

附件 1

威尼斯镰刀菌蛋白等 3 种新食品原料

一、威尼斯镰刀菌蛋白

中文名称	威尼斯镰刀菌蛋白
英文名称	Mycoprotein from <i>Fusarium venenatum</i>
生产工艺简述	以威尼斯镰刀菌（ <i>Fusarium venenatum</i> ）A3/5 菌株或 TB01 菌株为生产菌，经发酵、脱核酸、灭活、过滤等工艺制成。
其他需要说明的情况	1. 婴幼儿、孕妇、哺乳期妇女和食用真菌过敏者不宜食用，标签、说明书应当标注不适宜人群。 2. 质量规格和食品安全指标见附录。

附录

1. 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	湿 品	干 品	检测方法
色泽	类白色	类白色至浅黄色	取适量试样置于清洁、干燥的白瓷盘或烧杯中，在自然光线下，观察其色泽和状态，嗅其气味，品其滋味。
滋味	具有本品固有滋味，无异味	具有本品固有滋味，无异味	
气味	具有本品固有气味，无异味	具有本品固有气味，无异味	
状态	块状固体	块状或粉状固体	

2. 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项 目	湿 品	干 品	检测方法
蛋白质(以干基计), g/100 g ≥	50.0	50.0	GB 5009.5
水分, g/100 g ≤	80.0	10.0	GB 5009.3
灰分(以干基计), g/100 g ≤	6.0	6.0	GB 5009.4
核酸(RNA, 以干基计), g/100 g ≤	2.0	2.0	国家卫生健康委 2023 年第 10 号公告酵母蛋白的核酸测定方法

铅 (Pb) , mg/kg	≤	0.1	0.1	GB 5009.12
镉 (Cd) , mg/kg	≤	0.1	0.1	GB 5009.15
总汞 (Hg) , mg/kg	≤	0.05	0.05	GB 5009.17
总砷 (As) , mg/kg	≤	0.1	0.1	GB 5009.11

3. 微生物指标

微生物指标应符合表 3 的规定。

表 3 微生物指标

项 目	湿 品	干 品	检测方法
菌落总数, CFU/g	≤ 10000	10000	GB 4789.2
大肠菌群, CFU/g	≤ 100	100	GB 4789.3
霉菌和酵母, CFU/g	≤ 50	50	GB 4789.15
沙门氏菌, /25 g	不得检出	不得检出	GB 4789.4
金黄色葡萄球菌, /25 g	不得检出	不得检出	GB 4789.10
威尼斯镰刀菌, /25 g	不得检出	不得检出	附录 A

装后 121℃灭菌 20 min 备用。

A.2.2 羧甲基纤维素钠琼脂培养基 (CMC-Na 培养基)

用相同量的羧甲基纤维素钠替代表 A.1 威尼斯镰刀菌专用固体培养基中的葡萄糖, 其他成分在两种培养基中均相同。

A.2.3 无菌蒸馏水、生理盐水或磷酸盐缓冲液(按 GB 4789.15 要求配制)。

A.2.4 威尼斯镰刀菌专用液体培养基

除不含琼脂外, 其他成分与专用固体培养基相同。

A.2.5 CTAB 缓冲液: 2% CTAB、100 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)、20 mmol/L EDTA、1.4 mol/L NaCl (以上试剂均为商品化试剂, 纯度等级应不低于分析纯)。

A.2.6 氯仿-异戊醇 (24:1)。

A.2.7 无水乙醇。

A.2.8 70%的乙醇。

A.2.9 PCR 高保真型 2×Taq 酶。

A.3 仪器和设备

A.3.1 生化恒温培养箱。

A.3.2 恒温水浴锅。

A.3.3 涡旋振荡器。

A.3.4 PCR 仪。

A.4 样品中生产菌株威尼斯镰刀菌的检测步骤

A.4.1 样品的稀释

称取 25 g 待检样品，加至 225 mL 的无菌稀释液（蒸馏水、生理盐水或磷酸盐缓冲液）中，用涡旋振荡器混匀 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液。

用 1 mL 吸管吸取 1 mL 1:10 的样品匀液，注入含有 9 mL 无菌稀释液的试管中，反复吹吸并充分混匀（或用旋涡混匀器混匀），制备 1:100 的样品稀释液。按上述操作依次制备 10 倍递增系列稀释的样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管。

