

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241029004

引用格式: 贺燕, 周兴旺, 王晓庆, 等. 湖南特色辣酱中产毒黄曲霉的筛选鉴定及溯源研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 258–264.

HE Y, ZHOU XW, WANG XQ, *et al.* Isolation, identification and traceability research of *Aspergillus flavus* in Hunan characteristic chili sauce [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 258–264. (in Chinese with English abstract).

湖南特色辣酱中产毒黄曲霉的筛选 鉴定及溯源研究

贺燕¹, 周兴旺^{1*}, 王晓庆¹, 唐小兰¹, 袁凤君¹, 杨滔¹,
刘兰¹, 谢送来², 李政¹

(1. 湖南省产品质量检验研究院, 长沙 410007; 2. 湖南丰新农业开发有限公司, 娄底 417700)

摘要: **目的** 研究和分析湖南特色辣酱中黄曲霉毒素的含量及黄曲霉毒素污染的主要来源。**方法** 连续3年跟踪监测湖南特色辣酱企业中的原料、麦胚、半成品及成品中的黄曲霉毒素的含量。采用传统培养方法和基因测序技术对关键生产环节中的真菌进行分离和鉴定, 确定湖南特色辣酱中黄曲霉毒素的主要来源环节及菌种。**结果** 受传统工艺影响各企业辣酱产品中黄曲霉毒素含量出现不稳定的现象, 以麦胚环节黄曲霉毒素含量最高; 根霉和米曲霉可能为辣酱生长中的主要优势微生物; 从黄曲霉毒素含量高的样品中分离筛选得到了14株霉菌, 其中6株为黄曲霉。通过验证以及溯源分析得出辣酱中黄曲霉毒素含量主要来源是原料或麦胚中的黄曲霉。**结论** 湖南特色辣酱中黄曲霉毒素产生的重要环节是麦胚制作环节, 其黄曲霉毒素的主要来源是黄曲霉。因而对湖南特色辣酱中产毒黄曲霉的筛选鉴定及溯源研究, 对湖南特色辣酱质量安全控制具有重要指导意义。

关键词: 辣酱; 黄曲霉毒素; 分离和鉴定; 黄曲霉; 溯源研究

Isolation, identification and traceability research of *Aspergillus flavus* in Hunan characteristic chili sauce

HE Yan¹, ZHOU Xing-Wang^{1*}, WANG Xiao-Qing¹, TANG Xiao-Lan¹,
YUAN Feng-Jun¹, YANG Tao¹, LIU Lan¹, XIE Song-Lai², LI Zheng¹

(1. Hunan Provincial Institute of Product Quality Inspection and Research, Changsha 410007, China;
2. Hunan Fengxin Agricultural Development Co., Ltd., Loudi 417700, China)

ABSTRACT: Objective To study and analyze the content of aflatoxins in Hunan characteristic chili sauce and the main sources of aflatoxin contamination. **Methods** Content of aflatoxins in raw materials, wheat germ, semi-finished products, and finished products in Hunan characteristic chili sauce enterprises for 3 consecutive years

收稿日期: 2024-10-29

基金项目: 湖南创新型省份建设专项(2022SK2103); 湖南省自然科学基金项目(2022JJ90007, 2022JJ90029)

第一作者: 贺燕(1982—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 45023091@qq.com

*通信作者: 周兴旺(1980—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 63595979@qq.com

was tracked and monitored. Traditional cultivation methods and gene sequencing technology was used to isolate and identify fungi in key production processes, and determine the main source links and strains of aflatoxins in Hunan characteristic chili sauce. **Results** Due to the influence of traditional techniques, the content of aflatoxin in spicy sauce products of various enterprises was unstable, with the highest aflatoxin content occurring in the wheat germ stage. *Rhizopus* and *Aspergillus oryzae* may be the main dominant microorganisms in the growth of spicy sauce. The 14 strains of fungi were isolated and screened from samples with high levels of aflatoxin, of which 6 strains were *Aspergillus flavus*. Through verification and traceability analysis, it was found that the main source of aflatoxin content in spicy sauce was *Aspergillus flavus* in raw materials or wheat germ. **Conclusion** Important step in the production of aflatoxin in Hunan characteristic chili sauce is the wheat germ making process, and the main source of aflatoxin is *Aspergillus flavus*. Therefore, the isolation, identification, and traceability research of *Aspergillus flavus* in Hunan characteristic chili sauce have important guiding significance for the quality and safety control of Hunan characteristic chili sauce.

