

文章编号 :1009-038X(2002)06-0569-05

双歧杆菌活菌粉的制备

姚卫蓉, 钱科, 姚惠源
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要:用多孔淀粉吸附双歧杆菌后再喷雾干燥制备活菌粉,考察了喷雾干燥工艺过程对活菌存活率的影响,将得到的活菌粉装入肠溶胶囊制成肠溶性活菌粉胶囊,接着考察了该肠溶性活菌粉胶囊在加速贮藏条件下的贮藏稳定性.结果表明用多孔淀粉吸附双歧杆菌后,不仅在喷雾干燥过程中,而且在贮藏过程中,多孔淀粉对活菌都有保护作用.

关键词:多孔淀粉;双歧杆菌;活菌粉;喷雾干燥;贮藏

中图分类号:TS 201.3

文献标识码:A

The Applications of The Porous Starch II :Bifidobacterium Powder

YAO Wei-rong, QIAN Ke, YAO Hui-yuan
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract:Bifidobacteria are inhabitants of human intestine, and give a significant probiotic benefit to human body. Porous starch was used to absorb the bifidobacteria in order to enhance its resistance to heat and oxygen. This work focused on the change of survival rate of bifidobacteria during the different techniques. The survival rate of bifidobacteria increased after adsorption by the porous starches. It kept constant by adding protect reagent after adsorption. When the inlet air temperature of spray drying was fixed at 160 °C, survival rate of bifidobacteria decreased with increasing of outlet air temperature. To the powder characteristic of storage, spray drying was better than frozen drying.

Key words:bifidobacteria powder; spray drying; porous starch

随着双歧杆菌有益健康研究结果的不不断积累以及现代人对健康饮食要求的不断提高,双歧杆菌的保健功效已为广大消费者重视并接受,应用双歧杆菌的各种药物和食品相继推出并日渐普及.

双歧杆菌需定植于人体肠道中才能发挥生理功效,通过直接摄取含有双歧杆菌的食品或制剂,以补偿肠道中双歧杆菌的不足,对于经常服抗生素和肠道中缺少双歧杆菌的人群来说尤其适合.

为方便运输,耐贮藏,必须制备活菌粉.食用时将活菌粉装入肠溶胶囊,防止胃液对活菌的杀灭作用,使活菌安全到达肠道.

目前,双歧杆菌活菌制剂是作为一种辅助用药,生产量相对较小.如果将双歧杆菌制备成一种保健品,就需要批量生产(与辅助药剂相比).目前市场上活菌粉的制备大多采用真空冷冻干燥技术,用该工艺制备得到的活菌粉具有菌数多,活力强,

收稿日期 2002-04-10; 修订日期 2002-10-08.

基金项目 国家十五科技攻关项目资助课题(2001BA501A03).

作者简介 姚卫蓉(1970-),女,江苏吴江人,工学博士,讲师.

运输方便及保存期长等优点,但有生产设备投资大、生产成本低、生产量小的缺点.喷雾干燥是干燥制备粉状物料的另一技术,作为一种工业化技术,具有成本低廉、生产量大等优点.丁一庆^[1]和曹永梅^[2]等人曾试图用喷雾干燥工艺制备活菌粉,但发现活菌的存活率只有万分之几,远远达不到冷冻干燥的水平,基本没有工业化的可能性.

作者拟用多孔淀粉的特殊中空结构^[3]吸附双歧杆菌,再喷雾干燥,对应用喷雾干燥技术制备双歧杆菌粉进行了初步探讨,考察在喷雾干燥工艺以及贮藏过程中多孔淀粉对菌体的保护作用.

1 材料与方法

1.1 菌种

由食品学院生物技术学科组提供.

1.2 培养基

见文献^[1].

1.3 仪器与设备

KLG-IV 冷冻干燥机,德国制造 ;离心喷雾器,无锡林洲干燥机厂制造.

1.4 多孔淀粉的制备

见文献^[3].

1.5 活菌粉剂的制备

菌种→种子→发酵→离心→吸附→喷雾干燥→装入肠溶胶囊.

