《食品加工用酵母鉴定技术指南》编制说明

（征求意见稿）

一、工作简况

1、任务来源

根据国家标准委《关于下达 2010 年国家标准制修订计划的通知》（国标委综合[2010]87 号），《食品生产用酵母鉴定评价》列入国家标准制定计划项目，计划编号：20100280-T-469 ，由全国食品工业标准化技术委员会工业发酵分委会归口，主要起草单位：中国食品发酵工业研究院等。

2、主要工作过程

起草阶段：

起草工作组积极筹备标准制定的前期工作，开展多项基础研究工作。计划下达后，为了使本标准更具有先进性、科学性，起草工作组查阅了大量国内外文献资料及相关技术法规，并进行行业调研发酵行业常用的酵母种类，最终确定了标准的适用鉴定范围，建立食品工业用酿酒酵母和乳酸克鲁维的鉴定原则和鉴定方法。

起草工作组采取鉴定方案是利用分子生物学和生理生化方法结合，重点是采用分子生物学方法，完成酿酒酵母和乳酸克鲁维 26s rDNA D1\D2 区域序列分析的方法学验证，所建立的鉴定方法能够将酿酒酵母和乳酸克鲁维鉴定至种水平，在此基础上，形成标准征求意见稿。

二、标准编制原则和主要内容

1、标准编制原则

以科学技术和实验数据为基本依据，结合产品实际生产情况，经过科学研究而制定。本标准的制定充分考虑规范行业发展，促进工业发酵行业技术进步，充分考虑国内相关的法规要求，结合国情和产品特点；与相关标准法规协调一致；结合行业国内的实际情况，确保标准的科学性、先进性、可操作性。

本标准起草过程中，主要按照 GB/T 1.1《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》、GT/T 20000《标准化工作指南》、GT/T 20001《标准编写规则》

等要求进行编写。本标准编制过程中，主要参考了以下标准或文件：

GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

《The Yeasts，a Taxonomic Study》（Fifth Edition）。

2、标准主要内容的论据

1) 标准名称

本标准计划下达名称为《食品生产用酵母鉴定评价》，GB/T 32099-2015 《酵母产品分类导则》国家标准对酵母制品按应用领域分为“食品加工用酵母、富营养素酵母、饲用酵母及饲用酵母蛋白制品”，以及 GB31639-2016 食品安全国家标准名称为“食品加工用酵母”，因此考虑到和酵母标准体系相协调，将“食品生产用”修改为“食品加工用”，另外酵母菌种的鉴定方法种类繁多，各种方法适用范围也存在差异性，“评价”范围不明确，本标准给出食品工业用酵母（酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母）的鉴定基本原则和技术方案，提供指南性建议，综上，标准计划名称修改为“食品加工用酵母鉴定技术指南”。

2）标准适用范围

根据 GB/T 32099-2015 《酵母产品分类导则》国家标准，我国食品发酵工业中所用的酵母菌种，包括酿酒酵母、贝酵母、薛瓦酵母等十几种和属，不同菌种的鉴定方法依菌种特性有所不同，不同菌种鉴定水平的策略和方法需要进行一一实验验证，造成鉴定工作量十分繁重和耗时，因此根据行业调研的实际情况，我国食品工业用常用的菌种主要是酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母，其中酿酒酵母的使用量至少占到 90%以上，本标准鉴定适用范围包括酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母，鉴定至种水平。

3) 鉴定原则

多相分类（Polyphasic taxonomy）是指利用微生物多种不同的信息，包括表型的、基因型的和系统发育的信息，综合起来研究微生物分类和系统进化的过程。多相分类几乎包括了现代分类中所有方面，如传统分类、化学分类、分子分类、数值分类等，被认为是目前研究各级分类单位的最有效的手段，可用于所有水平上的分类单位的描述和定义。多相分类方法代表着当今菌种分类领域的一种发展

趋势。

主要技术思路如下：在获得酵母菌种纯培养后，采用表型试验和聚合酶链式反应相结合的方式鉴定，首先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，对于大多数酵母，利用 26s rDNA D1/D2 区序列差异，即可鉴定至种水平，可根据需要，进一步完成形态和生理生化试验加以验证和确定。

4）表型试验

表型试验主要参考酵母鉴定权威著作《酵母菌的分类学研究》“The Yeasts，a Taxonomic Study（Fifth Edition）”，对于生理生化特征，为便于操作和节约时间，也可采用商品化的微生物自动鉴定系统进行。

