

黑曲霉菌标准物质的研制及其在食品检测中的应用

白继超[#], 任秀[#], 陈怡文, 余文, 赵琳娜, 路勇^{*}, 崔生辉^{*}

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 研制黑曲霉菌标准物质, 并将其用于食品检测。**方法** 通过显微形态及转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)位点测序, 对研究用菌株进行菌种鉴定确认后冻干, 制备 10^4 CFU/样品浓度的标准物质。通过对标准物质样品均匀性、运输稳定性、储藏稳定性以及在不同食品基质中使用效果的检验, 结合 3 家实验室的协作定值实验对黑曲霉菌标准物质样品进行评价。**结果** CMCC98003 经肉眼观察菌落绒状, 黑色孢子头, 菌落反面呈无色或淡黄色有皱褶。制片后显微镜下观察, 可见顶囊呈球形, 小梗, 大梗, 分生孢子粗糙, 分生孢子梗宽且光滑, 孢梗颈, 符合黑曲霉菌形态特性; ITS 位点测序结果与美国国家生物信息中心基因库中已有序列比对, 匹配最优结果为黑曲霉菌。通过 SPSS 软件单因素方差分析结果为 $F_{0.05}(19,20)=2.137$, $F=1.614 < F_{0.05}$, 符合均匀性要求。黑曲霉菌标准物质在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 28 d, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 90 d, $25\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 7 d 进行检测, 菌浓度均维持在 10^4 CFU/样品; 不同食品基质中的适用性检验可见所有样品均能回收; 3 家单位协作标定结果均为 10^4 CFU/样品。**结论** 本研究制备的黑曲霉菌标准物质可以满足日常霉菌计数检验需求, 可用于实验室间及实验室内结果比对, 以期提高实验室检验人员的检验水平。

关键词: 黑曲霉菌; 标准物质; 转录间隔区位点

Preparation of standard materials for *Aspergillus niger* and its application on food detection

BAI Ji-Chao[#], REN Xiu[#], CHEN Yi-Wen, YU Wen, ZHAO Lin-Na, LU Yong^{*}, CUI Sheng-Hui^{*}

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To develop a standard substance with homogeneity and stability meeting the requirements of standard materials, and apply it to the quality control and laboratory examination of daily detection of *Aspergillus niger* in the laboratory. **Methods** The strains used in the study were identified by micromorphology and sequencing of internal transcribed spacer (ITS) sites, and then lyophilized to prepare 10^4 CFU/sample concentration standard

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603900)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603900)

[#]白继超、任秀为共同第一作者。

[#]BAI Ji-Chao and REN Xiu are co-first authors.

*通信作者: 路勇, 研究员, 主要研究方向为食品化妆品安全。E-mail: luyong0560@126.com

崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: cuishenghui@aliyun.com

*Corresponding author: LU Yong, Professor, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: luyong0560@126.com
CUI Sheng-Hui, Ph.D, Professor, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: cuishenghui@aliyun.com

material. Through the inspection of the uniformity, transportation stability, storage stability and the use effect in different food substrates of the reference material samples, combined with the cooperative fixed value experiment of 3 laboratories, the *Aspergillus niger* reference material samples were evaluated. **Results** The colony of CMCC98003 was fluffy and black spore head, the reverse side of the colony was colorless or light yellow with wrinkles. Under the microscope after production, it could be seen that the vesicle was spherical, small stem and large stem, the conidia was rough, the conidia stem was wide and smooth, and the spore stem neck conformed to the morphological characteristics of *Aspergillus niger*; the sequencing results of its loci were compared with the existing sequence alignment in the gene bank of the national biological information center of the United States, and the best matching result was *Aspergillus niger*. The results of one-way variance analysis by SPSS software were $F_{0.05}(19,20)=2.137$, $F=1.614 < F_{0.05}$, which met the uniformity requirements. The concentration of *Aspergillus niger* standard substance was maintained at 10^4 CFU/sample when it was placed at 4 °C for 28 d and -20 °C for 90 d; the transport stability was tested at 25 and 37 °C for 7 d, and the bacterial concentration was maintained at 10^4 CFU/sample; the applicability test in different food matrices showed that all samples could recover this standard sample; the collaborative calibration results of the 3 laboratories were 10^4 CFU/sample. **Conclusion** The standard materials of *Aspergillus niger* prepared in this study can meet the needs of daily mold count test, which can be used for the comparison of results between laboratories and within laboratories in order to improve the test level of laboratory inspectors.

