



有氧条件下污染禾谷镰刀菌的玉米品质变化规律和呕吐毒素的积累动态变化规律

闫珊珊, 刘光芒, 王建萍, 林燕, 白世平, 张克英, 吴彩梅*

四川农业大学动物营养研究所, 四川省、农业部动物抗病营养与饲料重点实验室, 四川 成都 611130

摘要: 【目的】试验旨在考察有氧条件下接种禾谷镰刀菌后玉米品质变化规律和呕吐毒素(脱氧雪腐镰刀菌烯醇Deoxynivalenol, DON; 15乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇15-acetyldeoxynivalenol, 15AC-DON)的积累动态变化规律。【方法】单因素试验设计, 禾谷镰刀菌接种量分别为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 个/g, 玉米水分22%, 三角瓶中培养, 通氧量为 $1020 \text{ m}^2/\text{m}^3$, 温度 $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 湿度 $75\% \pm 5\%$, 时间60 d, 测定不同时间点玉米培养物中的品质指标和二毒素含量。【结果】结果表明, 禾谷镰刀菌接种量对禾谷镰刀菌提供N源的粗蛋白质含量无影响($P > 0.05$), 随着培养时间的延长, 提供N源的氨基酸含量呈二次曲线变化($P < 0.01$), 提供C源的粗脂肪、淀粉、粗纤维呈线性降低($P < 0.01$)。酸价呈线性增加($P < 0.01$), 蛋白质溶解度、能量呈线性降低($P < 0.01$), 霉菌总数和毒素DON、15AC-DON呈二次曲线变化($P < 0.01$)。禾谷镰刀菌产DON的动态规律为, 0–15 d毒素产量范围为0.17–0.23 mg/kg, 16–20 d毒素产量范围为0.14–0.41 mg/kg, 21–60 d毒素产量范围为0.06–0.15 mg/kg; 禾谷镰刀菌产15AC-DON的动态规律为, 0–5 d毒素产量范围为1.11–5.28 mg/kg, 6–15 d毒素产量范围为5.55–10.05 mg/kg, 16–60 d毒素产量范围为4.68–12.06 mg/kg。【结论】玉米品质随禾谷镰刀菌接种量增加和培养时间延长逐渐降低, DON和15AC-DON产量与禾谷镰刀菌接种量呈剂量依赖关系, 60 d内二毒素积累存在前期、中期和后期的动态变化规律。

关键词: 玉米, 禾谷镰刀菌, 品质, DON, 15AC-DON

基金项目: 校企合作项目(2017009H900)

*通信作者。E-mail: zhuomuniao278@163.com

收稿日期: 2019-11-01; 修回日期: 2020-01-10; 网络出版日期: 2020-01-17

玉米是畜禽的主要能量饲料,每年消费量约11000万t。呕吐毒素(Deoxynivalenol, DON; 15乙酰基脱氧雪腐镰孢菌烯醇15-acetyldeoxynivalenol, 15AC-DON)是禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的次生代谢产物,可引起动物急性或慢性中毒^[1]。众多调研表明玉米中呕吐毒素污染严重,污染了毒素的玉米,品质不同程度下降,每年约有25%的玉米不能用于畜禽生产。而在中国产呕吐毒素的霉菌主要为禾谷镰刀菌,该菌为嗜冷菌,尤其我国北方在玉米收割和储存时,温度低,水分含量高,且收割和储存时存在有氧条件。因此,在玉米霉菌毒素污染严重的前提下,开展本研究为有氧条件下高水分含量玉米中呕吐毒素污染的防控及霉变玉米的利用提供理论依据。国内外学者^[2-4]调研了中国以及世界不同区域玉米中DON含量,发现玉米中DON污染严重,检出率为79%–100%,超标率为47.7%–90.91%。产呕吐毒素的霉菌主要有禾谷镰刀菌、黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)、燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum*)等,在中国主要为禾谷镰刀菌^[5]。禾谷镰刀菌作为需氧菌在低温高湿条件下适宜产毒^[6]。禾谷镰刀菌产DON的量主要受培养基种类、培养时间、水分、温湿度以及通氧量等因素影响。有研究表明禾谷镰刀菌在水分50%的玉米培养基,培养42d,产毒量最大,最大值为5868.2 μg/kg。也有研究发现禾谷镰刀菌在水分30%的玉米培养基,培养25d,产毒量最大,最大值为56.65 mg/kg^[7-8]。Ramirez等^[9]研究温度和水分活度对禾谷镰刀菌产DON的影响,发现温度在25℃、水分活度在0.98 aw时DON产毒量最高。张晓莉等^[5]将禾谷镰刀菌接种至基础培养基,温度分别为4、10、15、20、25、30

和35℃,培养3d,结果发现,禾谷镰刀菌产DON的量在温度为25℃时最高。综上所述,目前对使用量巨大的饲料原料玉米受禾谷镰刀菌污染后呕吐毒素的积累动态规律研究缺乏,而品质变化规律研究未见报道。GB 1353-2018^[10]规定玉米储藏期间水分含量≤14%,刚收割和存储时间较长的玉米水分含量较高(22%–30%)^[11]。GB 13078-2017^[12]规定饲料中霉菌总数限量标准为 4×10^4 个/克,因此,在已明确产呕吐毒素的霉菌主要为禾谷镰刀菌,该菌最佳产毒温度为25℃,而玉米收割和存储时温度低,水分含量高、存在有氧条件的前提下,本研究围绕霉菌总数标准主要考察禾谷镰刀菌接种量对玉米品质和DON、15AC-DON变化的影响,明确低温、高水分含量玉米品质变化和DON、15AC-DON的积累动态。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料: DON产毒菌株: 禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*) 14-62-1,由四川农业大学植物病理学教研室提供;玉米:产区为内蒙古西部。

