

小麦籽粒中原型及修饰型脱氧雪腐镰刀菌烯醇的产生规律研究

范楷, 刘星, 郭文博, 张志岐, 孟佳佳, 杜颖, 聂冬霞*

(上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403)

摘要: **目的** 研究原型脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)及其修饰型的产生规律。**方法** 以小麦籽粒为培养材料, 辐照灭菌后接种禾谷镰刀菌, 并分别在不同温度(10、20、30 °C)和水活度(0.95、0.98 a_w)下培养不同时间(7、14、21、28、35 d)后, 运用超高效液相色谱-串联质谱检测 DON, 3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyl-deoxynivalenol, 3-ADON), 15-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyl-deoxynivalenol, 15-ADON)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷(deoxynivalenol-3-glucoside, D3G)的产量。**结果** 在所有培养条件下, 原型DON的产量均随时间延长而增加; 并于0.98 a_w, 20 °C下的第35 d达到最高值100490.0 μg/kg; 不同培养条件下, 修饰型DON的生成情况各不相同, 3-ADON、15-ADON和D3G分别于0.98 a_w, 20 °C下的第14、28和35 d达到各自产量最高值(3-ADON: 7583.5 μg/kg; 15-ADON: 592.0 μg/kg; D3G: 6806.4 μg/kg)。此外, 10 °C下, D3G/DON比值随时间延长先增高后降低, 而20、30 °C下D3G/DON比值随时间延长呈指数下降($r^2 > 0.90$)。**结论** 小麦籽粒中原型和修饰型DON的最适产生条件均为0.98 a_w, 20 °C。本研究可为DON及其修饰型的生物合成、日常监管、污染防控等提供理论基础和科学依据。

关键词: 禾谷镰刀菌; 小麦籽粒; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷

Production of free and modified forms of deoxynivalenol in wheat grain

FAN Kai, LIU Xing, GUO Wen-Bo, ZHANG Zhi-Qi, MENG Jia-Jia, DU Ying, NIE Dong-Xia*

(Institute for Agro-food Standards and Testing Technology, Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the production mechanisms of free and modified forms of deoxynivalenol (DON). **Methods** Irradiated wheat grains were inoculated artificially with *Fusarium graminearum* and then incubated at different temperatures (10, 20, 30 °C) and water activities (0.95, 0.98 a_w). After incubation of 7, 14, 21, 28 and 35 days, the production of DON, its modified forms of 3-acetyl-deoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyl-deoxynivalenol (15-ADON) and DON-3-glucoside (D3G), were quantified by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Results** DON contents increased gradually in time dependent manner in all conditions, and the highest yield was 100490.0 μg/kg on day 35 at 20 °C and 0.98 a_w.

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(G20150632)

Fund: Supported by Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program of China (G20150632)

*通讯作者: 聂冬霞, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: niedongxia@163.com

*Corresponding author: NIE Dong-Xia, Associate Professor, Institute for Agro-food Standards and Testing Technology, Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China. E-mail: niedongxia@163.com

However, the highest yields of 3-ADON, 15-ADON and D3G were observed on day 24, 18 and 35 at 20 °C and 0.98 a_w (3-ADON: 7583.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 15-ADON: 592.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; D3G: 6806.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$), respectively. In addition, the ratio of D3G/DON increased firstly and then decreased at 10 °C, and declined gradually at 20 °C and 30 °C, which could be well described by exponential model ($r^2>0.90$). **Conclusion** The optimum temperature for free and modified forms of DON production was 20 °C and the optimum water activity was 0.98 a_w . Our results could provide theoretical base and scientific foundation for biosynthesis, routine supervision, prevention and control of free and modified DON.

KEY WORDS: *Fusarium graminearum*; wheat grain; deoxynivalenol; acetyl-deoxynivalenol; deoxynivalenol-3- glucoside

1 引言

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON), 又名呕吐毒素(vomitoxin), 是由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)等产生的一种重要的单端孢霉烯族真菌毒素, 广泛存在于玉米、小麦等谷物及其制品中^[1]。DON 具有急性毒性(腹泻、呕吐、直肠出血等)和慢性毒性(厌食、体重减轻、发育不良等), 严重威胁食品安全和人畜健康, 已被联合国粮农组织和世界卫生组织确定为最危险的食物污染物之一^[2]。

镰刀菌侵染谷物后不单产生原型 DON, 也会生成其他衍生物, 如 3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyl-deoxynivalenol, 3-ADON)和 15-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyl-deoxynivalenol, 15-ADON)^[3]。另一方面, 出于自我保护机制, 被侵染的谷物自身也会通过糖基化、谷胱甘肽化等作用将原型 DON 转化为毒性较低的“隐蔽型”DON(masked DON), 其中最常见的是脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷(deoxynivalenol-3-glucoside, D3G)^[4]。衍生物型 DON 和隐蔽型 DON 均可称为修饰型 DON(modified DON)。多项调查发现, 修饰型 DON 往往与原型 DON 共存于谷物及谷物制品中, 如 Boevre 等在不同种类的谷类食品和饲料样品中均检出 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G^[5]; 李凤琴等检测了我国 7 个省份的玉米、小麦样品, 发现 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的检出率分别为 61%, 25%, 35%和 38%^[6]; 本课题组前期也检测了 31 份我国不同地区的饲料样品, 发现 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的检出率分别为 74%, 58%, 42%和 55%^[7]。

修饰型 DON 不但具有较高的污染水平, 其危害同样不容忽视, 研究表明 3-ADON 和 15-ADON 具有与原型 DON 类似的毒性, 且其在动物体内的吸收更快, 危害更大^[8]; 而 D3G 虽然自身毒性较低, 但其进入动物体内后会被水解而释放出原型 DON, 从而也表现出同等甚至更高水平的毒性^[9]。因此, 修饰型 DON 也越来越得到人们的关注与重视。联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JAFAC)于 2010 年提出, DON、3-ADON、

15-ADON 毒性相同, 单种和总和的暂定日内最大摄入量均不得超过 1 $\mu\text{g}/(\text{kg bw d})$ ^[10]; 欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)下的食物链污染物小组(CONTAM Panel)也于 2014 年提出在进行风险评估时, D3G 应和原型 DON 同样对待^[11]。因此, 加强对修饰型 DON 监管, 明确其在谷物中的产生规律至关重要。然而, 目前对修饰型 DON 的研究还不是很充分, 其在谷物中如何产生, 受温度、湿度等环境因素的影响尚缺乏系统考察, 极大限制了后续相关工作的开展。