KEY WORDS: *Aspergillus niger*; standard materials; internal transcribed spacer sites

0 引言

近年来,随着食品防腐剂及食品辐照保藏技术的使用,霉菌引起的食品腐败问题越来越突出。霉菌是自然环境中最常见的腐生菌,遭到霉菌侵染的食品易发生霉坏变质,产生的某些代谢产物还会引起人体的急性和慢性中毒^[1]。

黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)为曲霉属中常见的一个种,在泥土、粮食和植物性产品中分布广泛^[2],也是引起食品和饲料等腐败变质的常见病害真菌^[3]。但是随着人们对黑曲霉菌研究的深入和应用,发现其某些菌种在一定条件下是安全的且具有很大的经济价值,美国食品与药品管理局也在 1987 年将其列为安全菌种^[2,4]。由于黑曲霉菌生长周期短、培养条件简单^[5-8]、且对人员及环境的危害较小,常作为霉菌检验标注物质用菌种。

食品微生物学检测中,霉菌的常规检测是监测其污染的重要手段之一。其常见的检测方法包括干片培养法、荧光分析法、微生物活性测定法、近红外光谱检测法和高光谱成像检测法等^[9-10]。目前,我国食品中黑曲霉菌的检测方法依据 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》进行,与菌落总数检验方法基本相同。虽然霉菌是食品检验的常规检测项目之一,但不同霉菌之间生长速度不一、菌落形态及显微形态有一定差别,想要检验及准确计数并不容易。因此,食

品日常检验工作中检测的质量控制就显得更加重要。可靠、准确且具有适用性的霉菌标准物质是非常急需也是非常必要的。目前,关于霉菌检验标准物质的相关研究报道鲜少。本研究使用从食品中分离的黑曲霉菌,经过显微形态观察及转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)位点测序进行确认后,使用冷冻干燥技术制备一批稳定的黑曲霉菌标准物质样品,以期为霉菌的准确检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本研究所用菌株来源于中国医学细菌保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collections, CMCC),使用菌株为黑曲霉菌 CMCC98003,分离自我国食品样品。

1.1.2 试剂

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)(美国 BD 公司); 0.85% (*m:V*)生理盐水(国药集团容生制药公司); 冻干保护剂(中国食品药品检定研究院自制); DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒(德国 QIAGEN 公司); Qubit™ dSDNA BR Assay Kit 试剂盒(美国 Invitrogen 公司); ITS 位点测序引物[序列见表 1,由英潍捷基有限公司合成,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)纯化]。

表 1 测序引物序列及退火温度
Table 1 Primer sequences and annealing temperature

名称	序列	退火温度 /°C	产物大小 /bp
ITS-F	5'-TCCTCCGCTTATTGA TATGC-3'	52	500~600
ITS-R	5'-GGAAGTAAAAGTC GTAACAAGG-3'		

1.1.3 仪器

HETO POWER DRY LL1500 冷冻干燥机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、Thermo1389 生物安全柜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、Thermo 恒温培养箱 ND2000 核酸蛋白分析仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PL2002 电子天平(瑞士梅特勒托利多公司); Qubit1.0 核酸蛋白定量仪(美国 Invitrogen 公司); HYC-940 全自动微生物螺旋加样系统(西班牙 IUL 公司); Digital 4000cc 均质器(法国 Interscience 公司); BX61 显微镜(日本奥林巴斯公司)

