

## 食品工业用菌安全性检测与评价技术的研究简介

计 融

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘 要:**为保障食品安全,“食品工业用菌安全性检测与评价技术的研究”课题被列为国家“十五”国家科技攻关计划“食品安全关键技术”资助课题。主要研究内容为食品工业用菌菌种毒力检测技术的研究;产毒和非产毒食品工业用菌菌种的鉴别研究;桔青霉素检测技术的建立和红曲霉产毒菌株的筛选研究;可安全使用的工业用菌菌种名单和食品工业用菌安全评价指导原则的研究。通过研究建立了红曲制品及红曲培养物中桔青霉素的定量检测技术。建立了鉴别食品工业常用菌株黑曲霉和赭曲霉毒素 A 的产毒菌株炭黑曲霉,米曲霉、黄曲霉毒素产毒菌株黄曲霉、寄生曲霉和集蜂曲霉的微生物学和生态学检测方法,在种间、种内水平甄别产毒与非产毒菌株。综合微生物学、毒理学、分析化学等研究结果,提出了可安全使用的食品工业用菌菌种名单报送国家食品安全控制部门,包括常用的具有悠久使用历史的食品发酵、生产食品添加剂和保健食品等食品加工和直接食用的真菌菌种(22 种酵母和 11 种真菌)以及可用于保健食品生产的益生菌菌种名单(9 种细菌、11 种真菌和酵母)。该课题具有极大的社会意义与经济意义。

**关键词:**食品;安全管理;工业微生物学

### Development of determination and evaluation system for fungi used in food processing industry

Ji Rong

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021)

**Abstract:** The project entitled “Development of determination and evaluation system for fungi used in food processing industry” was included in ten-fifth key technologies R and D programs financially supported by the Ministry of Science and Technology, with the aim of ensuring the safety of food derived from microorganisms. Study on the pathogenicity of fungi, identification of toxigenic and non-toxigenic fungi applied in food industry, methodology development for citrinin detection in *Monascus* materials and the screening of toxigenic *Monascus* strains, a list of microorganisms safely used in food production as well as the guidelines for their safety evaluation were involved. The results indicated that citrinin recoveries of the developed method from triplicate samples ranged from 87% to 104%. The detection limit and relative standard deviation for citrinin were 50 µg/L and less than 10%, respectively. Techniques based on the morphological characteristics to differentiate *Aspergillus niger* from *A. carbonarius*, *A. oryzae* from both *A. flavus* and *A. parasiticus* on a species-by-species basis were developed. Twenty-two yeasts, 11 fungi and 9 bacteria safely utilized in the production of fermented foods, food additives and health meals were chosen and comprised in the list of microorganisms for food production. The conduct of this project is of important social and economical significance.

**Key Words:** Food; Safety Management; Industrial Microbiology

基金项目:国家科技部“十五”科技攻关项目(2001BA804A02)。

作者简介:计融 男 研究员

This work was supported by the Grant from National Science and Technology Program Funds of Ministry of Science and Technology, China. (2001BA804A02)

食品新资源的开发利用导致了新的菌种不断涌现,国外大量用菌种生产的食品已经或即将进入我国市场,工业真菌在食品加工使用中的安全性问题日益受到广泛的关注。但目前我国在食品工业用菌的使用安全控制方面,从管理到技术支持均存在较大空白,缺乏相应的法规和管理手段。对菌种的使用放任自流,食品工业用菌的安全性基本处于失控状态,更谈不上与食品工业保持同步发展和保证食品的食用安全,在很大程度上影响了食品工业的发展。另外即使是一些投产时认为安全的菌种,在长期的传代使用过程中也可能发生变异,而管理部门缺乏相应的系统安全检测评价方法,也导致不安全菌种流入食品生产加工的事件屡屡发生。为了提高食品工业用菌安全性检测与评价的技术水平,保障微生物发酵食品的安全性,科技部在广泛征求专家意见的基础上,将本课题列为国家“十五”国家科技攻关计划“食品安全关键技术”资助课题,重点解决我国食品发酵工业中菌种安全性检测与评价关键技术并尽快应用于实践。本项目研究周期为2001年~2002年,合同编号:2001BA804A02,课题负责人计融。