1.1.2 试剂: DON标准对照品(上海源叶公司)、15AC-DON标准对照品(以色列FERMENTEK公司),甲醇、乙腈(色谱纯,美国Sigma公司)。乙醚、氢氧化钾、盐酸、氢氧化钠、高氯酸、无水乙醇硼酸等均为分析纯(成都科龙公司)。

1.1.3 仪器: 液相色谱-串联质谱仪(Agilent 1200-6430 Triple Quad,美国Agilent公司),高效液相色谱仪(HPLC-e2695,美国Waters公司),超高效液相色谱仪(UPLC H-Class,美国Waters公司),

半自动凯氏定氮仪(KjelFlex K-360 型, 瑞士 BUCHI 公司), 氨基酸自动分析仪(日立 L8900 型, 日本日立公司), 全自动纤维测定仪(A2000220, 美国 Ankom 公司), 紫外分光光度计(UV-300 型, 美国 Thermo 公司), 恒温恒湿培养箱(3913, 美国 Thermo 公司)。

1.2 试验设计

本试验采用单因素设计, 玉米中禾谷镰刀菌接种量设置 3 个处理, 分别为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 个/g, 每个处理 3 个重复, 每个重复 20 瓶, 玉米水分 22%, 培养温度 25 ± 2 °C, 湿度 $75\% \pm 5\%$, 时间 60 d, 采用三角瓶有氧培养, 通氧量为 $1020 \text{ m}^2/\text{m}^3$, 采样时间点为培养后的第 0、5、10、15、20、30、60 天, 每个采样时间点每个重复采集样品后混合成 3 个平行样进行相关指标的测定和统计分析。

1.3 样品处理

将初始水分含量为 11.85% 的玉米采用强度 10 kGy 的 ^{60}Co - γ 射线辐照灭菌, 并调制水分含量为 22%。水分调制方法参照蔡静平等研究^[13], 根据已测定的玉米样品原始水分含量, 计算所需加水量(公式 1)。

$$\text{理论加水量} = M(C_1 - C_0) / (100 - C_1) \quad \text{公式(1)}$$

其中, M: 样品的重量(g), C_0 : 样品的原始水分(%), C_1 : 样品所需要的水分(%)。调制水分后的玉米采用无菌三角瓶分装, 模拟玉米的有氧存储条件, 每瓶 40 g, 用孔径 0.2–0.22 μm , 通氧量 $1020 \text{ m}^2/\text{m}^3$ 的透气膜封口。

将确定为产毒菌的禾谷镰刀菌 14-62-1 接种于 PDA 平板复壮培养 5–7 d 后, 将菌丝接种于绿豆汤液体培养基(绿豆 20 g, 蒸馏水中煮沸 10 min, 纱布过滤, 加蒸馏水定容至 1 L)中, 产生分生孢

子后, 把分生孢子的浓度调整制成 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 个/mL 的孢子悬液, 每瓶样品分别接种 4 mL (此体积已纳入水分含量计算), 使样品的孢子数分别为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 个/g, 每个接种量样品 20 瓶, 试验总瓶数为 60 瓶。将样品放置于温度 25 ± 2 °C, 湿度 $75\% \pm 5\%$ 的控温控湿培养箱中培养, 每天定时混匀样品。

1.4 采样及样品测定方法

分别在培养的第 0、5、10、15、20、30、60 天无菌操作台采样, 接种量间消毒后再采集, 避免不同接种量间交叉污染, 每瓶样品每次采集 5 g, 每个重复样品粉碎后平行测定 3 个数值。霉菌总数采样后立即测定, 其余样品放置于 -80 °C 保存, 用于品质指标及 DON 含量测定。指标测定方法见表 1。

1.5 统计分析

数据采用 Excel 2013 整理, 采用 SAS 9.4 软件中 PROC MIXED 程序进行数据分析(公式 2)。

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + t_l + \varepsilon_{ijkl} \quad \text{公式(2)}$$

其中, Y_{ijkl} 为因变量, μ 为变量的总体平均值, α_i 为接种量水平($i=1 \times 10^5$, 1×10^6 , 1×10^7 个/g),

表 1. 玉米接种禾谷镰刀菌后品质指标及测定方法
Table 1. Quality index and determination method of corn inoculated with *Fusarium graminearum*

Items	Determination method
DON and 15AC-DON	GB/T 30956-2014 ^[14]
Moulds	GB/T 13092-2006 ^[15]
Amino acid	GB/T 18246-2000 ^[16]
CP	GB/T 6432-2018 ^[17]
EE	GB/T 6433-2006 ^[18]
CF	GB/T 6434-2006 ^[19]
Amylum	GB/T 5009.9-2016 ^[20]
Acid value	GB/T 5009.229-2016 ^[21]
Protein solubility	DB13/T 812-2006 ^[22]
Energy	Zhang Liying ^[23]

