

T/HAASS

河^{B 05}南省农学会团体标准

T/41/T XXXX—XXXX

大球盖菇菌种生产技术规程

Code of practice for spawn production of *Stropharia rugosoannulata*

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

河南省农学会 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》的规定起草。

本文件由河南省农学会提出并归口。

本文件起草单位：河南省农业科学院食用菌研究所

本文件主要起草人：王昱峰、樊佳豪、张珂珂、孔维丽、李涛、闻亚美、郑靖康、刘金玲

大球盖菇菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了大球盖菇菌种生产技术基本要求，品种选择、母种生产、液体菌种生产、栽培种生产、质量要求和建档与追溯等。

本文件适用于以液体转固体方式生产大球盖菇栽培种的方法。

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/T 150.1 压力容器 第1部分：通用要求
GB 5749 生活饮用水标准
GB/T 12728 食用菌术语
GB 50073 洁净厂房设计
NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程
NY/T 1284 食用菌菌种杂菌及害虫的检验
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
NY/T 1935 食用菌栽培基质质量安全要求
NY/T 3819 农产品质量安全追溯操作规程 食用菌

3 术语和定义

GB/T 12728界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

菌种 (spawn)

生长在适宜基质上具有结实性的菌丝培养物，包括母种、原种和栽培种。

3.2

液体菌种 (liquid spawn)

培养基为液体状态的菌种。

3.3

接种器 (liquid culture inoculator)

指能将液体菌种从反应器中按无菌操作要求转接到食用菌固体培养基物料上的设备，一般包含耐压硅胶导管，按压式喷头以及接种量调节器，简称接种枪。

3.4

接种量 (inoculation volume)

液体菌种接入每个固体栽培种培养基的体积。

3.5

固体菌种 (solid spawn)

培养基为固体状态的菌种

4 基本要求

4.1 人员资质

菌种生产者应具有三级菌种生产许可证。技术人员应经过专业培训、有职业资格证书。

4.2 场地要求

菌种生产厂区应交通便利，地势平坦、地面硬化、水电管网设施齐全、便于机械化操作。电能与生产产能匹配。厂区环境应符合NY/T 1742的规定。

4.3 厂房要求

厂房面积与生产产能相匹配，按照风向及生产工艺流程设计。厂房设计应符合GB 50073和NY/T 528的要求，设原材料库、配料分装室（场）、灭菌室、冷却室、液体菌种培养室、净化接种室、培养室、发菌室、冷库。冷却、接种、培养室地面应能防水、防腐蚀、防渗漏、防滑、易清洗，有良好的排水系统，墙壁和天花板应能防潮、防霉、防水。接种室洁净度应达到整体万级、局部百级的标准，并具有新风循环系统。液体菌种接种室宜在墙面设置排水口。

4.4 设备要求

生产设备应有铲车、叉车、拌料机、智能装袋机、高压蒸汽灭菌柜、直线式和90° 传送带等。应具备小型高压蒸汽灭菌器、超净工作台、恒温振荡器、磁力搅拌器及相应配套转子、恒温培养箱、低温保藏设备、显微镜、食用菌液体菌种发酵罐、大功率空气压缩机、空气冷冻式干燥机、0.01 μm的洁净三级空气过滤系统、电路控制箱、实验室用高压水管、灭火器、紫外灭菌灯管和臭氧发生器等符合液体菌种生产灭菌及净化接种要求。

5 品种选择

引种应当来源可靠，种性清晰，适合当地气候条件和原料的品种，优先使用授权植物新品种权或者通过省鉴定（认定）的品种。

6 母种生产

常用母种培养基见附录A.1。

按照NY/T 528规定的母种生产过程进行母种生产，便于观察长势，选择9 cm直径培养皿做容器。母种质量指标应符合表1的要求

表 1 母种菌丝质量要求

项目	级别		
	优秀	合格	一般
菌丝色泽	淡白且透明	淡白色不透明	浓白
菌丝纹路	清晰呈放射状	清晰部分放射	纹路散乱或无
内圈形状	近似圆形边缘润	近似圆形边缘锯齿	不规则图形
角变	无角变	无角变	角变

项目	级别		
色素	无	无或少量	稍多
气生菌丝量	无	少量	明显

7 液体菌种生产

7.1 配方

摇瓶菌种、发酵罐液体菌种配方见附录A 2, A 3

7.2 摇瓶菌种生产

按照附录A 2配方,称量原料溶解蒸煮、定容,选用500 mL或1 000 mL抽滤瓶,装液量为瓶容量的2/5-3/5,内置5 cm磁力转子,使用2层透气聚丙烯薄膜封口,橡胶管末端牛皮纸包实。121 °C高压灭菌20-30 min。每瓶接入40-50 枚直径3 mm菌饼,25 °C恒温箱内静止培养24 h,搅拌转速400 rpm避光培养7-8 d。

