

风险监测

我国熟制坚果与籽类食品中霉菌及其毒素污染状况研究

彭子欣, 杨欣, 李莹, 杨舒然, 闫琳, 杨大进

(国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 中国医学科学院创新单元2019RU014,
国家食品安全风险评估中心, 北京 100021)

摘要:目的 调查我国熟制坚果与籽类食品中霉菌及其毒素污染状况, 掌握该类食品中霉菌及真菌毒素污染风险的关联性。方法 通过采集市售商品, 检测霉菌及其毒素, 采用内转录间区(ITS)测序法对样品中污染的霉菌进行属鉴定。结果 19.32%(560/2912)的熟制坚果与籽类食品霉菌计数>25 CFU/g。单一、混合坚果超过该限值的比例分别为14.78%(322/2178)和32.56%(239/734), 差异有统计学意义($P<0.05$)。单一坚果中核桃超过该限值的比例最高, 为24.10%(47/195), 杏仁、巴达木和花生分别为17.44%(15/86)、16.81%(20/119)和16.22%(73/450), 其余种类均在15%以下。对26份霉菌计数>25 CFU/g的样品进行真菌毒素检测, 1份采自云南的花生检出白僵菌素污染量为16.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。ITS扩增子测序发现熟制坚果与籽类食品中主要污染曲霉属、交链孢霉属、念珠菌属等, 和真菌毒素检出有相关性。结论 熟制坚果与籽类食品中霉菌污染较高, 检出的霉菌属有产真菌毒素的风险, 提示应加强该类食品中污染霉菌的监测、种属鉴定及产毒情况研究, 掌握其污染途径和产毒规律, 为开展风险评估, 采取有效防控措施提供科学依据。

关键词:熟制坚果与籽类食品; 霉菌; 真菌毒素; 属鉴定

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)10-1460-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.10.009

Mold and mycotoxin contamination in cooked nuts and seeds in China

PENG Zixin, YANG Xin, LI Ying, YANG Shuran, YAN Lin, YANG Dajin

(NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, Chinese Academy of Medical Science Research
Unit (2019RU014), China National Center for Food Safety Risk
Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective The aim of this study was to investigate the mold and mycotoxin contamination status of cooked nuts and seeds in China in 2021 and to understand the correlation and risk of mold and mycotoxin contamination in such foods. **Methods** Samples of commercially available cooked nuts and seeds were tested for mold contamination. Internal transcribed spacer (ITS) sequencing was used to identify the genus of the contaminating mold in the samples. **Results** Out of the cooked nut and seed samples analyzed, 19.32% (560/2912) had mold counts > 25 colony-forming units (CFU)/g. The proportion of mold counts > 25 CFU/g was lower in single nuts and seeds (14.74%, 321/2178) than in mixed nuts and seeds (32.56%, 239/734, $P < 0.05$). Among the single nut and seed samples, walnuts (24.10%, 47/195) had the highest proportion of mold counts > 25 CFU/g, followed by almonds, spartan wood, and peanuts at 17.44% (15/86), 16.81% (20/119), and 16.22% (73/450), respectively. All other nuts and seeds had proportions below 15%. Mycotoxin analysis was performed on 26 samples with mold counts > 25 CFU/g, and beauvericin was detected at 16.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in one peanut sample collected from Yunnan Province. ITS amplicon sequencing revealed that the main contaminating genera in cooked nuts and seeds were *Aspergillus*, *Alternaria*, and *Candida*. The detected molds had a certain correlation with mycotoxins. **Conclusion** High levels of mold contamination were detected in cooked nuts and seeds, resulting in a risk of mycotoxin production in the detected foods. Thus, it is necessary to strengthen the genus and species identification and mycotoxin analysis in these types of food to understand the contamination route and the regularity of toxin production and to provide a scientific basis for risk assessment and effective prevention and control measures.

收稿日期: 2022-11-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172314)

作者简介: 彭子欣 女 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: pengzixin@cfssa.net.cn