γ_k 为培养时间($k=0, 5, 10, 15, 20, 30, 60$ d), $(\alpha\gamma)_{ik}$ 为影响因素之间的交互作用, t_i 为对各样品指标的重复测量, ε_{ikl} 为随机误差。方差分析显著者, 用 Tukey 法进行多重比较, $P<0.05$ 作为显著性水平检验标准。结果用平均值表示。

2 结果和分析

2.1 接种禾谷镰刀菌后玉米品质变化规律

2.1.1 为禾谷镰刀菌提供 N 源的营养素变化规律:

玉米各处理组培养期间氨基酸含量变化见表 2 和表 3。不同禾谷镰刀菌接种量组粗蛋白质和氨基酸含量随着培养时间的延长无显著变化($P>0.05$)。玉米各处理组培养期间粗蛋白质含量平均为

16.39%。必需氨基酸中 Trp、Thr、His 含量分别平均为 0.60%、0.35%、0.22%, Lys、Ile、Phe、Met、Arg、Val、Leu 含量随着培养时间的延长均呈二次曲线变化($P<0.01$)。非必需氨基酸中 Ala、Gly、Ser、Asp 含量分别平均为 0.52%、0.32%、0.39%、0.55%, Cys、Tyr、Glu、Pro 含量随着培养时间的延长均呈二次曲线变化($P<0.01$)。

2.1.2 为禾谷镰刀菌提供 C 源的营养素变化规律:

玉米各处理组培养期间粗脂肪、淀粉、粗纤维含量变化见表 4。禾谷镰刀菌接种量对粗脂肪、淀粉、粗纤维含量变化无显著影响($P>0.05$)。粗脂肪、淀粉、粗纤维含量随着培养时间的延长呈线性降低($P<0.01$)。

表 2. 禾谷镰刀菌接种量对玉米中必需氨基酸含量变化的影响

Table 2. Effect of inoculum of *Fusarium graminearum* on essential amino acid in corn (DM)

Items	Inoculation/ (conidia/g)	t/d							SEM	P-value				
		0	5	10	15	20	30	60		Inoculation	Time	Time× inoculation	Time ×time	Time×time ×inoculation
Phe/%	1×10^5	0.48 ^a	0.39 ^b	0.32 ^{cd}	0.29 ^d	0.30 ^d	0.27 ^d	0.37 ^{bc}	0.02	0.080	<0.001	0.051	<0.001	0.468
	1×10^6													
	1×10^7													
Leu/%	1×10^5	1.05 ^a	0.88 ^b	0.87 ^b	0.62 ^c	0.66 ^c	0.53 ^d	0.87 ^b	0.04	0.443	<0.001	0.819	<0.001	0.923
	1×10^6													
	1×10^7													
Met/%	1×10^5	0.31 ^a	0.04 ^c	0.06 ^c	0.17 ^b	0.22 ^b	0.32 ^a	0.06 ^c	0.04	0.911	0.003	0.763	<0.001	0.997
	1×10^6													
	1×10^7													
Arg/%	1×10^5	0.61 ^a	0.36 ^b	0.35 ^b	0.30 ^d	0.34 ^{bc}	0.31 ^{cd}	0.35 ^b	0.02	0.706	<0.001	0.740	<0.001	0.965
	1×10^6													
	1×10^7													
Val/%	1×10^5	0.53 ^a	0.34 ^b	0.36 ^b	0.31 ^c	0.35 ^b	0.35 ^b	0.36 ^b	0.02	0.150	0.001	0.860	<0.001	0.886
	1×10^6													
	1×10^7													
Lys/%	1×10^5	0.33 ^a	0.24 ^b	0.22 ^{bc}	0.21 ^c	0.23 ^{bc}	0.26 ^b	0.23 ^{bc}	0.02	0.897	<0.001	0.773	<0.001	0.770
	1×10^6													
	1×10^7													
Val/%	1×10^5	0.41 ^a	0.25 ^b	0.26 ^b	0.22 ^{cd}	0.25 ^{bc}	0.22 ^d	0.26 ^b	0.02	0.235	<0.001	0.814	<0.001	0.815
	1×10^6													
	1×10^7													

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same below. DM means dry matter, the same below.

表 3. 禾谷镰刀菌接种量对玉米中非必需氨基酸含量变化的影响

Table 3. Effect of inoculum of *Fusarium graminearum* on non-essential amino acid in corn (DM)

Items	Inoculation/ (conidia/g)	t/d							SEM	P-value				
		0	5	10	15	20	30	60		Inoculation	Time	Time× inoculation	Time ×time	Time×time ×inoculation
Cys/%	1×10 ⁵	0.20 ^a	0.06 ^d	0.07 ^d	0.07 ^d	0.11 ^c	0.09 ^{cd}	0.16 ^a	0.02	0.347	<0.001	0.740	<0.001	0.904
	1×10 ⁶													
	1×10 ⁷													
Tyr/%	1×10 ⁵	0.49 ^a	0.27 ^{bc}	0.28 ^b	0.23 ^{cd}	0.27 ^{bc}	0.21 ^d	0.28 ^b	0.03	0.323	<0.001	0.814	<0.001	0.956
	1×10 ⁶													
	1×10 ⁷													
Glu/%	1×10 ⁵	1.49 ^a	1.27 ^b	1.30 ^b	0.99 ^c	1.02 ^c	1.06 ^c	1.29 ^b	0.07	0.054	0.015	0.448	<0.001	0.523
	1×10 ⁶													
	1×10 ⁷													
Pro/%	1×10 ⁵	0.77 ^a	0.64 ^b	0.60 ^b	0.53 ^c	0.63 ^b	0.59 ^{bc}	0.60 ^b	0.04	0.407	<0.001	0.797	<0.001	0.694
	1×10 ⁶													
	1×10 ⁷													