5) PCR 方法（目标片段）

酵母菌分子鉴定方法通常包括核糖体 DNA 序列分析、DNA 指纹图谱、脉冲场凝胶电泳、实时 PCR 等。rDNA 是编码核糖体 RNA 的基因，通过 PCR 技术和荧光染色技术结合可以准确定位基因位置，其测定序列常用来鉴定物种同源性，现在 rDNA 与其转录间区(ITS) 的序列分析方法已被广泛应用于酵母菌的分类鉴定中，包括 18SrDNA、26S rDNA 的 D1 /D2、ITS、5.8S rDNA。这些序列大部分已经公布于 GenBank /EMBL /DDBJ 等国际核酸序列数据库中，为酵母菌的分类鉴定带来了极大的便利。

26S rDNA 的 Dl /D2 区域位于大亚基的 5’端，序列长度在 600 bp 左右，研究资料表明这段区域具有较高的变异率，可用于亲缘关系较近的菌株间的分类研究，该方法已经作为一种酵母分类和鉴定的方法被广泛采用。资料性附录 A 以 26S rDNA Dl /D2 为目标序列，给出了酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母的 PCR 鉴定方法。

3、解决的主要问题

酵母工业属于生物产业中的生物制造业，生物产业是我国战略性新兴产业之一。近年来中国成为全球酵母产能增长最为迅猛的区域，带动了亚太乃至全球酵母产能的快速增长，2016 年中国酵母类总产能达到 30 万吨。酵母应用的传统和

主导领域为面食发酵、烘焙、酿酒，行业发展相对成熟；酵母在饲料养殖、生物发酵等新兴领域市场容量巨大，应用前景广阔；酵母衍生品在风味、营养、健康等领域应用的广度和深度正在进一步拓展。

酵母菌是酵母工业发展的基础和关键，依据不同酵母菌的代谢特性生产相应的酵母产品。2015 年我国发布实施了 GB/T 32099-2015 《酵母产品分类导则》国家标准，规定了酵母产品的分类，并列出我国酵母产品用酵母种类，但未提出酵母鉴定方法，鉴定技术标准方面，主要有 GB/T 22547-2008 饲料添加剂 饲用活性干酵母（酿酒酵母）国家标准，仅提供了以形态学和生理生化特征为依据的传统鉴定方法，由于该方法鉴定过程繁琐、耗时，鉴定结果容易受操作人员经验影响，因此，研究建立食品加工用酵母鉴定技术标准，将有助于提升我国酵母产业技术标准水平，尽快与国际标准接轨。

近年来，随着分子技术的发展，依据微生物基因组的相关鉴定技术应运而生，可以直接用来进行微生物属甚至相同种属不同菌株的分类和鉴定，同时多相鉴定技术的提出和发展，为酵母鉴定至种甚至株水平提供坚实的技术支持。本标准的制定初步解决了我国酵母菌鉴定技术标准缺失的现实问题。

三、主要试验（或验证）情况

本标准在制定过程主要采用 26S rDNA Dl /D2 为目标序列，对食品加工用酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母进行 PCR 方法学验证。

从酵母生产企业中征集酵母产品，分别利用麦芽汁培养基和酵母菌培养基进行分离酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母，得到纯培养物。同时购买三株已知分类的地位的酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母、鲁氏酵母一并进行方法学验证。

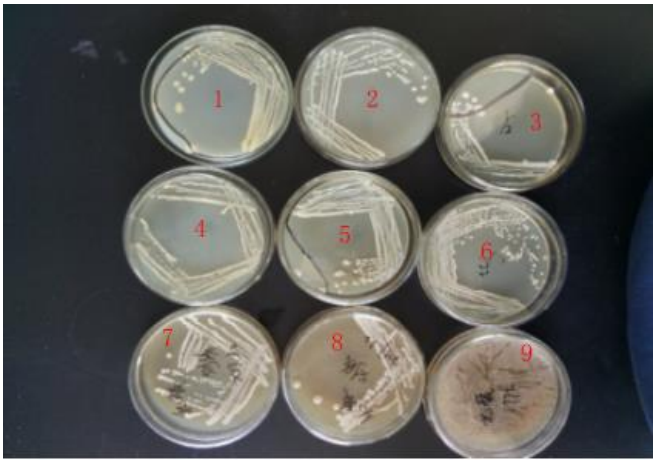


图 1 样品分离纯化

1.酿酒酵母（已知）、2.乳酸克鲁维酵母(已知)、3.鲁氏酵母（酵母）、4.样品 1、5.样品 2、6.样品 3、7.样品 4、8.样品 5、9.样品 6

按照附录 A 中提供的鉴定方法，上述菌种经液体培养，利用试剂盒提前基因组 DNA 后，进行 PCR 扩增，其琼脂糖电泳结果见图 2。扩增结果显示，所有样品均扩增出目的片段（约 600bp），条带清晰无杂带，无且阴性对照无条带。

