ISC65.020.01

CCS B 39

**DB 61**

陕 西 省 地 方 标 准

DB 61/T \*\*\*\*-202\*

灰树花菌种生产技术规程

Technical Regulations for Spawn Production of *Grifola frondosa*

202\*-\*\*-\*\* 发布 202\*-\*\*-\*\* 实施

陕西省市场监督管理局 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》给出的规则起草。

本文件由陕西省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：陕西省微生物研究所、陕西理工大学、陕西省园艺技术工作站、渭南市农业科学研究院、汉中市农业技术推广与培训中心、宝鸡市农业科学研究院、汉中康田生物科技有限公司。

本文件主要起草人：雷萍、张文隽、解修超、雷丽、简红忠、王璞、马婧嘉、李雅茹、韩根锁、李雪君、吴建海、戴文婧。

本文件由陕西省微生物研究所负责解释。

本文件首次发布。

联系信息如下：

单位：陕西省微生物研究所

地址：西安市雁塔区西影路76号

邮编：710043

电话: 029-82357027

灰树花菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了灰树花菌种生产的术语和定义、生产条件、生产技术、质量控制、记录及贮存。

本文件适用于灰树花各级固体菌种和液体菌种的生产。

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 150.2 压力容器 第2部分：材料

GB 3095 环境空气质量标准

GB 5749 生活饮用水卫生标准

GB/T 12728 食用菌术语

GB 15618 土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准

GB 50073 洁净厂房设计规范

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程

NY/T 1284 食用菌菌种中杂菌及害虫的检验

NY/T 1742 食用菌菌种通用技术要求

3 术语和定义

GB/T 12728-2006界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

灰树花 *Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray

隶属于担子菌亚门（Basidiomycotina）、层菌纲（Hymenomycetes）、非褶菌目（Aphyllophrales）、多孔菌科（Polyporaceae）、树花属（*Grigola*），又名贝叶多孔菌、叶状奇果菌、千佛菌、栗子蘑、莲花菌、云蕈、舞茸等。

3.2

固体菌种 culture

生长在固体培养料上的菌种。

[来源：GB/T 12728-2006,2.5.31]

3.3

母种 stock culture

具有结实性的菌丝体纯培养物及其继代培养物，也称一级种，试管种。

[来源：GB/T 12728-2006,2.5.7，有修改]

3.4

原种 mother spawn

由母种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物，也称二级种。

[来源：GB/T 12728-2006,2.5.8]

3.5

栽培种 spawn

由原种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物，栽培种只能用于栽培，不可再次扩大繁殖菌种，也称三级种。

[来源：GB/T 12728-2006,2.5.9]

3.6

液体菌种 liquid spawn

培养基为液体状态的菌种。

[来源：GB/T 12728-2006,2.5.30]

3.7

摇瓶液体菌种 Liquid spawn in shake pot

由母种移植到以三角瓶为容器的液体培养基中繁殖的菌丝体纯培养物。

3.8

食用菌液体菌种培养器 cultivation apparatus for edible fungus liquid spawn

也称液体菌种培养罐，是指进行食用菌液体菌种培养的专用设备。要求不锈钢材质，符合GB 150.2钢制压力容器标准。

3.9

通气量 ventilation volume

在液体菌种培养过程中发酵罐体积与每分钟通入发酵罐中无菌空气体积的比例。

注：用V/V（发酵罐体积/通入空气体积）表示。

3.10

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）。

注：单位为Mpa。

4 生产条件

4.1 技术人员

应具有与所生产的菌种级别相适应的《食用菌菌种生产经营许可证》、《食用菌菌种生产技术人员证》和《食用菌菌种检验员证》的人员。

4.2 生产场地

场地选择应符合NY/T 528；环境空气质量应符合GB 3095；水质应符合GB 5749；土壤应符合GB 15618。

4.3 生产厂房

4.3.1 固体菌种厂房

应符合NY/T 528中4.3的规定。

4.3.2 液体菌种厂房

4.3.2.1 厂房内应设有原材料库、配料室、灭菌室、无菌接种室、恒温培养室、发酵罐培养室、检验室等，按照液体菌种生产工艺流程合理布局，无菌区与有菌区有效隔离。

4.3.2.2 厂房地面、墙壁和天花板应能防水、防腐蚀、防渗漏、防滑，易清洗，易消毒，地面应有1.0 ％～1.5 ％的排水坡度和良好的排水系统。门窗应设置防蚊蝇纱网。

