

# 葡萄赭曲霉毒素污染及其产毒素菌株的筛选方法研究进展

王海英<sup>1</sup>, 张红印<sup>1\*</sup>, 杨其亚<sup>1</sup>, 李超兰<sup>1</sup>, 王俊青<sup>2</sup>, 刘正伟<sup>2</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013;

2. 河南永达食业集团技术中心, 河南鹤壁 458000)

**摘要:** 赭曲霉毒素A(ochratoxin, OTA)是由曲霉属和青霉属等真菌产生的一类真菌毒素,其毒性很强,分布广泛,对人类和动植物的健康有着巨大的影响。葡萄及其制品是食品中OTA的主要来源之一,从病害的葡萄表面筛选分离产生赭曲霉毒素的菌株是最常用的研究产毒素菌株的方法。由于产毒素菌株主要分布在葡萄果实的表面,葡萄组织受损后会极大提高赭曲霉毒素的污染程度,研究产毒菌株分布及产毒素能力对控制赭曲霉毒素污染及寻找一种有效地生物防治方法提供依据。本文综述了葡萄赭曲霉毒素的污染情况及其产毒素菌株的筛选方法,为控制葡萄及其产品中的OTA污染提供依据。

**关键词:** 赭曲霉毒素A, 筛选, 控制, 检测

## Advance of research on ochratoxin contamination in grapes and screening methods of toxin producing strains

WANG Hai-ying<sup>1</sup>, ZHANG Hong-yin<sup>1\*</sup>, YANG Qi-ya<sup>1</sup>, LI Chao-lan<sup>1</sup>, WANG Jun-qing<sup>2</sup>, LIU Zheng-wei<sup>2</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Food Group Technology Center, Henan Yongda, Hebi 458000, China)

**Abstract:** Ochratoxin A(OTA) was a toxic secondary metabolite produced by *Aspergillus* and *Penicillium* fungi. OTA had a huge impact on human and animal health due to its strong toxicity and wide distribution. Grape and its products were one of the main sources of food for OTA. Isolation and screening of strains producing ochratoxin from the surface of diseased grapes was the most commonly used method to research toxigenic strains. Because the toxigenic strains were mainly distributed in the the surface of grapes, the ochratoxin contamination levels would be greatly increased when the grape tissue was damaged. Study the distribution of toxigenic strains and its ability of producing toxins provides reference for controlling ochratoxin pollution and finding an effective biological control method. This paper reviewed the occurrence of ochratoxin A(OTA) contamination in grape and the screening methods of mycotoxin producing strains, which provided the basis for the control of OTA pollution in the grape and its products.

**Key words:** ochratoxin A; screening; control; detection

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)10-0369-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.10.070

赭曲霉毒素(ochratoxin)是由曲霉属如赭曲霉、硫色曲霉、蜂蜜曲霉以及青霉属等真菌产生的一类真菌毒素,它包含7种结构类似的化合物(见图1)<sup>[1]</sup>,其中以赭曲霉毒素A(OTA)的毒性最强(大鼠经口LD<sub>50</sub>=20mg/kg),是一种重要的毒枝菌素,经过大量的动物实验表明OTA具有肾毒性、致癌性、致畸性及致突变性<sup>[1]</sup>。

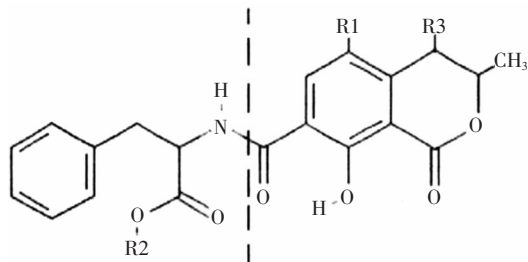
由于能够产生OTA毒素的菌株广泛存在于自然界中,而全世界对OTA的重视远没有对黄曲霉毒素的重视,要完全避免OTA对食品及饲料的污染非常困难<sup>[2]</sup>。食品法典委员会认定,OTA对人类威胁最重要的食品类别依次为:谷类>葡萄及其制品>咖啡豆及其制品>其他<sup>[1]</sup>。因此减少食品及其制品中的赭曲霉毒素含量,除了在粮食收获、储存、加工各个环节