## 1 目前食品工业用菌安全性检测与评价方面存在的主要问题

1.1 现有的对食品工业用菌安全性评价方法不能直接反映菌种本身对动物的毒性,对那些能产生毒素而其水平不足以导致动物发生急性中毒的菌种无从评价。

1.2 缺乏鉴别产毒和非产毒工业用菌菌种的技术,使一些能产生有毒代谢产物的菌种流入食品生产加工领域。

1.3 缺乏检测有毒真菌代谢产物赭曲霉毒素A和-硝基丙酸的技术,因此对用黑曲霉和米曲霉发酵生产的食品进行卫生监督时缺乏技术支持,食用该类食品缺乏安全保障。

1.4 由于桔青霉素的理化性质与红曲色素极其相似,从红曲产品中将红曲色素与桔青霉素成功分离的难度很大,试样的前处理繁琐,干扰杂质含量高,色素中残留的毒素较多,回收率低,因此急需建立准确、灵敏的桔青霉素检测技术。

1.5 目前尚无可安全使用的食品工业用菌种名单和食品工业用菌安全评价指导原则。

## 2 主要研究内容

食品工业用菌菌种毒力检测技术的研究;产毒和非产毒食品工业用菌菌种的鉴别研究;桔青霉素

检测技术的建立和红曲霉产毒菌株的筛选研究;可安全使用的工业用菌种名单和食品工业用菌安全评价指导原则的研究。

### 2.1 工业用菌菌种毒力检测技术的研究

2.1.1 建立食品工业用菌菌种毒力测定方法。选用米曲霉、黑曲霉、红曲霉3个食品工业生产中常用的菌种,找出引起实验动物(小鼠)出现毒性作用的孢子浓度。

2.1.2 建立快速、灵敏、特异的检测黑曲霉代谢产物赭曲霉毒素A、米曲霉代谢产物-硝基丙酸的方法。

2.1.3 进行米曲霉和黑曲霉共计10个菌株产毒能力的研究,并对所产毒素进行定性和定量分析。

2.1.4 综合米曲霉和黑曲霉孢子的毒力、毒素产生能力资料,筛选出两菌种内可安全使用的菌株。

2.2 产毒和非产毒工业用菌种的鉴别研究 建立食品发酵工业常用菌种黑曲霉和赭曲霉毒素A产毒菌株炭黑曲霉,米曲霉与致癌物黄曲霉毒素产毒菌株黄曲霉、寄生曲霉和集蜂曲霉的鉴别技术。

### 2.3 桔青霉素检测技术的建立和红曲霉产毒菌株的筛选研究

2.3.1 红曲霉有毒代谢产物桔青霉素检测技术的建立 建立准确、灵敏、稳定的红曲霉发酵产物及其制品中桔青霉素检测方法。

2.3.2 对食品工业中常用的5种红曲霉的20个菌株进行产毒能力的筛选 研究各菌株在不同培养条件下(培养基成分、pH值、温度、湿度等)的产毒情况,确定菌株生长和产生毒素的最适培养基和培养条件,同时筛选出安全的菌株。

2.4 提出可安全使用的食品工业用菌种名单。

2.5 提出食品工业用菌安全评价指导原则。

## 3 目标

3.1 总目标 建立一整套评价菌种系统安全性的检测技术,形成标准检测方法送审稿,交由国家标准主管部门审批发布,作为国家食品安全行政执法部门审批工业用菌菌种和安全控制的依据。提出可供安全使用的工业用菌种名单和安全评价指导原则,报送国家食品安全控制部门。

### 3.2 具体目标

3.2.1 建立红曲制品及红曲培养物中桔青霉素的定量检测技术,检测低限50 μg/kg,回收率>80%,RSD<10%。所建方法可用于定量测定红曲制品和菌种毒力评价试验菌种培养液中的桔青霉素,形成标准检测方法送审稿,提交国家食品卫生标准主管部门审批。

3.2.2 建立鉴别食品工业常用菌株黑曲霉和赭曲霉毒素 A 的产毒菌株炭黑曲霉、米曲霉、黄曲霉毒素产毒菌株黄曲霉、寄生曲霉和集蜂曲霉的微生物学和生态学检测方法。在种间、种内水平甄别产毒与非产毒菌株,为国家食品卫生检验部门提供菌种鉴别方法送审稿。

3.2.3 筛选出食品工业用红曲霉属内如红曲、紫红曲等安全的菌株,得出不安全菌株在不同培养基和培养条件下的产毒能力,确定产毒菌种名单,为食品安全行政执法部门审批工业用菌种和安全控制提供依据。

