

中华人民共和国国家标准

《饲用微生物制剂中产朊假丝酵母的测定》 编制说明 (征求意见稿)

承担单位：山东宝来利来生物工程股份有限公司

安琪酵母股份有限公司

北京大北农科技集团股份有限公司

浙江科峰生物技术有限公司

唐山拓普生物科技有限公司

二〇二三年十一月

目录

一、工作简况	1
(1) 任务来源	1
(2) 制定背景	1
(3) 起草过程	3
二、国家标准编制原则、主要内容及其确定的依据	4
(1) 国家标准编制原则	4
(2) 主要技术路线	4
(3) 主要技术内容确定的依据	5
三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益	6
(1) 综述报告	6
(2) 技术认证	8
(3) 预期的经济效益、社会效益和生态效益	33
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况	34
五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因	34
六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系	34
七、重大分歧意见的处理经过和依据	34
八、涉及专利的有关说明	34
九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议	34
十、其他应当说明的事项	35

国家标准《饲用微生物制剂中产朊假丝酵母的测定》编制说明

(征求意见稿)

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、起草过程等

(一) 任务来源

本任务由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC76）归口上报及执行，主管部门为国家市场监督管理总局国家标准化管理委员会；项目编号：20213333-T-469，由谷巍主持承担《饲用微生物制剂中产朊假丝酵母的测定》的制定工作；由山东宝来利来生物工程股份有限公司、安琪酵母股份有限公司、北京大北农科技集团股份有限公司、浙江科峰生物技术有限公司、唐山拓普生物科技有限公司承担该项目的制定工作。

(二) 制定背景

产朊假丝酵母（*Candida utilis*）又名产朊圆酵母或食用圆酵母，现更名杰丁塞伯林德纳氏酵母（*Cyberlindnera jadinii*）。其细胞为圆形、椭圆形或腊肠形，属于假丝酵母属，能发酵葡萄糖、蔗糖和棉子糖。含丰富的蛋白质（约占菌体干物质的 32%-75%）、维生素 B 和多种矿物质，在畜禽养殖中有着广泛的应用。

1. 产朊假丝酵母具有良好的应用前景。

(1) 作为饲料用单细胞蛋白的优良菌种。产朊假丝酵母菌体蛋白的营养价值很高，饲料酵母干物质中蛋白质含量可高达 50%。产朊假丝酵母的菌体蛋白质约占菌体干物质的 32%~75%，细胞壁约占整体重量的 20%，成分主要有内壁的 β -葡聚糖 57%、外壁的甘露寡糖 6.6%和糖蛋白 22%，此外还有几丁质、蛋白质、脂类和灰分等。其赖氨酸含量比大豆还高，接近动物蛋白，色氨酸含量比大豆高 7 倍以上，还含有 B 族维生素、矿物质以及其他生理活性物质，作为一种多维高蛋白活性饲料添加剂而被广泛使用。

(2) 作为微生物活菌制剂。产朊假丝酵母在维持动物肠道菌群平衡、提供营养物质、提高动物日增重及机体免疫力等方面有很好的应用价值。1) 产朊假丝酵母在动物体内增殖分泌胃蛋白酶、淀粉酶等多种消化酶类，不但可以大幅度提高饲料原料的蛋白质水平，加强对营养物质的消化利用，提高消化率，促进畜

禽生长，还能增强抵抗疾病和抗应激的能力，提高饲料报酬。2) 拮抗动物病原菌并维持和调整肠胃微生态平衡。产朊假丝酵母进入肠胃后能快速定植和繁殖，消耗氧气，形成一个低氧环境，给肠胃内的生理性厌氧菌如双歧杆菌、乳酸菌、消化链球菌等有益微生物的生长繁殖创造有利条件，从而抑制有害菌的生长，使菌群失调得以调整，使肠胃功能得以恢复。3) 增强动物体的免疫功能。产朊假丝酵母细胞壁中甘露糖和 β -葡聚糖具有免疫促进剂的功能，能够激发或增强机体免疫功能。

(3) 制备酵母培养物。酵母培养物主要由酵母细胞、酵母代谢产物以及变性培养基三部分构成。含蛋白质、氨基酸、必需脂肪酸、核苷酸、寡糖、维生素以及未知生长因子等。具有提高动物生产性能、优化饲料营养、改善动物健康状况等重要作用，已成为广泛应用于反刍动物、单胃动物、家禽的一种“绿色”生物活性饲料添加剂。

2. 国家饲料监管法律法规的配套需要。

产朊假丝酵母是我国《饲料添加剂品种目录（2013）》中规定允许使用的菌种，但没有相应的国家标准和行业标准与之配套，本标准的制定是为了适应《饲料和饲料添加剂管理条例》和中华人民共和国农业农村部公告第 226 号《新饲料添加剂申报材料要求》的相关要求。

3. 促进市场和产业发展需求。

为维护我国动物源性食品安全和公共卫生安全，农业农村部于 2019 年 7 月颁布了第 194 号公告，自 2020 年 1 月 1 日起，退出除中药类外的所有促生长类药物饲料添加剂在饲料中的添加使用；同时国家鼓励微生物制剂等绿色添加剂产品研发上市，加快了我国进入“无抗时代”的脚步。目前国内外诸多企业致力于产朊假丝酵母的研发、生产、推广应用等，国内生产产朊假丝酵母饲料添加剂的企业主要包括安琪酵母股份有限公司、山东圣琪生物有限公司、山东宝来利来生物工程股份有限公司、湖北绿天地生物科技有限公司、武汉科缘生物发展有限责任公司、湖北海宜生物科技有限公司、河南德邻生物制品有限公司、南京福润德动物药业有限公司等企业。国外在酵母及酵母培养物方面取得显著成效的公司主要有瑞士百福微生物有限公司、瑞士阿格拉诺股份公司、巴西库塔糖业公司、巴西奥特奇公司、德国 F. X. Wieninger 有限责任公司、韩国真力生物科技有限公司、

韩国 Eunjin 国际生物技术株式会社、台湾丰展生物科技股份有限公司、日本新水株式会社、法国拉曼股份公司、法国乐斯福工业公司、丹麦 De Danske Gaerfabrikker A/S 公司、西班牙 Calier 实验室有限公司、英国普碧欧堤丝国际有限公司、美国 AFB International 公司、美国奥特奇公司、美国达农威公司和美国伟克公司等。

4. 为保障产朊假丝酵母产品质量安全提供技术支撑。

产朊假丝酵母作为饲料添加剂广泛应用于畜禽养殖中，但饲料中产朊假丝酵母的测定尚无国家强制性标准；推荐性标准中仅 1 项国家标准(GB/T 34224-2017)规定了生物产品中功能性微生物包括产朊假丝酵母等的检测方法，另有 1 项行业标准（NY/T 1969-2010）和多项企业标准。现行标准中对产朊假丝酵母的菌落、菌体形态的描述，对产朊假丝酵母的接种方式、培养基、培养温度等存在差异。这导致产朊假丝酵母生产应用环节中存在菌种属性不准确、活菌数标识不符、纯度低、无统一评判标准等问题。因此有必要制定此项标准。

（三）主要起草过程

1. 确定编制小组，搜集样品和资料

2021 年 2 月～2021 年 6 月：收集查阅了与产朊假丝酵母相关的国内外标准、企业标准及相关资料，搜集了产朊假丝酵母饲料添加剂样品，结合实际样品情况，对这些资料进行整理；编制标准草案，进行标准申报。

2. 确定技术路线，进行实验

2021 年 7 月～2022 年 8 月：进一步进行实验，对草案进行完善；对标准设值进行讨论；并按照 GB/T 1.1-2020 形成了标准初稿。

3. 内部讨论和修改完善

2022 年 8 月～2022 年 12 月：山东宝来利来生物工程股份有限公司标准编制组进行多频次讨论和协商，对标准初稿进行修改，确定标准初稿。

4. 试验确证

2022 年 7 月～2022 年 9 月：由山东省饲料兽药质量检验中心、山东省农业科学院农产品加工与营养研究所及青岛谱尼测试有限公司对文件中制定的产朊假丝酵母检测方法进行确证。

SN/T 3266-2012《食品微生物检验方法确认技术规范》中“6.3 定量方法性

能指标计算与判定”和 GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》对重复性限和再现性限进行计算。见表1。

表1 重复性限和再现性限结果

样品号	重复	检测值 ($\times 10^9$ CFU/g)					重复性 限 r	再现性 限 R
B1	A1	3.63	3.60	3.57	3.63	3.73	0.222	0.550
	A2	3.20	3.23	3.33	3.27	3.47		
	A3	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60		
B2	A1	4.77	4.83	4.70	4.60	4.60	0.228	0.436
	A2	4.33	4.47	4.50	4.47	4.37		
	A3	4.60	4.60	4.60	4.60	4.60		

5. 定向征求意见

2023年7月11日：邀请专家对标准初稿进行现场审议。

2023年8月~11月：标准编制组根据专家意见进行方法修正，形成新的征求意见稿。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定的依据

（一）国家标准编制原则

本文件遵循市场相关性原则、协商一致性和普遍适用性原则，根据 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》的规定进行的编制。

（二）主要技术路线

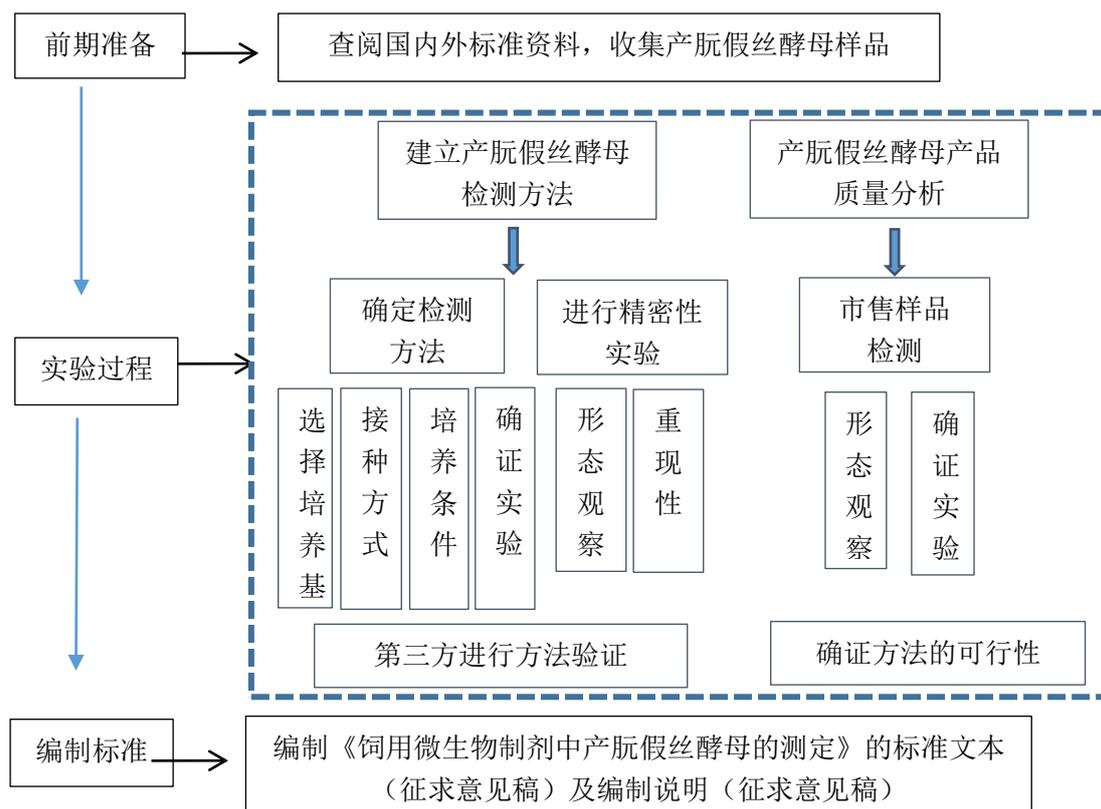


图 1 国家标准《饲用微生物制剂中产肮假丝酵母的测定》研制技术路线

(三) 主要技术内容及确定的依据

本标准的主要技术内容及确定的依据如下。

1. 国内标准情况

《饲料添加剂品种目录（2013）》中，产肮假丝酵母位居“微生物”类别，可用于养殖动物。然而，饲料中产肮假丝酵母的测定尚无国家强制性标准，推荐性标准中仅有 1 项国家标准《GB/T 34224-2017 生物产品中功能性微生物检测》和 1 项行业标准（《NY/T 1969-2010 饲料添加剂 产肮假丝酵母》）。