通信作者: 杨大进 男 研究员 研究方向为食品安全风险监测 E-mail: yangdajin@cfssa.net.cn

Key words: Cooked nuts and seeds; mold; mycotoxin; genus identification

近年来,我国熟制坚果与籽类食品消费量稳步提升,据统计 2018 年熟制坚果与籽类食品行业成交规模为 2012 年的 10 倍^[1]。2018 年国内休闲零食销售份额中,熟制坚果与籽类食品以 17% 的占比位居第 2,成为引领休闲零食行业增长的新方式^[1]。尤其是以坚果仁、风味果干为主要原材料的混合型休闲食品,因其倡导符合中国人膳食结构的“科学配比”概念,近年来成为受到消费者追捧的“网红食品”^[2]。2014—2020 年国家食品安全监督抽检结果中共涉及 124 批次不合格熟制坚果与籽类食品,其中微生物指标超标问题突出,尤其是霉菌污染问题^[3]。熟制坚果与籽类食品污染的霉菌是其腐败变质的主要原因,且可在一定条件下产生对人体有害的真菌毒素^[4]。国外研究发现,坚果及籽类在种植、采摘、运输、储藏、去壳、清洗、分拣、包装及加工等诸多过程中可被上百种霉菌污染^[5]。按霉菌污染环节可分为田间霉菌和仓储霉菌两种,田间霉菌以青霉菌属、麦角菌属和镰刀菌属为主,多在采收前污染坚果及籽类;仓储性霉菌以曲霉菌属为主,易在存储环节产生污染^[6],污染坚果及籽类并产生毒素的主要霉菌有曲霉属、青霉属、镰刀菌属等^[7]。真菌毒素可通过食品引起人急性或慢性中毒,表现为肝中毒、肾中毒、神经中毒和光致敏皮炎毒等,除急性中毒外,其致癌作用对人类健康危害最大^[8]。据联合国粮农组织估计,全球约 25% 的食品受到真菌毒素的污染,约 45~50 亿人口面临接触真菌毒素的风险^[9]。坚果及籽类食品中常见真菌毒素有黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFs)、单端孢霉毒素(Trichothecene toxins, TCs)、交链孢霉毒素(Alternaria toxins, ATs)和赭曲霉毒素(Ochratoxins, OTs)等,其中黄曲霉毒素已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)划定为 I 类致癌物^[8]。霉菌代谢产生真菌毒素受到菌株性质、生长状态、食品基质、温湿度等因素的影响,但目前对其产毒规律还所知甚少^[10]。

我国对于熟制坚果与籽类食品中微生物及其毒素污染状况掌握较少。本文对 2021 年熟制坚果与籽类食品中污染微生物及其毒素首次开展调查,分析霉菌污染种类、数量及其与产毒之间的关联关系,为进一步掌握污染规律,评估其健康风险提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在全国 31 个省(自治区、直辖市)和新疆生产

建设兵团随机采集熟制坚果与籽类食品,覆盖城市、农村、城乡结合部的超市、零售店、农贸市场、网购、批发市场等。采样地区以秦岭—淮河一线分为南北方,其中北方地区 17 个、南方地区 15 个。采集样品包括散装和预包装食品,以散装为主,涵盖单一和混合坚果与籽类食品,每份样品最小采样量为 500 g,采集时间为第二、三季度。各省第二、三季度采集样品数量见表 1。

表 1 各省第二、三季度采集熟制坚果与籽类食品样品数量/份

Table 1 Sample numbers of cooked nuts and seeds collected in the second and third quarters of each province

采样省份	采样量	第二季度 采样量	第三季度 采样量
安徽省	122	57	65
北京市	60	30	30
重庆市	50	30	20
福建省	66	32	34
甘肃省	85	25	60
广东省	89	53	36
广西壮族自治区	119	55	64
贵州省	76	38	38
海南省	50	30	20
河北省	135	72	63
河南省	102	42	60
黑龙江省	90	45	45
湖北省	108	61	47
湖南省	129	71	58
吉林省	60	30	30
江苏省	133	58	75
江西省	87	34	53
辽宁省	88	44	44
内蒙古自治区	84	36	48
宁夏回族自治区	60	34	26
青海省	65	38	27
山东省	156	68	88
山西省	62	22	40
陕西省	100	37	63
上海市	92	30	62
四川省	136	95	41
天津市	63	32	31
西藏自治区	60	18	42
新疆生产建设兵团	80	25	55
新疆维吾尔自治区	60	28	32
云南省	112	55	57
浙江省	133	51	82
合计	2 912	1 376	1 536

1.2 主要仪器与试剂

磷酸盐缓冲液、马铃薯葡萄糖琼脂购于北京陆桥生物技术公司。24 种真菌毒素的对照品,纯度均大于 95%,购于新加坡 Pribolab 公司;流动相所用色谱纯乙腈由美国 Fisher Scientific 公司提供。