收稿日期: 2014-07-21

作者简介: 王海英(1988-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

\* 通讯作者: 张红印(1972-),男,博士,教授,研究方向:食品生物技术。

基金项目: 国家自然科学基金(31271967);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20123227110015);镇江市科技支撑计划-农业支撑项目(NY2013020NY2013004)。



Ochratoxins	R1	R2	R3
OchratoxinA, OTA	Cl	H	H
OchratoxinB, OTB	H	H	H
OchratoxinC, OTC	Cl	Et	H
OTA Methyl ester	Cl	Me	H
OTB Methyl ester	H	Me	H
OTB Ethyl ester	H	Et	H
4-hydroxy OTA	Cl	H	OH
α	Cl	-OH replace the left	H
β	H	side group of dividing line	H

图1 赭曲霉毒素主体结构及取代集团位置

Fig.1 The ochratoxin main structure and substituted group position

过程中科学作业,注意防霉去毒外,唯一有效的办法是从源头上加强对食品、饲料及其原材料的污染控制,防止OTA超标污染的食品进入人类的食物链<sup>[3]</sup>。

## 1 OTA的结构及理化性质

赭曲霉毒素A的化学名称为7-(L-β-苯基丙氨酸-羧基)-羧基-5-氯代-8-羟基-3,4-二氢-3R-甲基异氧杂萘邻酮(香豆素),由7-羧基-5-氯-3,4-二氢-8-羟基-3R-甲基异香豆素通过一个肽键与L-β-苯丙氨酸的7-羧基相连而形成<sup>[4-5]</sup>,分子式为C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>6</sub>,摩尔分子量为403.82g/mol,熔点为169℃。赭曲霉毒素A的化学结构见图2<sup>[5]</sup>。

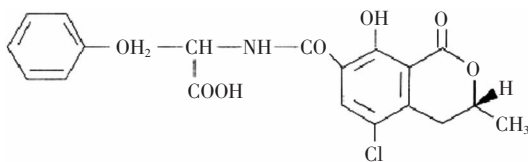


图2 赭曲霉毒素A的化学结构

Fig.2 The chemical structure of ochratoxin A

赭曲霉毒素A是一种无色结晶粉末状化合物,呈弱酸性,微溶于水,易溶于极性有机溶剂和碳酸氢钠溶液,在极性有机溶剂中稳定。赭曲霉毒素A对空气与光不稳定,特别是在潮湿环境中<sup>[6-8]</sup>。

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,在碱性条件下进行紫外检测为蓝色荧光,而且OTA含量与荧光强度呈正比<sup>[9]</sup>。产物中是否含有OTA毒素是判断菌种是否为产毒素菌株的直接依据。梁志宏<sup>[10]</sup>利用可可浆培养基(CCA)和察氏培养基(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。

## 2 OTA污染现状

OTA是世界上重要的毒枝菌素中的一种,广泛

地污染葡萄及其酒类制品,直接的危害人类和动物的健康。能够产生赭曲霉毒素的霉菌种类主要有赭曲霉属、炭黑曲霉属及青霉属,当这些菌株接种到液体培养基或者固体培养基中时,代谢产物中的赭曲霉毒素可以通过仪器精确地统计其含量。在法国西南部地区,有73%的谷物等食品中检测出OTA污染<sup>[11]</sup>。

酒类产品主要是由粮食或葡萄等酿造的,所以酒也有被OTA污染的可能。早在1994年就已在葡萄酒中检测到OTA。2006年,通过对欧洲整体膳食的评估发现,人们从葡萄酒中摄取的OTA含量占总量的13%,仅次于谷类。随着对其毒性认识的加深,各国家对食品中OTA的含量也相继规定了限量标准。在2006年,欧盟规定在葡萄及葡萄酒类产品中OTA的限量标准是2μg/kg,而在葡萄干中的OTA的限量为10μg/kg<sup>[12]</sup>。