2. 企业标准情况

目前现行有效的企业标准多达 60 余项，由参与生产企业起草制定，主要包括山东圣琪生物有限公司 Q/370883JSQ 003-2018 等（表 1），其中涉及到的产品主要有：强微 HL010-050（宜春强微生物科技有限公司）；鑫牧绿（沧州新大地生物科技有限公司）；普乐宝（产肮假丝酵母）（广东希普生物科技股份有限公司）；饲料添加剂 产肮假丝酵母 JSJM-01（甘肃汇能生物工程有限公司）；饲料添加剂 产肮假丝酵母 YH012-001（山东益昊生物科技有限公司）；饲料添加剂 产肮假丝酵母 C50、C200（山东圣琪生物有限公司）；饲料添加剂 产肮假丝

酵母 I 型、II 型（湖北绿天地生物科技有限公司）；源益生 BDWS2501、增益泰 BDWS2502、百德康健 BDWS2503（山东百德生物科技有限公司）等。

表 2 产朊假丝酵母主要企业标准

序号	标准号	起草单位
1	Q/370883JSQ 003-2018	山东圣琪生物有限公司
2	Q/AQJM 2256-2018	安琪酵母股份有限公司
3	Q/LTD 04-2019	湖北绿天地生物科技有限公司
4	Q/JSDB 63-2020	广州金水动物保健品有限公司
5	Q/371428ZKSW0022-2019	山东中科生物创新产业园管理有限公司
6	Q/370703SBD 025-2016	山东百德生物科技有限公司
7	Q/BVQY 005-2018	湖南泰谷生物兽药有限公司
8	Q/370725SYH 012-2020	山东益昊生物科技有限公司
9	Q/0QW006-2015	宜春强微生物科技有限公司
10	Q/GSHN 03-2019	甘肃汇能生物工程有限公司
11	Q/XPSW 15-2017	广东希普生物科技股份有限公司
12	Q/370902SBL119-2020	山东宝来利来生物工程股份有限公司

3. 国际标准情况

全国标准信息公共服务平台国外标准未查到与产朊假丝酵母相关匹配记录；中国标准信息服务网、美国国家标准学会(ansi)、国际电工委员会(IEC)、ISO、IHS Markit Standards Store 网站也未查到相关标准。

三、主要试验（或验证）的分析，综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

（一）综述报告

产朊假丝酵母（*Candida utilis*）作为饲料添加剂，广泛应用于畜禽养殖中。但生产应用环节中存在菌种属性不准确、活菌数标识不符、纯度低、无统一评判标准等问题。饲料中产朊假丝酵母的测定尚无国家强制性标准；推荐性标准中仅有 1 项国家标准（GB/T 34224-2017）规定了生物产品中功能性微生物包括产朊假丝酵母等的检测方法，另有 1 项行业标准（NY/T 1969-2010）和多项企业标准。

现行标准中对产朊假丝酵母的菌落、菌体形态的描述，对产朊假丝酵母的接种方式、培养基、培养温度等均存在差异。

中华人民共和国国家标准《GB/T 34224-2017 生物产品中功能性微生物检测》中描述了产朊假丝酵母的菌体形态和生化鉴定。菌体形态描述产朊假丝酵母呈椭圆形或腊肠形，大小 $(3.5\sim 4.5)\ \mu\text{m}\times(7.0\sim 13.0)\ \mu\text{m}$ ，多边芽殖，能形成假菌丝或有隔菌丝。生化鉴定描述了糖发酵实验和碳源同化实验。中华人民共和国农业行业标准《NY/T 1969-2010 饲料添加剂 产朊假丝酵母》中描述了产朊假丝酵母的菌体形态、培养形态、生理生化特征、分子生物学特征、感官要求、水分含量、卫生指标等。菌体形态描述中细胞呈椭圆形，大小为 $(3.5\sim 4.5)\ \mu\text{m}\times(7.0\sim 13.0)\ \mu\text{m}$ ，以多边出芽方式进行无性繁殖，形成假菌丝。无有性孢子，不产生色素。培养形态描述中：a) 麦芽汁琼脂培养基：菌落乳白色，平滑，有或无光泽，边缘整齐或菌丝状；b) 葡萄糖-蛋白胨-酵母提取物培养基：表面无菌膜，液体浑浊，管底有菌体沉淀。生理生化特征中描述了产朊假丝酵母的糖发酵实验、碳源同化实验、其他实验如无维生素培养基生长状况、温度实验、高渗透压生长实验、尿素分解实验、重氨基蓝 B (DBB) 实验等。分子生物学特征中描述产朊假丝酵母基因组经 18S rDNA 5'端通用引物 ITS1 (P1) 和 ITS2 区内 5'端特征引物 CU (P2) 进行 PCR 扩增后出现 449 bp 的特征片段，经 18S rDNA 5'端通用引物 ITS1 (P1) 和 28S rDNA 3'端通用引物 (P3) 进行 PCR 扩增后出现 565 bp 的特征片段，有别于其他真菌。

有很多企业标准饲料添加剂产朊假丝酵母的制定参照或采用了行业标准 (NY/T 1969-2010) 的描述。如：沧州新大地生物科技有限公司企业标准《混合型饲料添加剂微生物 Q/CXDD 01-2021》、朝阳华星生物工程有限公司企业标准《饲料添加剂 产朊假丝酵母 Q/CYHX003-2017》、广州金水动物保健品有限公司企业标准《饲料添加剂 产朊假丝酵母 Q/JSDB 63-2020》、哈尔滨农垦牧王生物科技有限公司企业标准《混合型饲料添加剂 Q/HMW002-2018》、宜春强微生物科技有限公司企业标准《混合型饲料添加剂 (产朊假丝酵母+枯草芽孢杆菌+乳酸片球菌) Q/YCQW 019-2015》。宜春强微生物科技有限公司企业标准《混合型饲料添加剂(产朊假丝酵母+枯草芽孢杆菌+乳酸片球菌)Q/YCQW019-2018》、《混合型饲料添加剂 (粪肠球菌+产朊假丝酵母+枯草芽孢杆菌) Q/YCQW020-2018》、《混合型饲料添加剂 (产朊假丝酵母) Q/0QW006-2015》、

《水产水质改良用 产朊假丝酵母制剂 Q/0QW013-2014》。

除参照行业标准的企业标准外,还有众多产朊假丝酵母企业标准,标准不一。山东中科生物创新产业园管理有限公司企业标准《饲料添加剂 产朊假丝酵母 Q/371428ZKSW0022-2019》采用孟加拉红培养基、梯度稀释倾注法、 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,观察菌落形态,鉴别后计数。产朊假丝酵母菌落光滑、湿润,菌落红丝,边缘不整齐。山东圣琪生物有限公司企业标准《饲料添加剂 产朊假丝酵母 Q/370883JSQ 003-2018》采用麦芽汁培养基、梯度稀释涂布法、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\sim 72$ 小时至长出典型菌落计数,平板培养 48 h 后,产朊假丝酵母菌落乳白色,平滑,有或无光泽,边缘整齐或菌丝状。山东亿安生物工程有限公司企业标准《混合型饲料添加剂液态 嗜酸乳杆菌和产朊假丝酵母 Q/370103YAB 001-2019》采用产朊假丝酵母菌培养基(蛋白胨 10 g ,牛肉膏 3 g ,氯化钠 5 g ,琼脂 18 g , $\text{pH } 7.2\sim 7.5$,蒸馏水 1000 mL)、平板涂布法、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 天,菌落呈奶油色。鼎正生物药业(天津)有限公司企业产品标准《混合型饲料添加剂 产朊假丝酵母 Q/12DZSW 1019-2016》采用产朊假丝酵母培养基(蛋白胨 10.0 g 、酵母膏 3.0 g 、牛肉膏 10.0 g 、磷酸氢二钾 2.0 g 、葡萄糖 10.0 g 、氯化钠 10.0 g 、琼脂 $15.0\sim 20.0\text{ g}$ 、水 1 L , $\text{pH } 7.1\pm 0.2$),梯度稀释涂布法、 $30\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 48 h ,产朊假丝酵母菌落乳白色,较大,细胞卵圆形。山东百德生物科技有限公司企业标准《饲料添加剂 产朊假丝酵母 Q/370703SBD 025-2016》采用马铃薯葡萄糖培养基(葡萄糖 20.0 g 、马铃薯浸粉 5.0 g 、氯霉素 0.1 g 、水 1000 mL , $\text{pH } 6.0\pm 0.2$,琼脂 20.0 g)、梯度稀释涂布法、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后计数,菌落圆形,乳白色,平滑,有或无光泽,边缘整齐或菌丝状。

(二) 技术认证

经过对行业标准《NY/T 1969-2010 饲料添加剂 产朊假丝酵母》及企业标准进行分析,目前主要使用的产朊假丝酵母检测培养基包括营养琼脂(Nutrient Agar, NA)、麦芽汁琼脂(Malt Extract Agar, MEA)、孟加拉红琼脂(Rose Bengal Medium, RBA)、马铃薯葡萄糖琼脂(Potato Dextrose Agar, PDA)这4种培养基(见表3)。实验采用 CICC 1314 为产朊假丝酵母标准菌株,经液态发酵、干燥而制得菌粉。接种方式使用倾注法和涂布法;培养温度为 $26\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。从培养基的选择、接种方式、培养温度和培养时间4个方向进行试验,研究制定科学严谨、具

有普遍性、可操作性和较优的产朊假丝酵母的检测方法。

表3 产朊假丝酵母常用检测培养基

序号	培养基名称	培养基成分, pH	使用的标准号
1	营养琼脂 (NA)	蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1000 mL。 pH 7.2~7.5	《Q/370103YAB 001-2019 混合型饲料添加剂 液态嗜酸乳杆菌和产朊假丝酵母》山东亿安生物工程有限公司企业标准
2	麦芽汁琼脂 (MEA)	麦芽浸粉 130.0 g, 氯霉素 0.1 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL。 pH6.0±0.2 (25℃时)	1.《NY/T 1969-2010 饲料添加剂 产朊假丝酵母》中华人民共和国农业行业标准; 2.《GB/T 34224-2017 生物产品中功能性微生物检测》中华人民共和国国家标准
3	孟加拉红琼脂 (RBA)	蛋白胨 5.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 磷酸二氢钾 1.0 g, 硫酸镁 0.5 g, 1/3000 孟加拉红溶液 100 mL, 氯霉素 0.1 g, 琼脂 15.0 g, 水 1000 mL。pH 自然	1.《NY/T 1969-2010 饲料添加剂 产朊假丝酵母》中华人民共和国农业行业标准 2.《Q/370902SBL119-2020 饲料添加剂 产朊假丝酵母》山东宝来利来生物工程股份有限公司企业标准 3.《Q/371428ZKSW0022-2019 饲料添加剂 产朊假丝酵母》山东中科生物创新产业园管理有限公司企业标准
4	马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA)	葡萄糖 20.0 g, 马铃薯浸粉 5.0 g, 氯霉素 0.1 g, 蒸馏水 1000 mL, 琼脂 20.0 g。pH 为 6.0±0.2	《Q/370703SBD 025-2016 饲料添加剂 产朊假丝酵母》山东百得生物科技有限公司企业标准

1. 产朊假丝酵母菌落形态检测条件的确定

(1) 培养温度的确定

表4 不同培养温度对产朊假丝酵母活菌数的影响 ($\times 10^9$ CFU/g)

温度 (°C)	NA	PDA	RBA	MEA
26	1.70±0.14	1.62±0.28	1.44±0.06	1.62±0.16
28	1.83±0.11	1.67±0.04	1.39±0.08	1.90±0.09
30	1.70±0.07	1.37±0.16	1.22±0.22	1.78±0.20
32	1.22±0.08	1.29±0.16	1.19±0.14	1.45±0.13
37	1.10±0.06	0.90±0.06	0.90±0.04	1.14±0.09

除 RBA 外, 其余培养基下均是 28 °C 时活菌数最高, 28 °C 与 26 °C、30 °C、32 °C、37 °C 组的 *P* 值分别为 0.234、0.068、0.000、0.000, 这表明 28 °C 与 26 °C、

