

双歧联菌微囊微生态口服液的研制

杨汝德 林晓珊 罗立新 郭迪

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州, 510640)

摘要 从工业化生产和应用的角度, 以天然原料为主, 研究适合于双歧杆菌生长的优化培养基配方, 研制出一种新型双歧联菌微囊微生态口服液, 解决了液态微生态产品货架期短的问题, 同时使发酵液得以充分利用, 避免了浪费和环境污染。

关键词: 双歧联菌, 混合培养, 微囊化, 微生态口服液

双歧杆菌是一类人体肠道正常菌群的优势菌, 与嗜酸乳杆菌有良好的互生关系, 可组成联菌株进行混合培养。

目前已商品化的含活性双歧杆菌的液态微生态产品, 在生产、销售和使用过程中, 普遍存在常温下活菌存活期很短, 即货架期短; 双歧活性菌在经口服通过消化道时, 不耐受胃酸, 容易失活。

我们从工业化生产和应用的角度, 重点研究以天然原料为主, 适合于双歧杆菌生长, 口感和风味良好的培养基配方, 研制出一种新型的双歧联菌微囊混饮口服液。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

短双歧杆菌(A)、两歧双歧杆菌(B)、青春双歧杆菌(C)、嗜酸乳杆菌(L), 以上菌种均由本系微生物实验室选育保存。

1.1.2 培养基

(1) 分离及增殖双歧杆菌用培养基(MRS培养基); (2) 分离及增殖乳酸杆菌用培养基(PTYG培养基); (3) 发酵培养基(NPNL优化)。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

接种物置厌氧培养箱进行厌氧培养或通入混合气体进行深层液体厌氧培养。

1.2.2 各种参数的测定方法

(1) 氨基酸的测定: 采用电位滴定法; (2) OD值的测定: 采用721分光光度计测定; (3) pH值的测定: 用PHS-3C型酸度计测定; (4) 活菌数的测定: 采

用高层半固体厌氧培养计数法。

1.2.3 主要培养基原料的制备方法

(1) 大豆水解液的制备: 取大豆和眉豆, 按比例加水 and NaHCO_3 浸泡后, 煮沸, 磨豆, 过滤, 灭酶。然后加入木瓜蛋白酶、高温 α -淀粉酶酶解, 过滤, 备用。

(2) 酵母水解液的制备: 取干酵母粉, 加入NaOH水浴保温破壁, 用HCl中和, 酶解, 离心取上清液。

(3) 牛肝汤的制备: 取牛肝, 切碎, 加水, 煮沸, 过滤取清液, 去油脂。

1.2.4 微胶囊的制备方法

采用流化喷雾的微囊化方法(略)。

2 结果与讨论

2.1 适合于工业化生产的各种培养基原料的制备

2.1.1 大豆水解液制备条件

研究结果表明, 大豆最佳酶解条件是: 加入0.6%木瓜蛋白酶, 保温70℃酶解1h; 眉豆的最佳酶解条件是加入0.1%高温 α -淀粉酶, 100℃液化5min。

2.1.2 干酵母水解液制备条件

正交实验的结果表明: 用1%的NaOH 50℃处理干酵母0.5h使之破壁, 中和后再用1%木瓜蛋白酶于70℃酶解1h, 效果最佳, 可代替酵母膏。

用果葡糖浆取代淀粉水解糖, 用牛肝汤取代猪肝汤, 发酵试验的结果表明完全可行。

2.2 培养基组分的优化

采用成本低, 易得到的果葡糖浆、干酵母粉水解液、大豆水解液和牛肝汤为主要原料, 通过正交实验对培养基成分进行优化, 结果如表1所示。

第一作者: 学士, 教授。

收稿时间: 2002-07-24, 改回时间: 2002-09-27

表 1 培养基优化的正交实验结果

水平	A 果葡	B 干酵母	C 大豆水	D 牛肝汤	净增 OD*
	糖浆/ %	水解液/ %	解液/ %	/ %	
1	2	2	10	5	0.617
2	2	4	15	10	0.429
3	2	8	20	15	0.631
4	3	2	15	15	0.578
5	3	4	20	5	0.564
6	3	8	10	10	0.619
7	4	2	20	10	0.512
8	4	4	10	15	0.490
9	4	8	15	5	0.582

注:以蒸馏水为空白,在波长为 600 nm 可见光下测得。

根据实验结果分析,确定了最优化的培养基配方:果葡糖浆 3%,干酵母水解液 8%,大豆水解液 10%,牛肝汤 5%,低聚果糖 0.3%,L- 半胱氨酸 0.

