

短乳杆菌微胶囊的制备及特性研究

刘洪明¹, 周灵芝², 姜晓明¹, 黄介鑫¹, 齐雪峰¹, 赵献军¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 青岛畜牧科技示范园, 山东 即墨 266225)

【摘要】 【目的】制备短乳杆菌微胶囊, 并对其特性进行检测, 以期在一定时间范围内延长短乳杆菌微生态制备的保存期, 减少短乳杆菌通过胃肠道的损失。【方法】采用微胶囊技术, 以短乳杆菌为模型菌株, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 筛选制备短乳杆菌微胶囊的最佳配方, 并检测短乳杆菌微胶囊的特性。【结果】制备短乳杆菌微胶囊的最佳配方为: 海藻酸钠 20 g/L, 氯化钙 30 g/L, $m(\text{菌液}) : m(\text{海藻酸钠}) = 1 : 3$, 壳聚糖 20 g/L。制备的短乳杆菌微胶囊呈球形, 粒径为 227 μm , 包囊效率为 89.7%, 能够耐受 85 $^{\circ}\text{C}$ 高温、人工胃液和肠液, 恒温保存 3 个月活菌数量仍达 1×10^8 cfu/g 以上。【结论】制备的短乳杆菌微胶囊保存期延长, 在胃、肠道内的损失降低。

【关键词】 短乳杆菌; 微胶囊; 人工肠液; 人工胃液

【中图分类号】 S859.5⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)07-0023-05

Preparation of microencapsulated *Lactobacillus brevis* and evaluation of their characterization

LIU Hong-ming¹, ZHOU Ling-zhi², JIANG Xiao-ming¹, HUANG Jie-xin¹,
QI Xue-feng¹, ZHAO Xian-jun¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100 China; 2 Qingdao Animal Husbandry Science & Technology Demonstration Park, Jimo, Shandong 266225, China)

Abstract: 【Objective】The research was carried out to prepare microencapsulation of *Lactobacillus brevis* and to investigate its characters so that its shelf life could be lengthened and the loss through the gastrointestinal tract reduced. 【Method】According to orthogonal design $L_9(3^4)$, microencapsulation of *Lactobacillus brevis* was prepared using sodium alginate as wall materials, and the characterization of these capsules were also evaluated. 【Result】The optimal formula for *Lactobacillus brevis* microcapsules was 20 g/L sodium alginate, 30 g/L calcium chloride, 20 g/L chitosan, the appropriate proportion of bacterial liquid and sodium alginate being 1 : 3 ($m : m$). The size of *Lactobacillus brevis* microcapsules was 227 μm , and encapsulation efficiency 89.7%. The prepared capsules were resistant to high temperature under 85 degrees C and simulated gastric juice, and the viable bacteria of microcapsule numbered more than 1×10^8 cfu/g at normal temperature for three months. 【Conclusion】The microencapsulation of *Lactobacillus brevis* prepared in this study extends the shelf life of strains, and reduces the loss of *Lactobacillus brevis* in the gastrointestinal tract.

Key words: *Lactobacillus brevis*; microencapsule; simulated intestinal juice; simulated gastric juice

* [收稿日期] 2008-10-08

[基金项目] 国家科技支撑计划项目“奶牛发展重大关键技术研究及示范”(2006BAD04A11); 陕西省“13115”科技创新工程项目“高效绿色饲料生产关键技术研究及示范”(2007ZDKG-15)

[作者简介] 刘洪明(1982—), 男, 山东烟台人, 在读硕士, 主要从事动物中毒性与营养代谢性疾病研究。
E-mail: super7star7@163.com

[通信作者] 赵献军(1961—), 男, 陕西蒲城人, 教授, 主要从事动物中毒性与营养代谢性疾病研究。
E-mail: zhaoxianjun458@sina.com

