

Читать
онлайн
Read
online

Минаева Л.П., Евсюкова А.Д., Маркова Ю.М., Полянина А.С., Быкова И.Б.,
Стеценко В.В., Чалый З.А., Ефимочкина Н.Р., Шевелева С.А.

Оценка загрязнённости кофе, какао и какао-продуктов плесневыми грибами – потенциальными продуцентами микотоксинов

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Москва, Россия

Введение. Напитки и продукты на основе кофе и какао входят в число базовых продуктов потребительской корзины. В микофлоре сырья кофе и какао могут присутствовать микотоксиногенные плесневые грибы тропических и субтропических регионов. Это обуславливает опасность загрязнения микотоксинами (МТ) готовой продукции и необходимость углублённого изучения потенциальных продуцентов МТ.

Материалы и методы. Микробная контаминация образцов кофе, какао-бобов и какао-продуктов (Московский регион) изучалась культуральными методами. Токсинообразование моноспорных изолятов плесневых грибов в условиях *in vitro* определяли в культуральном субстрате методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (УВЭЖХ-МС/МС) в формате мультидетекции (18 МТ).

Результаты. Все исследованные образцы характеризовались низкой микробной загрязнённостью. В поверхностной микофлоре доминировали виды *Aspergillus* секции *Nigri*. Изучена контаминация внутренней микофлоры зёрен зелёного кофе плесенью. Заражённость составляла 70–100%, преимущественно *Aspergillus* spp.; выделено 48 МСИ: 60% – виды *Aspergillus* секции *Nigri*, 12,5% – *Aspergillus* секции *Flavi* и 27% – *Aspergillus* spp. В условиях *in vitro* у 50% МСИ выявлено образование опасных МТ, максимальное количество достигало (мг/кг субстрата): фумонизин В2 – 24 (*A. niger*), охратоксин А – 518 (*Aspergillus* секции *Nigri*), афлатоксин В1 – 27,9 и афлатоксин – 1,44 (*A. flavus*), стеригматоцистин – более 380 (*A. parasiticus*).

Ограничения исследования. В рамках исследования видовая принадлежность МСИ проведена микологическими методами без применения ПЦР-анализа. Это станет предметом дальнейших исследований.

Заключение. Показано доминирование *Aspergillus* spp. в поверхностной микофлоре готовой продукции и внутренней микофлоре необработанного сырья и высокие уровни образования опасных МТ штаммами *Aspergillus* spp. из зёрен зелёного кофе. Наличие потенциального риска загрязнения данных видов пищевой продукции МТ обуславливает необходимость мониторинга её контаминации плесенью – продуцентами МТ. Наличие токсигенной активности плесневых грибов из зелёного кофе показано в России впервые.

Ключевые слова: кофе; какао; плесневые грибы; *Aspergillus* spp.; продуценты микотоксинов; фумонизин В2; афлатоксины; охратоксин А; стеригматоцистин; эмерджентные микотоксины; УВЭЖХ-МС/МС

Соблюдение этических стандартов: исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Для цитирования: Минаева Л.П., Евсюкова А.Д., Маркова Ю.М., Полянина А.С., Быкова И.Б., Стеценко В.В., Чалый З.А., Ефимочкина Н.Р., Шевелева С.А. Оценка загрязнённости кофе, какао и какао-продуктов плесневыми грибами – потенциальными продуцентами микотоксинов. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(4): 418-424. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-4-418-424>

Для корреспонденции: Минаева Людмила Павловна, канд. техн. наук, ст. науч. сотр. лаб. биобезопасности и анализа нутримикробиома ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, Москва. E-mail: liuminaeva-ion@mail.ru

Участие авторов: Минаева Л.П. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка результатов токсинообразования и фенотипической идентификации плесневых грибов; написание текста, редактирование, ответственность за целостность всех частей статьи; Евсюкова А.Д. – сбор и обработка результатов фенотипической идентификации плесневых грибов; Маркова Ю.М., Полянина А.С., Быкова И.Б., Стеценко В.В., Ефимочкина Н.Р. – сбор и обработка результатов микробиологических исследований; Чалый З.А. – сбор и обработка результатов УВЭЖХ-МС/МС исследований; Шевелева С.А. – согласование концепции исследования, редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 18-16-00077-П) «Эмерджентные микотоксины в пищевых продуктах растительного происхождения: разработка методов анализа, изучение контаминации, видовая характеристика микромицетов-продуцентов, разработка гигиенических нормативов».

Поступила: 30.11.2021 / Принята к печати: 12.04.2022 / Опубликована: 30.04.2022

Lyudmila P. Minaeva, Alena D. Evsjukova, Yulia M. Markova, Anna S. Polyanina, Irina B. Bykova,
Valentina V. Stetsenko, Zakhar A. Chalyy, Natalia R. Efimochkina, Svetlana A. Sheveleva

Assessment of contamination of coffee, cocoa and cocoa products, marketed in Russian, with mold fungi – potential producers of mycotoxins

Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, 109240, Russian Federation

Introduction. Beverages and products based on coffee and cocoa are included in the basic products in the consumer basket. The mycoflora of coffee and cocoa raw materials may contain mycotoxigenic molds from tropical and subtropical regions. This causes the hazard of contamination of finished products with mycotoxins (MT) and the need for in-depth study of potential MT producers.

Materials and methods. Microbial contamination of samples of coffee, cocoa beans and cocoa products (retail chain of the Moscow region) was studied by cultural methods. Toxin formation of single-spore isolates (SSI) of molds under *in vitro* conditions was determined in the culture substrate by the UHPLC-MS/MS method in the multidetection format (18 MT).