根据对样品中可能含有生产菌株威尼斯镰刀菌状况的估计，选择 2~3 个适宜稀释度的样品匀液，每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液，加入 2 个无菌平皿内；同时分别取 1 mL 无菌稀释液、1 mL 相应浓度（ $10^1 \sim 10^2$ CFU/mL）的威尼斯镰刀菌孢子悬液，分别各加至 2 个无菌平皿中作空白对照和阳性对照。

将 20 mL~25 mL 冷却至 46℃左右的威尼斯镰刀菌专用固体培养基倾注入平皿，并转动平皿使其与待检样液（无菌稀释液或孢子悬液）混合均匀后，置于水平台面待培养基完全凝固。

A.4.2 培养

待琼脂凝固后，正置平板，置 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 真菌专用培养箱中培养 1 天后开始观察并记录，直到培养至第 5 天。

A.4.3 菌落形态观察与计数

A.4.3.1 菌落形态观察

威尼斯镰刀菌在专用固体培养基平板上的典型菌落为圆形，正面观察菌落中心质地为白色绒毛状，边缘菌丝呈辐射状生长（见图 A.1）；菌株以每天直径增加约 1.3 ± 0.1 cm 的速率生长。菌落反面中心为白色或淡黄色，质地致密，边缘疏松。

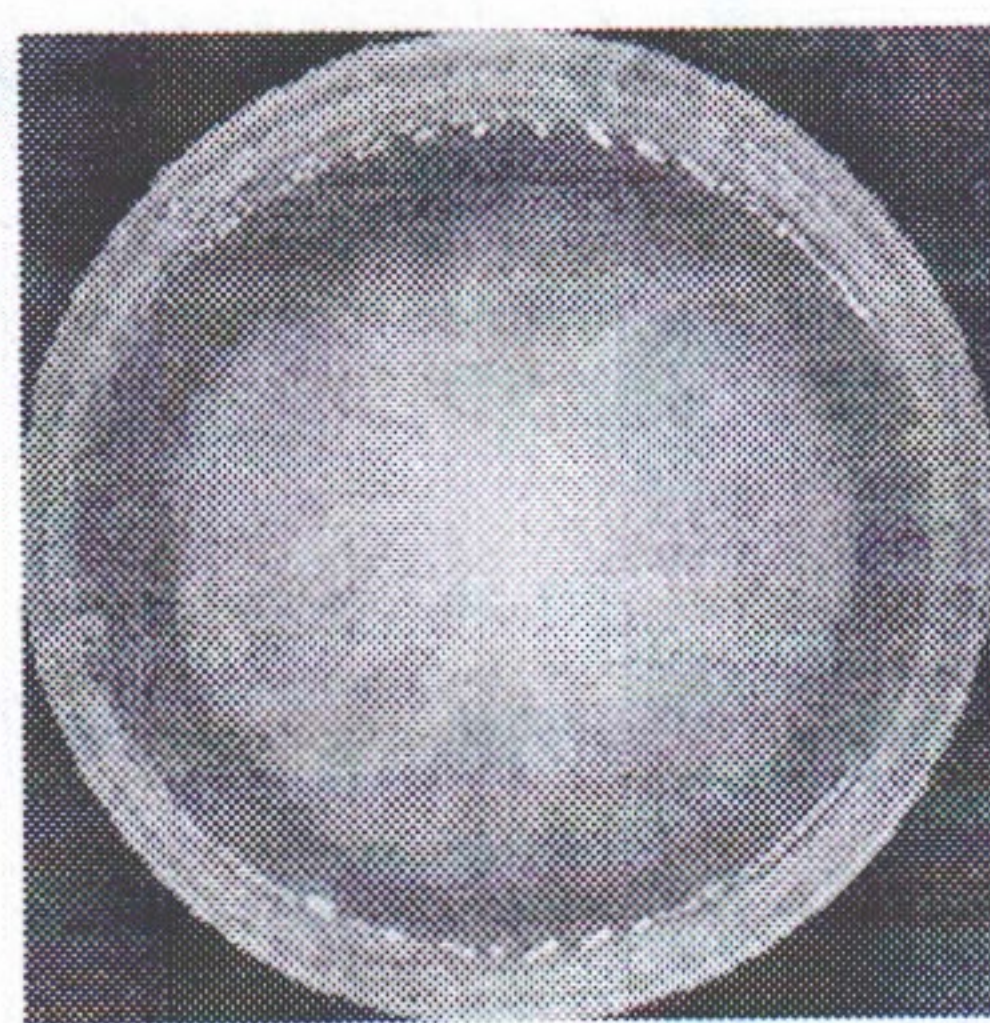


图 A.1 威尼斯镰刀菌在专用固体培养基上的菌落形态

A.4.3.2 菌落计数

根据 A.4.3.1 中描述的菌落特征，并按照 GB 4789.15 规定的要求，对同一稀释度的两个平板中生长的、符合威尼斯镰刀菌菌态特征的菌落进行计数并报告。

A.4.4 威尼斯镰刀菌的 PCR 鉴定

A.4.4.1 菌体制备

若待检样品培养 1 天后有疑似威尼斯镰刀菌生长，则挑取平板上的疑似菌落，转接于威尼斯镰刀菌专用固体培养基上，28℃培养 3 天；继而挑取菌落边缘的新生菌丝，转接至 CMC-Na 固体培养基平板，28℃培养 3 天后，刮取 CMC-Na 固体培养基平板上的全部孢子及菌丝体，接种至 150 mL 威

尼斯镰刀菌专用液体培养基中，28℃培养3天后，定性滤纸过滤收集菌体用于提取DNA，可蒸馏水淋洗菌体去除培养基残留，不能立即提取DNA的菌丝体-80℃冻存。

A.4.4.2 DNA 模板制备

