

DB42

湖北省地方标准

DB42/T 2063.2—2023

桑黄生产技术规程 第2部分：菌种制备

Technical regulations for sanghuangporus production—
Part 2: Spawn production

地方标准信息服务平台

2023-06-27 发布

2023-08-27 实施

湖北省市场监督管理局 发布

目 次

前言 III

引言 V

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 固体菌种制备 1

5 场地分区液体菌种制备 4

6 标签标志、包装、运输和贮存 6

附录 A（资料性） 母种培养基..... 8

附录 B（资料性） 原种、栽培种培养基..... 9

附录 C（资料性） 摇瓶液体菌种培养基..... 10

附录 D（资料性） 发酵罐液体菌种培养基..... 11

附录 E（资料性） 肉汤培养基..... 13

参考文献 14

地方标准信息服务平台

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。

本文件是DB42/T 2063的第2部分。DB42/T 2063《桑黄生产规程》已发布如下部分：

——第1部分：生产环境要求；

——第2部分：菌种制备。

请注意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专利的责任。

本文件由湖北森源生态科技股份有限公司、湖北省农业科学院经济作物研究所提出。

本文件由湖北省农业农村厅归口。

本文件起草单位：湖北森源生态科技股份有限公司、湖北省农业科学院经济作物研究所、宜昌市农业科学研究院、湖北省远安县农业技术推广中心。

本文件主要起草人：周伟、周洪英、孙波、吴洪丽、王卓仁、刘启燕、赵会长、刘世玲、申露露、李克彬、李明亮、翟红星、徐爱玉、史玉玲、陈姣蓉、陈严严、焦海涛、张顺凯、陈红霞。

本文件实施应用中的疑问，可咨询湖北省农业农村厅，联系电话：027-87665821，邮箱：hbsnab@126.com。本文件的有关修改意见建议请反馈至湖北森源生态科技股份有限公司，联系电话：0717-3815789，邮箱：hbsy666@163.com；湖北省农业科学院经济作物研究所，联系电话：027-87389860，邮箱：zhouhongying@hbaas.ac.cn。

地方标准信息服务平台

引 言

随着桑黄产业在湖北省的快速发展,需规范化、标准化引导桑黄生产,保障桑黄产业健康高质发展。桑黄菌种制备是生产过程的基础和核心,对生产顺利进行、桑黄产量和质量高低等有着决定性的影响。该文件制定的目的,是构建桑黄生产标准体系,整体提升我省及我国桑黄产品质量。该文件不同部分的划分和技术规程的确立,主要依据为桑黄生产过程中的不同环节,亦便于该文件各部分单独使用。《桑黄生产技术规程》拟由以下部分构成。

——第1部分:生产环境要求。目的在于规范桑黄生产环境的一般性要求及操作管理技术措施。

——第2部分:菌种制备。目的在于规范桑黄菌种制备的一般性要求及操作管理技术措施。

以上各部分涉及桑黄生产的不同环节,各部分内容协调互补,共同构成桑黄生产标准体系,以完善桑黄生产标准体系。

地方标准信息服务平台

桑黄生产技术规程

第2部分：菌种制备

1 范围

本文件规定了桑黄生产菌种制备过程以及标签标志、包装、运输和贮存要求。
本文件适用于湖北省桑黄生产环境要求的规范。

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 191 包装储运图示标志
- GB 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB/T 12728 食用菌术语
- GB/T 26373 醇类消毒剂卫生要求
- GB/T 37671-2019 金针菇菌种
- 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
- NY 5099 无公害食品 食用菌栽培基质安全技术要求
- DB42/T 2063.1 桑黄生产技术规程 第1部分：生产环境要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 固体菌种制备

4.1 人员配备

人员配备要求见参考文献《食用菌菌种管理办法》。

4.2 生产用水

应符合GB 5749的要求。

4.3 酒精

应符合GB/T 26373的要求。

4.4 母种制备

4.4.1 工艺流程

培养基配制→分装→灭菌→摆斜面冷却→无菌检验→菌种制备→接种→培养→检验→母种。

4.4.2 容器

使用直径18 mm~20 mm、长180 mm~200 mm的玻璃试管，试管塞采用硅胶塞。

4.4.3 培养基

参照附录A表A.1配方配制，将桑木粉和切片的马铃薯放入水中，煮沸30 min，用双层纱布过滤，弃去滤渣，加入琼脂融化后，加入剩余配料充分溶解后，补水至1000 mL。