Results. All samples examined were characterized by low microbial contamination. The surface mycoflora was dominated by *Aspergillus* species of the section *Nigri*. The contamination of the internal microflora of green coffee beans with molds was studied. Infection was 70–100%, mainly *Aspergillus* spp.; 48 SSI were isolated: 60% – *Aspergillus* species of the *Nigri* section, 12.5% – *Aspergillus* of the *Flavi* section and 27% – *Aspergillus* spp. Under *in vitro* conditions, the formation of

dangerous MTs was detected in 50% of SSI, the maximum amount reached (mg/kg of substrate): fumonisin B2 – 24.0 (*A. niger*), ochratoxin A – 518.0 (*Aspergillus section Nigri*), aflatoxin B1 – 27.9 and aflatoxin B2 – 1.44 (*A. flavus*), sterigmatocystin – more than 380.0 (*A. parasiticus*).

Limitations. Within the framework of the study, the species affiliation of MSIs was carried out by mycological methods without the use of PCR analysis, which will be the subject of further research.

Conclusion. *Aspergillus* spp. were shown to dominate in the surface mycoflora of finished food products and the internal mycoflora of unprocessed raw materials. There has been established the ability of strains of *Aspergillus* sp. from the internal microflora of green coffee to the formation of high levels of hazardous MTs. The presence of potential risk of MT contamination of these types of food products necessitates monitoring their contamination with MT-producing molds. The presence of toxigenic activity in molds isolated from green coffee has been shown in Russia for the first time.

Keywords: coffee; cocoa; mold fungi; *Aspergillus* sp.; producers of mycotoxins; fumonisin B2; aflatoxins; ochratoxin A; sterigmatocystin; emergent mycotoxins; UHPLC-MS/MS

Compliance with ethical standards. The study does not require an opinion from a biomedical ethics committee or other documents.

For citation: Minaeva L.P., Evsjukova A.D., Markova Yu.M., Polyana A.S., Bykova I.B., Stetsenko V.V., Chalyy Z.A., Efimochkina N.R., Sheveleva S.A. Assessment of contamination of coffee, cocoa and cocoa products marketed in Russian, with mold fungi – potential producers of mycotoxins. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(4): 418-424. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-4-418-424> (In Russian)

For correspondence: Luydmila P. Minaeva, PhD Technical Sciences, Senior researcher of the Laboratory of biosafety and nutrimicrobiome analysis, Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, 109240, Russian Federation. E-mail: liuminaeva-ion@mail.ru

Information about authors:

Minaeva L.P., https://orcid.org/0000-0003-1853-5735	Evsjukova A.D., https://orcid.org/0000-0001-6835-3644
Markova Yu.M., https://orcid.org/0000-0002-2766-7716	Bykova I.B., https://orcid.org/0000-0001-7288-312X
Stetsenko V.V., https://orcid.org/0000-0001-6470-171X	Chalyy Z.A., https://orcid.org/0000-0002-9371-8163
Efimochkina N.R., https://orcid.org/0000-0002-9071-0326	Sheveleva S.A., https://orcid.org/0000-0001-5647-9709

Contribution: Minaeva L.P. – concept and design of the study, collection and processing of the results of toxin formation and phenotypic identification of molds, writing and editing of the manuscript, responsibility for the integrity of all parts of the article; Evsjukova A.D. – collection and processing of the results of phenotypic identification of molds; Markova Yu.M., Polyana A.S., Bykova I.B., Stetsenko V.V., Efimochkina N.R. – collection and processing of material of microbiological studies; Chalyy Z.A. – collection and processing of material UHPLC-MS/MS research results; Sheveleva S.A. – agreement of the research concept, editing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 18-16-00077-P) “Emergent mycotoxins in food products of plant origin: development of methods of analysis, study of contamination, species characteristics of micromycetes-producers, development of hygienic standards.”

Received: November 30, 2021 / Accepted: April 12, 2022 / Published: April 30, 2022

Введение

Напитки и продукты на основе кофе и какао входят в состав ежедневных рационов большинства населения. Наряду с чаем кофе является одним из базовых продуктов потребительской корзины, какао в виде напитков и кондитерских изделий входит в рацион взрослого и детского населения. В последнее время в качестве заменителя какао и в производстве диетических безглютеновых продуктов используется порошок кэрб, получаемый из плодов рожкового дерева, – новый вид пищевого продукта на российском рынке и пока недостаточно изученный. Российская Федерация импортирует кофе, какао и какао-продукты как в виде сырья, так и в переработанном. Доля сырья для кофе (зелёный кофе) составляет около 85% от ввозимого объёма, для какао-продуктов (какао-бобы) – около 35% [1, 2], что обуславливает риски микробной контаминации на этапах транспортировки и хранения необработанного сырья.

В технологии производства кофе и какао наиболее важным с точки зрения безопасности является этап сушки и ферментации собранных плодов в естественных климатических условиях за счёт собственной микрофлоры, включающей в том числе плесневые грибы – потенциальные продуценты микотоксинов (МТ). К основным источниками афлатоксинов (АФЛ) в кофе относятся виды *Aspergillus* секции *Flavi* (*A. flavus*, *A. parasiticus*), охратоксинов – виды *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* и *A. steynii*, а также виды *Aspergillus* секции *Nigri*, способные к образованию как фумонизина В2 (*A. niger*, *A. welwitschiae*), так и охратоксин А (ОТА) (*A. carbonarius*) [3]. При ферментации какао-бобов *Penicillium citrinum* и *A. fumigatus* являются основными видами, предопределяющими пейзаж грибковой экосистемы [4]. Чрезмерное развитие в микофлоре этих и других видов *Penicillium* spp. и *Aspergillus* spp. может приводить к накоплению афлатоксинов и охратоксина А в обработанных какао-бобах и их конечных продуктах, которые в процессе переработки остаются в обезжиренной твёрдой фракции какао (порошке) и становятся дополнительным источником ОТА и АФЛ в рационе [5].