30 °C 差异不显著 ($P>0.05$)，28 °C 与 32 °C、37 °C 差异显著 ($P<0.05$)。故产朊假丝酵母活菌数测定时培养温度宜采用 28 °C。

(2) 培养时间的确定

对酿酒酵母菌粉、产朊假丝酵母菌粉及二者混合菌粉适度梯度稀释后，以孟加拉红琼脂 (RBA) 平板涂布法接种，28 °C 培养。

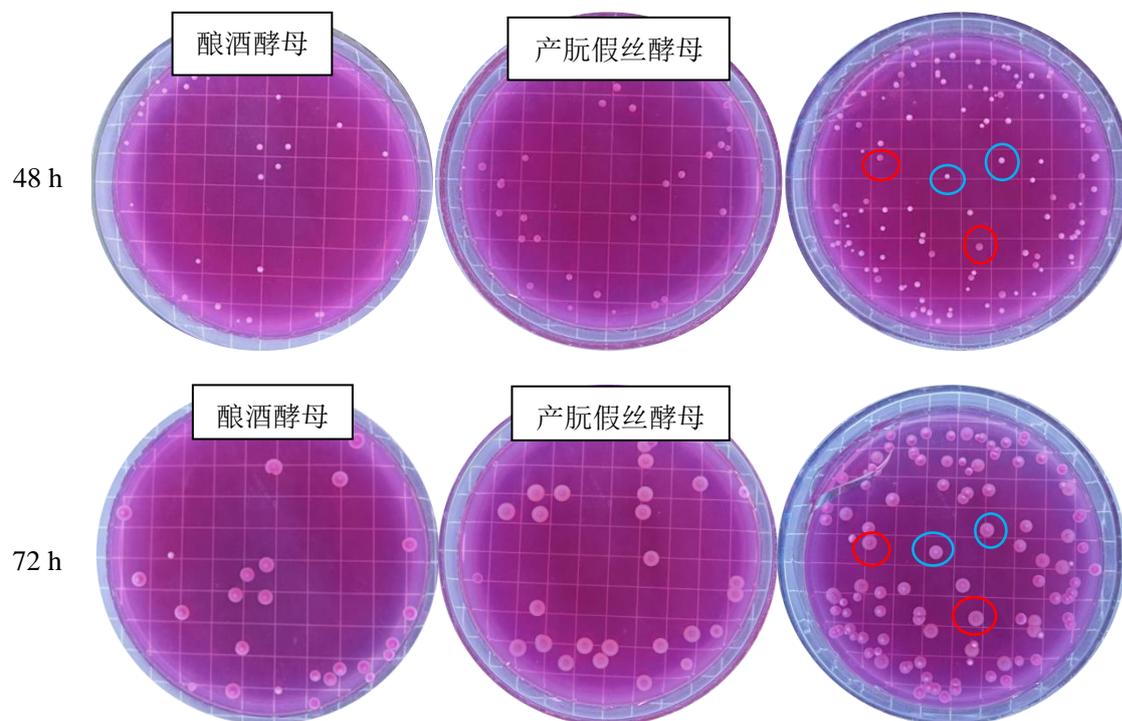


图 2 酿酒酵母及产朊假丝酵母在 RBA 上菌落形态

培养 30 h~36 h 时菌落很小，继续培养；培养约 48 h 时产朊假丝酵母在 RBA 培养基上菌落粉红色、表面湿润、平坦、边缘整齐；酿酒酵母在 RBA 培养基上菌落白色、表面湿润、突起、光滑、边缘整齐，二者菌落形态可区分。RBA 涂布平板如图 2 所示，红圈标注的为产朊假丝酵母，蓝圈标注的为酿酒酵母。

继续培养至 72 h 时，菌落形态发生了变化，产朊假丝酵母在 RBA 培养基上菌落呈同心圆形，芯粉红色边缘发白、表面湿润、平坦、边缘整齐；酿酒酵母在 RBA 培养基上菌落由白色变粉色、表面湿润、中间突起为白色、光滑、边缘整齐，二者菌落形态可区分。

由此可见，采用孟加拉红 (RBA) 培养基、以涂布法方式接种、培养时间为 72 h，产朊假丝酵母与酿酒酵母菌落形态可区分。

(3) 接种方式的确定

以产朊假丝酵母 ACCC20060、CICC1314 菌粉在 4 种不同培养基(NA、PDA、RBA、MEA) 涂布法、倾注法接种, 分别在 28 °C 培养 72 h 统计计数结果, 结果如表 5 所示。

表 5 不同培养基测定结果 ($\times 10^9$ CFU/g)

培养基编号	ACCC20060		CICC1314	
	涂布法	倾注法	涂布法	倾注法
马铃薯葡萄糖 (PDA)	4.10 \pm 0.14 ^{ab}	6.10 \pm 0.42	5.00 \pm 0.71	7.20 \pm 0.71
营养琼脂 (NA)	3.35 \pm 0.07 ^{ab}	6.70 \pm 0.42	6.15 \pm 0.35	6.70 \pm 0.71
孟加拉红琼脂 (RBA)	4.35 \pm 0.78 ^b	5.75 \pm 0.35	5.40 \pm 1.56	6.70 \pm 0.14
麦芽汁琼脂(MEA)	3.20 \pm 0.00 ^a	6.20 \pm 0.57	5.35 \pm 0.07	7.30 \pm 0.42

注: 同列肩标不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

如表 5 所示, 涂布法方式接种, 2 株产朊假丝酵母菌粉均在孟加拉红琼脂平板上活菌数最高 (NA 培养基上易污染杂菌, 淘汰此种培养基); 倾注法接种在 4 种培养基上计数结果差异均不显著, 除却营养琼脂培养基外, 均以麦芽汁琼脂活菌数最高。

该方法主要检测微生物制剂中产朊假丝酵母, 为方便菌落观察及典型菌落的挑取, 以涂布法方式接种为宜。

(4) 培养基的确定

分别采用 PDA、MEA、RBA 培养基, 涂布法接种, 28 °C 培养, 分别观察标准菌株产朊假丝酵母 CICC1314 (BLCC4-0085) 和 ACCC20060 (BLCC4-0085), 以及标准菌株酿酒酵母 CICC1002 (BLCC4-0086) 在 3 种培养基上的菌落形态, 如图 3。

由图 3 可知, 产朊假丝酵母 CICC1314 菌粉梯度稀释涂布、28 °C 培养 40 h~48 h 时, 在 PDA 培养基上菌落白色、表面湿润、菌落很小; 在 RBA 培养基上菌落粉红色、表面湿润、平坦、边缘整齐; 在 MEA 培养基上菌落灰白色、表面湿润、平坦、边缘整齐、有光泽。酿酒酵母 CICC1002 菌粉梯度稀释涂布、28 °C 培养约 40 h~48 h 后, 在 PDA 培养基上菌落白色、表面湿润、菌落很小; 在 RBA 培养基上菌落乳白色、表面湿润、突起、光滑、边缘整齐; 在 MEA 培养基上菌落乳白色、表面湿润、突起、光滑、边缘整齐、有光泽。

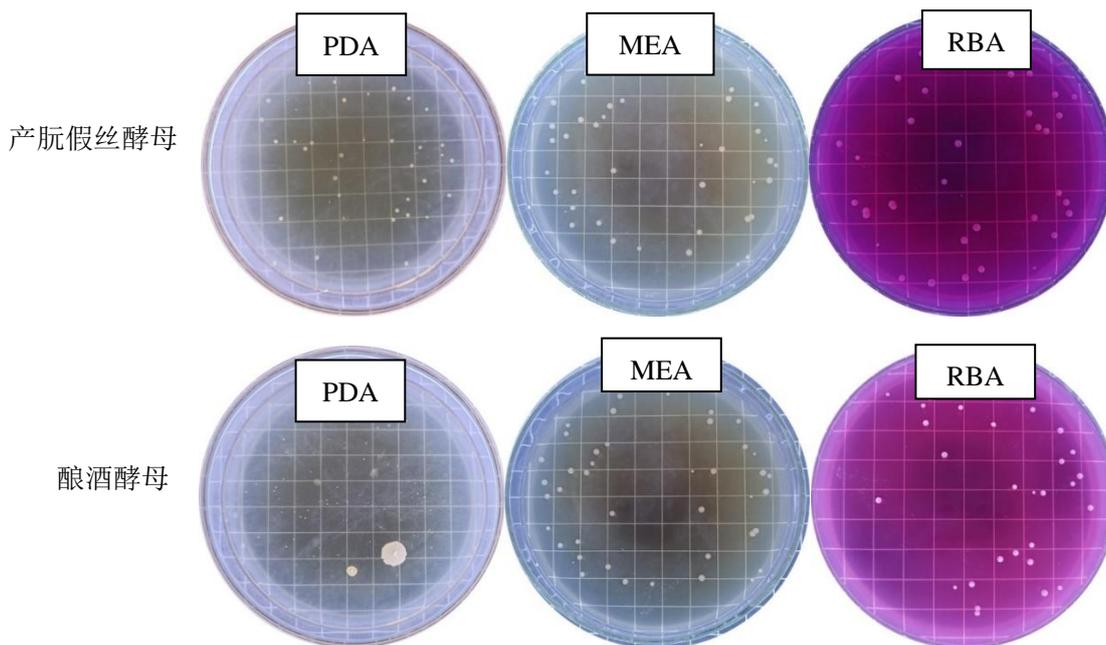


图 3 产朊假丝酵母及酿酒酵母在 3 种培养基上菌落形态

产朊假丝酵母与酿酒酵母混合菌粉在这 3 种培养基上菌落形态如图 3。

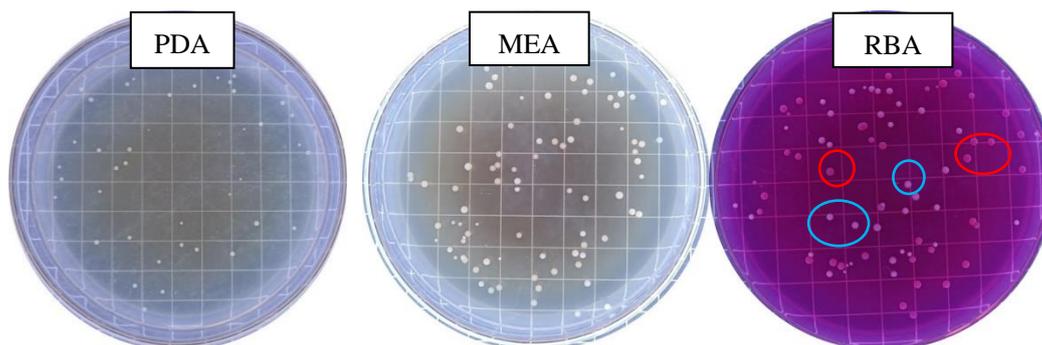


图 4 产朊假丝酵母与酿酒酵母混合菌粉在 3 种培养基上菌落形态

（注：产朊假丝酵母红圈标注，酿酒酵母蓝圈标注，下同）

综合产朊假丝酵母、酿酒酵母单一菌粉及混合菌粉涂布结果，两种酵母在 PDA 培养基上菌落形态区分不开；在 MEA 培养基上菌落颜色、形态略不同，肉眼基本可区分，但照片上难分辨；在 RBA 培养基上菌落颜色不同、菌落形态不同，可区分（见图 4）。因此选择孟加拉红琼脂（RBA）培养基检测微生物制剂中的产朊假丝酵母。

（5）产朊假丝酵母检测条件的调整

因审议专家提出毕赤酵母对检测方法有干扰，故增添毕赤酵母 CICC1258 进行检测培养基的确证。

以产朊假丝酵母 ACCC20060 和 CICC1314、酿酒酵母 CICC1002、毕赤酵母

CICC1258 菌粉在 2 种不同培养基 (RBA、改良 MEA) 涂布法接种, 分别在 28 °C 培养 72 h、86 h, 统计计数结果, 结果如表 6 所示。

表 6 4 株酵母菌在不同培养基上测定结果 ($\times 10^8$ CFU/g)

培养基名称	ACCC20060	CICC1314	CICC1002	CICC1258
孟加拉红琼脂 (RBA)	4.40 \pm 0.23	4.53 \pm 0.47	8.63 \pm 0.25	10.63 \pm 1.20
改良麦芽汁琼脂 (改良 MEA)	4.17 \pm 0.29	4.40 \pm 0.42	8.27 \pm 0.25	6.80 \pm 0.26

