

## 双歧杆菌干燥型微胶囊技术的研究

唐宝英 朱晓慧 刘佳

(江苏省微生物研究所, 无锡, 214063)

TQ46 A

**摘要** 通过对4种双歧杆菌微胶囊化技术的研究, 确立了制备高活性双歧杆菌干燥型微胶囊的最佳工艺。用此工艺制备的双歧杆菌微胶囊在冷藏和室温的条件下分别保存7个月, 存活率比对照分别提高33.6%和47.68%。

**关键词** 双歧杆菌, 微囊化, 存活率

双歧杆菌是人体肠道菌群中的有益细菌, 但双歧杆菌制品在贮存过程中存在着活性菌含量下降和服用时受胃酸影响而导致活性损失的问题, 为了解决这个问题, 近年来, 人们开始着手进行双歧杆菌微囊化的研究<sup>[1,2]</sup>。文中通过对4种双歧杆菌微囊化方法的研究, 确立了制备高活性双歧杆菌干燥型微胶囊的最佳工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 微生物菌种

两歧双歧杆菌, 江苏省微生物研究所保存。

#### 1.1.2 主要培养基

液体培养基: 葡萄糖1%, 酵母膏0.5%, 蛋白胨1%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%, pH 6.7。

TPY 固体培养基。

#### 1.1.3 主要试剂

明胶(化学纯, 中国医药集团上海化学总公司), 对苯二甲酰氯(化学纯, 上海群力化工厂), 果胶(Sigma公司), 液体石蜡(化学纯, 宜兴市洋溪徐渡化工厂), 异丙醇(分析纯, 宜兴市洋溪徐渡化工厂), 丙酮(分析纯, 昆山申江化工厂), 甲醛(分析纯, 宜兴市化学试剂三厂), 大豆色拉油(中外合资上海嘉里粮油工业有限公司), 棕榈油(江南大学提供), 司盘-85(化学纯, 中国医药集团上海化学试剂公司), 壳聚糖(Sigma公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 双歧杆菌湿菌体制备方法

将保存的菌种接种于液体培养基中, 在37℃培养20h后离心, 去培养基, 并用生理盐水洗涤2次, 所得湿菌体可直接作为制备微囊的心材。

#### 1.2.2 双歧杆菌冷冻粉制备方法

取湿菌泥以1:4的质量比与20%脱脂奶液充分混合, 于冷冻干燥机干燥20~24h, 粉碎过100目筛。

#### 1.2.3 双歧杆菌微胶囊的制备方法

方法A<sup>[3,4]</sup>: 将0.4g双歧杆菌冷冻粉与4mL 4%壳聚糖溶液混匀并悬浮于100mL大豆色拉油中(以Span85为乳化剂), 于250mL的烧杯中搅拌, 搅拌速度为200r/min, 乳化后加入1.2g对苯二甲酰氯(已加大豆色拉油20mL), 交联反应完毕, 加入大豆色拉油100mL稀释, 停止反应, 离心收集微胶囊, 用生理盐水洗涤2次即可。

方法B: 取15g明胶与100mL蒸馏水混合, 在电炉上加热溶解后降至43℃左右, 加入5g双歧杆菌冷冻粉, 搅匀后倒入喷雾器中, 利用压缩空气的压力将明胶与双歧杆菌冷冻粉的混合液喷射在干燥的淀粉上, 过80目筛, 得直径0.2~0.5mm的微囊。

方法C<sup>[5]</sup>: 取4g明胶与16mL蒸馏水混合, 在电炉上加热溶解后冷却至43℃, 加入双歧杆菌冷冻粉0.6g, 充分混匀。另将250g液体石蜡倒入盛有50g司盘-85的烧杯中, 维持液温45℃±1℃, 搅匀, 在中速搅拌下缓缓将含双歧杆菌的明胶溶液倒入液体石蜡中, 搅拌3min后, 迅速降温至5℃, 保持20min, 再加入25mL异丙醇使微囊进一步固化, 静置, 倾去上层液体石蜡后用异丙醇洗去残留的液体石蜡, 抽滤, 置室温自然干燥。

