

# 胶类物质对固体制剂中青春双歧杆菌稳定性研究\*

朱俊晨 李世敏 林 霄 李文顺 叶心华

(深圳职业技术学院生物应用工程系 深圳 518055)

**摘要:** 考察了50L发酵罐中青春双歧杆菌在混合胶类物质的果蔬汁底料中的生长及其溶氧率、pH值、可溶性固形物等变化规律,就培养后的双歧杆菌制备活菌固体制剂的工艺方法进行比较。结果表明胶类物质能缓冲培养基中酸性环境,减少发酵和制剂过程中空气氧对菌细胞的毒害,干燥后的固体制剂中活菌回收率高,贮存的稳定性增加。提示了明胶和黄原胶在配料干燥后对菌细胞的包埋及保护作用。并制定出关于青春双歧杆菌保健片或粉料的简便生产工艺。

**关键词:** 微胶囊, 双歧杆菌, 固定化, 发酵

**中图分类号:** R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)06-0433-04

## A STUDY ON THE APPLICATION OF GEL MIXTURE IN CULTIVATION OF BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS AND PREPARATION OF ITS TABLET AS A HEALTHY FOOD

ZHU Jun-Cheng LI Shi-Ming LIN Zhou LI Wen-Shun YE Xin-Hua

(Department of Applied Biological Engineering, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055)

**Abstract:** The effect of gelatin on anaero-cultivation of *Bifidobacterium adolescentis* and stabilization of its living cell in dried preparation was investigated. It was shown that the well-distributed mixture of gelatin and medium could have a cushioning effect on pH reduction resulting from acid-production while incubating, and the dried mixture comprising living cell of *bifidobacterium adolescentis* was prepared, in which the stability and viability of cell come from cultures of gelatin mixture was increased compared with that without gelatin mixture. It was shown that oxygen toxicity to anaerobic cell was well reduced because of cell immobilization by the gel mixture after drying with saccharide substance, and then fermentable dynamics in 50L fermentor was tested as well as the relationship of growth kinetics, pH, dissolved oxygen rate, and content of soluble solids.

**Key word:** Microcapsule, *Bifidobacterium*, Fermentation, Immobilization

微生物学理论体系的建立使双歧杆菌的研究方兴未艾,其临床保健作用正为人们所认识和接受,由此产生的各种生态制剂及其保健食品正在国内外飞速发展<sup>[1]</sup>,而如何保持其中的双歧杆菌等功能菌的活性,对于制剂的生产以及防病治病、保健等效果来说,是极其关键的

问题。但是,在工业化生产中尚存在着厌氧培养工艺复杂、营养要求高<sup>[2]</sup>、活菌量低及制剂不稳定<sup>[3]</sup>,尤其是固体制剂中冷冻干燥设备操作

\* 深圳市科技局基金资助项目(No.1998-48-26)

收稿日期: 1999-08-06, 修回日期: 2000-03-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

复杂及成本高等急待解决的问题。本研究小组在前期的大量工作中,已经筛选出了能促进青春双歧杆菌大量增殖的复合果蔬汁培养基及其厌氧发酵的工艺参数<sup>[4]</sup>,在5L发酵罐中培养24h时的最高活菌数达 $5.1 \times 10^{11}$  cfu/mL。为了进一步将发酵液制备成活菌保健片或生产用的粉料以便扩大产品的应用面,同时在避免采用高成本的冷冻干燥工艺的前提下,为工业化生产活菌保健粉料及口嚼片提供一套简单可行、低成本的工艺方法,本文将进一步探讨胶类物质与培养基均质混合后,青春双歧杆菌在其中的厌氧发酵工艺参数,考察其对双歧杆菌保健片或粉料生产中活菌稳定性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

青春双歧杆菌 *Bifidobacterium adolescentis* (由本研究室分离,经深圳市卫生防疫站鉴定为青春双歧杆菌)。

### 1.2 培养基

1.2.1 一级种子培养基: PYG 培养基<sup>[5]</sup>。

1.2.2 二级种子培养基: 复合蔬菜汁培养基, 主要成分: 胡萝卜汁 (3.6° Bx)、工业奶粉 (4%)、番茄汁 (3.0° Bx)、黄豆芽汁 (3.5° Bx), 并加入蜂蜜、酵母膏、氯化钠等。

