

引用格式:

赵以桥, 余烨颖, 吕雅婷, 曾昱龙, 胥伟. 黄曲霉侵染茶树籽产黄曲霉毒素的研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(4): 437-441.

ZHAO Y Q, YU Y Y, LYU Y T, ZENG Y L, XU W. Investigation of aflatoxins production in tea seeds infected by *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(4): 437-441.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 黄曲霉侵染茶树籽产黄曲霉毒素的研究

赵以桥<sup>1,2</sup>, 余烨颖<sup>1,2</sup>, 吕雅婷<sup>1,2</sup>, 曾昱龙<sup>1,2</sup>, 胥伟<sup>1,2\*</sup>

(1.四川农业大学园艺学院, 四川 成都 611130; 2.精制川茶四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

**摘要:**以茶树籽为原料, 真空冷冻干燥后粉碎并喷无菌水, 使含水量分别为 10%、15%、20%, 人工接种产毒黄曲霉(*Aspergillus flavus*)ACCC30899, 置于生化培养箱, 观察产毒黄曲霉的生长状况; 采用液相色谱串联质谱法分别于黄曲霉侵染 7、14、21 d、含水量大于 15%的茶树籽所产黄曲霉毒素组分进行测定。结果表明: 茶树籽粉末含水量高于 10%时黄曲霉可生长; 茶树籽粉末含水量大于 15%时黄曲霉生长状态良好, 黄曲霉毒素组分测定值均低于检测下限(0.03 μg/kg), 提示在产毒黄曲霉侵染含水量大于 15%的茶树籽, 产黄曲霉毒素的风险较小。

**关键词:** 茶树籽; 含水量; 黄曲霉; 黄曲霉毒素

中图分类号: Q949.32

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2021)04-0437-05

## Investigation of aflatoxins production in tea seeds infected by *Aspergillus flavus*

ZHAO Yiqiao<sup>1,2</sup>, YU Yeying<sup>1,2</sup>, LYU Yating<sup>1,2</sup>, ZENG Yulong<sup>1,2</sup>, XU Wei<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Horticulture, Sichuan Agriculture University, Chengdu, Sichuan 611130, China; 2.Tea Refining and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 611130, China)

**Abstract:** Tea seeds were used as raw materials, which were vacuumed and freeze-dried, then crushed and manually sprayed with sterile water to create tea seeds powder with 10%, 15% and 20% water content. Toxin producing *Aspergillus flavus* (ACCC30899) was artificially inoculated on the tea seeds powder which was cultured in biochemical incubator and observed continuously to investigate the growth of *Aspergillus flavus*. Aflatoxin components were measured in tea seeds whose water content were more than 15% during the infection of *Aspergillus flavus* (7 d, 14 d and 21 d) by liquid chromatography tandem mass spectrometry. It turns out that *Aspergillus flavus* could grow in tea seeds with more than 10% water. When the water content was more than 15%, *Aspergillus flavus* grew well and the aflatoxin contents were all lower than the detection lower limit (0.03 μg/kg), indicating tea seeds with water content higher than 15% have a small risk of producing aflatoxin under the condition of toxic *Aspergillus flavus*(ACCC30899) infection.

**Keywords:** tea seeds; water content; *Aspergillus flavus*; aflatoxins

茶树籽油是以茶树(*Camellia sinensis* O.Ktze.)种子原料制取的食用植物油。中国卫生部于2009年颁布第18号文件, 将茶树籽油列为新资源食品<sup>[1]</sup>。

茶树籽含油量通常在 20%~35%, 其主要成分为油酸、亚油酸、棕榈酸、硬脂酸、亚麻酸<sup>[2]</sup>。茶树籽油富含茶多酚、维生素 E 等, 是一种新型的功能性

收稿日期: 2020-06-28

修回日期: 2021-03-04

基金项目: 科技部国家重点研发计划项目(2019YFC0840503); 四川省科学技术厅重点研发计划项目(2019YFN0178)

作者简介: 赵以桥(1998—), 男, 重庆永川人, 硕士研究生, 主要从事茶叶品质管理与质量安全研究, 867673395@qq.com; \*通信作者, 胥伟, 博士, 讲师, 主要从事茶叶品质管理与质量安全研究, 270396393@qq.com

