

附件 1

威尼斯镰刀菌蛋白等 3 种新食品原料

一、威尼斯镰刀菌蛋白

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

附录

1. 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

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

2. 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

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

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

3. 微生物指标

微生物指标应符合表 3 的规定。

表 3 微生物指标

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

附录 A 威尼斯镰刀菌的检测方法

A.1 原理

将待检样品经过无菌溶解稀释处理后，选择适宜稀释度的稀释液涂布于威尼斯镰刀菌专用固体培养基平板上， $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 开始观察并记录。若平板上有菌丝生长，则挑取菌丝进行单菌落纯化后，采用聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）进一步鉴定，同时将平板继续培养至第 5 天进行最终计数并报告。

A.2 试剂与材料

A.2.1 威尼斯镰刀菌专用固体培养基

其组成和配比见表 A.1。

表 A.1 威尼斯镰刀菌专用固体培养基组成

序号	成分名称	用量
1	葡萄糖	20.0 g
2	酵母浸粉	0.5 g
3	磷酸二氢铵	2.1 g
4	硫酸铵	6.0 g
5	硫酸钾	2.1 g
6	硫酸镁	0.9 g
7	琼脂	20.0 g
8	去离子水	1000 mL

将上述成分溶解在 800 mL 去离子水中并定容至 1 L，分

装后 121℃灭菌 20 min 备用。

A.2.2 羧甲基纤维素钠琼脂培养基（CMC-Na 培养基）

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

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

A.2.4 威尼斯镰刀菌专用液体培养基

除不含琼脂外，其他成分与专用固体培养基相同。

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

A.2.6 氯仿-异戊醇（24:1）。

A.2.7 无水乙醇。

A.2.8 70%的乙醇。

A.2.9 PCR 高保真型 2×Taq 酶。

A.3 仪器和设备

A.3.1 生化恒温培养箱。

A.3.2 恒温水浴锅。

A.3.3 涡旋振荡器。

A.3.4 PCR 仪。

A.4 样品中生产菌株威尼斯镰刀菌的检测步骤

A.4.1 样品的稀释

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

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

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

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

A.4.2 培养

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

A.4.3 菌落形态观察与计数

A.4.3.1 菌落形态观察

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



图 A.1 威尼斯镰刀菌在专用固体培养基上的菌落形态

A.4.3.2 菌落计数

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

A.4.4 威尼斯镰刀菌的 PCR 鉴定

A.4.4.1 菌体制备

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

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

A.4.4.2 DNA 模板制备

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

A.4.4.3 PCR 扩增

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

A.4.4.4 扩增产物序列分析

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

A.5 结果判定

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

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

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

二、接骨木莓花色苷

中文名称	接骨木莓花色苷
英文名称	Elderberry anthocyanins
基本信息	来源： 荚蒾科接骨木属植物西洋接骨木（ <i>Sambucus nigra</i> L.）的果实
生产工艺简述	以西洋接骨木的果实为原料，经酶解、压榨、膜过滤、灭菌、干燥等工艺制成。
推荐食用量	≤3.2 克/天（以总花色苷含量 10 g/100 g 计，超过该含量的按照实际含量折算）
其他需要说明的情况	1. 使用范围和最大使用量：乳及乳制品（调制乳和风味发酵乳 3.2 g/kg，乳粉及调制乳粉按照冲调后液体质量折算，干酪、再制干酪、干酪制品、炼乳按照生乳原料倍数折算），饮料类（液体饮料 ≤50 mL 包装 32 g/kg, 51 ~ 500 mL 包装 3.2 g/kg，固体饮料按照冲调后液体质量折算），果冻（56 g/kg），可可制品、巧克力和巧克力制品（包括代可可脂巧克力及制品）（56 g/kg），糖果（60 g/kg），冷冻饮品（32 g/kg），焙烤食品（16 g/kg），酒类（16 g/kg）。 2. 婴幼儿、孕妇和哺乳期妇女不宜食用，标签、说明书应当标注不适宜人群和食用限量。 3. 质量规格和食品安全指标见附录。

附录

1. 感官要求

感官要求应符合表 1 规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求	检 验 方 法
色泽	暗红色	取适量试样置于清洁、干燥的白瓷盘或烧杯中,在自然光线下,观察其色泽和状态,嗅其气味,品其滋味。
滋味	具有本品固有滋味,无异味	
气味	具有本品固有气味,无异味	
状态	粉末,无肉眼可见外来异物	

2. 理化指标

理化指标应符合表 2 规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标	检 验 方 法
总花色苷（以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷氯化物计）， $\geq$ g/100 g	10.0	国家卫生健康委 2023 年第 3 号蓝莓花色苷的总花色苷测定方法
水分，g/100 g	$\leq$ 7.0	GB 5009.3
灰分，g/100 g	$\leq$ 5.0	GB 5009.4
铅（Pb），mg/kg	$\leq$ 0.5	GB 5009.12
镉（Cd），mg/kg	$\leq$ 0.1	GB 5009.15
总汞（Hg），mg/kg	$\leq$ 0.1	GB 5009.17

