

团 体 标 准

T/ZSJX 2102—2023

灵芝液体菌种生产技术规程

Code of practice for liquid spawn production of *ganoderma*

2023-12-26 发布

2023-12-31 实施

中国食用菌协会 发布
中国标准出版社 出版

全国团体标准信息平台
中国标准出版社

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 生产场地及环境	2
5 设施与设备	2
5.1 车间总体要求	2
5.2 化验室和菌种室	3
5.3 接种间	3
5.4 培养间	3
5.5 配料间	3
5.6 发酵间	3
5.7 设备	3
6 培养原料	3
6.1 化学试剂类	3
6.2 生物制剂和天然材料类	3
7 品种	4
8 生产工艺流程	4
9 生产要求	4
9.1 母种制备	4
9.2 摇瓶液体种制备	4
9.3 液体菌种制备	5
10 留样	6
11 记录与存档	6
12 操作人员要求	6
附录 A (资料性) 培养基配方	7
A.1 摇瓶液体培养基配方	7
A.2 液体菌种配方	7
附录 B (资料性) 培养工艺参数	8
B.1 摇瓶液体种培养	8
B.2 液体菌种培养	8
附录 C (资料性) 放罐指标	9
C.1 感官指标	9
C.2 理化指标	9

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。

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。

本文件由中国食用菌协会提出并归口。

本文件起草单位：江西仙客来生物科技有限公司、安发(福建)生物科技有限公司、浙江寿仙谷医药股份有限公司。

本文件主要起草人：潘新华、高益槐、李振皓、潘峰、郑春源、李明焱、徐泽群、戚俊、郑重。

灵芝液体菌种生产技术规程

1 范围

本文件规定了灵芝液体菌种生产场地及环境、设施与设备、培养原料、品种、生产工艺流程、生产要求、留样、记录与存档、操作人员要求。

本文件适用于赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. Ex Fr.)Karst.、紫芝 *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang 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/T 150.1 压力容器 第1部分:通用要求

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 528 食用菌菌种生产技术规程

NY/T 1742 食用菌菌种通用技术要求

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

液体培养 liquid culture

将菌种接种于液体的培养基中,并不断振荡或搅拌,使菌种均匀地在液体的培养基中生长繁殖的培养方法。

3.2

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]

3.3

罐压 jar-pressure

液体培养过程中菌种罐内所保持的压力。

注:单位为兆帕(MPa)。

3.4

液体培养器 cultivation apparatus for liquid spawn

进行液体菌种培养的专用设备。

3.5

煮罐 boiler

将培养器加水 80%后,用内置电热棒或外源蒸汽进行高压蒸汽灭菌处理的过程。

3.6

投料 feeding

将配制好的培养基投放到培养器中。

3.7

定容 constant volume

培养器中加入培养料后,加水至所要求体积。

3.8

放罐 empty pot

培养结束,将液体菌种从培养器内排出,接种到栽培袋(瓶)中的过程。

3.9

摇瓶液体种 liquid spawn in shake pot

装在玻璃菌种瓶内恒温振荡培养的液体菌种。

3.10

镜检 microscopic examination

通过显微镜观察灵芝菌丝生长发育状态和有无杂菌污染的过程。

3.11

通气量 ventilation volume

在液体菌种培养过程中发酵罐中料液体积与每分钟通入发酵罐中无菌空气体积的比例。

注:用每分钟通气量与罐体实际料液体积的比值(VVM)表示。

3.12

死角 dead angle

培养器蒸汽灭菌时未能达到彻底灭菌的地方。

3.13

罐压回零 jar-pressure returning to zero

液体菌种培养过程中,培养器内压力回到零点或呈负压。

4 生产场地及环境

4.1 厂房从布局结构功能上应满足灵芝液体菌种生产的基本需求,主要分区之间应相互独立隔离。主要分区应包括化验室、菌种室、接种间、培养间、配料间、发酵间和其他配套功能间。

4.2 厂房周围交通便利,无污水和其他污染源,卫生环境应符合 NY/T 528 相关要求。

5 设施与设备

5.1 车间总体要求

车间总体要求应包括但不限于:

