

红曲发酵夏秋茶毒理学评价

贺圣凌¹, 赵兴丽¹, 周罗娜^{1,2}, 宋诗颖^{1,2}, 罗林丽¹, 刘辉^{1*}

(1. 贵州省农业科学院生物技术研究所, 贵阳 550006; 2. 贵州省农业生物重点实验室, 贵阳 550006)

摘要: **目的** 利用红曲发酵夏秋茶, 探究其急性毒性和遗传毒性。**方法** 通过急性经口毒性试验评价其食用毒性, 通过细菌回复突变试验、哺乳动物红细胞微核试验和体外哺乳动物细胞染色体畸变试验对红曲发酵夏秋茶进行遗传毒性评价。**结果** 经过急性经口给药的受试动物未见明显中毒症状及死亡, 且雌雄小鼠急性经口半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)大于 10 g/(kg BW), 属于实际无毒级, 哺乳动物红细胞微核试验的阴性对照组、阳性对照组及红曲发酵夏秋茶各剂量组嗜多染红细胞/红细胞(polychromatic erythrocytes/red blood cells, PCE/RBC)比例无明显差别, 细菌回复突变试验中各剂量组回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2 倍, 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验中红曲发酵夏秋茶无细胞毒性。**结论** 在本试验研究剂量和条件下, 通过红曲发酵的夏秋茶既无食用毒性也无遗传毒性, 该结论能为其食用安全提供依据。

关键词: 红曲菌; 夏秋茶; 安全性评价; 急性毒性试验; 遗传毒性试验

Toxicological evaluation of summer-autumn tea fermented by *Monascus ruber*

HE Sheng-Ling¹, ZHAO Xing-Li¹, ZHOU Luo-Na^{1,2}, SONG Shi-Ying^{1,2}, LUO Lin-Li¹, LIU Hui^{1*}

(1. Institute of Biotechnology, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China;
2. Key Laboratory of Agricultural Biotechnology in Guizhou Province, Guiyang 550006, China)

ABSTRACT: Objective To explore the acute toxicity and genotoxicity of summer-autumn tea fermented by *Monascus ruber*. **Methods** The acute oral toxicity test was used to evaluate the edible toxicity of summer-autumn tea fermented by *Monascus ruber*. The genotoxicity of summer-autumn tea fermented by *Monascus ruber* was evaluated by bacterial reverse mutation test, mammalian erythrocyte micronucleus test and *in vitro* mammalian cell chromosome aberration test. **Results** The test animals were not poisoned and died after acute oral administration, and the acute oral median lethal dose (LD₅₀) greater than 10 g/(kg BW) in male and female mice, which was classified as the actual non-toxic level. There was no significant difference in the ratio of polychromatic erythrocytes/red blood cells (PCE/RBC) between the negative control group, the positive control group and *Monascus ruber* fermented summer-autumn tea groups in the mammalian erythrocyte micronucleus test. In bacterial reverse mutation test, the number of revertant colonies in *Monascus ruber* fermented summer-autumn tea groups did not exceed twice the number of spontaneous revertant colonies. The result of *in vitro* mammalian cell chromosome aberration test was no cytotoxicity in summer autumn tea fermented by *Monascus ruber*. **Conclusion** The summer-autumn tea fermented by *Monascus ruber* has neither edible toxicity nor genotoxicity in this experiment dosage and conditions, which can

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2019]2380)

Fund: Supported by the Guizhou Science and Technology Support Project ([2019]2380)

*通信作者: 刘辉, 副教授, 主要研究方向为食品科学。E-mail: 369943663@qq.com

*Corresponding author: LIU Hui, Associate Professor, Institute of Biotechnology, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China. E-mail: 369943663@qq.com

provide a basis for its edible safety.

KEY WORDS: *Monascus ruber*; summer-autumn tea; safety evaluation; acute toxicity experiment; genotoxicity experiment

0 引言

红曲菌(*Monascus*)属真菌界散子囊科目中的红曲科^[1],在我国、日本及印尼等亚洲国家被广泛应用,历史悠久^[2]。红曲菌在代谢过程中可以产生红曲色素,红曲色素(*Monascus pigment*)是我国食品卫生法规中被允许使用的可食用色素之一^[3],除被广泛用于食品业,也常用于化妆品及纺织业^[4]。目前,越来越多的学者致力于提高红曲菌次级代谢产物,主要通过发酵工艺、菌种的筛选、代谢调控及基因编辑等来提高红曲菌次级代谢产物产出率。如 LI 等^[5]通过设计一种红曲液态发酵马铃薯的新工艺来提高黄色素产量,李琦等^[6]利用基因敲除构建了一株高产红曲色素的红曲菌株,许世锦等^[7]通过乳糖醇调节液促进红曲菌代谢莫纳克林 K (Monacolin K),吴玉峰等^[8]从不同地区红曲米中筛选出了酿酒用高产 Monacolin K 的红曲菌株。红曲次级代谢产物 Monacolin K 具有降血压、抑制胆固醇合成、抗肿瘤及保护肾脏等功能^[9]。AKIRA^[10]于 1979 年在红曲发酵液中发现了 Monacolin K 能特异性的抑制胆固醇的合成,郑建全等^[11]用红曲喂养自发性高血压大鼠证实了红曲具有降血压功能,成晓霞等^[12]通过对 Monacolin K 的酯构型弱碱化发现其抗肿瘤作用。因此,现在对于红曲菌次级代谢产物的研究主要集中在如何提高 Monacolin K 的产量。