总砷 (As) , mg/kg	≤	0.5	GB 5009.11
-------------------	---	-----	------------

3. 微生物指标

微生物指标应符合表 3 的规定。

表 3 微生物指标

项 目	指 标	检验方法
菌落总数, CFU/g	≤ 3000	GB 4789.2
大肠菌群, CFU/g	≤ 10	GB 4789.3
霉菌和酵母, CFU/g	≤ 100	GB 4789.15
沙门氏菌, /25 g	不得检出	GB 4789.4
金黄色葡萄球菌, /25 g	不得检出	GB 4789.10

三、油橄榄果多酚

中文名称	油橄榄果多酚
英文名称	Olive fruit polyphenols
基本信息	来源：木犀科木犀榄属植物木犀榄（ <i>Olea europaea</i> L.）的果实
生产工艺简述	以木犀榄的果实为原料，经乙醇提取、过滤、浓缩、脱脂、干燥、粉碎等工艺制成。
推荐食用量	≤600 毫克/天（以总多酚含量 10 g/100 g 计，超过该含量的按照实际含量折算）
其他需要说明的情况	1. 使用范围和最大使用量：乳及乳制品（调制乳和风味发酵乳 0.5 g/kg，调制乳粉按照冲调后液体质量折算，干酪、再制干酪、干酪制品、炼乳按照生乳原料倍数折算），饮料类（液体饮料 ≤50 mL 包装 5 g/kg，51 ~ 500 mL 包装 0.5 g/kg，固体饮料按照冲调后液体质量折算），果冻（8 g/kg），可可制品、巧克力和巧克力制品（包括代可可脂巧克力及制品）（8 g/kg），糖果（25 g/kg），冷冻饮品（5 g/kg），酒类（2.5 g/kg），蜜饯（5 g/kg）。 2. 婴幼儿、孕妇和哺乳期妇女不宜食用，标签、说明书应当标注不适宜人群和食用限量。 3. 质量规格和食品安全指标见附录。

附录

1. 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求	检测方法
色泽	棕色	取适量试样置于清洁、干燥的白瓷盘或烧杯中，在自然光线下，观察其色泽和状态，嗅其气味，品其滋味。
滋味	具有本品固有滋味，无异味	
气味	具有本品固有气味，无异味	
状态	粉末，无肉眼可见外来异物	

2. 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标	检测方法
总多酚（以没食子酸计），g/100 g $\geq$	10.0	附录 A
毛蕊花苷，% $\geq$	2.0	附录 B
水分，g/100 g $\leq$	5.0	GB 5009.3
灰分，g/100 g $\leq$	20.0	GB 5009.4
黄曲霉毒素 B ₁ ， μ g/kg $\leq$	5.0	GB 5009.22
铅（Pb），mg/kg $\leq$	0.5	GB 5009.12
总砷（As），mg/kg $\leq$	0.5	GB 5009.11

3. 微生物指标

微生物指标应符合表 3 的规定。

表 3 微生物指标

项 目	指 标	检测方法
菌落总数，CFU/g	≤ 10000	GB 4789.2
大肠菌群，CFU/g	≤ 10	GB 4789.3
霉菌和酵母，CFU/g	≤ 50	GB 4789.15
沙门氏菌，/25 g	不得检出	GB 4789.4
金黄色葡萄球菌，/25 g	不得检出	GB 4789.10

附录 A 总多酚测定方法 分光光度法

A.1 原理

酚类化合物在碱性条件下被福林酚氧化，生成蓝色的化合物，在一定浓度范围内，吸光度与酚类化合物的含量成正比，符合朗伯-比尔定律，采用分光光度法测定总多酚的含量。

A.2 试剂和材料

除另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 一级水。

A.2.1 无水乙醇。

A.2.2 福林酚试剂。

A.2.3 无水碳酸钠。

A.2.4 50%乙醇：取 500 mL 无水乙醇用水定容到 1 L，摇匀。

A.2.5 95%乙醇：取 950 mL 无水乙醇用水定容到 1 L，摇匀。

A.2.6 20%碳酸钠溶液：称取 20 g 无水碳酸钠，用水溶解定容至 100 mL，摇匀。

A.2.7 没食子酸标准品（CAS 号：149-91-7），纯度 $\geq 99.0\%$ 。

A.3 仪器和设备

A.3.1 紫外分光光度计：配 1 cm 石英比色皿。

A.3.2 分析天平：感量为 0.0001 g。

A.3.3 恒温水浴锅。

A.4 分析步骤

A.4.1 标准溶液制备

A.4.1.1 标准储备液

准确称取没食子酸标准品 50 mg (精确到 0.0001g) 于烧杯中, 加入 95%乙醇完全溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 再用 95%乙醇定容至刻度, 混匀, 即得没食子酸浓度为 5.0 mg/mL 的标准储备液 (2~8℃避光可保存 48 h)。