1.2.3 发酵培养基: 同二级种子培养基。

1.2.4 胶类物质: 明胶、黄原胶。

### 1.3 填充料

蔗糖粉,符合 GB317-84《白砂糖》中一级品; 颗粒型葡萄糖酸钙,符合食品添加剂国家标准; 乳粉,符合 GB5411 的规定; 乙基纤维素、硬脂酸镁,符合 GB2760-81《食品添加剂使用卫生标准》; 异麦芽低聚糖、淀粉及其它辅料,符合食品卫生要求。

### 1.4 方法

1.4.1 发酵培养: 培养基 pH6.7~7.0,  $0.55 \times 10^5$  Pa, 30min 高压蒸汽灭菌,采用 Hungates 技术<sup>[5]</sup>除氧,取活菌数为  $10^7 \sim 10^8$  个/mL 的培养液作为一级种子、接种量为 10%, 二级种子活菌数为  $10^{10} \sim 10^{11}$  个/mL, 接种量为 5%, 培养温

度为  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

1.4.2 工艺流程: 菌种→一级种子培养基→二级种子培养基→发酵培养基→混合填充料→真空干燥→制粒、制片→充氮包装。

1.4.3 检测指标与方法: 测定不同培养时间发酵物或固体制剂中的活菌数<sup>[5]</sup>和 pH 值<sup>[6]</sup>以及不同保存时间固体制剂的活菌数。

### 1.5 主要设备

5L 及 50L 发酵罐, 恒温培养箱, 冷冻离心机, 混合机, 喷雾干燥设备, 压片机, 真空干燥设备, 充氮包装机。

## 2 结果与讨论

### 2.1 双歧杆菌干燥制剂制备方法的比较

将双歧杆菌发酵液配以保护剂再进行干燥制得固体制剂, 分别检测其中的活菌数。实验分以下 3 组进行: (1 组) 将发酵液与一定浓度的明胶、黄原胶混合后, 配以保护剂使固形物含量达 40%~50% 再进行喷雾干燥, 进风温度为  $160^\circ\text{C} \sim 180^\circ\text{C}$ 、出风温度为  $80^\circ\text{C}$ , 制备微胶囊活菌粉。(2 组) 将发酵液与干燥的填充料混合, 于  $30^\circ\text{C}$  进行真空干燥制备粉料。(3 组) 将发酵液冷冻离心收集菌体, 进行真空干燥制备粉料。

由表 1 结果分析, 由于在冷冻离心时, 可能

表1 不同的干燥方法对活菌数的影响

|                          | 干燥方法                 |                      |                      |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                          | 1组                   | 2组                   | 3组                   |
| 发酵液中的活菌数<br>(cfu/mL)     | $5.1 \times 10^{11}$ | $5.1 \times 10^{11}$ | $5.1 \times 10^{11}$ |
| 干燥后固体配料中的<br>活菌数 (cfu/g) | $9.0 \times 10^4$    | $7.0 \times 10^8$    | $\leq 10$            |

由于低温条件, 分子氧容易进入而与菌体表面的亲水基团结合, 从而使菌细胞在干燥过程中大量死亡<sup>[7]</sup>。因此, (3 组) 方案中固体制剂中基本检测不出活菌。在喷雾干燥的过程中, 由于与高温空气充分接触, 尽管菌细胞与热空气接触时间短, 但因热力作用还是导致菌体很快死亡, 由 (1 组) 方案制备的微胶囊内双歧杆菌活菌为  $9.0 \times 10^4$  cfu/g, 存活率较低。而与保护剂及填充料混合经真空干燥后, 活菌存活率相

对较高达  $7.0 \times 10^8$  cfu/g。因此,在不采用冷冻干燥工艺的前提下,本课题在今后的研究中将采用(2组)方案的干燥工艺。

## 2.2 胶体物质对发酵液中 pH 值及干燥粉料中双歧杆菌存活的影响

**2.2.1 发酵曲线:**在发酵培养基中按一定比例添加明胶和黄原胶,经均质、灭菌、充氮气除氧后,接种发酵培养,定时取样测定 pH 值和活菌数。以未添加胶类物质的发酵液为对照,发酵曲线见图 1。由图 1 可知,在加有黄原胶、明胶的混合培养基中,双歧杆菌生长延滞期相对较长、pH 偏高且下降的变化平缓,最高活菌数达  $2.3 \times 10^{11}$  cfu/mL 左右,发酵终点 pH 值为 4.1。而没有添加胶类的培养基中,双歧杆菌生长情况则相反:菌体生长的延滞期较短、pH 下降变化较快、发酵终点 pH 值为 3.5,最高活菌数为  $5.1 \times 10^{11}$  cfu/mL 左右。提示了因为明胶溶液对双歧杆菌发酵过程中产酸导致的 pH 下降,有一定的缓冲作用。