乳酸杆菌是人体肠道内正常的有益菌,在机体健康的情况下,其数量较其他菌群多,功能均较其他菌群重要^[1-2]。短乳杆菌是乳酸菌中乳杆菌属的重要菌种,具有高产酸、解毒、抑菌和提高机体免疫力等多种特性^[3]。随着人们对短乳杆菌研究的不断深入,以活性短乳杆菌为主要功效成分的食品或药物相继问世,并日渐普及。但是,短乳杆菌对营养条件要求较高,对氧较为敏感,对低 pH 值耐受性差,容易失活,产品在常温下销售和消费过程中,活菌含量迅速下降。此外,短乳杆菌在体内要发挥其益生作用,首先需要安全地通过机体胃环境,有大量活菌到达肠道并定殖于肠粘膜上,但由于胃酸具有杀菌作用,导致短乳杆菌的存活数在此过程中大幅度下降^[4-5]。

微囊化技术是利用高分子材料将气体、液体、固体芯材包嵌制备成微胶囊的一种技术。微囊化技术的主要优点在于,可有效降低活性物质对外界环境不良因素的反应,控制芯材的释放,掩蔽芯材的异味,改变芯材的物理、化学性质等。目前,将微囊化技术用于短乳杆菌微生态制剂的研究尚未见报道。本研究将短乳杆菌包封于具有抗渗性和肠溶性的复合囊材中,制成短乳杆菌微胶囊,并通过体外模拟人工胃肠道环境,检测了微胶囊制剂活性菌的存活率及常温下的保存期,以期短乳杆菌微胶囊制剂的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌 种

短乳杆菌,由西北农林科技大学临床兽医实验

室提供。

1.2 主要仪器

HD3 型高速乳化均质机,北京航空光大机械厂生产;BS210S 型电子分析天平,德国赛多利斯股份公司产品;电热恒温培养箱,黄石市恒丰医疗器械有限公司生产。

1.3 主要溶液的配制

1.3.1 人工胃液^[6] 量取 0.1 mol/L 稀盐酸 16.4 mL,加蒸馏水约 800 mL 和胃蛋白酶 10 g,摇匀后加蒸馏水定容至 1 000 mL,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 2.5。

1.3.2 人工肠液^[7] 称取 KH_2PO_4 6.8 g,加入 500 mL 蒸馏水溶解,用 4 g/L NaOH 调节 pH 值为 6.8,121 ℃灭菌 20 min。称取胰酶 10 g,加适量无菌水溶解。将上述 2 液混合后,用无菌水定容至 1 000 mL,即得人工肠液。

1.3.3 解囊液的配制^[7] 称取 14.2 g Na_2HPO_4 和 9.6 g 柠檬酸,加水溶解并定容至 1 000 mL,调节 pH 值为 7.25,121 ℃灭菌 20 min。

1.4 短乳杆菌微胶囊最佳配方的筛选及制备

参考文献[8-12],选择海藻酸钠质量浓度(A)、菌液与海藻酸钠的质量比(B)、壳聚糖质量浓度(C)、 CaCl_2 质量浓度(D)作为影响因素,采用 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,研究各因素对微胶囊包封率的影响,并参考粒径大小、成球效果等试验指标,筛选出制备短乳杆菌微胶囊的最佳配方。短乳杆菌微胶囊配方 $L_9(3^4)$ 正交试验设计见表 1。用筛选的最佳配方制备短乳杆菌微胶囊。

表 1 短乳杆菌微胶囊配方 $L_9(3^4)$ 的试验设计

Table 1 Orthogonal experiment $L_9(3^4)$ on screening microcapsule

因素水平 Level	A 海藻酸钠质量浓度/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Sodium alginate concentration	B $m(\text{菌液}) : m(\text{海藻酸钠})$ $m(\text{bacterial liquid}) :$ $m(\text{sodium alginate})$	C 壳聚糖质量浓度/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Chitosan concentration	D CaCl_2 质量浓度/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Calcium chloride concentration
1	10	1 : 1	10	10
2	20	1 : 2	15	20
3	30	1 : 3	20	30