油脂<sup>[3]</sup>。黄曲霉毒素是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)产生的次级代谢产物<sup>[4]</sup>。黄曲霉毒素常存在于发霉的粮油作物和坚果等油脂含量较高的食品中<sup>[5-7]</sup>。罗凡等<sup>[8]</sup>在油茶籽上的研究发现,在湿热气候条件下,油茶籽易感染黄曲霉并产生黄曲霉毒素。茶树籽在仓储过程中,易在高温、高湿条件下霉变,存在黄曲霉污染导致的安全风险。

笔者在不同含水量茶树籽粉末上,接种产毒黄曲霉菌株(*Aspergillus flavus*) ACCC30899,观察产毒黄曲霉的生长情况;采用液相色谱串联质谱法分别对黄曲霉侵染 7、14、21 d 的含水量大于 15% 的茶树籽所产黄曲霉毒素组分进行测定,以期为茶树籽的科学仓储和茶树籽油的安全生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

茶树籽采自四川省名山茶树良种繁育场;黄曲霉菌株(ACCC30899)购于中国农业微生物菌种保藏管理中心;黄曲霉毒素标准品(AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>)均购于普瑞邦生物工程有限公司(青岛)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 黄曲霉阳性产毒验证

将活化后的黄曲霉孢子悬浮液接种于黑毛茶(来自湖南省桃源县,含水量 10.05%)样品中,28℃、相对湿度 90%、黑暗培养 21 d 后,依照文献<sup>[9]</sup>,采用 LC-MS/MS 检测黄曲霉毒素含量。

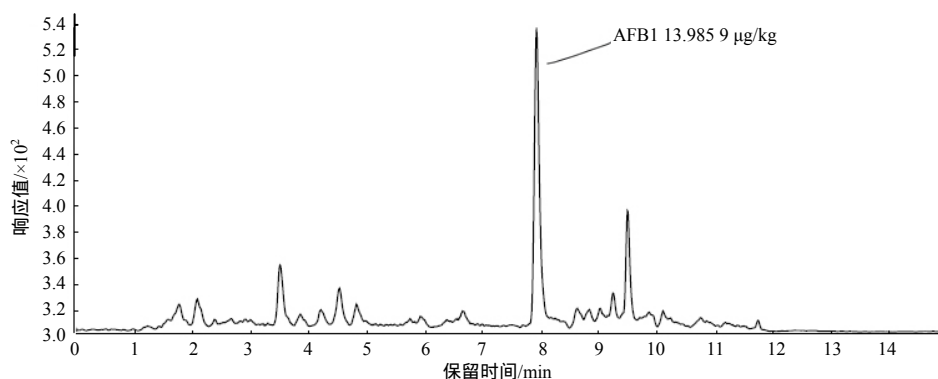


图1 黄曲霉菌株在黑毛茶基质上产黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的质谱

Fig. 1 Chromatogram of aflatoxin B<sub>1</sub> produced by *Aspergillus flavus* on raw dark tea

#### 2.2 黄曲霉菌种在茶树籽基质中的生长状况

将活化后的黄曲霉菌株制成孢子悬浮液,接种

#### 1.2.2 黄曲霉菌株在茶树籽基质上的生长势观察

取真空冷冻干燥后的茶树籽粉末 5.00 g,高压灭菌 30.0 min,添加无菌蒸馏水使其含水量分别为 10%、15%、20%,分别加入  $1.9 \times 10^6$  cfu/mL 黄曲霉孢子悬浮液 0.5 mL,即每个样品的接种量为  $9.5 \times 10^5$  cfu/mL,于 28.0℃ 培养箱中黑暗培养 7 d,观察黄曲霉在茶树籽基质上的生长情况。

#### 1.2.3 黄曲霉侵染茶树籽产毒特性的测定

依据 1.2.2 试验结果,结合及华等<sup>[10]</sup>研究结论,将黄曲霉孢子悬浮液接种至含水量大于 15%(小于 20%)的茶树籽粉基质上,在 28℃ 生化培养箱中,按培养时间 7、14 和 21 d 进行黑暗培养,观察黄曲霉的生长情况;均参照 GB 5009.22—2016<sup>[11]</sup>方法测定黄曲霉毒素组分 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 含量。