茶是全球公认的健康饮品^[13],茶叶在夏秋季会因为温度上升、光照增强而导致新叶氨基酸含量大幅度降低^[14],酚氨比升高,会导致茶叶滋味苦涩^[15]。因此,夏秋茶常被称作低档茶^[16]。而为了提高夏秋茶的品质及经济效益,目前主要是利用深加工提高夏秋茶的附加值^[17],如郝标等^[18]利用夏秋茶与酿酒大曲混合制成茶酒,黄莹捷等^[19]利用夏秋茶和猕猴桃制作果酒等,也有优化种植技术提高夏秋茶品质的研究陆续报道,如刘声传等^[20]利用氨基酸叶面肥既提高了夏秋茶产量又降低了酚氨比。中国有 6 大茶,分别为乌龙茶、绿茶、黑茶、红茶、白茶、黄茶^[21],其中乌龙茶、黑茶和红茶属于发酵茶,然而,在目前的发酵茶中,极少有用指定菌种接种来发酵茶叶,提及最多的就是黑茶中的“金花菌”。利用红曲发酵既能改善夏秋茶的滋味,又能提高其功能活性成分,极大的提高了夏秋茶的经济价值,如肖建国^[22]提出了一种黑茶的加工方法,该方法利用红曲菌发酵黑茶,显著改善了黑茶的苦涩味,傅静等^[23]利用红曲菌发酵普洱茶,显著提高了洛伐他汀的含量,宋诗颖等^[24]筛选出适生于夏秋茶的红曲菌种,并完成了种子液基质配方优化,进一步证实了红曲发酵夏秋茶的可行性。目前对于

采用红曲菌发酵夏秋茶的安全性评价鲜有研究,因此,本研究通过急性经口试验及三项遗传毒性试验对红曲发酵夏秋茶进行评价,以为红曲发酵夏秋茶的毒理学安全性评价提供基础,开发出安全无毒的功能性红曲茶。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

夏秋茶,由贵州安顺春来茶业有限公司提供。

昆明(KM)小鼠,雌雄各半,由湖南莱斯克景达实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。质量合格证号:No.430727221101902064,检疫合格后使用。使用许可证号:SYXK(湘)2019-0016。

试验菌株、S₉及细胞株:经鉴定符合要求的 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门菌;红色红曲霉(*Monascus ruber*) 3.15746 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心;中国仓鼠卵巢细胞株(CHO),购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

饲料由湖南嘉泰实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(湘)2020-0006。

2-氨基芴(2-amino-fluoren, 2-AF)、9-芴酮、1,8-二羟蒽醌、环磷酸胺(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC)(分析纯,上海阿达玛斯试剂有限公司);胰蛋白酶(180 U/mg)、蛋白胨、营养琼脂、秋水仙素、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、尿素、氯化钾、硫酸铵、硫酸镁、磷酸二氢钾、硫酸亚铁、无水乙醇(分析纯,生工生物工程(上海)股份有限公司);姬姆萨溶液(北京百奥莱博科技有限公司);马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(英国 OXOID 公司);叠氮化钠(sodium azide, NaN₃)(上海世泽生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

ZQPL-200 立式恒温震荡培养箱(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);BCE224I-1CCN 分析天平[精度 0.0001 g,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];SX-700 蒸汽灭菌器(日本 Tomy Kogyo 公司);BSP-400 生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);Milli-Q A10 超纯水系统(美国 Millipore 公司);BGZ-246 电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);VS-840-1 净化工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);CX23LED RFSIC 生物显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司];BIST-A-D910-D-B 双扉脉动真空灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);TG16MW 离心

机(湖南赫西仪器装备有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 红曲发酵夏秋茶制备

茶汁的制备:准确称取夏秋茶(毛茶)5 g于茶壶中,2000 mL蒸馏水煮沸3 min,过滤,稀释2倍即得备用茶汁。

孢子悬浮液的制备:从活化好的红色红曲霉 3.15746 平板中刮取一环菌体于 PDA 培养皿中培养 7 d,用 7 mm 打孔器从活化好的红色红曲霉 3.15746 平板中打 3 个菌饼于无菌 PDA 培养皿中,倒置培养 5 d,再使用 30 mL 无菌水刮洗菌体,过滤于无菌三角瓶中,使用血球计数板计数,确保孢子浓度达 10^6 CFU/mL。