1.5 短乳杆菌微胶囊包囊效率的测定

称取 1 g 短乳杆菌微胶囊 2 份,分别加入到 9 mL PBS 缓冲液和 9 mL 解囊液中,在胶囊待胀溶和溶解完全时,分别采用试管 10 倍稀释法稀释,并将稀释后的液体倾注于平板上,置培养箱中培养 24 h 后进行活菌计数,并计算包囊效率:

$$\text{包囊效率} / \% = (B_2 - B_1) / B_2 \times 100 \%。$$

式中: B_2 为微胶囊的活菌数(微胶囊表面与其内部活菌数之和), B_1 为微胶囊表面的活菌数。

1.6 人工胃液和肠液中短乳杆菌微胶囊的溶出情况检测

称取 1 g 短乳杆菌微胶囊 2 份,分别置于 100 mL 人工胃液和 100 mL 人工肠液中,于 (37 ± 0.5) ℃恒温水浴中搅拌,搅拌速度为 50 r/min。分别于

0,40,60,80,100,120 min 时取样,以人工胃液和人工肠液为空白对照组,在 680 nm 波长下测定其透光率(OD_{680}),根据 OD_{680} 值变化情况分析人工胃液和人工肠液中微胶囊的溶出情况。

1.7 短乳杆菌微胶囊对人工胃液的耐受性检测

称取 1 g 短乳杆菌微胶囊,溶于 9 mL 人工胃液中,充分搅拌,分别在 30,60,90 min 时取样,过滤后将微胶囊用生理盐水洗涤至中性,干燥。将干燥好的微胶囊制剂用解囊液处理后,采用 10 倍稀释法进行活菌计数。

1.8 短乳杆菌微胶囊的高温耐受性检测

称取 1 g 短乳杆菌微胶囊 2 份,分别加入到菌液组和微胶囊组试管中,向菌液组微胶囊加 9 mL 解囊液,使其完全溶解,微胶囊组不做处理。2 组试管同时放入 85 ℃ 烘箱中,分别在 0,1,2,3 min 时取

样,采用 10 倍稀释法进行活菌计数。

1.9 短乳杆菌微胶囊的稳定性检测

称取 10 g 短乳杆菌微胶囊,以铂纸密封,于相对湿度(RH)为 60%~65%、37 ℃ 恒温培养箱中放置 3 个月,每月取 1 份(1 g),采用 10 倍稀释法进行活菌计数。

2 结果与分析

2.1 短乳杆菌微胶囊最佳配方的筛选

由表 2 可以看出,在试验条件下,以包囊效率为考察指标,短乳杆菌微胶囊的最佳配方为 $A_2B_3C_3D_3$,即海藻酸钠 20 g/L,氯化钙 30 g/L, $m(\text{菌液}):m(\text{海藻酸钠})=1:3$,壳聚糖 20 g/L。采用最佳配方制备的短乳杆菌微胶囊呈球形,粒径为 227 μm ,包囊效率为 89.7%。

表 2 短乳杆菌微胶囊配方筛选的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Orthogonal experiment $L_9(3^4)$ result of screening microencapsulation

试验编号 No.	因素 Factor				试验结果 Result	
	A	B	C	D	包囊效率/% Entrapment efficiency	粒径/ μm Particle size
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	32.2	183
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	51.6	239
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	77.3	235
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	50.8	243
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	73.1	275
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	84.5	232
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	44.7	309
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	55.5	257
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	75.4	272
K_1	161.1	127.7	172.2	180.7		
K_2	208.4	180.2	177.8	180.8		
K_3	175.6	237.2	185.1	183.6		
k_1	53.7	42.6	57.4	60.2		
k_2	69.5	60.1	59.3	60.3		
k_3	58.6	79.1	61.7	61.2		
R	47.3	109.5	12.9	1		