### 1.3 数据统计与分析

采用 Excel 2019 进行数据处理;采用 Origin 2018 绘图。

## 2 结果与分析

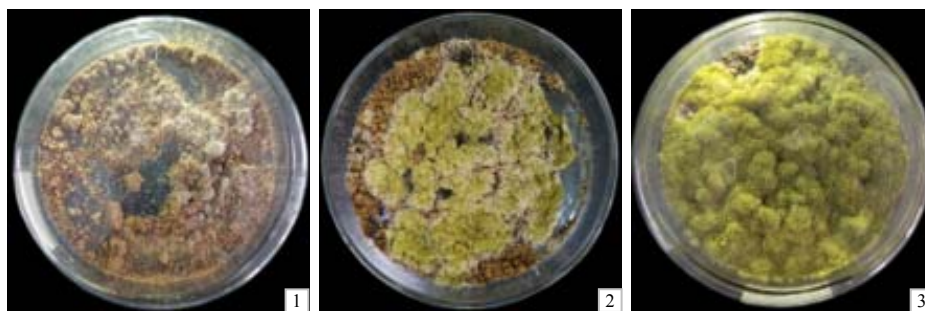
### 2.1 黄曲霉菌种的产毒能力

将黄曲霉菌株(ACCC30899)活化后制成孢子悬浮液,接种至黑毛茶基质上,黑暗培养 21 d 后,取样测定黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的含量。结果(图 1)显示,该黄曲霉菌株在黑毛茶基质上可产毒,含量为 13.985 9 μg/kg,说明该菌株具有产生黄曲霉毒素的能力。

至含水量分别为 10%、15%、20% 的茶树籽粉末基质上,于 28℃ 生化培养箱中黑暗培养 7 d,观察黄曲霉生长状况。结果(图 2)显示:黄曲霉菌株在含水

量为 10% 的茶树籽基质上基本不生长(图 2-1); 当茶树籽基质含水量为 15% 时, 黄曲霉生长较旺盛(图

2-2); 当茶树籽基质含水量为 20% 时, 菌丝及产孢结构几乎密布整个培养皿(图 2-3)。



1 含水量为 10% 的茶树籽基质; 2 含水量为 15% 的茶树籽基质; 3 含水量为 20% 的茶树籽基质。

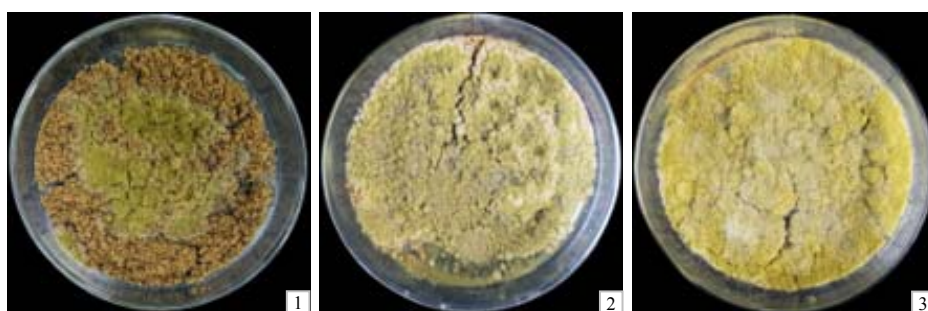
图 2 黄曲霉在不同含水量茶树籽基质上培养 7 d 的生长状况

Fig.2 Growth of *Aspergillus flavus* in tea seed medium with different water content for 7 days

### 2.3 黄曲霉侵染茶树籽的产毒特性

为考察黄曲霉侵染茶树籽的产黄曲霉毒素组分的情况, 在茶树籽含水量大于 15% (小于 20%) 的条件下接种黄曲霉菌株, 在 28 °C 生化培养箱中黑暗培养, 采用 LC-MS/MS 检测方法检测黄曲霉菌

株在茶树籽基质上的产毒情况。从图 3 可以看出, 随着培养时间的延长, 黄曲霉在茶树籽基质上的生长逐渐增多, 提示高水分条件下茶树籽能为黄曲霉生长提供较好的生长基质。



1 培养 7 d; 2 培养 14 d; 3 培养 21 d。

图 3 黄曲霉在茶树籽基质上培养不同时间的生长状况

Fig.3 Growth of *Aspergillus flavus* on tea seeds during the different time

分别用质量浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0 和 5.0  $\mu\text{g/L}$  的标准液对黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 以峰面积(Y)对质量分数(X)进行线性回归, 分别得标准曲线(表 1)。最低检测限以 3 倍信噪比计算, 为 0.03  $\mu\text{g/kg}$ 。

表 1 黄曲霉毒素组分的标准曲线和检出限

黄曲霉毒素组分	标准曲线	相关系数	检出限/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
AFB <sub>1</sub>	$Y = 152\ 167X - 2687.4$	0.999 9	0.03
AFB <sub>2</sub>	$Y = 21\ 987X + 1350.8$	0.998 4	0.03
AFG <sub>1</sub>	$Y = 74\ 386X + 3320.4$	0.998 4	0.03
AFG <sub>2</sub>	$Y = 21\ 228X - 699.14$	0.999 5	0.03

