doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.17.015

黑曲霉生长最低水分活度研究*

周志云[1],杨 静[1],李 翠[1],胡 科[2],杨晓莉[1△]
(1.陕西省食品药品监督检验研究院,陕西 西安 710061; 2.陕西盛德泰林生物安全技术检测有限公司,陕西 西安 710061)

摘要:目的 探讨氯化钠、甘油、葡萄糖3种不同培养介质在不同水分活度条件下对目标微生物黑曲霉生长的影响。**方法** 分别称取不同浓度的氯化钠、甘油、葡萄糖,调节玫瑰红钠琼脂平板的水分活度,测量黑曲霉在平板上的生长直径,判定菌落生长的最低水分活度值。**结果** 以氯化钠和甘油介质调节水分活度在0.77以下时,黑曲霉的增长处于停滞状态;以*D*(+)－无水葡萄糖介质调节水分活度在0.76以下时,黑曲霉的增长处于停滞状态。**结论** 水分活度的高低对黑曲霉的生长有一定影响,其生长最低水分活度与《美国药典》中对黑曲霉最低水分活度值的要求一致。

关键词:水分活度;黑曲霉;微生物控制
中图分类号:R917;R927.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1006－4931(2020)17－0060－04

Minimum Water Activity of *Aspergillus Niger*

ZHOU Zhiyun[1], *YANG Jing*[1], *LI Cui*[1], *HU Ke*[2], *YANG Xiaoli*[1]
(*1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710061; 2. Shaanxi Shengdetailin Biological Safety Technical Testing Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, China 710061*)

Abstract: Objective To study the effects of three different culture media, i.e., sodium chloride, glycerol and glucose, on the target microorganism *Aspergillus niger* under different water activities. **Methods** Different concentrations of sodium chloride, glycerol and glucose were used to adjust the water activity of the rose red sodium agar plate. The minimum water activity value of the colony growth was determined by measuring the growth diameter of *Aspergillus niger* on the plate. **Results** The water activity controlled by sodium chloride and glycerin was below 0.77, and *Aspergillus niger* was in a state of stagnant growth. With *D*(+)－ anhydrous glucose medium to regulate water activity below 0.76, *Aspergillus niger* was in a state of stagnant growth. **Conclusion** The level of water activity has a certain effect on the growth of *Aspergillus niger*. The lowest water activity of *Aspergillus niger* was consistent with USP1112.

Key words: water activity; *Aspergillus niger*; microbial control

水分含量是反映药品质量安全和稳定的一个重要参数[1－4]。水分活度(Aw)是指食品或药品等物质在密闭容器中达到平衡状态时的水分蒸气压与该温度下纯水的饱和蒸气压的比值[4－5]。微生物的生长必须有水,但结合在分子内的水不能被微生物利用,只有游离的水才能被利用[6],故采用水分活度来表示能被微生物利用的实际含水量,控制水分活度可抑制微生物的生长。各类不同的微生物与水分活度的关系主要体现在临界点上,低于此临界点,微生物不能生长[7]。通过不同的介质优化产品处方,设计和控制药品的水分活度,可降低微生物增殖的风险。《美国药典》首次收载水分活度测定应用于非无菌制剂微生物控制的章节[8],将其成功引入制药工业药品微生物控制,但目前《中国药典》对相关内容收载较少。黑曲霉为曲霉属真菌中的一个常见种属,广泛分布于世界各地的粮食、植物性产品和土壤中,其生长适温为28 ℃左右,最低相对湿度为88%,能引起水分较高的粮食霉变和其他工业器材霉变。黑曲霉可运用在药物发酵中,如在甘草发酵过程中可提高甘草甜素的提取率,但若生产不当,则会产生致癌性的黄曲霉毒素[9－10]。本研究中应用氯化钠、甘油、葡萄糖3种不同介质调节玫瑰红钠琼脂的水分活度值,以降低黑曲霉可利用的"游离水"程度,从而达到使黑曲霉不再繁殖、生长停滞的目的,并探讨黑曲霉生长所需的最低水活度值。现报道如下。

1 仪器、菌种与试药

1.1 仪器

Aqualab Series 4型水分活度仪(美国Decagon公司);HFsafe－1200 LC型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);BS2202S型电子分析天平(德国赛多利斯公司,精度为0.01 g);IPP260型霉菌培养箱(德国Memmer公司)。