取100 mg菌丝体置于研钵中，加入液氮并充分研磨成均质粉末后，取不少于50 mg菌粉转到1.5 mL的离心管中，加入300 μ L预热至65℃的CTAB缓冲液，振荡混匀，65℃水浴中放置1 h后，加入700 μ L的氯仿-异戊醇（24:1）立即剧烈上下颠倒离心管5~10次，10000 $\times$ g离心5 min后（若上清液中有絮状物可重复离心），将上清液转至新的1.5 mL离心管中，加入1 mL无水乙醇后，立即轻缓上下颠倒离心管5~10次，10000 $\times$ g离心2 min，弃上清，加1 mL无水乙醇重悬沉淀后10000 $\times$ g离心2 min，弃上清，沉淀溶解于50 μ L无菌水中备用。

A.4.4.3 PCR 扩增

选择真菌ITS区通用引物ITS1/ITS4（ITS1:TCCGTAGGTGAACCTGCGG；ITS4:TCC TCCGCTTATTGATATGC）。PCR反应体系组成为：ITS1/4引物各1 μ L，模板2 μ L，高保真型2 $\times$ Taq酶25 μ L，无菌水补齐至50 μ L。扩增程序为：1）预变性：98℃ 3 min；2）循环阶段（35次）：98℃变性15 s，56℃退火15 s，72℃延伸30 s；3）补平：72℃ 5 min。对所得扩增产物进行测序。

A.4.4.4 扩增产物序列分析

将 PCR 扩增所得序列在 GenBank、UNITE、MycoBank 三大数据库同步 BLAST，相似度 $\geq 97\%$ 且覆盖度 $> 90\%$ 的比对结果才具参考价值。

A.5 结果判定

如果平板上没有符合威尼斯镰刀菌形态特征的菌落生长，则判定为样品中未检出威尼斯镰刀菌。

如果平板上有菌落生长，但全部菌落的扩增序列在 GenBank、UNITE、MycoBank 三大数据库中同步 BLAST 时，比对结果为相似度 $< 97\%$ 或覆盖度 $\leq 90\%$ ，则判定为样品中未检出威尼斯镰刀菌。

如果平板上有疑似威尼斯镰刀菌的菌落生长，且菌落经 PCR 扩增后其序列在 GenBank、UNITE、MycoBank 三大数据库中进行同步 BLAST 时，有符合相似度 $\geq 97\%$ 且覆盖度 $> 90\%$ 的比对结果，则判定为样品中检出威尼斯镰刀菌。并按照 GB 4789.15 的要求，对符合威尼斯镰刀菌形态特征的菌落进行计数并报告。