### 2.2.2 固体制剂中活菌存活稳定性:对发酵液

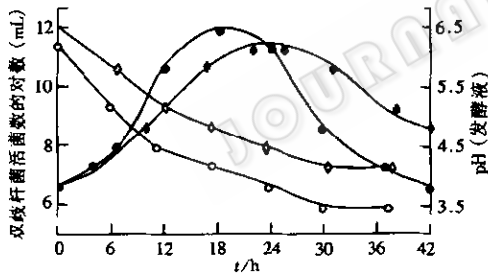


图 1 在加胶培养基中和对照组培养基中双歧杆菌的发酵曲线

—●—对照组培养基中双歧杆菌的生长曲线, —○—对照组培养基中 pH 变化曲线, —◆—加胶培养基中双歧杆菌的生长曲线, —◇—加胶培养基中 pH 变化曲线

充氮压滤、混料、脱水、制粒并经室温真空干燥作成双歧杆菌固体制剂,测定固体制剂中的活菌数。将上述活菌固体制剂充氮密封包装于  $6^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$  条件下保存 1 个月,测定其活菌数及存活率实验分如下两组进行:(1组)由加有胶类物质的培养液制备的固体活菌制剂,(2组)由不添加胶类的培养液制备的固体活菌制剂。

实验结果见表 2。

从图 1 及表 2 结果可以看出,尽管在胶体

表 2 固体制剂中活菌回收率的比较

| 指标                   | 实验号                  |                      |
|----------------------|----------------------|----------------------|
|                      | 1组                   | 2组                   |
| 发酵液中的活菌数<br>(cfu/mL) | $2.3 \times 10^{11}$ | $5.1 \times 10^{11}$ |
| 固体颗粒中的活菌数<br>(cfu/g) | $6.7 \times 10^8$    | $3.5 \times 10^8$    |
| 保存一个月后活菌数<br>(cfu/g) | $5.9 \times 10^8$    | $1.0 \times 10^8$    |
| 回收率(%)               | 88.1%                | 28.6%                |

物质的底料中双歧杆菌活菌数稍低,但(1组)加有胶类包埋物质干燥制备的活菌粉料中双歧杆菌的存活率高、活菌保存期长、稳定性好。没有添加胶类物质的(2组)制备的活菌粉料中双歧杆菌的情况则相反,存活率相对较低、稳定性较差。

这可能是由于明胶和黄原胶与培养基混合形成了粘稠的混合胶体起到一定的阻氧作用,减少了辅料拌和过程中空气氧对双歧杆菌的毒害作用。同时,胶体物质还能将菌体细胞严密地包裹起来,起到包埋和保护菌细胞的作用<sup>[7]</sup>;另一方面发酵液最终的 pH 偏高,这也有利于改善菌细胞的干燥环境,提高存活率。

## 2.3 发酵过程的放大试验

**2.3.1 50L 的发酵罐中双歧杆菌的发酵曲线:**分别于 5L 和 50L 的发酵罐中进行厌氧发酵,定时检测其活菌数和 pH 值,由图 2 发酵曲线可知,发酵罐体积放大 10 倍后,活菌生长速度有所减缓,pH 值下降也相对平缓,5L 发酵罐中发酵 24h 后活菌数最高达到  $2.3 \times 10^{11}$  cfu/mL,对应的发酵 pH 值为 4.1,50L 罐发酵 30h 后活菌数最高达到  $5.7 \times 10^{10}$  cfu/mL,对应的发酵 pH 值为 4.3。这主要是由于发酵罐体积放大后,培养物经蒸汽灭菌充氮除氧不够彻底而形成的双歧杆菌增殖速度减慢。发酵底料起始可溶性固形物为  $9.5^{\circ}\text{Bx}$ ,经灭菌后为  $10^{\circ}\text{Bx}$ ,在发酵过程中可溶性固形物都有所下降,在 50L 发酵罐中处于双歧杆菌对数生长后期时,由于大量合