表 4. 禾谷镰刀菌接种量对玉米中粗脂肪、淀粉、粗纤维含量变化的影响

Table 4. Effect of inoculum of *Fusarium graminearum* on EE and Starch and CF in corn (DM)

Items	Inoculation/ (conidia/g)	t/d							SEM	P-value				
		0	5	10	15	20	30	60		Inoculation	Time	Time× inoculation	Time ×time	Time×time ×inoculation
EE/%	1×10 ⁵	3.03 ^a	2.98 ^a	2.69 ^b	2.20 ^c	1.86 ^d	1.30 ^e	0.89 ^f	0.01	0.305	<0.001	0.235	0.012	0.761
	1×10 ⁶													
	1×10 ⁷													
Starch/%	1×10 ⁵	50.99 ^a	48.37 ^a	41.07 ^b	36.76 ^c	34.09 ^c	24.80 ^d	23.49 ^d	2.19	0.374	<0.001	0.077	<0.001	0.990
	1×10 ⁶												1	
	1×10 ⁷													
CF/%	1×10 ⁵	2.06 ^a	2.10 ^a	1.69 ^b	1.61 ^b	1.40 ^c	1.25 ^c	0.97 ^d	0.09	0.148	<0.001	0.414	0.132	0.889
	1×10 ⁶													
	1×10 ⁷													

2.1.3 其他玉米品质评价指标变化规律: 玉米各处理组培养期间蛋白质溶解度、酸价、能量、霉菌总数变化见表 5。培养期间禾谷镰刀菌接种量是霉菌总数变化的主要影响因素,对蛋白质溶解度、酸价、能量变化无显著影响($P>0.05$)。酸价随着培养时间的延长呈线性上升($P<0.01$),蛋白质溶解度、能量随着培养时间的延长呈线性降低($P<0.01$)。不同禾谷镰刀菌接种量组霉菌总数随着培养时间的延长呈二次曲线变化($P<0.01$)。

玉米接种禾谷镰刀菌孢子悬浮液后,其培养

性状在试验前 5 d 未变化如图 1-A,从试验第 10 天开始长出白色絮状菌丝,如图 1-B,在试验第 15 天白色菌丝达到生长旺盛期,如图 1-C,到试验第 20 天玉米表面覆盖禾谷镰刀菌产生的红色分泌物,如图 1-D,至试验第 30 天和试验第 60 天玉米红色加深,如图 1-E。

2.2 DON 和 15AC-DON 积累动态变化规律

玉米各处理组培养期间 DON 和 15AC-DON 含量变化见表 6。不同禾谷镰刀菌接种量组 DON 和 15AC-DON 含量随着培养时间的延长呈二次

表 5. 禾谷镰刀菌接种量对玉米中其他品质评价指标变化的影响

Table 5. Effect of inoculum of *Fusarium graminearum* on quality evaluation index in corn

Items	Inoculation/ (conidia/g)	t/d							SEM	P-value				
		0	5	10	15	20	30	60		Inoculation	Time	Time× inoculation	Time×time ×inoculation	
Protein solubility/ % (DM)	1×10 ⁵ 1×10 ⁶ 1×10 ⁷	23.27 ^a	22.86 ^a	20.43 ^b	17.32 ^c	14.81 ^d	13.11 ^d	10.69 ^e	1.01	0.238	<0.001	0.150	0.031	0.892
Acid value/% (DM)	1×10 ⁵ 1×10 ⁶ 1×10 ⁷	0.34 ^g	0.63 ^f	1.27 ^e	1.61 ^d	1.87 ^c	2.35 ^b	2.64 ^a	0.13	0.258	<0.001	0.630	0.087	0.983
Energy (kJ/g) (DM)	1×10 ⁵ 1×10 ⁶ 1×10 ⁷	15.67 ^a	13.32 ^b	12.71 ^c	12.32 ^{cd}	12.029 ^d	11.21 ^e	10.60 ^f	0.30	0.374	<0.001	0.782	0.003	0.952
total mold (CFU/g FM)	1×10 ⁵ 1×10 ⁶ 1×10 ⁷	7.00× 10 ^{2d}	5.7× 10 ^{3d}	7.33× 10 ^{3d}	1.03× 10 ^{4d}	3.83× 10 ^{4c}	9.67× 10 ^{4a}	7.33× 10 ^{4b}	278.11	0.015	<0.001	0.016	<0.001	0.560
		8.60× 10 ^{2d}	6.00× 10 ^{3d}	8.00× 10 ^{3d}	5.67× 10 ^{4cd}	1.50× 10 ^{5bc}	8.00× 10 ^{5a}	2.33× 10 ^{5b}						
		8.80× 10 ^{2d}	7.33× 10 ^{3d}	1.23× 10 ^{4d}	1.20× 10 ^{5cd}	8.00× 10 ^{5b}	2.03× 10 ^{6a}	7.00× 10 ^{5bc}						

FM means fresh matter.