如表 6 所示, 产朊假丝酵母、酿酒酵母在孟加拉红琼脂、改良麦芽汁琼脂计数结果无显著差异, 但毕赤酵母 CICC1258 在孟加拉红琼脂平板上活菌数显著高于改良麦芽汁琼脂。72 h 时, 从菌落形态可明显区分 3 种酵母菌 (图 5), 且 86 h 菌落形态更为明显 (图 6), 肉眼清晰可辨, 选定孟加拉红琼脂培养基、涂布法方式接种、28 °C 培养 72 h 作为产朊假丝酵母检测方法。



图 5 4 株酵母菌 28 °C 条件下在孟加拉红琼脂 (RBA)、改良麦芽汁琼脂 (改良 MEA) 上培养 72 h 菌落形态

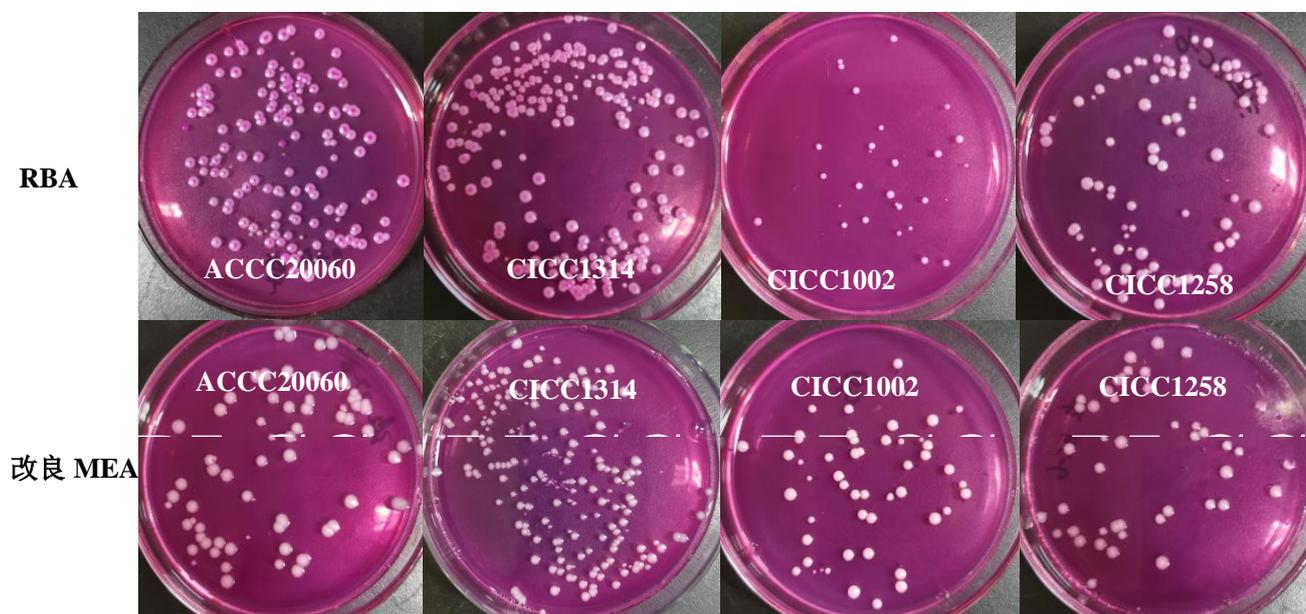


图 6 4 株酵母菌 28 °C 条件下在孟加拉红琼脂 (RBA)、改良麦芽汁琼脂 (改良 MEA) 上培养 86 h 菌落形态

5. 产朊假丝酵母确证试验：生理生化分析

(一) 生理生化分析试验项目选择糖发酵、碳源同化

(1) 糖发酵实验

产朊假丝酵母菌种对糖的发酵实验采用杜氏管 (Durham tube) 法。糖发酵底物包括：葡萄糖 (glucose)、半乳糖 (galactose)、蔗糖 (sucrose)、麦芽糖 (maltose)、乳糖 (lactose)、棉子糖 (raffinose) 和海藻糖 (trehalose)，所用化合物均为分析纯。将棉子糖用蒸馏水配成 40% (w/v) 母液，其他糖用蒸馏水配成 20% (w/v) 母液，过滤除菌后置 4 °C 下备用。四株标准菌株：产朊假丝酵母 ACCC20060 (BLCC4-0077)、产朊假丝酵母 CICC1314 (BLCC4-0085)、酿酒酵母 CICC1002 (BLCC4-0086) 及热带假丝酵母 BLCC4-0021。

用蒸馏水配制 0.5% (w/v) 酵母提取物 (Yeast Extract) 溶液，取 3.6 mL 分装于口径 12 mm 试管中，放入倒置的发酵管，用棉塞封口后 115 °C 灭菌 30 min，冷却后每个试管内无菌加入 0.4 mL 糖母液备用。将产朊假丝酵母划线接种于酵母菌琼脂培养基 (葡萄糖 2.0%，酵母膏 0.5%，蛋白胨 1.0%，磷酸二氢钾 0.2%，琼脂粉 1.5%，pH 自然)，25 °C 培养 2 d~3 d 进行活化，再转接于酵母培养基中，于 30 °C 培养 24 h~48 h，制成细胞悬浮液。以每试管 0.1 mL 的量接种于准备好的发酵试管内，摇匀，25 °C 下培养两周，期间观察杜氏管内是否有气体积存及其积存量，第一周内每天记录一次，第二周内每 2 d~3 d 记录一次，最后结果以下述符号表示：

表 7 糖发酵结果符号释义

序号	观察结果	释义
1	+	强发酵，7 d 内气体迅速充满倒置管；
2	L	延迟发酵，7 d 后倒置管才迅速充满气体；
3	W	弱发酵，倒置管内有气体，但直到最后也未充满；
4	—	不发酵，倒置管内无气体积存；
5	V	同一种内有的菌株发酵，有的不发酵或弱发酵。

表 8 酵母菌糖发酵实验结果

特征	BLCC4-0021	BLCC4-0077	BLCC4-0085	BLCC4-0086
----	------------	------------	------------	------------

葡萄糖	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+
棉子糖	-	-	-	-
麦芽糖	+	-	-	+
半乳糖	+	-	-	+
乳糖	-	-	-	-
海藻糖	+	-	-	+

由表 8 可知，产朊假丝酵母 BLCC4-0085 和 BLCC4-0077 对葡萄糖、蔗糖发酵为阳性，对乳糖、海藻糖、麦芽糖、半乳糖、棉子糖发酵为阴性，这与行标中结果一致。酿酒酵母 BLCC4-0086 及热带假丝酵母 BLCC4-0021 对葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、半乳糖为阳性，对棉子糖、乳糖为阴性。

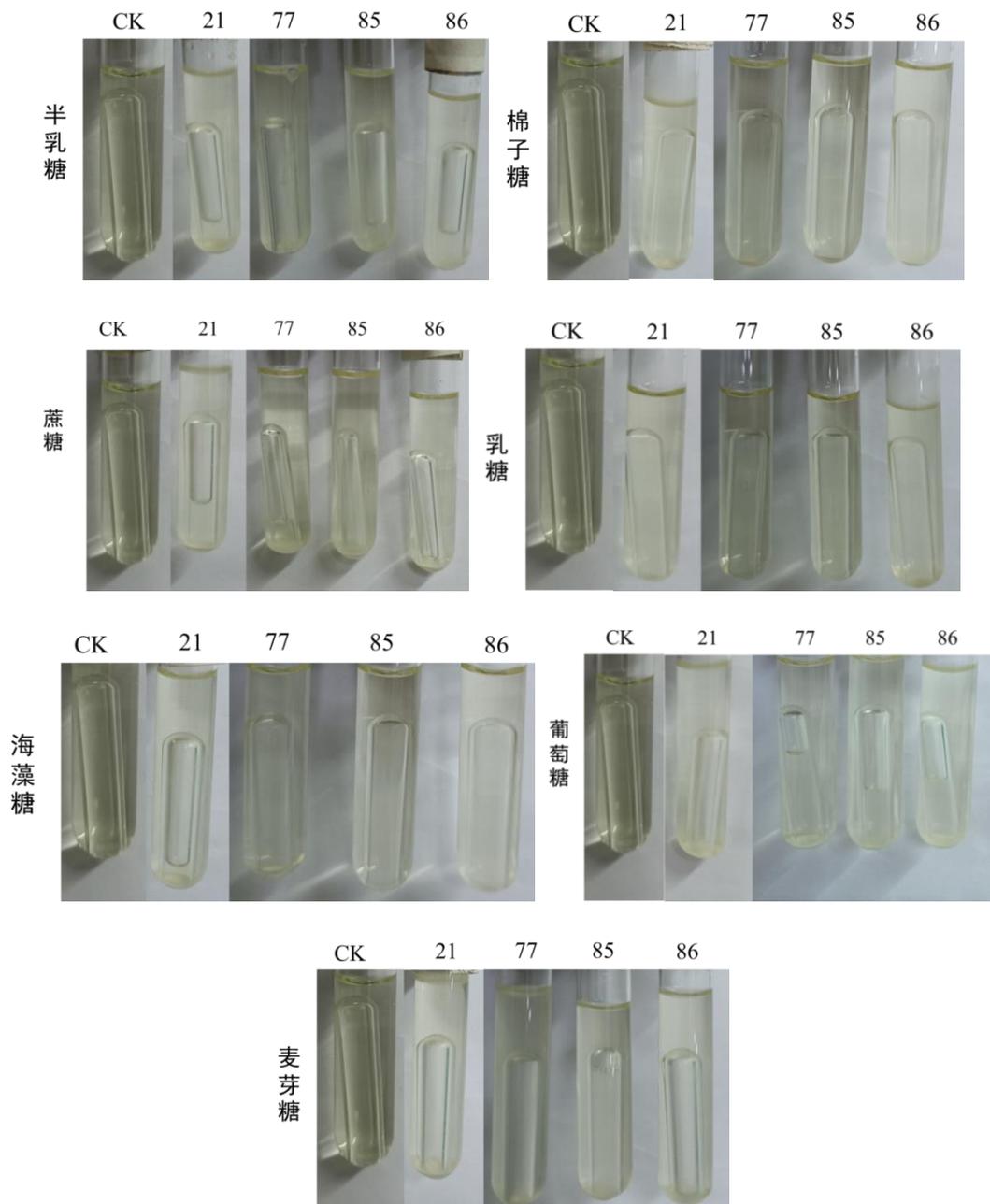


图7 酵母菌糖发酵实验结果

(2) 碳源利用实验

选用以下 26 种碳源化合物作为同化实验对象。

六碳糖: D-葡萄糖(D-glucose)、D-半乳糖(D-galactose)、L-山梨糖(L-sorbose);

五碳糖: D-木糖(D-xylose)、L-阿拉伯糖(L-arabinose)、L-鼠李糖(L-rhamnose); 双糖: 蔗糖(sucrose)、麦芽糖(maltose)、纤维二糖(cellobiose)、海藻糖(trehalose)、乳糖(lactose)、蜜二糖(melibiose);

三糖: 棉子糖(raffinose)、松三糖(melezitose);

多糖: 可溶性淀粉(soluble starch);

醇类: 赤藓糖醇(erythritol)、D-甘露醇(D-mannitol)、肌醇(inositol)、甘油(glycerol)、半乳糖醇(galactitol)、D-山梨醇(D-sorbitol)、乙醇(ethanol);

有机酸: 琥珀酸(succinic acid)、柠檬酸(citric acid)、DL-乳酸(DL-lactic acid); 糖苷: 水杨苷(salicin)。