成细胞物质,可溶性固形物达最低点为7.0° Bx左右,而处于稳定后期时可溶性固形物却略有增加达8.0° Bx,之后又有所下降。

### 2.3.2 发酵罐中溶氧率的变化:通过溶氧电极

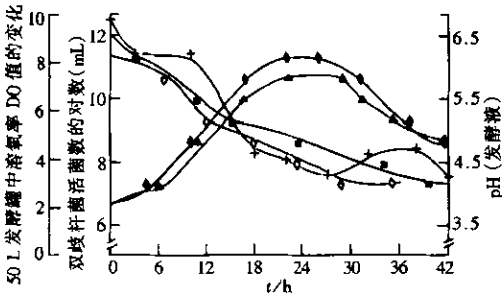


图2 50L发酵罐中双歧杆菌的发酵曲线

—◆— 5L发酵罐中双歧杆菌的生长曲线, —◇— 5L发酵罐中双歧杆菌 pH变化曲线, —▲— 50L发酵罐中双歧杆菌的生长曲线, —■— 50L发酵罐中双歧杆菌 pH变化曲线, —+— 50L发酵罐中溶氧率 DO 值的变化曲线

观察在50L和5L发酵罐中溶氧率DO值的变化过程,在高压蒸汽灭菌后,将底料的相对DO值调为100,由图2结果可见,底料经充氮除氧后至发酵的过程中,50L发酵罐中的溶氧率始终高于5L的发酵罐,且DO值呈现非均一的动态变化,从除氧后开始发酵3h的8.4降至4.2。此时,发酵罐中的双歧杆菌数达最高数为5.7 × 10<sup>10</sup> cfu/mL。可见,当发酵罐体积放大后,对于培养基的充氮除氧是技术关键。因为所采用青春双歧杆菌是厌氧菌,它不能合成与氧有关的呼吸链组分,因而分子氧对其活细胞有毒害作用<sup>[7]</sup>。由此可见,在工业化生产双歧杆菌微生态制剂产品中,要想得到高活菌量的产品,关键是形成合适的厌氧培养环境,应使培养液中氧的分压降至最低限度。

### 2.4 双歧杆菌保健粉料及口嚼片的生产工艺的研究

双歧杆菌保健粉的生产工艺过程是将符合食品卫生要求的异麦芽低聚糖、蔗糖、可溶性淀

粉、豆粉、颗粒型葡萄糖酸钙等于80℃烘干、粉碎、过筛、与乳粉、抗氧化剂等混合作为复合填充剂,与混合胶类物质的发酵液按一定比例拌和、真空干燥、制粒、与1%硬脂酸镁混合,将压片机压力控制在0.3~0.35 MPa压片后制得双歧杆菌保健片,再充氮包装即得成品。

### 2.5 产品及应用

填充辅料的成分对成品中双歧杆菌存活的影响:将加胶类物质的发酵液中再混合一定比例的棕榈油、乳化剂、乙基纤维素,再按上述工艺条件制备双歧杆菌保健粉进行压片。与未经上述条件处理的双歧杆菌保健粉制备的活菌片作比较,充氮密封包装,于6℃~10℃保存,定时检测其中的双歧杆菌数,由结果表2可以看出,配料中一定比例的疏水性填充剂能够稳定双歧杆菌在干燥状态下的存活。

### 3 结论

与黄原胶、明胶混合经喷雾干燥制备的微胶囊化双歧杆菌存活率较低,而在复合果蔬汁底料中添加一定比例的胶类物质,发酵液与填充料混合,经真空干燥制得的双歧杆菌保健粉中双歧杆菌存活率较高,提示了胶类物质在干燥脱水后对菌细胞的包埋和保护作用。

### 参 考 文 献

[1] 康白. 微生物学原理. 大连: 大连出版社, 1996, 131~144.

[2] 杨基础. 微生物学通报, 1996, 23(1): 35~36.

[3] 杨翔华. 食品科学, 1997, 18(3): 40~43.

[4] 朱俊晨. 食品与发酵工业, 2000, 26(1): 37~47.

[5] 杨洁彬, 郭兴华. 乳酸菌-生物学基础及应用(第一版). 北京: 中国轻工业出版社, 1996.

[6] 黄伟坤. 食品检验与分析(第一版). 北京: 中国轻工出版社, 1995, 6: 454~455.

[7] 曹永梅. 食品与发酵工业, 1999, 25(2): 71~74.