方法D<sup>[6,7]</sup>: 称取4.5g明胶, 加入45mL蒸馏水, 于电炉上加热溶解后冷却至40℃保温备用。另取棕榈油15g, 加热熔化后冷却至40℃, 迅速加入双歧杆菌冷冻粉3.8g, 中速搅拌, 缓缓倒入40℃的10%明胶溶液中, 搅拌2~3min, 然后迅速将其倒入5℃200mL色拉油中, 快速搅拌1~2min, 停止搅拌后入冰箱冷冻室中固化20min, 加丙酮稀释过滤, 收

第一作者: 学士, 副研究员。

收稿时间: 2003-04-10

集沉淀,用适量丙酮洗涤沉淀2次,再用10%甲醛丙酮溶液150 mL于冷冻室中固化10 min,过滤,用丙酮洗涤2次,滤去丙酮后于室温干燥。

#### 1.2.4 微量中双歧杆菌活菌数的测定

准确称取双歧杆菌微囊1 g,加入9 mL解囊液,在漩涡混合器上充分振荡直至囊体崩解,混合均匀,用10倍稀释法稀释至合适的稀释度,取0.1 mL菌悬液涂TPY平板,于37℃厌氧培养48 h。根据平板

上长出的菌落数折算出微囊中双歧杆菌的含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 四种微囊化方法对双歧杆菌活菌数量的影响

为了筛选到操作简便、活菌含量高的双歧杆菌微胶囊的制备方法,笔者根据实验室现有条件筛选到了相对较为适宜的方法。现将其中4种微囊化方法对活菌数的影响列于表1中。

表1 不同微囊化方法对双歧杆菌活菌数的影响

| 方法 | 成囊前<br>活菌总数/个      | 成囊后<br>活菌总数/个      | 存活率<br>/% | 成囊情况             |
|----|--------------------|--------------------|-----------|------------------|
| A  | $3.64 \times 10^8$ | $1.35 \times 10^3$ | 0.0004    | 微囊易浮在洗涤液表面,收集困难。 |
| B  | $9.10 \times 10^9$ | $2.39 \times 10^4$ | 0.0003    | 微囊颗粒大小整齐,但喷嘴易堵塞。 |
| C  | $3.64 \times 10^8$ | 未测出                | 0         | 微囊颗粒大小整齐,易收集。    |
| D  | $1.09 \times 10^9$ | $7.65 \times 10^8$ | 70.2      | 微囊颗粒大小整齐,易收集。    |

从表1可看出,方法D从成囊情况及活菌数都相对好于其他3种,因此选用此法进行了进一步的研究。

### 2.2 不同明胶浓度对成囊的影响

选择10%、20%和30%3个明胶浓度,用方法D进行成囊试验,结果见表2。

表2 不同明胶浓度对成囊的影响

| 明胶浓度<br>/% | 成囊情况               |
|------------|--------------------|
| 10         | 微囊小而整齐,易收集。        |
| 20         | 明胶结成一团绕在搅拌棒上,无法成囊。 |
| 30         | 明胶结成一团绕在搅拌棒上,无法成囊。 |

从表2可看出,明胶浓度为10%时成囊效果最好,浓度为20%、30%时,明胶液凝固温度升高,当倒入冷的色拉油中时未成囊就已凝固成一团,必须提高温度才能成囊,但这样又会影响到微囊中双歧杆菌的存活率。综合以上因素,选择包裹液明胶溶液的浓度为10%。

### 2.3 不同固化时间对微囊形状及双歧杆菌活菌数量的影响

采用方法D制作微囊时,在成囊后需用10%甲醛丙酮液对微囊进行固化,其时间的长短对微囊形状及双歧杆菌活菌数量都会产生一定的影响,结果列于表3。

表3 不同固化时间对微囊形状及双歧杆菌活菌数量影响的比较

| 固化时间/min                       | 5                    | 7.5                   | 10                     | 15                     |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 微囊外形                           | 直径0.5~1 mm,外壁毛糙,手摸易碎 | 直径0.5~1 mm,外壁较光滑,不易破碎 | 直径0.5~1 mm,外壁光滑,有弹性,不碎 | 直径0.5~1 mm,外壁光滑,有弹性,不碎 |
| 活菌数<br>/个·g <sup>-1</sup> (微囊) | $4.40 \times 10^5$   | $3.95 \times 10^5$    | $1.81 \times 10^5$     | $9.43 \times 10^4$     |

