

# 双歧杆菌微胶囊的研究\*

陈洪兴,房 健,李朝霞

(盐城工学院 海洋系,江苏 盐城 224003)

摘 要 以海藻酸钠/壳聚糖为壁材,用表面交联法将活性双歧杆菌微胶囊化,并观察了微胶囊的耐胃酸性、常温贮存稳定性和低温贮存稳定性。

关键词 双歧杆菌;微胶囊;海藻酸钠;壳聚糖

中图分类号:TQ464 文献标识码:A 文章编号:1671-5322(2003)02-0041-03

双歧杆菌是一类革兰氏阳性厌氧菌,对人体有重要的生理和保健功能。应用双歧杆菌的各种药物和食品相继被推出并日渐普及。但是,双歧杆菌对营养要求高,对氧极为敏感,对低 pH 值的抵抗力差,活性保持较困难<sup>[1]</sup>。因此,在双歧杆菌制品中存在的最为关键的问题是产品销售和消费过程中活菌含量的下降,双歧杆菌必需通过胃环境(胃酸有杀菌作用)以大量的存活菌到达肠道并定植于肠粘膜上才能发挥其生理功能<sup>[2]</sup>。

微胶囊技术是近年来新兴起来的一门技术,其在保护生物活性分子、组织或细胞以对抗不利的环境方面取得了较好的成效<sup>[3]</sup>。将双歧杆菌进行微胶囊化的优点在于<sup>[4]</sup>:(1)可将双歧杆菌与氧气等外界不利环境分开;(2)掩盖其特有的令人不愉快的气味;(3)制品颗粒微小,可添加到一些食品中;(4)采用肠溶性壁材后,能防止胃酸的破坏,从而使尽可能多的菌体到达肠道,真正起到有益于健康的作用。

海藻酸钠是存在于褐藻类中的天然高分子,是一种阴离子聚合物,由  $\beta$ -1,4-D 型甘露糖醛酸钠盐和  $\alpha$ -1,4-L 型古罗糖醛酸钠盐共聚而成。壳聚糖是由甲壳素脱乙酰化反应得到的天然高分子直链多糖,是一种阳离子聚合物,其化学名为  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-氨基-2-脱氧-D-葡聚糖。壳聚糖分子链上的伯氨基与海藻酸钠分子链上的羧基反应形成聚电解质络合膜<sup>[5]</sup>。有研究表明,海藻酸钠/壳聚糖微胶囊对细胞具有保护和支持

作用,且具备良好的生物相容性和亲粘膜性<sup>[6]</sup>。本文采用海藻酸钠/壳聚糖交联法制备双歧杆菌微胶囊,提高双歧杆菌在贮存和消费过程中的稳定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

海藻酸钠 青岛水产公司;  
壳聚糖 浙江玉环公司;  
青春双歧杆菌 包头市环境科学研究所提供。

### 1.2 人工胃液

取 16.4 mlHCl,加水约 800 ml 及胃蛋白酶 10 g,搅匀后加水定容至 1000 ml,100℃灭菌 10 min。

### 1.3 主要培养基

#### 1.3.1 液体培养基(质量浓度)

|        |      |       |       |
|--------|------|-------|-------|
| 酵母浸出膏  | 0.5% | 胰蛋白胍  | 0.5%  |
| 蛋白胍    | 1%   | 大豆蛋白胍 | 0.5%  |
| L-半胱氨酸 | 0.1% | 可溶性淀粉 | 0.05% |
| 无水葡萄糖  | 1%   | NG 浸液 | 15%   |
| 双歧因子   | 1%   | 乳糖    | 0.3%  |
| 吐温 80  | 0.1% |       |       |

调 pH 值至 7.0,1.0 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min,无菌过滤备用。用于双歧杆菌的培养、保藏。

#### 1.3.2 半固体培养基

在液体培养基中加入琼脂 0.3%,调 pH 值至 7.0,1.0 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min,无菌过滤分装备用。

