

DOI:CNKI:61-1390/S.20120223.1728.034

网络出版时间:2012-02-23 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120223.1728.034.html>

赭曲霉毒素产生菌筛选方法的对比与优选

蒋春美^a, 师俊玲^a, 刘延琳^b

(西北农林科技大学 a 食品科学与工程学院, b 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】探求一种能够快速、准确地筛选出赭曲霉毒素产生菌的分析方法,为赭曲霉毒素的检测与防治奠定基础。【方法】分别采用紫外荧光法、胶体金免疫试纸条法和高效液相色谱(HPLC)法,对分离自葡萄表面的 189 株霉菌产生赭曲霉毒素 A(OTA)的能力进行分析,并对 3 种方法的鉴定结果进行比较。其中在紫外荧光法中,黑曲霉接种至可可浆培养基(CCA)培养,其他霉菌接种至察氏培养基(CA)培养,培养后能够产生荧光的菌株被认为是 OTA 产生菌。同时分别用高效液相色谱法(HPLC)和 OTA 胶体金试纸条对所有菌株培养物中的 OTA 进行检测。【结果】以 HPLC 检测结果为标准,用紫外荧光法对 OTA 产生菌初筛的假阳性率较高,假阴性率为 0;胶体金免疫试纸条法用于筛选 OTA 产生菌的假阴性率为 47.4%,假阳性率为 0,适合于产毒量高的菌种筛选。【结论】用紫外荧光法作为 OTA 产生菌的初筛方法可以排除大部分非 OTA 产生菌,漏检率低,从而大大降低 HPLC 检测的工作强度和检测成本;将紫外荧光法和 HPLC 定量分析结合使用,可以快速、准确地分离到 OTA 产生菌;将紫外荧光法和胶体金免疫试纸条相结合,可以快速筛选 OTA 产量高的菌株,且该方法较为经济,对环境和人体的污染较小。

[关键词] 赭曲霉毒素 A;紫外荧光法;OTA 胶体金试纸条;产生菌筛选

[中图分类号] TS201.3;Q93-332

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)03-0169-06

Methods for quick screening out ochratoxin-producing isolates

JIANG Chun-mei^a, SHI Jun-ling^a, LIU Yan-lin^b

(a College of Food Science and Engineering, b College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This paper aimed at screening out a method that can quickly identify the ochratoxin-producing ability of the isolates and set foundation for ochratoxin detection and prevention. 【Method】 Three different methods of UV fluorescence, high performance liquid chromatography (HPLC) and colloidal gold immunoassay strip were used to screen out ochratoxin (OTA)-producer from 189 strains isolated from grape. In the UV fluorescence method, isolates belonging to *Aspergillus* section Nigri were cultivated in cococut cream medium (CCA) and other fungi in Czapek medium (CA), respectively. The strains that produce fluorescent colour were supposed to be OTA-producer. HPLC and OTA colloidal gold test strip were also used to test OTA production in the culture at the same time. 【Result】 According to the HPLC results, the UV fluorescence method yielded high false-positive rate but no false-negative rate. The colloidal gold test strip method yielded false-negative rate of 47.4% and false-positive rate of 0. 【Conclusion】 UV fluorescence method could be used for primary screening for excluding most non-OTA-producing strains and thus significantly reduce the HPLC labour intensity and testing cost. Combination of the UV fluorescence method and HPLC is a rapid and accurate method to screen out OTA-producing strains. Combination of the UV fluorescence and the colloidal gold test strip methods could be a good method to screen out the

* [收稿日期] 2011-10-08

[基金项目] 农业部现代葡萄产业技术体系建设专项(nycyt-x-30-ch-03)

[作者简介] 蒋春美(1986—),女,山东临沂人,硕士,主要从事食品生物技术研究。E-mail:jiangchunmei2006@163.com

[通信作者] 师俊玲(1972—),女,陕西渭南人,教授,博士,主要从事食品生物技术研究。E-mail:sjshi2004@yahoo.com.cn

strains that have high OTA-producing ability. Compared with HPLC method, this would be more convenient, cost lower and have lower contamination for environment and human.