3.2.4 建立一整套系统评价食品生产用菌种安全性的检测技术,同时为国家食品安全行政立法、执法部门制定相关政策提供依据。

3.2.5 初步提出可安全使用的食品工业用菌种名单,报送国家食品安全控制部门。

3.2.6 提出食品工业用菌安全评价指导原则,报送国家食品安全控制部门。

## 4 结果

4.1 食品工业用菌种毒力检测方法 选用米曲霉、黑曲霉、红曲霉 3 个食品工业生产中常用的菌种共 10 个菌株,采用小鼠尾静脉注射真菌孢子悬液(染毒剂量浓度分组为  $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  和  $10^7$  个孢子)直接染毒的方法,通过综合动物体重变化情况、一般状态及生死观察、尸体解剖、组织(肝、肾、脑、脾)活菌数测定和病理组织学检查等指标,确定导致实验小鼠出现毒性作用的孢子浓度,同时做实验菌株产毒素试验。结果表明,三菌种对小鼠造成的脏器损害主要在肾脏,脑部以循环改变为主,肝脏次之;米曲霉、黑曲霉和红曲霉对小鼠的致病性(活菌计数、组织病理学改变)随孢子注入量的增加而加重,呈剂量-反应关系,该结果与其他国家所得结果一致,三菌种中以米曲霉的致病性最强;米曲霉对小鼠的最小致病剂量为  $10^5$  个孢子,红曲霉和黑曲霉各为  $10^6$  个孢子;虽然黑曲霉 UV-11 产赭曲霉毒素 A,红曲霉菌种中的紫色红曲和菌株 3.4384 在大米培养基上产生高浓度的桔青霉素(浓度分别为 139.51 和 2458.8 mg/kg),但这些菌株对动物的致病性与其他同类菌株相比无差异。而菌株一旦产生毒素是不可以用于食品发酵工业的,因此建议对食品工业用菌的毒力进行评价时,应将其致病性和产毒试验结果综合起来评价才合理。

成果的先进性 食品工业用菌种系统安全性测试方法的研究,突破了我国传统的菌种安全性评价方法中仅使用固定培养物、仅对有毒代谢产物进行

毒力测试的局限性,将危险性评估的手段引入菌种安全性测试的领域。此项技术的创新点在于发现了真菌孢子在不同浓度下对动物造成的毒性作用,明确了孢子对动物的直接毒作用浓度与菌株产生毒素能力的相关关系,为科学评价工业用菌种的系统安全性提供了科学依据。

与国内外同类结果的比较、评价 国际上日本和丹麦在菌种毒力实验方面进行了大量研究,积累了一定的数据,我国真菌发酵产品出口到上述国家时对方要求提供菌种毒力实验报告。而国内到目前为止尚无用真菌孢子注入方式染毒进行菌种毒力实验与菌株产生毒素能力结合起来评价食品工业用菌种安全性的方法,本方法的建立填补国内空白,并已按任务书考核指标的要求完成了所有实验,达到国内领先、国际同等水平。

4.2 检测赭曲霉毒素 A 的高效液相色谱法 建立了检测黑曲霉发酵产物中赭曲霉毒素 A 高效液相色谱法,方法的检出限、回收率、精密度、相对标准偏差等指标均达到任务书考核指标的要求,各项技术指标见表 1,该方法已形成标准送审稿拟上报卫生部。

表 1 检测黑曲霉发酵产物中赭曲霉毒素 A 高效液相色谱法相关技术参数

项目	技术参数
仪器条件	Waters HPLC 分析仪, $\lambda_{ex} = 338 \text{ nm}$ , $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$
分析柱	ODS <sub>2</sub> 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm), 5 $\mu\text{m}$ particles
柱温	30
流动相	CH <sub>3</sub> CN + 0.08 mol/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (56 + 44, 体积比)
流速	1.0 mL/min
进样量	40 $\mu\text{L}$
线性范围	2 ~ 500 ng/mL
S/N	3
回归方程	$y = 13194x - 24.229$
相关系数	0.9998
检出限	0.8 $\mu\text{g/kg}$
回收率 %	1 ~ 50 $\mu\text{g/kg}$ 添加范围内的回收率如下 (每个水平 6 个平行样): 麦芽汁 - 蛋白胨培养基: 92.14 $\pm$ 2.1 ~ 98.01 $\pm$ 2.1 麦芽汁 - 酵母膏培养基: 87.45 $\pm$ 4.6 ~ 100.47 $\pm$ 3.4 马铃薯 - 酵母膏培养基: 83.01 $\pm$ 4.5 ~ 90.7 $\pm$ 1.9 小麦: 81.5 $\pm$ 6.3 ~ 95.4 $\pm$ 4.3 水稻: 83.2 $\pm$ 5.2 ~ 97.6 $\pm$ 2.4
精密度 %	赭曲霉毒素 A 添加浓度为 5、50、500 ng/mL 时, 相对标准偏差(RSD)分别为 10、6、5。