本研究以可发芽小麦籽粒为培养材料, 辐照灭菌后接种禾谷镰刀菌, 采用超高效液相色谱串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)分析在不同培养温度、培养时间和水活度下 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的产生量, 探讨原型 DON 及其修饰型在不同培养条件下的产生规律, 明确其最适产毒条件, 为真菌毒素的监管、防控等提供理论和科学依据, 对保障食品质量和大众健康等具有重要的意义。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

ESS-010-03 直线电子加速器(日本 IHI 公司); 5804R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Heraguard ECO 超净台(美国 Thermo Fisher 公司); MJP-250 霉菌培养箱(上海精宏实验设备有限公司); SX-500 高压灭菌锅(日本 TOMY 公司); 4TE 水活度仪(美国 Aqua Lab 公司); HSC-24B 氮吹仪(上海楚定分析仪器有限公司); ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); TRIPLE QUADTM 5500 三重四级杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙酸铵、DON(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、D3G(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、3-ADON(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 15-ADON(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)标准品(美国 Sigma-Aldrich 公司); PDA 培养基(上海源叶生物科技有限公司); PDB 培养基(北京索莱宝科技有限公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水(美国 Millipore 公司)。

禾谷镰刀菌菌株 F4582 购自德国微生物菌种保藏中

心 DSMZ; 可发芽小麦籽粒购自上海奉贤易买得超市。

2.2 试验方法

2.2.1 小麦籽粒辐照处理

为除去细菌等微生物同时并保持籽粒的发芽活性,将小麦籽粒置于塑料自封袋(每袋约 1.5 kg),在上海束能辐照技术有限公司进行电子束辐照处理,剂量为 10 kGy。辐照后的小麦籽粒于 4 °C 保存备用。

2.2.2 菌株活化培养

将禾谷镰刀菌菌株 F4582 接种于 PDA 固体培养基,28 °C 黑暗培养 7 d 后,接种至 PDB 液体培养基中,25 °C 下 150 r/min 震荡继续培养 5 d。取孢子液,显微镜观察孢子浓度,用无菌水调整至 10^5 个/mL,用于后续接种。

2.2.3 小麦籽粒接种培养

超净台中准确称取 50 g 辐照灭菌后的小麦籽粒于 250 mL 无菌锥形瓶中,加入适量无菌水,调整水活度分别为 0.95 a_w 和 0.98 a_w ,并用无菌透气封口膜密封,震荡摇匀。每瓶接种 100 μ L 禾谷镰刀菌孢子液后分别置于 10, 20 和 30 °C 恒温培养箱黑暗培养不同时间(7, 14, 21, 28 和 35 d),每个培养条件设置 3 个重复。培养第一周,每天振荡锥形瓶,使菌丝与培养基充分接触,并防止小麦籽粒凝结成块。

2.2.4 样品处理

培养结束后,取小麦籽粒培养物于 50 °C 烘箱干燥,粉碎混匀后准确称取 2 g 粉碎样品于 50 mL 离心管,加入 10 mL 乙腈/水(84:16, V:V),旋涡震荡 1 min,浸泡 5 min 后,超声提取 1 h。4000 r/min 离心 10 min 后,取 5 mL 上清液,在 40 °C 下氮气吹干,1 mL 的 5 mmol/L 乙酸铵水溶液/甲醇(80:20, V:V)溶解残渣,涡旋 30 s,超声 1 min,再涡旋 30 s,充分溶解后,适量稀释,过 0.22 μ m 滤膜,UPLC-MS/MS 测定。

2.2.5 UPLC-MS/MS 检测条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 3.0 mm, 2.7 mm); 流动相: 流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液,流动相 B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~1 min, 10%B; 1~10 min, 10%B~25%B; 10~11 min, 25%B~90%B; 11~11.5 min, 90%B; 11.5~11.6 min, 90%B~10%B; 11.6~13 min, 10%B; 流速 0.4 mL/min; 进样量 3 μ L; 柱温 40 °C。

采用电喷雾电离源(ESI)正负离子模式同时扫描; 雾化气、辅助气均为高纯空气,碰撞气为高纯氮气; 雾化气:

50 Psi; 辅助气: 50 Psi; 雾化温度: 500.0 °C; 喷雾电压: 5500 V; 喷雾电压气帘气: 35 Psi; 碰撞气: 8 Psi; 通过多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式对目标化合物准确定量, DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的母离子、子离子、碰撞电压等质谱参数见表 1。

2.2.6 方法学验证

通过考察线性、检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)、回收率和精密度来评价所建立分析方法的灵敏度、准确性和重复性。分别移取适量 DON 原型及修饰型毒素标准品溶液用乙腈配制质量浓度为 1 mg/L 的混合标准工作液。以不含目标毒素的小麦籽粒为空白样品,按 2.2.4 操作,得到空白基质溶液。用空白基质溶液稀释标准工作液得到 1、2、5、10、20、50、100 和 200 μ g/L 浓度的基质标准溶液,以毒素浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,建立 4 种真菌毒素的基质标准曲线并用于样品浓度测定。以定性离子通道的 3 倍信噪比(signal-to-noise ratio, S/N)确定目标毒素的 LOD、定量离子通道的 10 倍信噪比确定目标毒素的 LOQ。采用加标回收试验法考察回收率和精密度。选取空白小麦籽粒样品分别按照添加浓度 5、50 和 100 μ g/kg 加入适量的标准工作液,每个浓度选取 5 个平行样。按 2.2.4 和 2.2.5 处理样品和测定浓度,回收率为测定值和理论值的百分比,日内精密度和日间精密度分别为同一天和连续 5 d 测定结果的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

3 结果与分析

3.1 原型及修饰型 DON 含量测定的方法学验证

方法学试验结果表明,小麦籽粒中原型及修饰型 DON 在各自范围内线性关系良好,相关系数(r^2)均大于 0.99(表 2)。DON 的定量限为 2 μ g/kg,检出限为 1 μ g/kg; 3-ADON, 15-ADON 和 D3G 的定量限均为 1 μ g/kg,检出限均为 0.5 μ g/kg。加标回收试验结果表明,4 种真菌毒素的回收率范围为 74.81%~114.28%($n=5$),精密度(RSD)范围为 1.3%~14.4%($n=5$)(表 3)。以上数据表明,采用的分析方法灵敏、准确、可靠,满足本试验中对小麦籽粒中 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的准确定量。标准溶液和实际接种培养小麦籽粒中 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的 MRM 图谱如图 1 所示。

表 1 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的质谱参数
Table 1 MS/MS spectrometry parameters for DON, 3-ADON, 15-ADON and D3G