Проблема контаминации кофе опасным ОТА побудила Научный комитет Европейской комиссии по пищевым продуктам провести оценку риска и признать необходимость контроля ОТА в такой продукции. Было отмечено, что кофе и какао входят в группу продуктов питания, являющихся основными источниками поступления ОТА в организм человека с пищей [6].

Для разработки надёжных подходов к снижению негативного воздействия МТ и эмергентных микотоксинов (ЭМТ) на организм человека, включая обоснование гигиенических критериев безопасности, внедрение новых технологий защиты пищевой продукции от загрязнения и эффективный лабораторный контроль, необходимо углублённое изучение поражающих растительную продукцию плесеней, являющихся потенциальными продуцентами МТ, и их токсигенных свойств.

В связи с изложенным задачей настоящего исследования было изучение характера и уровней загрязнённости кофе, какао и кэрба потенциально токсигенными плесневыми грибами с определением видовой принадлежности выделенных штаммов и оценка способности продуцировать МТ и ЭМТ в модельных условиях.

Материалы и методы

Исследовано 56 образцов, полученных из розничной сети Московского региона: 32 образца кофе (20 – зелёный, 12 – обжаренный), 10 образцов какао (4 – какао-бобы сырые, 4 – обжаренные), 10 образцов какао-порошка, 2 образца какаосодержащих продуктов и 4 – кэрба. Происхождение образцов по регионам и странам представлено в табл. 1.

Микробиологический анализ. Микологический посев проводили по ГОСТ 10444.12-2013¹, количество мезофильных

¹ ГОСТ 10444.12-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчёта количества дрожжей и плесневых грибов [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200107308> (дата обращения: 16.09.2020 г.).

Таблица 1 / Table 1

Происхождение образцов
Origin of samples

Вид продукции Product type	Регион, страна происхождения Region, country of origin – number of samples	Число образцов Number of samples
Кофе зелёный (зерно) Green coffee (grain)	<i>Центральная Америка:</i> <i>Central America:</i>	
	Куба / Cuba	1
	Гватемала / Guatemala	1
	Гондурас / Honduras	1
	<i>Южная Америка: / South America:</i>	
	Бразилия / Brazil	6
	Колумбия / Colombia	2
	Африка / Africa	
	Уганда / Uganda	2
	Кения / Kenya	1
	Эфиопия / Ethiopia	1
	<i>Юго-Восточная Азия: / South East Asia:</i>	
	Индия / India	2
	Танзания / Tanzania	1
Вьетнам / Vietnam	1	
Лаос / Laos	1	
Кофе обжаренный Roasted coffee	<i>Юго-Восточная Азия: / South East Asia:</i>	
	Индонезия / Indonesia	2
	<i>Европа: / Europa:</i>	
Кипр / Cyprus	1	
Нет данных / No data	9	
Какао-бобы сырые Raw cocoa beans	<i>Африка: / Africa:</i>	
	Кот-д'Ивуар / Cote d'Ivoire	1
	<i>Южная Америка: / South America:</i>	
Эквадор / Ecuador	1	
Нет данных / No data	2	
Какао-бобы обжаренные Roasted cocoa beans	<i>Юго-Восточная Азия: / South East Asia:</i>	
	Индонезия / Indonesia	1
	<i>Южная Америка: / South America:</i>	
Колумбия / Colombia	1	
Нет данных / No data	4	
Какао-порошок Cocoa powder	<i>Африка: / Africa:</i>	
	Гана / Ghana	1
	<i>Юго-Восточная Азия: / South East Asia:</i>	
	Индонезия / Indonesia	1
Нет данных / No data	8	
Какаосодержащие продукты Cocoa products	Нет данных No data	2
	<i>Европа: / Europa:</i>	
Кэроб Carob	Испания / Spain	3
	Нет данных / No data	1

аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) определяли по ГОСТ 10444.15-94².

Фенотипическая идентификация грибных моноспоровых изолятов (МСИ) была проведена классическими микологическими методами в соответствии с рекомендациями Chen A.J. и соавт., Samson R.A. и соавт. [7, 8]. Культуральные свойства и макроморфологические характеристики определяли в процессе роста на диагностических питательных средах (CYA, CYAS, и CREA) при температуре 15; 24; 36 и 40 °C в соответствии с методиками Samson и соавт. и Díaz G.V. и соавт. [8, 9]. Микроморфологические характеристики (размер и форму конидий) оценивали при микроскопировании. Таксономическую идентификацию проводили по фенотипическим характеристикам в соответствии с Samson и соавт. [8, 10], для морфологически схожих видов указывали принадлежность к секции видов.

Изучение внутренней микрофлоры зелёного кофе проводили как при микологическом анализе зерна – посевом цельных зёрен на стерильную питательную среду [11]. Выросшие непосредственно из кофейных зёрен плесневые грибы отсеивали, затем выполняли поэтапную расчистку до получения МСИ, используемых в дальнейших исследованиях.

