ICS 07.100.30
X60

GB

中 华 人 民 共 和 国 国 家 标 准

XX/T XXXXX—XXXX

食品加工用酵母鉴定技术指南

Guideline for identification of yeast in food processing

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

征求意见稿

（本稿完成日期：）

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 实施

发 布

前　　言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会（SAC/TC64）提出。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会工业发酵分技术委员会（SAC/TC64/SC5）归口。

本标准起草单位：略。

本标准主要起草人：略。

食品加工用酵母鉴定技术指南

1 范围

本标准规定了食品加工用酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）的鉴定原则、鉴定方法和鉴定结果表述。

本标准适用于食品加工用酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）的种水平鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.1 PCR：polymerase chain reaction，聚合酶链式反应。

3.2 DNA：deoxyribonucleic acid，脱氧核糖核酸。

3.3 dNTP：deoxy-ribonucleoside triphosphate，脱氧核糖核苷三磷酸。

3.4 dATP：deoxy-adenosine triphosphate，脱氧腺苷三磷酸。

3.5 dCTP：deoxy-cytidine triphosphate，脱氧胞苷三磷酸。

3.6 dTTP：deoxy-thymidine triphosphate，脱氧胸苷三磷酸。

3.7 dGTP：deoxy-guanosine triphosphate，脱氧鸟苷三磷酸。

3.8 dUTP：deoxy-uridine triphosphate，脱氧尿苷三磷酸。

3.9 bp：base pair，碱基对。

3.10 Taq：thermus aquaticu，水生栖热菌。

3.11 Tris：tris(hydroxymethyl) aminomethane，三（羟甲基）氨基甲烷。

3.12 EDTA：ethylene diamine tetraacetic acid，乙二胺四乙酸。

3.13 TE：Tris-HCl、EDTA 缓冲液。

3.14　26s rDNA：26S ribosomal deoxyribonucleic acid，26s 核糖体脱氧核糖核酸。

3.15　Genbank:基因库。

3.16　EMBL：The European Molecular Biology Laboratory，欧洲分子生物学实验室。

3.17　DDBJ：DNA Data Bank of Japan，日本 DNA 数据银行。

4　鉴定原则

获得酵母菌种纯培养物后，采用表型试验和聚合酶链式反应（PCR）方法相结合的方式鉴定。

5　鉴定方法

5.1　表型试验

根据酵母菌株的培养形态、生理生化特征等内容，与分类系统对照，得到菌株的分类信息，参考《The Yeasts，a Taxonomic Study》（Fifth Edition）执行，其中生理生化特征也可按照自动微生物鉴定系统进行。

5.2　PCR 方法

获得酵母菌种纯培养后，提取酵母菌体基因组DNA，PCR扩增目标序列（如26s rDNA D1/D2区序列），所得的PCR产物进行序列测定，将DNA序列与已有核酸序列数据库（如Genbank、EMBL、DDBJ等）中已知参考序列进行同源性比对，并获得系统发育信息，得到菌株的分类信息，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）的PCR鉴定方法参见附录A。

6　鉴定结果表述

根据菌株的核酸序列（包括系统发育信息）、形态特征观察和生理生化特征，对照通用的鉴定系统，确定待鉴定菌株的分类地位。菌种名称采用国际命名规则，使用属名和种加词的拉丁词，并附中文译名，有异名时应同时标注。

附　录　A
（资料性附录）
酵母菌 26s rDNA D1/D2 序列分析方法（PCR 方法）

A.1　试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯或生化试剂，实验用水为灭菌双蒸水或蒸馏水。

A.1.1　质控菌株

大肠杆菌ATCC25922、酿酒酵母ATCC 18824 ^{T} =JCM 7255 ^{T} =CGMCC 2.1882^{T}、乳酸克鲁维酵母ATCC8585^{T}，或其他已确定分类地位的参考菌株。

A.1.2　麦芽汁液体培养基：麦芽汁加水稀释至10 ^{o}Bx ~15°Bx(巴林糖度计)，115℃灭菌15min。

A.1.3　酵母菌液体培养基：分别称取酵母膏 3.0g，麦芽浸膏 3.0g，蛋白胨 5.0g，葡萄糖 10.0g于蒸馏水中，加热搅拌溶解，补充蒸馏水至1.0L，于121℃灭菌15min。