种子液的配制:以 50 mL 茶汁为基准,蔗糖 1.141 g、蛋白胨 0.712 g、硫酸镁 0.048 g 配制种子液,并于 121°C 高压灭菌 20 min。

种子液培养条件:温度 28°C、接入 2 mL 红曲菌孢子悬浮液、初始 pH 5、装液量 50 mL/150 mL、180 r/min 摇瓶培养 5 d。

固态发酵条件:准确称取 10 g 夏秋茶毛茶于 240 mL 组培瓶中,按 42%含水量加入 3%蔗糖水,按 34% (g/mL) 接种量接入种子液,100°C 灭菌,于 28°C 固态发酵 7 d。

1.3.2 样品处理

称取红曲发酵夏秋茶 50 g,加入 500 mL 纯水,于常压、85°C 浸泡 30 min,过滤,按上述步骤过滤提取 2 次,合并 2 次提取液,浓缩至 50 mL,备用。

采用限量法,按 10 g/kg 体重的染毒剂量经口灌胃染毒。取 KM 小鼠 20 只,雌雄各半,体重(19.6±0.8) g,禁食过夜。根据小鼠体重取适量受试物用纯水配成与染毒剂量对应的浓度溶液,按 0.2 mL/10 g 体重给小鼠一次性经口灌胃给药,观察小鼠给药后 14 d 内的中毒症状及死亡情况。

1.3.3 哺乳动物红细胞微核试验

样品处理:称取红曲发酵夏秋茶 100 g,加入 1000 mL 纯水,于常压、85°C 浸泡 30 min,提取 2 次,合并 2 次提取液,浓缩至 100 mL,备用。

根据急性经口毒性试验测得受试物半数致死量(median lethal dose, LD_{50})>10 g/(kg BW),即以 10.0 g/(kg BW) 为高剂量,另设 5.0 g/(kg BW)、2.5 g/(kg BW) 为中、低剂量。选取 KM 小鼠 50 只,体重为(27.6±1.4) g,随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半。各染毒组用纯水配制所需浓度,阴性对照组用纯水,各染毒组和阴性对照组均为灌胃给药,阳性对照用环磷酰胺 40 mg/kg,腹腔注射给药。采用 30 h 染毒法,即两次染毒间隔 24 h,第二次染毒后 6 h 取材。动物颈椎脱臼处死后,打开胸腔,沿着胸骨柄与肋骨交界处剪断,剥掉附着其上的肌肉,擦净血污,横向剪开胸骨,暴露骨髓腔,然后用止血钳挤出骨髓液,将骨髓液滴在载玻片一段的小牛血清液滴里,仔细混匀,制成细胞悬液。每个样本按常规制片 2 张,经甲醇固定, Giemsa 染色后,于

油镜下观察 2000 个嗜多染红细胞的微核数,计算微核率及嗜多染红细胞和总红细胞的比率。

1.3.4 细菌回复突变试验

样品处理:称取红曲发酵夏秋茶 10 g 加入 100 mL 纯水,于常压、85°C 浸泡 30 min,提取 2 次,将 2 次提取液合并浓缩至 10 mL,备用。

阳性对照:TA97a+S9、TA98+S9、TA100+S9 采用 2-AF 处理(剂量:10.0 μg/皿);TA97a-S9、TA98-S9 采用 9-苄酮处理(剂量:0.2 μg/皿);TA100-S9、TA1535-S9 采用 NaN_3 处理(剂量:1.5 μg/皿);TA102+S9 采用 1,8-二羟蒽醌处理(剂量:50.0 μg/皿);TA102-S9 采用 MMC 处理(剂量:0.5 μg/皿);TA1535 + S9 采用环磷酰胺处理(剂量:50.0 μg/皿)。

采用平板掺入法,在 2 mL 顶层琼脂中加入 0.1 mL 试验菌株增菌液、0.1 mL 受试物溶液和 0.5 mL S9 混合液(当代活化时),混匀后倒入底层培养基平板上。试验中,设 5 剂量组(5000、1000、200、40、8 μg/皿),每个剂量组平行 3 组,并重复 1 次,最后以 6 皿的平均值计。同时设置自发回变对照、纯水对照和阳性突变剂对照。在 37°C 下培养 48 h 后,计数每皿回变菌落数,如果受试物的回变菌落数超过自发回变数的两倍以上,并有剂量-反应关系者,则定为阳性。