- a) 车间地面能防水、防腐蚀、防渗漏、防滑和易清洗,有排水坡度和排水系统,排水沟是圆弧式的明沟;
- b) 墙壁和天花板能防潮、防霉、防水和易清洗;
- c) 门窗设置防蚊蝇纱网;

- d) 车间入口处设置洗手、消毒和干手设施；
- e) 设置与职工人数相匹配的更衣室、浴室、厕所和工作休息室；
- f) 车间设封闭式废物桶；
- g) 车间安装排气管道或排气设施。

5.2 化验室和菌种室

化验室应有相应的试验检测设备,菌种室应有制种用的灭菌设施和常规用具。

5.3 接种间

接种间应符合 GB 50073 的相关要求,并应设置缓冲间。

5.4 培养间

培养间应符合 GB 50073 的相关要求,培养间应配置相应的设备(如摇床等)用于摇瓶液体种的培养。

5.5 配料间

配料间应符合 NY/T 528 的相关要求。

5.6 发酵间

发酵间应符合 GB 50073 的相关要求。

5.7 设备

5.7.1 基础生产设备

基础生产设备包括培养器、空气净化系统、超高效空气过滤器、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、冰箱、显微镜、磁力搅拌机、磅秤、天平及 pH 计等,在经常停电的地方应有自备电源。并应满足以下要求。

- a) 培养器、高压蒸汽灭菌锅和蒸汽锅炉使用经政府有关部门检验合格、符合国家压力容器标准的产品。
- b) 液体培养器采用不锈钢材质,并符合 GB 150.1 的相关要求。
- c) 超高效空气过滤器的滤芯在额定风量下对粒径 $0.1\ \mu\text{m}\sim 0.2\ \mu\text{m}$ 粒子的捕集效率在 99.999% 以上,空气阻力在 280 Pa 以下。所有材质应耐 126 °C 高温。