\* 收稿日期:2003-04-12  
作者简介:陈洪兴(1967-),男,江苏南通市人,盐城工学院海洋系讲师,江南大学在读硕士研究生。

用于双歧杆菌活菌计数。

1.4 方法

1.4.1 双歧杆菌活菌计数

采用平板涂布法计数<sup>[7]</sup>,于 37 ℃ 厌氧培养 48 ~ 60 ho

1.4.2 壳聚糖的纯化与修饰

壳聚糖的纯化 将壳聚糖溶解于 1% 冰醋酸溶液中,配成 1% 壳聚糖溶液。过滤除去不溶物,再加入 10% NaOH 使溶液的 pH 值至 10.0,得到白色沉淀,用蒸馏水洗涤数次,除去过量的 NaOH,最后浸没于 85% 乙醇、15% 甲醇混合液中,在室温下干燥得到黄棕色纯化壳聚糖。

壳聚糖的修饰 利用亚硝酸盐氧化反应,降低壳聚糖分子量。NaNO<sub>2</sub> 与壳聚糖的摩尔比为 0.05,充分混合后,放置隔夜,使充分反应。用蒸馏水稀释至 100 ml,调 pH 为 6.5 备用。

1.4.3 微胶囊的制备

将培养所得的对数生长期的双歧杆菌经离心分离后,与浓度为 1.5% 的海藻酸钠均匀混合,用带有 4 号针头的玻璃注射器将双歧杆菌与海藻酸

钠的混合液注入 1.5% CaCl<sub>2</sub> 溶液中,形成海藻酸钙凝胶珠,然后与 0.3% 的壳聚糖溶液进行成膜反应,经水洗除去未反应的壳聚糖后,将其自然干燥。

1.4.4 耐胃酸试验

将 0.1 g 样品置于 37 ℃ 的人工胃液中保温,并不断搅拌,一定时间后取出,用生理盐水洗涤至中性,破碎微胶囊,测定双歧杆菌活菌数。并与未包埋的菌液进行比较。

1.4.5 贮存实验

将试样放入若干个小玻璃瓶中,密封,遮光,于 37 ℃ 的恒温培养箱(或 4 ℃ 冰箱)中放置数月,每隔一定时间取出 1 份,从中取出 0.1 g,测其活菌数。

2 结果与讨论

2.1 耐胃酸性

人胃的排空时间约 4 ~ 5 ho 将未包埋的菌液和双歧杆菌微胶囊分别进行耐胃酸试验,结果如下:

表 1 经人工胃液处理后的活菌数(cfu/g)

| Table 1 Numbers of the living Bifidobacterium disposed by the artificial gastric juice (cfu/g) |                   |                   |                   |                   |                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 在人工胃液中处理时间/h                                                                                   | 0                 | 1                 | 2                 | 3                 | 4                 |
| 未包埋的菌液                                                                                         | $2.8 \times 10^8$ | $5.7 \times 10^5$ | $1.3 \times 10^2$ | 0                 | 0                 |
| 双歧杆菌微胶囊                                                                                        | $6.3 \times 10^7$ | $5.6 \times 10^7$ | $3.6 \times 10^7$ | $8.3 \times 10^6$ | $1.7 \times 10^6$ |

表 1 显示 未包埋的菌液经人工胃液作用 2h 后,活菌数下降了六个数量级 3 h 后,已无活菌检出。而双歧杆菌微胶囊经人工胃液处理 2h 后,存活率为 57% 4 h 后,仍有 2.7% 存活下来,用海藻酸钠/壳聚糖包埋的微胶囊,阻止了胃液对双歧杆

菌作用,大大提高了双歧杆菌的耐胃酸性。

2.2 常温贮存稳定性

温度是影响双歧杆菌微胶囊稳定性的重要因素之一。在 37 ℃ 下恒温加速失活贮存 3 个月(相当于常温下 1 年),结果如下:

表 2 37 ℃ 贮存实验中活菌数的变化(cfu/g)

| Table 2 The changes of the numbers of the living Bifidobacterium in stockpile with 37 ℃ (cfu/g) |                   |                   |                   |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 37 ℃ 恒温时间/d                                                                                     | 0                 | 30                | 60                | 90                |
| 未包埋的菌液                                                                                          | $8.4 \times 10^7$ | $7.7 \times 10^5$ | $8.6 \times 10^4$ | $3.1 \times 10^3$ |
| 双歧杆菌微胶囊                                                                                         | $5.7 \times 10^7$ | $4.8 \times 10^7$ | $2.4 \times 10^7$ | $9.6 \times 10^6$ |