1.3.5 体外哺乳动物细胞染色体畸变

受试样品处理:称取红曲发酵夏秋茶 5 g 加入 50 mL 纯水,于常压、85°C 浸泡 30 min,提取 2 次,将 2 次提取液合并浓缩至 5 mL,除菌后备用。

阳性物的配制:用已灭菌的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)配成质量浓度为 100 μg/mL 溶液,使用时终质量浓度为 10 μg/mL。用已灭菌的 PBS 配成质量浓度为 25 μg/mL 溶液,使用时终质量浓度为 0.5 μg/mL。

细胞毒性的确定:取已除菌的样品置于已接种中国仓鼠卵巢细胞株(CHO)的培养瓶中,使样品终质量浓度为 5 μL/mL,在与不加 S9 的情况下,于二氧化碳培养箱培养 48 h,观察细胞生长速度和生长状态,判断红曲发酵夏秋茶是否具有毒性。

染毒:试验需在加入和不加入 S_9 混合物(S_9 mix)的条件下进行,将 2×10^5 个的细胞株接种于培养瓶中,置于二氧化碳培养箱培养,至细胞覆盖率 85%左右,取出培养瓶,吸去培养瓶中的培养液,根据剂量组设计加入受试物及相应阳性物置培养箱培养 4 h。吸去受试物培养液,用 PBS 溶液清洗细胞 3 次,加入 5 mL 完全培养液培养 20 h,加入秋水仙素,终质量浓度为 1 μg/mL,4 h 后收获细胞。

收获细胞:0.25 g 胰蛋白酶消化细胞,待细胞脱落后,加入 5 mL 完全培养基混匀,置于离心管以 1000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。低渗:加入 2 mL 0.075 mol/L KCl,混匀,于 37°C 低渗处理 30 min。预固定:加入 2 mL 固定液,以 1000 r/min 速度离心 5 min,弃去上清液。固定:加入 2 mL 固定液,混匀后固定 5 min,以 1000 r/min 速度离心 5 min,弃去上清液,重复固定一次,弃去上清液。滴片:加入数滴固

定液,混匀,用混悬液滴片,自然干燥。玻片使用前用冰水浸泡。染色:10%姬姆萨溶液染色 15 min。

1.4 数据处理

急性经口毒性试验、哺乳动物红细胞微核试验和细菌回复突变试验数据采用 WPS Office 2020 进行统计分析,试验重复 3 次,结果用平均值±标准偏差表示,根据单因素方差分析法对数据进行显著性分析,在统计学上以 $P>0.05$ 表示无显著性差异, $P<0.05$ 表示有显著性差异(*), $P<0.01$ 表示有极显著差异(**);体外哺乳动物细胞染色体畸变试验数据采用卡方检验(χ^2)进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 急性经口毒性试验

如表 1 所示,以 10 g/kg 体重剂量经口给药后,观察期 14 d 内受试物未见明显中毒症状及死亡,体重未见异常。观察期满对动物进行大体解剖检查,肉眼观察其主要脏器,未发现有异常改变。由此可知,红曲发酵夏秋茶对 KM 小鼠急性经口 $LD_{50}>10$ g/(kg BW),属于实际无毒级。

2.2 哺乳动物红细胞微核试验

微核是细胞在有丝分裂后期染色体有规律的进入子细胞形成细胞核时,仍然滞留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝点断片,或因纺锤体受损而丢失的整条染色体,在末期后单独形成的次核,比主核小^[25]。如表 2 所示,在显微镜下分别计数每只动物 2000 个嗜多染红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE)中出现的微核

数,计算微核率(%)以及嗜多染红细胞和总红细胞的比率(polychromatic erythrocytes/red blood cells, PCE/RBC),受试样品各剂量组微核率与阴性对照组比较差异无显著性($P>0.05$),阳性对照组(环磷酰胺)微核率与阴性对照组和各剂量组比较均明显增高,差异有显著性($P<0.05$),可能是由于阳性物在该试验条件下可引起所用哺乳类细胞染色体损伤,导致微核细胞率增加。阴性对照组、阳性对照组以及该送检样品名称各剂量组 PCE/RBC 比例无明显差异($P>0.05$),结果如表 2 所示。由此可知,红曲发酵夏秋茶哺乳动物细胞微核试验结果为阴性。

2.3 细菌回复突变试验

如表 3 和表 4 所示,对鼠伤寒沙门氏菌 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 5 株试验菌株,加与不加 S9,受试物各剂量组回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2 倍,亦无剂量-反应关系。由此可知,红曲发酵夏秋茶无致突变作用。