1.2 方法

1.2.1 黑曲霉菌的鉴定

形态观察: 将黑曲霉菌(CMCC98003)划线接种于 PDA 琼脂平板, 28 °C 培养 5~7 d 后, 肉眼观察平板上菌落特点并制片, 于显微镜下观察形态。

ITS 位点测序鉴定: 使用 DNA 提取试剂盒对分纯后菌株进行 DNA 提取, 具体操作步骤参照 DNA 提取试剂盒说明书进行, 提取后使用 Qubit™ dSDNA BR Assay Kit、Qubit1.0 核酸蛋白定量仪及核酸蛋白分析仪对其进行浓度及纯度测定。提取 DNA 后进行 ITS 位点扩增, 扩增体系如下: 10×buffer 2.5 μL, 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP) (0.05 mmol/L) 2 μL, 引物(50 pm/μL) 0.2 μL, Taq 酶(5 U/mL) 0.2 μL, dd H₂O 补至 25 μL 体积, DNA 模板 2 μL; 扩增条件如下: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环, 72 °C 7 min, 4 °C 保存。扩增产物送至北京天一辉远生物科技有限公司进行克隆测序, 结果上传至美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) GenBank 网站进行 Blast 比对。

1.2.2 黑曲霉菌标准物质的研制及验证

(1) 黑曲霉菌标准样品的生产制备流程

将黑曲霉菌(CMCC98003)一代新鲜培养物, 划线接种于 PDA 平板, 28 °C 培养 48 h。用无菌生理盐水洗涤孢子后进行离心清洗, 重复洗涤 3 次后, 弃生理盐水, 加入于冻干保护剂中, 以 20 μL/球的体积滴入含有液氮的 48 孔板中进行速冻, 冻干后菌球分装于西林瓶中, 置于冷冻干燥机中冻干 16 h 后真空压盖密封, -20 °C 保存。

(2) 标准物质的均匀性检验

随机抽取冻干标准物质 20 瓶, 向每瓶标准物质中加

入 1 mL 生理盐水溶液, 将黑曲霉菌标准物质充分溶解, 应用螺旋涂布仪选择 E50 模式涂布于 PDA 平板, 每个样品做 2 个平行, 置 28 °C 培养 48 h 后进行菌落计数。根据 CNAS—GL003 《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》对结果进行单因子方差分析, 评价样品的均匀性。

(3) 标准物质的运输条件稳定性检验

将冻干后标准物质分别存放于 25 和 37 °C 培养箱, 模拟实验周期为 1 周, 分别于 1、3、5、7 d 对标准物质的含菌量进行测定, 检验方法同 1.2.2 (2)。

(4) 标准物质的储存稳定性检验

将冻干后标准物质分别存放于 -20、4 °C。定期对黑曲霉菌的标准物质进行检验, 对储存稳定性进行评价, 检验方法同 1.2.2 (2)。

(5) 标准物质的真实食品样品适用性验证

根据 GB 4789.15—2016, 选择购买于大型商超的食品样品 7 大类共 20 件, 对黑曲霉菌标准物质应用于真实食品样品中的使用效果进行验证。检测步骤为: 称取样品 25 g, 分别加入到 225 mL 生理盐水中, 用拍击式均质器均质 30 s。每种食品样品各称取 2 份, 其中一份作为本底对照, 另一份作为实验组加入 1 个标准物质均质后进行使用效果验证。后续检验参照 GB 4789.15—2016 进行检测。

(6) 协作标定

1) 方案的设计

协作标定样品包括 10 瓶黑曲霉菌的标准样品, 每个标准样品浓度水平为 10⁴ CFU。

2) 样品的发放

共对 3 家实验室发放样品, 将 10 瓶西林瓶样品分别固定于有海绵缓冲的方盒中, 再将方盒置于密封袋中, 于泡沫盒中加入 1.5 kg 冰袋密封后进行运输。

3) 测定方法

进行协作标定的实验室参照 GB 4789.15—2016 对标准样品进行检测, 实验室可根据日常检测的要求选择培养基及黑曲霉菌的鉴定方法。

4) 结果的评价原则

对实验室报送的结果, 按以下原则进行判定, 10 份标准样品中有任意样品检测浓度低于 10⁴ CFU 即判定制备的标准样品不合格。最终根据 3 家实验室反馈结果对本标准物质浓度的结果进行评价。