Key words: Ochratoxin A; ultraviolet fluorescence; OTA colloidal gold test strip; OTA-producing strain screening

赭曲霉毒素(Ochratoxin)是曲霉菌属和青霉菌属的某些种产生的次级代谢产物,对农作物污染严重^[1]。赭曲霉毒素有 7 种结构类似物^[2-3],其中以赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA)的分布最广,毒性最强,对人类和动植物的危害最大。OTA 不仅有免疫毒性、肾毒性和肝毒性,并且还有致畸、致突变和致癌作用^[1],被国际癌症研究机构(IARC)定为人类可能的致癌物^[4]。产毒菌的污染、生长及产毒,是食用农产品中 OTA 的根本来源。了解与掌握食品中产毒菌的污染水平及其种类,对于产毒菌的早期控制、食用农产品的早期预警及产毒菌的风险评估均具有重要意义。由于污染食品的真菌种类很多,从中鉴别出毒素产生菌的工作量大且周期长,因此,开发快速、低成本、大批量筛选产毒菌的方法对实际生产有重要意义。

由赭曲霉毒素的理化特性可知,OTA 在长波紫外光下会显示绿色或黄绿色荧光,碱性条件下紫外检测为蓝色荧光,而且 OTA 含量与荧光强度呈正比。利用这一原理,Leong 等^[5]利用可可浆培养基(Coconut Cream Agar, CCA)对 OTA 产生菌进行了筛选,发现炭黑曲霉(*A. carbonarius*)在 CCA 培养基上均可以产生荧光,而黑曲霉(*A. niger*)或棘孢曲霉(*A. aculeatus*)均不能产生荧光。梁志宏^[6]利用 CCA 和察氏培养基(Cazepk Agar, CA)对从粮食中分离出的黑曲霉群菌株和其他真菌进行了 OTA 产生菌的初筛。产物中是否含有 OTA 毒素是判断菌种能否产毒素的直接依据。目前,用于检测 OTA 的常用方法有配备荧光检测器的高效液相色谱法^[7]或液相质谱联用法^[8],这 2 种方法虽然能够定量准确地测定出毒素含量,但其操作过程繁琐、成本高、周期长,不适用于产毒菌种的初筛。其他可用于 OTA 检测的方法还有薄层色谱法(TLC)和酶联免疫吸附法(ELISA)^[9-10],这些方法为半定量法,成本稍低,但也需要较为繁琐的样品前处理过程。胶体金免疫试纸条法是近年来发展起来的可用于毒素快速检测的定性和半定量检测方法^[11],具有操作简便、使用快捷的特点,但其检测限较高,对毒素含量低的样品检测准确性较低。利用紫外荧光法和胶体金免疫试纸条法可以对产 OTA 的菌株进行快速筛

选,但尚未见有关其筛选结果可靠性分析方面的研究报道。为此,本研究分别使用紫外荧光法、胶体金免疫试纸条法和 HPLC 法,对从葡萄中分离出的 189 株霉菌逐一进行了 OTA 产生能力的检测,并以 HPLC 检测结果为标准,分析了其他 2 种方法的可行性与可靠性,以期建立准确、低成本、快速筛选 OTA 高产菌株的方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 微生物 为从腐烂和健康的葡萄表面分离出的 189 株菌。

1.1.2 主要试剂 赭曲霉毒素 A, FERMENTEK 公司;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯), Sigma 公司。

1.1.3 主要仪器 ZF-6 型三用紫外分析仪、日本岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪、赭曲霉毒素 A 胶体金免疫试纸条。

1.1.4 培养基 菌种活化培养基采用 PDA 培养基。紫外荧光筛选采用察氏培养基(CA)和可可浆培养基(CCA, 体积分数 50% 的可可浆 1 L, 琼脂 15 g)。

1.2 方法

1.2.1 紫外荧光法 将所有菌株接种于 PDA 培养基上培养 5~7 d 后,以单点或多点接种法将除黑曲霉以外的其他菌株转接到 CA 培养基上,25 ℃ 避光培养 14 d,黑曲霉转接到 CCA 培养基上,25 ℃ 避光培养 7 d。培养结束后,用波长为 365 nm 的紫外灯照射平板^[6],观察平板背面的荧光产生情况。以不接种的相应平板作为对照,筛选出能够产生绿色、黄绿色荧光(CA 培养基)和蓝绿色荧光(CCA 培养基)的平板;再用质量分数为 25%~28% 的氨水避光熏蒸 1 h,挑选在紫外灯下荧光增强的菌株即为有可能产生 OTA 毒素的菌株。