2.4 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

受试物的细胞毒性:在加与不加 S9 的情况下,细胞胞浆内有离散颗粒,无细胞溶解,无细胞增殖下降情况,即说明受试物在终质量浓度为 5 μ L/mL 时,无细胞毒性。如表 5 所示,环磷酰胺在加 S9 时与阴性对照组比较时,畸变率有显著性差异($P<0.05$),丝裂霉素在不加 S9 时与阴性对照时,畸变率有显著性差异($P<0.05$),受试物各剂量组在加与不加 S9 情况下与阴性对照组比较均无显著性差异($P>0.05$),即红曲发酵夏秋茶在加与不加代谢活化系统的情况下,体外哺乳动物细胞染色体畸变试验结果均未见致突变性。

表 1 急性经口毒性试验结果
Table 1 Results of acute oral toxicity test

动物性别	染毒剂量/(g/kg)	动物数/只	体重/g			动物死亡数/只	动物死亡率/%
			0 d	7 d	14 d		
雄性	10	10	19.7±0.8	31.0±0.5	37.3±0.7	0	0
雌性	10	10	19.5±0.9	29.8±0.9	34.4±0.8	0	0

表 2 哺乳动物红细胞微核试验结果
Table 2 Results of mammalian erythrocyte micronucleus test

性别	组别	剂量/(mg/kg)	细胞总数/个	微核细胞数/个	微核率/%	PCE/RBC
雄	高剂量组	10000	10000	14	1.40±0.65	0.58±0.04
	中剂量组	5000	10000	14	1.40±0.42	0.57±0.02
	低剂量组	2500	10000	11	1.10±0.42	0.61±0.03
	阴性对照组	0	10000	13	1.30±0.76	0.59±0.03
	阳性对照组	40	10000	220	22.00±1.73*	0.60±0.02
雌	高剂量组	10000	10000	13	1.30±0.45	0.57±0.03
	中剂量组	5000	10000	12	1.20±0.76	0.60±0.02
	低剂量组	2500	10000	14	1.40±0.65	0.59±0.03
	阴性对照组	0	10000	13	1.30±0.57	0.60±0.04
	阳性对照组	40	10000	216	21.60±1.14*	0.61±0.02

注: *表示与阴性对照组比较有显著性差异, $P<0.05$ 。

表 3 第 1 次细菌回复突变试验结果
Table 3 Results of the first bacterial reverse mutation test

受试物	剂量/ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
		+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
受试物	5000	135.3 \pm 10.6	131.3 \pm 11.1	35.3 \pm 4.5	37.0 \pm 4.4	144.3 \pm 10.7	149.7 \pm 10.1	280.3 \pm 18.8	277.0 \pm 17.0	19.3 \pm 3.2	18.3 \pm 1.2
	1000	136.3 \pm 11.6	141.3 \pm 10.1	34.0 \pm 4.0	32.0 \pm 3.5	148.7 \pm 10.3	159.0 \pm 10.5	285.0 \pm 13.2	269.3 \pm 13.7	19.7 \pm 2.1	22.0 \pm 2.6
受试物	500	129.0 \pm 9.5	135.7 \pm 10.5	35.0 \pm 4.4	36.0 \pm 4.0	148.3 \pm 10.4	146.0 \pm 11.1	278.3 \pm 17.8	270.7 \pm 12.7	20.7 \pm 2.9	20.3 \pm 3.2
	40	122.0 \pm 9.6	142.3 \pm 10.2	37.3 \pm 5.1	33.0 \pm 3.6	156.3 \pm 11.2	154.7 \pm 11.0	273.3 \pm 15.8	284.7 \pm 16.0	20.3 \pm 2.1	18.7 \pm 2.3
自发回变	8	131.0 \pm 12.1	137.3 \pm 11.6	34.3 \pm 3.1	35.7 \pm 6.4	145.7 \pm 9.9	154.3 \pm 11.0	268.3 \pm 10.7	264.3 \pm 13.1	20.0 \pm 1.7	21.0 \pm 2.6
	/	134.0 \pm 11.1	136.0 \pm 12.5	34.7 \pm 3.1	36.7 \pm 5.5	155.7 \pm 11.4	151.7 \pm 10.5	266.7 \pm 17.5	266.0 \pm 11.4	19.3 \pm 4.2	20.7 \pm 2.9
溶剂对照	/	134.7 \pm 10.0	132.7 \pm 11.9	39.7 \pm 4.7	33.3 \pm 4.2	155.3 \pm 13.2	167.3 \pm 6.7	282.3 \pm 13.6	262.0 \pm 11.5	19.7 \pm 3.5	19.7 \pm 1.5
	/	1246.7 \pm 79.4	1206.3 \pm 84.5	2577.0 \pm 98.9	2264.7 \pm 129.0	2153.7 \pm 76.1	2441.7 \pm 88.8	1000.7 \pm 55.5	2057.7 \pm 87.8	831.3 \pm 15.6	451.7 \pm 16.0

注: /表示未加入受试物, 下同。

表 4 第 2 次细菌回复突变试验结果
Table 4 Results of the second bacterial reverse mutation test