由于地域等原因,OTA的污染状况轻重不一。不同的气候影响着赭曲霉毒素产生菌的种类及其OTA浓度,许多研究者发现在温和的气候条件下,青霉属菌株是赭曲霉毒素的主要产生菌,而污染对象集中在谷物等粮食作物。在温度高、湿度大的热带地区,产生赭曲霉毒素的菌株为赭曲霉属和炭黑曲霉属,污染咖啡、葡萄和香料作物等<sup>[13]</sup>。同时有研究者发现在亚热带气候环境下,农作物的生长及加工极易受到赭曲霉毒素的污染,其中包括谷物、啤酒、咖啡豆、可可、香料、坚果、干果、葡萄汁以及在人体血液和动物源性产品也检测到赭曲霉毒素,而且毒素含量也相对较大。由于赭曲霉毒素化学结构稳定,在传统的作物加工温度下很难被分解,而在发酵过程中也仅有很少的一部分被降解,甚至在许多人造食品中也存在赭曲霉毒素污染<sup>[14]</sup>。

## 3 赭曲霉毒素A的来源

1965年,Scott从南非高粱上分离到一株赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*),它是最早发现的OTA产生菌<sup>[13]</sup>。起初,OTA被认为是所有曲霉属的代谢产物,几年来的研究才发现只有曲霉属的部分菌种才可以通过生物合成的方法合成赭曲霉毒素。OTA也是青霉属的某些种的代谢产物,人们在鲜绿青霉(*Penicillium viridicatum*)和某些青霉中检测到了OTA。青霉属菌株产生OTA一般只在气温低于30℃且水分活度较低的地方生长。因此,在寒冷地区,粮食作物中OTA的来源主要是青霉菌产生的<sup>[15]</sup>。曲霉属的生长条件与青霉菌属刚好相反,它主要生长在热带和亚热带气候地区即又热又潮湿的地方,曲霉属中最为人们所知能产生OTA的菌株是赭曲霉,因此在热带和亚热带地区,农作物在田间或储存过程中污染的OTA主要由赭曲霉产生<sup>[14-15]</sup>。

自Abarca发现黑曲霉的变种能产生OTA<sup>[16]</sup>后,研究者发现了黑曲霉(*Aspergillus niger*)中许多菌株也能产生OTA,此外还包括炭黑曲霉。随着研究的不断深入,研究者们发现炭黑曲霉是赭曲霉毒素的主要产生菌,产毒量高于黑曲霉毒素,并且易侵染苹果、葡萄及其果酒类产品<sup>[15]</sup>。

## 4 防治OTA污染的方法

### 4.1 物理去除法

分为剔除霉粒、碾轧加工、水洗、热处理法和辐射法几种。其中辐射法是将污染赭曲霉毒素的饲料、粮食撒铺成薄层,用高压汞灯紫外线大剂量照射。

### 4.2 化学方法

化学方法是长久以来控制果蔬病害的最主要方法,但是化学残留不仅仅危害着人体健康,而且对环境造成严重的污染,化学杀菌剂的大量使用使有害生物产生抗药性,不断地造成恶性循环。于是亟需一种安全有效的防治方法,通过生物间的相互作用来抑制有害生物的生长繁殖即新型的生物防治的方法<sup>[17]</sup>。

### 4.3 生物防治的方法

利用有益生物来对抗有害生物,其中应用的微生物可用于生产微生物农药。由于赭曲霉毒素性质稳定不易分解,一旦产生很难处理,最佳方法就是利用生物方法进行预防。通过利用有益微生物控制产生赭曲霉毒素霉菌的生长减少毒枝菌素的合成,从根本上减少OTA对人类的威胁。生物防治已经作为减少葡萄园中OTA毒素这一类毒枝菌素污染的新方法被广泛采纳<sup>[18-20]</sup>。

## 5 赭曲霉毒素产生菌的筛选方法

### 5.1 紫外荧光法检测

由赭曲霉毒素的理化特性可知,OTA在长波紫外光(365nm, 125W)下会显示绿色或黄绿色荧光,而且OTA含量与荧光强度呈正比<sup>[9]</sup>。

将分离纯化得到的霉菌单菌落三点法接种到CA培养基中,黑曲霉接种到可可浆培养基上,25℃培养14d(可可浆培养基上培养7d)后,将长出菌落的平板置于紫外灯(波长365nm, 125W)下观察,如果菌落周围的培养基中出现蓝紫色或黄绿色荧光即为产赭曲霉毒素的阳性菌株,按荧光强弱及有无分别记录为:+++、++、+和-,-表示阴性菌株<sup>[21]</sup>。若荧光不明显或无荧光时,可将平板用25%~28%的氨水避光熏蒸1h,挑选出在紫外灯下荧光强度增强的菌株即为可疑的产生赭曲霉毒素的菌株。