1.3 检测方法

按照 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》^[11]进行霉菌平板计数。对采自云南省、四川省、福建省的随机抽取的 26 份样品开展黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素等 24 种真菌毒素的检测。黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ (Aflatoxin B₁、B₂、G₁、G₂, AFTB₁、B₂、G₁、G₂)、杂色曲霉毒素 (Stachybotrylactam, ST)、赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)、腾毒素 (Tentoxin, TEN)、链格孢酚 (Alternariol, AOH)、交链孢烯 (Altenuene, ALT)、T-2 毒素 (T-2 toxin, T-2)、HT-2 毒素 (HT-2 toxin, HT-2)、交链孢毒素 I (Altetoxin, ATX-I)、交链孢酚单甲醚 (Alternariol monomethyl ether, AME)、 α -玉米赤霉烯醇 (α -zearalenol, α -ZEL)、 β -玉米赤霉烯醇 (β -zearalenol, β -ZEL)、 α -玉米赤霉醇 (α -zearalanol, α -ZAL)、 β -玉米赤霉醇 (β -zearalanol, β -ZAL)、玉米赤霉酮 (Zearalanone, ZAN)、玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN)、白僵菌素 (Beauverin, BEA)、恩镰孢菌素 A、B、A₁、B₁ (Enniatin A、B、A₁、B₁, ENNA、B、A₁、B₁) 等 24 种真菌毒素的测定使用专门为本次调查研制的液相色谱串联质谱法检验^[12]。

1.4 ITS测序

在甘肃省、四川省、云南省采集的样品中随机抽选 41 份,采用十六烷基三甲基溴化铵法 (Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 对熟制坚果与籽类食品中污染霉菌的基因组 DNA 进行提取,之后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,取适量样品 DNA 于离心管中,使用无菌水稀释样品至 1 ng/ μ L^[13]。使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (美国) 文库试剂盒进行文库构建,使用 Illumina NovaSeq6000 (美国) 进行上机测序。将测序数据去除 Barcode 和引物序列后使用 FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) 对每个样品的 reads 进行拼接,拼接后的高质量序列利用 Uparse 算法 (Uparse v7.0.1001, <http://www.drive5.com/uparse/>) 进行聚类,以 97% 的一致性 (Identity) 将序列聚类成为 OTUs (Operational taxonomic units),用 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 中的 BLAST 方法 (http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html) 与 Unite (V8.2) 数据库 (<https://unite.ut.ee/>) 进行物种注释分析^[13]。

1.5 统计学分析

应用 R 软件进行数据分析。应用 χ^2 检验对不同种类、不同包装、不同采样季度的熟制坚果与籽类食品中霉菌污染状况进行比较, $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 霉菌检测情况

全国共采集熟制坚果与籽类食品 2 912 份,其中北方省份采集样品 1 410 份,南方省份采集样品 1 502 份;带壳和脱壳样品分别为 1 543 份和 1 369 份;散装和预包装样品分别为 1 772 份和 1 140 份;单一和混合样品分别为 2 178 份和 734 份;第二和第三季度采集样品分别为 1 376 份和 1 536 份。仅 1 份样品产自中国香港,7 份样品产自国外,其余 2 904 份样品均产自内地。

参考 GB 19300—2014《食品安全国家标准 坚果与籽类食品》^[14],烘炒工艺加工的熟制坚果与籽类食品中霉菌计数不得超过 25 CFU/g,有 19.23% (560/2 912) 的样品超过该限值,其中霉菌计数在 25~1 000 CFU/g 的样品比例为 16.31% (475/2 912), >1 000 CFU/g 的样品比例为 2.92% (85/2 912)。霉菌计数最高的样品为采自湖南省湘潭市某超市的一份每日坚果,计数为 7.5×10^6 CFU/g。北方 17 省霉菌计数超过 25 CFU/g 的样品比例为 19.22% (271/1 410),南方 15 省为 19.24% (289/1 502),差异无统计学意义。

2.2 不同种类样品霉菌检测情况

采集的样品中,脱壳熟制坚果与籽类样品霉菌计数 >25 CFU/g 的比例为 23.96% (328/1 369),带壳样品该比例为 15.04% (232/1 543),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中,霉菌计数在 25~1 000 CFU/g 的脱壳样品占比 20.38% (279/1 369),带壳样品占比 12.70% (196/1 543);霉菌计数 >1 000 CFU/g 的脱壳样品比例为 3.58% (49/1 369),带壳样品比例为 2.33% (36/1 543),差异均有统计学意义 ($P < 0.05$,表 2)。

单一和混合坚果霉菌计数 >25 CFU/g 的样品比例分别为 14.78% (322/2 178) 和 32.56% (239/734),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中,霉菌计数在 25~1 000 CFU/g 的样品比例分别为 12.63% (275/2 178) 和 27.25% (200/734); >1 000 CFU/g 的样品比例分别为 2.11% (46/2 178) 和 5.31% (39/734),差异均有统计学意义 ($P < 0.01$,表 3)。单一坚果中核桃超过该限值的比例最高,为 24.10% (47/195),杏仁、巴达木和花生分别为 17.44% (15/86)、16.81% (20/119) 和 16.22% (73/450),其余种类均在 15% 以下。