受试物	剂量/ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
		+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
受试物	5000	127.3 \pm 10.2	134.0 \pm 9.5	32.7 \pm 3.8	36.0 \pm 4.0	147.7 \pm 11.5	146.3 \pm 10.0	273.0 \pm 16.4	278.3 \pm 13.2	22.0 \pm 2.6	18.7 \pm 2.3
	1000	126.7 \pm 10.6	139.0 \pm 11.4	33.7 \pm 4.0	37.7 \pm 4.5	147.0 \pm 10.8	147.3 \pm 10.1	270.3 \pm 10.6	286.3 \pm 23.2	18.3 \pm 4.2	18.7 \pm 2.5
受试物	500	129.3 \pm 9.7	123.0 \pm 11.3	35.7 \pm 4.5	33.0 \pm 3.6	152.3 \pm 10.5	146.0 \pm 10.8	267.3 \pm 11.8	277.3 \pm 22.2	19.3 \pm 3.2	20.7 \pm 3.1
	40	132.3 \pm 10.2	136.7 \pm 11.4	37.3 \pm 3.8	35.3 \pm 5.5	154.0 \pm 11.4	148.0 \pm 16.6	272.0 \pm 13.5	272.3 \pm 26.2	20.0 \pm 2.0	19.7 \pm 3.5
自发回变	8	139.0 \pm 12.3	136.0 \pm 11.0	34.0 \pm 4.6	34.0 \pm 3.0	152.0 \pm 11.0	144.7 \pm 11.9	266.0 \pm 16.1	246.3 \pm 11.1	17.3 \pm 2.1	19.0 \pm 2.6
	/	127.7 \pm 11.6	128.0 \pm 9.0	38.3 \pm 5.5	35.7 \pm 3.5	148.3 \pm 10.0	151.7 \pm 10.5	279.0 \pm 19.3	273.3 \pm 17.9	20.3 \pm 3.8	21.0 \pm 2.6
溶剂对照	/	129.7 \pm 10.0	130.7 \pm 12.1	38.7 \pm 5.0	34.3 \pm 3.1	141.7 \pm 12.5	156.7 \pm 10.1	273.7 \pm 12.3	275.3 \pm 16.6	19.7 \pm 2.1	21.3 \pm 4.2
	/	1226.7 \pm 93.2	1187.0 \pm 96.0	2498.7 \pm 78.8	2128.3 \pm 60.5	2220.7 \pm 88.7	2369.3 \pm 120.5	1053.3 \pm 64.3	2160.3 \pm 85.2	821.0 \pm 10.5	501.0 \pm 20.7

表5 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验结果
Table 5 Results of *in vitro* mammalian cell chromosome aberration test

组别	终质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	观察细胞数/个		畸变细胞数/个		畸变率			
		+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	<i>P</i>	- S9	<i>P</i>
阴性对照	-	100	100	2	3	2	-	3	-
环磷酰胺	10.00	100	-	29	-	29	<0.05	-	-
丝裂霉素	0.50	-	100	-	27	-	-	27	<0.05
	5.00	100	100	2	4	2	>0.05	4	>0.05
受试物	2.50	100	100	1	0	1	>0.05	0	>0.05
	1.25	100	100	1	3	1	>0.05	3	>0.05

注: 用卡方检验进行统计学分析。- 表示无。

3 结论

红曲菌的次级代谢产物有很多的生物学功能,除了红曲色素的着色功能、Monacolin K 具有降三高、抗癌及抗菌等作用,红曲菌代谢产生的各种酶也在饲料行业中被广泛应用^[26]。利用红曲菌发酵,通过生物转化,不但能改善夏秋茶的滋味,同时能结合红曲菌的优点,开发出具有品质优良、降三高、抗菌、抗氧化的功能茶。虽然红曲色素安全性高,但桔霉素也是红曲菌代谢的一种次级代谢产物,是具有潜在危害的真菌毒素^[27-28],桔霉素具有肾脏毒性,还可致畸、致癌和诱发基因突变^[29]。食品安全性毒理学评价是食品生产应用的前提^[30],本研究通过急性经口毒性试验、细菌回复突变试验、哺乳动物红细胞微核试验及小鼠精母细胞染色体畸变试验系统性的分析了红曲发酵夏秋茶的食用毒性及遗传毒性,其结果表明红曲发酵夏秋茶属于无毒且无遗传毒性的物质,属于食用安全、遗传安全的可食用食品。该研究结果若能结合慢性毒性试验结果可为进一步开发红曲发酵夏秋茶提供一定的支撑依据,因此,在后续研究过程中,应继续完善慢性毒性试验。