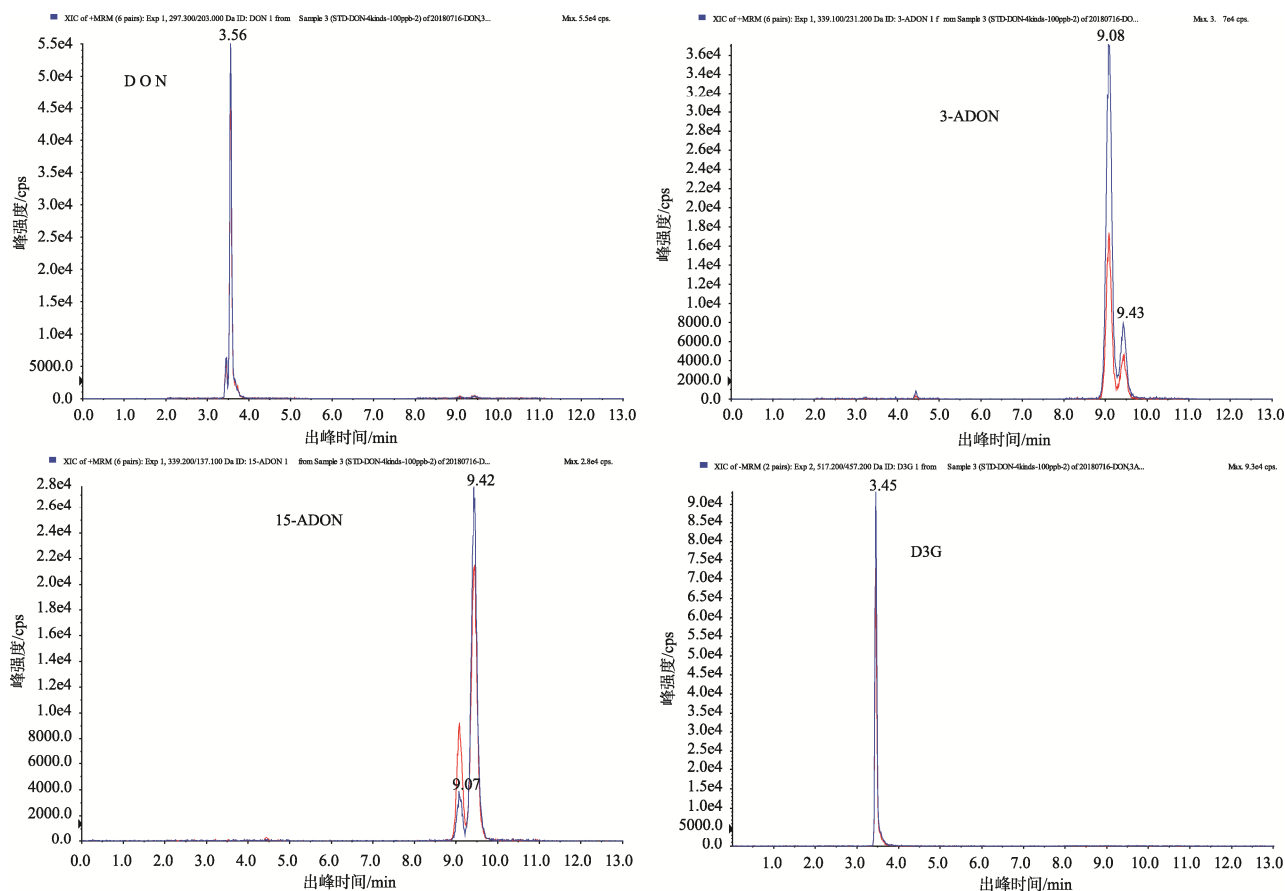
	母离子	量子离子	碰撞电压/eV	定性子离子	碰撞电压/eV	离子化模式
DON	297.3	203.0	28	175.1	28	ES ⁺
D3G	517.2	457.2	18	427.2	27	ES ⁻
3-ADON	339.1	231.2	16	203.3	19	ES ⁺
15-ADON	339.2	137.1	15	261.2	16	ES ⁺

表2 小麦籽粒中 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的线性、检出限和定量限
Table 2 linearities, LODs and LODs of DON, 3-ADON, 15-ADON and D3G in wheat grain

	标准曲线	r^2	线性范围 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	LOQ/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
DON	$Y=3652.8X+22170.9$	0.999	2~200	1	2
3-ADON	$Y=6799.0X+7730.1$	0.999	1~200	0.5	1
15-ADON	$Y=4874.7X-4116.9$	0.998	1~200	0.5	1
D3G	$Y=7094.9X+14688.8$	0.994	1~200	0.5	1

表3 小麦籽粒中 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的加标回收率与精密度($n=5$)
Table 3 Recoveries, intra- and inter-day precisions of DON, 3-ADON, 15-ADON and D3G in wheat grain ($n=5$)

	低添加水平($5 \mu\text{g}/\text{kg}$)			中添加水平($50 \mu\text{g}/\text{kg}$)			高添加水平($100 \mu\text{g}/\text{kg}$)		
	回收率/%	日内精密度/%	日间精密度/%	回收率/%	日内精密度/%	日间精密度/%	回收率/%	日内精密度/%	日间精密度/%
DON	98.33	9.9	11.0	84.26	7.5	8.3	82.28	8.4	6.9
3-ADON	79.02	6.2	4.9	74.81	4.4	5.8	80.13	3.6	3.2
15-ADON	94.91	5.4	6.7	92.05	1.3	4.2	91.71	2.9	9.4
D3G	104.49	13.1	5.0	114.28	6.3	14.4	105.65	4.1	9.1