A.1.4　Taq DNA聚合酶。

A.1.5　dNTP：dATP、 dTTP、 dCTP、 dGTP。

A.1.6　琼脂糖。

A.1.7　溴化乙锭或其他可替代的生物染料。

A.1.8　DNA分子量标记。

A.1.9　酵母基因组DNA提取试剂盒。

A.1.10　1×TAE缓冲液：称取Tris碱242g，吸取冰乙酸57.1mL，加入0.5mmol/L EDTA(pH=8.0) 100mL，用蒸馏水定容至1000mL，配制成50×TAE缓冲液，室温保存，使用时用蒸馏水稀释为1×TAE缓冲液。

A.1.11　琼脂糖凝胶（2%，w/v）：称取2.0g琼脂糖于锥形瓶中，加入98.0mL 1×TAE缓冲液，加热溶解。

A.1.12　10×PCR缓冲液。

A.1.13　6×loading buffer(上样液)。

A.1.14　无菌PCR反应管。

A.1.15　无菌离心管：1.5mL、2mL。

A.2　仪器和设备

A.2.1　电子天平：感量0.001g。

A.2.2　PCR仪。

A.2.3　离心机。

A.2.4　紫外凝胶成像仪。

A.2.5　电泳仪。

A.2.6　微量移液器：　10μL、100μL、200μL、1000μL。

A.2.7　恒温水浴锅。

A.2.8　超净工作台。

A.3　实验室基本要求和生物安全与质量控制

应符合GB 4789.1的规定。

A.4　操作步骤

A.4.1　菌株活化

A.4.1.1　酿酒酵母

无菌条件下，移取适量酿酒酵母纯培养物至麦芽汁液体培养基中，28℃静置培养三天，获得液体培养物。

A.4.1.2　乳酸克鲁维酵母

无菌条件下，移取适量乳酸克鲁维酵母纯培养物至酵母菌液体培养基中，24℃静置培养三天，获得液体培养物。

A.4.2　DNA模板制备

A.4.2.1　DNA模板提取

无菌条件下，移取处于对数生长期的1.5mL酵母液体培养物，10 000r/min 离心2min~5min，小心去除上清液。按照酵母基因组DNA提取试剂盒说明书提取DNA模板，所提取的模板DNA溶于50μL 无菌双蒸水中，-20℃保存，备用。

A.4.2.2　DNA模板浓度测定

按照GB/T 19495.3规定的方法执行。

A.4.3　引物、PCR反应体系及反应条件

A.4.3.1　引物选择

以酵母26s rDNA D1/D2区域序列为目的片段，长度约550bp-600bp，上游引物序列：5’ - GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3’，下游引物序列：5’-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G- 3’。

A.4.3.2　反应体系

10×PCR缓冲液（含Mg^{2+} ） 5μL，模板3μL-5μL，引物各0.4μmol/L，Taq DNA聚合酶1.5 units，dNTPs 0.2mmol/L，无菌双蒸水补充至50μL，同时设置阴性对照、阳性对照和空白对照。

A.4.3.3　反应条件

95℃预处理5min 、95℃变性1min、52℃退火1min、72℃延伸1min30s，36个循环后，72℃延伸10min，最后冷却到4℃保存。

A.4.4　PCR质量控制

每个PCR反应均应设置2个平行实验，应设置空白对照、阳性对照和阴性对照，空白对照的PCR反应体系中使用无菌双蒸水代替DNA模板，阳性对照使用与目标菌种同种或同属的模式菌种或参考菌株的DNA为模板，阴性对照采用不含目标序列的DNA为模板。

A.4.5　PCR扩增产物的电泳检验

使用1×TAE缓冲液配制2%琼脂糖凝胶，加热至沸腾溶解后，采取电泳前染色法，当凝胶温度在55℃~60℃时，微量移液器加入溴化乙锭或其他可替代的生物染料，使其终浓度达到1μg/mL或工作浓度为1×，趁热将琼脂糖溶液均匀倒入制胶器，室温冷却至凝固。在电泳槽中加入1×TAE缓冲液，使溶液没过胶面，移取5μL DNA扩增产物与1μL 6×loading buffer(上样液)混合均匀后，点样，同时根据目的片段大小，在点样孔中加入 DNA分子量标记，8 v/cm ~12v/cm，恒压，电泳20min~30min。在紫外凝胶成像仪下观察电泳结果，拍照并记录结果。

A.4.6　PCR结果判断

当出现下列情况之一，则PCR方法鉴定结果无效，应重新进行实验。

——两份平行测试样品的结果不一致；

——空白对照或阴性对照出现条带；

——阳性对照未出现目的片段。

A.4.7　序列测定及比对

将所得PCR产物进行测序，返回序列后，将所得序列输入核酸序列数据库，按照操作说明，进行同源性搜索比对，并构建系统发育树，报告菌种种属信息。