所用化合物均为分析纯。

首先, 把各种碳源分别配成 10 倍葡萄糖浓度的同化母液, 具体方法为: 称取 6.7 g 酵母含氮基础培养基(Yesat Nitrogen Base), 加入与 5.0 g 葡萄糖相当的碳源化合物(即与 5.0 g 葡萄糖含有等摩尔的碳); 若是棉子糖则添加量加倍, 溶于 100 mL 去离子水中; 若是有机酸先把酸度调至 pH 5.7, 过滤除菌后放入 4 °C 冰箱作为同化母液备用。第二步, 在 12 mm 口径试管中每管加入 3.6 mL 蒸馏水, 121 °C 灭菌 30 min 后加入 0.4 mL 同化母液制成同化管备用。最后, 把培养了 24 h~48 h 的产朊假丝酵母菌体用无菌水或氮源基础液体培养基制成细胞悬浮液, 调整细胞浓度使悬液至半透光($A_{640} \approx 1.0$), 然后用无菌吸管将悬浮液滴入准备好的同化管内, 或用移液器吸入 40 μ L~50 μ L, 25 °C 下静置培养 1 周、2 周和 4 周, 分别记录结果。

同化结果的观察与记录方法: 取一片白色卡片, 其上用墨汁或黑色墨水划上约 0.75 mm 宽的直线, 把培养一段时间后的同化管充分摇匀, 贴于该卡片上, 透过培养液观察卡片上的黑线, 并根据下述原则记录。

表9 碳源利用结果符号及释义

序号	观察结果	释义	同化结果
1	+++	透过试管完全看不见黑	“+”强同化, 两周内为++或+++; “L” 延滞

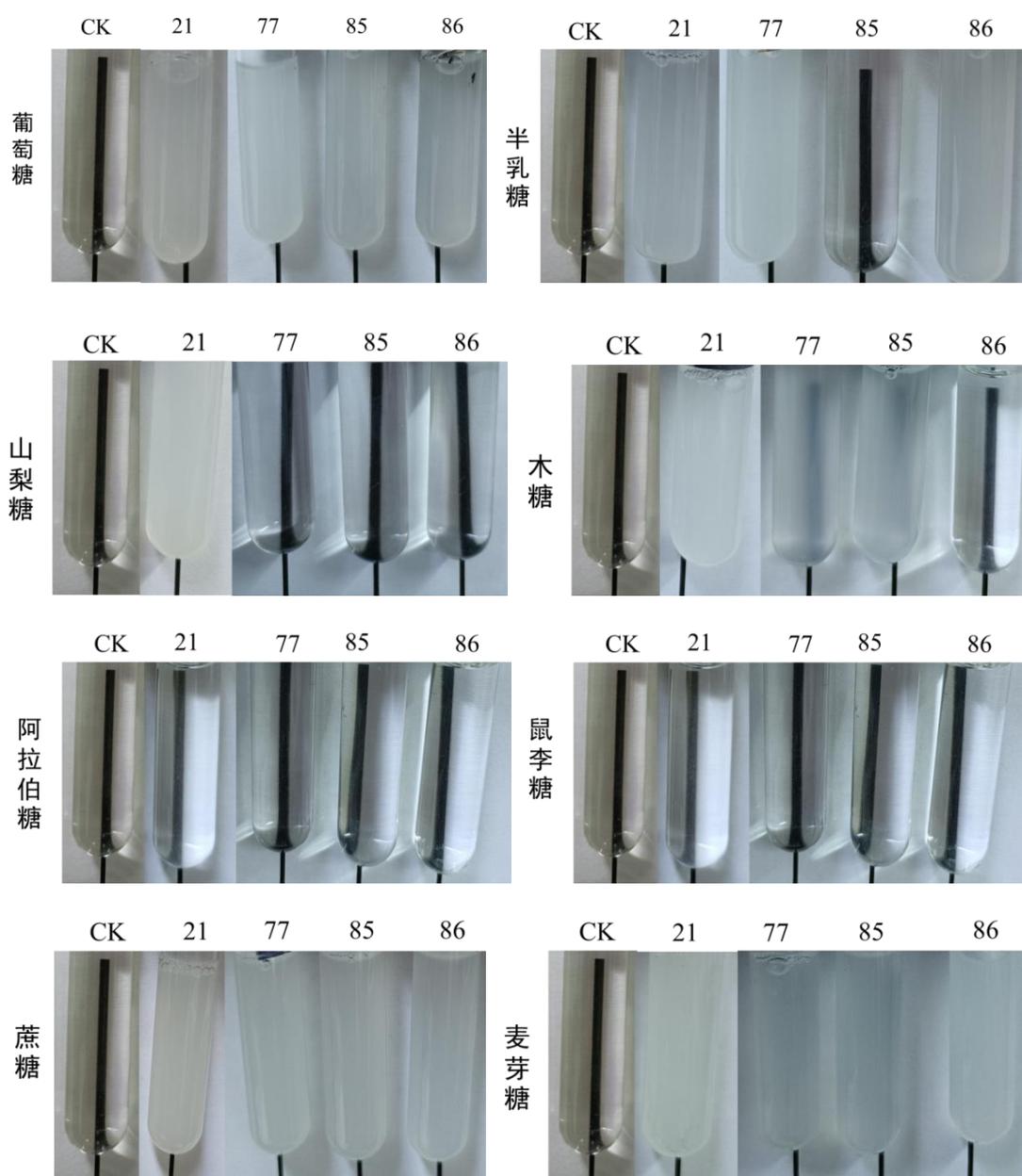
		线;	同化, 两周后迅速变为++或+++;
2	++	可见黑线但呈一发散的模 糊现条;	“S”缓慢同化, 两周后缓慢变为++或+++; “W”弱同化, 记录为+; “-”不同化; “(+)”
3	+	黑线可见但边缘模糊	少数情况可以同化;
4	-	黑线清晰可见且边缘不模 糊	“V”有些菌株同化反应为+, 有些菌株同化 反应为-; “+W”可以同化或弱同化, 所有 菌株都可以生长, 有些生长较弱; “W/-” 弱同化或不同化。

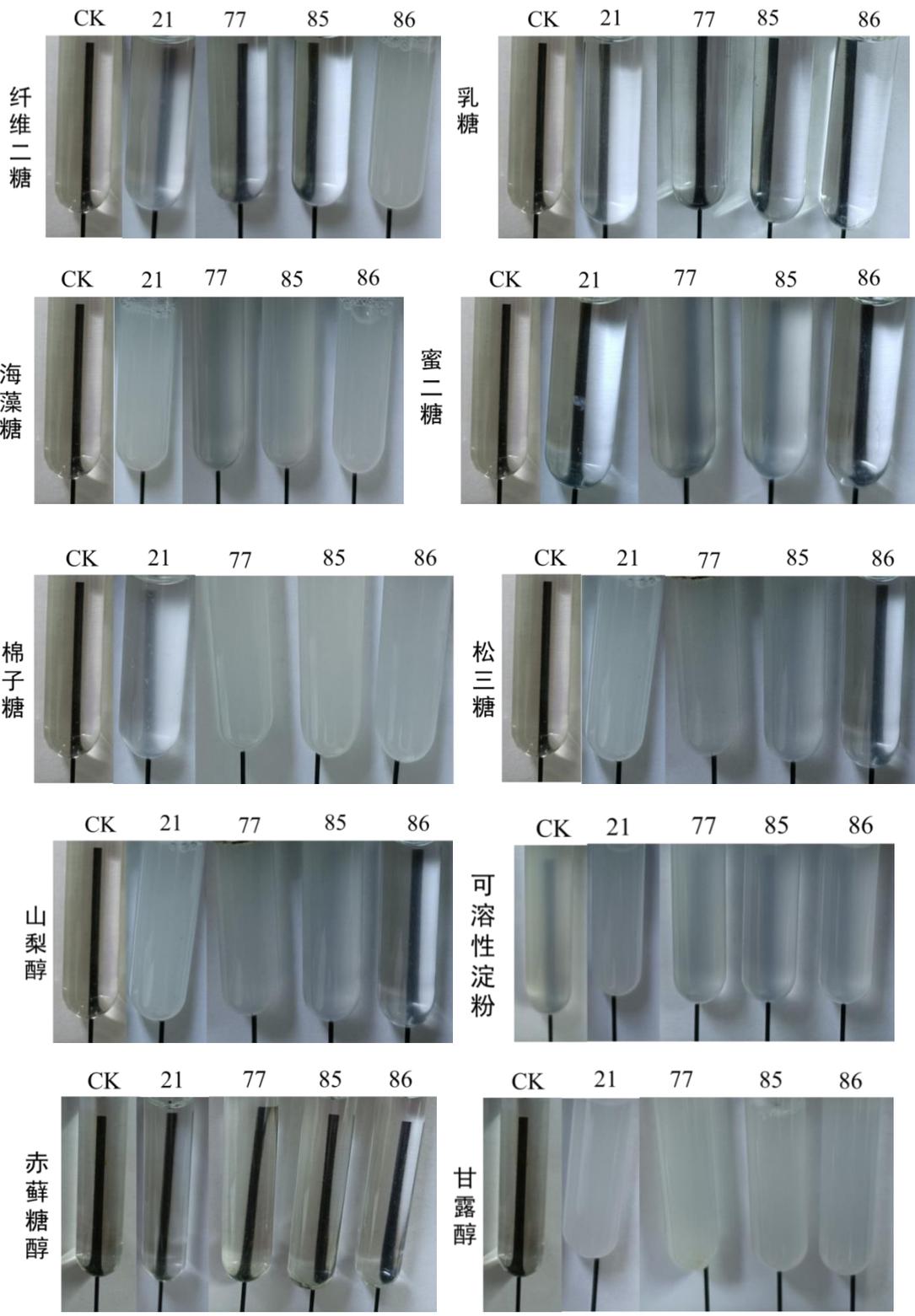
表 10 酵母菌碳源利用实验

碳源	BLCC4-0021	BLCC4-0077	BLCC4-0085	BLCC4-0086
葡萄糖	+++	+++	+++	+++
半乳糖	+++	+++	-	+++
山梨糖	+++	-	-	-
木糖	+++	++	++	-
阿拉伯糖	-	-	-	-
鼠李糖	-	-	-	-
蔗糖	+++	+++	+++	+++
麦芽糖	+++	+++	+++	+++
纤维二糖	+++	++	++	-
海藻糖	+++	++	+++	+++
乳糖	-	-	-	-
蜜二糖	-	+	+	-
棉子糖	+	+++	+++	+++
松三糖	+++	++	++	-
山梨醇	+++	+	+	-
可溶性 淀粉	+++	++	++	++
赤藓糖醇	-	-	-	-
甘露醇	+++	+++	+++	+++
肌醇	-	-	-	-
甘油	-	+++	++	++
半乳糖醇	-	-	-	-
乙醇	++	+++	+++	+++

琥珀酸	++	+	+	+
柠檬酸	+	+	+	+
DL-乳酸	+	+	+	+
水杨苷	+	++	+	+

由表 10 可知，培养 28 d 后产朊假丝酵母 BLCC4-0077 及 BLCC4-0085 对葡萄糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、蜜二糖、棉子糖、松三糖、可溶性淀粉、甘油、乙醇、DL 乳酸、山梨醇及水杨苷利用为阳性，对山梨糖、阿拉伯糖、鼠李糖、乳糖、赤藓糖醇、肌醇及半乳糖利用为阴性，与行标中结果一致。产朊假丝酵母 BLCC4-0077 对半乳糖利用为阳性，BLCC4-0085 对半乳糖利用为阴性。