KEY WORDS: chili sauce; aflatoxin; isolation and identification; *Aspergillus flavus*; traceability research

0 引言

辣酱是湖南的一种地方特色发酵食品, 主要以小麦和本地灯笼椒或牛角椒为主要原料, 通过小麦自然接种制作曲胚, 经发酵、晒干、磨碎, 再配以水、食盐、糯米、地蚕等辅料经晒制发酵而成。该发酵成品味道鲜美, 含有丰富的蛋白质及各种微量元素, 可直接食用, 亦可作为菜肴的调味品^[1-2]。辣酱经敞开式的自然接种后形成了包含霉菌、酵母、细菌在内的丰富的微生物体系, 其中以霉菌为主, 可产生脂肪酶、蛋白酶、纤维素酶等代谢产物从而分解小麦中的淀粉、纤维素、蛋白质等物质, 继而形成辣酱特有的风味体系^[1]。

由于湖南特色辣酱多为家庭式加工, 发酵工艺独特(发酵再晒制发酵), 易引起黄曲霉毒素 B₁ 超标、胀包质量安全问题^[3]。黄曲霉毒素是一类主要由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*)、集蜂曲霉 (*Aspergillus apicalis*)、溜曲霉曲霉属 (*Aspergillus mucilaginus*) 真菌产生的有毒次生代谢物^[4], 主要在谷物、坚果、饲料、中药材、牛奶及乳制品中较为常见^[5], 是已知毒性最大的霉菌毒素^[6], 其毒性是氰化钾的 10 倍、砒霜的 68 倍^[7], 包括 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂ 等多种亚型, 其中 B₁ 是迄今发现毒性最强的真菌毒素^[8], 对人和动物可造成急性或慢性中毒, 具有致癌、致畸、致突变作用^[9-10]。

目前对于湖南特色辣酱的研究主要集中于辣酱生产工艺^[11-13]、风味^[2]、黄曲霉毒素的防控等^[14-16], 而对于湖南特色辣酱中黄曲霉毒素溯源研究甚少。作为地理性标志产品的湖南特色辣酱已成为当地农产收入的重要来源。研究湖南特色辣酱中黄曲霉毒素溯源, 可以从根本上了解导致辣酱黄曲霉毒素超标的原因, 从而对湖南特色辣酱质量安全控制、食品安全、辣酱产业发展等方面具有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

选取 6 个湖南特色辣酱生产企业或小作坊 2022—2024 年的原料、麦胚、半成品、成品。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar medium, PDA)、孟加拉红培养基、产毒培养基 (北京陆桥有限公司); 棉兰酚染色液 (化学纯, 福州飞净生物科技有限公司); DNA 提取试剂盒 (生化试剂, 北京天根生化科技有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、盐酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

MIR-254 生化培养箱 (日本松下电器有限公司); C1000 Touch 梯度聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (美国伯乐公司); LC-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); QTRAP 4500 高效液相色谱质谱三重四级杆联用仪 (美国 AB SCIEX 公司); BS224s 电子分析天平 (精度 0.1 mg, 北京赛多利斯仪器系统有限公司); CM-1000 涡旋混合器 (日本东京理化器械株式会社); Avanti JXN-26 离心机 (美国贝克曼库尔特有限公司); M64 LabTech 多通道样品浓缩仪 (北京莱伯泰科仪器股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 黄曲霉毒素测定方法

目前食品中黄曲霉毒素主要有高效液相色谱法 (high performance liquid chromatograph, HPLC)、高效液相色谱-质谱法 (high performance liquid chromatograph-mass spectrometer, HPLC-MS)、酶联免疫法等, 主要以前两种方法为主^[17]。为针对性地对湖南特色酱类食品——辣酱产黄曲霉毒素产

毒菌株进行筛选溯源研究, 收集从 2022—2024 年 6 个辣酱企业的发酵成品、半成品、原料以及曲种进行黄曲霉毒素的监测, 方法参照 GB 5009.22—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》方法检测^[18]。

1.3.2 真菌的分离及鉴定

(1) 分离培养

发酵成品或半成品、原料: 取 25.0 g 样品加入至 225 mL 无菌水后经拍打均质混匀, 稀释至合适梯度后取 1.0 mL 至无菌培养皿中, 根据实验需求加入已灭菌的孟加拉红培养基或 PDA 培养基, 于 28 °C 培养 3~5 d 后挑取菌落进行分离纯化^[19-21]。

酱胚或曲胚子(麦胚): 称取 1.0 g 样品加入至 225 mL 无菌水后经拍打均质混匀, 稀释至合适梯度后取 1.0 mL 至无菌培养皿中, 根据实验需求加入已灭菌的孟加拉红培养基或 PDA 培养基, 于 28 °C 培养 3~5 d 后挑取菌落进行分离纯化。

(2) 真菌的鉴定

菌落观察: 根据有关真菌培养基选择的研究^[22], 将分离纯化得到的菌株用接种环点接于孟加拉红或 PDA 平板上观察其菌落特征。

菌丝及孢子形态观察^[23]: 于洁净载玻片上, 滴一滴乳酸石炭酸棉蓝染色液, 用接种环挑取菌落少量菌丝孢子放入棉蓝染色液中, 盖上玻片于显微镜下观察菌株的细胞形态。

1.3.3 基因测序

(1) 基因组 DNA 提取

柱式法^[24]提取方法: 取 1.5 mL 离心管, 加入 200 μ L 预处理液, 然后加入适量纯化后的菌株样品。加入 20 μ L 蛋白酶 K, 加入 200 μ L 裂解液, 充分颠倒混匀, 于 70 °C 金属浴放置 10 min。加 200 μ L 无水乙醇, 充分颠倒混匀, 短离心以去除管盖内壁液滴。过吸附柱, 洗涤 1 次, 漂洗 2 次。吸附柱于室温放置 3~5 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的溶剂。将吸附转入一个新离心管, 向吸附柱中间位置悬空滴加 50~100 μ L 双蒸水, 室温放置 3~5 min, 12000 r/min 离心 2 min, 将溶液收集到离心管中。