1.2.2 HPLC 法 参照 Bragulat 等^[12]的方法,将菌种在 CCA 或 CA 培养基上培养 7 或 14 d 后,用打孔器打取 3 块培养物(培养基带菌体,直径 4.6 mm)放入 4 mL 小试管中,称量后加入甲醇 500 μ L,漩涡振荡 1 min,静止提取 60 min 后,用孔径 0.45 μ m 滤膜过滤,用 HPLC 进行检测。

HPLC 检测条件: 采用日本岛津高效液相色谱仪 LC-2010A,包括荧光检测系统和自动进样系统。荧光检测器检测波长:激发波长 330 nm,发射波长 460 nm;色谱柱: 反相 C₁₈ 柱,250 mm×4.6 mm,5 μm; 柱温:30 ℃; 流动相:V(乙腈):V(水):V(乙酸)=99:99:2; 流速:1.0 mL/min; 进样量:20 μL。根据检测的毒素含量和所取琼脂块的质量,计算每 g 培养物中毒素的质量,表示为毒素产量 (ng/g)。

1.2.3 胶体金免疫试纸条法 参照赭曲霉毒素 A 胶体金试纸条说明书,检测限为 10 ng/g,阳性结果代表检测液中 OTA 的含量大于检测限,阴性结果代表检测液中 OTA 的含量小于检测限。

1.2.4 菌株的鉴定 黑曲霉和青霉的鉴定主要依据形态特征,根据菌落形态和菌丝特征对分离得到的菌株进行鉴定^[13],具体鉴定参照 Pitt 等^[14]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 紫外荧光法

2.1.1 CA 培养基 将除黑曲霉菌群以外的 151 株菌在 CA 培养基上进行培养时,以未接种任何菌株的平板作为对照(图 1a),有 42 株菌产生黄绿色荧光(图 1b),6 株菌产生绿色荧光(图 1c),8 株菌产生蓝绿色荧光,3 株菌产生暗黄色荧光,7 株菌产生暗绿色荧光,5 株菌产生紫色荧光,13 株菌产生蓝色荧光,7 株菌产生橘红色荧光,60 株菌不产生任何荧光。

HPLC 验证结果(表 1)表明,凡是不产生荧光的菌株均不产 OTA;产生荧光的菌株中,只有 10 株菌可产生 OTA,占有产荧光菌株的 10.99%。在这 10 株产毒菌中,有 8 株产黄绿色荧光,占有黄绿色荧光产生菌的 19.05%;1 株产绿色荧光,占有绿色荧光产生菌的 16.67%;1 株产暗黄色荧光,占有暗黄色荧光产生菌的 33.33%。

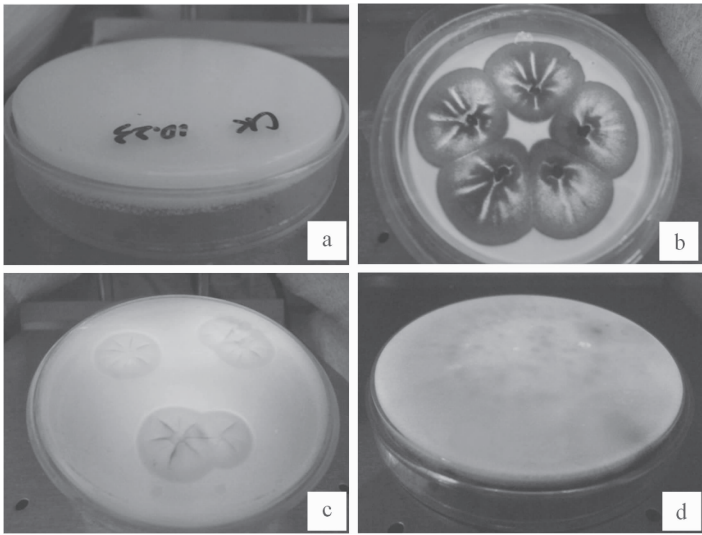


图 1 产 OTA 菌株在 CA 和 CCA 培养基上的荧光现象
a. 对照;b. SLBB 在 CA 培养基上培养 14 d(正面);c. 092506 在 CA 培养基上培养 14 d(反面);
d. 黑曲霉 HBHD 在 CCA 培养基上培养 7 d(反面)