表 3 混合培养菌体增殖量(OD)测定结果

测定项目	培养时间/h								
	0	4	8	12	14	16	18	20	22
OD 值	0.160	0.250	0.264	0.432	0.539	0.620	0.640	0.690	0.680
pH 值	5.70	5.82	5.27	4.40	4.16	3.98	3.94	3.92	3.88

由表 3 可知,混合菌在优选培养基中培养 8 h 后菌体量明显增加,20 h 到达最高峰,即对数生长期末期。同时 pH 随着菌量的增加而下降,在 16 h 已经降至 4.0 以下,此环境只适合嗜酸乳杆菌生长而不利双歧杆菌生长。同时表明,混合菌生长的对数生长期约在 8~ 18 h,故在大批量生产时,发酵时间宜控制在 18 h 左右,以利获得细胞活力最强,活菌数最高的培养菌液。

2.4 10 L 发酵罐扩大中间试验

在前面实验的基础上,我们进行了 10 L 发酵罐扩大中间试验。将培养到对数期的双歧杆菌 A、B、C 各按 1% 接种量,接入到已经灭菌的装有 8 L 培养液的 10 L 发酵罐中(嗜酸乳杆菌 L 在 A、B、C 中培养 6 h 后再接入),于 37~ 38℃ 下间歇通入混合气体进行深层液体厌氧培养。在培养过程中定时取样测定 OD 值和 pH,确定 18 h 为对数生长期末期并终止培养。同时在培养至 14 h 和 18 h 的时候分别对双歧杆菌和嗜酸乳杆菌进行活菌计数,培养 18 h 活菌数可达到 8.9×10^{10} 个/mL。

表 4 10 L 发酵罐中活菌数的测定

培养时间/h	发酵培养液总活菌数/mL ⁻¹	嗜酸乳杆菌 L 活菌数/mL ⁻¹	双歧杆菌在 ABC 中活菌数/mL ⁻¹
14	7.8×10^{10}	2.5×10^{10}	5.3×10^{10}

1%,盐溶液 2%,pH 7.5。在各因素所选定的水平范围内,干酵母水解液添加量为主要影响因素。

表 2 正交实验结果分析

	A	B	C	D
K_1	0.560	0.570	0.576	0.589
K_2	0.587	0.494	0.530	0.520
K_3	0.528	0.611	0.569	0.566
R	0.059	0.116	0.046	0.069

2.3 混合培养发酵曲线的测定

将双歧杆菌 A、B、C 种子液,各按 1% 接种量接入装有已灭菌的 500 mL 优选培养基中,37~ 38℃ 下厌氧培养 6 h 后再接入 1% 嗜酸乳杆菌 L,继续厌氧培养并定时取样测定 OD 值和 pH 值,根据 OD 值和 pH 值的变化作出生长曲线(略)。

18	8.9×10^{10}	2.6×10^{10}	6.3×10^{10}
----	----------------------	----------------------	----------------------

由表 4 可见,混合培养双歧杆菌生长良好,与嗜酸乳杆菌的活菌数比例大致为 2:1,且活菌数均达到了 10^{10} /mL。

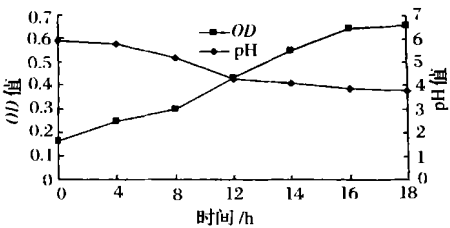


图 1 10L 发酵罐中试发酵曲线

2.5 微囊化微生态乳片剂的制备

成熟发酵菌液(8 L)经高速离心后,可得湿活菌体约 50 g,离心清液约 7.5 L。湿菌体加入冻干保护剂于- 40℃ 进行冷冻真空干燥,可得冻干菌粉约 200 g。经微囊化后可得含活性菌微囊约 300 g(微囊化过程,双歧杆菌存活率约 80%)。微囊压成微生态乳片制剂约 3 kg。