(2) 聚合酶链式反应扩增

对真菌 18S 的 *ITS1*: TCCGTAGGTGAACCTGCGG 和 *ITS4*: TCCTCCGCTTATTGATATGC 进行扩增。PCR 扩增反应体系总体积为 25 μ L 具体为: 上下引物各 1.0 μ L(浓度为 10 mol/L), DNA 模板 2.0 μ L, PCR 预混液 12.5 μ L, 双蒸水 8.5 μ L。PCR 扩增条件为: 96 °C 5 min; 96 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。

(3) PCR 产物检测及纯化

3 μ L PCR 产物进行 1.0% 的琼脂糖凝胶检测, 观察条带性状。PCR 产物纯化按照磁珠纯化标准操作流程操作, 其原理主要是利用磁珠能够吸附或者释放带电荷物质, 在高盐低 pH 溶液吸附 DNA, 在低盐高 pH 溶液释放 DNA, 从而达到分离提纯 DNA 产物的目的。

(4) 测序

将纯化后的 PCR 产物送至基因测序公司进行测序。

(5) 结果比对

测序结果进行美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)-BLAST 比对。NCBI 链接: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>。

1.3.4 产毒黄曲霉的验证实验

将分离所得黄曲霉接种至煮熟的麦子中按照辣酱生产工艺进行发酵制作麦胚, 同时以不接种黄曲霉菌株麦胚的生产小试为对照, 麦胚发霉完成后, 经晒干清洗, 再晒干然后磨碎后, 按照 1.3.1 分别测定两者生产小试中的麦胚黄曲霉毒素的含量。为防止制作麦胚过程, 微生物的相互污染, 对照及验证分别选取同一环境下隔断成两个独立空间为霉胚发酵区域。

1.4 数据处理

每个测定实验重复 3 次, 采用 Excel 2003 对结果进行数据统计分析, Origin 2019b 制图。

2 结果与分析

2.1 黄曲霉毒素检测结果分析

湖南辣酱目前一般都属于传统的自然发酵, 主要以小麦为主要原料, 通过自然接种制作曲胚, 经发酵、晒干、磨碎, 再配以辣椒、食盐、水等经晒制而成。产品从制胚到成品, 历时 5 个多月, 最重要的就是晒制工艺, 以一年为生产周期。本研究对 6 个企业连续 3 年的原料、麦胚(发霉菌曲胚)、半成品、成品黄曲霉毒素检测的结果见表 1。

从表 1 数据显示: 同一企业生产的酱类产品, 黄曲霉毒素的含量不稳定, 会因生产时间不同而不同, 出现质量不稳定的现象。以 XHS、FX、JY 企业最为典型, XHS 企业在原料采购、工艺均未发生改变的 3 年里, 2022 年、2023 年里生产的酱类产品黄曲霉毒素均为未检出, 但在 2024 年麦胚黄曲霉毒素达到 223.00 μ g/kg, 成品黄曲霉毒素含量达到了 4.20 μ g/kg, 稍微低于 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》所规定的 5.0 μ g/kg 的限量标准; FX 企业在 2022 年麦胚黄曲霉毒素达到 264.00 μ g/kg, 成品黄曲霉毒素含量达到了 10.50 μ g/kg, 已超过了国家限量标准规定的 2.0 倍左右; JY 企业出现了 2022 年、2024 年产品黄曲霉略微超标的问题, ZF 和 XJ 两家企业 3 年中也出现了 1 年的产品黄曲霉毒素含量比较高的情况, 从所抽的 6 家企业来看, 唯有 XB 企业生产的辣酱连续 3 年黄曲霉毒素都处于合格范围内。黄曲霉毒素出现不稳定可能的主要原因是敞开放式自然发酵工艺, 生产过程中产品质量受原料、麦胚发酵以及气候、自然环境影响较大。对于 XB 企业连续 3 年保持产品质量稳定的主要原因为采用了接种优势菌种加自然接种的制胚方式。从连续监测的结果来看, 黄曲霉毒素指标是湖南酱类产品的一个重要风险指标, 各生产企业及监管部门需要高度重视。

表1 2022—2024年不同厂家原料、麦胚、成品、半成品黄曲霉毒素B₁检测结果(μg/kg)
Table 1 Detection results of aflatoxin B₁ for raw materials, wheat germ, finished products, semi-finished products from different manufacturers from 2022 to 2024 (μg/kg)