2.3 不同包装类型样品霉菌污染情况

预包装和散装(包括自行简易包装)样品霉菌计

数>25 CFU/g 的比例分别为 20.09%(229/1 140)和 18.68%(331/1 772),差异无统计学意义($P>0.05$)。其中,预包装和散装霉菌计数在 25~1 000 CFU/g 的样品比例分别为 17.37%(198/1 140)和 15.63%(277/1 772);预包装和散装>1 000 CFU/g 的样品比例分别为 2.72%(31/1 140)和 3.05%(54/1 772),差异均无统计学意义($P>0.05$,表 4)。

2.4 不同季度样品霉菌污染情况

第二和第三季度样品霉菌计数>25 CFU/g 的比例分别为 19.77%(272/1 376)和 18.75%(288/1 536),差异无统计学意义($P>0.05$)。其中,霉菌计

数在 25~1 000 CFU/g 的样品比例分别为 16.35%(225/1 376)和 16.28%(250/1 536);>1 000 CFU/g 的样品比例分别为 3.42%(47/1 376)和 2.47%(38/1 536),差异均无统计学意义($P>0.05$,表 5)。

2.5 真菌毒素检出情况

如表 6 所示,26 份样品中 15 份(57.69%,15/26)未检出全部 24 种真菌毒素,11 份样品(42.31%,11/26)共检出 9 种真菌毒素。2 份样品分别检出 6 种真菌毒素,1 份是福建省的散装瓜子仁,另 1 份是云南省的散装花生。7 份样品检出 BEA,其中采自云南省的 1 份散装花生 BEA 检出值

表 2 带壳和脱壳熟制坚果与籽类食品霉菌污染情况

Table 2 Mold contamination of cooked nuts and seeds with shell and shelled

食品类别	样品数量/份	≤25 CFU/g				25~1 000 CFU/g				>1 000 CFU/g			
		样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	统计分析	样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	卡方分析	样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	统计分析
带壳熟制坚果与籽类	1 543	1 311	84.96	(83.18,86.75)	$\chi^2=37.19,$ $P<0.01$	196	12.70	(11.04,14.36)	$\chi^2=31.32,$ $P<0.01$	36	2.33	(1.58,3.09)	$\chi^2=3.98,$ $P<0.05$
脱壳熟制坚果与籽类	1 369	1 041	76.04	(73.78,78.30)		279	20.38	(18.25,22.51)		49	3.58	(2.60,4.56)	
合计	2 912	2 352	80.77	(79.34,82.20)		475	16.31	(14.97,17.65)		85	2.92	(2.31,3.53)	

表 3 单一和混合熟制坚果与籽类食品霉菌污染情况

Table 3 Mold contamination of single and mixed cooked nuts and seeds

食品类别	样品数量/份	≤25 CFU/g				25~1 000 CFU/g				>1 000 CFU/g			
		样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	统计分析	样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	卡方分析	样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	统计分析
单一熟制坚果与籽类	2 178	1 857	85.26	(83.77,86.75)	$\chi^2=112.28,$ $P<0.01$	275	12.63	(12.16,14.63)	$\chi^2=85.98,$ $P<0.01$	46	2.11	(4.86,6.54)	$\chi^2=19.86,$ $P<0.01$
混合熟制坚果与籽类	734	495	67.44	(66.74,70.64)		200	27.25	(15.17,17.87)		39	5.31	(5.72,7.53)	
合计	2 912	2 352	80.77	(79.34,82.20)		475	16.31	(14.97,17.65)		85	2.92	(2.31,3.53)	

表 4 不同包装类型熟制坚果与籽类食品霉菌污染情况

Table 4 Mold contamination of cooked nuts and seeds in different packaging types

包装类型	样品数量/份	≤25 CFU/g				25~1 000 CFU/g				>1 000 CFU/g			
		样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	统计分析	样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	卡方分析	样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	统计分析
散装(包括自行简易包装)	1 772	1 441	81.32	(79.51,83.14)	$\chi^2=0.35,$ $P>0.05$	277	15.63	(13.94,17.32)	$\chi^2=0.22,$ $P>0.05$	54	3.05	(2.25,3.85)	$\chi^2=0.61,$ $P>0.05$
预包装	1 140	911	79.91	(77.59,82.24)		198	17.37	(15.17,19.57)		31	2.72	(1.78,3.66)	
合计	2 912	2 352	80.77	(79.34,82.20)		475	16.31	(14.97,17.65)		85	2.92	(2.31,3.53)	

表 5 第二和第三季度熟制坚果与籽类食品霉菌污染情况

Table 5 Mold contamination of cooked nuts and seeds in the second and third quarters