A.4.1.2 标准系列工作液

准确移取 2 mL 5.0 mg/mL 没食子酸标准储备液溶液于 200 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀。分别准确移取 0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL 和 1.0 mL 上述溶液于 10 mL 容量瓶中, 备用, 记为 1.0 mg/L、2.0 mg/L、3.0 mg/L、4.0 mg/L、5.0 mg/L 的没食子酸系列标准溶液 (现用现配, 避光保存)。

A.4.2 试样溶液制备

准确称取 100 mg (精确到 0.0001 g) 样品置于 100 mL 容量瓶中, 加入 80 mL 50%乙醇完全溶解后, 用 50%乙醇定容至刻度。准确移取 0.1 mL 溶液转移入 10 mL 容量瓶中, 备用, 即得试样溶液 (现用现配)。

A.5 测定

分别在每个系列标准溶液和试样溶液中加入约 6 mL 水, 然后加入 0.5 mL 的福林酚试剂。加入福林酚试剂 1 min 后 (最多不超过 8 min), 加入 0.75 mL 的 20%碳酸钠水溶液, 混合后用水定容至刻度。将容量瓶在 30℃静置 2 h (隔 1 h 振荡一次)。反应后冷却至 20℃。以水作为空白, 对照溶液按

相同操作程序进行处理。

于波长 765 nm 处用空白溶液调节零点，然后分别测定标准系列溶液和试样溶液的吸光度，绘制标准曲线，按标准曲线法计算试样溶液浓度。

A.6 计算

试样中总多酚的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times 0.1 \times 100}{W} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X —样品中总多酚的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

C —从标准曲线得出的试样溶液浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

0.1—样品溶液的体积，单位为升（L）；

100—稀释倍数；

W —样品的质量，单位为毫克（mg）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

A.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

附录 B 毛蕊花苷测定方法 液相色谱法

B.1 原理

采用高效液相色谱法检测试样中毛蕊花苷的含量，紫外检测器检测，外标法定量。

B.2 试剂和溶液

除另有说明外，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

B.2.1 甲醇，色谱纯。

B.2.2 乙腈，色谱纯。

B.2.3 三氟乙酸。

B.2.4 0.1%三氟乙酸：取 1 mL 三氟乙酸用水定容至 1000 mL，摇匀。

B.2.5 毛蕊花苷标准品（CAS 号：61276-17-3），纯度 $\geq 95\%$ 。

B.3 仪器和设备

B.3.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器。

B.3.2 电子天平：感量为 0.0001 g。

B.4 分析步骤

B.4.1 标准溶液制备

准确称取毛蕊花苷标准品 10 mg（精确至 0.1 mg）于 100 mL 容量瓶中，加入约 80 mL 甲醇完全溶解后用甲醇定容至刻度，混匀，即得标准储备溶液（2~8℃避光保存 48 h）。准确移取 5.0 mL 标准储备溶液至 50 mL 容量瓶中，用甲醇定容

至刻度，配成浓度为 0.01 mg/mL 的标准溶液（现用现配）。

B.4.2 试样溶液制备

准确称取 50 mg（精确至 0.1 mg）样品于 50 mL 容量瓶中，加入约 40 mL 甲醇完全溶解后定容至刻度，经 0.45 μm 有机相微孔滤膜过滤，即得试样溶液（现用现配）。

B.4.3 参考色谱条件

a) 色谱柱：C₁₈ 柱，250 mm $\times$ 4.6 mm，粒径 5 μm ，或其他等效色谱柱；

b) 检测波长：330 nm；

c) 流速：1.0 mL/min；

d) 柱温：60°C；

e) 进样量：10 μL ；

f) 流动相：流动相 A：0.1%三氟乙酸；流动相 B：乙腈。

梯度洗脱程序见表 B.1。

表 B.1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	95	5
10	90	10
42	71	29
43	10	90
50	10	90
51	95	5
60	95	5

B.5 测定

以配制溶剂（甲醇）作为空白溶液，将空白溶液、标准

溶液、试样溶液注入高效液相色谱仪，记录保留时间和峰面积并计算响应因子。

B.6 计算

标准溶液中毛蕊花苷的含量按式（1）计算：

$$C = \frac{W \times Q}{V} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C —标准溶液中毛蕊花苷的含量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