4.3.2.3 液体发酵间和接种间按照GB 50073的要求执行。

4.4 设备设施

4.4.1 固体菌种

应符合NY/T 528中4.4的规定。

4.4.2 液体菌种

4.4.2.1 高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、恒温回旋式振荡器、恒温培养箱、液体菌种培养器、液体菌种接种器、空气压缩机、空气过滤器、冰箱、显微镜、磅秤、天平、酸度计及其它相关器具。

4.4.2.2 灭菌室、无菌接种室、恒温培养室、液体菌种培养室、检验室均应具备调温设施，排风设备。

4.5 培养基质

应符合 NY/T 528中4.7.2的要求。

4.6 菌种选择

使用种性清楚，高产、优质、抗逆性强、商品性能良好的品种。菌种生产应符合 NY/T 528中4.5的要求。

5 生产技术

5.1 固体菌种生产

5.1.1 生产工艺流程

培养基配制→分装→灭菌→冷却→接种→培养（检查）→成品。

5.1.2 母种生产

5.1.2.1 容器

应符合NY/T 528中4.7.1.2的规定。

5.1.2.2 培养基制备

按照附录A规定配制。配制好的培养基应立即分装，分装量为试管长度的1/4～1/5，试管口应保持干净，随后封口。灭菌压力0.105 MPa～0.15 MPa，温度121 ℃～126 ℃，时间30 min。灭菌结束后取出试管摆成斜面。

5.1.2.3 灭菌效果检查

按3 %随机抽取母种培养基置于28 ℃恒温培养48 h，检查有无细菌或霉菌感染。

5.1.2.4 接种

按照NY/T 528中4.7.7的规定执行。

5.1.2.5 培养

温度25 ℃±1 ℃，遮光培养10 d～15 d，当菌丝长满试管斜面，即可用于生产原种。

5.1.3 原种、栽培种生产

5.1.3.1 容器

应符合NY/T 528中4.7.1.3和4.7.1.4的规定。

5.1.3.2 培养基制备

按照附录B规定配制。配制好的培养料立即装瓶（袋），装至2/3处，将瓶（袋）口和瓶（袋）外壁擦干净封口。灭菌压力0.105 MPa～0.15 MPa，温度121 ℃～126 ℃，时间120min～180min。灭菌结束后取出冷却至25 ℃以下待用。

5.1.3.3 接种

按照 NY/T 528中4.7.7的规定执行。每支母种接种4瓶（袋）～6瓶（袋）原种，每袋原种接种25瓶（袋）～35 瓶（袋）栽培种。

5.1.3.4 培养

温度25 ℃±1 ℃，空气相对湿度55 ％～65 ％，遮光、通风，原种培养30 d～40 d，栽培种培养35 d～45 d，当菌丝长满瓶（袋），即可用于栽培种或栽培生产。

5.1.4 检查

母种接种36 h后进行首次检查，检出未萌发或受污染者；培养4 d～5 d、8 d～9 d时分别进行第二次和第三次检查，检出污染或生长不良的菌种。原种及栽培种在菌丝封口前，隔日例行检查；之后每隔一周检查一次，直至长满瓶（袋）。

5.2 液体菌种生产

5.2.1 生产工艺流程

母种→摇瓶液体菌种→液体菌种培养器检查、清洗与空消→培养基配制→上罐→灭菌→冷却→接种→液体菌种发酵→菌种检测

5.2.2 母种生产

按照5.1.2的方法执行。

5.2.3 摇瓶液体菌种生产

5.2.3.1 容器

500 mL～1000 mL的三角瓶。

5.2.3.2 培养基制备

按照附录C规定配制培养基。装液量为三角瓶容量的50 ％～60 ％，八层纱布和聚丙烯薄膜封口。灭菌压力0.105 MPa～0.15 MPa，温度121 ℃～126 ℃，时间30 min。