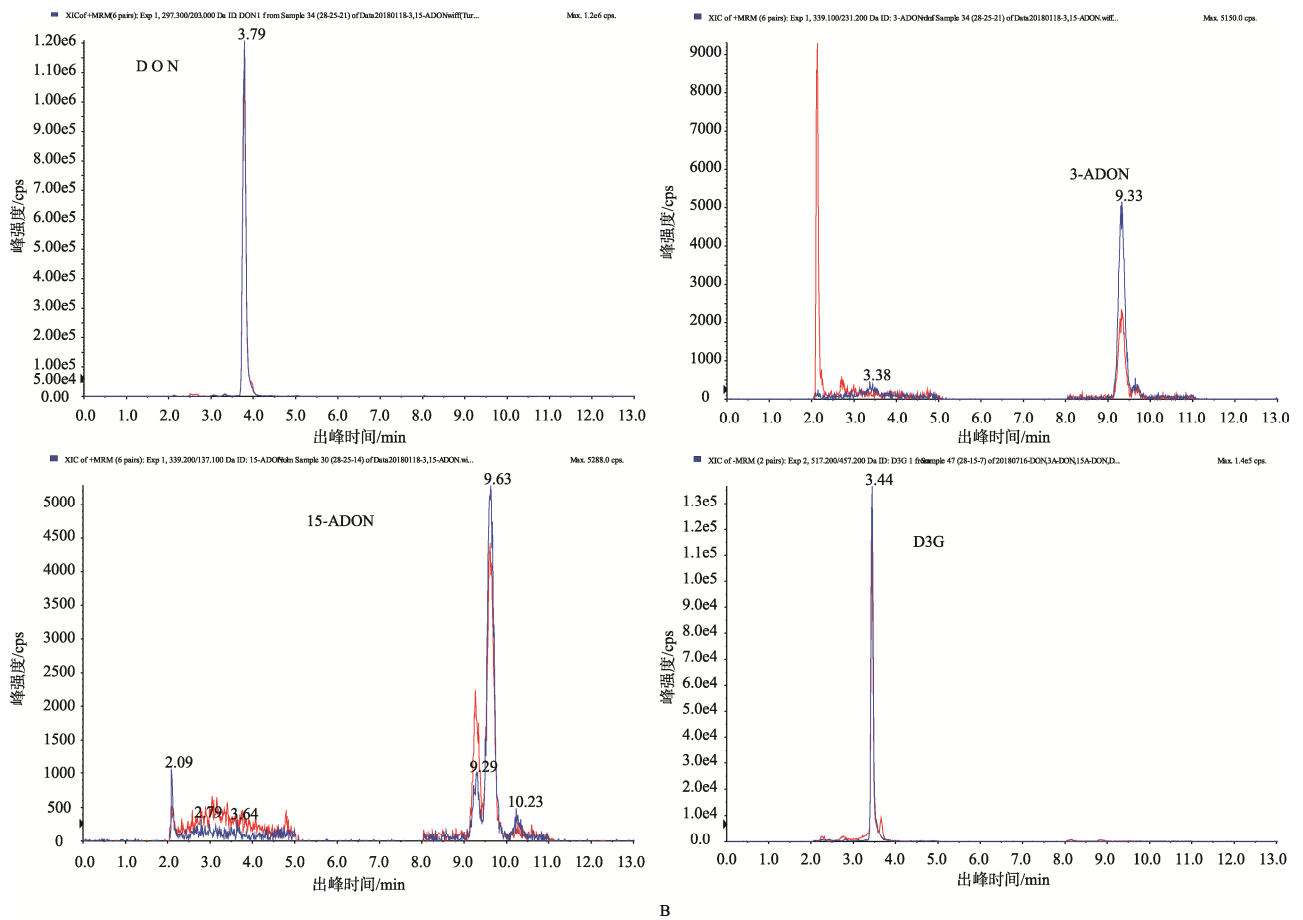


A

注: A: 标准溶液($100 \mu\text{g}/\text{L}$)。

图1 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的 MRM 图谱

Fig.1 MRM chromatograms of DON, 3-ADON, 15-ADON and D3G



注: B: 小麦籽粒。

续图 1 DON、3-ADON、15-ADON 和 D3G 的 MRM 图谱

Fig.1 MRM chromatograms of DON, 3-ADON, 15-ADON and D3G

3.2 不同培养条件下小麦籽粒中 DON 产生情况

不同培养条件下接种小麦籽粒中 DON 的产生情况如图 2 所示。可见, 在不同水活度及温度培养下, DON 的产量均随时间延长而增加; 在同一时间点, DON 的产量与水活度成正比, 而 20 °C 时 DON 的产量比在 10 °C 和 30 °C 时更高。总之, 在 0.98 a_w 和 20 °C 培养条件下, 小麦籽粒中 DON 产量最高, 第 35 d 可达 100490.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在 0.95 a_w 和 10 °C 培养条件下, DON 产量最低, 第 35 d 为 9831.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

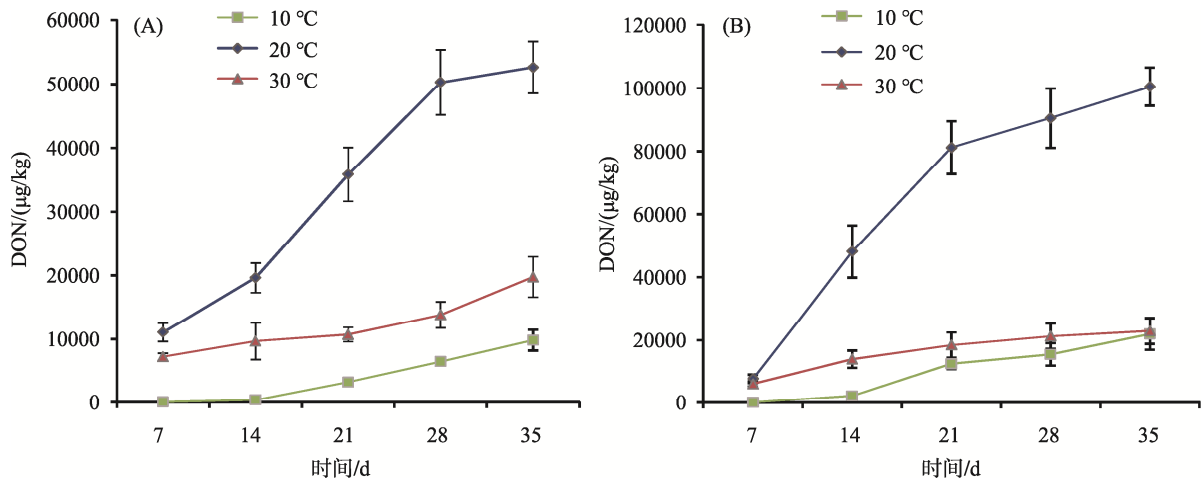
3.3 不同培养条件下小麦籽粒中 3-ADON 和 15-ADON 产生情况

不同培养条件下小麦籽粒中 3-ADON 的产生情况如图 3 所示。2 种水活度条件下, 10 °C 时, 3-ADON 的含量均随时间延长而增加; 而 20 °C 和 30 °C 时 3-ADON 的含量均随时间延长而先增加后降低, 并分别于第 28 d 和第 14 d 到达最高点。0.98 a_w , 20 °C 时, 3-ADON 在第 28 d 产量最高, 达到 7583.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

与 3-ADON 相比, 15-ADON 在小麦籽粒中的产量较低(图 4)。在 10 °C 和 20 °C 时, 2 种水活度条件下, 15-ADON 的产量均随时间延长而增加; 而在 30 °C 时, 0.95 a_w 和 0.98 a_w 下, 15-ADON 的产量分别于第 21 d 和 14 d 达到最高值, 随后逐渐下降。与 3-ADON 一样, 在 20 °C、0.98 a_w 下, 15-ADON 产量最高, 在第 35 d 达到 592.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.4 不同培养条件下小麦籽粒中 D3G 产生情况