2.6 口服液的调制

离心后的上清液中含有丰富的各种人体必需氨基酸、维生素、双歧因子(大豆低聚糖、低聚果糖等)、双歧杆菌多糖和各种生理活性物质,将其调配

成口服液,并与含活性菌微囊配合,则成为一种新型的微生态混饮口服液。

上述离心清液以 2:1 加水,加入甜味剂和香味剂,经过调配、灌装、灭菌,可得酸甜适中的口服液约 12L (240 瓶,50 mL/瓶)。

3 结 论

(1) 用适合于工业化生产的天然原料代替实验室常用培养基原料,更有利于双歧杆菌的生长,可大大改善发酵液的口感和风味,也可降低成本。

(2) 发酵后将培养液离心,收集活菌体后制成冻干粉,富含营养和生理活性物质的离心清液调配成保健饮品,发酵产物完全利用,避免浪费和环境污染。

(3) 冻干粉经微囊化制成活性微胶囊,较好的解决了冻干活性菌不耐受强胃酸和常温保存期短的问题。

题。

(4) 经调配的发酵上清液与活性微囊制剂一起组成一种新型的微囊化双歧联菌株混饮口服液,解决了液态微生态制剂存在的问题

参 考 文 献

- 1 Cheng C C, Nagasawa T. Japan J. Zootech. Sci., 1983, 54 (11): 740~ 747
- 2 Ana M P, Gomes F, Xavier M et al. Journal of Dairy Science, 1998, 8(11): 2818~ 2825
- 3 陈文学,史俊华. 中国微生态学杂志, 2000, 12(5): 298
- 4 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及试验方法. 北京: 中国轻工业出版社 1996. 68~ 80, 85~ 89, 103~ 109
- 5 刘仲则. 食品科学, 1994, (11): 17
- 6 那淑敏,贾士芳. 中国微生态学杂志, 1999, 11(5): 5~ 7
- 7 张香美,江汉湖,董明盛. 安徽农业技术师范学院学报, 1999, 13(2): 5~ 10

市场动态

新型食品添加剂在国外面市

日本和法国合资的 Beghin- Meiji 公司,在欧洲投放了第一种以果糖低聚糖为基础的食品添加剂——Actilight. Actilight 中的双歧因子能刺激肠道菌落,在碳水化合物和类脂化合物的新陈代谢中参与某些维生素的合成(维生素 B 和维生素 K),并参与肠道食物的调节。

法国和荷兰的研究机构进行过专题研究,结果都表明 Actilight 还有一个附带的好处,就是能够促进镁的吸收。根据上述两个组织的研究结果,如果每天食用 10g Actilight,连续食用 5 周,可以将对镁的吸收提高 11%。欧洲、日本和美国很多大的食品厂家都选择了 Actilight 作为他们的食品类产品(奶、酸奶、糖、鲜奶酪、果酱、香肠、火腿)或高品质的营养食品(饼干、谷物食品等)的添加剂。

信息窗

日本用聚氯乙烯纤维开发保健产品

日本帝人公司研究人员发现,聚氯乙烯纤维与人体摩擦后会产生大量负离子。他们正试图利用这一特性开发保健产品。

据这家公司的研究人员测定,当聚氯乙烯纤维与人体互相摩擦时,会使周围空气中漂浮的水分子带上负电,每 cm^3 可多达 880 至 2020 个,数量是通常情况下的 4~ 10 倍。研究人员还发现,聚氯乙烯纤维与皮肤摩擦后产生的负离子量要比聚酯和聚丙烯与皮肤摩擦后产生的负离子量多。研究人员认为,产生这种现象的原因可能是聚氯乙烯中的氯容易失去电子,很小的能量就能使空气中的微粒带电。

科学家发现,瀑布周围容易产生空气负离子,它们有抑制人体细胞和血液氧化的作用。因此,日本公司希望利用聚氯乙烯纤维这一特性开发出保健产品。

日本推出新型合成氢菌蛋白饲料

日本一家公司最近研制生产出了一一种新型合成饲料——氢细菌生物群蛋白饲料,简称氢菌蛋白饲料。

据科研人员介绍,这种新型合成饲料是利用氢细菌生物群对含碳的无机物废料进行发酵而生成的,在工业化生产中,每 m^3 的反应容器一昼夜可生产 80~ 100kg 的氢菌蛋白。利用这种饲料来喂家畜家禽,不仅可节约鱼粉、骨粉等精饲料,而且可以加快畜禽生长。