Исследование токсинообразования в условиях in vitro проводили на модельных средах: картофельно-сахарозном агаре (КСА/PDA) и зерне риса с относительной влажностью 35% [10, 12]. Условия культивирования исследуемых продуцентов и последующую экстракцию МТ из субстратного мицелия осуществляли в соответствии с разработанной ранее методикой [13]. Стандартное отклонение для трёх повторностей (посевов на питательные среды) при анализе микотоксинов в экстрактах из субстратного мицелия составляло 7,4%, получено с использованием программного обеспечения Office Excel (Microsoft, США).

Определение 18 микотоксинов: AFL (афлатоксины B1, B2, G1 и G2), 3- и 15-ацетил дезоксиниваленол (3- и 15-AcDON), боверицин (BEA), дезоксиниваленол (DON), ОТА, стригматоцистин (STC), Т-2 токсин (Т-2), НТ-2 токсин (НТ-2), Т-2 триол (Т-2 triol), фумонизины B1 и B2 (FB1, FB2), энниатины А, В (ENN А, В), микофеноловая кислота МФК (MFA) проводили методом УВЭЖХ-МС/МС в режиме мультидетекции по разработанной ранее методике [14]. Для исключения влияния матрикса и получения ложноположительных результатов стандарты МТ разводили в экстрактах соответствующих питательных сред.

Результаты

Изучение микробной контаминации кофе, какао, какао-продуктов и кэроба. Согласно требованиям технического регламента «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011)³, в ЕАЭС в отношении плесневых грибов и общей микробной загрязнённости установлены следующие требования безопасности: для кофе количество плесеней – не более 500 КОЕ/г, КМАФАнМ не нормируется; для какао-порошка количество плесеней – не более 100 КОЕ/г, КМАФАнМ – не более $1 \cdot 10^5$ КОЕ/г; для какаосодержащих продуктов (по шоколаду с добавками) плесени – не более 100 КОЕ/г, КМАФАнМ – не более $5 \cdot 10^4$ КОЕ/г.

Результаты микробиологических исследований образцов, распределённые по уровням загрязнения, представлены в табл. 2. По содержанию плесневых грибов только в 2 образцах из 56 исследованных проб (3,6%) было выяв-

² ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200022648> (дата обращения: 16.09.2020 г.).

³ ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции: технический регламент Таможенного союза / утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 года № 880 (с изменениями на 08.08.2019 г.). [Электронный ресурс]. КОДЕКС: электронный фонд правовой и нормативно-технической документации. URL: <https://docs.cntd.ru/document/902320560> (дата обращения: 07.11.2021).

Таблица 2 / Table 2

Распределение образцов кофе, какао, какао-продуктов и кэроба по уровням микробной загрязнённости

Distribution of coffee, cocoa, cocoa products and carob samples by microbial contamination levels

Показатель, КОЕ/г Indicators, CFU/g	Кофе / coffee		Какао-бобы / Cocoa beans		Какао порошок Cocoa powder n = 10	Какаосодержащие продукты* Cocoa products* n = 2	Кэроб Carob n = 4
	зелёный Green n = 20	обжаренный Roasted n = 12	сырые Raw n = 4	обжаренные Roasted n = 6			
<i>Плесени / Mold</i>							
Норматив / Normalized value of the indicator	< 500	–	–	–	< 100	< 100	–
Среднее / Average	1.1 · 10 ³	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	5
Диапазоны значений Range of values	< 5 ... 2.1 · 10 ⁴	< 5 ... 10 ¹	< 5	< 5 ... 4 · 10 ¹	< 5 ... 2.7 · 10 ¹	< 5	< 5 ... 10
Уровень загрязнения Contamination levels	Число образцов по уровням загрязнённости Number of samples by contamination levels						
< 5	6	10	4	5	9	2	2
5–100	11	2	0	1	1	0	2
> 100 ... 500	1	0	0	0	0	0	0
> 500	2	0	0	0	0	0	0
<i>Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) Total Mesophilic Aerobic end Facultative Anaerobic Microbial Count (TMAFaMC)</i>							
Норматив / Normalized value of the indicator	–	–	–	–	10 ⁵	5 · 10 ⁴	–
Среднее / Average	4.9 · 10 ⁴	< 15	4.2 · 10 ⁴	3.3 · 10 ⁵	1.3 · 10 ⁴	5.5 · 10 ⁴	2.6 · 10 ³
Диапазоны значений Range of values	< 15 ... 9.1 · 10 ⁵	< 15 ... 5 · 10 ²	3.2 · 10 ³ ... 1.5 · 10 ³	< 15 ... 2 · 10 ⁶	< 15 ... 1.3 · 10 ⁵	< 15 ... 1.1 · 10 ⁵	< 15 ... 7.2 · 10 ²
Уровень загрязнения Contamination levels	Число образцов по уровням загрязнённости Number of samples by contamination levels						
< 15	5	11	0	3	4	1	1
15 ... 5 · 10 ⁴	14	1	2	2	5	0	3
> 5 · 10 ⁴	1	0	1	1	1	1	0

Пр и м е ч а н и е. * – для образцов какаосодержащей продукции (посыпка шоколадная и какао-бобы в шоколаде) показатель КМАФАнМ принят как для шоколада и шоколада с добавками.

Note. * – for samples of cocoa-containing products (chocolate sprinkles and cocoa beans in chocolate), the TMAFaMC indicator is applied, the same as for chocolate and chocolate with additives.