目前 AOAC 有检测粮食中赭曲霉毒素 A 的高效液相色谱方法,各国也有类似的报道,检测限在 1 ~ 10  $\mu\text{g/kg}$  范围不等,回收率大于 80%,但世界各国尚

未见检测黑曲霉发酵产物中赭曲霉毒素 A 方法的报道。本方法的建立填补我国在对产赭曲霉毒素 A 的黑曲霉菌株进行筛选时缺乏检测方法的空白,对食品工业用菌种的安全性遴选提供了技术保障。

4.3 食品用黑曲霉菌株的筛选 用所建方法对产赭曲霉毒素 A 的食品发酵工业用黑曲霉进行了产毒实验筛选,结果见表 2。由表 2 可见,在所试验的 5 个黑曲霉菌株中,只有黑曲霉 3324 在 3 种产毒培养基上不产生赭曲霉毒素 A,其他 4 个菌株在不同的培养基中均有产毒的能力,因此黑曲霉 3324 为本实验筛选出的可用于食品发酵工业的安全菌株。

表 2 食品发酵工业用黑曲霉菌株的筛选  $\mu\text{g}/\text{kg}$

	黑曲 uv - 11	黑曲 uv - 48	黑曲 3 - 350	黑曲 3324	黑曲霉
麦蛋	229.4	45.9	1.5	ND	ND
麦酵	17.5	29.4	154.5	ND	16.4
马酵	4.4	75.9	113.5	ND	ND

注:ND 为未检出。

4.4 检测 - 硝基丙酸的高效液相色谱法 完成了检测米曲霉发酵产物中 - 硝基丙酸高效液相色谱法的建立,所建方法的检出限、回收率、精密度、相对标准偏差等指标达到任务书考核指标的要求,各项技术指标见表 3,该方法已形成标准送审稿拟上报卫生部。

表 3 检测米曲霉发酵产物中 - 硝基丙酸高效液相色谱法的技术参数

项目	技术参数
仪器条件	Waters HPLC 分析仪,紫外检测波长 210 nm
分析柱	$\text{C}_{18}$ ODS <sub>2</sub> 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm), 5 $\mu\text{m}$ particles
柱温	25
流动相	$\text{CH}_3\text{CN} + 0.02 \text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4$ (pH3.0) (1+3, 体积比)
流速	1.0 mL/min
进样量	10 $\mu\text{L}$
线性范围	0.1 ~ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$
S/N	3
回归方程	$y = [5.07 \times 10^5]x - 1.23 \times 10^4$
相关系数	0.9998
检出限	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$
回收率	在 0.5 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平添加范围内(每个水平 6 个平行样),其回收率为 90.1 % ~ 98.0 %, RSD 为 2.38 % ~ 5.64 %

#### 与国内外同类结果的比较、评价

目前 AOAC 尚未见检测食品中 - 硝基丙酸高效液相色谱方法,我国胡文娟和刘勇曾分别建立了检测动物血浆和霉变甘蔗中 - 硝基丙酸的薄层色谱法和气相色谱法,检出限分别为 2 mg/kg 和 2 ng。

1984 年 Muir - AD 等建立了用高效液相色谱法检测动物血浆中 - 硝基丙酸的方法,检测限为 1 mg/kg。由于动物血浆成分复杂,干扰因素多,提取过程繁琐,因此检测限较高。世界各国尚未有检测米曲霉发酵产物中 - 硝基丙酸方法的报道。本方法的建立弥补了我国检测米曲霉培养物中 - 硝基丙酸时无方法的缺陷,对食品工业用菌种的安全性遴选提供了技术保障。