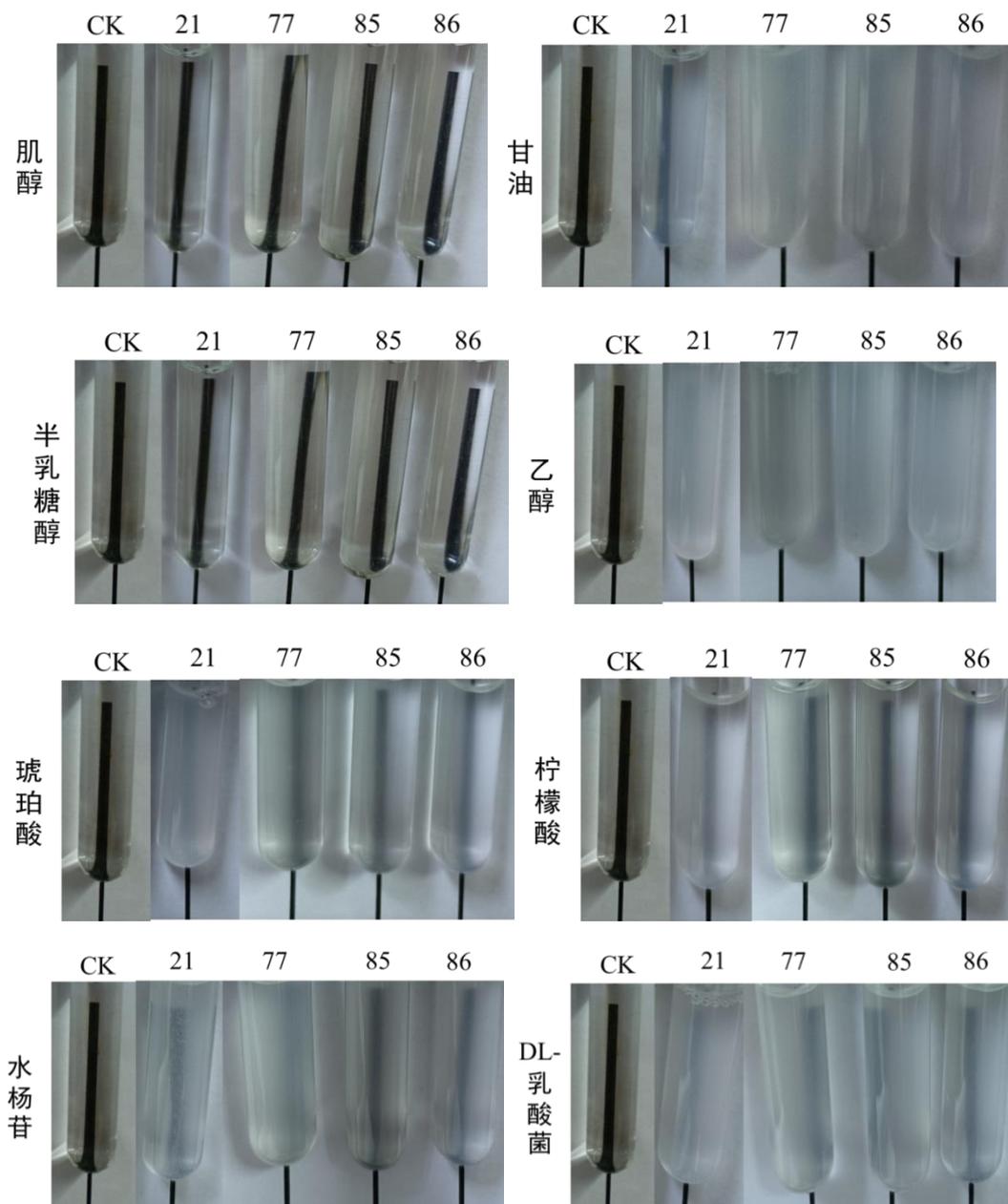


图 8 酵母菌碳源同化实验结果

产朊假丝酵母生理生化实验汇总结果如表 11。

表 11 产朊假丝酵母的生理生化特征

试验项目		结果	试验项目		结果
糖类发酵	葡萄糖	+	碳源利用	乳糖	-
	蔗糖	+		蜜二糖	V
	棉子糖	V		棉子糖	+
	麦芽糖	-		松三糖	+
	半乳糖	-		可溶性淀粉	+
	乳糖	-		赤藓糖醇	-

	海藻糖	-		D-甘露醇	+
碳源利用	D-葡萄糖	+		肌醇	-
	D-半乳糖	+		甘油	+
	L-山梨糖	-		半乳糖醇	-
	D-木糖	+		D-山梨醇	+
	L-阿拉伯糖	-		乙醇	+
	L-鼠李糖	-		琥珀酸	+
	蔗糖	+		柠檬酸	+
	麦芽糖	+		DL-乳酸	+
	纤维二糖	+		水杨苷	+
	海藻糖	+			
注：+表示阳性反应；-表示阴性反应；V表示可为阳性反应亦可为阴性反应。					

(二) 生理生化项目确证

因生理生化碳源及糖种类繁多复杂，根据上述生理生化结果区别及《酵母的特征与鉴定手册》结果，选定如下碳源及糖利用种类进行试验，选择产朊假丝酵母 ACCC20060 (BLCC4-0077)、CICC1314 (BLCC4-0085)、酿酒酵母 CICC1002 (BLCC4-0086)、毕赤酵母 CICC1258 (BLCC4-0112) 4 株酵母菌进行生理生化实验确证。

(3) 糖发酵

糖发酵底物包括：葡萄糖 (glucose)、蔗糖 (sucrose)、乳糖 (lactose)、半乳糖 (galactose)、麦芽糖 (maltose)、和海藻糖 (trehalose)，所用化合物均为分析纯，用蒸馏水配成 20% (w/v) 母液，过滤除菌后置 4 °C 下备用。其余方法同 (1)。

表 12 酵母菌糖发酵实验结果

特征	BLCC4-0077	BLCC4-0085	BLCC4-0086	BLCC4-0112
葡萄糖	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+
麦芽糖	-	-	+	-
半乳糖	-	-	+	-
乳糖	-	-	-	-
海藻糖	-	-	+	-

由表 12 可知，产朊假丝酵母 BLCC4-0085、BLCC4-0077 和毕赤酵母 BLCC4-0112 对葡萄糖、蔗糖发酵为阳性，对乳糖、海藻糖、麦芽糖、半乳糖发

醇为阴性，这与行标中结果一致。酿酒酵母 BLCC4-0086 对葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、半乳糖为阳性，对乳糖为阴性。

(4) 碳源同化试验

选用以下 6 种碳源化合物作为同化试验对象。所用化合物均为分析纯。

表 13 碳源名称及成分

碳源	成分
六碳糖	D-葡萄糖 (D-glucose)
五碳糖	D-木糖 (D-xylose)
双糖	蔗糖 (sucrose)、纤维二糖 (cellobiose)
三糖	松三糖 (melezitose)
醇类	D-山梨醇 (D-sorbitol)

结果如表 14 所示。

表 14 4 株酵母菌碳源同化结果

菌株编号	D-葡萄糖	D-木糖	蔗糖	纤维二糖	松三糖	D-山梨醇
BLCC4-0077	+++	++	+++	+++	+++	+
BLCC4-0085	+++	++	+++	++	+++	+
BLCC4-0086	+++	++	+++	+	++	-
BLCC4-0112	+++	+++	+++	+++	+++	-

培养 14 d 后产朊假丝酵母 BLCC4-0077 及 BLCC4-0085 对葡萄糖、木糖、蔗糖、纤维二糖、松三糖、山梨醇利用为阳性，与行标“NYT 1969-2010 饲料添加剂 产朊假丝酵母”中结果一致。



图 9 酵母菌碳源同化试验结果

表 15 产朊假丝酵母的生理生化特征

试验项目		结果	试验项目		结果
糖类发酵	葡萄糖	+	碳源利用	D-葡萄糖	+
	蔗糖	+		D-木糖	+
	麦芽糖	-		蔗糖	+
	半乳糖	-		纤维二糖	+
	乳糖	-		松三糖	+
	海藻糖	-		D-山梨醇	+
注：+表示阳性反应；-表示阴性反应					

6. 产朊假丝酵母确证试验：分子生物学分析

参照《GB 7300.501-2021 饲料添加剂 第 5 部分：微生物 酿酒酵母》及《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》，采用核酸序列分析法对菌株 rRNA 基因中 26S rDNA D1/D2 区和转录间区 ITS 序列保守性进行分析，图 8 为凝胶电泳分析图。

产朊假丝酵母 CICC1314 (BLCC4-0085)、ACCC20060 (BLCC4-0077)，与毕赤酵母 CICC1258 (BLCC4-0112)，酿酒酵母 CICC1002 (BLCC4-0086)，经 ITS1、ITS4 扩增后片段在 500 bp~1000 bp 间，经 NL1、NL4 扩增后片段在，为 500 bp~750 bp 间。产朊假丝酵母和毕赤酵母可以区分。

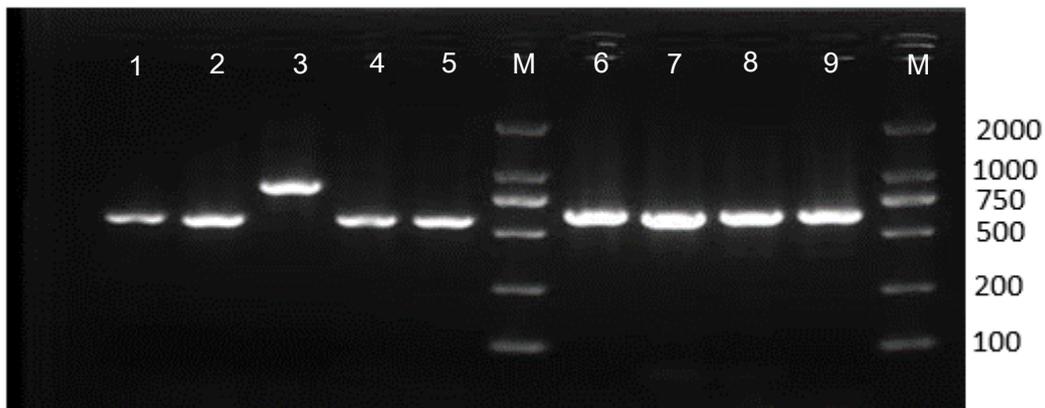


图 10 酵母菌凝胶电泳分析 1-5: ITS rDNA; 6-9: 26S rDNA

M: Marker DL2000; 1、2: 0112-ITS rDNA; 3: 0086-ITS rDNA; 4: 0085-ITS rDNA; 5: 0077-ITS rDNA; 6: 0112-26S rDNA; 7: 0086-26S rDNA; 8: 0085-26S rDNA; 9: 0077-26S rDNA

扩增菌株 CICC1314 的 26S rDNA D1/D2 区和 ITS 序列，与 GenBank 等国际核酸序列数据库中 *Cyberlindnera jadinii* 序列进行同源性比较，序列一致性 $\geq 99\%$ ，