参考文献

- 车逸心, 刘雯娟, 徐瑞欣, 等. 紫红曲霉与酿酒酵母共发酵对红曲甜米酒风味的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(4): 118-124.
CHE YX, LIU WX, XU RX, *et al.* Influence of *Monascus purpureus* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation on the flavor of sweet red yeast rice wine [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2020, 20(4): 118-124.
- 崔莉, 张德权, 张培正. 红曲色素的研究现状分析[J]. 食品科技, 2008, (8): 115-119.
CUI L, ZHANG DQ, ZHANG PZ. The situation and development of *Monascus* pigment [J]. Food Sci Technol, 2008, (8): 115-119.
- 王震. 液相色谱-质谱/质谱串联法测定番茄酱中六种红曲色素[J]. 现代食品, 2022, 28(15): 198-203.
WANG Z. Determination of six *Monascus* pigments in tomato paste by LC-MS/MS [J]. Mod Food, 2022, 28(15): 198-203.
- 玛合沙提·努尔江, 包天雨, 张添琪, 等. 红曲色素的生物活性及其作用机制研究进展[J/OL]. 食品与发酵工业: 1-12. [2022-12-20]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.031410
NUERJIANG MHST, BAO TY, ZHANG TQ, *et al.* Advance in research on the biological activity and action mechanism of *Monascus* pigment [J/OL]. Food Ferment Ind: 1-12. [2022-12-20]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.031410
- LI WD, LI Y, YU WJ, *et al.* Study on production of yellow pigment from potato fermented by *Monascus* [J]. Food Biosci, 2022, 50: 102088.
- 李琦, 高健信, 陈福生, 等. 不产桔霉素高产红曲色素的基因工程红曲菌株构建[J]. 中国酿造, 2018, 37(6): 30-35.
LI Q, GAO JX, CHEN FS, *et al.* Construction of genetically engineered *Monascus* strains with no citrinin yield but high yield *Monascus* pigments [J]. China Brew, 2018, 37(6): 30-35.
- 许世锦, 胡文林, 陈罗华周, 等. 乳糖醇调节液态发酵红曲菌生长及莫纳可林 K 代谢的研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(22): 241-247.
XU SJ, HU WL, CHEN LHZ, *et al.* Study on lactitol regulation of *Monascus* sp. growth and Monacolin K metabolism by submerged fermentation [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(22): 241-247.
- 吴玉峰, 刘双平, 韩笑, 等. 酿酒用高产洛伐他汀红曲菌的筛选[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(6): 77-86.
WU YF, LIU SP, HAN X, *et al.* Screening of *Monascus* strains with high lovastatin production for brewage [J]. J Food Sci Technol, 2021, 39(6): 77-86.
- DEOKYEONG CHOE, JUYEON LEE, SOOHYUN WOO, *et al.* Evaluation of the amine derivatives of *Monascus* pigment with anti-obesity activities [J]. Food Chem, 2012, 134(1): 315-323.
- AKIRA ENDO. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species [J]. J Antibiot, 1979, 32(8).
- 郑建全, 郭俊霞, 金宗濂. 红曲对自发性高血压大鼠降压机理研究[J]. 食品工业科技, 2007, (3): 207-208, 236.
ZHENG JQ, GUO JX, JIN ZL. Study on the antihypertensive mechanism of *Monascus* on spontaneously hypertensive rats [J]. Sci Technol Food Ind, 2007, (3): 207-208, 236.
- 成晓霞, 陈泽雄. 红曲抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2011, 13(3): 43-45.
CHEN XX, CHEN ZX. Research progress on antitumor activity of *Monascus* [J]. Mod Chin Med, 2011, 13(3): 43-45.
- 尹祎. 《中国茶叶标准化工作》系列讲座之一 茶叶标准的分类及其标准体系[J]. 中国茶叶加工, 2020, (1): 68-70.
YI W. The first of a series of lectures on *Tea standardization in China: Classification and standard system of tea standards* [J]. China Tea Process,