当需要检测的霉菌很多时,这种检测OTA产生菌的方法快速简便,极大地缩小了工作量。缺陷是会将少数能够产生荧光的非产毒菌株也统计在内,造成假阳性现象,例如*A. ochraceus* M75能够在紫外照射下产生蓝绿色荧光,但是本身不产生赭曲霉毒素<sup>[22]</sup>。

### 5.2 高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)

由于赭曲霉毒素化合物具有天然的荧光性,使用高效液相检测器能够克服培养菌体产生的其他代谢产物的干扰,设定赭曲霉毒素的激发波长及吸收波长能够单一的检测出其中含有的微量的赭曲霉毒素,从而判断出待测菌株是否为赭曲霉毒素产生菌<sup>[23]</sup>。

将培养在CA培养基上的霉菌用打孔器取一定量的带有菌体的培养基,用甲醇试剂萃取培养基中的代谢物赭曲霉毒素,萃取得到的液体用0.22μm有机过滤器过滤,在有荧光检测器的高效液相色谱仪中检测(激发波长330nm,吸收波长460nm<sup>[24]</sup>),与OTA

标准品的出峰时间作对照,通过标准曲线及培养基的重量可以计算得到产毒菌株的产毒量。相应的,信噪比、峰值方差和柱效等都可以从软件上直接获得<sup>[25]</sup>。

高效液相色谱法灵敏度高,分离度好,能准确定性定量分析<sup>[23]</sup>,但是存在费时、仪器设备昂贵、操作复杂且不适合大批量样品检测等缺点。

### 5.3 胶体金免疫试纸条法

胶体金试纸条法是将特异性的抗原或抗体以条带状固定在膜上,胶体金标记抗体吸附在结合垫上,当待检样本与胶体金标记抗体相互反应,结合物在抗原区特异性结合在检测带出现显色反应<sup>[26]</sup>。

对于在培养基中培养的待测菌株,用甲醇静置提取其在培养基中菌株产生的代谢产物后,用胶体金免疫试纸条法检测其代谢产物中是否含有OTA,是检验菌株是否为产生赭曲霉毒素菌的唯一标准。胶体金悬浮液的配制、单克隆抗体的连接、试纸条的处理等参照说明要求准备<sup>[27]</sup>。免疫试纸条的检测限是10ng/g,阳性结果代表提取液中赭曲霉毒素的含量高于检测限,阴性结果代表提取液中的OTA浓度低于检测限<sup>[28]</sup>。

胶体金试纸条法具有方便快捷、高敏感性、稳定性强、不需要特殊设备和试剂、结果判断直观等优点,但是此法目前仅能用于半定量,抗体容易受到许多外在条件的影响,例如外界温度和保藏条件等<sup>[28-29]</sup>。

### 5.4 酶联免疫检测法(ELISA)

ELISA法基本原理是在合适的载体上,酶标记抗体或抗原与相应的抗原或抗体形成酶标记的抗原抗体复合物,酶与底物反应生成一种带色物质。根据色泽深浅可以用分光光度计进行测定,从而可以计算出参与反应的抗原和抗体的含量<sup>[30]</sup>。

用二氯甲烷和丙酮萃取含有菌体培养基中的代谢产物,用索氏提取法对样品进行浓缩,冷冻干燥之后用少量甲醇溶解,样品的纯化用C<sub>18</sub>固相萃取柱,样品制备完成后按照说明要求合成OTA抗体<sup>[31]</sup>。由于ELISA抗体效价的不同,不同报道ELISA的灵敏度在0.042~10μg/L之间,而商品化的ELISA试剂盒的灵敏度一般在0.2μg/L左右<sup>[32]</sup>。