5.2.3.3 接种

将灭菌后的培养基冷却至25 ℃以下，无菌条件下每瓶接入0.5 cm2左右大小的母种5 块～8块。

5.2.3.4 培养

恒温25 ℃±1 ℃遮光静置培养24 h，以振荡频率150 r/min～180 r/min，继续培养4 d～6 d。

5.2.3.5 移种标准

发酵液清澈透明、无异味；菌丝球密集、均匀悬浮于液体中不分层，菌丝体湿重不少于50 mg/mL

，平皿检验无杂菌。

5.2.4 发酵罐液体菌种生产

5.2.4.1 投料前准备

检查液体菌种培养器上全部阀门、压力表，要求完好，工作正常；用流水冲洗液体菌种培养器罐体内、外，达到无死角、内壁无任何培养料残余物。使用前进行空消，压力0.105 MPa～0.15 MPa，温度121 ℃～126 ℃，时间40 min。

5.2.4.2 培养基配制

按照附录D规定配制培养基，调节培养基起始pH为6.5～6.8。

5.2.4.3 上罐

打开罐盖，将配制好的液体培养基加入罐内，装液量为罐体容积的60 ％。通入空气搅拌1 min～2 min，混合均匀，密封盖口。

5.2.4.4 灭菌

液体菌种培养器内蒸汽压力达到0.105 Mpa～0.15 Mpa，温度达到121 ℃～126 ℃，保持50 min～60 min。

5.2.4.5 冷却

灭菌结束将冷水通入培养器夹层或内置冷却系统中循环，降温过程中向发酵罐内通入无菌空气同时打开排气阀，培养基降温至22 ℃～25 ℃停止通入冷凝水，罐内压力维持在0.05 Mpa。

5.2.4.6 接种

在无菌条件下，将摇瓶液体菌种接入发酵罐，接种量为发酵液装液量的10 ％。

5.2.4.7 培养

通气量：1︰0.5 V/ V～1︰1.0 V/ V（料液体积/空气体积）。

罐压：0.03 MPa～0.05 MPa。

培养温度：25 ℃±2 ℃。

培养时间：72 h～96 h。

5.2.5 检查

摇瓶液体菌种接种后每天观察，若有菌丝挂壁、培养液浑浊则表明有杂菌污染，不可使用；液体菌种接种1 d后进行隔天检测，按照无菌操作取样，将样液接于PDA培养基的斜面或培养皿上，于28 ℃恒温培养2 d～5 d，采用显微镜和感官观察菌丝生长状况和有无杂菌污染。

6 质量控制

6.1 固体菌种

6.1.1 质量要求

各级菌种感官及微生物学要求应符合NY/T 1742中规定。

6.1.2 菌种检验

各级菌种杂菌及害虫检验按照NY/T 1284的规定执行。

6.1.3 留样

各级菌种都应留样备查，母种每个批号3 支～5 支，原种、栽培种5 瓶（袋）～7 瓶（袋），于4 ℃～6 ℃条件下贮存，贮存至使用者在正常生产条件下该批菌种出第一茬菇。

6.2 液体菌种

6.2.1 感官要求

6.2.1.1 色泽：球状菌丝体呈白色，菌液呈淡黄色。

6.2.1.2 菌液形态：菌液稍粘稠，有大量球状、絮状菌丝体悬浮、分布均匀、不上浮、不下沉、不迅速分层，菌球间液体不浑浊。

6.2.1.3 菌液气味：有灰树花液体菌种培养时特有的气味，无异味。

6.2.2 理化指标

6.2.2.1终止 pH：4.0～5.5。

6.2.2.2 菌丝湿重（g/100mL）：≥8。

6.2.2.3 显微镜下菌丝形态：灰树花菌种液体培养特有的球状和絮状菌丝体大量分布，菌丝粗壮，菌丝内原生质分布均匀，染色剂着色深。

6.2.2.4 无菌检查：无霉菌、细菌、酵母菌等杂菌菌落生长。

6.2.3 菌种检验

检验项目、指标、方法见附录E，达到检验指标即可放罐。

6.2.4 留样

摇瓶菌种使用时取样30 mL～40 mL，发酵罐实消后的空白培养基取样30 mL～40 mL，放罐前48 h从发酵罐中取样30 mL～40 mL，发酵终止后取样80 mL～100 mL，均用无菌三角瓶留存，于2 ℃～4 ℃保存7 d，备查。