采样季度	样品数量/份	≤25 CFU/g				25~1 000 CFU/g				>1 000 CFU/g			
		样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	统计分析	样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	卡方分析	样品数量/份	样品比例/%	95%CI/%	统计分析
第二季度	1 376	1 104	80.23	(78.07,82.28)	$\chi^2=0.49,$ $P>0.05$	225	16.35	(14.44,18.36)	$\chi^2=0.01,$ $P>0.05$	47	3.42	(2.46,4.39)	$\chi^2=0.13,$ $P>0.05$
第三季度	1 536	1 248	81.25	(79.23,83.17)		250	16.28	(14.43,18.15)		38	2.47	(1.72,3.29)	
合计	2 912	2 352	80.77	(79.34,82.20)		475	16.31	(14.97,17.65)		85	2.92	(2.31,3.53)	

表6 熟制坚果与籽类食品真菌毒素检出情况
Table 6 Detection of mycotoxins in cooked nuts and seeds

编号	采样地点	采样月份	样品种类	包装形式	产品类别	产地	生产月份	霉菌计数/ (CFU/g)	TEN*	AOH	AME	ZEN	BEA	ENNA	ENNA ₁	ENNB	ENNB ₁
jzg005	四川省	5月	西瓜子	预包装	单一坚果	广东省	2021年2月	100	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
jzg007	四川省	5月	夏威夷果	预包装	单一坚果	云南省	2020年6月	50	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
jzg011	四川省	5月	南瓜子	散装	单一坚果	四川省	2021年4月	50	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
jzg020	四川省	5月	每日坚果	预包装	混合坚果	山东省	2021年4月	150	0.22	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	0.03	0.03	N.D.
G21119	福建省	5月	瓜子仁	散装	单一坚果	江西省	2021年2月	30	6.82	N.D.	0.88	0.65	2.10	N.D.	N.D.	0.06	0.18
G21123	福建省	5月	每日坚果	预包装	混合坚果	山东省	2021年1月	50	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
J21021	福建省	5月	腰果	预包装	单一坚果	浙江省	2021年1月	130	0.62	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03	0.09
J21022	福建省	5月	每日坚果	预包装	混合坚果	安徽省	2021年1月	210	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
J21023	福建省	5月	每日坚果	预包装	混合坚果	山东省	2021年1月	140	N.D.	2.23	2.29	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-1	云南省	4月	南瓜子	散装	单一坚果	云南省	2021年2月	260	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-2	云南省	5月	葵花籽	散装	单一坚果	不详	2021年2月	1 100	2.58	N.D.	0.23	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-3	云南省	5月	夏威夷果	散装	单一坚果	不详	2020年12月	60	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-4	云南省	5月	核桃仁	散装	单一坚果	不详	不详	30	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-5	云南省	5月	花生	散装	单一坚果	不详	不详	8 200	N.D.	N.D.	0.14	N.D.	16.37	0.24	0.30	0.05	0.32
YN-6	云南省	4月	每日坚果	预包装	混合坚果	山东省	2020年11月	50	N.D.	N.D.	0.14	N.D.	0.18	N.D.	0.04	0.05	0.16
YN-7	云南省	4月	每日坚果	预包装	混合坚果	广东省	2021年1月	410	N.D.	N.D.	0.22	N.D.	0.74	N.D.	N.D.	0.03	N.D.
YN-8	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	山东省	2021年5月	170	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-9	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	广东省	2021年1月	340	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-10	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	山东省	2021年5月	9 900	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-11	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	山东省	2021年6月	100	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-12	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	安徽省	2021年5月	40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-13	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	山东省	2021年1月	<10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-14	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	安徽省	2021年7月	<10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-15	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	江苏省	2021年1月	950	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-16	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	安徽省	2021年7月	300	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
YN-17	云南省	8月	每日坚果	预包装	混合坚果	上海市	2021年5月	<10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

注:*：仅列出了有阳性样品检出的真菌毒素；N.D.：未检出

16.37 μg/kg,这份样品的霉菌计数为8 200 CFU/g。6份样品检出AME和ENNB。福建省1份散装瓜子仁TEN检出值为6.82 μg/kg。云南省1份混合坚果样品霉菌计数达9 900 CFU/g,但未检出真菌毒素。

2.6 霉菌属水平分析

开展测序的41份样品中,28份获得ITS测序结果。分析发现,28份样品霉菌属分布差异大,主要污染有曲霉属(*Aspergillus* spp.)、交链孢霉属(*Alternaria* spp.)、念珠菌属(*Candida* spp.)、*Parengyodontium*属、丽赤壳属(*Calonectria* spp.)、枝孢属(*Cladosporium* spp.)、镰刀菌属(*Fusarium* spp.)、节担菌属(*Wallemia* spp.)、葡萄座腔霉属(*Botryosphaeria* spp.)、接合酵母属(*Zygosaccharomyces* spp.)等(图1)。采自云南的预包装每日坚果样品YN-11和YN-12曲霉属最多;采自云南的散装葵花籽样品YN-2交链孢霉属最多;采自甘肃的散装开心果样品GS03念珠菌属最多;采自四川的