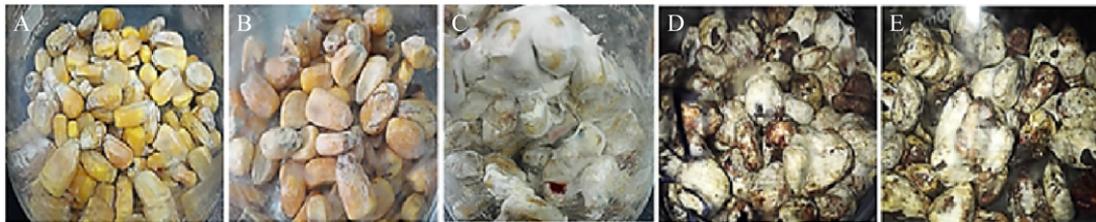


图 1. 有氧条件下接种禾谷镰刀菌后玉米的培养性状

Figure 1. Culture characteristics of *Fusarium graminearum* corn under oxygen supply. A: 1×10⁵–1×10⁷ conidia/g inoculation of 5 d; B: 1×10⁵–1×10⁷ conidia/g inoculation of 10 d; C: 1×10⁵–1×10⁷ conidia/g inoculation of 15 d; D: 1×10⁵–1×10⁷ conidia/g inoculation of 20 d; E: 1×10⁵–1×10⁷ conidia/g inoculation of 60 d.

表 6. 禾谷镰刀菌接种量对玉米中 DON 和 15AC-DON 含量变化的影响

Table 6. Effect of inoculum of *Fusarium graminearum* on DON and 15AC-DON in corn (DM)

Items	Inoculation/ (conidia/g)	t/d							SEM	P-value				
		0	5	10	15	20	30	60		Inoculation	Time	Time× inoculation	Time×time ×inoculation	
DON (mg/kg)	1×10 ⁵ 1×10 ⁶ 1×10 ⁷	0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^d	0.17 ^b	0.41 ^a	0.16 ^b	0.06 ^c	0.03	<0.001	<0.001	<0.001	0.017	0.021
		0.00 ^e	0.00 ^e	0.00 ^e	0.22 ^c	0.54 ^a	0.24 ^b	0.09 ^d						
		0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^d	0.23 ^c	1.14 ^a	0.53 ^b	0.15 ^c						
15AC- DON (mg/kg)	1×10 ⁵ 1×10 ⁶ 1×10 ⁷	0.00 ^e	1.11 ^d	2.80 ^c	5.55 ^a	4.87 ^b	4.40 ^b	4.68 ^b	0.53	<0.001	<0.001	<0.001	0.041	0.248
		0.00 ^e	3.27 ^d	6.07 ^c	8.45 ^b	10.07 ^a	5.92 ^c	5.38 ^c						
		0.00 ^g	5.28 ^f	6.37 ^e	10.05 ^d	22.24 ^a	17.54 ^b	12.06 ^c						

曲线变化($P<0.01$), 禾谷镰刀菌接种量为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 个/g 时, 玉米中 DON 和 15AC-DON 有积累动态变化规律。禾谷镰刀菌产 DON 前期: 0–15 d, DON 的含量分别达到 0.17、0.22、0.23 mg/kg; 产 DON 中期: 16–20 d, DON 的含量分别达到 0.41、0.54、0.14 mg/kg; 产 DON 后期: 21–60 d, DON 的含量分别为 0.06、0.09、0.15 mg/kg。禾谷镰刀菌产 15AC-DON 前期: 0–5 d, 15AC-DON 的含量分别达到 1.11、3.27、5.28 mg/kg; 产 15AC-DON 中期: 6–15 d, 15AC-DON 的含量分别达到 5.55、8.45、10.05 mg/kg; 产 15AC-DON 后期: 16–60 d, 15AC-DON 的含量分别为 4.68、5.38、12.06 mg/kg。产毒量从高到低依次为 1×10^7 个/g > 1×10^6 个/g > 1×10^5 个/g。

2.3 玉米中霉菌总数、毒素、品质三者之间的相关性

玉米培养期间毒素与品质之间的相关性见表 7。结果表明, DON 与粗蛋白质、氨基酸无相关性, 与蛋白质溶解度($r=-0.321$, $P=0.012$, $n=3$)、粗脂肪($r=-0.537$, $P=0.006$, $n=3$)、淀粉($r=-0.600$, $P=0.004$, $n=3$)和粗纤维($r=-0.586$, $P=0.005$, $n=3$)呈显著负相关, 酸价($r=0.460$, $P=0.030$, $n=3$)、霉菌总数($r=0.552$, $P=0.009$, $n=3$)呈显著正相关。15AC-DON 与粗蛋白质、氨基酸、粗脂肪、粗纤维、淀粉无相关性, 与蛋白质溶解度($r=-0.340$, $P=0.025$, $n=3$)呈显著负相关, 与酸价($r=0.464$, $P=0.034$, $n=3$)、霉菌总数($r=0.714$, $P=<0.001$, $n=3$)呈显著正相关。

表 7 玉米中毒素与品质之间的相关性

Table 7. Correlation between quality and toxins in CGM

Quality index	Correlation/ <i>r</i>		Significant/ <i>P</i>	
	DON	15AC-DON	DON	15AC-DON
CP	—	—	—	—
Amino acid	—	—	—	—
EE	-0.537	—	0.006	—
CF	-0.586	—	0.005	—
Starch	-0.600	—	0.004	—
Protein solubility	-0.321	-0.340	0.012	0.025
Acid value	0.623	0.460	0.003	0.036
Moulds	0.552	0.714	0.009	<0.001

Note: “—” means no correlation between the two factors.