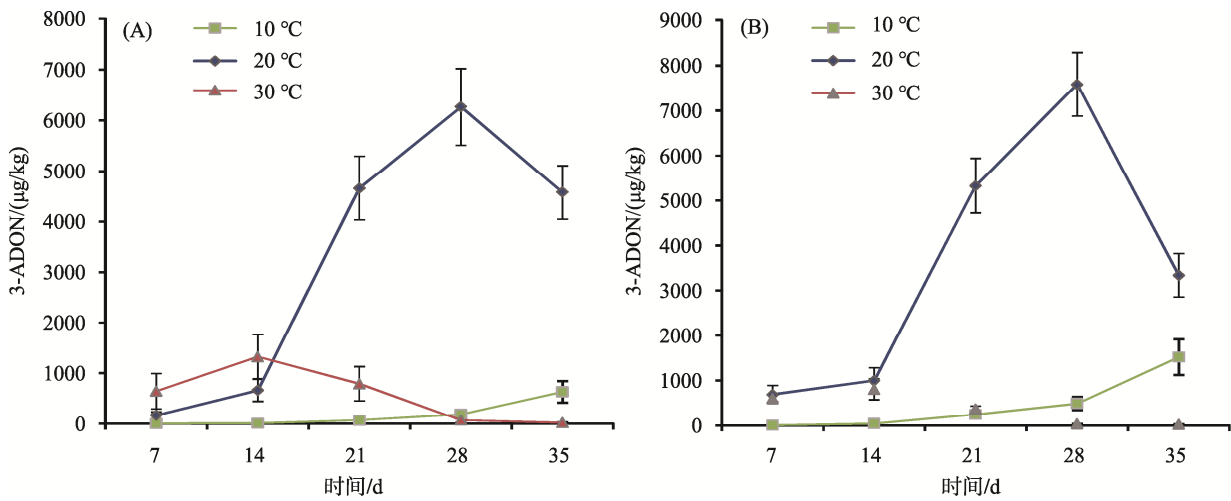
不同水活度、温度和培养时间下接种小麦籽粒中 D3G 的产生情况如图 5 所示。在 0.95 a_w 、10 °C 时, D3G 含量先逐渐升高, 第 28 d 达到最高值, 随后下降; 而 20 °C 和 30 °C 条件下, D3G 含量均于第 7 d 即达到最高, 随后随时间增加而下降。在 0.98 a_w 下, 10 °C 和 20 °C 时, D3G 含量先升高后降低, 分别于第 28 d 和 14 d 产量达到最高; 而 30 °C 下, D3G 含量同样于第 7 d 最高, 随后逐渐下降。同样, 在 0.98 a_w , 20 °C, 培养到第 14 d 的小麦籽粒中 D3G 的含量最高, 可达 6806.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。



注: (A)水活度 0.95 a_w , (B)水活度 0.98 a_w 。

图 2 不同培养温度、水活度、培养时间下 DON 的产量($n=3$)

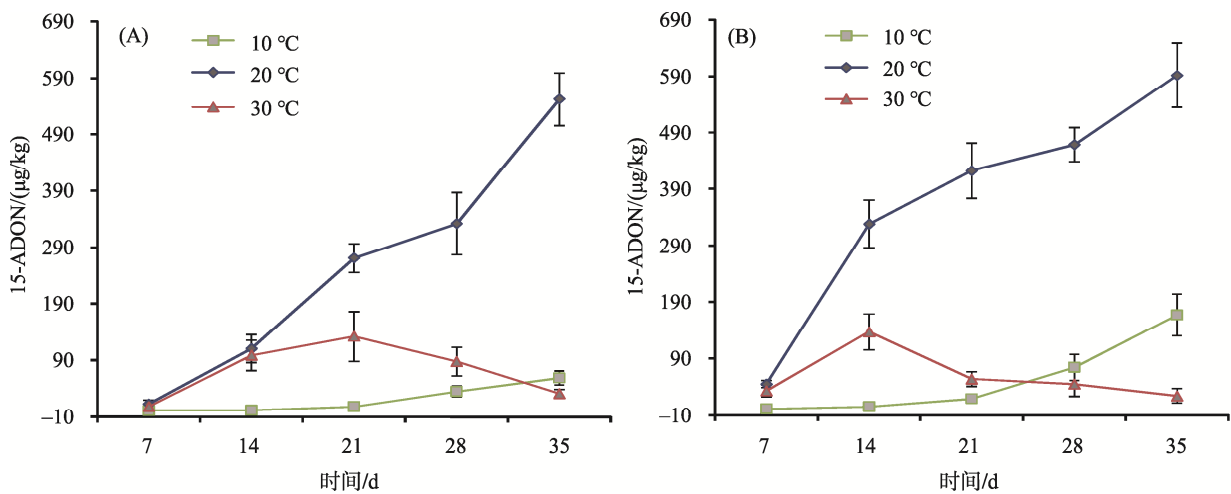
Fig.2 Production of DON in different temperatures, water activities and incubation time ($n=3$)



注: (A)水活度 0.95 a_w , (B)水活度 0.98 a_w 。

图 3 不同培养温度、水活度、培养时间下 3-ADON 的产量($n=3$)

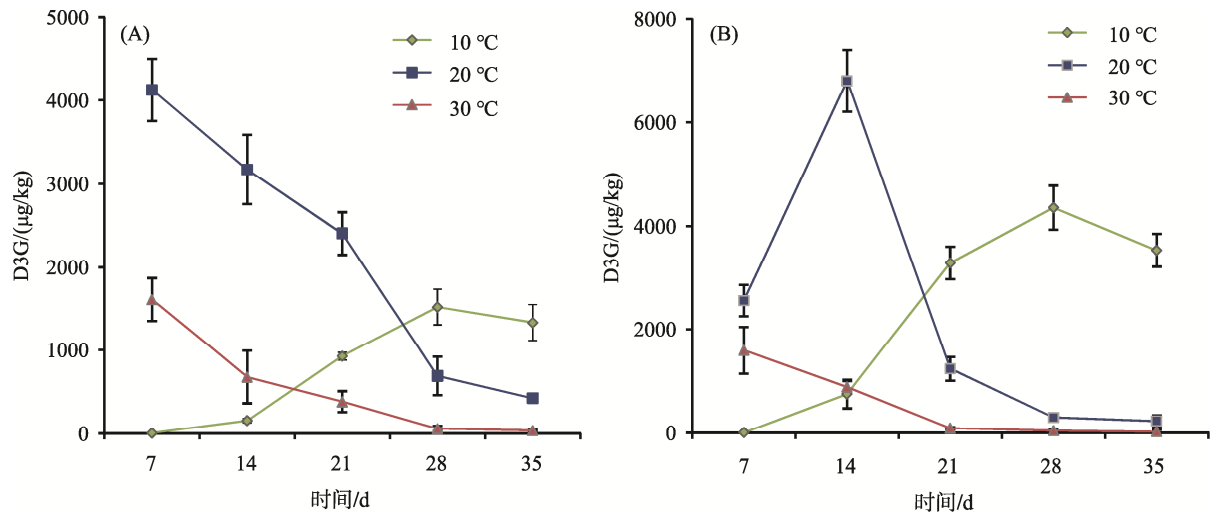
Fig.3 Production of 3-ADON in different temperatures, water activities and incubation time ($n=3$)