厂家类别	原料(小麦颗粒)			麦胚			半成品			成品		
	2022年	2023年	2024年	2022年	2023年	2024年	2022年	2023年	2024年	2022年	2023年	2024年
XHS	N.D	N.D	N.D	N.D	0.17±0.01	223.00±18.00	N.D	0.36±0.02	35.80±1.90	N.D	N.D	4.20±0.32
FX	1.48±0.11	N.D	N.D	264.00±10.00	53.90±3.50	N.D	27.40±2.20	8.32±0.51	N.D	10.50±0.70	1.52±0.09	N.D
XB	N.D	N.D	N.D	0.13±0.01	10.40±0.90	9.41±0.53	N.D	N.D	0.62±0.04	N.D	N.D	0.45±0.04
ZF	0.34±0.02	N.D	N.D	118.90±8.20	N.D	7.17±0.36	14.00±0.90	N.D	N.D	7.74±0.51	N.D	N.D
XJ	N.D	0.12±0.01	1.45±0.12	0.91±0.07	0.41±0.03	227.00±16.00	0.46±0.04	0.31±0.02	24.10±1.60	0.33±0.02	0.09±0.01	4.70±0.32
JY	N.D	N.D	0.80±0.06	117.00±9.00	5.59±0.43	252.00±13.00	15.40±0.90	2.48±0.18	15.60±0.90	5.20±0.40	0.13±0.01	5.42±0.37

注: N.D代表未检出; 厂家类别列中字母组合代表不同的企业名称。

通过对不同企业原料、麦胚、半成品和成品黄曲霉毒素的检测, 得出在酱类生产的全过程中, 原料中黄曲霉毒素含量为未检出, 个别出现检出的情况; 麦胚的黄曲霉毒素含量最高(最高可以达到 264.00 μg/kg), 据分析原因主要为麦胚发酵时, 梅雨时间长, 空气潮湿, 发霉时间过长。经发霉的麦胚经后续清洗、添加盐水、辣椒、糯米等原料, 黄曲霉毒素的含量会有一定程度的降低; 麦胚黄曲霉毒素含量高的产品, 黄曲霉毒素检出或超标的概率大。以 2022 年 FX 和 2024 年 XHS 企业为例, 麦胚分别为 264.00 μg/kg 和 223.00 μg/kg, 成品检出黄曲霉毒素的含量分别达到了 10.50 μg/kg 和 4.20 μg/kg。从表 1 看到, 尽管曲胚黄曲霉含量达到了 264.00 μg/kg, 但经过清洗麦胚、添加原料稀释后, 成品的黄曲霉毒素含量就降低到 10.50 μg/kg。综合分析, 辣酱产黄曲霉毒素的重要来源工艺过程——麦胚的制作过程, 为本研究进行黄曲霉毒素的溯源提供了研究的切入点。

2.2 真菌分离及鉴定结果

本研究主要以 PDA、孟加拉红培养基为主要测试培养基。孟加拉红培养基因添加氯霉素, 真菌菌丝生长受到抑制, 生长的菌落较在 PDA 上小。这和有关培养基对酵母和霉菌检测结果影响研究的结论一致^[3]。

2.2.1 湖南特色酱中优势菌株的分离和鉴定

重点对 6 个企业或小作坊 3 年来成品和麦胚黄曲霉毒素含量极低或未检出的麦胚按照 1.3.2 进行分离和鉴定, 发现主要有 2 种优势菌(图 1)。

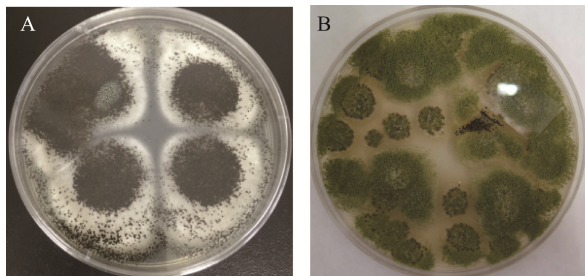


图1 辣酱中优势菌落特征

Fig.1 Characteristics of dominant bacterial colonies in chili sauce

图 1A, 菌落生长初为白色绒絮状, 生长速度快, 几天后可布满整个培养皿, 发展成熟后, 整个菌落呈深褐色, 顶部为黑色。其显微镜特征(图 2A): 菌丝呈无色透明状, 孢子囊呈球形, 无横隔, 分生孢子自顶囊全面着生, 像菊花状, 经过分子测序鉴定为根霉。图 1B, 菌落先为白色菌落, 随后菌落中间后出现黄色小点, 随后中层为黄色, 随着进一步的培养, 孢子布满整个菌丝上面, 出现黄绿或蓝绿色的菌落。在显微镜下观察, 分生孢子梗较长, 菌丝无色透明, 顶囊粗大, 近似椭圆形, 小梗着生于顶囊上部, 分生孢子呈串着生在小梗的顶端(图 2B), 参照齐组同《中国真菌志》第五卷曲霉属及其相关有性型可步鉴定属于曲霉属中的米曲霉^[25]。