1.6 加速贮藏性能试验

分别将样品置于 37,45,55 ℃ 的恒温培养箱中,定时取出样品,用灭菌的 PBS 缓冲液使精确称量的干剂复水,室温放置 20 min,逐级稀释,39 ℃ 培养 24 h,按活菌计数法计数^[1].

2 结果与讨论

2.1 不同杀菌方法的效果比较

多孔淀粉由于其特殊的中空结构,造成杀菌的难度.首先考察不同杀菌方式对杀菌效果的影响.以玉米多孔淀粉为样品,经湿热杀菌(121 ℃ 杀菌 30 min),Co⁶⁰辐射杀菌 24 h,厌氧培养,计数,比较杀菌效果,结果见表 1.

表 1 不同杀菌方法的效果比较

Tab.1 The effect of sterilization on survival rate

杀菌方法	活菌数/(个/mL)
湿热杀菌	0
Co ⁶⁰ 辐射杀菌	6.8×10 ⁵

由表 1 可以看出,湿热杀菌完全可以达到彻底

杀菌,而 Co⁶⁰辐射杀菌 24 h 还有活菌存在.因而,采用湿热杀菌方法.

2.2 喷雾干燥工艺的确定

主要考察多孔淀粉吸附双歧杆菌后的喷雾干燥工艺,考察不同喷雾条件对存活率的影响.

2.2.1 保护剂对存活率的影响 将双歧杆菌活菌体在加与不加保护剂的情况下,分别用玉米多孔淀粉吸附,再喷雾干燥,测定其存活率.玉米多孔淀粉的加入量为保护剂的 40%.保护剂组成:脱脂奶粉 20 g/dL,甘油 1 g/dL,蔗糖 8 g/dL,喷雾干燥时进风温度 170 ℃,出风温度 70 ℃,相对存活率的计算以表中加保护剂样品的存活率为参照,结果见表 2.表 2 表明,保护剂的存在与否对存活率影响不大,而文献^[1]报道,保护剂对菌体存活率有较大的影响.说明经过多孔淀粉吸附后,活菌体钻入多孔淀粉的孔内.喷雾干燥时,由于活菌体有外层多孔淀粉外壳的保护,保护剂对存活率没有决定性影响.

表 2 保护剂对存活率的影响

Tab.2 The effect of protecting regeant on survival rate

处理	相对存活率/%
不加保护剂	98.09
加保护剂	100.00

2.2.2 喷雾干燥温度对成活率的影响 将进风温度固定在 170 ℃,改变出风温度,考察不同出风温度对菌体存活率的影响,结果见表 3.

表 3 不同出风温度对活菌数的影响

Tab.3 The effect of the outlet air temperature on survival rate

出风温度/℃	产物水分/%	菌体存活率/%
65	5.62	2.3
75	4.49	1.9
80	3.38	1.7

表 3 表明,得到的产物呈乳白色,松散无结块,有酸奶香味.出风温度越低,存活率越高,但水分含量也越大.当出风温度为 65 ℃ 时,得到的活菌粉仍是粉末状的;而按一般的操作经验,出风温度为 65 ℃ 时,得到的产品一般水分含量太大,无法分散.分析其原因,可能是因为进入离心喷雾机的原料中有 40% 左右的固形物,这些固形物的绝大部分是多孔淀粉颗粒,由于多孔淀粉是生淀粉颗粒,这种固液混合物体系不粘稠.喷雾时,虽然进风温度达到 170 ℃,但是多孔淀粉粒子在极短暂的时间内通过,并被迅速干燥,根本没有充分溶胀、糊化的机会,而

且出风温度为 65 ℃ 时,已足够令多孔淀粉干燥.因此,喷雾出来的粒子基本仍是生多孔淀粉颗粒.因此,用多孔淀粉吸附活菌后再喷雾干燥,能增加喷雾工艺的可操作性.可以控制喷雾工艺条件如下:进风温度 170 ℃,出风温度 65 ℃.

2.3 贮藏性能

一种微生物制剂功效的优劣,首先取决于所选用的菌种,在此基础上,功效与所含活菌量有密切关系,这是与其他保健食品的最大区别.因此,了解不同工艺得到的活菌制剂在不同的贮藏条件、不同水分下的存活特性,对科学、合理地生产、贮运及服用具有积极意义.