5.7.2 常用生产用具

常用生产用具包括玻璃三角瓶、接种器、接种用火圈环、试管、量杯、量瓶、玻璃漏斗、滤纸及精密 pH 试纸等生物试验常规用品。

6 培养原料

6.1 化学试剂类

化学试剂类符合 NY/T 528 的相关要求。

6.2 生物制剂和天然材料类

生物制剂和天然材料类应符合 NY/T 528 要求,其中水不溶性固体物料应过 40 目筛(筛网孔径

25.4 mm)。

7 品种

母种质量应符合 NY/T 1742 的要求。

8 生产工艺流程

灵芝液体菌种生产工艺流程见图 1。

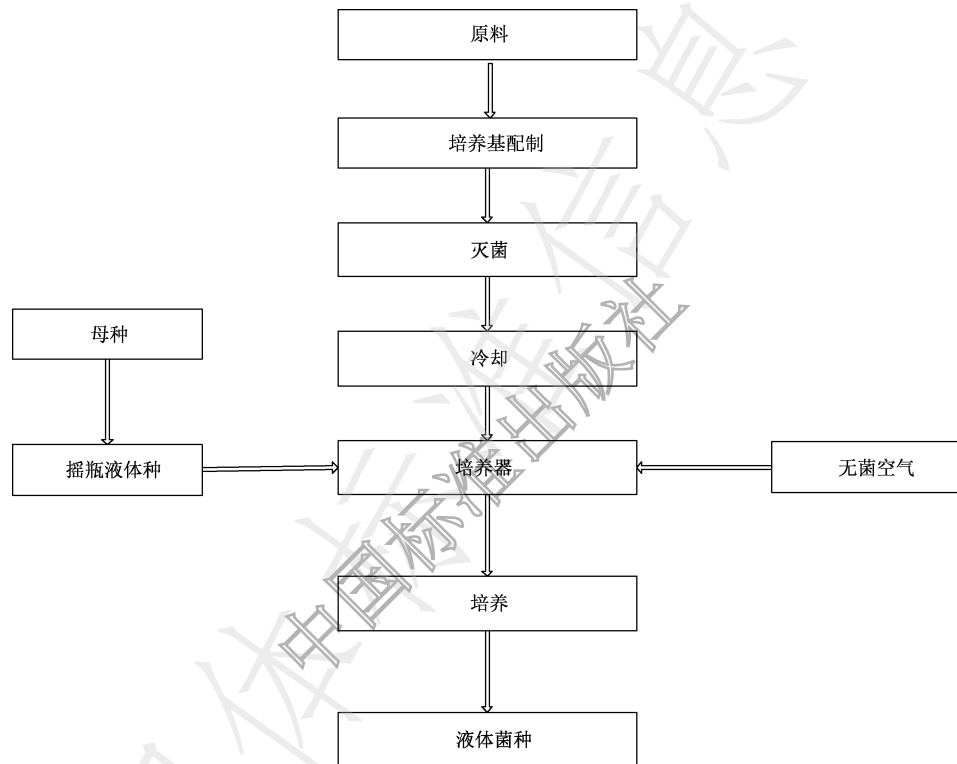


图 1 灵芝液体菌种生产工艺流程图

9 生产要求

9.1 母种制备

应符合 NY/T 528 制备要求,使用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar,PDA)。

9.2 摇瓶液体种制备

9.2.1 培养基配制

使用 500 mL~1 000 mL、耐 126 °C 高温的无色或近无色的玻璃菌种瓶。各类容器都应采取相应措施(如棉塞、硅胶塞等),保证摇瓶液体种不受污染。培养基配方见附录 A 中 A.1。

9.2.2 灭菌

摇瓶液体种培养基配制后应立即灭菌,灭菌压力为 0.1 MPa~0.12 MPa,时间为 30 min。灭菌后应

按照 NY/T 528 要求进行灭菌效果检查。

9.2.3 冷却

将灭菌后的摇瓶液体培养基冷却至室温。

9.2.4 接种

在无茵条件下,严格按无茵操作将母种接种至摇瓶液体培养基。

9.2.5 培养

培养间使用前用臭氧或其他适宜方式消毒。接种后的摇瓶液体培养基于恒温摇床培养,培养条件见附录 B 中 B.1。培养期间应定期检查,及时去除污染或异常的摇瓶,培养结束后进行镜检。

9.3 液体菌种制备

9.3.1 投料前准备

投料前准备工作应包括但不限于:

- a) 检查培养器上全部阀门、安全阀、压力表,要求完好、工作正常;
- b) 对培养器内、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;培养器初次使用、出现染菌、长期放置、更换品种时,都通过煮罐或空消进行灭菌。空消压力 0.105 MPa~0.125 MPa、温度 121 °C~124 °C,时间 30 min~40 min;
- c) 使用蒸汽对超高效空气过滤器进行灭菌,灭菌压力 0.105 MPa~0.125 MPa,时间 40 min。

9.3.2 培养基配制

原材料应符合 NY/T 528 的相关要求,用水应符合 GB 5749 的相关要求,培养基配方见 A.2。

9.3.2.1 投料与定容

将配制好的培养基材料,加适量温水,搅拌均匀,倒入或用泵抽入培养器中,加水定容至所需体积,培养基投料量为罐体总容积的 70%~80%,然后拧紧上料口盖。

9.3.2.2 灭菌

培养器内压力为 0.105 MPa~0.125 MPa,温度为 121 °C~124 °C、保持时间 30 min~40 min,防止灭菌死角。

9.3.2.3 冷却降温

灭菌结束将冷水通入培养器夹层或者内置冷却系统中循环,使培养基降温为 24 °C~28 °C。注意降温过程中要及时向培养器内通入无茵空气,维持罐压在 0.03 MPa~0.05 MPa,防止罐压回零。

9.3.3 接种

接种前,调整罐内压力,保持在 0.01 MPa~0.02 MPa,利用火焰保护接种法,把装有酒精棉球的接种用火圈环放在接种口的上方点燃;打开接种口盖,在火焰上打开摇瓶液体种,灼烧瓶口后迅速投入罐中(接种量 0.3%~0.5%);用火灼烧接种口盖子,迅速把接种口盖好,拧紧。移走火焰圈,调整罐内压力为 0.03 MPa~0.05 MPa。

9.3.4 液体菌种培养

使用自动化或半自动化控制培养器中的温度、压力、通气量等参数对液体菌种进行培养。培养参数见 B.2。培养期间定期检查菌丝生长状态、pH 检测或采用分子生物学聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)检测技术。