7 记录及贮存

7.1 记录

生产各环节应由操作人员现场详细记录，记录内容签字后归档保存至本批菌种栽培出菇结束。

7.2 贮存

固体菌种一般在4 ℃～6 ℃下遮光贮存不超过15d，液体菌种在4 ℃～10 ℃下贮存不超过3 d。

附 录 A

（规范性）

常用母种培养基配方

A.1 PDA培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基）

马铃薯200 g（浸出汁），葡萄糖20 g，琼脂20 g，水1000 mL。

A.2 CPDA培养基（综合马铃薯葡萄糖琼脂培养基）

马铃薯200 g（浸出汁），葡萄糖20 g，磷酸二氢钾1 g，硫酸镁0.5 g，蛋白胨5 g，琼脂20 g，VB110 mg，水1000 mL。

A.3马铃薯麸皮培养基

马铃薯200 g（浸出汁），麸皮100 g（浸出汁），葡萄糖20 g，磷酸二氢钾2.5 g，硫酸镁0.5 g，琼脂20 g，水1000 mL。

A.4 木屑综合培养基

木屑75g（浸出汁），葡萄糖20 g，磷酸二氢钾1 .5g，硫酸镁0.75 g，蛋白胨2 g，琼脂20 g，水1000 mL。

附 录 B

（规范性）

常用原种和栽培种培养基配方

B.1 配方1

栗木屑80 ％，麸皮18 %，石膏1 ％，蔗糖1 ％， 含水量60 ％～63 ％。

B.2 配方2

棉籽壳80 ％，麸皮18 ％，石膏1 ％，蔗糖1 ％， 含水量60 ％～63 ％。

B.3 配方3

阔叶树木屑75 ％，麸皮18 ％，玉米粉5 ％，石膏1 ％，蔗糖1 ％，含水量60 ％～63 ％。

B.4配方4

杂木屑78 ％，麸皮20 ％，石膏1 ％，红糖1 ％，含水量60 ％～63 ％。

B.5 配方5

杂木屑40 ％，棉籽壳40 ％，麸皮10 ％，玉米粉8 ％，石膏1 ％，蔗糖1 ％，含水量60 ％～63 ％。

附 录 C

（规范性）

常用摇瓶液体菌种培养基配方

C.1 配方1

马铃薯（浸出汁）200 g，葡萄糖20 g，蛋白胨3 g，磷酸二氢钾1.0 g，水1000 mL。

C.2 配方2

麸皮（浸出汁）35 g，葡萄糖28 g，磷酸二氢钾3 g，硫酸镁1.5 g，VB15 mg，水1000 mL。

附 录 D

（规范性）

常用液体发酵罐培养基配方

D.1 配方1

玉米粉50 g，麸皮20 g，磷酸二氢钾1 g，硫酸镁0.5g，VB1100 mg，水1000 mL。

D.2 配方2

玉米粉30 g，黄豆粉20 g，葡萄糖20 g，磷酸二氢钾0.05 g，硫酸镁0.2 g，水1000 mL。

D.3 配方3

蔗糖20 g，黄豆粉5 g，蛋白胨3 g，磷酸二氢钾1 g，硫酸镁0.5g，水1000 mL。

附 录 E

（规范性）

液体菌种检验项目

E.1 液体菌种检验项目见表E.1。

表E.1 检验项目

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目 | 指标 | 检验方法 |
| 菌液颜色和透明度 | 球状菌丝体呈白色，滤液呈淡黄色，清澈透明 | 肉眼观察 |
| 菌液形态 | 菌液稍粘稠，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，菌球间液体不浑浊 | 肉眼观察 |
| 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，有灰树花菌液体培养时特有的气味 | 鼻嗅 |
| 终止pH值 | 4.0～5.5 | pH计 |
| 菌丝湿重（g/100mL） | ≥8 | 取一定重量发酵菌液，经转速3500 r/min离心15 min，称量离心沉淀的菌丝体重量，计算菌丝体重量与菌液体积比值 |
| 菌丝显微镜形态和杂菌鉴别 | 可见灰树花菌种液体培养中特有的菌丝形态，菌丝粗壮，菌丝内原生质分布均匀、染色剂着色深。无杂菌 | 显微镜（低倍镜、高倍镜、油镜） |
| 杂菌、害虫检测 | 灰树花菌丝生长，划痕处无霉菌、酵母菌、细菌菌落生长 | 取样接种到营养肉汤培养基、营养琼脂培养基、划线培养，分别在28 ℃和37 ℃恒温培养2 d～5 d，每天观察菌落生长情况，参照 NY/T 1284 |

DB 61/T \*\*\*\*-202\*