微生物的失活速率与菌种特性、所处营养条件与温度有关.其失活过程符合一级反应动力学,失活速率($-dN/dt$)与任一瞬间残存的活菌数(N)成正比,可表示为:

$$dN/dt = -KN \tag{1}$$

移项积分得:

$$\lg(N_t/N_0) = -K_t \tag{2}$$

$$\lg N_t = -K_t + \lg N_0 \tag{3}$$

式中: N_0 为初始活菌浓度(CFU/g), N_t 为 t 时刻活菌浓度(CFU/g), K 为失活常数(h^{-1}), t 为失活时间(h).

由于试验时间的限制,用加速贮藏试验考察活菌粉的贮藏性能.将多孔淀粉吸附双歧杆菌后的喷雾干燥粉(简称为 PSBP)与常规的不加多孔淀粉的冷冻粉(简称为 BP)分别进行加速贮藏试验,考察多孔淀粉在加速贮藏期间对活菌的保护作用.

2.3.1 多孔淀粉吸附的活菌粉

将多孔淀粉吸附双歧杆菌,再喷雾干燥,得到的活菌粉称为“多孔淀粉吸附的活菌粉”(简称 PSBP),经测定水分质量分数为 3.38%.对该活菌粉(PSBP)分别在 36,45,56 ℃ 下进行加速贮藏试验,分别在不同的贮藏时间测定其残存菌量,结果见表 4.可以看出,当菌种已定,营养条件不变时,温度对双歧杆菌活菌的存活特性的影响随温度的升高而加大.

将表 4 数据以 $\lg N-t$ 作图(见图 1),并作线性回归,得到 3 个温度的回归方程:

36 ℃: $\lg N_t = -0.0033t + 5.4955 \tag{4}$

失活常数 $K_{36\text{ ℃}} = 0.0028 (h^{-1})$

45 ℃: $\lg N_t = -0.0944t + 5.4394 \tag{5}$

失活常数 $K_{45\text{ ℃}} = 0.0944 (h^{-1})$

56 ℃: $\lg N_t = -0.256t + 5.456 \tag{6}$

失活常数 $K_{56\text{ ℃}} = 0.7831 (h^{-1})$

同时,一级反应动力学应符合阿累尼乌斯方程

$$K = A\exp(-E/RT)$$

式中: A 为比例常数; E 为微生物失活所需活化能,为 4.186 J/mol; T 为温度(K).将式(4)~(6)中求出的 K 值与温度 T 作 $\lg K \sim 1/T$ 图(见图 2),作线性回归,得回归方程

$$\lg K = 28.375 - 9471.2/T \tag{7}$$

设 $\lg(N_t/N_0)$ 为失活系数 η ,则 $K = \eta/t$,代入式(7)

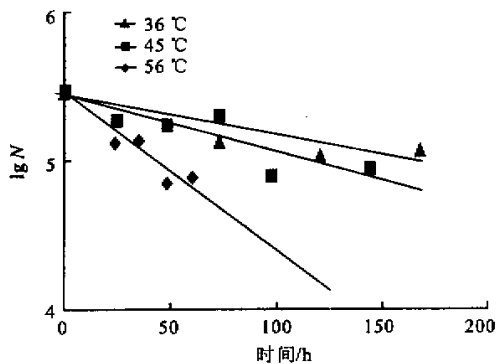
$$\lg t = -28.375 + \lg \eta + 9741.2/T \tag{8}$$

表 4 不同温度对活菌数的影响

Tab.4 The effect of the storage temperature on survival rate

时间/h	不同温度下的活菌浓度/(CFU/g)		
	36 ℃	45 ℃	56 ℃
0	3.22×10^5	3.22×10^5	3.22×10^5
0.5			1.06×10^5
1.0		1.83×10^5	1.26×10^5
1.5			1.38×10^5
2		1.75×10^5	6.97×10^4
2.5			7.84×10^4
3		1.90×10^5	
4		7.85×10^4	
6		8.70×10^4	
12	3.63×10^5		
24	1.48×10^5		
72	1.30×10^5		
120	1.05×10^5		
168	1.15×10^5		

注 样品 PSBP.