2.2 短乳杆菌微胶囊在人工胃液和人工肠液中的溶出情况

以透光率来衡量短乳杆菌微胶囊在人工胃液和人工肠液中的溶出情况,结果见图 1。由图 1 可以看出,在处理的前 40 min,人工胃液 OD_{680} 值上升较大,40 min 后, OD_{680} 值基本稳定;在人工肠液中,处理 60 min 后,其 OD_{680} 值基本稳定。人工观察结果显示,在 60 min 时,人工肠液中已不含固体颗粒。由上述结果可确定,短乳杆菌微胶囊在人工肠液中完全崩解的时间为 60 min。

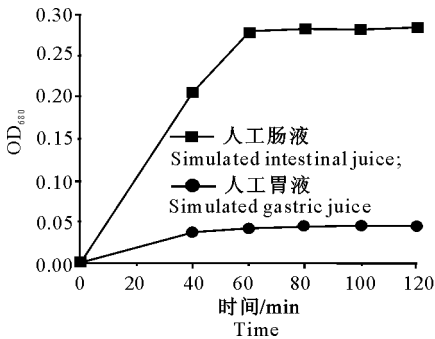


图 1 短乳杆菌微胶囊在人工胃、肠液中的溶出情况
Fig. 1 Efficacy of cell release for *Lactobacillus brevis* microcapsuled under simulated gastrointestinal conditions

2.3 短乳杆菌微胶囊对人工胃液的耐受性检测

由表 3 可以看出,在 60 和 90 min 时,人工胃液中的短乳杆菌数显著低于 0 和 30 min($P<0.05$),

60 min 与 90 min 之间差异不显著($P>0.05$)。表明在 0~60 min,短乳杆菌死亡数量较多,在 60~90 min 活菌数量变化不大。

表 3 短乳杆菌微胶囊对人工胃液的耐受性检测结果

Table 3 The tolerance of *Lactobacillus brevis* microcapsuled in stimulative juice

处理 Treatment	活菌数量/(cfu·g ⁻¹) Change of viable bacterial number				存活率/% Survival rate
	0 min	30 min	60 min	90 min	
1	1.45×10 ⁹	1.21×10 ⁹	7.2×10 ⁸	6.97×10 ⁸	48.07
2	2.13×10 ⁹	1.97×10 ⁹	1.04×10 ⁹	9.83×10 ⁸	46.15
3	1.74×10 ⁹	1.36×10 ⁹	8.82×10 ⁸	8.30×10 ⁸	47.70
平均值 Mean	1.77×10 ⁹ a	1.51×10 ⁹ a	8.81×10 ⁸ b	8.37×10 ⁸ b	47.31

注:表中同行数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)。
Note: Means with different superscripts letters differ significantly ($P<0.05$), and means with the same superscripts letters don't show obvious difference($P>0.05$).

2.4 短乳杆菌微胶囊对高温的耐受性检测

由图 2 可以看出,在 85 ℃ 条件下,菌液组短乳杆菌活菌数急剧下降,3 min 时存活率仅为 0.58%;微胶囊组的短乳杆菌活菌数下降速率明显减慢,3 min 时存活率为 71%。由此可见,微胶囊化后,短乳杆菌能够耐受 85 ℃ 的高温作用,耐高温性显著提高。

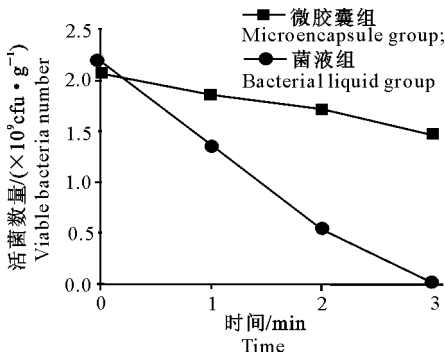


图 2 短乳杆菌微胶囊对 85 ℃ 高温的耐受性
Fig. 2 Changing curve of the viability of *Lactobacillus brevis* microcapsule during storage at 85 ℃

2.5 短乳杆菌微胶囊的稳定性检测

由恒温加速试验结果(表 4)可知,微胶囊化后的短乳杆菌对外界不利因素的抵抗力增强,制剂的稳定性得到提高。依据 Van't Hoff 规律^[13]可推断,短乳杆菌微胶囊室温条件下储存期为 1 年。