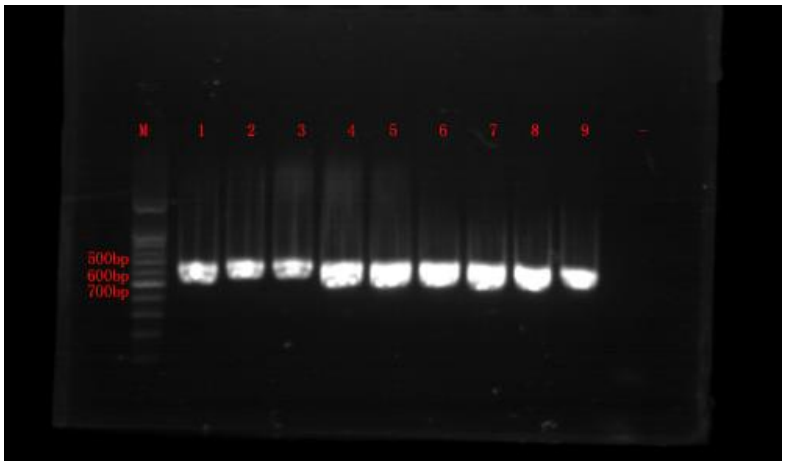


图 2 酵母样品 PCR 扩增电泳结果

M-DNA Marker；1.酿酒酵母（已知）、2.乳酸克鲁维酵母(已知)、3.鲁氏酵母（酵母）、4.样品 1、5.样品 2、6.样品 3、7.样品 4、8.样品 5、9.样品 6

将 PCR 产物送交测序公司进行测序，返回序列后，将所得序列输入 NCBI 核酸数据库进行同源性比对，并构建系统发育树。

从比对结果并结合系统发育分析可以看出，除鲁氏酵母外，酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母与数据库中现有序列的相似程度均在 99%以上，所有样品均能鉴定至种水平。

样品编号	酵母名称	相似序列	相似度	登录号
1	J（酿酒酵母）	Saccharomyces cerevisiae strain	99%	HM107797.1
2	R（乳酸克鲁维酵母）	Kluyveromyces marxianus strain	99%	FJ896140.1
3	L（鲁氏酵母）	Saccharomyces rouxii	97%	KY110285.1
4（样品 1）	A(酿酒酵母)	Saccharomyces cerevisiae strain	99%	GU080046.1
5（样品 2）	D(酿酒酵母)	Saccharomyces cerevisiae strain	99%	KX428530.1
6（样品 3）	N（酿酒酵母）	Saccharomyces cerevisiae strain	99%	HM107798.1
7（样品 4）	S1（酿酒酵母）	Saccharomyces cerevisiae strain	99%	HM107797.1
8（样品 5）	S2（酿酒酵母）	Saccharomyces cerevisiae strain	99%	KX428530.1
9（样品 6）	Y（酿酒酵母）	Saccharomyces cerevisiae strain	99%	HM191661.1