用 LC-MS/MS 法对培养 7、14、21 d 的茶树籽

样中 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 含量进行检测, 结果显示, 培养的 4 组生物学重复茶树籽样中均未检测出 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>, 提示黄曲霉菌株 (*Aspergillus flavus* ACCC30899) 虽然能在高含水量茶树籽基质上生长良好, 但其产毒特性受到抑制。

### 3 结论与讨论

黄曲霉在油脂和蛋白质含量较高的坚果类基质上较易生长并产生黄曲霉毒素<sup>[7]</sup>。茶树籽富含油脂和蛋白质<sup>[12]</sup>, 符合黄曲霉生长的基质条件。本试验中, 外源接种黄曲霉至含水量高于 10% 的茶树籽基质上, 黄曲霉生长, 并在一定范围内表现出生长势随着茶树籽含水量的升高而更加旺盛的趋势, 表

明茶树籽是黄曲霉生长的良好基质,在室温条件下,茶树籽含水量是黄曲霉生长的限制因子。根据罗凡等<sup>[8]</sup>、耿安立<sup>[13]</sup>、及华等<sup>[10]</sup>和 GALLO 等<sup>[14]</sup>在油茶籽、玉米、花生和杏仁基质上的研究结果,玉米的贮藏含水量应在 13%以下,花生、杏仁、油茶籽的含水量应在 10%以下,它们在贮藏过程中,控制其水分含量可以有效避免黄曲霉的生长。在高湿条件下,茶树籽有被外源黄曲霉侵染的可能,榨油茶籽的储存期含水量应控制在 10%以下。

模拟黄曲霉侵染茶树籽试验结果表明,高水分条件下茶树籽虽然能为黄曲霉菌株提供营养基质供其生长,但培养生长 7、14 和 21 d 的茶树籽黄曲霉毒素组分(AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>)检测结果显示其含量均低于检测下限(0.03 μg/kg),说明霉变茶树籽残留黄曲霉毒素的风险较低。这与黄曲霉侵染油茶籽产黄曲霉毒素的结论存在一定的差异<sup>[8]</sup>。分析原因:其一,茶树籽和油茶籽为不同种的山茶属植物,可能存在影响生物合成黄曲霉毒素的差异性物质;其二,茶树籽基质内含成分复杂。在以茶叶基质为研究对象的黄曲霉产毒研究结果表明,云南大叶种茶的水提物对黄曲霉毒素的合成有明显的抑制作用<sup>[15]</sup>,同时,抗氧化剂的存在也会抑制 AFB<sub>1</sub>的合成<sup>[16-18]</sup>。茶树籽中是否存在类似抑制黄曲霉毒素生物合成的物质有待进一步研究。有研究证明真菌毒素存在与基质共价结合形成隐蔽型真菌毒素的可能<sup>[19]</sup>,在茶籽油中是否存在此类隐蔽型黄曲霉毒素有待进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. 2009年第18号公告[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(1): 52.  
Announcement No. 18(2009) of the Ministry of Health of the People's Republic of China[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2010, 22(1): 52.
- [2] 朱晋萱, 张士康, 朱跃进, 等. 全国十三省茶叶籽的含油率和脂肪酸组成研究[J]. 中国茶叶加工, 2012(3): 35-38.  
ZHU J X, ZHANG S K, ZHU Y J, et al. Research on tea seed oil percentage and fatty acid composition from 13 provinces[J]. China Tea Processing, 2012(3): 35-38.
- [3] 常亚丽, 黄双杰, 刘威, 等. 茶籽油研究进展[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(12): 138-146.  
CHANG Y L, HUANG S J, LIU W, et al. Research progress of tea *Camellia* seed oil, one kind of woody plant natural oil[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2019, 34(12): 138-146.
- [4] PIEKKOLA S, TURNER P C, ABDEL-HAMID M, et al. Characterisation of aflatoxin and deoxynivalenol exposure among pregnant Egyptian women[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2012, 29(6): 962-971.
- [5] LAI X W, ZHANG H, LIU R C, et al. Potential for aflatoxin B1 and B2 production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2015, 22(2): 176-180.
- [6] FARFAN I D B, DE LA FUENTE G N, MURRAY S C, et al. Genome wide association study for drought, aflatoxin resistance, and important agronomic traits of maize hybrids in the sub-tropics[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117737.
- [7] 王颖, 王建忠, 林秋君, 等. 花生黄曲霉毒素防控及检测方法研究进展[J]. 辽宁农业科学, 2019(5): 66-68.  
WANG Y, WANG J Z, LIN Q J, et al. Research progress on prevention control and detection of peanut aflatoxin[J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2019(5): 66-68.
- [8] 罗凡, 费学谦, 王亚萍. 油茶籽及油茶饼中黄曲霉毒素污染研究[J]. 中国油脂, 2013, 38(5): 69-71.  
LUO F, FEI X Q, WANG Y P. Aflatoxins contamination in oil-tea camellia seed and its cake[J]. China Oils and Fats, 2013, 38(5): 69-71.
- [9] MONBALIU S, WU A B, ZHANG D B, et al. Multimycotoxin UPLC-MS/MS for tea, herbal infusions and the derived drinkable products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(24): 12664-12671.
- [10] 及华, 张海新, 李运朝, 等. 含水量对玉米粉贮藏期黄曲霉生长及黄曲霉毒素B<sub>1</sub>积累的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5863-5866.  
JI H, ZHANG H X, LI Y C, et al. Effects of water content on growth of *Aspergillus flavus* and accumulation of aflatoxin B<sub>1</sub> in corn flour during storage[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(22): 5863-5866.
- [11] GB/T 5009.22—2016 食品中黄曲霉毒素B族和G族的测定[S].  
GB/T 5009.22—2016 Determination of aflatoxin group B and group G in food[S].
- [12] 宋美蓉. 茶籽、茶花和茶寄生中化学成分的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2014.  
SONG M R. The research on the composition of tea seed, *Camellia*, tea parasitic[D]. Dalian, China: Liaoning Normal University, 2014.
- [13] 耿安立. 试论花生贮藏加工过程的质量安全控制[J]. 农村经济与科技, 2019, 30(6): 148-149.