7.3 发酵罐液体菌种生产

7.3.1 发酵罐选择

按照每个栽培袋菌种接种量40-50 mL计算液体菌种生产量,根据生产量选择不同规格发酵罐,中试规模推荐使用100 L、200 L发酵罐,生产规模推荐使用400 L、600 L及1 000 L发酵罐。罐容积不宜过大,避免增加清洗难度产生死角。

7.3.2 发酵罐空消

发酵罐空消前检查罐体是否漏气。利用压力0.11 Mpa以上的水蒸汽对反应器的空气滤芯、呼吸器、内胆进出口和内胆本身进行彻底灭菌,三级过滤系统滤芯若出现染色或异味,应立即更换。

7.3.3 发酵罐实消

以100 L发酵罐为例,将培养基、水和消泡剂装填进入发酵罐,初始装液量为罐体75 %-80 %。打开进行电加热灭菌,料温95 °C以上拧紧罐盖。罐温升至100 °C,关闭泵入罐体的无菌空气。观察内接种口,当水蒸汽摩擦声明显且有白色水蒸汽冒出时应在2 min后逐步关小已半开的接种口并于罐温105-106 °C完全关闭。升压过程需每隔10 min对外罐2个出汽口进行排水处理。外罐、内罐压差在0.025-0.035 Mpa之间。内胆温度124 °C,压力0.115-0.120 Mpa,实消50 min,过程中每10 min从排污口和外接种口冲刷排出内罐培养基共800-1 000 mL。

7.3.4 冷却接种

实消灭菌过程结束,剩余培养基占罐体的 70-75 %且培养基液面在发酵罐视镜的中线处。

内胆温度降至 30 °C以下后,使用呼吸器将压力排至 0 并微开呼吸器即开始接种。使用火焰圈保护法接种,须在 10 min 内完成菌种倾注。接种完毕,关闭呼吸器,打开进气阀,升内胆罐压至 0.09 Mpa 静置保持过夜。

7.3.5 培养和检测

根据罐压变化调整呼吸器阀门大小，发酵罐空气流速8-15 L/min，罐压保存在0.03-0.06 Mpa正压之间，温度 23 ± 2 °C，培养6-8 d。每日监测，见附录C.1。

采用LB（营养肉汤）培养基检测是否有杂菌污染，符合NY/T 1284 7.1.3.1的要求。

7.3.6 液体菌种成熟指标

表 2.1 大球盖菇液体菌种感官要求

项目	要求（抽滤瓶）	要求（发酵罐）
菌液色泽	菌丝体呈乳白色，菌液呈淡黄色	菌丝体呈微黄色，菌液呈土黄色
菌液形态	粘稠不分层，清澈透明，菌丝体均匀 菌丝球平均直径2-3 mm	菌丝体均匀、细小、固形物 $\geq 80\%$ 菌丝球平均直径2-3 mm
菌液气味	有大球盖菇特有香气，无酸、臭等异味	有大球盖菇特有香气，无酸、臭等异味

表 2.2 大球盖菇液体菌种感官要求

项目	要求
终止pH值	< 3.5
菌丝干重（g/100mL）	3.0-4.0
平均菌丝球直径（mm）	2-3
糖度(°)	3.0-3.5

8 栽培种生产

8.1 栽培种配方

常规栽培种料配方见A.4。根据季节和装袋前栽培种原料的pH控制石灰添加量在1%-3%，过磷酸钙1%，装袋前料堆pH 6.5-7.0。

8.2 培养料发酵制备

宜选取水泥地面作为发酵场地，按照配方将主料充分预湿，含水量保持在65 %-75 %，加入辅料，搅拌机或者人工搅拌均匀。建堆，堆宽1.2-1.5 m，堆高0.7-1 m，长度不限，呈现梅花状打三排排气孔，孔径8-10 cm。料温达到65 °C以上，保持24 h后进行第一次翻堆，料温再次达到65 °C以上并保持24 h进行第二次翻堆，以此类推整个过程需翻3-4次，发酵过程完成，冬季发酵时间不超过12 d，夏季发酵时间不低于7 d。记录内容见附录C.2。

8.3 装袋灭菌

使用折径*长*厚 14-17 cm*36 cm*0.004 cm 的一端封口高密度聚乙烯或聚丙烯塑料袋。使用冲压式装袋机装袋，袋料不宜过紧，海绵套环封口，封口至料面留出空隙。高压蒸汽灭菌 121 °C-2 小时；115-118°C灭菌 2-3 h，温度降至 80 °C即可出锅。

8.4 无菌接种

菌袋温度冷却至30℃。在百级净化接种间进行接种，使用高压蒸汽灭菌后的硅胶管在火焰保护下连接发酵罐，在无菌室连接手动接种器。压住接种器开关放出1 L左右液体菌种（视连接胶管长短而定）润洗管壁，接种器枪头插入待接栽培种菌袋，每袋注入40-50 mL（与7.3.1 前后一致）液体菌种。