2 结果与分析

2.1 菌株确认

2.1.1 形态观察

肉眼观察菌落绒状, 黑色孢子头, 菌落反面呈无色或淡黄色有皱褶。制片后显微镜下观察, 可见顶囊呈球形, 小梗, 大梗, 分生孢子粗糙, 分生孢子梗宽且光滑, 孢梗

颈, 符合黑曲菌形态特性。

2.1.2 ITS 位点测序

本研究使用菌株提取 DNA 后使用 Qubit1.0 核酸蛋白定量仪测定浓度为 4.34 μg/mL, 浓度符合要求; 使用核酸蛋白分析仪测定纯度, A260/A280 为 1.88, 纯度良好; ITS 位点测序结果如下:

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCG
 AGTGC GGTCCTTTGGGCCAACCTCCCATCCGTGTC
 TATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTGTC
 GGCCCGGGGGGGGCGCCTCTGCCCGGGCCCGT
 GCCCGCCGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAA
 GCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAA
 ACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
 AAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC
 AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT
 GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAG
 CGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGG
 TCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAG
 GCAGCGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGG
 GGCTTTGTACATGCTGTAGGATTGGCCGGCGCCT
 GCCGACGTTTTCCAACATTCTTTCCAGGTTGACCTC
 GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC
 AATAAGCGGAGGA。

与 NCBI Genbank 中比对, 匹配最优结果为黑曲霉菌 (*Aspergillus niger*)(Accession number: MT550026.1, 覆盖度: 100%; 鉴定匹配度: 100%)。综上, 本研究中使用的菌株确认无误。

2.2 标准样品均匀性的检验结果

对 20 瓶黑曲霉菌标准物质的检测结果计数, 结果的均值为 3.8×10^4 CFU/样品, 最大值为 5.2×10^4 CFU/样品, 最小值为 2.6×10^4 CFU/样品。对检测结果进行单因素方差分析可见, 样品间均方为 0.012, 样品内均方 0.007, 计算出 $F=1.614$, $F_{0.05}(19,20)$ 临界值=2.137, $F < F_{0.05}$ 。表明在 0.05 显著水平时, 黑曲霉菌的标准物质是符合均匀性要求的(结果见表 2)。

表 2 20 瓶标准物质计数结果
 Table 2 Count of 20 bottles of samples standard materials

序号	菌含量 (CFU/样品)	对数值	菌含量 (CFU/样品)	对数值
1	4.4×10^4	4.64	4.0×10^4	4.60
2	4.4×10^4	4.64	4.6×10^4	4.66
3	5.0×10^4	4.70	4.8×10^4	4.68
4	3.2×10^4	4.51	2.6×10^4	4.41
5	2.6×10^4	4.41	3.2×10^4	4.51
6	5.0×10^4	4.70	5.2×10^4	4.72
7	3.6×10^4	4.56	3.8×10^4	4.58
8	3.2×10^4	4.51	3.2×10^4	4.51
9	3.4×10^4	4.53	3.8×10^4	4.58

表 2(续)

序号	菌含量 (CFU/样品)	对数值	菌含量 (CFU/样品)	对数值
10	3.6×10^4	4.56	3.8×10^4	4.58
11	5.2×10^4	4.72	2.8×10^4	4.45
12	4.8×10^4	4.68	5.2×10^4	4.72
13	3.0×10^4	4.48	4.4×10^4	4.64
14	3.6×10^4	4.56	5.0×10^4	4.70
15	3.2×10^4	4.51	3.0×10^4	4.48
16	3.6×10^4	4.56	3.0×10^4	4.48
17	3.2×10^4	4.51	2.6×10^4	4.41
18	3.8×10^4	4.58	3.0×10^4	4.48
19	3.2×10^4	4.51	4.0×10^4	4.60
20	4.2×10^4	4.62	3.6×10^4	4.56
平均值			3.8×10^4 CFU/样品	
最大值			5.2×10^4 CFU/样品	
最小值			2.6×10^4 CFU/样品	

