平、电磁炉、酸度计等；自备电源（发电机）以防停电应急；培养器、高压灭菌锅和蒸汽锅炉应使用经政府有关部门检验合格，符合GB150.1的要求。

4.3 人员条件

根据杏鲍菇液体菌种生产规模，配备相应数量的专业技术操作人员；工作人员净化应符合GB 50457-2019中5.2条款的要求。

5 生产工艺

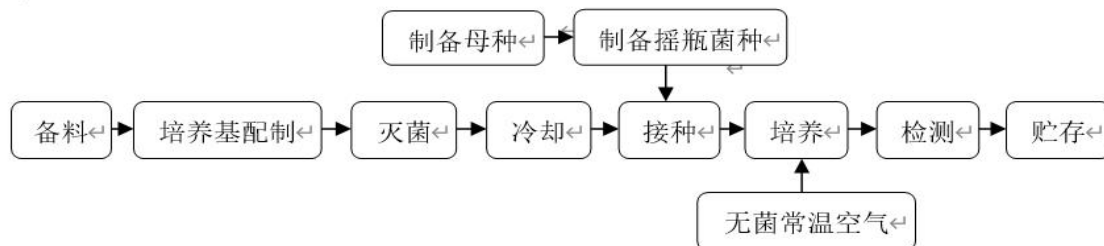


图1 杏鲍菇液体菌种生产工艺流程

6 技术要求

6.1 品种选择

杏鲍菇菌种生产过程应符合NY/T528和NY/T2375的要求，引种时应从有技术资质的供种单位引种且种性清楚，经过出菇试验方可用于生产。

6.2 制备母种

容器使用玻璃试管或培养皿，常用培养基配方参见附录A，培养基灭菌参数126℃，0.13 Mpa~0.14 Mpa压力下，维持35 min。接种在超净工作台上严格按无菌操作接种。最佳培养温度22.5℃~24.5℃，空气相对湿度在55%~65%，避光培养。在制备过程中应符合GB/T19489和SN/T1538.1的要求。

6.3 制备摇瓶菌种

根据发酵罐接种口径大小，选择1000 ml的三角瓶或抽滤瓶制备摇瓶液体种；每个摇瓶装液量控制在500ml~700ml；常用培养基配方附录A；灭菌参数同6.2；在接种时，对于培养皿母种，采用直径5mm~7mm打孔器、取菌种块5块；试管母种，接种铲或钩切取长宽：4 mm×5 mm的菌种块6~8块接到摇瓶。最佳培养温度23.0℃~24.0℃；空气相对湿度60%左右，宜黑暗培养，培养周期5 d~7 d。

6.4 备料

所备原材料应符合NY/T1935的要求。

6.5 发酵罐液体菌种培养基配制

6.5.1 培养基原料及配方

具体配方原料应根据原料资源的获取方便度且符合NY/T 528要求，满足杏鲍菇营养需求，选用适合并经过验证的培养基配方，杏鲍菇发酵罐配方见附录A。

6.5.2 配料及投料

先将易溶于水的用温水充分溶解加入，对于不容易溶解的豆粕、黄豆粉等，要加工成浆过20目筛后加入。配料用水应符合GB/T5749生活饮用水卫生标准。

6.6 灭菌

6.6.1 发酵罐检查与清洗检漏

检查发酵罐上的全部阀门、安全阀、压力表，要求完好、匹配度高、工作正常；对罐体内、外和全部阀门用流水或高压水枪进行反复清洗，达到无死角、内壁无任何培养料残余物的洁净程度；清洗干净后关闭排水管、合上投料口、打开空气进气阀门，当罐内压力达到0.15 Mpa，关闭空气进气阀门，静置30min，再用调至好的泄露检测水对罐体上所有阀门和接口处进行泄漏检查。

6.6.2 煮罐及空消

发酵罐初次使用、出现杂菌污染、放假长期放置、更换品种等情况出现时，应加强清洗，煮罐及空消。对内置有电加热棒或发酵罐内通蒸汽的固定培养器加水至容积的80%加热至121℃，灭菌40 min，移动发酵罐，在高压灭菌锅内蒸汽压力达到0.11 Mpa~0.13 Mpa、温度121℃~123℃、灭菌1 h。

6.6.3 定容及调 PH 值

投料后开始加水定溶，当溶液总容量占发酵罐体积的80%时止，并把PH调到6.5~7.5为宜。

6.6.4 排冷、灭菌

对于固定发酵罐，罐内温度到110℃、蒸汽压力升至0.05 Mpa时，两次排冷、排净冷空气，培养基灭菌在126℃，0.13 Mpa~0.14 Mpa压力下，维持60 min。

6.7 冷却

固定发酵罐，采用通入无菌空气和循环冷水相结合的冷却方法；移动发酵罐冷却，采用洁净强冷空间冷却方法，使罐内培养基温度冷却到22℃~24℃，保持压力稳定、防止罐压回零。

6.8 接种

穿戴好净化服，在无菌状态下，把合格的摇瓶菌种快速接到发酵罐内，立即关闭接种阀门、盖好接种口并拧紧，接着打开进气阀门，使罐内保持一定的正压状态。

6.9 发酵罐菌种培养

发酵罐菌种培养条件见表1。

表1 杏鲍菇发酵罐种培养条件

培养条件类别	要求及范围
通气量	无菌洁净压缩空气；把罐内通气量调节至1:0.5 V/V~1:1.2 V/V(料液体积/空气体积)
罐压	根据培养不同阶段的需氧量变化；使罐压维持在0.02 Mpa~0.03 Mpa。
温度	培养健壮有活力的均匀菌球，发酵罐培养温度宜控制在23.5±1.0 ℃。
CO ₂ 浓度	根据菌丝代谢及对CO ₂ 的需求，CO ₂ 浓度调控范围在220 ppm~3800 ppm。
培养周期	在稳定的接种比例、温度及通气条件下，培养周期宜控制在5 d~6 d。