3 讨论

3.1 禾谷镰刀菌接种量对玉米品质变化规律的影响

本课题组前期研究结果发现, 在缺氧存储条件下, 玉米中 DON 和 15AC-DON 无规律性积累动态变化, 分析可能原因为接种量少和禾谷镰刀菌是需氧菌, 在供氧条件下较适宜生长, 而在缺氧存储条件下延缓或抑制菌株生长和产毒^[24–25]。缺氧条件下, 水分 22%, 1×10^5 个/g 禾谷镰刀菌接种量组 0、5、10、15、20、30、60 d 霉菌总数分别为 8.50×10^2 、 6.67×10^3 、 9.33×10^3 、 2.33×10^4 、 4.75×10^4 、 8.17×10^4 、 3.63×10^4 CFU/g。有氧条件下, 22%水分含量和 1×10^5 个/g 禾谷镰刀菌接种量组, 与缺氧存储条件比总体霉菌总数增加, 并且霉菌总数与禾谷镰刀菌接种量呈剂量依赖关系。通过绝对消耗率公式[(60 d 的数据值–0 d 的数据值)/60 d $\times 100\%$], 计算出该剂量组, 为玉米中禾谷镰刀菌提供 C 源的淀粉、粗纤维、粗脂肪绝对消耗率分别为 49%、46%、68%, 提供 N 源的粗蛋白质、氨基酸、非蛋白氮绝对消耗率分别

为 98%、0.71%、97.29%；缺氧条件下，该剂量组，为玉米中禾谷镰刀菌提供 C 源的淀粉、粗纤维、粗脂肪绝对消耗率分别为 58%、52%、72%，提供 N 源的粗蛋白质、氨基酸、非蛋白氮绝对消耗率分别为 96%、19.86%、76.14%，说明玉米作为能量饲料其 C 源较丰富，N 源相对不足，禾谷镰刀菌在生长过程中粗蛋白、氨基酸、非蛋白氮为其提供 N 源，淀粉、粗纤维、粗脂肪为其提供 C 源，同时发现，禾谷镰刀菌在缺氧和有氧存储条件下，对 C、N 源的利用规律一致，蛋白氮为其提供主要 N 源，其次为非蛋白氮，粗脂肪为其提供主要 C 源，其次为淀粉、最后为粗纤维，有所不同的是，禾谷镰刀菌在有氧存储条件下，对 C、N 源的绝对消耗率比在缺氧存储条件下高。氨基酸中 Lys、Ile、Phe、Met、Arg、Val、Leu、Cys、Tyr、Glu、Pro 含量总体呈下降趋势，说明以上氨基酸作为蛋白氮为禾谷镰刀菌提供了 N 源。而 Trp、Thr、His、Ala、Gly、Ser、Asp 的含量，在整个培养过程中无变化，说明禾谷镰刀菌生长时未利用以上氨基酸，也未产生相应代谢物。在有氧存储条件下，禾谷镰刀菌对玉米中的 C、N 源消耗量均增加，且禾谷镰刀菌接种量对玉米中霉变的影响存在剂量依赖关系。因此本试验证实了禾谷镰刀菌在有氧条件下增加对营养素的需求，同时降低玉米的品质。

3.2 有氧存储条件下禾谷镰刀菌接种量对玉米毒素积累动态变化规律的影响

本试验发现接种禾谷镰刀菌的玉米中，DON 和 15AC-DON 在有氧条件下有积累动态变化规律，并存在剂量依赖关系，说明氧气和接种量对

毒素产生的影响大。本试验中 15AC-DON 和 DON 在玉米培养基中的毒素积累动态变化规律不一致。周闯^[26]以玉米作为培养基研究发现接种禾谷镰刀菌孢子悬液培养 15 d 后开始产毒，试验第 25 天产毒量最大，25–40 d DON 含量逐渐下降，该研究结果与本试验中玉米中 DON 积累动态变化规律相近。尹珺等^[27]在察氏液体培养基中接种禾谷镰刀菌发现在接种培养的第 30 天 DON 产毒达到最大值，其后至 45 d DON 含量开始下降，其 DON 的毒素积累动态变化规律与本试验结果不一致。基质不同，基质提供的 C、N 源的物质种类和量亦不同，可能是影响毒素积累动态变化规律不同的原因。

通过将玉米中 15AC-DON 和 DON 与主要营养素能量、淀粉、粗脂肪、粗纤维、酸价之间进行相关性分析，结果发现 15AC-DON 与能量、淀粉、粗脂肪、粗纤维呈显著负相关，与酸价之间呈正相关，DON 仅与酸价呈正相关。总体结果表明，禾谷镰刀菌的次生代谢产物 15AC-DON 和 DON 与玉米品质呈正相关。15AC-DON 和 DON 与玉米中营养素的相关性不一致。