2.3 标准物质运输稳定性检验结果

对本研究生产的黑曲霉菌标准物质进行运输稳定性监测(结果见表 3), 37 °C 储存 7 d 后仍然稳定在 10^4 CFU/样品, 表明 37 °C 条件下保存黑曲霉菌标准物质是稳定的; 25 °C 条件下, 储存 7 d 后也仍然稳定在 10^4 CFU/样品, 大部分国内城市 7 d 内邮寄都可以到达, 因此在高温天气(37 °C)下及常温天气(25 °C)下运输都可以符合要求。

表 3 标准样品运输稳定性测定结果
 Table 3 Determination results of transport stability of standard samples

时间/d	37 °C (CFU/样品)	37 °C对数值	25 °C (CFU/样品)	25 °C对数值
0	3.8×10^4	4.58	3.8×10^4	4.58
3	4.3×10^4	4.63	4.2×10^4	4.62
5	4.3×10^4	4.63	3.4×10^4	4.53
7	4.3×10^4	4.63	4.3×10^4	4.63

2.4 标准样品物质储存稳定性检验结果

对本研究生产的黑曲霉菌标准物质进行长期(-20 °C)储存及短期(4 °C)储存稳定性监测(结果见表 4)。-20 °C 保藏 180 d 复苏率为 84.2%, 浓度维持在 10^4 CFU/样品, 表明 -20 °C 条件下长期保存该标准物质是可行的; 4 °C 条件下, 储存 28 d 复苏率在 89.5% 以上, 浓度维持在 10^4 CFU/样品, 表明 4 °C 条件下短期保存该标准物质也是符合要求的。

表4 -20、4℃储存稳定性结果

Table 4 Storage stability determination results under -20, 4℃

时间/d	-20℃活菌含量 (CFU/样品)	复苏率/%	4℃活菌含量 (CFU/样品)	复苏率/%
0	3.8×10^4		3.8×10^4	
1	/	/	4.0×10^4	105.3
3	/	/	3.6×10^4	94.7
5	/	/	3.4×10^4	89.5
7	4.0×10^4	105.3	3.4×10^4	89.5
14	3.8×10^4	100.0	3.6×10^4	94.7
28	4.2×10^4	110.5	3.8×10^4	100.0
60	3.6×10^4	94.7	/	/
90	3.4×10^4	89.5	/	/
180	3.2×10^4	84.2	/	/

注: /表示无需检测,下同。

2.5 协作标定的结果

将制备的黑曲霉菌标准物质,采用泡沫盒加冰袋的方式寄送给协作标定单位,共3家单位,代码为A、B、C,对10件样品进行计数,并进行生化鉴定(结果见表5)。

本研究制备的黑曲霉菌标准物质,设计目标菌的含量为 10^4 CFU/样品,使用的菌株为CMCC98003黑曲霉菌,通过3家实验室测定的结果可见,样品活菌含量均在 10^4 CFU/样品水平,生化鉴定结果均符合黑曲霉菌的特征。

2.6 标准物质(样品)的使用效果验证检验

如表6所示,在冷冻饮品、婴儿配方奶粉、蜂花粉、非发酵豆制品、膨化食品、饼干、果干制品7类常见食品中,加入本标准物质后均能够检出黑曲霉菌,证明该标准物质可以满足食品中黑曲霉菌检验的质控要求。