表 4 短乳杆菌微胶囊的稳定性试验结果

Table 4 Results of stability of *Lactobacillus brevis* microencapsulation during storage at 37 ℃

处理 Treatment	活菌数量/(cfu·g ⁻¹) Change of viable bacterial number				存活率/% Survival rate
	0 d	30 d	60 d	90 d	
1	2.24×10 ⁹	1.57×10 ⁹	8.20×10 ⁸	2.34×10 ⁸	10.45
2	1.78×10 ⁹	1.04×10 ⁹	6.83×10 ⁸	1.67×10 ⁸	9.40
3	2.46×10 ⁹	1.83×10 ⁹	8.85×10 ⁸	2.85×10 ⁸	13.20
平均值 Mean	2.16×10 ⁹	1.48×10 ⁹	7.96×10 ⁸	2.29×10 ⁸	10.60

3 讨 论

3.1 短乳杆菌微胶囊化壁材的选择

微胶囊包埋效果的好坏与壁材的选择紧密相关,在选用壁材时,既要考虑其粘度、渗透性、吸湿性、溶解性和稳定性,又要考虑芯材性质。本试验选择的壁材物质海藻酸钠、氯化钙和壳聚糖均为食品工业中常用的囊材材料,无毒、粘度大、易成膜,且来源广泛,具有较大的实用性和推广价值^[14]。海藻酸钠作为微胶囊壁材的优点是,制备条件温和简单,价

格低廉。但是单一以海藻酸钠为壁材制备的短乳杆菌微胶囊,不能很好地阻隔胃液,因而产品不具有耐胃酸的能力。本试验利用海藻酸钙(海藻酸钠与氯化钙反应所得)与壳聚糖等电点不同的特性,使壳聚糖在海藻酸钙表面形成二次包被,构成海藻酸钙-壳聚糖复合体系,使制得的微胶囊具有一定的耐胃酸能力,从而使短乳杆菌能安全地通过胃环境^[15]。从试验结果来看,短乳杆菌微胶囊被人工胃液作用 60 min 后,虽然活菌率大大下降,但活菌数仍可达 1×10⁸ cfu/g 以上,这与微胶囊的溶出试验结果相一

致,胃液作用前期,部分微胶囊因包封不完全而发生渗漏,导致短乳杆菌大量死亡。60 min 后包封完全的微胶囊在人工胃液中不崩解释放,活菌数变化不大。

3.2 微囊化产品的质量评价

由于短乳杆菌对高温非常敏感,因此其微胶囊化后的耐热性可作为评价其微囊化优劣的指标之一。莫棣华等^[16]报道,饲料压粒加工可使 10%~30%的芽孢杆菌孢子失活,而乳杆菌经 60 ℃或更高温度后,几乎测不到活细胞。本试验选用高于巴氏消毒和饲料制粒的温度和作用时间^[17],对制备的短乳杆菌微胶囊进行处理,结果显示短乳杆菌存活率高达 71%,活菌数较未进行微囊化处理的菌液提高了 2 个数量级。这可能是由于微胶囊壁材作为一种物理屏障,减缓了热传递过程所致。恒温加速保存试验表明,短乳杆菌微胶囊在恒温 37 ℃、相对湿度(RH)60%~65%条件下储存 3 个月,短乳杆菌存活率在 10%以上,根据经验及 Van't Hoff 规律^[13]可推算,在室温条件下短乳杆菌微胶囊的储存期为 1 年。

[参考文献]

[1] Fujisawa T, Yaeshima T, Mitsuoka T. Lactobacilli in human feces [J]. Bioscience Microflora, 1996, 15: 69-75.

[2] Hose H, Sozzi T. Biotechnology group: meeting probiotics-fact or fiction [J]. J Chem Tech Biotechnol, 1991, 51: 539.