ELISA法快速灵敏、可定量、操作简便、无需贵重仪器设备,且对样品纯度要求不高,特别适用于大批量样品的检测,发展非常迅速<sup>[33]</sup>。但是ELISA受方法学上的限制,如AFB<sub>1</sub>(黄曲霉毒素)、OTA等不同的生物毒素需要不同的试剂各自检测,而且试剂盒检测的灵敏度或可测范围很难充分满足实际需求<sup>[34]</sup>。

### 5.5 薄层层析法

薄层层析是将吸附剂、载体或其他活性物质均匀涂铺在平面板(如玻璃板、塑料片、金属片等)上,形成薄层(常用厚度为0.25mm左右)后,在此薄层上进行层析分离的分析方法<sup>[35]</sup>。它兼备了柱色谱和纸色谱的优点,适用于少量样品(几到几十微克,甚至0.01微克)的分离,适用于挥发性较小或较高温度易发生变化而不能用气相色谱分析的物质。

待测菌体在MEB液体培养基上摇瓶培养培养14d后,分离菌丝体,用液氮研磨甲醇溶液粉末,用

0.22 $\mu\text{m}$ 的有机滤膜过滤后用薄层层析进行定性检测,可以判断出提取液中是否含有OTA,从而判断分离纯化的菌株是否为赭曲霉毒素产生菌<sup>[36]</sup>。

TLC是OTA早期研究中最常见的检测方法,因其操作简便曾被广泛应用<sup>[37]</sup>。但这种方法较费时(48h左右),灵敏度和特异性较差,在OTA的提取过程中所需的有机溶剂品种多且量大,薄层色谱法(TLC)检测限为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[38]</sup>。

### 5.6 液相-质谱联用法(LC-MS/MS)

液相质谱联用技术是将色谱的分离能力与质谱的定性功能结合起来,实现对复杂混合物更准确的定量和定性分析,对样品量要求低并且实验数据全自动处理<sup>[39]</sup>。不仅能对微量的化合物进行定量分析,也简化了样品的前处理过程,使样品分析更简便。

待测菌株接种到固体培养基上培养14d后,取一定量的带菌体培养基,用甲醇萃取培养基中的代谢产物,再用免疫固相萃取柱净化样品,C<sub>18</sub>反相色谱柱对样品中赭曲霉毒素A进行有效分离,电喷雾离子化,采用高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法进行测定。该方法的检出限为0.20 $\mu\text{g}/\text{L}$ ,方法定量下限为0.20 $\mu\text{g}/\text{L}$ ,线性范围为0.20~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ ,加标回收率为86.6%~91.0%,相对标准偏差为1.67%<sup>[40]</sup>。

这种检测方法灵敏、准确、可定量,但是设备昂贵,不适合大规模筛选产毒菌株<sup>[41]</sup>。

### 5.7 时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术

TRFIA是超微量检测领域中一项新兴的检测技术,是利用免疫反应的高度特异性和标记示踪物的高度灵敏性相结合而建立的一类微量物质检测技术。

TRFIA建立快速的高灵敏度的赭曲霉毒素A全自动检测方法。待测霉菌接种到固体察氏培养基上培养14d后,灭菌的打孔器打取带菌体的培养基,并用70%的甲醇溶液萃取菌体代谢物,OTA-BSA(赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物)的微孔板上添加过滤后的提取液以及OTA单克隆抗体,振荡洗涤后测定荧光强度,测定菌体代谢产物中是否含有赭曲霉毒素<sup>[42]</sup>。

该方法的灵敏度为0.03 $\mu\text{g}/\text{L}$ ,测量范围为0.03~1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ ,既可以满足食品中OTA低浓度的限量要求,也可以满足饲料中OTA较宽范围的限量要求<sup>[43]</sup>。

TRFIA采用非放射性原子标记技术,标记位点多,灵敏度高,生物活性影响小,相对长的荧光发射周期可有效避免环境因素的干扰。采用TRFIA方法建立的试剂盒具有有效期长、操作流程短、灵敏度高、标准曲线量程宽、可全自动操作及应用范围十分广泛等优点<sup>[44]</sup>。