3.3 有氧条件下毒素积累和霉变的联系

在缺氧存储条件下，发现霉变与毒素积累无相关性，而在有氧存储条件下玉米中 15AC-DON 和 DON 与霉菌总数呈正相关。Lopez-Berges 等^[28]研究发现，禾谷镰刀菌中 TOR 信号途径可以响应外源的不同氮源来调控禾谷镰刀菌产毒能力。*FgSch 9* 是 TOR 信号途径中编码蛋白的一种基因。顾沁^[29]研究发现，*FgSch 9* 在禾谷镰刀菌生长中，可调控气生菌丝的生长，以及促进 DON 产生过程中色素的合成。前期研究结果表明，在

缺氧存储条件下培养,发现玉米未出现红色分泌物,而在有氧存储条件下,玉米在培养期间在产毒后期第 20 天出现了红色分泌物,产毒初期和产毒中期并未出现。禾谷镰刀菌主要通过利用玉米中的 C 源和 N 源以维持自身生长需要。禾谷镰刀菌对 C 源和 N 源的利用是由蛋白 CreA 调控的^[30]。Kumar 等^[31]研究发现,CreA 蛋白与 TRI 基因簇的结合位点位于 *TRI4-TRI6* 基因的间隔区,可以与一个新的基因 FGSG-09715.3 结合,更有利于调控 CreA 蛋白影响 DON 的合成。Ronne^[32]研究表明,在以葡萄糖作为 C 源的条件,CreA 蛋白能够和次生代谢相关基因启动子区的保守序列 G/CPyGGGG 结合从而抑制相关基因的表达。因此, DON 和 15AC-DON 在禾谷镰刀菌适宜生长条件下有积累动态变化规律,受霉变的影响,与霉变程度和霉变性状相关。

4 结论

①有氧条件下,玉米品质随禾谷镰刀菌接种量增加和培养时间延长逐渐降低。

②有氧条件下,玉米在禾谷镰刀菌产毒后期出现红色分泌物,粗蛋白质、氨基酸、非蛋白氮为禾谷镰刀菌生长提供 N 源,粗脂肪、淀粉、粗纤维为其提供 C 源。

③有氧条件下, DON 和 15AC-DON 产量与禾谷镰刀菌接种量呈剂量依赖关系,60 d 内二毒素积累存在前期、中期和后期的动态变化规律。

致谢:感谢四川农业大学植物病理教研室陈华宝老师提供禾谷镰刀菌产毒菌株,感谢四川省饲料站程传民老师在毒素测定工作中给予的指导和帮助。

参考文献

- [1] Carballo D, Font G, Ferrer E, Berrada H. Evaluation of mycotoxin residues on ready-to-eat food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry in tandem. *Toxins*, 2018, 10(6): 243.
- [2] 朱风华, 陈甫, 刘文华, 徐进栋, 朱连勤. 2016 年山东省饲料原料及配合饲料霉菌毒素污染状况调查. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(6): 159-163.
- [3] Tran ST, Smith TK, Girgis GN. A survey of free and conjugated deoxynivalenol in the 2008 corn crop in Ontario, Canada. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92(1): 37-41.
- [4] Zhen YG, Bai F, Zhang KY, Li Y, Ding XM, Feng Y. The rule of contamination and distribution of vomitoxin in main feedstuffs and products in China. *Chinese Journal of Animal Science*, 2009, 45(8): 21-24, 28. (in Chinese)
甄阳光, 柏凡, 张克英, 李云, 丁雪梅, 冯娅. 我国主要饲料原料及产品呕吐毒素污染分布规律研究. *中国畜牧杂志*, 2009, 45(8): 21-24, 28.
- [5] Zhang XL, Sun W, Zhang HY, Yang QY. Progress in toxicity and biological detoxification of deoxynivalenol. *Food Science*, 2016, 37(17): 245-251. (in Chinese)
张晓莉, 孙伟, 张红印, 杨其亚. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的毒性及生物脱毒研究进展. *食品科学*, 2016, 37(17): 245-251.
- [6] Cai JP, Liu XY, Zhai HC. Progress on the regulation of don toxin produced by *Fusarium graminearum*. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2016, 37(1): 114-119. (in Chinese)
蔡静平, 刘新影, 翟焕趁. 禾谷镰刀菌 DON 毒素生物合成调控研究进展. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2016, 37(1): 114-119.
- [7] Xu DY, Wang W, Chen XP, Lin XH, Li YW, Li FQ. Screening of toxin production influence factors of *Fusarium graminearum* with predictive microbiology method. *Chinese Journal of Public Health*, 2013, 29(1): 72-76. (in Chinese)
徐得月, 王伟, 陈西平, 林肖惠, 李玉伟, 李凤琴. 禾谷镰刀菌产毒影响因子预测微生物学筛选. *中国公共卫生*, 2013, 29(1): 72-76.
- [8] Jiang YJ, Xu W, Chen XF, Zhu DF, Geng FF, Fan MX, Gong JJ, Li Y, Feng SB, Wu JJ, Wang XC. Extraction, purification and concentration determination of deoxynivalenol. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(9): 1771-1777. (in Chinese)