表5 协作标定结果

Table 5 Collaborative study result

协作标定单位代码	A		B		C	
样品序号	活菌含量 (CFU/样品)	鉴定结果	活菌含量 (CFU/样品)	鉴定结果	活菌含量 (CFU/样品)	鉴定结果
1	3.3×10^4	是	2.8×10^4	是	4.7×10^4	是
2	2.9×10^4	是	3.2×10^4	是	2.0×10^4	是
3	3.3×10^4	是	3.3×10^4	是	5.4×10^4	是
4	2.7×10^4	是	2.3×10^4	是	5.4×10^4	是
5	2.8×10^4	是	3.0×10^4	是	5.0×10^4	是
6	3.0×10^4	是	3.0×10^4	是	4.5×10^4	是
7	3.4×10^4	是	2.6×10^4	是	3.2×10^4	是
8	2.5×10^4	是	2.9×10^4	是	4.1×10^4	是
9	3.0×10^4	是	2.7×10^4	是	2.1×10^4	是
10	4.4×10^4	是	2.5×10^4	是	4.7×10^4	是
平均值	3.1×10^4	/	2.8×10^4	/	4.1×10^4	/
总平均值			3.3×10^4			

表6 食品中标准物质(样品)验证结果

Table 6 Validation results of reference materials (samples) in food

序号	样品名称	样品本底检测结果	检测结果
1	上海亮亮重绿豆冰棍	-	+
2	君乐宝茵童时光幼儿配方奶粉(12~36月龄3段)	-	+
3	惠氏启赋蕴萃幼儿配方奶粉(0~6月龄1段)	-	+
4	飞鹤臻爱飞帆幼儿配方奶粉(12~36月龄3段)	-	+
5	子母幼儿配方奶粉(12~36月龄3段)	-	+
6	惠氏S-26金装爱儿乐(0~6月龄1段)	-	+
7	蜜乐油菜蜂花粉	-	+

表 6(续)

序号	样品名称	样品本底检测结果	检测结果
8	五台山蜂蜜园蜂花粉	-	+
9	南京老山油菜蜂花粉	-	+
10	古松黄豆腐竹	-	+
11	奥雪芥末绿冰棍	-	+
12	伊利奶提子雪糕	-	+
13	蒙牛绿色心情雪糕	-	+
14	德氏德式黑啤酒酿黑麦冰淇淋	-	+
15	川珍豆腐皮	-	+
16	阿香婆小米锅巴	-	+
17	peppito 奶盐味梳打饼干	-	+
18	禾煜臻萃小核桂圆	-	+
19	小禾说桂圆干	-	+
20	六必居油泼黄瓜	-	+

注: -表示未检出黑曲霉菌, +表示检出黑曲霉菌。

3 结论与讨论

标准菌株的质量控制是食品微生物检测结果准确性和可靠性的保障^[11]。目前大部分可供的标准物质使用的菌株购买自国外权威保藏机构, 其运输时间长、价格高、使用受限, 不利于我国食品相关研究的开展。本研究使用的黑曲霉菌分离自我国食品样品, 具有我国食源性特点及我国自主知识产权, 可摆脱国外的相关限制。

目前我国国家标准中并未对霉菌的菌落及显微形态进行详细描述, 主要为其形态较多, 无法一一展开叙述。霉菌辨别需要一定经验, 据了解部分检验人员所在实验室既无霉菌相关标准菌株作为对照也未分离到霉菌, 缺乏经验, 可能导致检验水平无法提升及无法进行相应研究。为保证菌种准确性, 本研究通过显微形态特征及 ITS 位点测序 2 种检测手段对菌种进行综合鉴定确认, 经过确认, 本菌显微形态典型, 与相关文献报道一致^[12-13]。实验室检验人员可参照本研究相关详细描述进行观察, 积累一定经验, 还可根据本研究列出的 ITS 位点测序的可靠引物、扩增条件、扩增体系、测序序列等信息进行检验, 进一步提高检验检测能力。