在目前的OTA检测中,代谢产物中是否含有赭曲霉毒素是筛选分离赭曲霉毒素产生菌的唯一标准。将待检测霉菌菌株接种到培养基中培养一段时间后,通过前处理工艺萃取浓缩代谢产物中的赭曲霉毒素后,常利用液相质谱联用法和荧光检测法等检测赭曲霉毒素<sup>[45-46]</sup>。此外,还有许多新兴的检测赭曲霉毒素的方法,如李尧等报道了采用基质分散固相萃取(MSPD)净化,使用液相色谱仪配荧光检测器分析谷物中OTA含量的方法<sup>[47]</sup>。近红外光谱技术(NIRS)

在真菌毒素的检测方面也得到了一定的发展和应用。但是基于免疫学原理的酶联免疫法及胶体金免疫层析技术检测法建立在抗原和抗体的基础上,步骤繁琐,成本高,易出现假阳性结果。而液相质谱联用技术以及高效液相荧光检测法由于结果准确、回收率高、精密度良好、重现性好等优点被广泛应用。

## 6 展望

赭曲霉毒素对农作物及水果制品的污染在全球范围内都比较严重,其中赭曲霉毒素A在自然界分布最广泛,毒性最强,对人类和动植物影响最大。由于产生赭曲霉毒素A菌株的生长繁殖受到生态环境和污染源种类的影响,其主要产毒菌株和产毒素含量也存在巨大差异。因此发展快速、灵敏、简便的检测筛选OTA产生菌的方法进而建立生物防治体系,并对OTA的生物学作用及其作用机制做更深入的研究,通过抑制OTA产生菌株的生长繁殖,从源头上控制赭曲霉毒素的污染问题是今后一段时间内此领域的研究重点。

### 参考文献

- [1] 杨超. 四种真菌毒素检测方法的建立以及赭曲霉毒素A去除方法的初步研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [2] 高翔,李梅. 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.
- [3] Angelo V, Michelangelo P, Gianluca C. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy[J]. Journal of Chromatography A,2000,88(8):321-326.
- [4] Brera C, Miwaglia M, Colatosti M. Evaluation of the impact of exotoxins on human health of source of errors[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry,2002,50(25):7493-7496.
- [5] 章英,许杨. 谷物类食品中赭曲霉毒素A分析方法的研究进展[J]. 食品科学,2006,27(12):767-771.
- [6] 杨家玲,岳田利,高振鹏,等. 赭曲霉毒素A检测方法的研究进展[J]. 农产品加工(学刊),2008,6:4-7.
- [7] Ponsone M L, Chiotta ML, Combina M, et al. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes[J]. International Journal of Food Microbiology,2011,151(1),70-77.
- [8] 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.
- [9] 蒋春美,师俊玲,刘延琳. 赭曲霉毒素产生菌筛选方法的对比与优选[J]. 西北农林科技大学学报,2012,40(3):169-174.
- [10] 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.
- [11] Serge K, Franoise SM, Regine S, et al. Fungal Flora and Ochratoxin A Production In Various Food and Feed in France[J]. System Appl Microbiol,1995,18,455-459.
- [12] Timperio A M, Magro P, Chilosi G, et al. 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.
- [13] 疏秀林,施庆珊,欧阳友生. 赭曲霉毒素的产生及鉴别[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(10):2183-2185.