лено количество, превышающее установленный норматив: в зелёном кофе из Бразилии – 2,1 · 10⁴ КОЕ/г и из Кении – 1,5 · 10³ КОЕ/г. По показателю КМАФАнМ установленным нормативам не соответствовали: один образец какао-порошка (1,3 · 10⁵ КОЕ/г) и один образец какаосодержащего продукта (какао-бобы в шоколаде – 1,1 · 10⁵ КОЕ/г). В продуктах, для которых этот норматив не установлен, высокие уровни КМАФАнМ были выявлены в зелёном кофе из Уганды – 9,1 · 10⁵ КОЕ/г, в сырых какао-бобах – 1,5 · 10⁵ КОЕ/г и в обжаренных какао-бобах тёртых – 2 · 10⁶ КОЕ/г (см. табл. 2). В 51 образце (91%) общая микробная загрязнённость не превышала 5 · 10⁴ КОЕ/г.

Наибольшая частота обнаружения плесеней (55%) была в зелёном кофе – в 11 из 20 образцов на уровне от 5 до 100 КОЕ/г. Остальные виды продуктов были преимущественно чистыми, и лишь отдельные образцы имели такой же уровень загрязнённости.

Уровни *бактериальной контаминации* образцов характеризуют общее гигиеническое состояние производства и конечной продукции. По показателю КМАФАнМ в зелёном кофе также была выявлена наиболее высокая частота загрязнённости образцов – 70%, в 14 образцах содержалось от 15 до 5 · 10⁴ КОЕ/г. Такой же уровень был выявлен в трёх из четырёх образцов кэроба, в пяти из десяти образцов какао-порошка и в одном из двух образцов сырых какао-бобов. Пре-

вышение установленного норматива зафиксировано в одном образце какао-порошка и одном образце какаосодержащего продукта (какао-бобы в шоколаде).

Изучение внутренней микрофлоры зелёного кофе. При исследовании внутренней микрофлоры зелёного кофе оценивали количество поражённых зёрен и видовой состав плесневых грибов. Данные, представленные в табл. 3, показывают, что наибольшее число поражённых зёрен (100%) было в образцах из Центральной Америки, далее, в порядке убывания, следовали образцы из Африки – 90%, Южной Америки – 87,5% и Юго-Восточной Азии – 70%. В большинстве случаев внутренняя контаминация была обусловлена грибами рода *Aspergillus*, в отдельных образцах обнаруживались *Penicillium*, *Mucor* и *Alternaria*. Наибольшая частота обнаружения *Aspergillus* spp. была в образцах из Центральной Америки (96,7% зёрен) и Африки (95% зёрен).

Для дальнейших исследований из внутренней микрофлоры зёрен зелёного кофе были выделены 48 МСИ, относящиеся к наиболее представленному в образцах роду *Aspergillus*. По результатам фенотипической идентификации к секции *Aspergillus Nigri* были отнесены 29 штаммов (60,4%), к секции *Aspergillus Flavi* – 6 (12,5%). Для 13 (27%) штаммов рода *Aspergillus* spp. видовая принадлежность не была окончательно установлена. Среди выделенных видов некоторые являются потенциальными продуцентами МТ и ЭМТ.

Таблица 3 / Table 3

Загрязнённость кофейных зёрен внутренней микрофлорой (средние значения)
Contamination of coffee beans with internal microflora (average values)

Происхождение, число (n) образцов Origin, number (n) of samples	Заражённые зёрна, % Infected grains, %	Чистые зёрна, % Uninfected grains, %	Видовой состав микрофлоры, % Species composition of mycoflora, %				
			<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	другие виды плесеней other types of mold
Южная Америка / South America n = 8	87.5	12.5	75	12.5	15	7.5	17.7
Центральная Америка / Central America n = 3	100	0	96.7	0.0	10.0	6.7	10
Африка / Africa n = 4	95	5	95	0	0.3	0	0
Юго-Восточная Азия / South East Asia n = 5	70.0	30.0	53.0	0.0	2.0	4.0	0.2

Таблица 4 / Table 4

Характеристики токсигенных грибов *Aspergillus* spp., выделенных из зелёных кофейных зёрен
Characteristics of toxigenic molds of *Aspergillus* spp. isolated from green coffee beans