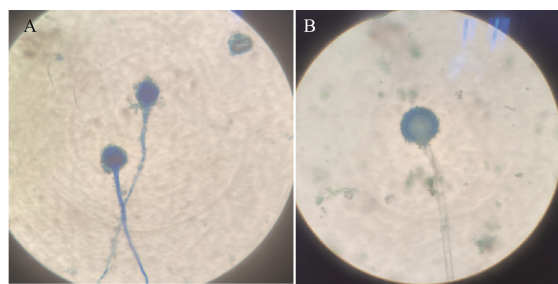


图2 2种优势菌显微特征

Fig.2 Microscopic characteristics of 2 kinds of dominant bacteria

辣酱产品主要靠前期制曲阶段的真菌生物(主要为霉菌), 产生的淀粉酶、蛋白酶、糖化酶等丰富的酶系来分解和发酵原料而形成。分离得到的两种霉菌, 根霉含有丰富的淀粉酶、酒化酶, 能产生乳酸、反丁烯二酸、琥珀酸、微量酒精及芳香的酯类物质^[26]。米曲霉是一类产蛋白酶、淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、植酸酶等复合酶的菌株^[27]。对 6 个企业或小作坊 3 年来成品和麦胚黄曲霉毒素含量极低或未检出的麦胚中都能分离筛选到以上 2 种菌, 说明根霉和米曲霉可能为辣酱生长中的主要优势微生物。

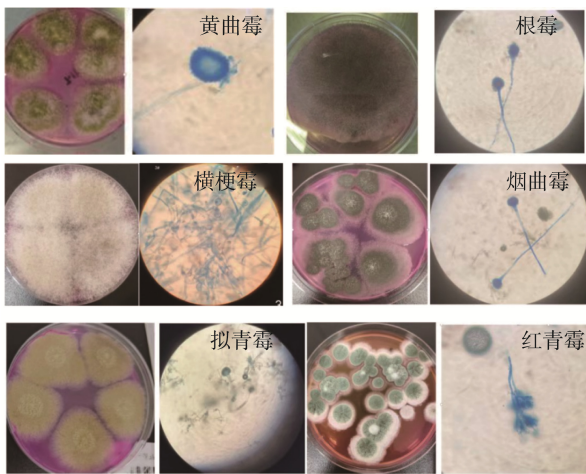
2.2.2 产毒黄曲霉的筛选鉴定

对 6 个企业或小作坊中 3 年来黄曲霉毒素含量高的原

料、麦胚、半成品、成品按照 1.3.2 的方法进行分离、鉴定,由显微形态分析及基因测序,得到了 14 株霉菌,分为曲霉属、根霉属、青霉属、横梗属 4 个属 6 个种,其中黄曲霉 6 株,根霉 2 株,拟青霉 2 株,红青霉 1 株,横梗霉 1 株,烟曲霉 1 株。其中 2#、6#、8#、9#、11#、14# 为黄曲霉菌株,分别来源于 XF 的麦子、XF 的麦胚、ZF 麦胚、JY 麦胚、XHS 的麦胚和半成品。分离得到黄曲霉菌多生长较快,结构疏松,其菌落正面色泽随其生长由白色变为黄色及黄绿色,呈半绒毛状。在显微镜下观察,可见分生孢子顶囊呈烧瓶形或近球形,分生孢子在小梗上呈链状着生,分生孢子的周围有小突起、球形。分离得到 6 种真菌菌落及显微镜形态见图 3。基因测序及 NCBI 比对结果如表 2。

2.2.3 产毒黄曲霉发育树的构建

为了解产毒黄曲霉的来源,本研究将分离鉴定为黄曲霉菌种的 2#、6#、8#、11#、9#、14#,依据测序和 BLAST 结果,构建发育树,发现此 6 株黄曲霉与黄曲霉 S7L6A (ON171640.1) 的亲源关系最近(图 4)。



注:显微镜形态图均采用 40×100 倍的显微镜倍数。

图 3 6 种真菌菌落及显微镜形态图

Fig.3 Colonies and microscopic morphology images of the 6 types of fungal

表 2 菌株分离及鉴定信息

Table 2 Isolation and identification information of bacterial strains

编号	鉴定结果	同源性/%	NCBI 比对编号
1#	曲霉属(<i>Aspergillus</i> sp)	100.00	MT645617.1
2#	黄曲霉	100.00	ON171640.1
3#	横梗霉(<i>Lichtheimia ramosa</i>)	100.00	MT487859.1
4#	拟青霉(<i>Paecilomyces</i> sp)	99.67	AB217857.1
5#	红青霉(<i>Penicillium rubens</i>)	100.00	MT558923.1
6#	黄曲霉	100.00	ON171640.1
7#	根霉(<i>Rhizopus delemar</i>)	100.00	LC514332.1
8#	黄曲霉	100.00	ON171640.1
9#	黄曲霉	100.00	MN547373.1
10#	根霉	100.00	MT620751.1
11#	黄曲霉	100.00	MN856426.1
12#	拟青霉	99.66	MW793724.
13#	烟曲霉(<i>Aspergillus fumigatus</i>)	100.00	MK834669.1
14#	黄曲霉	100.00	MN547373.1

2.3 产毒黄曲霉的验证结果

辣酱生产工艺中,发霉麦胚的制作对辣酱产品质量和口感起着决定作用。其过程实质是各种真菌微生物的繁殖、代谢的过程,是有利于辣酱风味物质形成的各种酶的产生过程^[28]。