7 标识与贮存

7.1 标识

注明杏鲍菇品种、级别、生产批次、接种机编号、接种人员、接种日期。

7.2 贮存

7.2.1 摇瓶菌种

摇瓶液体菌种瓶口用防潮的牛皮纸包好，放在4℃洁净环境中可保持4 d~6 d。

7.2.2 发酵罐液体菌种

储藏温度15℃~20℃，发酵罐内液体菌种，持续通无菌空气，保持罐压0.02 Mpa~0.03 Mpa，存放1 d~2 d。

8 质量检测与留样

8.1 质量检测

按照无菌操作从取样阀或接种口、取少量菌液，接种于GB/T4789.28中规定的PDA培养基中或营养肉汤培养液中，并按照对应参数进行培养、检测是否存在杂菌。PH值采用精密酸度计测定，菌丝湿重检测取100ml液体菌液，经1000 r/min离心5 min,倒掉上清液称重再减去离心管重量；显微镜观察杏鲍菇液体菌丝的锁状联合及生长情况和有无杂菌污染。

8.2 液体菌种放罐指标

8.2.1 经镜检及其它感官理化指标等方法检验质量都完全合格即可放罐接种或储存。

8.2.2 感官理化指标见表2。

表 2 杏鲍菇发酵罐液体种感官理化指标

项目类别	指标要求
菌球大小	0.5 mm≤T≤3.0 mm
菌龄	5 d≤d≤6 d
菌丝形态	菌丝呈球形或片段均匀悬浮于液体中，不分层。
菌液气味	有特殊浓郁的杏香味，培养过程中，这种香味逐步增加，最后一天达最大值，不能有酸、臭等异味。
显微镜下菌球形态	有杏鲍菇特有的微观菌丝形态，主菌丝粗壮、分支菌丝偏细，锁状联合多且明显，分支密度大、菌丝细胞壁完整度高。
菌液PH值	5.0~6.2
菌丝体湿重	(13~21) g/L
菌液总糖度	1.2%~1.6%
CO ₂ 浓度	2700 ppm~3900 ppm（发酵罐菌液内空气中的浓度）
杂菌	无

8.3 留样

摇瓶液体菌种样品；培养器灭菌后的空白培养基样品;发酵罐液体菌种样品,用作镜检和其它生产综合指标测定。

9 档案管理

杏鲍菇液体菌种生产的环节，应包括以下记录清单附件B但不限于这些生产记录。生产记录归档保存，至少两年。

附录 A
(资料性)
杏鲍菇菌种培养基配方

项目 基质类型	各基质配方成分
母种培养基	<p>a)PDA 培养基: 马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉(凝固剂) 19 g,水 1 L,PH 自然。</p> <p>b)加富 PDA 培养基: 马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,KH₂PO₄ 3 g,蛋白胨 2 g,MgSO₄ 1.5 g,琼脂粉(凝固剂) 19 g,水 1 L,PH 自然。</p>
摇瓶种培养基	<p>a)配方加富 PDA 培养基(不加凝固剂): 马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,KH₂PO₄, 蛋白胨 2 g, 硫酸镁 1.5 g,水 1 L,PH 自然。</p> <p>b)配方: 白糖 20 g,黄豆粉 3 g,酵母浸膏 2 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,VB₁0.005 g,水 1 L,PH 自然。</p>
发酵罐种培养基	<p>a)配方: 葡萄糖 15 g,豆粕 3 g,蛋白胨 0.5 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,消泡剂 0.5 ml,水 1 L,PH 值 6.5-7.5。</p> <p>b)配方: 白糖 20 g,黄豆粉 3 g,酵母浸膏 2 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,VB₁0.005 g,消泡剂 0.4 ml,水 1 L,PH 值 6.5-7.5。</p> <p>c)配方: 白糖 15 g,豆粕粉 2.5 g,酵母浸膏 2.5 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,消泡剂 0.6 ml,水 1 L,PH 值 6.5-7.5。</p>

附录 B
(规范性)
杏鲍菇液体菌种生产记录

序号	表格名称	记录内容	备注
1	母种生产记录表	配方、灭菌参数、批次、数量、培养参数、菌丝长势	异常情况记录
2	摇瓶菌种生产记录表	配方、批次、数量、灭菌参数、培养参数、菌球密度、颜色、完整度观察	异常情况记录
3	摇瓶菌种接生产瓶记录表	接种批次、数量、培养温湿度、菌丝颜色、生长速度	异常情况记录
4	发酵罐菌种培养基制作记录表	配方、批次、配料、排冷、灭菌、冷却参数、PH 值、接种时间、温度	异常情况记录
5	发酵罐菌种培养温度记录表	时间、批次、罐号、保温温度、冷却温度、温度计温度	异常情况记录
6	发酵罐菌种培养周期 CO ₂ 浓度记录表	批次、罐号、培养周期、CO ₂ 浓度、温度、检测时间	异常情况记录
7	发酵罐菌种接生产瓶留样记录表	接种批次、数量、培养温湿度、菌丝颜色、生长速度、现蕾情况、子实体生长状态	异常情况记录
8	栽培瓶接种批次卡	接种时间、发酵罐种批次、接种机编号、接种人员、培养房号	异常情况记录