Число токсигенных изолятов Number of toxigenic isolates	Видовой состав изолятов Species composition of isolates	Происхождение Origin	Содержание МТ в питательных средах, мг/кг MT content in culture substrate, mg/kg
Центральная Америка / Central America (n = 20)			
4	<i>Aspergillus section Nigri (A. niger)*</i>	Бразилия, Колумбия Brazil, Colombia	ФВ2 / Fumonisin 0.017–0.114
2	<i>A. flavus</i>	Бразилия, Колумбия Brazil, Colombia	АФЛ В ₁ / Aflatoxin B ₁ АФЛ В ₂ / Aflatoxin B ₂ СТЦ / Sterigmatocystin 11.9–14.1 0.15–0.67 0.01–0.66
2	<i>Aspergillus section Nigri (A. carbonarius)*</i>	Колумбия / Colombia	ОТА / Ochratoxin A 6.0 и (and) 145.4
Всего токсигенных изолятов по региону – 8 из 20 (40%) / Total toxigenic isolates by region 8 out of 20 (40%)			
Южная Америка / South America (n = 10)			
3	<i>Aspergillus section Nigri (A. niger)*</i>	Куба, Гватемала, Гондурас Cuba, Guatemala, Honduras	ФВ2 / Fumonisin 0.11–2.52
1	<i>A. flavus</i>	Гватемала / Guatemala	АФЛ В ₁ / Aflatoxin B ₁ АФЛ В ₂ / Aflatoxin B ₂ СТЦ / Sterigmatocystin 16.0 0.20 0.66
1	<i>A. parasiticus</i>	Куба / Cuba	СТЦ / Sterigmatocystin 380.8
Всего токсигенных изолятов по региону – 5 из 10 (50%) / Total toxigenic isolates by region 5 out of 10 (50%)			
Африка / Africa (n = 9)			
5	<i>Aspergillus section Nigri (A. niger)*</i>	Уганда, Эфиопия, Танзания Uganda, Ethiopia, Tanzania	ФВ2 / Fumonisin 0.13–24.1
2	<i>Aspergillus section Nigri (A. carbonarius)*</i>	Танзания / Tanzania	ОТА / Ochratoxin A 0.90 и (and) 518.0
Всего токсигенных изолятов по региону – 7 из 9 (77.8%) / Total toxigenic isolates by region 7 out of 9 (77.8%)			
Юго-Восточная Азия / South East Asia (n = 9)			
2	<i>Aspergillus section Nigri (A. niger)*</i>	Вьетнам, Индия Vietnam, India	ФВ2 / Fumonisin 0.09 и (and) 2.30
1	<i>A. flavus</i>	Вьетнам Vietnam	АФЛ В ₁ / Aflatoxin B ₁ АФЛ В ₂ / Aflatoxin B ₂ СТЦ / Sterigmatocystin 27.9 1.44 0.01
1	<i>A. parasiticus</i>	Индия / India	СТЦ / Sterigmatocystin 2.14
Всего токсигенных изолятов по региону – 4 из 9 (44.4%) / Total toxigenic isolates by region 4 out of 9 (44.4%)			

Примечание. * – наиболее вероятный вид плесневого изолята.

Note. * – most likely type of mold isolate.

Исследование токсигенных свойств плесневых грибов – контаминантов зелёного кофе. В условиях *in vitro* проведены исследования токсинообразующей активности 48 МСИ. Данные по числу токсигенных изолятов, видовому составу, происхождению и максимальным количествам МТ, накопленным в модельных средах, представлены в табл. 4. Наиболее высокие уровни токсинообразования отмечены на зерне риса – на субстрате с минимальной влажностью, что характерно для ксерофильных микромицетов, к которым относятся виды *Aspergillus* секций *Nigri* и *Flavi* [15]. У половины испытанных штаммов (24 из 48) выявлена способность к образованию как опасных, регламентируемых в пищевой продукции МТ, – АФЛ В1, АФЛ В2, ОТА, ФВ2, так и новых эмерджентных МТ, в частности, СТЦ.

Среди 29 изолятов *Aspergillus* секции *Nigri* большинство (14 штаммов) накапливали в субстрате ФВ2, 4 штамма – ОТА, 11 были нетоксигенными. Из изолятов секции *Flavi* 6 штаммов продуцировали АФЛ В1, АФЛ В2 и СТЦ. Продукция одновременно трёх МТ (АФЛ В1, АФЛ В2 и СТЦ) была характерна для всех четырёх штаммов *A. flavus*. Два штамма *A. parasiticus* продуцировали только СТЦ. Среди 13 штаммов других видов рода *Aspergillus* все были нетоксигенными.

По регионам происхождения наибольший процент токсинопродуцирующих штаммов был выделен среди образцов кофе из Африки – 77,8%, далее в порядке уменьшения: в 50% образцов из Южной Америки, в 44,4% – из Юго-Восточной Азии, в 40% – из Центральной Америки.

Установлено, что отдельные изоляты при моделировании условий на питательных средах, оптимальных для токсинообразования у плесеней, способны к накоплению высоких и сверхвысоких количеств МТ, среди которых были обнаружены наиболее опасные и нормируемые в пищевой продукции. Так, штамм *Aspergillus* секции *Nigri* (*A. niger*) продуцировал ФВ2 на уровне 24 мг/кг, сопоставимом с продукцией этого МТ типичным продуцентом – *Fusarium verticillioides*; грибы *Aspergillus* секции *Flavi* синтезировали высокие и супервысокие уровни как одновременно нескольких видов опасных микотоксинов АФЛ В1 – 27,9 мг/кг и АФЛ В2 – 1,44 мг/кг в комплексе с эмерджентным СТЦ (*A. flavus*), так и только СТЦ на сверхвысоком уровне – более 380 мг/кг (*A. parasiticus*); выявлена способность штаммов *Aspergillus* секции *Nigri* продуцировать ОТА в количествах до 518 мг/кг.

Обсуждение

Анализ микробного загрязнения исследованных образцов кофе, какао, какао-продуктов и кэроба, среди которых 55,6% (32 из 56) представлены переработанными видами продукции, показал, что содержание плесеней в 94,6% образцов не превышало 100 КОЕ/г, а общая бактериальная загрязнённость в 91% не превышала $5 \cdot 10^4$ КОЕ/г. Видовой состав плесеней, определяющих поверхностную загрязнённость образцов, был представлен преимущественно видами *Aspergillus* секции *Nigri*, которые определяли максимальные уровни контаминации.