4.5 不产 - 硝基丙酸米曲霉菌株的筛选 用所建的方法对产 - 硝基丙酸的食品发酵工业用米曲霉进行了产毒实验筛选,结果见表 4。由表 4 可见,所实验的 5 株米曲霉中只有 1 株在麦芽汁酵母膏培养基上产 - 硝基丙酸,其它 4 株在 3 种产毒培养基上均不产毒,因此可安全用于食品发酵工业。

表 4 不产 - 硝基丙酸米曲霉菌种的筛选  $\mu\text{g}/\text{kg}$

	米曲霉 1	米曲霉 2	米曲霉 3	米曲霉 4	米曲霉 5
麦蛋	ND	ND	ND	ND	ND
麦酵	ND	10	ND	ND	ND
马酵	ND	ND	ND	ND	ND

注:ND 为未检出。

4.6 检测红曲发酵制品中桔青霉素高效液相色谱检测方法 方法的技术参数 方法的检出限、回收率、相对标准偏差等指标达到任务书考核指标的要求,各项技术指标见表 5。

表 5 红曲霉发酵产物中桔青霉素高效液相色谱检测法的技术参数

项目	技术参数
仪器条件	HP1100 液相色谱分析仪, $\text{ex} = 331 \text{ nm}$ , $\text{em} = 500 \text{ nm}$
分析柱	Eclipse XDB $\text{C}_{18}$ 反相色谱柱, 5 $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4.6 mm
柱温	28
流动相	$\text{CH}_3\text{CN} + \text{水}$ (用磷酸调 pH2.5) (35 + 65, 体积比)
流速	1.0 mL/min
进样量	20 $\mu\text{L}$
线性范围	0.1 ~ 10 mg/L
S/N	3
回归方程	$y = 89.724x + 0.2669$
相关系数	0.9998
检出限	50 $\mu\text{g}/\text{L}$
回收率	在 0.1 ~ 10 mg/L 添加浓度范围内,桔青霉素的回收率为 87 % ~ 104 %, RSD 为 5.9 % ~ 7.15 %

#### 与国内外同类结果的比较和评价

由于桔青霉素的理化性质与红曲色素极其相似,从红曲产品中将红曲色素与桔青霉素成功分离的难度很大,试样的前处理繁琐,干扰杂质含量高,色素中残留的毒素较多,回收率低,因此红曲发酵制品中桔青霉素的检测一直是困扰世界各国发酵行业

的难题,也是科学家们潜心研究的重点。法国和荷兰的研究者用甲醇/氯仿(1+1,体积比)萃取红曲中的桔青霉素,萃取液经真空浓缩后再经甲醇溶解、脱脂处理,萃取物中色素含量很高,整个检测步骤多。日本在检测红曲液体发酵产品中的桔青霉素时,为了分离色素,先采用柱分离的方式,用甲醇+水(7+3,体积比)作洗脱剂,收集一定时间内的流出液(内含桔青霉素),再用 HPLC 配荧光检测,检测时间也较长。本研究经过对 7 种萃取剂提取结果比较,筛选出复合萃取剂(甲苯+乙酸乙酯+甲酸,7+3+1),提取过程简单,回收率高,提取时间短(1 h 以内)。此外,对 7 种流动相进行了研究,筛选出分离效果好的乙腈+水(用磷酸调 pH2.5,35+65,体积比)流动相,为成功检测桔青霉素打下了基础。

酶联免疫吸附分析法检测红曲制品中的桔青霉素在欧美一些国家得到了发展,间接酶联免疫法检测限为 0.4~0.8 μg/L。直接酶联免疫法检测限为 2~4 μg/L。目前已商业化的 ELISA 试剂盒是德国 r-Biopharm 的 RIDASCREEN FAST Citrinin 试剂盒。供应商提供的资料表明,检测限为 15 μg/kg,但荷兰联合利华公司食品研究所对该试剂盒的检测验证表明,由于功能性红曲产品色素的干扰,检测极限仅为 50 μg/kg。与此相比,本方法的检测限接近 ELISA 试剂盒。我国尚无检测红曲发酵制品中桔青霉素的任何方法,本方法各项特性指标达到国内领先,国际同等水平,填补国内空白,并于 2003 年 6 月被卫生部《保健食品检验与评价技术规范》采纳,形成政府指定的检测方法颁布供全国使用。