注: (A)水活度 0.95 a_w , (B)水活度 0.98 a_w 。

图 4 不同培养温度、水活度、培养时间下 15-ADON 的产量($n=3$)

Fig.4 Production of 15-ADON in different temperatures, water activities and incubation time ($n=3$)



注: (A)水活度 0.95 a_w, (B)水活度 0.98 a_w。

图5 不同培养温度、水活度、培养时间下 D3G 的产量(n=3)

Fig.5 Production of D3G in different temperatures, water activities and incubation time (n=3)

3.5 不同培养条件下小麦籽粒中 3-ADON、15-ADON 和 D3G 占 DON 的比值

不同水活度、温度和培养时间下小麦籽粒中 3-ADON、15-ADON 和 D3G 占 DON 的比值情况如图 6 所示。在不同培养条件下, 3-ADON/DON 和 15-ADON/DON 呈现不同的变化情况, 并无统一规律。形成对比的是, 在 10 °C, 2 种水活度下, D3G/DON 比值均随时间延长先升高后降低; 而 20 °C 和 30 °C 时, 2 种水活度下 D3G/DON 比值均在第 7 d 即达到最高, 随后逐渐下降, 至第 35 d 接近为 0; 运用指数模型模拟此条件下 D3G/DON 比值变化情况(图 7), R² 均在 0.90 以上。因此, 在 20 °C 和 30 °C, 0.95 a_w 和 0.98 a_w 的培养条件下, D3G/DON 比值随时间延长而呈指数形式下降。

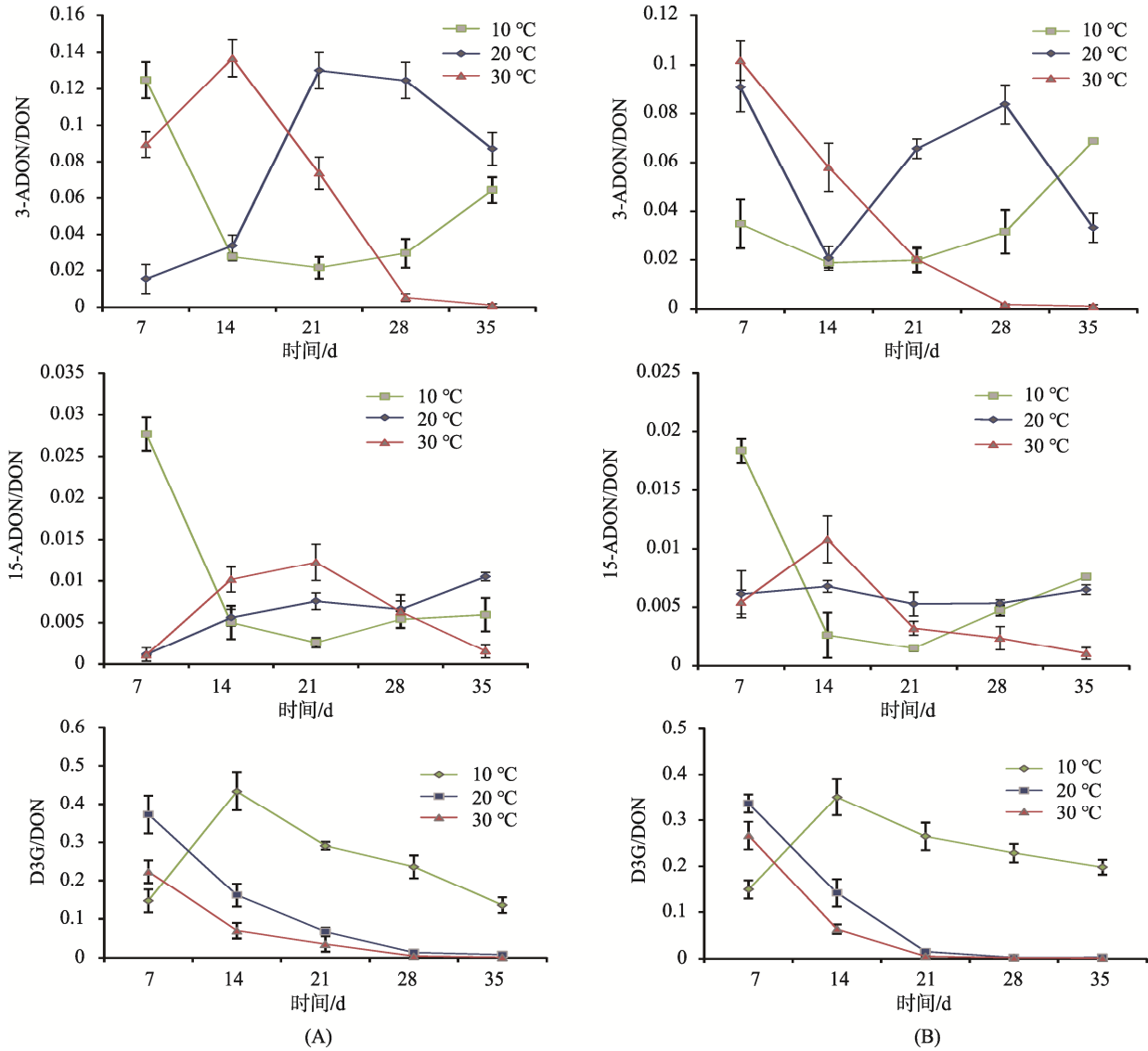
4 讨论

修饰型 DON 由于高污染水平, 与原型 DON 同等甚至更高的毒性作用, 已越来越得到人们关注, 成为当今世界研究热点。为模拟 DON 侵染作物过程, 保证作物自身活性, 本研究以辐照灭菌后的可发芽小麦籽粒为培养基, 接种高产毒禾谷镰刀菌株 F4582, 测定不同培养条件下原型 DON 及其衍生物 3-ADON、15-ADON 和隐蔽型毒素 D3G 的生成量, 探讨小麦籽粒中修饰型 DON 的产生规律。