[3] 李文斌,唐中伟,宋敏丽. 短乳杆菌的研究和应用进展 [J]. 中国食品添加剂, 2007(6): 110-112.

Li W B, Tang Z W, Song M L. Research and application process of *Lactobacillus brevis* [J]. China Food Additives, 2007(6): 110-112. (in Chinese)

[4] Chou L S, Weimer B. Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 23-31.

[5] Hood S K, Zottola E A. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells [J]. Journal of Food Science, 1988, 53: 1514-1516.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:附录ⅧA [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

China Pharmacopoeia Committee. Chinese medicine dictionary: Appendix ⅧA [M]. Beijing: Chemistry and Industry Press, 2005. (in Chinese)

[7] 李 宁. 双歧杆菌微胶囊制备工艺及功能特性的研究 [D]. 河北:河北农业大学, 2007.

Li N. The research of preparation technics and function speciality of bifidobacteria microencapsulation [D]. Hebei: Agricultural University of Hebei, 2007. (in Chinese)

[8] 魏 华,李雁群. 乳酸菌微胶囊化的初步研究 [J]. 中国乳品工业, 1998, 26(6): 13-16.

Wei H, Li Y Q. Preliminary studies of the microcapsulation of lactics [J]. China Dairy Industry, 1998, 26(6): 13-16. (in Chinese)

[9] 徐致远,郭本恒,陈 卫. 乳酸菌微胶囊技术的研究进展 [J]. 乳业科学与技术, 2005(5): 198-201.

Xu Z Y, Guo B H, Chen W. The development of micro-encapsulation technology applied in LAB production [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2005(5): 198-201. (in Chinese)

[10] 周剑忠,董明盛,江汉湖,等. 乳酸菌细胞的液芯包囊固定化技术及应用 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 82-86.

Zhou J Z, Dong M S, Jiang H H, et al. Application of liquid-core encapsulation of immobilized cell for LAB [J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(2): 82-86. (in Chinese)

[11] Dziezak J. Microencapsulation and encapsulated ingredients [J]. Food Technolgy, 1988, 3: 135-151.

[12] Green K D, Gill I S, Khan J A, et al. Microencapsulation of yeast cells and their use as a biocatalyst in organic solvents [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 49: 535-543.

[13] 许燕滨,谢光炎,杨汝德,等. 双歧杆菌微胶囊热稳定性研究 [J]. 广东工业大学学报, 2001, 18(4): 86-89.

Xu Y B, Xie G Y, Yang R D, et al. Studies on the Thermal Stability of bifidobacterium Microcapsules [J]. Journal of Guangdong University of Technology, 2001, 18(4): 86-89. (in Chinese)

[14] 孙 雪,奚廷斐. 海藻酸钠微囊制备方法及应用的研究 [J]. 生物医学工程与临床, 2005, 9(6): 369-376.

Sun X, Xi T F. The preparation and application of sodium alginate microencapsulation [J]. Biomedical Engineering and Clinical Medicine, 2005, 9(6): 369-376. (in Chinese)

[15] 王 勇,解玉冰,马小军. 壳聚糖/海藻酸钠生物微胶囊的研究进展 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 13-16.

Wang Y, Xie Y B, Ma X J. Progress of studies on chitosan/alginate microcapsule [J]. Progress in Biotechnology, 1999, 19(2): 13-16. (in Chinese)

[16] 莫棣华,沈应然. 活菌制剂在我国饲料工业中的应用 [J]. 饲料工业, 1994, 15(3): 12-15.

Mo L H, Shen Y R. Application of biogen in feed industry [J]. Feed Industry, 1994, 15(3): 12-15. (in Chinese)

[17] 黄 文,王 益,谭 军. 饲用微生物添加剂的微胶囊包被研究 [J]. 粮食与饲料工业, 2002(7): 24-25.

Huang W, Wang Y, Tan J. Microencapsulation of microbial feed additives [J]. Cereal and Feed Industry, 2002(7): 24-25. (in Chinese)