Изучение внутренней микрофлоры образцов зелёного кофе, полученных из четырёх кофепроизводящих регионов (Южной и Центральной Америки, Африки и Юго-Восточной Азии), показало высокую степень поражённости зёрен плесневыми грибами, которая в зависимости от региона составляла от 70 до 100%. Во всех образцах преобладали грибы рода *Aspergillus*, в отдельных случаях обнаруживались *Penicillium*, *Mucor* и *Alternaria*. Видовая идентификация выделенных из зёрен кофе 48 МСИ, принадлежащих к аспергиллам секций *Nigri* и *Flavi*, показала наличие среди них потенциальных продуцентов МТ и ЭМТ.

Особую опасность представляют плесневые грибы внутренней микрофлоры, так как содержание МТ в пищевых продуктах в большей мере обусловлено наличием токсигенных видов плесневых грибов, вегетирующих именно во внутренней части плодов растений (зёрен, ягод, семян) и использующих их в качестве субстрата. Поэтому выделение

плесневых грибов из внутренней микрофлоры, определение их видовой принадлежности и токсигенных свойств даёт понимание источников происхождения МТ в данных видах продукта.

Исследование в условиях *in vitro* на модельных средах **токсинообразующих свойств** изолятов *Aspergillus* spp., выделенных из внутренней микрофлоры зёрен зелёного кофе, показало значительную долю (50%) штаммов, продуцирующих как опасные, регламентируемые в пищевой продукции МТ – АФЛ В1, АФЛ В2, ОТА, ФВ2, так и эмерджентные МТ, в частности, СТЦ. Стеригматоцистин является биогенным предшественником афлатоксинов и отнесён Международным агентством по изучению рака (МАИР) к классу 2В (возможный канцероген для человека) [16].

Фумонизин-продуцирующая активность видов *Aspergillus* секции *Nigri* была выявлена у штаммов, полученных из образцов кофе всех четырёх географических регионов, в то время как охратоксин-продуцирующая активность обнаруживалась только у штаммов из Центральной Америки и Африки. Впервые продукция фумонизинов была описана для изолятов *A. niger*, выделенных из образцов тайского кофе, при этом отмечалось, что для чёрных аспергиллов характерна продукция ФВ2 и ФВ4 в отличие от грибов рода *Fusarium*, продуцирующих также ФВ1, ФВ3 и др. [17]. При изучении микрофлоры кофе на тайских плантациях было показано, что источником фумонизина В2 в кофе являлись *Aspergillus niger* («чёрные аспергиллы»), а не типичный продуцент фумонизинов в зерновых – вид *Fusarium verticillioides*. Сообщается об обнаружении на кофейных зёрнах наряду с *A. niger* также видов *A. carbonarius*, *A. sclerotii carbonarius* и *A. foetidus* [17]. В том же исследовании описана способность отдельных видов секции *Nigri* (*A. carbonarius*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii* и *A. sclerotiorum*) к продукции ОТА, а отдельных штаммов вида *A. niger* – к одновременной продукции ФВ2 и ОТА. Отличительной особенностью вида *A. carbonarius* является способность к продукции высоких уровней ОТА у 98–100% штаммов [3].

В комплекс *Aspergillus* секции *Nigri* входят несколько морфологически неразличимых видов, имеющих при этом различные метаболические профили, в частности, *A. niger* и *A. carbonarius*. В полученных в данном исследовании результатах 14 штаммов *Aspergillus* секции *Nigri*, продуцирующих ФВ2, на основании их хемотипа с высокой долей вероятности принадлежат к виду *A. niger*, а 4 штамма, продуцирующих ОТА, – к виду *A. carbonarius*, что подтверждается высоким уровнем продукции ОТА.

Выявлены 4 штамма *A. flavus*, продуцирующие одновременно АФЛ В1, В2 и СТЦ, а также 2 штамма *A. parasiticus*, производящих только СТЦ. Таким образом, фенотипическая идентификация указанных изолятов согласуется с хемотипом [3]. Окончательная видовая принадлежность устанавливается по результатам ПЦР-анализа с видоспецифическими праймерами.

Знания о способности плесневых контаминантов к токсинообразованию важны для разработки подходов к предотвращению загрязнения микотоксинами пищевой продукции в процессе её получения, переработки и хранения с учётом специфики поведения микрофлоры. Также эти исследования позволили получить новые данные о метаболических профилях конкретных видов грибов и их хемотипах, основанных на видоспецифичности токсинпродуцирующей способности, что даёт возможность создавать новые алгоритмы для таксономической идентификации микромицетов.

Заключение

В целом микробиологическое состояние большинства исследованных образцов кофе, какао, какао-продуктов и кэроба оценивается как удовлетворительное. В переработанной пищевой продукции несоответствия выявлены только в двух продуктах из 28 по общему микробному числу, в переработанном сырье из 28 образцов только два образца зелёного кофе не соответствовали нормативу по количеству

плесеней. При этом как в поверхностной микрофлоре готовой продукции, так и во внутренней микрофлоре необработанного сырья отмечена высокая частота встречаемости грибов рода *Aspergillus*.

Полученные в экспериментальных условиях данные демонстрируют высокий потенциал микотоксинообразования грибов рода *Aspergillus* – плесневых контаминантов кофейного сырья, способных в благоприятных условиях к накоплению высоких и сверхвысоких уровней нескольких опасных МТ (ОТА, АФЛ В1, ФВ2) а также ЭМТ (СТЦ). С учётом повсеместной распространённости видов *Aspergillus* секции *Nigri* это свидетельствует о наличии потенциального риска контаминации растительного сырья и пищевой продукции опасными МТ (ФВ2 и ОТА) и подтверждает, что создание надлежащих условий на всех этапах транспортировки и хранения данного вида сырья, а также вырабатываемых из него продуктов является необхо-

димой частью системы обеспечения безопасности и снижения риска возникновения пищевых микотоксикозов.