查阅文献可见, 目前大部分微生物标准物质为定性标准物质^[14-16], 近年来随着研究发展, 也有陆续有一些定量标准物质进行研制, 但数量及种类无法满足检验要求^[17-18]。本样品作为定量标准物质研制具有更高难度, 通过检测数据可见, 符合作为定量标准物质使用的要求。一般天气(25 °C)及高温天气(37 °C)下, 7 d 内邮寄可到达的城市间运输可维持样品活菌数量的稳定, 满足运输要求。长

期储存样品时, 建议保持在-20 °C以下, 短期内可放于冷藏。20 件常见食品样品中验证可见, 样品均可回收, 适用于食品中霉菌的检验。3 家实验室协作标定结果可见, 其平均标定浓度为 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ CFU/样品, 按国家标准要求于 225 mL 样品稀释液中使用, 可被稀释至 10^2 CFU/样品, 在平板上计数时浓度适宜, 便于人员的使用。

本研究制备的标准物质为冻干小球, 比冻干粉末样品使用更安全便捷^[19-20], 可直接打开溶解使用, 既保证了使用人员及环境的安全, 也保证了检测结果准确性及稳定性。综上, 本研究制备的黑曲霉菌标准物质方便、安全、快捷, 可用于实验室日常检验的质量控制及对照样品, 也可作为实验室间比对或能力验证样品, 进一步提高检验机构的检测能力。

参考文献

- [1] 韩小敏, 李凤琴. 黑曲霉菌种多相分类和鉴定方法最新研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 279-285.
HAN XM, LI FQ. Advances on polyphasic classification and identification of *Aspergillus niger* isolates [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(23): 279-285.
- [2] 张熙, 韩双艳. 黑曲霉发酵产酶研究进展[J]. 化学与生物工程, 2016, 33(1): 13-16.
ZHANG X, HAN SY. Research progress on fermentation production of enzyme by *Aspergillus niger* [J]. Chem Bioeng, 2016, 33(1): 13-16.
- [3] VARGA J, KEVEI F, HAMARI Z, et al. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification [M]. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000.
- [4] 蔡程山, 王雨, 白飞荣, 等. 黑曲霉 *Aspergillus niger* 全基因组 DNA 提取方法的改良与比较[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(6): 13-18.