4.4.4 分装

将配制好的培养基立即分装，装量为试管长度的1/5~1/4。试管口保持洁净，塞入硅胶试管塞，用牛皮纸包扎成捆。

4.4.5 灭菌

将包扎好的试管直立放在高压灭菌锅中灭菌，饱和蒸汽压力达到1.05 kg/cm²、温度121 °C时，恒压恒温灭菌30 min。

4.4.6 摆斜面

灭菌结束后，当压力表指针回到“0”位时，打开灭菌锅锅盖，趁热将试管以适当斜度摆放在操作台面上冷却凝固，斜面长度为试管的2/3。

4.4.7 无菌检验

按试管总量的3%~5%随机抽取斜面培养基，置于30 ± 1 °C恒温培养48 h，无微生物长出的为灭菌合格。

4.4.8 接种

取符合NY/T 1742 要求的桑黄菌种按无菌操作要求，取约0.3 cm²~0.5 cm²菌块接种到新的试管斜面培养基中，置于28 °C的培养箱中培养。当菌丝长满培养基，即得母种，可用于生产原种。

4.4.9 培养

将斜面试管置于28 °C的培养箱中培养，至菌丝长满培养基，选取菌丝生长健壮、均匀一致、无杂菌污染的试管菌种留存使用。

4.4.10 质量检验

接种48 h后应做首次检查，剔除未萌发生长或受污染者；母种菌落长至直径约2 cm左右时，进行第二次检查；长满前再检查一次，剔除污染或生长不良的菌种。按照 NY/T 1284 的规定进行检查。

4.5 原种、栽培种制备

4.5.1 工艺流程

培养基配制→装袋（瓶）→灭菌→冷却→接种→培养→质量检验→原种（栽培种）。

4.5.2 容器

- 4.5.2.1 原种一般选用 750 mL 玻璃菌种瓶或 15 cm×28 cm×(0.05 mm~0.07 mm) 聚丙烯塑料袋；
 4.5.2.2 栽培种一般选用 (17 cm~18 cm)×35 cm×(0.05 mm~0.07 mm) 改性聚乙烯或聚丙烯塑料袋。

4.5.3 培养基

培养基配方参见附录B表B.1，含水量控制在55%~65%。

4.5.3.1 培养基材料的规格及要求

培养基材料应符合NY 5099的要求，其具体规格和要求为：

- 用于原种及栽培种的桑树木屑、栎类等杂树木屑，冬季粉碎加工时过4目（直径1~2 cm）左右的筛，晒干入库备用；
- 麸皮使用新鲜、纯净无杂质的大块麸皮，含水量不超过12%；
- 碳酸钙粉使用合格的轻质碳酸钙粉；
- 蔗糖使用没有经过脱色处理的红糖为好，其营养成分更丰富。

4.5.3.2 材料的预处理及配置

为了使配制的培养料含水量均匀，木屑混合搅拌前作加水预湿处理；按照附录B的配方比例，计算培养基各材料的配方量准确称取，严格按照要求的含水量准确加入所需的水，利用搅拌机进行培养料的均匀搅拌。

4.5.4 装袋（瓶）

保证装料松紧度的一致，压紧料面，瓶装菌种用塑料透气膜封口，袋装菌种套上无棉盖体封口。装料确保在2 h~4 h内完成，防止时间过长微生物繁殖导致培养料酸败。

4.5.5 灭菌

保持饱和蒸汽压力 $1.05\text{ kg/cm}^2\sim 1.37\text{ kg/cm}^2$ 、温度 $121\text{ }^\circ\text{C}\sim 125\text{ }^\circ\text{C}$ 时，恒温恒压灭菌2 h。

4.5.6 冷却

灭菌完成后取出置于净化冷却区域冷却至室温。

4.5.7 接种

4.5.7.1 接种前准备

用75%酒精擦拭超净工作台、接种用具、需接种的培养料袋（瓶）进行表面消毒后，置于超净工作台内紫外线照射30 min，再进行后续操作。

4.5.7.2 接种操作步骤

接种操作步骤包括：

- 原种。提前备好母种，核对无误后严格按照无菌操作要求接种。接种工具经酒精灯火焰灼烧灭菌，冷却后挑取试管中直径为2 cm~2.4 cm的菌块接种到袋（瓶）中，每支母种接原种5~6袋（瓶）；
- 栽培种。提前备好原种，核对无误后严格按照无菌操作要求接种。接种工具经酒精灯火焰灼烧灭菌，冷却后挑取7 g~10 g原种菌块到料袋中，每瓶（袋）原种可扩繁40~60袋栽培种。