预包装瓜子仁样品jzg005镰刀菌属最多;采自云南的散装花生YN-5主要污染曲霉属、镰刀菌属和节担菌属,该样品霉菌计数8 200 CFU/g, BEA检出值16.37 μg/kg。

3 讨论

市场监管部门2016—2019年抽检信息显示,炒货食品及坚果制品霉菌污染问题相对突出,占总不合格数的15.2%,检测值为30~23 000 CFU/g^[1]。坚果及籽类食品在运输、储存、加工及分销等过程中易受到黄曲霉等多种霉菌污染^[1,15-16]。本次调查发现,19.32%(560/2 912)的熟制坚果与籽类食品霉菌计数>25 CFU/g,脱壳比带壳样品霉菌污染率显著高,混合坚果比单一坚果霉菌污染率显著高,单一坚果中核桃、杏仁、巴达木和花生霉菌污染高于其他种类,但预包装和散装样品霉菌污染无显著差异。熟制坚果与籽类食品中主要污染曲霉属、交

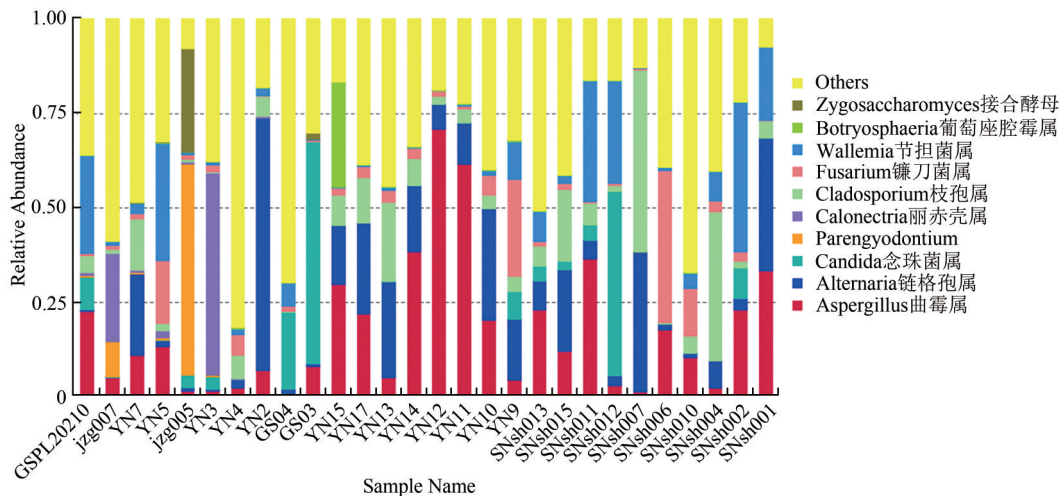


图1 熟制坚果与籽类食品中霉菌主要属分布

Figure 1 Main distribution of mold in cooked nuts and seeds

链孢霉属、念珠菌属,1份花生检出白僵菌素污染量为 $16.37\ \mu\text{g}/\text{kg}$,霉菌污染与真菌毒素检出有相关性。以上结果说明原料种类和生产工艺对产品霉菌污染影响大,加工过程中因机械损伤、交叉污染、空气传播等因素,增加了霉菌污染机会^[16],但是否有密封包装不影响霉菌污染。本次模拟消费者采购行为,于第二、三季度在市场上进行随机采样,结果显示这两个季度熟制坚果与籽类食品霉菌污染无显著差异,后续将开展四个季度霉菌污染差异分析,以及熟制坚果与籽类的生产消费全过程监测,分析霉菌污染的关键环节和控制措施,为相关部门和企业防控霉菌污染提供科学依据。

《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761—2017)规定熟制坚果中 AFB_1 含量不得超过 $5\ \mu\text{g}/\text{kg}$,杏仁、榛子中 AFB_1 含量不得超过 $15\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[17]。该限量标准中涉及的坚果、干果和真菌毒素种类偏少,这与我国目前坚果和干果中真菌毒素的污染监测数据不足有关。以每日坚果这类混合坚果为例,尽管其市场占有率较大,但尚无霉菌及真菌毒素限量的国家标准,造成判定依据不明确,仅依靠企业标准检测,无法对其安全性进行有效监管。本次调查中,在一份花生和一份瓜子仁中分别检出BEA和TEN污染量较高。BEA是由镰刀菌属的多种真菌产生的六酯肽类真菌毒素,对动物的上皮细胞、免疫细胞、卵巢细胞等具有很强的毒性作用^[18]。TEN是交链孢霉属毒素,有研究称这类毒素会对牲畜和人体产生慢性或急性的致突变、致畸、致癌等毒性作用^[19]。因此,尽管未检测出 AFB_1 ,但该类食品中的真菌毒素污染仍需大量收集数据,为安全生产、监管和消费提供数据支撑和参考借鉴。