8.5 发菌管理

接种后菌袋温度25℃，空气湿度为60-65%，CO₂浓度1 000-2 000 ppm的养菌室避光培养。定期检查菌种，挑出杂菌污染袋，填写发菌管理记录表，28-35 d内菌种满袋率应达到> 70 %。

8.6 菌种贮存

栽培种满袋后，为抑制菌丝变黄和菌皮生长，及时转运至4℃冷库进行低温保藏。

9 建档与追溯

建立生产档案记录、投入品档案记录、物候期档案记录，发现问题时便于追溯，电子档案、纸质档案保存期均为3年，以备查阅。产品质量安全追溯执行NY/T 3819操作规程。

附 录 A

(资料性)

大球盖菇制种流程常用配方

A.1 母种培养基配方

A.1.1 PDA培养基：马铃薯（煮汁）200 g，葡萄糖20 g，琼脂20 g，水1000 mL，pH自然；

A.1.2 马铃薯（煮汁）200 g，葡萄糖20 g，琼脂20 g，蛋白胨/酵母膏2 g，磷酸二氢钾1.5 g，硫酸镁0.5g，水 1000mL，pH自然；

A.1.3 CPDA培养基：马铃薯（煮汁）200 g，葡萄糖20 g，琼脂21 g，磷酸二氢钾1.5 ，硫酸镁0.5 其余同上。

A.2 抽滤瓶液体培养基常用配方

A.2.1 CPDB培养基：马铃薯（煮汁）200 g，葡萄糖20 g，蛋白胨2 g，磷酸二氢钾1.5 g，硫酸镁0.5 g，水1000 mL，pH自然；

A.2.2 马铃薯（煮汁）200 g，葡萄糖20 g，黄豆粉15 g，麸皮（浸汁）5 g，磷酸二氢钾1.0 g，硫酸镁0.5 g，水1000 mL，pH自然^[1]。

A.3 发酵罐液体培养基（100 L）常用配方

A.3.1 复合培养料1.5 kg，化工级葡萄糖2.5 kg，消泡剂40-50 mL，洁净自来水80-85 L，pH 6.5-7.0。

A.3.2 黄豆粉0.4 kg、白糖1.65 kg、硫酸镁80 g、磷酸二氢钾80 g、消泡剂40-50 mL、洁净自来水80-85 L，pH 6.5-7.0^[2]。

A.4 大球盖菇栽培种发酵料常用配方

A.4.1 玉米芯40 %，细木屑30 %，稻壳10 %，米糠17 %，过磷酸钙1 %，石膏1 %，石灰1 %，含水量57.5-62 %

A.4.2 细木屑82 %，麸皮15 %，黄豆粉2 %，石膏0.5 %，石灰0.5 %，其余同上

A.4.3 细木屑77 %，稻壳20 %，黄豆粉2 %，石膏0.5 %，石灰0.5 %，其余同上。

注1：所有栽培种配方初始含水量65 %-70 %，初始PH值7-7.5，常规发酵时间7-10 d，灭菌后PH值6.5-7.0，含水量60.5-61.5 %最佳。

注2：冬季可将玉米芯用量减至30 %，细木屑用量增至40 %；夏季生石灰用量可提升至3 %防止酸败；冬季发酵时间应延长但尽可能不超过12 d，夏季时间缩短不少于7 d。

附 录 B
(资料性)
大球盖菇栽培种制种 (液体转固体) 生产记录表

B.1 发酵罐核心参数监测表

表 B.1 发酵罐核心参数监测表

参数	检测项	标准范围	实测值1	实测值2	实测值3	记录时间
物理	温度 (°C)	23-24				
	压力 (Mpa)	0.03-0.06				
	尾气流速(L/min)	8.0-15.0				
化学	pH	< 6.0				
	尾气气味	1.清香2.微甜 3.微苦4.酸香				
菌	液体颜色	1.褐色2.土黄 3.淡黄4.其他				
	视镜液面高度	1.高2.中3.低				
	平均菌丝球直径 直径	2 mm-3 mm 1.是2.否				

B.2 发酵料堆温湿度和 pH 监测表

表 B.2 发酵料堆温湿度和 pH 监测表

日期	温湿度、pH	早6:00	中12:00	晚18:00	是否翻堆 (1.是2.否)	翻堆开始时间	翻堆结束时间
D1	温度 (外/内)	/	/	/			
	湿度/pH	/	/	/			
D2	温度 (外/内)	/	/	/			
	湿度/pH	/	/	/			
D3	温度 (外/内)	/	/	/			
	湿度/pH	/	/	/			
D4	温度 (外/内)	/	/	/			
	湿度/pH	/	/	/			
...		/	/	/			
		/	/	/			

B.3 发菌期管理记录表

表 B.3 发菌期管理记录表

日期	室温	料温	CO ₂ 浓度	湿度	光照	菌丝长势

T/41/T XXXX—XXXX

日期	室温	料温	CO ₂ 浓度	湿度	光照	菌丝长势