温度和水活度是影响原型 DON 生成的关键环境因素, 两者在真菌感染作物和产生毒素等环节中均起到至关重要的调控作用^[12]。有研究表明, 禾谷镰刀菌产生 DON 的温度范围为 10~37 °C, 水活度范围为 0.935~0.995 a_w^[13]。本试验中, 所有条件下 DON 均可生成, 而在 20 °C、0.98 a_w 时, 小麦籽粒中 DON 产生量最高, 与之前研究报道 DON 在玉米(22 °C, 0.97 a_w)、小麦(25 °C, 0.98 a_w)和香菇(20 °C, 0.98 a_w)等中的最适产生条件相似^[14-16], 但不同研究中 DON 最高产

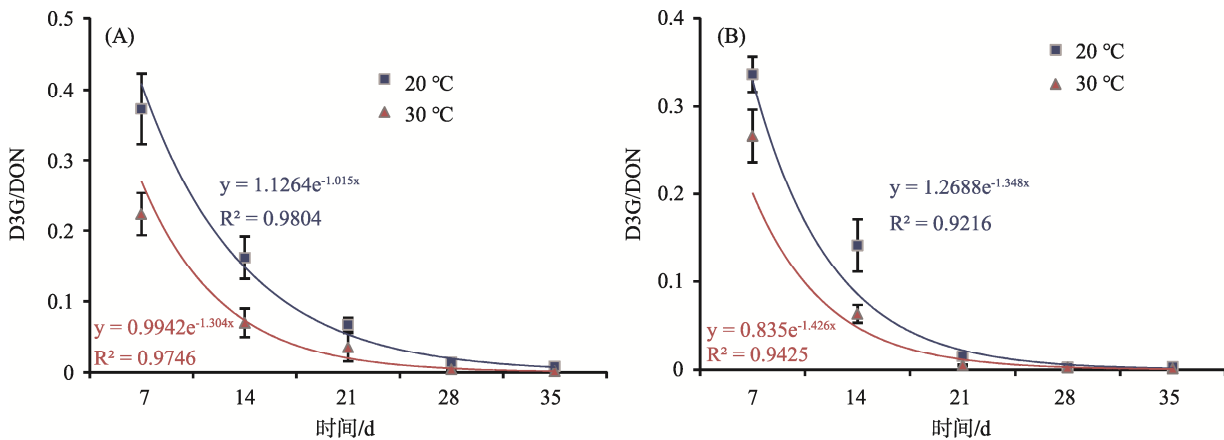
量各不相同, 可能归结于各自产毒菌株种类和培养基的差异。另一方面, 本试验中, 在所有培养条件下 DON 的产量均随时间延长而增加, 与 Hope 等的结果一致^[15]; 然而崔莉和 Ramirez 等发现在某些条件下, 小麦中 DON 产量会随时间延长先上升后下降^[17,18]。除菌株和培养基的差别外, 一种可能是本试验中观测时间较短, 而多数研究中 DON 产量的下降均发生在 35 d 后^[19]。DON 产量下降的原因还不是很清楚, 可能是由于小麦籽粒营养物质的消耗、菌丝自身老化、抑制性代谢产物的积累以及形成新的结合物等^[20]。

与原型毒素一样, 修饰型 DON, 包括衍生物 3-ADON、15-ADON 和隐蔽型毒素 D3G 的产生同样受到温度和水活度的调控, 其最适产生条件也均为 20 °C、0.98 a_w; 然而, 不同毒素的具体产生情况又各不相同。目前, 有关 3-ADON 和 15-ADON 在谷物中的产生规律研究还较少。本试验结果发现, 所有培养条件下, 均有 3-ADON 和 15-ADON 生成, 而同样条件下 3-ADON 产量均高于 15-ADON 产量。为更好地描述 DON 向其乙酰化衍生物转化的情况, 本研究考察了不同培养条件下 3-ADON/DON 和 15-ADON/DON 比值的变化情况; 结果并无可统一规律可被归纳, 这可能归结于 DON 乙酰化衍生物的合成调控更为复杂。乙酰化 DON 是 DON 生物合成的直接前体: 起始底物焦磷酸法尼酯(farnesyl pyrophosphate)通过一系列反应生成 3, 15-diADON, 然后在 *Tri8* 基因编码的去乙酰转移酶催化下形成 3-ADON 和 15-ADON, 进一步羟基化最终生成 DON^[21]。有研究认为, 出于真菌的自我保护机制, 当原型毒素产量超过一定限度时, DON 可转变回 3-ADON 和 15-ADON^[22]; 另一方面, 当禾谷镰刀菌侵染小麦时, 小麦自身的去乙酰转移酶又会将 3-ADON 和 15-ADON 的乙酰基去除而转化为原型 DON^[23]。因此, 3-ADON 和 15-ADON 的产生受到菌株自身、侵染宿主及外界环境的共同调节, 其产生规律和具体机制还需进一步深入研究。



注: (A)水活度 0.95 a_w , (B)水活度 0.98 a_w 。

图6 不同培养温度、水活度、培养时间下小麦籽粒中3-ADON/DON、15-ADON/DON和D3G/DON的变化情况(n=3)
Fig.6 Ratios of 3-ADON/DON, 15-ADON/DON and D3G/DON in different temperatures, water activities and incubation time (n=3)



注: (A)水活度 0.95 a_w , (B)水活度 0.98 a_w 。

图7 指数模型拟合不同培养温度、水活度下小麦籽粒中D3G/DON比值与培养时间的关系(n=3)
Fig.7 Correlation between the D3G/DON ratio and incubation time in different temperatures and water activities (n=3)

与3-ADON和15-ADON由禾谷镰刀菌自身合成不同,隐蔽型毒素D3G是由原型DON在植物脱毒过程中在糖基转移酶(glucosyltransferases)作用下形成的代谢产物^[24]。目前关于D3G产生规律报道还很少, Maul等研究发现小麦、大麦和黑麦等发芽过程中可将DON转化为D3G;特别在小麦中,D3G在培养前5d随时间逐渐增加,随后趋于停止^[25]。本试验从第7d开始检测,因此大部分培养条件下未观测到D3G产量增加,而是在不同的时间点开始均随时间而下降。D3G/DON比值是反映作物将DON原型转化为D3G效率的一个重要指标,与禾谷镰刀菌引起的赤霉病发病率和病情指数显著负相关^[26,27],且不同时间、区域和种类的作物中D3G/DON比值均存在差异^[28]。本研究发现,在10℃、2种水活度下D3G/DON比值均先升高后降低,而在20℃和30℃下,D3G/DON比值均在第7d达到最高,然后随时间延长而呈指数下降。D3G的生成主要受到底物DON产量和小麦糖基转移酶活性两者的影响,因此,20℃和30℃下D3G/DON比值的降低可能主要由以下两方面原因导致,一方面是由于DON产量随时间的增加而显著提高,另一方面是由于小麦籽粒中负责将DON向D3G转化的糖基转移酶和葡萄糖底物等的逐渐消耗直至殆尽;而10℃下,D3G/DON比值的先升高后降低则可能与低温条件下小麦发芽迟缓、糖基转移酶的转录较慢及酶活性较低等因素有关。