黄曲霉毒素的来源有寄生曲霉、黄曲霉等真菌的代谢产物,寄生曲霉几乎所有的菌株可以产生毒素,而黄曲霉则只有部分菌株可以产生黄曲霉毒素^[29]。此外,米曲霉和黄曲霉在具有相似特征,采用传统方法鉴定会出现米曲霉误被鉴定为黄曲霉的情况^[30],因而对筛选分离所得的黄曲霉进行产毒验证,更能进一步确认湖南特色酱中黄曲霉毒素的来源。在验证实验的过程中,发现以接种黄曲霉的麦子,生长霉的速度比对照组快,从而形成发霉麦胚的时间过程要短。发霉麦胚形成后,经晒干清洗磨碎后,进行黄曲霉毒素含量的检测,其检测结果见表 3。

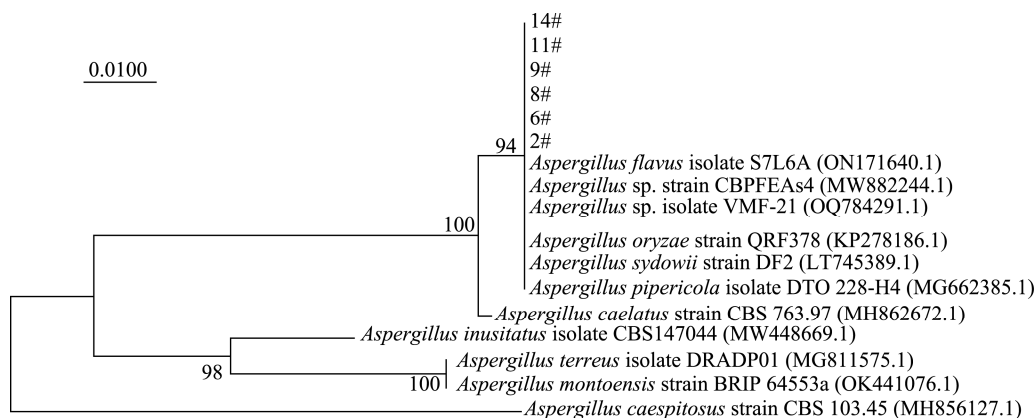


图 4 6 株黄曲霉 18S rDNA N-J 系统发育树

Fig.4 18S rDNA N-J phylogenetic tree of 6 strains of *Aspergillus flavus*

表3 验证实验中黄曲霉毒素含量测定结果表
Table 3 Results of aflatoxin content determination in validation experiments

接种黄曲霉编号	黄曲霉毒素含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
2#	702.00 \pm 19.00
6#	457.00 \pm 15.00
8#	746.00 \pm 24.00
9#	524.00 \pm 16.00
11#	312.00 \pm 17.00
14#	678.00 \pm 26.00
对照组	11.20 \pm 2.50

从表3中明显看出,接种分离所得黄曲霉菌株制作的麦胚的黄曲霉毒素含量明显高于不接种分离黄曲霉的对照组麦胚。由此验证了分离鉴定所得的黄曲霉是能产生黄曲霉毒素的真菌。

2.4 产毒黄曲霉溯源分析结果

黄曲霉是一种广泛分布的腐生好氧真菌,污染粮食及相关食品和饲料后,会产生具有强毒性的次生代谢产物—黄曲霉毒素^[31]。从黄曲霉毒素含量高的原料、麦胚、半成品、成品中分离得到了比例占43% (14株中有6株为黄曲霉)黄曲霉。经实验验证,添加该分离霉菌株后,麦胚中黄曲霉毒素的含量明显高于对照组,由此可推断出,辣酱黄曲霉毒素含量来源主要是产毒黄曲霉。

辣酱前期原料主要是小麦,而南方小麦的收割季节通常为5月份,正值梅雨季节,易滋生霉,这是能在原料中能检出黄曲霉毒素的一个重要原因。滋生霉的小麦再用于麦胚的制作,自然感染黄曲霉的几率就更大,产生黄曲霉毒素的可能性也大。另一方面,辣酱麦胚的制作期间一般为端午节过后,多为多雨天气,环境空气潮湿,温度为25℃左右,易于霉菌的生长。据生产企业多年经验发现,若发霉期间持续下雨过长,产品的黄曲霉毒素会明显偏高。同时,麦胚制作为自然接种发酵,霉胚室环境直接影响麦胚的质量。从2.2.2鉴定结果来看,分离所得黄曲霉主要集中于原料和麦胚,其中又以麦胚产生的几率最大。所以可以进一步推断辣酱黄曲霉毒素含量来源主要是原料和麦胚。此两个环节是辣酱生产工艺中需要重点关注的风险控制点。

3 结论

经对2022—2024年3年6个辣酱企业或小作坊产品的黄曲霉毒素含量的监测得出,受传统工艺影响各企业辣酱产品中黄曲霉毒素含量出现不稳定的现象,以麦胚环节黄曲霉毒素含量最高。根霉和米曲霉可能为辣酱生长中的主要优势微生物。从黄曲霉毒素含量高的原料、麦胚、半成品、成品中分离经显微分析和基因测序鉴定,得到了14