从表3可看出,固化时间为7.5~10 min较好,这样制成的微囊结实,活菌数又相对较高。

### 2.4 双歧杆菌冷冻粉与棕榈油最佳配比的筛选

各取1 g双歧杆菌冷冻粉分别与3、4、5、6、8和10 g棕榈油(预先加热熔化并冷却至40℃)混合后按方法D制成微胶囊,用活菌检测法分别检测微囊中的活菌数,其结果见表4。

从表4可看出,当双歧杆菌冷冻粉与棕榈油质量之比为1:4时,微胶囊中双歧杆菌总菌数最高。

### 2.5 双歧杆菌微胶囊的稳定性考察试验

采用方法D制备双歧杆菌微胶囊,将其装在密封的小瓶中,分别置于冰箱(2~8℃)和室温(8~

34℃)保存,定期测定活菌含量,结果见表5和表6。

表4 心材与囊材不同配比微囊活菌数的影响

| 样品号 | 心材:囊材 <sup>1)</sup> | 微囊质量<br>/g | 活菌数<br>/个·g <sup>-1</sup><br>(微囊) | 总菌数<br>/个·g <sup>-1</sup> |
|-----|---------------------|------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 1   | 1:3                 | 3.2        | $6.50 \times 10^6$                | $2.08 \times 10^7$        |
| 2   | 1:4                 | 3.6        | $1.49 \times 10^7$                | $5.36 \times 10^7$        |
| 3   | 1:5                 | 4.1        | $1.06 \times 10^7$                | $4.35 \times 10^7$        |
| 4   | 1:6                 | 4.5        | $7.60 \times 10^6$                | $3.42 \times 10^7$        |
| 5   | 1:8                 | 5.8        | $5.65 \times 10^6$                | $3.28 \times 10^7$        |
| 6   | 1:10                | 6.9        | $4.15 \times 10^6$                | $2.86 \times 10^7$        |

1)心材与囊材之比即为m(菌粉):m(棕榈油)。

从表5和表6可看出,在相同保存条件下,在相同的保存时间内,双歧杆菌微胶囊的存活率都要比对照组(双歧冷冻粉)高出许多,尤其是随着保存时

间的延长,这一点更加明显。说明用该方法制得的微胶囊保存性能良好。

表 5 冰箱保存稳定性考察试验结果

| 时间<br>/月 | 活菌含量/个·g <sup>-1</sup> |                    | 存活率/% |      |
|----------|------------------------|--------------------|-------|------|
|          | 冷冻粉                    | 微囊                 | 冷冻粉   | 微囊   |
| 0        | $3.55 \times 10^8$     | $8.90 \times 10^6$ | 100   | 100  |
| 1        | $3.15 \times 10^8$     | $8.65 \times 10^6$ | 88.7  | 97.2 |
| 3        | $2.80 \times 10^8$     | $8.15 \times 10^6$ | 78.9  | 91.6 |
| 4        | $2.05 \times 10^8$     | $7.80 \times 10^6$ | 57.7  | 87.6 |
| 5        | $1.71 \times 10^8$     | $6.80 \times 10^6$ | 48.0  | 79.1 |
| 6        | $1.61 \times 10^8$     | $6.65 \times 10^6$ | 45.4  | 74.7 |
| 7        | $1.32 \times 10^8$     | $6.30 \times 10^6$ | 37.2  | 70.8 |