- 姜云晶, 许伟, 陈晓芳, 朱电峰, 耿芳芳, 范梦雪, 宫佳杰, 李玉, 冯士彬, 吴金节, 王希春. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇提取、纯化及含量检测. *中国兽医学报*, 2017, 37(9): 1771–1777.
- [9] Ramirez ML, Chulze S, Magan N. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 106(3): 291–296.
- [10] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB 1353-2018 玉米. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [11] Zhao XT. Test on low temperature vacuum drying technology to dry corn of high moisture content. *Grain Storage*, 2007, 36(4): 51–53, 56. (in Chinese)
赵祥涛. 高水分玉米真空低温干燥工艺生产性试验研究. *粮食储藏*, 2007, 36(4): 51–53, 56.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 13078-2017 饲料卫生标准. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [13] Cai JP, Wei X, Huang SX, Zhang H. Effects of temperature on safe moisture and mould development of stored wheat. *Cereal & Feed Industry*, 2012, (5): 18–21. (in Chinese)
蔡静平, 魏鑫, 黄淑霞, 张航. 温度对小麦安全储藏水分及霉菌活动的影响. *粮食与饲料工业*, 2012, (5): 18–21.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 30956-2014 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 13092-2006 饲料中霉菌总数的测定. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [16] 国家质量技术监督局. GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [17] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 6432-2018 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 6433-2006 饲料中粗脂肪的测定. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 6434-2006 饲料中粗纤维的含量测定 过滤法. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [20] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.9-2016 食品安全国家标准 食品中淀粉的测定. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准, 食品中酸价的测定. GB 5009.229-2016 饲料卫生标准. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [22] 河北省质量技术监督局. DB13/T 812-2006 大豆及其制品蛋白质溶解度的测定. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [23] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术. 第3版. 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 82–94.
- [24] Alvarez E, Cardoso M, Depetris G, Castellari C, Cristos D, Montiel MD, Bartosik R. Storage of WDGS under hermetic and non-hermetic conditions: effect on sensory properties, microorganisms, mycotoxins and nutritional value. *Journal of Stored Products Research*, 2019, 80: 65–70.
- [25] Singh SP, Kaur S, Singh D. Toxicological profile of Indian foods-ensuring food safety in India//Gupta RK, Dudeja, Minhas S. *Food Safety in the 21st Century: Public Health Perspective*. Amsterdam: Academic Press, 2017: 111–127.
- [26] 周闯. 饲料中DON的污染情况调查及DON制备工艺的研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2014.
- [27] 尹珺, 张爱华, 何成华, 张海彬. DON 毒素的提取、纯化. (2007-12-14). <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/200712-279>.
- [28] López-Berges MS, Rispaill N, Prados-Rosales RC, Di Pietro A. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell*, 2010, 22(7): 2459–2475.
- [29] 顾沁. 禾谷镰刀菌中TOR信号途径与MAPK信号途径互作机制研究. 浙江大学博士学位论文, 2015.
- [30] Ruijter GJG, Visser J. Carbon repression in aspergilli. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 151(2): 103–114.
- [31] Kumar L, Breakspear A, Kistler C, Ma LJ, Xie XH. Systematic discovery of regulatory motifs in *Fusarium graminearum* by comparing four *Fusarium* genomes. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 208.
- [32] Ronne H. Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics*, 1995, 11(1): 12–17.

Quality variation and deoxynivalenol accumulation in corn inoculated with *Fusarium graminearum* under aerobic conditions

Shanshan Yan, Guangmang Liu, Jianping Wang, Yan Lin, Shiping Bai, Keying Zhang, Caimei Wu*

Institute of Animal Nutrition, Key Laboratory for Animal Disease-Resistance Nutrition and Feedstuffs of China Ministry of Agriculture and Rural Affairs and Sichuan Province. Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichun Province, China

Abstract: [Objective] The objective of this trial is to investigate the quality variation and the accumulation of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol in corn with different *Fusarium graminearum* inoculation under aerobic conditions. [Methods] Single factor experiment design was used, the inoculation amount of *Fusarium graminearum* was 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 conidia/g, the corn moisture was 22%, cultured in a Erlenmeyer flask, and the oxygen flux was $1020 \text{ m}^2/\text{m}^3$. The temperature was $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, the humidity was $75\% \pm 5\%$, and the culture time was 60 d. The quality index and two toxins content in corn culture on different culture time were measured. [Results] The amino acid content had a quadratic curve variation ($P < 0.01$), the content of crude fat, starch and crude fiber decreased linearly ($P < 0.01$), the acid value increased linearly ($P < 0.01$), the protein solubility and energy decreased linearly ($P < 0.01$), the mold counting and content of deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol showed a quadratic curve variation ($P < 0.01$). The accumulation dynamic of deoxynivalenol was that the toxin production ranged from 0.17 to 0.23 mg/kg between 0–15 d, from 0.14 to 0.41 mg/kg between 16–20 d, from 0.06 to 0.15 mg/kg between 21–60 d. The accumulation dynamic of 15-acetyldeoxynivalenol was that the toxin production ranged from 1.11 to 5.28 mg/kg between 0 to 5 d, from 5.55 to 10.05 mg/kg between 6–15 d, from 4.68 to 12.06 mg/kg between 16–60 d. [Conclusion] The corn quality decreased gradually with the increase of *Fusarium graminearum* inoculation amount and culture time. There was a dose-dependent relationship between content of deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol and *Fusarium graminearum* inoculation amount. The accumulation dynamic of two toxins was found within 60 days.

Keywords: corn, *Fusarium graminearum*, quality, deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the School-enterprise Cooperation Project (2017009H900)

*Corresponding author. E-mail: zhuomuniao278@163.com

Received: 1 November 2019; Revised: 10 January 2020; Published online: 17 January 2020