9.3.5 液体菌种放罐

培养结束后,达到放罐指标(见附录 C)即可放罐。终止发酵后应及时接种至栽培袋(瓶),接种过程中培养器内压力维持在 0.01 MPa~0.02 MPa。如需运输则在培养器内通入无菌空气,保持罐压 0.02 MPa~0.04 MPa,料温 6 °C~10 °C 可保存 3 d; 11 °C~15 °C 可保存 2 d,可短途运输,不宜长途运输。

10 留样

母种每个批号留样 3 支~5 支,摇瓶液体种每批次 3 瓶~5 瓶,于 4 °C~6 °C 下贮存,贮存至液体菌种经转接的栽培袋(瓶)至正常发菌。

11 记录与存档

母种、摇瓶液体种和液体菌种生产的每个环节都应有翔实的生产记录,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。

12 操作人员要求

液体菌种生产厂应有与液体菌种生产所需的专业技术人员,从事液体菌种生产的各级操作人员,应进行液体菌种专业培训,培训合格后上岗。

附录 A
(资料性)
培养基配方

A.1 摇瓶液体培养基配方

葡萄糖 2%、酵母粉 0.25%、蛋白胨 0.25%、磷酸二氢钾 0.1%、硫酸镁 0.05%、麸皮 5% (新鲜、不能霉变,煮沸 1 h,取汁),pH 自然。

A.2 液体菌种配方

葡萄糖 1.8%、玉米淀粉 0.6%、黄豆粉 0.6%、酵母粉 (60 目) 0.2%、蛋白胨 0.05%、磷酸二氢钾 0.1%、硫酸镁 0.05%、食用油 0.10%,pH 自然。

附 录 B
(资料性)
培养工艺参数

B.1 摇瓶液体种培养

摇瓶液体种培养工艺参数见表 B.1。

表 B.1 摇瓶液体种培养

序号	工艺	参数
1	培养温度	23 ℃~27 ℃
2	培养时间	6 d~7 d
3	摇床振荡频率	110 r/min~120 r/min

B.2 液体菌种培养

液体菌种培养工艺参数见表 B.2。

表 B.2 液体菌种培养

序号	工艺	参数
1	培养温度	23 ℃~27 ℃
2	通气量	(0.13 VVM~0.33 VVM)根据培养时间逐步调整
3	培养时间	4 d~7 d
4	罐压	培养过程维持 0.03 MPa~0.05 MPa
注：VVM 指每分钟通气量。		

附 录 C
(资料性)
放罐指标

C.1 感官指标

感官指标见表 C.1。

表 C.1 感官指标

项目	指标	检测方法
菌液色泽	球状菌丝体呈白色,滤液呈淡黄色至棕色	肉眼观察
菌液形态	菌液稍黏稠,有大量片状或球状菌丝体悬浮,分布均匀,不上浮,不下沉,不迅速分层,菌球间液不浑浊	肉眼观察
菌液气味	有灵芝液体培养特有的香气,无异味,如酸、臭味等培养器排气口气味正常,无明显改变	鼻嗅

C.2 理化指标

理化指标见表 C.2。

表 C.2 理化指标

项目	指标	检测方法
pH	3.5~4.5	pH 计
菌丝湿重 (g/100 mL)	>8	采用过滤法:采用 $\phi 15$ cm 的定量滤纸,将 100 mL 液体菌液,过滤至无水滴滴下,称重后减去滤纸湿重
	>5	采用离心法:高速离心,取一定体积的样品,经 10 000 r/min 离心 5 min,去掉上清液,称其湿重
显微镜下菌丝形态和杂菌鉴别	可见灵芝菌种液体培养基中特有的菌丝形态,球状菌丝体大量分布,菌丝粗壮,菌丝内原生质分布均匀,染色剂着色深; 无霉菌菌丝、酵母和细菌菌体	显微镜镜检(低倍镜、高倍镜、油镜)
留存样品无菌检查	有灵芝菌丝生长,划痕处无霉菌、酵母、细菌菌落生长	取样接种到肉汤培养基、营养琼脂培养基划线培养,分别在 28 °C 和 37 °C 恒温培养 2 d~5 d,每天观察菌落生长情况