因此认定该菌株为产朊假丝酵母 *Candida utilis*，又名杰丁塞伯林德纳氏酵母 *Cyberlindnera jadinii*。

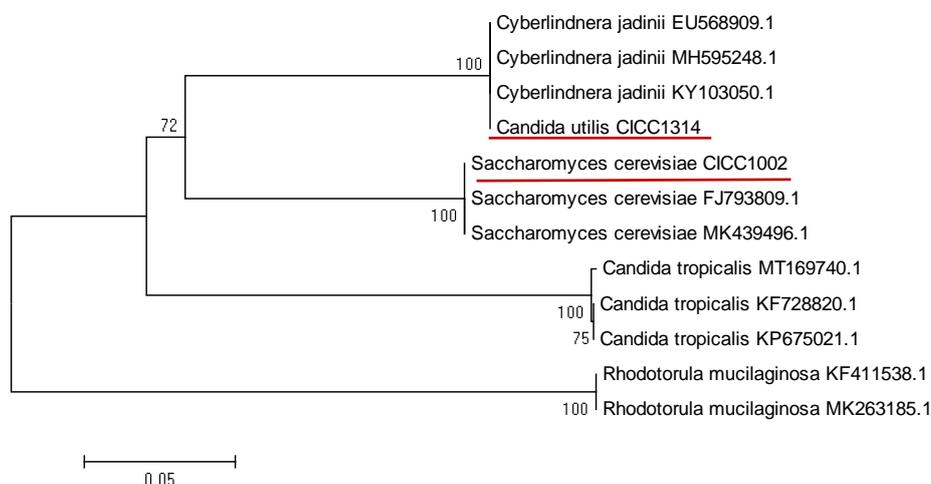


图 11 产朊假丝酵母菌株 CICC1314 系统发育树

7. 产朊假丝酵母样品的收集及检测分析

收集了 13 个产朊假丝酵母样品进行了检测。这 13 个样品代表了 13 家企业生产的产朊假丝酵母产品，具有广泛的代表性。样品信息见表 16。

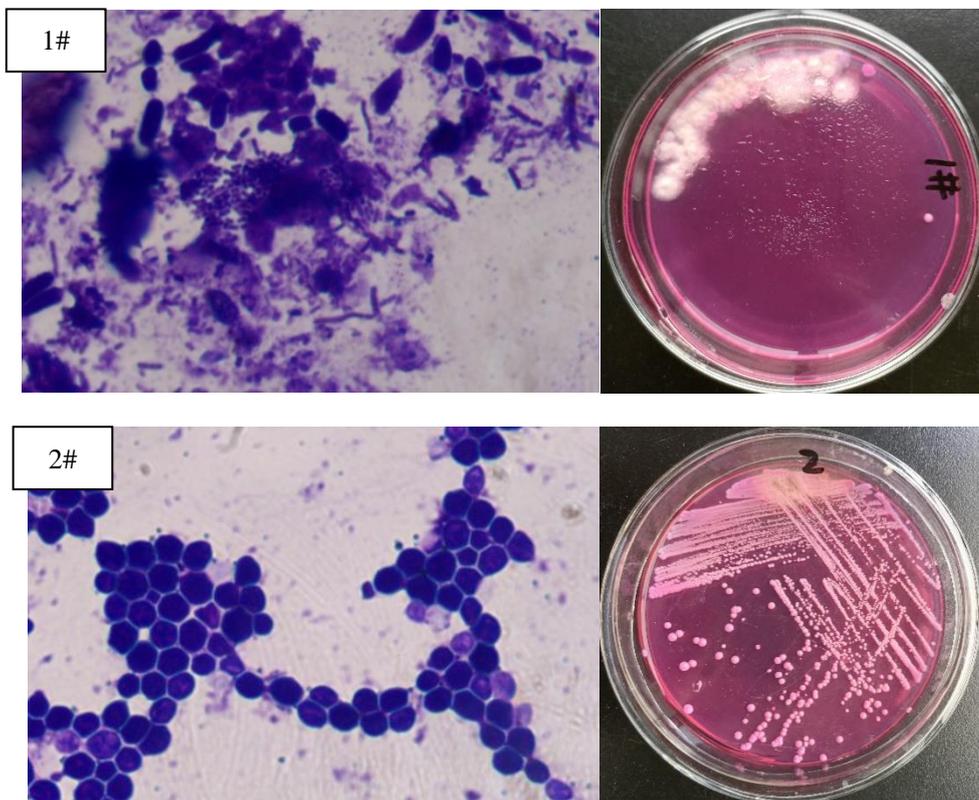
表 16 产朊假丝酵母样品编号及来源

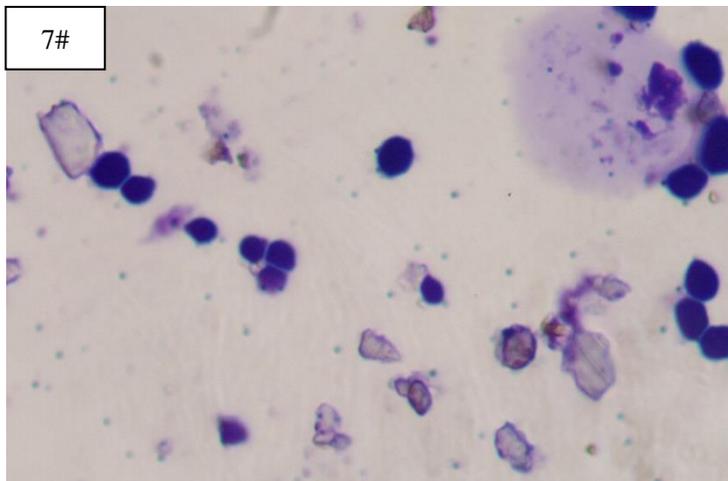
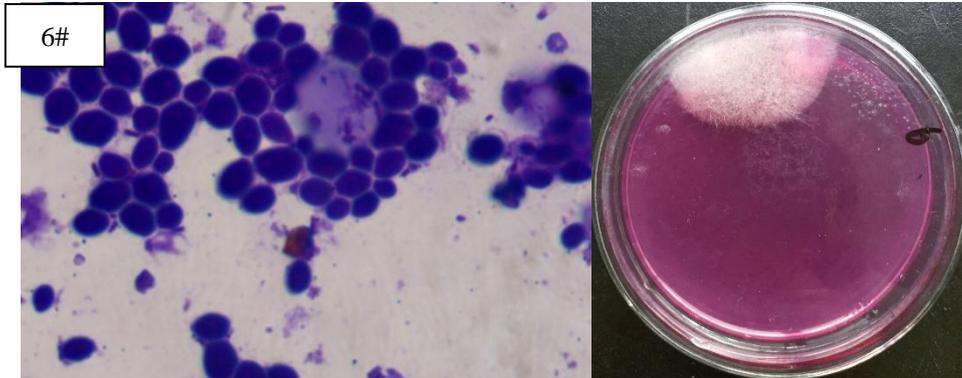
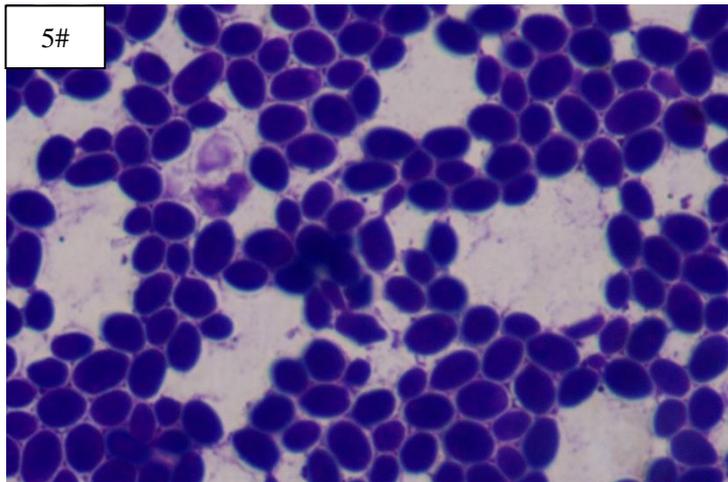
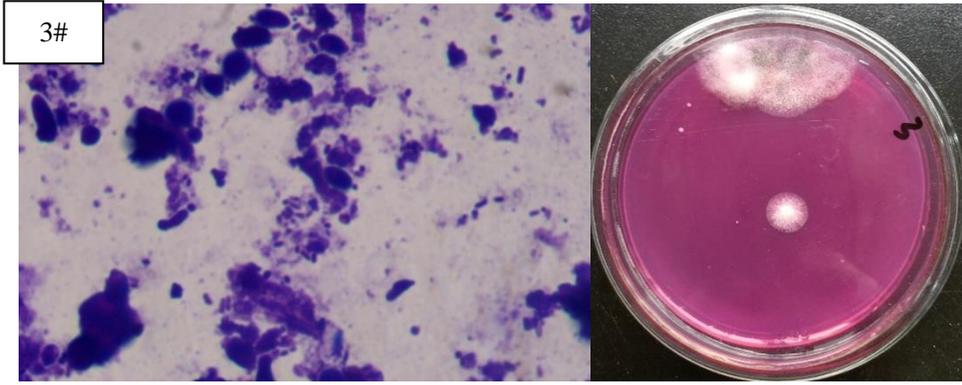
编号	产品名称	厂家名称	活菌数 (CFU/g)	执行标准
1	产朊假丝酵母	深圳市星凯越生物科技有限公司	100 亿	Q/CZX01-2019 (朝阳市中兴饲料有限公司 中兴畜禽浓缩饲料) 企标
2	产朊假丝酵母	山东鑫卓源化工有限公司	203 亿	活菌数 GB T26428-2010; 性状 Q/370783WJQ001-2018 (潍坊佳淇生物科技有限公司 环保用微生物菌剂企标)
3	产朊假丝酵母	温州守诚化工科技有限公司	100 亿	企标
4	产朊假丝酵母	武汉鹏垒生物	100 亿	Q/CXDD 01-2021 (沧州新大地生物科技有限公司企标) 企标
5	产朊假丝酵母	武汉东康源科技有限公司	196 亿	企标
6	产朊假丝酵母	鹤壁市百惠生物科技有限公司	30 亿	企标
7	鑫牧绿 产朊假丝酵母	沧州新大地生物科技有限公司	50 亿	Q/CXDD 01-2021 混合型饲料添加剂 微生物企标
8	产朊假丝酵母功能菌剂	北京正农农业科技有限公司	80 亿	GB20287-2006 农用微生物菌剂 国家标准
9	产朊假丝酵母	江苏菌长农业有限公	30 亿	企标

司				
10	多维山楂酵素 混合型饲料添加 剂（产朊假丝酵 母）	哈尔滨农垦牧王生物 科技有限公司	30 亿	Q/HMW002-2021 混合型饲料 添加剂（哈尔滨农垦牧王生物 科技有限公司企标）
11	强微 HL010-050	宜春强微生物科技有 限公司	5 亿	Q/YCQW019-2015 混合型饲 料添加剂（产朊假丝酵母+枯 草芽孢杆菌+乳酸片球菌）企 标
12	产朊假丝酵母	广州微立旺生物科技 有限公司	80 亿	企标
13	产朊假丝酵母	潍坊兴业源生物科技 有限公司	30 亿	企标

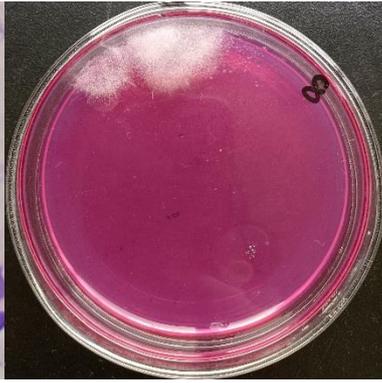
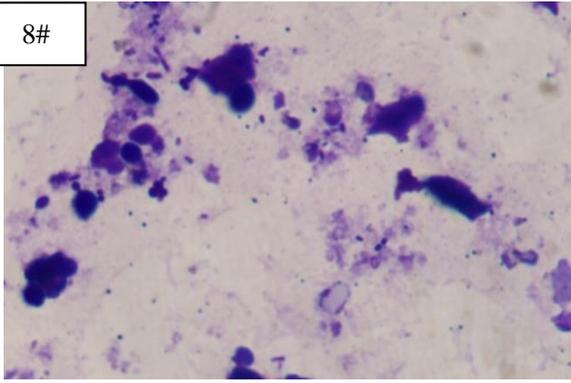
(1) 产朊假丝酵母产品菌落菌体形态测定

13 种产朊假丝酵母产品以改良 MEA 平板划线、涂布，28 °C 培养。菌落菌体形态照片如图 12。

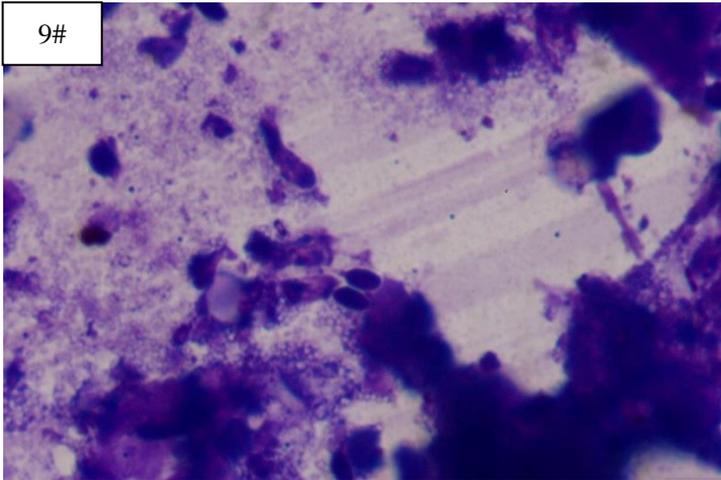




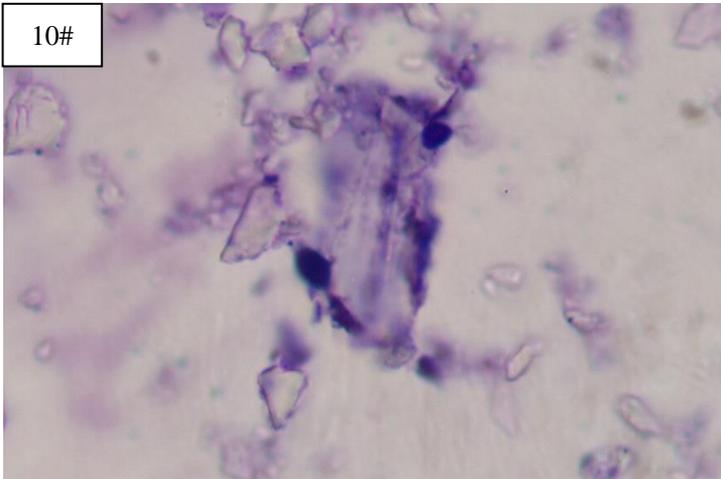
8#



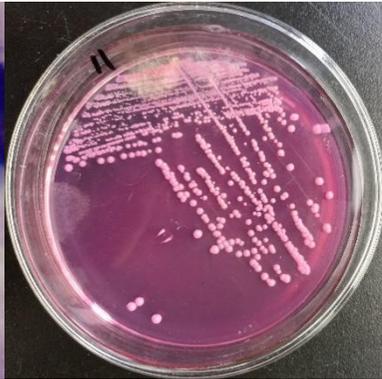
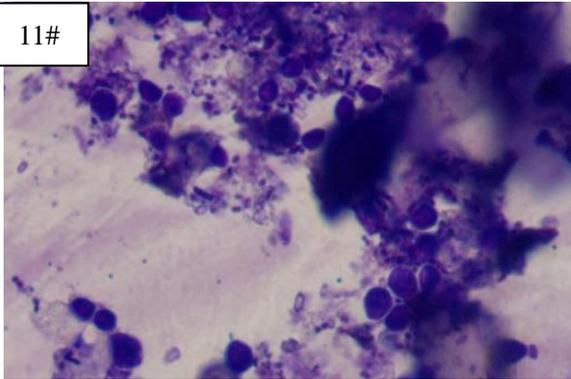
9#