4.7 红曲霉不产毒菌株的筛选和培养条件对产毒的影响及评价 用所建方法对 35 株食品发酵工业用红曲霉产桔青霉素能力进行了筛选。由表 6 可见,所有实验菌株在大米培养基上均有产桔青霉素的能力,有 30 个菌株(85.71%)在液体培养基上桔青霉素产量高于方法的检测限。同一菌株在 pH 4.5、静止培养的固体培养基上产桔青霉素能力高于以谷氨酸钠为唯一氮源、葡萄糖为唯一碳源、pH 6.5、振荡培养的液体培养基,平均高 63 倍(0.45~1 464 倍)。同一菌株在固体培养基上的色素产量也高于液体培养基,为 3~509 倍,平均 93 倍。按日本规定的色价 50 单位(E 10%,1 cm,相当于中国液态发酵基质 5 个色价单位)中桔青霉素含量不得超过 0.2 mg/kg(相应的固体发酵基质为 500 色价单位,桔青霉素含量不得超过 20 mg/kg)的标准,本实验所用 SIS-14, SIS-16, SIS-22, SIS-23, SIS-28 5 个菌株在大米基质中的桔青霉素产量符合此标准,但这 5 株菌在液体培养基中的桔青霉素产量却高于限量

值。同理, SIS-29, SIS-30, SIS-31, SIS-32 4 个在液体培养基中不产桔青霉素的菌株在固体培养基中桔青霉素产量也高于限量值。此外,实验菌株中有 3 个菌株的色素产量超过国家 1985 年规定 800 色价的一级标准,但其中有 2 个菌株的桔青霉素/色价比值超过日本的规定标准。只有 1 株(编号 SIS-22)是本次实验中在固体培养基上色素产量最高(1 134 μg/g)而桔青霉素产量较低(平均 5.23 mg/kg, 3 个平行样品中的最高仅为 7.2 mg/kg),桔青霉素/色价比值在两种产毒培养基中均不超过日本标准的菌株,若将此菌株用于固体培养生产食用色素,其终产品中桔青霉素含量低于日本标准。从生产低桔青霉素或无桔青霉素的红曲产品的角度来说,重点应放在筛选低产或不产桔青霉素的菌种上。因此菌株 SIS-22 是固体发酵用的理想菌株,也是本课题筛选出的可用于食品发酵工业的安全菌株。

表 6 35 株红曲霉产桔青霉素结果

	桔青霉素 (mg/kg, mg/L) <sup>(1)</sup>		色价 (U/g, U/mL) <sup>(2)</sup>	
	红曲米	液态发酵	红曲米	液态发酵
阳性率 %	100(35/35)	85.71(30/35)	100(35/35)	91.43(32/35)
范围	0.28~2458.80	0.09~55.65	25.50~1134.00	0.11~35.33
均值	201.60	11.99	302.00	6.28
50%中位数	61.99	3.51	163.00	5.84

注:(1)为 3 个样品的平均值。(2)为于 505 nm 处测量。

4.8 产毒和非产毒食品工业用菌种的鉴别研究 完成了对食品工业常用菌株黑曲霉和赭曲霉毒素 A 产毒菌株,炭黑曲霉、米曲霉与致癌物黄曲霉毒素产毒菌株,黄曲霉和寄生曲霉在多种培养基(查氏琼脂、麦芽汁琼脂和麦芽汁-酵母膏琼脂)上培养 3、5、7、10 和 14 d,进行动态的大体形态(菌核形成情况、颜色、菌落直径、生长速度等)和显微镜下结构(孢子头大小、菌丝长度和宽度、分生孢子头大小和形状、分生孢子头的结构、产孢结构的形状和大小、分生孢子的形状、颜色和大小等)的鉴别鉴定,形成了一套标准的、图文并茂的鉴别鉴定方法,对食品加工业自检和食品卫生检验部门鉴别有害真菌具有极高的参考价值。

#### 评价

国内也有菌种鉴定方面的材料,但由于所用培养基不全面,仅从一种培养基上的菌落及显微镜下特征不能对菌株进行全面鉴定,误判率较高。本方法的建立弥补了上述方法的不足。课题组最近用所建方法纠正了两起食品工业用菌错误鉴定事件。一起是由生产厂家向我所送检的,我室用其培养物给小鼠灌胃造成 70%动物死亡,实际为米曲霉但却在当地被错误鉴定为“黑曲霉”;另一起为菌种保藏单