Fig. 1 Fluorescence phenomenon of OTA producing strains on the CA and CCA medium
a. CK;b. Strain SLBB cultured on CA medium for 14 days;c. Strain 092506 cultured on CA medium for 14 days;
d. Strain HBHD cultured on CCA medium for 7 days

由表 1 还可以看出,在产黄绿色荧光的菌株中,荧光强度达到“+++”的菌株都能产生 OTA,且其毒素产量较高,均在 120 ng/g 以上;荧光强度达到“++”的菌株中只有 12.82%的菌株能产生 OTA,且其 OTA 产量较低。在产绿色荧光的菌株中,荧光强度达到“+++”的菌株能产生 OTA,且其毒素产量较高,而荧光强度达到“++”的菌株均不能产生 OTA。在产生暗黄色荧光的菌株中,即使其荧光

强度只有“+”,但其产生 OTA 的可能性也可达到 33.33%。

这说明,用 CA 培养基筛选非黑曲霉的 OTA 产生菌时,那些能够产生较强黄绿色荧光和绿色荧光、可产生暗黄色荧光(即使荧光强度较弱)的菌株才有可能为产毒菌株。以 HPLC 检测结果为依据,用这种方法筛选所得毒素产生菌(包括产黄绿色荧光、绿色荧光和暗黄色荧光的菌株)产 OTA 的假阳性率

为 89. 01%。但是,通过这种方法可以剔除掉荧光的菌株),有利于大大减少验证时的样品数量。
66.22%的非产毒菌株(不产生任何荧光和产生其他

表 1 CA 培养基上紫外荧光法、HPLC 和 OTA 胶体金试纸条法对供试菌产生 OTA 检测结果的比较

Table 1 Comparison of the tested isolates OTA-production results on CA medium among UV fluorescence, HPLC and OTA colloidal gold test strip

菌株序号 Strain number	菌株名称 Strain name	紫外荧光法 ^a UV fluorescence ^a		HPLC 测得 OTA 产量/ (ng · g ⁻¹) ^b OTA yield by HPLC ^b	OTA 胶体 金试纸条 ^c OTA colloidal gold test strip ^c
		荧光颜色 Colour	荧光强度 Intensity		
1	101119	黄绿色 Yellow-green	+++	169.98	+
2	092506	黄绿色 Yellow-green	+++	120.58	+
3	101104	黄绿色 Yellow-green	+++	138.70	+
4	091902	黄绿色 Yellow-green	++	98.90	+
5	SLBB	绿色 Green	+++	34.18	+
6	091325	黄绿色 Yellow-green	++	19.76	—
7	101108	黄绿色 Yellow-green	++	16.08	—
8	091709	黄绿色 Yellow-green	++	3.93	—
9	091319	黄绿色 Yellow-green	++	17.24	—
10	091907	暗黄色 Deep-yellow	+	15.06	—
11—44	092510、092509、091703、101111、092501、 091517、091911、090623、091533、121005、 091901、091704、091708、101122、120206、 101117、101106、092518、091510、091326、 091305、091307、091308、091505、091507、 091530、091723、091724、091918、CD111301、 CD111302、CD111303、CD111304、CD111305	黄绿色 Yellow-green	++	—	—
45—49	101105、101701、101102、101114、090624	绿色 Green	++	—	—
50—57	120205、120210、120213、091520、120214、 091912、120231、101124	蓝绿色 Blue-green	++	—	—
58—59	091719、091532	暗黄色 Deep-yellow	+	—	—
60—66	091712、091508、101113、101109、 120221、120211、101115	暗绿色 Deep-green	++	—	—
67—71	091905、091715、091913、120219、092517	紫色 Purple	+	—	—
72—84	091522、120218、091332、091529、101704、101703、 091713、091701、091506、091903、091904、101121、101125	蓝色 Blue	+++	—	—
85—91	W1、091523、120207、091527、120212、091515、091333	橘红 Reddish orange	++	—	—
92—151	101110、090617、091917、W12、091303、101118、 091302、101702、091310、091313、091320、091324、 120228、091717、091716、091711、W15、091710、 120220、091504、091528、092502、091526、091509、 101103、120222、091915、091519、101123、091908、 091909、091727、091914、092507、091503、120215、 101120、120216、092512、091511、091525、091311、 091312、091321、091323、091328、091329、091501、 091514、091702、091707、091725、091906、101101、 101112、101705、092503、091516、091316、091317	无 None	无 None	—	—