表 1 酵母样品同源性比对结果

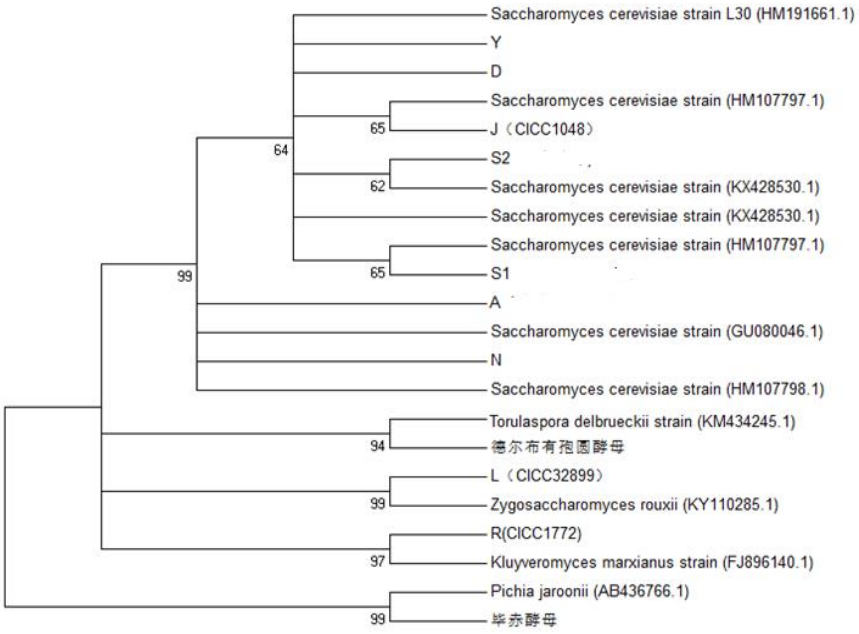


图 3 酵母样品 26s rDNA D1/D2 序列系统发育分析

四、标准中涉及专利的情况

本标准不涉及专利问题。

五、预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

酵母菌在食品发酵领域扮演重要的角色，依据不同酵母菌的代谢特性生产相应的酵母产品，因此，研究建立食品加工用酵母鉴定技术标准，在研究确定特定菌种的功能、开发新产品、菌种标识等方面提供技术支持，提升我国酵母产业技术标准水平，尽快与国际标准接轨。

本标准基于菌种多相鉴定的技术思路，规定了食品加工用酵母鉴定原则、鉴定方法及鉴定结果表述，解决了我国酵母菌鉴定技术标准缺失的现实问题。标准的实施将有效促进酵母行业有序发展，维护生产者、经营者和消费者的合法权益。

六、与国际、国外对比情况

本标准没有采用国际标准。

本标准制定过程中未查到同类国际、国外标准。

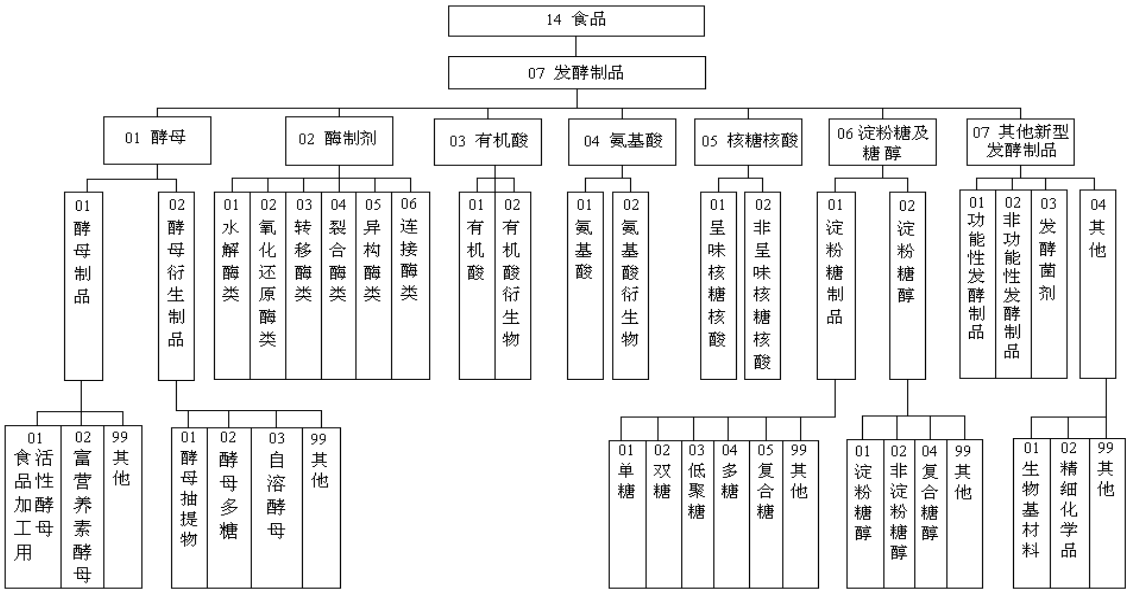
本标准制定过程中未测试国外的样品、样机。

本标准水平为国内先进水平。

七、在标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及标准，特别是

强制性标准的协调性

本专业领域标准体系框图如图。



本标准属于食品标准体系“07 发酵制品”中“其他新型发酵制品”的“发酵菌剂”。

本标准与现行相关法律、法规、规章及相关标准协调一致。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

九、标准性质的建议说明

建议本标准的性质为推荐性行业标准。

十、贯彻标准的要求和措施建议

建议本标准批准发布 6 个月后实施。

十一、废止现行相关标准的建议

无。

十二、其他应予说明的事项

无。

主要参考文献

1. Cletus P. Kurtzman *et al*.The Yeasts，a Taxonomic Study（Fifth Edition）[M].Elsevier，2011.
2. 唐玲等. 酵母的分子生物学鉴定[J]. 生物技术通报,2008,(05):84-87
3. 杨静静等. 分子生物学技术在酵母菌多相分类鉴定中的应用[J]. 中国酿造,2011,(04):16-20
4. 李金霞等. 酿酒酵母 26S rDNA D1/D2 区域序列分析及其系统发育研究[J]. 酿酒,2007,(01):37-39.