1.2 菌种

黑曲霉 *Aspergillus niger* 标准菌株购自中国医学细菌保藏管理中心,试验用菌株为第3代。

1.3 试药

沙氏葡萄糖琼脂培养基(北京陆桥技术有限责任公司,批号为170316);玫瑰红钠琼脂培养基(北京陆桥技术有限责任公司,批号为181124);甘油(批号为

*基金项目:陕西省重点研发计划项目[2019SF－062]。
第一作者:周志云,大学本科,主管药师,主要从事药品微生物检验与分析工作,(电子信箱)1271413243@qq.com。
△通信作者:杨晓莉,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药品微生物控制与管理及标准修订,(电子信箱)yangxiaoli0206@163.com。

20180730),氯化钠(批号为 20170308),*D*(+)-无水葡萄糖(批号为 20180109),聚山梨酯 80(批号为 20180821),均由国药集团化学试剂有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 菌液制备

将黑曲霉接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)上,25 ℃培养 7 d,加入 5 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的无菌 0.9% 氯化钠溶液,洗脱孢子,收集孢子悬液,用含 0.05% 聚山梨酯 80 的无菌 0.9% 氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液,移至无菌试管内,用无菌 0.9% 氯化钠溶液制备成每 1 mL 含黑曲霉 10^4 cfu 的孢子悬液。

2.1.2 培养基制备

玫瑰红钠平皿制备:分别称取氯化钠、甘油、*D*(+)-无水葡萄糖,调节玫瑰红钠培养基的水分活度至 T_L(0.76),T(0.77),T_H(0.78),即黑曲霉生长的水分活度限值为 0.77,用不同介质调节玫瑰红钠培养基,使灭菌后的培养基的水分活度至最低水分活度附近 3 个水平(即低于水分活度限值 0.01 单位、水分活度限值、高于水分活度限值 0.01 单位),同时配制不调节水分活度的玫瑰红钠培养基 T_0。

不同环境水分活度制备:称取氯化钠、甘油、无水葡萄糖,置纯化水中,调节各溶液水分活度至 0.76,0.77,0.78,与玫瑰红钠琼脂平皿水分活度相同。将 121 ℃灭菌 15 min 后的氯化钠、甘油、无水葡萄糖溶液置密封干燥器中,制备不同环境水分活度储存环境。

2.1.3 水分活度测定

预培养:无菌操作将滤膜正面朝上,贴于未调节水分活度灭菌后的玫瑰红钠琼脂平板上。将制备好的菌液用接种针点植于滤膜中心位置,25 ℃预培养 48 h。

观察、转移与分组:待菌落生长至直径为 5~10 mm 时,分别测量滤膜垂直的 2 个直径,取平均值,2 次测量差值不超过 2 mm,记为初始大小。在生物安全柜内将菌落连同滤膜小心转移至制备好的不同梯度水分活度的玫瑰红钠琼脂平板上。T_L(0.76),T(0.77),T_H(0.78)为试验组;T_0 为对照组(0.95~0.97)。

培养:将灭菌后含有不同水分活度的盐、甘油、无水葡萄糖溶液倒入干燥器内,将玫瑰红钠平皿置含有相同水分活度盐、甘油、无水葡萄糖溶液的密闭干燥器内,置 25 ℃培养、观察。采取水分活度仪-露点/冷面镜法直接测定调节水分活度[11],于 0,3,7,11,15,19,23,27,31 d 时分别测量并记录菌落大小。每个验证试验分别进行 3 次。