- 2020, (1): 68–70.
- [14] 陆泰良, 万保雄, 林朝赐, 等. 茶园间作桃树对夏茶绿茶品质的影响[J]. 南方园艺, 2021, 32(4): 75–79.
LU TL, WAN BX, LIN CC, *et al.* Effect of peach intercropping on the quality of summer tea and green tea [J]. *South Hort*, 2021, 32(4): 75–79.
- [15] 张六六, 王亚, 吴燕. 冠突散囊菌发酵夏秋茶工艺优化研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(9): 174–176, 196.
ZHANG LL, WANG Y, WU Y. Study on the process optimization of summer-autumn tea fermented by *Eurotium cristatum* SL-1 [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2020, 48(9): 174–176, 196.
- [16] 张明珠, 秦华光, 穆丹, 等. 茶多糖的抗氧化活性及对细胞氧化损伤的保护机制[J]. 植物学报, 2022, 57(4): 444–456.
ZHANG MZ, QIN HG, MU D, *et al.* Antioxidant activity of tea polysaccharide and its protective mechanism against oxidative damage [J]. *Chin Bull Bot*, 2022, 57(4): 444–456.
- [17] 袁国风. 加大科研力度 夏秋茶释放更多茶“动能”[Z]. 2021.
YUAN GF. Strengthen scientific research and release more “kinetic energy” of summer and autumn tea [Z]. 2021.
- [18] 郝标, 陈兴杰, 杨金玉. 夏秋茶混合发酵制茶酒的润料装置设计与应用[J]. 机械研究与应用, 2021, 34(6): 87–89, 92.
HAO B, CHEN XJ, YANG JY. Design and application of moistening device for tea making wine by the mixed fermentation of summer and autumn tea [J]. *Mech Res Appl*, 2021, 34(6): 87–89, 92.
- [19] 黄莹捷, 朱裕德, 覃小玲, 等. 猕猴桃茶酒的发酵工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(15): 117–123.
HUANG YJ, ZHU YD, QIN XL, *et al.* Study on fermentation technology of kiwifruit tea wine [J]. *Food Res Dev*, 2020, 41(15): 117–123.
- [20] 刘声传, 魏杰, 陈智雄, 等. 氨基酸叶面肥对黄化茶树夏秋茶产量和品质的影响[J]. 中国农学通报, 2022, 38(19): 54–58.
LIU SC, WEI J, CHEN ZX, *et al.* Effects of amino acid foliar fertilizer on yield and quality of etiolated tea plant (*Camellia sinensis*) in summer and autumn [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2022, 38(19): 54–58.
- [21] 李璇. 不同泥料紫砂壶对六大茶类茶汤影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
LI X. Effect of boccaro teapot on infusion of six kinds of tea [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [22] 肖建国. 一种黑茶的加工方法: 中国, CN107980945B [P]. 2021-06-22.
XIAO JG. A processing method of dark tea: China. CN107980945B [P]. 2021-06-22.
- [23] 傅静, 李亚莉, 秘鸣, 等. 洛伐他汀普洱茶开发研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 209–212.
FU J, LI YL, MI M, *et al.* Research on processing of lovastatin Pu'er tea [J]. *Food Mech*, 2012, 28(4): 209–212.
- [24] 宋诗颖, 林雨蝶, 周罗娜, 等. 红曲发酵夏秋茶菌种筛选及基质适生性研究[J]. 食品科技, 2022, 47(10): 62–69.
SONG SY, LIN YD, ZHOU LN, *et al.* Study on strain screening and substrate adaptability of summer-autumn tea fermented by *Monascus* [J]. *Food Sci Technol*, 2022, 47(10): 62–69.
- [25] 王新庄. 食品安全问题探讨及法律规制研究—评《食品安全法原理》[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(17): 5769.
WANG XZ. Discussion on food safety and research on legal regulation—comment on the *Principles of food safety law* [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(17): 5769.
- [26] 孙秋婉, 郭蕾, 洪厚胜. 红曲次级代谢产物的生物功能及应用于发酵性饲料的研究进展[J]. 中国饲料, 2022, (15): 1–4.
SUN QW, GUO L, HONG HS. Research on the application and optimizations strategy of red yeast rice in the feed industry [J]. *China Feed*, 2022, (15): 1–4.
- [27] 林凤, 李慧敏, 王玉梅, 等. 红曲霉色素及代谢物研究进展[J]. 中国调味品, 2019, 44(12): 188–191.
LIN F, LI HM, WANG YM, *et al.* Research progress on *Monascus* pigments and metabolites [J]. *China Cond*, 2019, 44(12): 188–191.
- [28] 苏东晓, 张瑞芬, 张名位, 等. 红曲色素生物活性研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2017, 38(2): 129–135.
SU DX, ZHANG RF, ZHANG MW, *et al.* Biological activities of *Monascus* pigments: A review [J]. *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2017, 38(2): 129–135.
- [29] 李培睿, 张晓伟, 曹依曼. 红曲霉桔霉素的检测和控制方法研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(3): 100–105.
LI PR, ZHANG XW, CAO YM. Progress on detection and control of *Monascus citrinin* [J]. *China Food Addit*, 2021, 32(3): 100–105.
- [30] 张惠惠, 崔议方, 宋书祎, 等. 过热蒸汽灭菌松花粉的安全性毒理学评价研究[J]. 药学研究, 2022, 41(7): 442–446.
ZHANG HH, CUI YF, SONG SY, *et al.* Toxicological evaluation of pine pollen sterilized by superheated steam [J]. *J Pharm Res*, 2022, 41(7): 442–446.

(责任编辑: 黄周梅 韩晓红)

作者简介



贺圣凌, 硕士, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: 122819785@qq.com



刘辉, 副教授, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: 369943663@qq.com