表 6 室温保存稳定性考察试验结果

| 时间<br>/月 | 活菌含量/个·g <sup>-1</sup> |                    | 存活率/% |      |
|----------|------------------------|--------------------|-------|------|
|          | 冷冻粉                    | 微囊                 | 冷冻粉   | 微囊   |
| 0        | $3.65 \times 10^8$     | $8.30 \times 10^6$ | 100   | 100  |
| 1        | $3.20 \times 10^8$     | $8.05 \times 10^6$ | 87.7  | 97.0 |
| 3        | $2.70 \times 10^8$     | $7.80 \times 10^6$ | 74.0  | 94.0 |
| 4        | $1.50 \times 10^8$     | $7.30 \times 10^6$ | 41.1  | 84.9 |
| 5        | $8.85 \times 10^7$     | $5.95 \times 10^6$ | 24.2  | 69.2 |
| 6        | $7.83 \times 10^7$     | $5.50 \times 10^6$ | 21.5  | 64.0 |
| 7        | $2.60 \times 10^7$     | $4.45 \times 10^6$ | 7.12  | 54.8 |

### 3 结 论

双歧杆菌的微囊化技术中,菌体活性的保持具

有较高的难度。本项目组根据双歧杆菌长时间与水接触易死亡的特点,采用双层包裹法,先用棕榈油把双歧杆菌包裹起来,然后再用大分子明胶溶液包裹制成双层微囊,避免了双歧杆菌与明胶水溶液的直接接触,因而制成的双歧微囊活菌数高,保存性好。由于受试验条件的限制,在实验中双层微囊的制作都是手工操作,因而实验结果还不够理想。国外有制作双层微胶囊的专用设备,制出的微囊不仅形状好,而且活菌数高。国内暂时还无这种专用设备,但只要投入一定的物力、人力,双歧杆菌等活菌制剂微胶囊产品的产业化很快即可实现。这对提高双歧杆菌类活菌制品的质量和档次将具有十分重要的意义。

### 参 考 文 献

- 杨基础,刘佳.微生物学通报,1996,23(1):35~36
- 许燕滨,杨汝德,陈惠音.四川食品与发酵,1998(3):24~26
- Groboillot A F. Biotechnology & Bioengineering, 1993, 42:1157
- Poncelet D, Newfeld R J. Biotenology & Bioengineering, 1989, 33:95
- 刘宝山,于西全,黄小峰等.中国药学杂志,1992,27(7):408~410
- 丸山哲彦,村上道男,浅野纈道等.公开特许公报,昭61-151127
- 森原义郎,今井彬.特许公报,昭51-8875



## 外资注重中国保健食品市场的投资 D

中国保健品消费市场具有巨大的增长空间,近20年来,中国人均消费支出增长为15%~30%,远高于发达国家13%的增长,1999年全国保健品消费额为400亿元,占当年社会总体消费品零售总额的1.47%。这对于国外健康产品生产企业来说有巨大的吸引力,大量洋保健品蜂拥而至,同时众多国际公司斥巨资,以收购、兼并、租赁等形式抢占中国市场;至2001年底,已有近400个进口保健食品获准进入我国保健品市场。安利、宝洁、美国全球健康联盟、杜邦等一批保健品跨国公司或在中国设厂,或推出产品。2000年市场上进口保健品302种,到2002年进口保健品已近500种,增长了67%。

近5年来,洋品牌在中国市场上的销售量以年均12%以上的速度增长。作为全球营养保健品巨头的安利公司,自1999年推出纽崔莱营养保健食品以来,已连续3年位居中国保健食品销量的第一位,而在2002年中国保健食品业193亿的总销售收入中,安利(中国)的销售就占了近1/6,高达30亿元,而这些产品还只是其向中国推出的少数产品。另据美国著名的NPD市场调查公司的统计,每百名购买保健品的中国消费者中就有约15人购买国外品牌的保健品,这个数字在未来几年里还将上升。2003年6月,安利与中国签订了1.2亿美元的增资计划,其中8000万美元将用于追加生产投资和新一期的工厂扩建。该公司多位高层人士均表示中国是安利全球市场的一个策略重点,也是其海外最大的市场。2003年SARS事件不仅显现出中国保健品市场的巨大需求空间,也促使安利加快了生产本地化的步伐。