注:a:+++、强荧光,++、较强荧光,+、有荧光;b:—、不产 OTA;c:—、阳性,—、阴性。下表同。
Note:a:+++、Much stronger fluorescence,++、Strong fluorescence,+、Have fluorescence;b:—、No OTA production;c:—、Positive,—、Negative. Table 2 is the same.

2.1.2 CCA 培养基 将黑曲霉接种在 CA 培养基上时产荧光现象不明显,而 CCA 培养基是专门用来筛选产 OTA 黑曲霉的培养基。本研究将分离到的 38 株黑曲霉在 CCA 培养基上培养后,于紫外灯下进行观察,发现其中有 5 株能产生蓝绿色荧光(图 1d),13 株可产生绿色荧光,15 株产生黄绿色荧光,5 株不产生任何荧光。
经 HPLC 检测验证(表 2)表明,凡是产蓝绿色荧光的菌株都能产生 OTA,而且其产毒量较高(均

大于 80 ng/g),这与梁志宏^[6]的报道一致。但观察发现,产生绿色或黄绿色荧光的菌株也可以产生 OTA,只是其产生量较少。产黄绿色荧光和绿色荧光的菌株均有产毒菌和非产毒菌,其中产黄绿色荧光很强的菌株经检测后均能产生毒素,而产荧光稍弱的菌株则有可能不产毒素。在产黄绿色荧光的菌株中,产毒菌占 13.33%;在产绿色荧光的菌株中,产毒菌占 15.38%。不产生任何荧光的菌株均不产 OTA。

这说明,在用 CCA 筛选产 OTA 的黑曲霉时,若以产蓝绿色荧光为目标进行选择时,只能筛选到一些毒素产量高的菌株;需要结合产黄绿色荧光和产绿色荧光才能筛选出所有的毒素产生菌。但是在以黄绿色荧光和绿色荧光为筛选依据时,会带来 85.71% 的假阳性率。然而,用此法依然可以排除掉

表 2 CCA 培养基上紫外荧光法、HPLC 和 OTA 胶体金试纸条法对黑曲霉产生 OTA 检测结果的比较

Table 2 Comparison of *Aspergillus* section *Nigri*'s OTA-production on CCA medium among UV fluorescence, HPLC and OTA colloidal gold test strip

菌株序号 Strain number	菌株名称 Strain name	紫外荧光法 ^a UV fluorescence ^a		HPLC 测得 OTA 产量/ (ng·g ⁻¹) ^b OTA yield by HPLC ^b	OTA 胶体 金试纸条 ^c OTA colloidal gold test strip ^c
		荧光颜色 Colour	荧光强度 Intensity		
1	HBHD	蓝绿色 Blue-green	+++	11 272.12	+
2	090908	蓝绿色 Blue-green	+++	11 325.60	+
3	090614	蓝绿色 Blue-green	+++	13 179.24	+
4	091314	蓝绿色 Blue-green	+++	2 274.13	+
5	091718	蓝绿色 Blue-green	+++	82.31	+
6	091327	黄绿色 Yellow-green	++	17.38	—
7	090612	黄绿色 Yellow-green	++	20.68	—
8	091721	绿色 Green	+++	6.31	—
9	120208	绿色 Green	+++	13.46	—
10—22	090607、092514、090616、092508、120230、091518、 120204、091728、091730、091315、091720、092511、090603	黄绿色 Yellow-green	++	—	—
23—33	Q13、092513、092515、120223、090609、091706、 092505、120201、091722、091731、120217	绿色 Green	++	—	—
34—38	090610、120202、091910、091331、091330	无 None	None	—	—