株霉菌,其中6株为黄曲霉,通过产毒黄曲霉的验证实验以及溯源分析辣酱黄曲霉毒素含量来源主要是原料或麦胚中的黄曲霉。辣酱生产企业应注意麦胚制作的曲房环境条件,在制曲和发酵过程中控制好温度和湿度,促进优势霉菌的生长,防止其他杂菌的滋生,同时严把原料关,以防止黄曲霉毒的污染。

参考文献

- [1] 尹含靓,刘洋,蒋立文,等.不同厂家永丰辣酱麦曲中真菌群落结构及其理化性质[J].食品与发酵工业,2023,49(7):112–117.
YIN HL, LIU Y, JIANG LW, et al. The structure of fungal communities and their physicochemical properties in Yongfeng spicy sauce wheat koji from different manufacturers [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(7): 112–117.
- [2] 丁诗瑶,王晶晶,王蓉蓉,等.永丰辣酱挥发性风味物质分析[J].中国调味品,2020,45(6):142–147.
DING SY, WANG JJ, WANG RR, et al. Analysis of volatile flavor substances in Yongfeng spicy sauce [J]. China Condiment, 2020, 45(6): 142–147.
- [3] 贺燕.湖南酱类中主要微生物的研究及黄曲霉毒素B₁的监测[J].农产品加工,2019,475(3):56–60.
HE Y. Research on the main microorganisms in Hunan sauce and monitoring of aflatoxin B₁ [J]. Farm Products Processing, 2019, 475(3): 56–60.
- [4] 邢福国,李旭,张晨曦.黄曲霉毒素的产生机制及污染防控策略[J].食品科学技术学报,2021,39(1):13–26,64.
XING FG, LI X, ZHANG CX. Production mechanism of aflatoxin and pollution control strategies [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(1): 13–26, 64.
- [5] NAZHAND A, DURAZZO A, LUCARINI M, et al. Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds [J]. Foods, 2020, 9(5): 644.
- [6] SCHAMANN A, SCHMIDT-HEYDT M, GEISEN R, et al. Formation of B and M-group aflatoxins and precursors by *Aspergillus flavus* on maize and its implication for food safety [J]. Mycotoxin Research, 2022, 38(2): 79–92.
- [7] 魏娜,张飞龙.西藏高原粮油作物曲霉菌污染及菌株产毒力研究[J].中国粮油学报,2024,39(2):31–37.
WEI N, ZHANG FL. Study on *Aspergillus* contamination of grain and oil crops in Tibet Plateau and its virulence [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2024, 39(2): 31–37.
- [8] PAULETTO M, TOLOSI R, GIANTIN M, et al. Insights into aflatoxins B₁ toxicity in cattle: An *in vitro* whole-transcriptomic approach [J]. Toxins, 2020, 12(7): 429.
- [9] 闫兆凤.中国主粮中真菌毒素污染现状[J].卫生研究,2022,51(4):7–12.
YAN ZF. Mycotoxin pollution in staple grains in China [J]. Journal of Hygiene Research, 2022, 51(4): 7–12.
- [10] 赵晓野,王儒,王婷,等.黄曲霉毒素的危害及检测方法研究进展[J].食品安全导刊,2022(3):155–158.
ZHAO XY, WANG R, WANG T, et al. Research progress on hazards and detection methods of aflatoxin [J]. China Food Safety Magazine, 2022(3):