2.2 结果

2.2.1 氯化钠培养介质

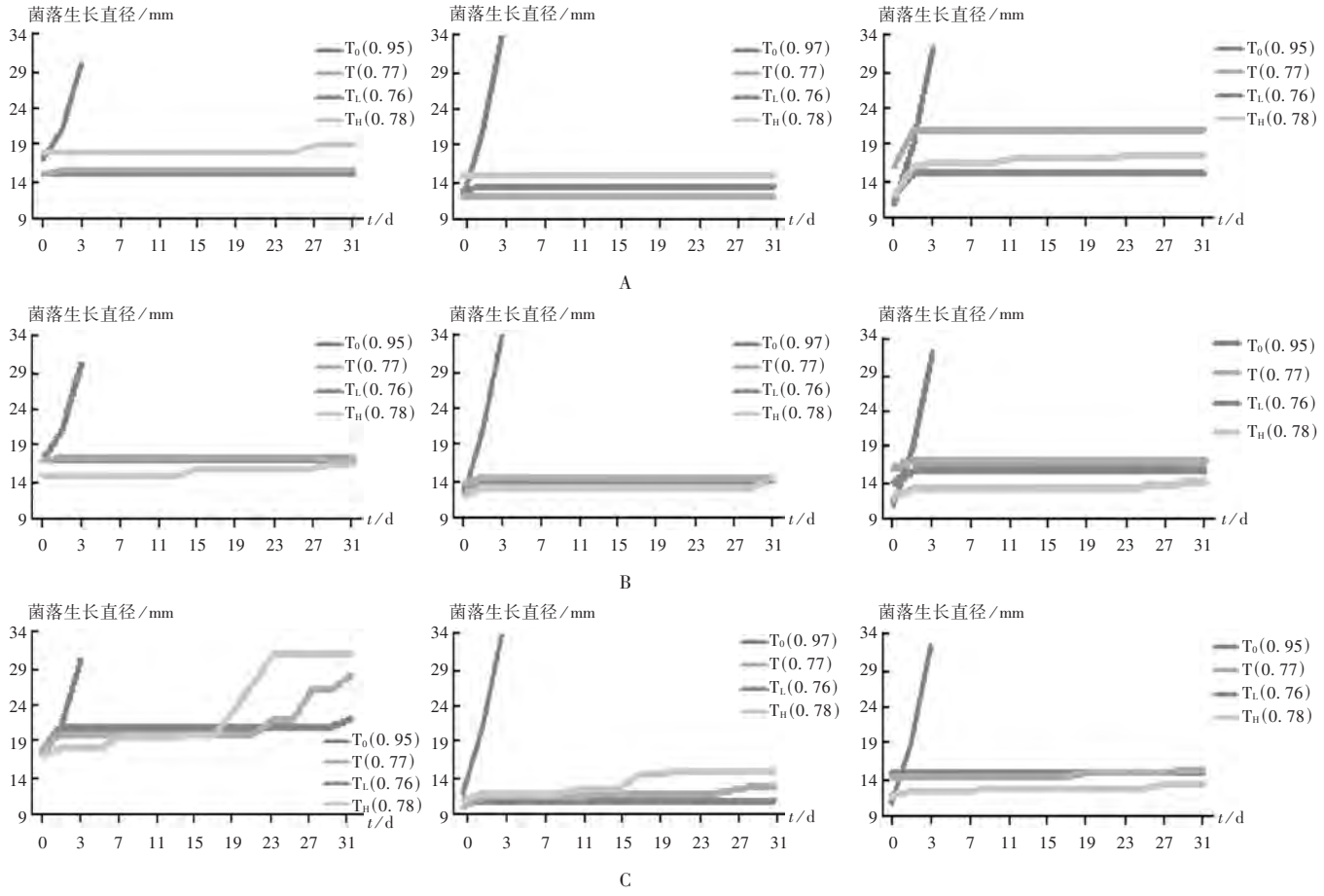
以氯化钠为介质,考察周期为 31 d,记录黑曲霉在 0.76,0.77,0.78 水分活度下菌落的生长情况。结果未调节水分活度的玫瑰红钠琼脂平板(对照组)的黑曲霉生长不受环境影响,第 3 天超出测量范围;其余 3 组玫瑰红钠琼脂平板均调节水分活度,已接种黑曲霉的滤膜转移至平板,前 3 d,菌落处于适应阶段,有不同程度的增长,3 d 后,菌落逐渐趋于平稳。水分活度低于 0.77 时,3 组黑曲霉菌丝均未出现增长情况。当水分活度调节至 0.78 时,第 1 次实验观察至第 23 天,黑曲霉菌丝直径增长 0.5 mm;第 2 次实验观察至第 31 天,黑曲霉菌丝直径未增长;第 3 次实验观察至第 27 天,黑曲霉菌丝直径增长了 1 mm。详见图 1 A。因此,以氯化钠调节水分活度来控制黑曲霉的增长有显著效果,水分活度控制在 0.77 以下时,黑曲霉的增长处于停滞状态。

2.2.2 甘油培养介质

以甘油为介质,考察周期为 31 d,记录黑曲霉在 0.76,0.77,0.78 不同水分活度下菌落的生长情况。结果,未调节水分活度的玫瑰红钠琼脂平板(对照组)的黑曲霉生长不受环境影响,第 3 天超出测量范围;其余 3 组玫瑰红钠琼脂平板均调节水分活度,已接种黑曲霉的滤膜转移至平板,前 3 d,菌落处于适应阶段,有不同程度的增长,3 d 后,菌落逐渐趋于平稳。水分活度低于 0.77 时,3 组黑曲霉菌丝均未出现增长情况。当水分活度为 0.78 时,第 1 次实验观察至第 15 天,黑曲霉菌丝呈现增长趋势,至第 29 天,菌丝直径增长了 1.5 mm;第2 次实验观察至第 25 天,黑曲霉菌丝呈增长趋势,至第31 天菌丝直径增长了 1.0 mm;第 3 次实验观察至第 29 天,黑曲霉菌丝呈现增长趋势,至第 31 天菌丝直径增长了 1.5 mm。详见图 1 B。因此,以甘油调节水分活度来控制黑曲霉的增长,水分活度控制在 0.77 以下时,黑曲霉的增长处于停滞状态;水分活度在 0.78 时,菌丝虽有增长,但变化不大,直径只有 1~1.5 mm 的增长。