位误将黄曲霉当米曲霉出售给食品生产厂家,厂家送我所进行菌种毒力实验,实验前经我室鉴定为黄曲霉。该鉴别研究方法已形成送审稿拟上报卫生部。

4.9 可安全使用的食品工业用菌种名单 综合微生物学、毒理学、分析化学等研究结果,提出了可安全使用的食品工业用菌种名单报送国家食品安全控制部门。包括常用的具有悠久使用历史的食品发酵、生产食品添加剂、保健食品等食品加工和直接食用的真菌菌种(22种酵母和11种真菌)和可用于保健食品生产的益生菌菌种名单(9种细菌、11种真菌和酵母),该名单已被卫生部采纳并形成正式文件(卫法监发[2001]84号)下发,成为我国用微生物生产保健食品的评价依据。

4.10 食品工业用菌安全评价指导原则 根据既往数据、资料,结合本实验结果,提出了食品工业用菌安全评价指导原则,并已形成送审稿上报卫生部。该原则对从根本上遏制一些不法企业将新分离的条件致病菌或致病菌用于食品开发,了解菌株的使用历史、分类鉴定、耐药性、遗传稳定性、有效性,正确指导企业生产,既具有经济效益又具有社会效益。同时为目前我国用真菌生产食品、酶制剂、保健食品等企业的安全生产和政府部门的监管提供了有力的技术支持。

## 5 本研究取得的成果

5.1 到目前为止,课题组将建立的一整套系统评价食品工业生产用菌种安全性的技术文件(包括真菌类保健食品评审规定;可用于保健食品的真菌菌种名单;真菌菌种检定单位名单;益生菌类保健食品评审规定;可用于保健食品的益生菌菌种名单等)上报卫生部,已被采纳并形成正式文件(卫法监发[2001]84号)下发,成为我国用微生物生产保健食品的评价依据,同时为国家食品安全行政部门制定相关政策提供技术支撑。

5.2 红曲产品中桔青霉素的测定也被卫生部颁布的《保健食品检验与评价技术规范》收录并颁布,成为政府指定的检测方法供全国食品安全检测部门使用。

## 6 推广应用前景、存在的问题及改进意见 食品发

酵工业是国民经济发展的重要支柱,食品发酵用菌种的安全性关系到企业兴衰和广大消费者的生命安全。本研究所建立的工业用真菌菌种毒力检测技术的研究对合理地、客观地评价工业用真菌菌种的安全性,改变现有的只对菌种有毒代谢产物的毒性进行评价的片面方法提供了重要依据;所建立的检测红曲制品及红曲培养物中桔青霉素、黑曲霉代谢产物赭曲霉毒素A、米曲霉代谢产物-硝基丙酸的HPLC方法,对杜绝工业用真菌发酵终产品中有毒代谢产物的污染、保护消费者的健康、解决贸易技术壁垒中的技术瓶颈和双边贸易纠纷、保护我国贸易来往中的经济利益和在国际上的声誉意义非常,可取得直接和间接的经济效益。已经卓有成效地表现在:

6.1 提出的食品工业用菌种名单已直接用于食品加工业,同时被卫生部采纳作为保健食品评审的依据并形成正式文件(卫法监发[2001]84号),用这些菌种生产并被批准的保健食品有上百种,促进了食品加工业和国民经济的发展,产生了巨大的经济效益。

6.2 食品工业用菌安全评价指导原则与菌种名单配套使用对确保发酵食品的安全性提供了重要保障。

6.3 建立的红曲发酵制品中桔青霉素 HPLC 检测方法已于2003年6月被卫生部《保健食品检验与评价技术规范》采纳,形成官方检测方法颁布供全国使用,为评价用红曲生产保健食品的安全性提供了依据,用此方法检测的红曲制品中桔青霉素含量已成为评价审批红曲发酵产品的重要依据,产生了巨大的社会和经济效益。同时该方法已被推荐为2003~2005年国家标准项目计划中。

6.4 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所利用所建立的菌种鉴别方法已成功鉴别多起非食品工业用菌种,筛选出的不安全菌种对降低企业的经济损失可产生直接的经济效益,同时可降低因进食用有毒菌种发酵生产的食品而导致食物中毒的发病率,对减少医疗和社会负担可产生间接的经济和社会效益。

6.5 食品工业用菌的安全性评价程序和方法已被推荐为2003~2005年国家标准项目计划中。

[收稿日期:2004-02-22]

中图分类号:R15;TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2004)03-0195-06