Обнаруженная у штаммов *Aspergillus* секции *Nigri* фумонизин- и охратоксин-продуцирующая активность приобретает особую значимость с учётом широкого использования *A. niger* в биотехнологии в качестве важнейшего продуцента органических кислот и ферментных препаратов для пищевой промышленности.

Всё это подтверждает необходимость более глубокого изучения микрофлоры этих видов пищевой продукции. Большое значение для прогнозной оценки риска имеет изучение токсигенных свойств грибных контаминантов в отношении расширенного спектра токсических метаболитов, включая ЭМТ.

Настоящим исследованием впервые в Российской Федерации доказано наличие токсигенной активности у плесневых грибов, выделенных из зелёного кофе.

Литература

(п.п. 3–10, 12, 15, 17 см. References)

- Ипатова А.А. Обзор российского рынка кофе в 2017–2019 годах. *Российский продовольственный рынок*. 2020; (1). <https://foodmarket.spb.ru/>
- Точиева Л. Импорт какао-продуктов и обзор производства шоколадных изделий. Апрель 2021. *Российский продовольственный рынок*. 2021; (4). <https://foodmarket.spb.ru/>
- Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В. Фузариоз зерновых культур. *Защита и карантин растений*. 2011; (S5): 69–120.
- Минаева Л.П., Полянина А.С., Киселева М.Г., Чалый З.А., Ефимочкина Н.Р., Шевелева С.А. Изучение контаминации сухофруктов токсигенными плесневыми грибами. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(7): 717–23. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7>
- Чалый З.А., Киселева М.Г., Седова И.Б., Минаева Л.П., Шевелева С.А., Тутельян В.А. Изучение контаминации сухофруктов микотоксинами. *Вопросы питания*. 2021; 90(1): 33–9. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-1-33-39>
- Седова И.Б., Киселева М.Г., Захарова Л.П., Тутельян В.А. Токсиколого-гигиеническая характеристика микотоксина стеригматоцистина и методы его определения в пищевых продуктах. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(1): 105–17. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2019-98-1-105-117>

References

- Ipatova A.A. Overview of the Russian coffee market in 2017–2019. *Rossiyskiy prodovol'stvennyy rynek*. 2020; (1). Available at: <https://foodmarket.spb.ru/> (in Russian)
- Tochieva L. Cocoa imports and chocolate production overview. *Rossiyskiy prodovol'stvennyy rynek*. 2021; (4). Available at: <https://foodmarket.spb.ru/> (in Russian)
- Moretti A., Susca A., eds. *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 1542)*. New York: Springer; 2017.
- Petyaev I.M., Bashmakov Y.K. Cocobiota: Implications for Human Health. *J. Nutr. Metab.* 2016; 2016: 7906927. <https://doi.org/10.1155/2016/7906927>
- Copetti M.V., Iamanaka B.T., Pitt J.I., Taniwaki M.H. Fungi and mycotoxins in cocoa: from farm to chocolate. *Int. J. Food Microbiol.* 2014; 178: 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023>
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006. Commission Directive 2006/1881/EC of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. *Off. J. Eur. Commun.* 2006; L364: 5–24.
- Chen A.J., Hubka V., Frisvad J.C., Visagie C.M., Houbraken J., Meijer M., et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food. *Stud. Mycol.* 2017; 88: 37–135. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.07.001>
- Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C., Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud. Mycol.* 2007; 59: 129–45. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.13>
- Díaz G.V., Coniglio R.O., Chungara C.I., Zapata P.D., Villalba L.L., Fonseca M.I. *Aspergillus niger* LBM 134 isolated from rotten wood and its potential cellulolytic ability. *Mycol.* 2020; 12(3): 160–73. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1823509>
- Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J., Hong S.B., Hubka V., Klaassen C.H., et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 2014; 78: 141–73. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Gagkaeva T.Yu., Gavrilo O.P., Levitin M.M., Novozhilov K.V. Fusariosis of grain crops. Supplement to the Journal. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2011; (5). (in Russian)
- Han X., Jiang H., Xu J., Zhang J., Li F. Dynamic fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* intended used in food industry in China. *Toxins (Basel)*. 2017; 9(7): 217. <https://doi.org/10.3390/toxins9070217>
- Minaeva L.P., Polyamina A.S., Kiseleva M.G., Chalyy Z.A., Efimochkina N.R., Sheveleva S.A. Dried fruits marketed in Russian: toxigenic mold contamination. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(7): 717–23. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-717-723> (In Russian)
- Chalyy Z.A., Kiseleva M.G., Sedova I.B., Minaeva L.P., Sheveleva S.A., Tutelyan V.A. Dried fruits marketed in Russia: multi-mycotoxin contamination. *Voprosy pitaniya*. 2021; 90(1): 33–9. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-1-33-39> (in Russian)
- Rico-Munoz E., Samson R.A., Houbraken J. Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiol.* 2019; 81: 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.016>
- Sedova I.B., Kiseleva M.G., Zakhrova L.P., Tutel'yan V.A. Toxicological and hygienic characteristics of mycotoxin sterigmatocystin and methods for its determination in food products. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2019; 98(1): 105–17. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2019-98-1-105-117> (in Russian)
- Noonim P., Mahakarnchanakul W., Nielsen K.F., Frisvad J., Samson R.A. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* from Thai coffee beans. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.* 2009; 26(1): 94–100. <https://doi.org/10.1080/02652030802366090>