2.2.3 *D*(+)-无水葡萄糖培养介质

以 *D*(+)-无水葡萄糖为介质,考察周期为 31 d,记录黑曲霉在 0.76,0.77,0.78 不同水分活度下菌落的生长情况。结果,未调节水分活度的玫瑰红钠琼脂平板(对照组)的黑曲霉生长不受环境影响,第 3 天超出测量范围,其余 3 组玫瑰红钠琼脂平板均调节水分活度,已接种黑曲霉的滤膜转移至平板,前 3 d,菌落处于适应阶段,有不同程度的增长,3 d 后,菌落逐渐趋于平稳。水分活度低于 0.76 时,3 组黑曲霉菌丝均未出现增长情况。当水分活度调节至 0.77 时,第 1 次实验观察至第 23 天,黑曲霉菌丝呈现增长趋势,至第 31 天菌丝直径增长了 8mm;第 2 次实验观察至第 13 天,黑曲霉菌丝呈增长趋势,至第 31 天菌丝直径增长了 1.5 mm;第 3 次实验观察至第 19 天,黑曲霉菌丝呈现增长趋势,至第 31 天菌丝直径增长了 1 mm。当水分活度调节至 0.78 时,第1 次实



A. 氯化钠 B. 甘油 C. *D*(+)-无水葡萄糖

图1 不同培养介质下3种水分活度黑曲霉生长情况(n=3)

验观察至第7天,黑曲霉菌丝呈现增长趋势,至第31天菌丝直径增长了13 mm;第2次实验观察至第17天时黑曲霉菌丝呈现增长趋势,至第31天菌丝直径增长了3 mm;第3次实验观察至第9天,黑曲霉菌丝呈现增长趋势,至第31天菌丝直径增长了1 mm。详见图1 C。因此,以*D*(+)-无水葡萄糖调节水分活度来控制黑曲霉的增长,水分活度控制在0.76以下时,黑曲霉的增长处于停滞状态;水分活度在0.77以上时,菌丝呈增长趋势。

3 讨论

以氯化钠为介质调节水分活度为0.76~0.78时,黑曲霉菌落直径均无明显变化。以甘油为介质调节水分活度为0.76~0.77时,菌落直径无明显变化;水分活度为0.78时,菌落直径增长1~2 mm。*D*(+)-无水葡萄糖为介质调节水分活度为0.76时,菌落直径无明显变化;水分活度为0.77~0.78时,黑曲霉菌落直径增长3~10 mm。不同介质条件下,黑曲霉最低水分活度存在差异,其中氯化钠调节下的黑曲霉菌落增长不明显,但通过甘油及葡萄糖调节后,水分活度在0.78时即出现增长趋势。可见,通过氯化钠调节能获得最低的黑曲霉生长水分活度值。

黑曲霉菌丝测定采用的培养基为SDA,使用*D*(+)-无水葡萄糖调节SDA水活度平板不凝,分析原因可能是SDA培养基处方中含有大量的葡萄糖[12]。但在配制水分活度为0.76的SDA平板时,需在原处方基础上添加较大量的葡萄糖,这改变了培养基的特性,导致试验无法继续。经过各种试验研究后选用玫瑰红钠琼脂培养基,解决了水分活度较低的情况下平板不凝的问题。

在药品生产领域,尤其是中药材、中药饮片、中药颗粒经常在运输及贮存过程中发生霉变[13]。因此,在非无菌药品的配方开发和保质期研究中引入水分活度的概念十分有必要[14-15],通过不同的介质优化产品处方,设计和控制药品的水分活度,降低微生物增殖的风险是发展趋势。本研究结果显示,当水分活度不超过0.76时,黑曲霉菌落生长处于停滞期,这与文献[8]的研究结果基本一致。

参考文献:

[1] 杨晓莉,李 辉,绳金房,等. 药品微生物控制中水分活度测定的应用前景[J]. 中国药业,2018,27(23):7-10.

[2] 绳金房,李 辉,马仕洪,等. 浅析水分活度测定在非无菌制剂微生物控制中的应用[J]. 药物分析杂志,2018,38(10):1837-1841.