- [14] Al-Hazmi NA. Determination of Patulin and Ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2010, 17: 353-359.
- [15] Ramos A J, Labernia N, Marin S, et al. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 44(1-2): 133-140.
- [16] Abarca M L, Bragulat M R, Castella G, et al. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus Niger* var *niger*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(7): 2650-2652.
- [17] Ponsone ML, Chiotta ML, Combina M, et al. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes[J]. International journal of food microbiology, 2011, 151(1): 70-77.
- [18] Zhang H, Wang L, Zheng X, et al. Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and *Rhizopus* decay of peaches[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115: 53-58.
- [19] Pfohl-Leskowicz A, Manderville RA. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51, 61-99.
- [20] Chulze S N, Magnoli C E, Dalcero A M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111, S5-S9.
- [21] 许艳丽, 鲍蕾, 雷质文, 等. 一种快速检测产黄曲霉毒素菌株的方法[J]. 食品与发酵工程, 2008, 34(5): 148-151.
- [22] Jooste HMLJ, Goetz J A. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 65: 39-44.
- [23] Qi P, Lin Z, Li J, et al. Development of a rapid, simple and sensitive HPLC-FLD method for determination of rhodamine B in chili-containing products[J]. Food Chemistry, 2014, 164: 98-103.
- [24] Kong W, Wei R, Logrieco AF, et al. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets[J]. Food Chemistry, 2014, 146: 320-326.
- [25] Mao J, Lei S, Yang X, et al. Quantification of ochratoxin A in red wines by conventional HPLC-FLD using a column packed with core-shell particles[J]. Food Control, 2013, 32: 505-511.
- [26] Gao H F, Han J, Yang S J, et al. Highly sensitive multianalyte immunochromatographic test strip for rapid chemiluminescent detection of ractopamine and salbutamol [J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 839(11): 91-96.
- [27] Wang J, Wang Z, Liu J, et al. Nanocolloidal gold-based immuno-dip strip assay for rapid detection of Sudan red I in food samples[J]. Food Chemistry, 2013, 136: 1478-1483.
- [28] 谢春梅. 葡萄酒中赭曲霉毒素A的测定方法研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [29] Duan N, Wu S-J, Wang Z-P. An Aptamer-based Fluorescence Assay for Ochratoxin A[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39: 300-304.
- [30] 杨利国. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- [31] Xu T, Wang J, Liu S-Z, et al. A highly sensitive and selective immunoassay for the detection of tetrabromobisphenol A in soil and sediment[J]. Anal Chim Acta, 2012, 751: 119-127.
- [32] Gao H, Han J, Yang S, et al. Highly sensitive multianalyte immunochromatographic test strip for rapid chemiluminescent detection of ractopamine and salbutamol[J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 839: 91-96.
- [33] Dohnal V, Dvorak V, Malir F, et al. A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic[J]. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 2013, 62: 427-431.
- [34] 阎龙宝, 王浩. 液相色谱-质谱联用技术测定葡萄酒中的赭曲霉毒素A残留[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(6): 136-138.
- [35] Tao Z, Sato M, Han Y, et al. A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination[J]. Food Control, 2011, 22: 1154-1157.
- [36] Muniroh MS, Sariah M, Zainal Abidin MA, et al. Rapid detection of *Ganoderma*-infected oil palms by microwave ergosterol extraction with HPLC and TLC[J]. Journal of microbiological methods, 2014, 100: 143-147.
- [37] Kucharska M, Grabkab J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes[J]. Talanta, 2010, 80: 1045-1051.
- [38] Andrade FI, Florindo MI, Pinto IG, et al. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC[J]. Food Chemistry, 2014, 157: 193-198.
- [39] Roland A, Bros P, Bouisseau A, et al. Analysis of ochratoxin A in grapes, musts and wines by LC-MS/MS: First comparison of stable isotope dilution assay and diastereomeric dilution assay methods[J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 818: 39-45.
- [40] 阎龙宝, 王浩. 液相色谱-质谱联用技术测定葡萄酒中的赭曲霉毒素A残留[J]. 食品研究与开发, 2010, 6: 136-138.
- [41] Reinsch M, Töpfer A, Lehmann A, et al. Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection[J]. Food Chemistry, 2007, 100: 312-317.
- [42] 黄飏, 张珏, 马智鸿, 等. 用双标记时间分辨荧光免疫法同时检测黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和赭曲霉毒素A[J]. 卫生研究, 2009, 4: 385-388.
- [43] 黄飏, 陶文沂, 张莲芬, 等. 赭曲霉毒素的高灵敏时间分辨荧光免疫分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(7): 662-666.
- [44] Lin G, Huang H, Liu T, et al. A time-resolved fluoroimmunoassay for the quantitation of rabies virus nucleoprotein in the rabies vaccine[J]. Journal of Virological Methods, 2014, 206: 89-94.
- [45] Flažs D, Domijan AM, Ivic D. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia[J]. Food Control, 2009, 20: 590-592.
- [46] 王颖, 张妮娜, 雒丽娜, 等. 赭曲霉毒素A检测方法的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(5): 757-760.
- [47] 李尧, 张雪梅, 党献民, 等. 基质分散固相萃取净化液相色谱检测谷物中赭曲霉毒素A[J]. 粮食与饲料工业, 2012, 10: 57-60.