2.2 OTA 胶体金试纸条法

由表 1 和表 2 可以看出,只有那些毒素产量比较高的菌株才能用 OTA 胶体金试纸条检测出来,而那些毒素产量较低的菌株试纸条检测结果均呈现阴性。与 HPLC 检测结果相比,OTA 胶体金试纸条检测毒素产生菌的假阳性率为 0,假阴性率为 47.4%。这可能是因为其产生 OTA 的浓度低于试纸条的检测限所致。由此说明,用 OTA 胶体金试纸条法只能筛选出那些毒素产量较高的产毒菌。

与紫外荧光结果相比,OTA 胶体金试纸条法仅能检出那些毒素产量较高,而且在 CCA 培养基上呈现蓝绿色荧光、在 CA 培养基上产生较强黄绿色荧光和绿色荧光的毒素产生菌。用 OTA 胶体金试纸条检验产 OTA 的菌株占目标荧光产生菌的 18.9%。

根据 HPLC 结果,用 OTA 胶体金试纸条法检测呈阳性的 10 株菌的产 OTA 量均大于 20 ng/g,而低于此值时,则检测呈阴性,该结果高于说明书中制定的检测限 10 ng/g,说明采用 OTA 试纸条法从固体培养基中直接提取 OTA 时,其检测限有所降低,为 20 ng/g。

一部分绝对不产生 OTA 的菌株,即那些不产生荧光的菌株。

由上述结果可以看出,用紫外荧光法对 OTA 产生菌进行初筛时,虽然其假阳性率较高,但其假阴性率为 0。借此可以在初筛中剔除掉一部分非毒素产生菌,能有效减少验证时的样品分析量。

2.3 产毒菌的类型

表 3 表明,189 株供试菌株中,青霉和曲霉占有所有菌株的 65.1%,产 OTA 的菌株主要为青霉和曲霉,1 株为其他。以 HPLC 结果为依据,可知本试验共从葡萄中检出 19 株 OTA 产毒菌,占有所有污染菌的 10.1%。

表 3 189 株分离菌株种类的统计

Table 3 Species analysis of the 189 isolates

菌株种类 Species	产 OTA 菌株数 Number of OTA-producing strains	不产 OTA 菌株数 Number of none OTA producing strains
青霉 <i>Penicillium</i>	6	61
曲霉 <i>Aspergillus</i>	12	44
其他 Others	1	65

3 讨 论

目前对从葡萄中分离得到的产 OTA 菌株的筛选,主要采用配备荧光检测器的 HPLC 法^[15],此法结果准确可靠,但对设备的要求高,检测成本较高,周期长,提取过程比较复杂,而污染食品的真菌种类很多,产生 OTA 的菌株相对较少,利用 HPLC 筛选产 OTA 的菌株不适合大样本分析。本试验采用

HPLC 法对所有菌株产 OTA 的能力进行了验证,以 HPLC 法的结果为依据,对紫外荧光法和 OTA 胶体金试纸条的可靠性进行了分析。紫外荧光法可用于 OTA 产毒菌的初筛,CCA 培养基适用于黑曲霉菌群,以蓝绿色荧光作为目标荧光时可筛选出产毒量较大的菌株,但其存在假阴性结果,因此在筛选时应将产黄绿色和绿色的菌株均考虑在内,以避免漏选;其他菌株使用 CA 这种浅色的培养基有利于检测结果的观察,其假阴性率低,可以在排除不产毒菌株的同时尽量避免对产毒菌的漏选。因此,在菌株数量较多时,紫外荧光法的优势更为明显,本试验中利用紫外荧光法可以排除 55.56% 的菌株。在利用紫外灯直接对培养基进行初筛检测时,会有一些菌株产生暗黄色、暗绿色或紫色荧光,经过浓氨水熏蒸后可以减少误差^[7]。如果有些菌株产生色素,应注意对此类菌株的筛选,因为色素对产生荧光的颜色和强度有一定影响。