W —标准溶液中毛蕊花苷标准品的质量，单位为毫克（mg）；

Q —毛蕊花苷标准品的纯度，单位为百分比（%）；

V —标准溶液的体积，单位为毫升（mL）。

标准溶液色谱图中毛蕊花苷的响应因子按式（2）计算：

$$RF = \frac{A}{C} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

RF —毛蕊花苷的响应因子 RF 值；

A —标准溶液色谱图中毛蕊花苷的峰面积；

C —标准溶液中毛蕊花苷的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

计算毛蕊花苷标准溶液两次进样的平均值，作为毛蕊花苷标准品的平均响应因子 RF 值。

样品中毛蕊花苷的含量按式（3）计算：

$$T = \frac{A_T \times V_T}{RF \times W_T} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中：

T —样品中毛蕊花苷的含量，单位为百分比（%）；

A_T —试样溶液色谱图中毛蕊花苷的峰面积；

V_T —试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

RF —毛蕊花苷标准品的平均响应因子；

W_T —试样的质量，单位为毫克（mg）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

B.7 检出限和定量限

当样品取样量为 50 mg 时，本方法检出限为 0.0044%，定量限为 0.0147%。

B.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 2%。

B.9 色谱图

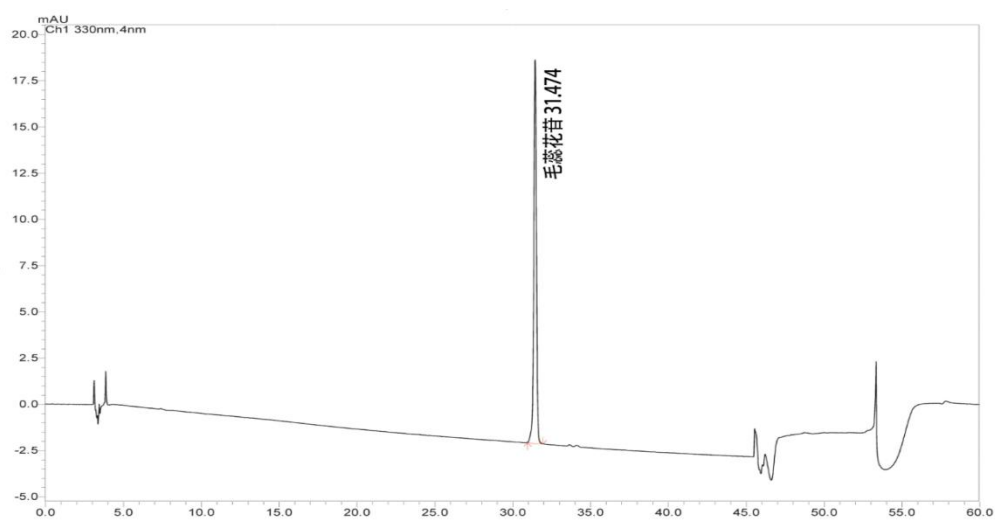


图 B.1 毛蕊花苷标准溶液色谱图 (0.01 mg/mL)

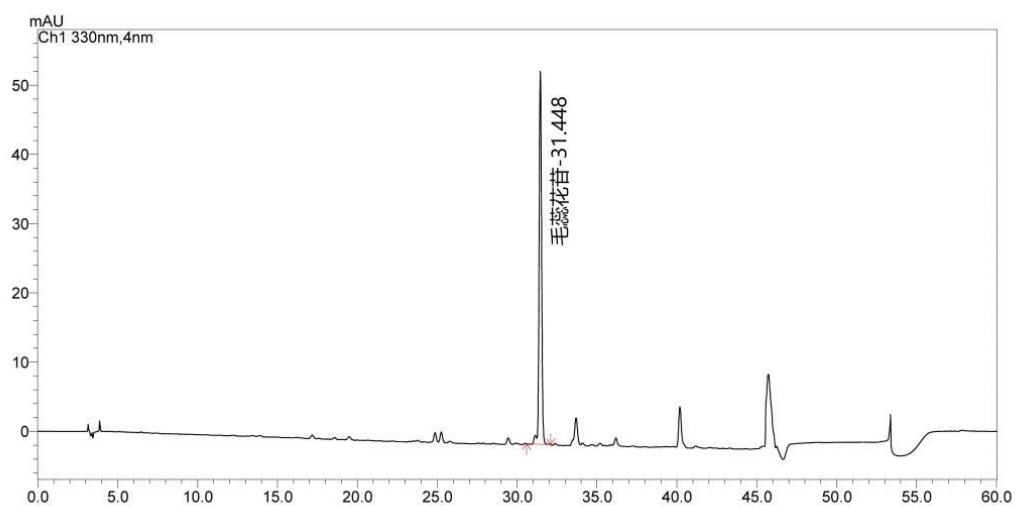


图 B.2 试样溶液色谱图 (1.00 mg/mL)