10#



11#



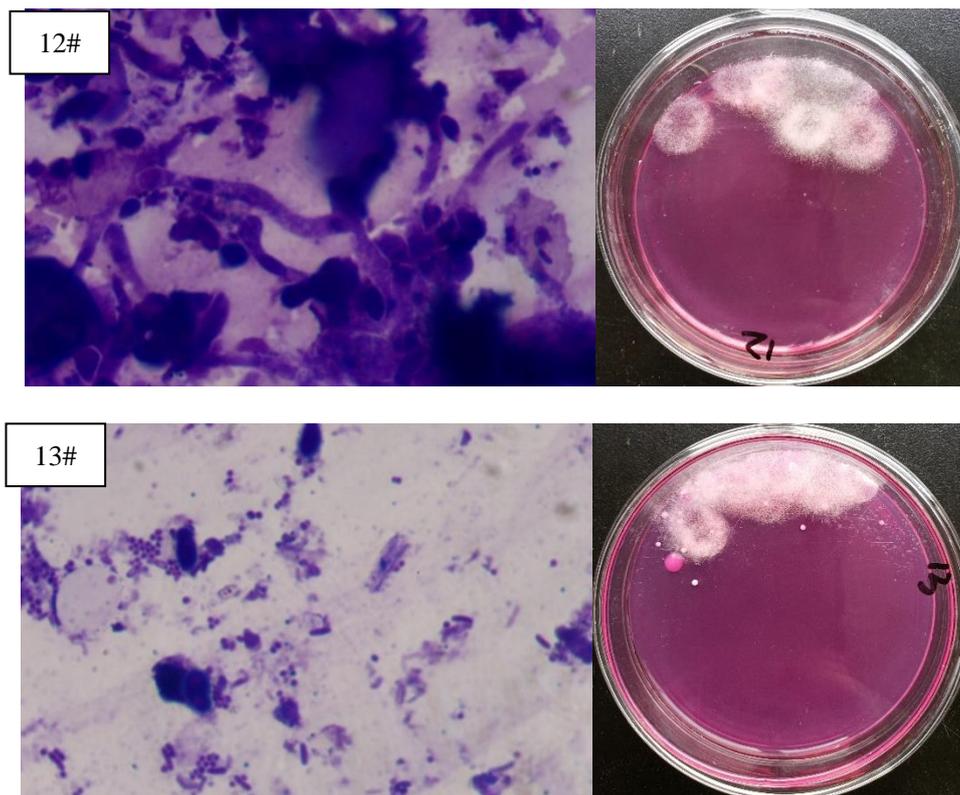


图 12 13 种产朊假丝酵母产品菌落、菌体形态照片

由图 12 可知，2#、11#样品菌落及菌体形态符合酿酒酵母特征，1#、3#、4#、12#、13#划线平板显示有酵母和霉菌，6#、8#只有霉菌，其他样品平板空白。然后，挑取 2#、11#平板单菌落纯化培养，并进行生理生化实验及分子生物学分析。

(2) 样品 2#、11#生理生化实验

产朊假丝酵母样品 2#、11#生理生化实验结果如表 17。

表 17 产朊假丝酵母样品 2#、11#生理生化实验结果

试验项目		结果	试验项目	结果
糖类发酵	葡萄糖	+	半乳糖	+
	蔗糖	+	乳糖	-
	棉子糖	+	海藻糖	-
	麦芽糖	+	纤维二糖	-
	松三糖	-	蜜二糖	V
碳源利用	D-葡萄糖	+	松三糖	-
	D-半乳糖	+	可溶性淀粉	V
	L-山梨糖	-	赤藓糖醇	-
	D-木糖	-	D-甘露醇	V
	L-阿拉伯糖	-	肌醇	-
	L-鼠李糖	-	甘油	V
	蔗糖	+	半乳糖醇	-
	麦芽糖	+	D-山梨醇	-

	纤维二糖	-	乙醇	+
	海藻糖	+	琥珀酸	V
	乳糖	-	柠檬酸	+
	蜜二糖	V	DL-乳酸	+
	棉子糖	+	水杨苷	+
注：+表示阳性反应；-表示阴性反应；V表示可为阳性反应亦可为阴性反应。				

(3) 样品 2#、11# DNA 提取及测序

对纯化的 2#、11# 产品以酵母基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）（天根生物）提取 DNA，PCR 扩增后送铂尚测序，引物为 ITS1、ITS4，鉴定、比对结果如图 15。

①2#序列

```
TCCTAAGAATTTATATTTTGAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCT
TTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGT
GCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGAT
TTCTGTGCTTTTTGTTATAGGACAATTAACCGTTTTCAATACAACACACTGTGGAG
TTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGT
AACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTC
GTAAGTGGAAATTTTAAAATATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCC
TGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTG
GAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAAAAGG
TTTTCTTGGCGGCCTGGAGGAAAATGGCAGTACGGGCCTTTTAGGGTTTACCAAC
TGCGGTAATCTTTTTTTAACTGGACGGATTGGAACGTTATCGAAAAAAAAAAAA
GGTCCAGGGAATAAAGGGTCTTAAAGTTTGACCCCAAATCCGGGAGGAATACCC
CCTGAACTTAACGCATACAAAAACGGGAAGAAA
```

②11#序列

```
CCCTAGAAATTATAATTTTGAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTT
TACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTG
CGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATT
TCTGTGCTTTTTGTTATAGGACAATTAACCGTTTTCAATACAACACACTGTGGAGT
TTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTA
ACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCG
TAACTGGAAATTTTAAAATATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCT
GTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGG
```

AGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCCAAAGAAGTTT
 CTCTGCGTGCTTGAAGGATAATGCCAGTACCGGCGTTTTAAGTTTTACCCACTGCG
 GCTAATCCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGGTATCGATAAGAAGAGAACGTCT
 AAGCGAACAAATGGTCCTAAAGTTTGAAGTCAAATCAAGTAAGAGTACCCGCCTGA
 CCTAAGCATAATCATAACCCGAGAAAGG

③2#、11#的系统发育进化树

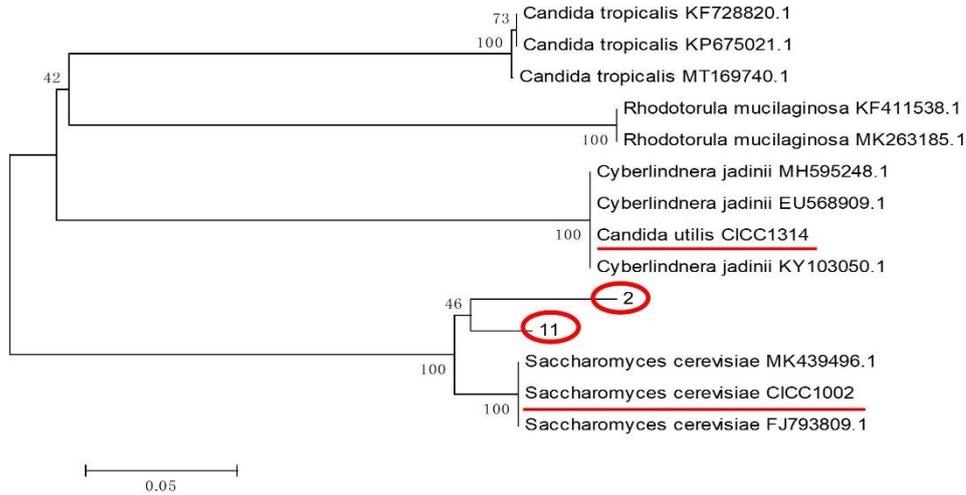


图 13 产朊假丝酵母产品 2#、11#系统发育树

经菌体菌落形态检测、生理生化及分子生物学分析，2#、11#为酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*。

(三) 预期的经济效益、社会效益和生态效益

随着畜牧养殖业的稳定发展和无抗养殖的进程加快，产朊假丝酵母等微生态制剂应用越来越广泛，而且显示出不可限量的应用前景。

养殖业的发展直接影响国民健康和经济发展，“无抗化”是大势所趋，养殖行业、饲料行业、兽医兽药行业及相关行业都必须适应趋势的发展。产朊假丝酵母是美国食品和药品管理局（FDA）认证的可视为安全（GRAS, Generally Recognized as Safe）的微生物菌种，在维持动物肠道菌群平衡、提供营养物质、提高动物生产性能、提高饲料转化率等方面有很好的应用价值，畜禽养殖中有着广泛的应用。

中国是世界上最大的养殖国家，且规模化程度呈不断上升趋势。2022 年中国饲料添加剂行业总产值预计达 1291.3 亿元，同比增长 11.80%。微生物饲料添加剂的应用占比以最低 5% 计，产值将有 64.565 亿元。其中产朊假丝酵母活菌、酵母培养物或者其复合制剂，占据 10%~30% 份额，添加量一般为 0.1%~0.5%，

有 19.4 亿元左右的产值，经济效益显著。由此可见产朊假丝酵母类相关产品的产业空间将越来越大。

本标准的制订，将有助于提升饲用微生物制剂中产朊假丝酵母的标准化水平，提高无药残养殖用药的管理方法、技术的科学性和可操作性，保护生态环境，为畜牧养殖业实现优质、高产、高效提供技术支撑，有利于控制抗生素残留，实现无药残养殖的标准化、规范化、集约化，将会获得更高的经济效益和社会效益。

在国家“饲料无抗化”及“养殖减抗、限抗”的背景下，通过本标准的实施，进一步加强人们对绿色、安全和环保意识的不断增强，产朊假丝酵母应用后将显著提升养殖动物的生产性能，减少抗生素等药物的用量（减少 30% 以上），有效减少养殖污染和化学药物的二次污染，减少碳排放，推进我国畜牧业的绿色、健康、无污染、可持续发展，具有显著的生态效益。

四、与国际、国外同类标准水平的对比情况

本标准编制过程中，除行标和企标外，未检索到国内、国际标准等同类标准。本标准可填补国内空白，属国内领先水平。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因；

由于没有检索到国际同类标准，所以在本标准的制定过程中没有引用或采用相关标准。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

在本标准的编制过程中严格遵守国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准，与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调性原则。配套的推荐性标准包括 GB/T 8170《数值修约规则与极限数值的表示和判定》。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准编制过程中没有涉及到产朊假丝酵母相关专利。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

本标准对规范检测产朊假丝酵母起到重要作用。过去只是按照常用的方法进行的操作，无法明确区分酵母菌、种、属特性，可靠性无法保证。经过严谨、系统的研究工作，建立了饲用微生物制剂中产朊假丝酵母的检测方法，使产朊假丝酵母的目标性检测有据可依，有法可循。本标准具有较强的科学性、经济性和广泛的应用前景，便于推广。

因此，建议将《饲用微生物制剂中产朊假丝酵母的测定》作为国家标准批准发布。本标准颁布以后，对于微生物制剂产朊假丝酵母的相关管理要求应符合本产品标准。

十、其他应当说明的事项

无。