由表 2 可见 37 ℃ 条件下,经 90 d 贮存,未包埋的菌液的活菌数下降了 4 个数量级(仅为原有的 0.037%),而经海藻酸钠/壳聚糖包埋的双歧杆菌存活率为 17%。高分子材料可作为一种物理屏障,提高微胶囊化双歧杆菌的常温贮存稳定性。但是,微胶囊中的双歧杆菌存活率也有下降,这可能是贮存过程中壁材特性结构发生改变,使膜的

通透性发生了变化,使其对微胶囊内的双歧杆菌的保护作用减弱。

2.3 低温贮存稳定性

微生物产品通常采用 4 ℃ 冷藏。将微胶囊放于 4 ℃ 的冰箱中进行贮存实验,结果如表 3 所示。

从表 3 可以看出 未包埋的菌液不耐冷藏,而双歧杆菌微胶囊的低温贮存稳定性较高。微胶囊

| 表 3 4 ℃贮存实验中活菌数的变化 (cfu/g)                                                                |                   |                   |                   |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Table 3 The changes of number of the living Bifidobacterium in stockpile with 4 ℃ (cfu/g) |                   |                   |                   |                   |
| 冷藏时间/d                                                                                    | 0                 | 30                | 45                | 60                |
| 未包埋的菌液                                                                                    | $3.3 \times 10^8$ | $5.7 \times 10^4$ | $1.4 \times 10^2$ | 0                 |
| 双歧杆菌微胶囊                                                                                   | $5.7 \times 10^7$ | $7.0 \times 10^6$ | $2.6 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^6$ |

经过自然干燥,含水量较低,菌体处于休眠状态。而且,在双歧杆菌外面包上一层高分子囊膜,令其与外界环境隔离,增强了对外界不利环境的抵抗力,故菌体存活率较高。

3 结论

以海藻酸钠/壳聚糖为壁材,采用表面交联法

制备的双歧杆菌微胶囊,耐胃酸性、常温贮存和低温贮存稳定性有明显提高。在人工胃液中处理 4 h,存活率为 2.7%。在 37 ℃ 下恒温加速失活贮存 90 d,存活率为 17%,效果理想。4 ℃ 冷藏 30 d,活菌数从  $5.7 \times 10^7$  cfu/g 降至  $7.0 \times 10^6$  cfu/g,稳定性较好。

参考文献：

[1] 杨基础.双歧杆菌生长和代谢过程的研究[J].微生物学通报.1995,22(6):347-350.  
[2] Hoover D G. Bifidobacteria : activity and potential benefits[J]. Food Technology. 1993,6:120-124.  
[3] Dziezak J D. Microencapsulation and encapsulated ingredients[J]. Food Technology. 1988, 42:136-139.  
[4] 曹永梅.微胶囊技术在双歧杆菌中的应用[J].食品科技.2000,5:8-11.  
[5] 刘群.海藻酸钠-壳聚糖微胶囊膜强度的研究[J].高等学校化学学报.2002,23(7):1417-1420.  
[6] 付颖丽.海藻酸钠/壳聚糖微胶囊生物相容性的研究[J].自然科学进展.2002,12(8):845-847.  
[7] 诸葛健.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994.

Study on Microencapsulation of Living Bifidobacterium

CHEN Hong-xing,FANG Jian,LI Zhao-xia  
(Department of Marine Engineering of Yancheng Institute of Technology,Jiangsu Yancheng 224003,China)

**Abstract** In this paper, the living bifidobacterium is encapsulated with chitosan - alginate sodium by superficial cross linking technique, and it's characters of gastric juice - fast and the stabilities of stockpile in normal or low temperature are observed.  
**Keywords** bifidobacterium ; microencapsulation ; alginate sodium ; chitosan

(上接第 37 页)

Determiration of Trace Amounts of Pb in Cosmetics  
by Hydride Generation - Atomic Absorption Spectrometry

XING Xiao-ping  
(Department of Science and Technology of Yancheng Institute of Technology,Jiangsu Yancheng 224003,China)

**Abstract** A method for determiration of Pb in cosmetics by hydride generation - atomic absorption spectrometry is described in this paper. The optimum conditions of Hydride Generation - aas is studied. This method has some characteristics such as quickly and high precision as well as high accuracy. The correlation coefficient of the linear calibration curve is 0.9995, and the results of this method is in good agreement with that of standard method.  
**Keywords** 万方数据 trace amounts of Pb ; Hydride Generation - AAS