4.5.8 培养

4.5.8.1 原种培养

接种后将菌种袋（瓶）置于26℃～28℃培养室内避光培养30 d左右，菌丝长满袋（瓶）后，菌种表面出现轻微黄色色素，即可用于生产扩繁栽培种。

4.5.8.2 栽培种培养

接种后将菌种袋置于26℃～28℃培养室内避光培养35 d～45 d，菌丝长满袋后，菌种表面有黄色色素出现，即可用于生产扩繁栽培菌袋。

4.5.9 质量检验

原种及栽培种接种后，在菌丝长满培养基表面前，每日按照 NY/T 1284 的规定例行检查：观察菌丝生长状态、生长速度、以及是否有污染，剔除污染或菌丝生长残缺、缓慢、长势不良、拮抗、断层等不良的菌种。

5 场地分区液体菌种制备

5.1 生产条件

5.1.1 人员配备

人员配备同4.1。

5.1.2 生产场地

生产场地按照DB42/T 2063.1的要求执行。

5.1.3 培养基质

应符合NY 5099 的要求。

5.2 生产工艺

5.2.1 工艺流程

母种→摇瓶液体菌种→发酵罐液体菌种→质量检验。

5.2.2 母种制备

母种制备同 4.4。

5.2.3 摇瓶液体菌种制备

5.2.3.1 培养基

培养基配方参见附录C。

5.2.3.2 装瓶

采用1000 mL的常规直口三角瓶，每瓶装量为500 mL，每瓶加1支搅拌子，专用透气封口膜封口。

5.2.3.3 灭菌

在饱和蒸汽压力达到1.05kg/cm²，温度121℃时，恒压恒温灭菌30min。

5.2.3.4 接种

将灭菌后的培养基冷却至26℃以下，无菌操作下每瓶接入0.5cm²的母种3~5块，在电磁搅拌器上搅拌30min。

5.2.3.5 培养

在温度26℃~28℃下静止培养1d，移至摇床，在振荡频率150r/min~170r/min、温度26℃~28℃下培养6d~8d。

5.2.3.6 摇瓶液体菌种质量检验

摇瓶液体菌种培养容器规格应符合GB/T 37671-2019 中4.4.1.1的规定。将液体菌种容器置于摇床上，振荡频率150r/min~170r/min，温度26℃~28℃，避光培养6d~8d，摇瓶液体菌种质量应符合表1规定。

表1 摇瓶液体菌种质量标准

项 目		要 求
培养基装量		容器的40%~60%
母种接种块大小，接种量		每瓶培养基接种 0.5cm ² 菌块 3~5 块
感官指标	色泽	菌丝体呈浅灰色，菌液清亮呈黄棕色
	形态	菌液稍粘稠，有大量絮状、球状菌丝体悬浮，分布均匀
	气味	有桑黄菌种特有的香味，无酸、臭、霉等异味
杂菌		无杆状、球状等细菌、酵母菌等杂菌

5.2.4 发酵罐液体菌种制备

5.2.4.1 培养基

按照附录D规定配制，水质应符合GB 5749 的规定。

5.2.4.2 装液量

气升式发酵罐的装液量为其体积的60%~75%。

5.2.4.3 灭菌

夹层预热培养基至90℃后，用蒸汽进罐升温至121℃，饱和蒸汽压力达到1.05kg/cm²时，恒压恒温灭菌35min~40min。

5.2.4.4 冷却

灭菌结束后，向发酵罐夹层内充自来水，向发酵罐内充无菌空气冷却培养基至28℃。

5.2.4.5 接种

无菌条件下，通过发酵罐接种口接种液体菌种，接种量为发酵罐内培养基的0.8‰~1.2‰。

5.2.4.6 培养

向发酵罐内充无菌空气，使罐压保持0.20 kg/cm²~0.41 kg/cm²，温度26℃~28℃，培养8 d~9 d，至罐内液体菌种湿菌丝量达到80 g/L以上。

5.2.5 发酵罐液体菌种质量检验

接种后4 d~5 d，按照GB 4789.28的规定取样检验杂菌。继续培养4 d~5 d，发酵罐液体菌种应符合表2规定。

表2 发酵罐液体菌种质量标准

项 目		要 求
感官指标	色泽	菌丝体呈浅灰色，菌液澄清呈黄棕色，
	形态	稍粘稠并附壁，絮状，或有少量球状菌丝。大量菌丝体悬浮，分布均匀，不上浮、不下沉、不迅速分层。
	气味	有菌香气味，无酸、臭味等，发酵罐排气口气味正常。
理化指标	酸碱度	菌液pH值4.5~5。
	生物量	湿菌丝生物量达到80 g/L以上。
	形态和杂菌鉴别	菌丝体多絮状，少量球状，显微镜观察，菌丝无锁状联合。
杂菌		无杆状、球状等细菌、酵母菌等杂菌。