真核生物的ITS由于是非转录区,承受的外界遗传选择压力小,变异强,可直接对样品中的霉菌

特征序列进行扩增检测,克服大多数霉菌无法纯培养的难题,可用于研究霉菌的种群结构^[20]。本研究发现,采自不同地区、不同种类的样品霉菌属分布差异大,这可能与气候、原料、加工工艺、储存条件及时间等相关。曲霉属是引起食品霉腐的主要微生物之一,其中又以黄曲霉毒性最强^[21];念珠菌是真菌中最常见的条件致病菌,常定植于人皮肤、口腔、阴道和肠黏膜等处,易引起念珠菌病^[22];镰刀菌属可产生毒素,造成食物中毒,本次调查花生中检出的BEA是由黄色镰刀菌、尖孢镰刀菌和燕麦镰刀菌等镰刀菌属的某些菌株在特定环境条件下代谢产生的^[23]。交链孢霉属的一些菌株可感染人和动物,引起皮癣、甲癣、颞骨髓炎等疾病,产生的某些真菌毒素是重要的致癌因素,瓜子仁中检出的TEN即是由交链孢霉属的细交链孢菌代谢产生^[24]。本次霉菌计数、霉菌属和真菌毒素检出结果显示,样品中霉菌及毒素污染有一定相关性,检出毒素的样品一定存在产毒霉菌污染,但产毒霉菌不一定代谢产生毒素。霉菌代谢产生真菌毒素与毒株性质、污染量、温度、湿度、水分含量以及储存时间等有关^[25],应进一步开展霉菌计数、霉菌种属、真菌毒素污染和储存条件之间关联研究,发展熟制坚果与籽类食品霉菌及真菌毒素污染关键控制技术。

本研究是我国首次对熟制坚果与籽类食品中霉菌污染开展监测,但由于检测样品量限制等原因,仅对少数地区采集的41份样品中霉菌种群结构、26份样品中真菌毒素污染情况开展了检测。后续将在全国更多地区对检出霉菌开展种属鉴定、霉菌种群结构分析和真菌毒素检测,为掌握熟制坚果与籽类食品中霉菌污染规律、开展科学评估、采取防控措施奠定数据基础。