- 155–158.
- [11] 朱皓. 双峰永丰辣酱传统制作工艺与发展研究[D]. 南宁: 广西民族大学, 2016.
- ZHU H. Research on the traditional processing technology and development of Shuangfeng Yongfeng chili sauce [D]. Nanning: Guangxi University for Nationalities, 2016.
- [12] 苏东林, 张忠刚, 谭欢, 等. 永丰辣酱人工接种双菌种制曲工艺的优化研究[J]. 食品工业科技, 2009(6): 159–163.
- SU DL, ZHANG ZG, TAN H, *et al.* Optimization of koji making process of Yongfeng chili sauce by artificial inoculation with two strains [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009(6): 159–163.
- [13] 苏东林, 张忠刚, 陈亮, 等. 永丰辣酱自然发酵过程中主要优势菌及化学成分的动态变化分析[J]. 食品科学, 2009(17): 212–216.
- SU DL, ZHANG ZG, CHEN L, *et al.* Dynamic changes of main dominant bacteria and chemical components during natural fermentation of Yongfeng chili sauce [J]. Food Science, 2009(17): 212–216.
- [14] 刘嘉欣, 陶越攀, 周兴旺, 等. 薄荷精油对黄曲霉生长的抑制作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(24): 152–158.
- LIU JX, TAO YP, ZHOU XW, *et al.* Inhibitory effect of peppermint essential oil on the growth of *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(24): 152–158.
- [15] 陶越攀, 刘嘉欣, 周兴旺, 等. 降解黄曲霉毒素 B1 菌株的筛选鉴定及降解条件优化[J]. 北京农学院学报, 2024, 39(2): 79–84.
- TAO YP, LIU JX, ZHOU XW, *et al.* Screening and identification of aflatoxin B1 degrading strain and optimization of degradation conditions [J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2024, 39(2): 79–84.
- [16] 卫梦绮. 桔萜醛对黄曲霉生长的抑制作用及机理初探[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019.
- WEI MQ. The inhibitory activity and preliminary mechanism of cuminaldehyde on the growth of *Aspergillus flavus* [D]. Xi'an: Shanxi University of Science and Technology, 2019.
- [17] 罗绣, 孙震晓. 黄曲霉毒素检测方法的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2024, 36(5): 78–83.
- LUO X, SUN ZX. Research progress of aflatoxin detection methods [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2024, 36(5): 78–83.
- [18] 王亮亮, 唐小兰, 周兴旺, 等. 湖南发酵酱中黄曲霉毒素的污染与控制研究[J]. 中国食品, 2018(23): 417–420.
- WANG LL, TANG XL, ZHOU XW, *et al.* Study on the pollution and control of aflatoxin in Hunan fermented sauce [J]. China Food, 2018(23): 417–420.
- [19] 杨生瑞, 屈凌波, 孙长坡, 等. 黄曲霉菌株的分离、鉴定及产毒能力分析[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(6): 110–114, 123.
- YANG SR, QU LB, SUN CP, *et al.* Isolation, identification and toxin producing ability analysis of *Aspergillus flavus* strains [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2012, 27(6): 110–114, 123.
- [20] 罗惠波, 杨晓东, 李丹宇, 等. 中高温大曲中黄曲霉的分离鉴定及其安全性初步研究[J]. 酿酒科技, 2012(12): 37–40.
- LUO HB, YANG XD, LI DN, *et al.* Isolation and identification of *Aspergillus flavus* from medium high temperature Daqu and preliminary study on its safety [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2012(12): 37–40.
- [21] 赵亚荣, 郑锦锦, 陈佩榕, 等. 仓储稻米中产柄曲霉毒素菌的分离鉴定及其产毒条件研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(5): 211–216.
- ZHAO YR, ZHENG JJ, CHEN PR, *et al.* Isolation, identification and toxin producing conditions of *Aspergillus stipulans* from stored rice [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(5): 211–216.
- [22] 刘俊英, 许文博, 田沛. 分离自羊茅属植物的内生真菌菌株在不同培养基上生长速度的多样性[J]. 草业科学, 2024(3): 42–48.
- LIU JY, XU WB, TIAN P. Diversity of growth rates of endophytic fungal strains isolated from *Festuca* plants on different media [J]. Pratacultural Science, 2024(3): 42–48.
- [23] 周宇, 黄在兴, 鲍兴禄, 等. 姬松茸菌褶、担孢子及菌丝体微观形态观察[J]. 热带作物学报, 2022, 43(12): 52–58.
- ZHOU Y, HUANG ZX, BAO XL, *et al.* Observation on the microscopic morphology of gill, basidiospore and mycelium of *Agaricus blazei* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(12): 52–58.
- [24] 张婉. 黄曲霉毒素 B1 降解菌的筛选及降解机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- ZHANG W. Screening and degradation mechanism of aflatoxin B1 degrading bacteria [D]. Changchun: Jilin University, 2023.
- [25] 朱媛媛, 刘晔, 冯纬, 等. 豆酱发酵用工业米曲霉菌种的复壮[J]. 中国调味品, 2016, 41(3): 1–5.
- ZHU YY, LIU Y, FENG W, *et al.* Rejuvenation of industrial *Aspergillus oryzae* for soybean paste fermentation [J]. China Condiment, 2016, 41(3): 1–5.
- [26] 姜越君. 低盐风味麦辣酱发酵技术研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011.
- JIANG YJ. Study on fermentation technology of low salt flavor spicy sauce [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2011.
- [27] 朱磊. 酱油酿造中米曲霉酶系的影响[J]. 食品安全导刊, 2016(Z2): 84–90.
- ZHU L. Effect of *Aspergillus oryzae* enzyme system on soy sauce brewing [J]. China Food Safety Magazine, 2016(Z2): 84–90.
- [28] 魏艳丽, 鲁绯. 中国传统发酵酱的演变[J]. 中国酿造, 2019, 38(2): 77–81.
- WEI YL, LU F. Evolution of Chinese traditional fermented sauce [J]. China Brewing, 2019, 38(2): 77–81.
- [29] 张初署. 中国不同生态区花生土壤中黄曲霉菌分布、产毒特征及遗传多样性研究[C]. 武汉: 中国菌物学会, 2016.
- ZHANG CS. Distribution, toxigenic characteristics and genetic diversity of *Aspergillus flavus* in peanut soils from different ecological regions in China [C]. Wuhan: Chinese Mycological Society, 2016.
- [30] 白飞荣, 姚粟, 凌空, 等. 黄曲霉和米曲霉的多相鉴定方法[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 215–226.
- BAI FR, YAO S, LING K, *et al.* Multiphase identification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* [J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 215–226.
- [31] 王明清, 沈文凤, 穆树旗, 等. 一株降解黄曲霉毒素 B1、拮抗黄曲霉的菌株鉴定及应用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(18): 231–238.
- WANG MQ, SHEN WF, MU SQ, *et al.* Identification and application of a strain degrading aflatoxin B1 and antagonizing *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(18): 231–238.

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)