- CAI CS, WANG Y, BAI FR, *et al.* Improvement and comparison of *Aspergillus niger* genomic DNA extraction methods [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(6): 13–18.
- [5] 张楠, 孙西同, 李金, 等. 黑曲霉固态发酵生产柚苷酶的工艺研究[J]. *工业微生物*, 2020, 50(5): 21–26.
- ZHANG N, SUN XT, LI Q, *et al.* Process of solid-state fermentation for naringinase production by *Aspergillus niger* FFCC uv-11 [J]. *Ind Microbiol*, 2020, 50(5): 21–26.
- [6] PATEL H, CHAPLA D, DIVECHA J, *et al.* Improved yield of α -L-arabinofuranosidase by newly isolated *Aspergillus niger* ADH-11 and synergistic effect of crude enzyme on saccharification of maize stover [J]. *Bioresour Bioprocess*, 2015, 2(1). DOI: 10.1186/s40643-015-0039-7
- [7] 刘新育, 王一凡, 王明道, 等. 热击对黑曲霉孢子萌发及产木聚糖酶的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2013, (11): 39–43.
- LIU XY, WANG YF, WANG MD, *et al.* Effect of heat shock on spore germination and xylanase production of *Aspergillus niger* [J]. *Food Ferment Ind*, 2013, (11): 39–43.
- [8] 唐菁, 赵志, 苏莱, 等. 黑曲霉 H1-9b 发酵产葡萄糖氧化酶的工艺优化[J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 220–223.
- TANG J, ZHAO X, SU M, *et al.* Optimization of glucose oxidase production by fermentation of *Aspergillus niger* H1-9b [J]. *Food Sci*, 2013, 34(9): 220–223.
- [9] 龙炫辉, 杨永强, 魏涛, 等. 实时荧光重组酶聚合酶扩增快速检测临床常见曲霉菌方法的建立[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(16): 3189–3192.
- LONG XH, YANG YQ, WEI T, *et al.* Establishment of a real-time fluorescent recombinase polymerase amplification method for rapid detection of common clinical *Aspergillus* [J]. *Prog Mod Biomed*, 2020, 20(16): 3189–3192.
- [10] 周玉庭, 任佳丽, 张紫莺. 粮食中霉菌污染检测方法现状及发展趋势[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(1): 252–258.
- ZHOU YT, REN JL, ZHANG ZY. Current situation and development trends of detection methods for mold contamination in grains [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(1): 252–258.
- [11] 谢春华. 大肠埃希氏菌标准菌株的制备以及试剂验收分析[J]. *临床检验杂志*, 2018, 7(4): 595–596.
- XIE CH. Preparation of standard strains of *Escherichia coli* and analysis of reagent acceptance [J]. *Clin Lab J*, 2018, 7(4): 595–596.
- [12] FUNGARO MHP, FERRANTI LS, MASSI FP, *et al.* *Aspergillus labruscus* sp. Nov. a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6203.
- [13] SAMSON RA, VISAGIE CM, HOUBRAKEN JJ, *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus* [J]. *Stud Mycol*, 2014, 78(4): 141–173.
- [14] 瞿洪仁, 骆海朋, 申静云, 等. 食品检测用单核细胞增生李斯特氏菌标准物质的研制[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(1): 73–78.
- QU HR, LUO HP, SHEN JY, *et al.* Preparation of *Listeria monocytogenes* reference material for food analysis [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(1): 73–78.
- [15] 柯璐, 林杰, 戴晓丽, 等. 肠炎沙门氏菌活菌标准物质的研制[J]. *食品研究与开发*, 2015, (5): 111–115.
- KE L, LIN J, DAI XL, *et al.* The reference materials of preparation about *Salmonella enteritidis* [J]. *Food Res Dev*, 2015, (5): 111–115.
- [16] 柯璐, 戴晓丽, 林杰, 等. 志贺氏菌标准物质的制备方法[J]. *食品科学*, 2015, 36(24): 253–259.
- KE L, DAI XL, LIN J, *et al.* Preparation of reference materials for *Shigella* [J]. *Food Sci*, 2015, 36(24): 253–259.
- [17] 薛蕾, 林婧, 隋志伟, 等. 大肠杆菌定量检测用标准物质的研制[J]. *计量学报*, 2015, 36(6): 652–656.
- XUE L, LIN J, SUI ZW, *et al.* Preparation of reference material for quantitative detection of *Escherichia coli* [J]. *Acta Metrol Sin*, 2015, 36(6): 652–656.
- [18] 任秀, 白继超, 骆海朋, 等. 食品检验用解脂耶氏酵母菌标准物质制备研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(17): 6770–6775.
- REN X, BAI JC, LUO HP, *et al.* Study on the preparation of standard materials for *Yarrowia lipolytica* [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(17): 6770–6775.
- [19] 林杰, 柯璐, 黄晓蓉, 等. 甲型副伤寒沙门菌标准物质制备工艺初探[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014, (7): 127–129.
- LIN J, KE L, HUANG XR, *et al.* Preliminary study on the preparation process of standard substances of *Salmonella paratyphoid* A [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2014, (7): 127–129.
- [20] 薛蕾, 隋志伟, 张玲, 等. 金黄色葡萄球菌标准物质的研制[J]. *食品科学*, 2015, 36(8): 44–48.
- XUE L, SUI ZW, ZHANG L, *et al.* Preparation of *Staphylococcus aureus* reference material [J]. *Food Sci*, 2015, 36(8): 44–48.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



白继超, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: baijichao1989@163.com



任 秀, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品微生物学、分子生物学检测。
E-mail: wanwan329@sina.cn



路 勇, 研究员, 主要研究方向为食品化妆品安全。
E-mail: luyong0560@126.com



崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
Email: cuishenghui@aliyun.com