参考文献

- [1] 张海红, 王冠群, 田洪芸, 等. 我国2016—2019年炒货食品及坚果制品质量安全状况及风险分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 7633-7641.
ZHANG H H, WANG G Q, TIAN H Y, et al. Quality and safety status and risk analysis of roasted seeds and nuts products in China from 2016 to 2019 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(20): 7633-7641.
- [2] 王钰祺. 沃隆坚果王萍: 10亿单品的下一步, 做坚果中的大队长[J]. 国际品牌观察, 2021(29): 32-33.
WANG Y Q. Walloon Nut Wang Ping: The next step of 1 billion single products, to be the captain of nuts [J]. Global Brand Insight, 2021(29): 32-33.
- [3] 袁爱华, 骆瑜, 王维亚, 等. PCR快速检测坚果及籽类制品中的霉菌[J]. 实验与检验医学, 2020, 38(6): 1129-1132.
YUAN A H, LUO Y, WANG W Y, et al. Rapid detection of mold in nuts and seed products by PCR [J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2020, 38(6): 1129-1132.
- [4] 刘单单, 曾晓琮, 周露. 2018年广东省炒货食品及坚果制品安全状况结果分析[J]. 食品工业, 2021, 42(5): 367-372.
LIU D D, ZENG X C, ZHOU L. Analysis on the safety status of roasted seeds and nut products in Guangdong Province in 2018 [J]. The Food Industry, 2021, 42(5): 367-372.
- [5] ORTEGA-BELTRAN A, MORAL J, PICOT A, et al. Atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates endemic to almond, fig, and pistachio orchards in California with potential to reduce aflatoxin contamination in these crops [J]. Plant Disease, 2019, 103(5): 905-912.
- [6] MISHRA G, PANDA B K, RAMIREZ W A, et al. Research advancements in optical imaging and spectroscopic techniques for nondestructive detection of mold infection and mycotoxins in cereal grains and nuts [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(5): 4612-4651.
- [7] 李润妍, 潘琳, 柳家鹏, 等. 2010—2019年欧盟食品和饲料快速预警系统对华通报食品真菌毒素污染分析及应对策略[J]. 核农学报, 2021, 35(8): 1883-1892.
LI R Y, PAN L, LIU J P, et al. Analysis and countermeasures of notifications on mycotoxin contamination in food from China by EU rapid alert system for food and feed (RASFF) from 2010 to 2019 [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(8): 1883-1892.
- [8] 赖文珊, 武爱波, 刘弘, 等. 果蔬中常见真菌毒素的检测研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(4): 1286-1293.
LAI W S, WU A B, LIU H, et al. Research progress on the detection of common mycotoxins in fruits and vegetables [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(4): 1286-1293.
- [9] 朱家骥, 荣雅文, 焦天慧, 等. 食品中常见真菌毒素的表面增强拉曼光谱检测研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(17): 235-247.
ZHU J J, RONG Y W, JIAO T H, et al. Advances in the detection of common mycotoxins in foods by surface-enhanced raman spectroscopy [J]. Food Science, 2023, 44(17): 235-247.
- [10] 闫珊珊, 刘光芒, 王建萍, 等. 有氧条件下污染禾谷镰刀菌的玉米品质变化规律和呕吐毒素的积累动态变化规律[J]. 微生物学报, 2020, 60(8): 1661-1671.
YAN S S, LIU G M, WANG J P, et al. Quality variation and deoxynivalenol accumulation in corn inoculated with *Fusarium graminearum* under aerobic conditions [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(8): 1661-1671.
- [11] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数: GB 4789.15—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission. National food safety standard-Food microbiological examination: Enumeration of moulds and yeasts: GB 4789.15—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [12] 国家食品安全风险评估中心. 2022年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册(中卷)-化学方法SOP[M]. 北京: 国家食品安全风险评估中心, 2021.
China National Center for Food Safety Risk Assessment. National work manual for risk surveillance of food contamination and harmful factors 2022 (Medium volume)- Chemical methods SOP [M]. Beijing: China National Center for Food Safety Risk Assessment, 2021.
- [13] BUEHLER A J, EVANOWSKI R L, WIEDMANN M, et al. Internal transcribed spacer (ITS) sequence-based characterization of fungal isolates from multiple yogurt facilities-A case study [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(4): 3646-3653.
- [14] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 坚果与籽类食品: GB 19300—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
National Health and Family Planning Commission. National food safety standard Nuts and seeds: GB 19300—2014 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [15] KWABENA, BEDIAKO A. Aflatoxin contamination of groundnut (*Arachis hypogaea* L.): Predisposing factors and management interventions [J]. Food Control, 2019, 98: 61-67.
- [16] 周劲松. 炒货食品氧化和霉变的原因及对策探讨[J]. 现代食品, 2019, (4): 114-115.
ZHOU J S. Discussion on the causes and countermeasures of food oxidation and mildew in fried [J]. Modern Food, 2019, (4): 114-115.
- [17] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量: GB 2761—2017 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard Limits of mycotoxins in food: GB 2761—2017 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [18] 刘柏林, 倪曼, 单晓梅, 等. 冷诱导液液萃取-分散固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中白僵菌素和4种恩镰孢菌素残留[J]. 色谱, 2021, 39(12): 1331-1339.
LIU B L, NI M, SHAN X M, et al. Simultaneous determination of beauvericin and four enniatins in eggs by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with cold-induced liquid-liquid extraction and dispersive solid phase extraction [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39

- (12): 1331-1339.
- [19] WANG Y J, NIE J Y, YAN Z, et al. Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in nuts and dried fruits from China [J]. *Food Control*, 2018, 88: 181-189.
- [20] AL-AMRI O, AL-QURAIHY S, AL-SHAEBI E M, et al. Molecular identification of the rodent-borne pathogen *Rodentolepis nana* using the genetic markers of ITS-1, 18 S, and 28 S rDNA [J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(2): 1361-1367.
- [21] DONNELLY J P, CHEN S C, KAUFFMAN C A, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer and the mycoses study group education and research consortium [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2020, 71(6): 1367-1376.
- [22] CADENA J, THOMPSON G R 3RD, PATTERSON T F. Aspergillosis: Epidemiology, diagnosis, and treatment [J]. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2021, 35(2): 415-434.
- [23] 韩小敏, 李凤琴, 徐文静, 等. 重要产毒镰刀菌合成白僵菌素和恩镰孢菌素研究进展 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(1): 89-93.
- HAN X M, LI F Q, XU W J, et al. Progress on biosynthesis of beauvericin and enniatins for important toxin-producing *Fusarium* species [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2019, 31(1): 89-93.
- [24] 孙丹蕾. 新兴真菌毒素检测方法及其膳食暴露研究 [D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2019.
- SUN D L. Study on the methods for the determination of emerging mycotoxins and dietary exposure assessment in China [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2019.
- [25] 赵雪, 靳欣迪, 刘斌, 等. 辣椒粉中黄曲霉菌生长及其产毒规律的预测模型构建 [J]. *食品科学*, 2021, 42(14): 62-69.
- ZHAO X, JIN X D, LIU B, et al. Prediction model construction for *Aspergillus flavus* growth and toxin accumulation in chili powder [J]. *Food Science*, 2021, 42(14): 62-69.