样品 PSBP

图 1 不同贮藏温度下活菌数随时间的变化

Fig.1 The effect of storage temperature on survival rate

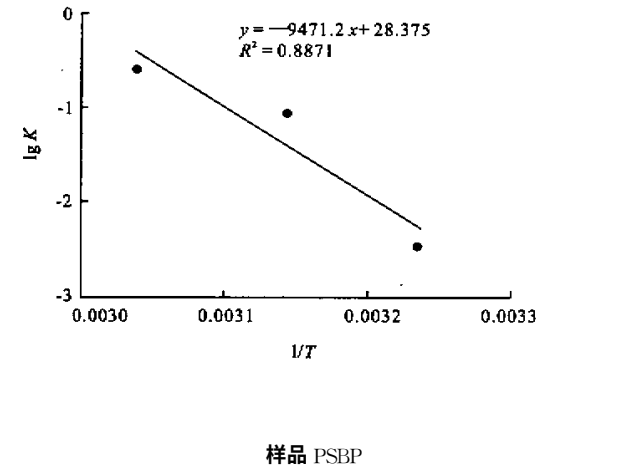


图 2 不同温度下的失活系数

Fig. 2 The effect of storage temperature on lgK

2.3.2 没有多孔淀粉吸附的活菌粉

将双歧杆菌活菌粉直接进行冷冻干燥,得到活菌粉的水分质量分数为 3.32%,简称该活菌粉为“BP”,然后在不同温度下加速贮藏,在不同贮藏期间测定得到的残存菌量见表 5.

表 5 不同温度对活菌数的影响

Tab.5 The effect of the storage temperature on survival rate

时间/h	不同温度下的活菌浓度/(CFU/g)		
	36℃	45℃	56℃
0	2.24×10^8	2.24×10^8	2.24×10^8
0.5			1.56×10^5
1.0		1.01×10^7	1.95×10^5
1.5			3.41×10^5
2.0			2.43×10^5
2.5			1.79×10^5
3.0		2.21×10^5	
4.0		2.43×10^5	
6.0		1.92×10^5	
12	3.61×10^7		
24	3.54×10^7		
72	2.66×10^5		
120	3.90×10^5		
168	2.43×10^5		
216	2.16×10^5		

注 样品 BP

对表 5 数据进行处理(处理方式如 2.3.1),得到 $\lg N_t-t$ 图(图略),并作线性回归,得到 3 个温度的回归方程:

36℃: $\lg N_t = -0.01357t + 7.632$ (9)

失活常数 $K_{37^\circ\text{C}} = 0.0135 \text{ (h}^{-1}\text{)}$

45℃: $\lg N_t = -0.5064t + 7.6915$ (10)

失活常数 $K_{45^\circ\text{C}} = 0.0115 \text{ (h}^{-1}\text{)}$

56℃: $\lg N_t = -1.1467t + 7.5676$ (11)

失活常数 $K_{55^\circ\text{C}} = 0.006 \text{ (h}^{-1}\text{)}$

将式(9)~(11)中求出的 K 值与温度 T 作 $\lg K \sim 1/T$ 图(图略),作线性回归,得回归方程:

$\lg K = 25.959 - 9648.3/T$ (12)

$\lg t = -29.595 + \lg \eta + 9648.3/T$ (13)

通过式(8),(13),可求得两种活菌粉(PSBP,BP)在不同温度下活菌的失活速率,也可根据在限定的保质期内允许失活菌数的要求,选择合适的贮运温度.如:在一年保质期内要控制活菌数只降低一个指数(即 $\eta=1$),则 $T=14.7^\circ\text{C}$ (BP), $T=20.1^\circ\text{C}$ (PSBP).也就是说,用多孔淀粉吸附后的活菌粉(PSBP)的贮藏温度要高于冷冻粉(BP)的贮藏温度.其中冷冻粉 BP 的贮藏性能与文献[4]报道相符.说明用多孔淀粉吸附了活菌后,贮藏性能得到了提高,基本可以在常温下贮藏.也说明多孔淀粉在贮藏期间对菌体有保护作用.多孔淀粉吸附菌体后,贮藏过程中,使菌体与外界相对隔绝,从而远离氧对菌体的抑制作用,延长了贮藏时间.