6 标签标志、包装、运输和贮存

6.1 标签、标志

6.1.1 产品标签

每支（瓶、袋、罐）菌种应贴有清晰注明的标签：产品名称（菌种名称、菌株代号、类别）、生产单位、接种日期、执行标准。

6.1.2 包装标签

菌种包装应贴有清晰注明标签：产品名称（品种名称、菌株代号、类别）、厂名、厂址、联系电话、出厂日期、保质期、贮存条件、数量、执行标准、菌种生产经营许可证编号。

6.1.3 包装储运图示

按GB/T 191规定，应注明标志：小心轻放标志、防水、防潮、防冻标志、防晒、防高温标志、防止倒置标志、防止重压标志。

6.2 包装

包装应符合以下要求：

- a) 母种外包装采用木盒或有足够强度的纸箱，内填棉花、碎纸等缓冲物；
- b) 原种、栽培种外包装采用洁净、干燥的塑料箱、编织袋、泡沫箱或有足够强度的纸箱。

6.3 运输

运输应符合以下要求：

- a) 不得与有毒、有害、有异味的物品混装混运；
- b) 运输工具应清洁、卫生、无污染物；
- c) 气温达 30℃ 以上时，需用 2℃~4℃ 的冷藏车运输；
- d) 运输中应有防震、防晒、防尘、防雨淋、防杂菌污染的措施。

6.4 贮存

贮存应符合以下要求：

- a) 母种在 5 ± 1 ℃ 冰箱中贮存，贮存期不超过 90 d；
- b) 固体原种和栽培种的贮存温度和时间应符合 NY/T 1742 的规定；
- c) 摇瓶液体菌种、发酵罐液体菌种均应及时使用，不贮存。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(资料性)
母种培养基

表A.1 给出了母种培养基配方。

表A.1 母种培养基配方

材 料	用 量
马铃薯	200 g
桑木粉	50 g
葡萄糖	20 g
琼脂粉	20 g
水	1000 mL

地方标准信息服务平台

附 录 B
(资料性)
原种、栽培种培养基

表B.1 给出了原种、栽培种培养基。

表B.1 原种、栽培种培养基配方

材 料	用 量
桑木屑	38 kg
栎类等杂木屑	40 kg
麸皮	20 kg
轻质碳酸钙	1 kg
蔗糖	1 kg
水	118 kg

地方标准信息服务平台

附 录 C
(资料性)
摇瓶液体菌种培养基

表C.1给出了摇瓶液体菌种培养基配方。

表C.1 摇瓶液体菌种培养基配方

材料	用量
葡萄糖	20 g
豆粕粉	4 g
玉米粉	4 g
麸皮粉	8 g
桑木粉	2 g
磷酸二氢钾	1 g
硫酸镁	0.5 g
水	1000 mL

表C.2给出了摇瓶液体菌种培养基配方。

表C.2 摇瓶液体菌种培养基配方

材料	用量
土豆淀粉	30 g~60 g
白砂糖	10 g
磷酸二氢钾	1 g
硫酸镁	0.5 g
酵母膏	1 g
水	1000 mL

附 录 D
(资料性)
发酵罐液体菌种培养基

表D.1给出了发酵罐液体菌种不同的培养基配方。

表D.1 发酵罐液体菌种培养基配方

材料	用量
葡萄糖	20 g
豆粕粉	4 g
玉米粉	4 g
麸皮粉	8 g
桑木粉	2 g
磷酸二氢二钾	1 g
硫酸镁	0.5 g
水	1000 mL

表D.2给出了发酵罐液体菌种培养基配方。

表D.2 发酵罐液体菌种培养基配方

材料	用量
可溶性淀粉	30 g~60 g
白砂糖	10 g
磷酸二氢钾	1 g
硫酸镁	0.5 g
酵母膏	1 g
水	1000 mL

表D.3给出了发酵罐液体菌种培养基配方。

表D.3 发酵罐液体菌种培养基配方

材料	用量
玉米粉	10 g
麸皮粉	10 g
葡萄糖	20 g

表 D.3 发酵罐液体菌种培养基配方（续）

材料	用量
蛋白胨	5 g
酵母膏	5 g
磷酸二氢钾	1 g
硫酸镁	0.5 g
水	1000 mL

地方标准信息服务平台

附 录 E
(资料性)
肉汤培养基

表E.1给出了肉汤培养基配方。

表E.1 肉汤培养基配方

材料	用量
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
蛋白胨	10 g
葡萄糖	3 g
琼脂	20 g
水	1000 mL

地方标准信息服务平台

参 考 文 献

[1] 《食用菌菌种管理办法》2006年3月27日农业部令第62号公布，2013年12月31日农业部令2013年第5号、2014年4月25日农业部令2014年第3号、2015年4月29日农业部令2015年第1号修订。

地方标准信息服务平台