5 结论

本研究将禾谷镰刀菌F4582接种于可发芽小麦籽粒,初步探讨了不同温度、水活度和培养时间下DON原型及其修饰型的产生规律。结果表明,温度、水活度和培养时间均是影响DON、3-ADON、15-ADON和D3G生成的关键因素。在所考察的培养环境下,4种毒素的最适产生条件均为0.98_{a_w}、20℃,而在低温、低水活度条件下,其产量相对较低。因此在谷物及其制品的加工、储存和运输等过程中应尽可能的选择低温和干燥环境,以防止毒素的生成。

参考文献

- [1] Alizadeh A, Braber S, Akbari P, *et al.* Deoxynivalenol and its modified forms: Are there major differences? [J] *Toxins*, 2016, 8: 334.
- [2] 黄凯, 黄明明, 朱祖贤, 等. 呕吐毒素毒性研究进展[J]. 饲料博览 2013, (12): 8-11.
Huang K, Huang MM, Zhu ZX, *et al.* Research progress on toxicity of DON [J]. *Feed Rev*, 2013, (12): 8-11.
- [3] Pestka JJ. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance [J]. *Arch Toxicol*, 2010, 84: 663-679.
- [4] Rychlik M, Humpf HU, Marko O, *et al.* Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins [J]. *Mycotoxin Res*, 2014, 30: 197-205.
- [5] Boevre MD, Mavungu JDD, Landschoot S, *et al.* Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products [J]. *World Mycotoxin J*, 2012, 5: 207-219.
- [6] 李凤琴, 于钊钊, 邵兵, 等. 2007-2008年中国谷物中隐蔽型脱氧雪腐镰刀菌烯醇及多组分真菌毒素污染状况[J]. 中华预防医学杂志 2011, 45: 57-63.
Li FQ, Yu CC, Shao B, *et al.* Nature occurrence of masked deoxynivalenol and multi-mycotoxins in cereals from China harvested in 2007 and 2008 [J]. *Chin J Prev Med*, 2011, 45: 57-63.
- [7] Fan Z, Bai B, Jin P, *et al.* Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of four type B trichothecenes and masked deoxynivalenol in various feed products [J]. *Molecules*, 2016, 21: 747.
- [8] Kadota T, Furusawa H, Hirano S, *et al.* Comparative study of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol on intestinal transport and IL-8 secretion in the human cell line Caco-2 [J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(6): 1888-1895.
- [9] 余佃贞, 田野, 武爱波. 食中隐蔽型真菌毒素污染的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报 2018, 9(2): 349-354.
Yu DZ, Tian Y, Wu AB. Research advance of masked mycotoxins contaminated in grains [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(2): 349-354.
- [10] JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives. Summary and conclusions [C]. Seventy-Second Meeting, Rome, Italy. 2010.
- [11] EFSA. Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed [J]. *EFSA J*, 2014, 12: 3916.
- [12] 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[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37: 114-119.
Cai JP, Liu XY, Zhai HC. Progress on the regulation of DON toxin produced by *Fusarium graminearum* [J]. *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2016, 37: 114-119.
- [13] Czembor E, Stępień L, Waskiewicz A. Effect of environmental factors on *Fusarium* species and associated mycotoxins in maize grain grown in Poland [J]. *PLoS One* 2015, 10: e0133644.
- [14] Martins MLG, Martins HM. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum* [J]. *Food Chem*, 2002, 79: 315-318.
- [15] Hope R, Aldred D, Magan N. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2005, 40: 295-300.
- [16] Han Z, Shen Y, Mavungu JDD, *et al.* Relationship between environmental conditions, TRI5 gene expression and deoxynivalenol production in stored *Lentinula edodes* infected with *Fusarium graminearum* [J]. *World Mycotoxin J*, 2018, 11: 177-186.
- [17] 崔莉, 刘阳, 邢福国. 小麦籽粒中结合态脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素产生规律研究[J]. 核农学报, 2013, 27: 56-60.
Cui L, Liu Y, Xing FG. Production of bound deoxynivalenol by *Fusarium graminearum* in wheat grain [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2013, 27: 56-60.
- [18] 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 [J]. *Int J Food Microbiol*, 2006, 106: 291-296.
- [19] Cambaza EM, Koseki S, Kawamura S. Meta-analytic review on the impact of temperature and water activity in deoxynivalenol synthesis by *Fusarium*

- graminearum [J]. Food Res, 2018, 2: 443–446.
- [20] Berthiller F, Schuhmacher R, Adam G, *et al.* Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 395: 1243–1252.
- [21] 王龔, 王刘庆, 刘阳. 食品中主要真菌毒素生物合成途径研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2158–2167.
Wang Y, Wang LQ, Liu Y. Research advances on biosynthetic pathways of the common mycotoxins in food [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(6): 2158–2167.
- [22] 俞刚, 陈利锋, 柴一秋. 禾谷镰孢单端孢霉烯族毒素在小麦组织中的积累[J]. 植物病理学报, 2002, 32: 142–146.
Yu G, Chen LF, Chai YQ. Accumulation of trichothecenes of *Fusarium graminearum* in wheat tissues [J]. Acta Phytopathol Sin, 2002, 32: 142–146.
- [23] Alexander NJ, McCormick SP, Waalwijk C, *et al.* The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in fusarium [J]. Fungal Genet Biol, 2011, 48: 485–495.
- [24] Karlovsky P. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91: 491–504.
- [25] Maul R, Müller C, Rieß S, *et al.* Germination induces the glucosylation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various grains [J]. Food Chem, 2012, 131: 274–279.
- [26] Audenaert K, De Boevre M, Vanheule A, *et al.* Mycotoxin glucosylation in commercial wheat varieties: Impact on resistance to Fusarium graminearum under laboratory and field conditions [J]. Food Control, 2013, 34: 756–762.
- [27] Dall'Asta C, Dall'Erta A, Mantovani P, *et al.* Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in durum wheat [J]. World Mycotoxin J, 2013, 6: 83–91.
- [28] Lemmens M, Steiner B, Sulyok M, *et al.* Masked mycotoxins: Does breeding for enhanced Fusarium head blight resistance result in more deoxynivalenol-3-glucoside in new wheat varieties? [J]. World Mycotoxin J, 2016, 9: 741–754.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



范楷, 助理研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。

E-mail: fankai1983@foxmail.com



聂冬霞, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。

E-mail: niedongxia@163.com