为了对加速预测试验进行验证,4 个月后,对保存在 4℃ 冰箱中的喷雾干燥样品(PSBP)进行了活力测定,活力为 $3.22 \times 10^{2.6}$,与原活力相比较(3.22×10^6),下降指数 $\eta=2.4$,而根据公式(8),在 4℃ 保存 4 个月, $\eta=2.36$,因而计算结果与实验基本相符,证明该加速预测法具有实际意义.

需指出的是,上述结果是双歧杆菌活菌粉在非厌氧条件下对温度的敏感情况.由于双歧杆菌是专性厌氧菌,在考察活菌粉的存活特性时还需考虑氧的因素.如活菌粉进行厌氧处理,其存活特性将提高.此外,活菌粉的存活,还受到其他因素的影响,如水分、蛋白质含量,pH 值等.因此,如要成为一个有功效的微生态制剂,应对上述因素加以改进.

3 结 论

用 40% 玉米多孔淀粉吸附活菌,喷雾干燥(进风温度 170℃,出风温度 65℃),菌体存活率达到 2.3%,活菌存活率高于文献报导.将喷雾干燥的活菌粉装入肠溶胶囊,得到具有肠溶性的双歧杆菌活菌粉.在非严格厌氧条件下加速贮藏,菌体的存活性能要优越于不用多孔淀粉吸附直接冷冻干燥的活菌粉.说明用多孔淀粉吸附双歧杆菌后不仅在喷雾干燥过程中,而且在贮藏过程都对其存活率有较好的保护作用.

参考文献：

[1] 丁一庆. 双歧杆菌活菌粉剂的研究[D]. 无锡 无锡轻工大学,1998.

[2] 曹永梅. 微胶囊双歧杆菌的研究[D]. 无锡 无锡轻工大学,1998.

[3] 姚卫蓉,姚惠源. 多孔淀粉的研究之 I 酶和原料粒度对形成多孔淀粉的影响[J]. 中国粮油学报, 2001,16(1) 36-38.

[4] 张明,苏丽明,马天良等. 非厌氧下 HJ9211 冻干双歧杆菌的存活特性[J]. 华东理工大学学报,1999,25(1) 36-38.

(责任编辑 李春丽)

(上接第 563 页)

参考文献：

[1] FUKUSHIMA D. Review :Recent progress in research and technology on soybeans[J]. **Food Sci Technol Res**, 2001, 7(1) :8-16.

[2] PSZCZOLA D E. Soy :why it 's moving into the mainstream[J]. **Food Tech**, 2000, 54(9) :76-86.

[3] UTAKA K. FUKAZAWA C. Gelation mechanism of soybean proteins treated by ficin[A]. Repot of the 39th Daizu Shokushi Kaihatus Kenkyukai,Toyko,1976.

[4] FUKE Y, MASAKATSU S, MSTSUOKA H. Coagulation of soy milk by proteolytic enzyme treatment[J]. **J Jap Soc Food Sci Technol**, 1980, 27 275-279.

[5] FUKE Y, SEKIGUCHI M, MSTSUOKA H. Nature of stem bromelain treatments on the aggregation and gelation of soybean proteins[J]. **J Food Sci**, 1985, 50 :1283-1288.

[6] MURATA K, KUSAKABE I, KOBAYASHI H. Studies on the coagulation of soymilk-protein by commercial proteinase[J]. **Agric Biol Chem**, 1987, 51 385-388.

[7] ARIMA K, IWASAKI S, TAMURA G. Milk clotting enzyme from microorganism[J]. **Agric Biol Chem**, 1967, 31 :540-545.

[8] GODFEREY T, REICHELT J. Industrial Enzymology- the application of enzymes in industry[M]. New York :Macmillan Publishers Ltd, 1983. 553-554.

[9] WHITKER J R. Priciples of enzymology for the food science[M]. New York :Marcel Dekker Inc, 1972, 511-541.

[10] KOHYAMA K, SANO Y, DOI E. Rheological characteristics and gelation mechanism of Tofu (Soybean Curd) [J]. **J Agric Food Chem**, 1995, 43 :1808-1812.

(责任编辑 杨 萌)