- GENG A L . Discussion on the quality and safety control of peanut storage and processing[J] . Rural Economy and Science-Technology , 2019 , 30(6) : 148-149 .
- [14] GALLO A , SOLFRIZZO M , EPIFANI F , et al . Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium[J] . International Journal of Food Microbiology , 2016 , 217 : 162-169 .
- [15] 李浩, 谭英智, 陈柱涛, 等 . 云南大叶种晒青毛茶提取物对产毒黄曲霉生长及产毒的影响[J] . 现代食品科技, 2015 , 31(11) : 101-106 .
- LI H , TAN Y Z , CHEN Z T , et al . Effect of Yunnan large-leaf *Camellia sinensis* extract on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*[J] . Modern Food Science and Technology , 2015 , 31(11) : 101-106 .
- [16] 吴清华 . 茶叶中抑制黄曲霉毒素产生的组分及相关特性研究[D] . 杨凌: 西北农林科技大学, 2013 .
- WU Q H . Study on components of inhibiting production of aflatoxin in tea and related characteristics[D] . Yangling , China : Northwest A&F University , 2013 .
- [17] 郭芮 . 茶多酚单体对黄曲霉产毒的抑制作用及机理研究[D] . 西安: 陕西科技大学, 2018 .
- GUO R . Inhibition and mechanism of tea polyphenol monomers on AFB<sub>1</sub> production by *Aspergillus flavus*[D] . Xi'an : Shaanxi University of Science & Technology , 2018 .
- [18] 赵西西, 贺竹梅 . 基于RNA-Seq数据的没食子酸抑制黄曲霉毒素生物合成的机理研究[C]//广东省遗传学会 . 广东省遗传学会第九届代表大会暨学术研讨会论文及摘要汇编 . 广东省遗传学会: 广东省科学技术协会科技交流部, 2014 : 249 .
- ZHAO X X , HE Z M . Study on the mechanism of gallic acid inhibiting aflatoxin biosynthesis based on RNA-Seq data[C]//Compilation of Papers and Abstracts of the Ninth Congress and Academic Symposium of the Guangdong Genetic Society . Guangdong Society of Genetics : Science and Technology Exchange Department of Guangdong Science and Technology Association , 2014 : 249 .
- [19] 李波, 刘秀斌, 曾建国 . 真菌毒素与隐蔽型真菌毒素研究进展[J] . 饲料研究, 2020 , 43(4) : 94-98 .
- LI B , LIU X B , ZENG J G . Research progress on mycotoxins and masked mycotoxins[J] . Feed Research , 2020 , 43(4) : 94-98 .

责任编辑: 罗慧敏  
英文编辑: 罗维