4 结 论

紫外荧光法、胶体金免疫试纸条法和高效液相色谱法均可用于产 OTA 菌的筛选,用紫外荧光法对 OTA 产生菌进行初筛时,虽然其假阳性率较高,但其假阴性率为 0,因此将其用于初筛可以排除掉绝大部分非 OTA 产生菌,且漏检率较低。OTA 胶体金试纸条法检测结果准确,使用方便,但会出现假阴性,在筛选 OTA 产生量较高的菌株时有较大优势。采用紫外荧光法作为初筛方法,结合 HPLC 法,对产荧光能力较强的菌株进行验证,可快速、准确地分离到最多的 OTA 产生菌。采用紫外荧光法和 OTA 胶体金试纸条法相结合的方法,可以快速、准确地得到 OTA 产生菌,而且这种方法也最经济,对环境和人体的污染也最小。

〔参考文献〕

- [1] Vargaa J, Kozakiewicz Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products [J]. Trends in Food Science and Technology, 2006, 17: 72-81.
- [2] 杨 超. 四种真菌毒素检测方法的建立以及赭曲霉毒素 A 脱除方法的初步研究 [D]. 山东青岛: 中国海洋大学, 2009.
Yang C. The research of detection methods of four mycotoxins and detoxification method of OTA [D]. Qingdao, Shandong: Ocean University of China, 2009. (in Chinese)
- [3] 杨家玲, 岳田利, 高振鹏. 赭曲霉毒素 A 检测方法的研究进展 [J]. 农产品加工, 2008, 139(6): 4-7.
Yang J L, Yue T L, Gao Z P. Research advance on the determination methods of ochratoxin A [J]. Academic Periodical of

- Farm Products Processing, 2008, 139(6): 4-7. (in Chinese)
- [4] 高 翔, 李 梅, 张立实. 赭曲霉毒素 A 的毒性研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2005, 32(1): 51-55.
Gao X, Li M, Zhang L S. Ochratoxin A toxicity research [J]. International Journal of Hygiene Volumes, 2005, 32(1): 51-55. (in Chinese)
- [5] Leong S L, Hocking A D, Pitt J I. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2004, 10(1): 83-88.
- [6] 梁志宏. 粮食中赭曲霉毒素 A 的检测及产毒素菌株的分析与研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2008.
Liang Z H. Detection of ochratoxin A and analysis of ochratoxigenic-fungi in foodstuff [D]. Beijing: China Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [7] Flajs D, Domijan A M, Ivic D. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia [J]. Food Control, 2009, 20: 590-592.
- [8] Anna M T, Paolo M, Gabriele C. Assay of ochratoxin A in grape by high-pressure liquid chromatography coupled on line with an ESI-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2006, 832: 127-133.
- [9] 熊勇华, 陈雪岚, 许 杨. 检测赭曲霉毒素 A(OTA) 的酶联免疫吸附法(ELISA) 体系的建立 [J]. 食品科学, 2006, 27(5): 30-35.
Xiong Y H, Chen X L, Xu Y. Development of ELISA system to determine ochratoxin A [J]. Food Science, 2006, 27(5): 30-35. (in Chinese)
- [10] Angelini E, Bazzo I, Savino M, et al. Ochratoxin A: Comparison of extraction methods from grapes and quantitative determination by different competitive enzyme-linked immunosorbent assay kits [J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(12): 2488-2496.
- [11] 赖卫华, 熊勇华, 陈高明, 等. 应用胶体金试纸条快速检测赭曲霉毒素 A 的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(5): 204-207.
Lai W H, Xiong Y H, Chen G M, et al. Preparation of colloidal gold strip for rapid detection of ochratoxin A [J]. Food Science, 2005, 26(5): 204-207. (in Chinese)
- [12] Bragulat M R, Abarca M L, Cabanes F J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71: 139-144.
- [13] Diaz G A, Torres R, Vega M, et al. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 133: 195-199.
- [14] Pitt J I, Hocking A D. Fungi and food spoilage [M]. Third edition. New York, USA: Springer Science and Business Media, 2009.
- [15] Gómeza C, Bragulata M R, Abarcaa M L, et al. Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production [J]. Food Microbiology, 2006, 23: 541-545.