

免疫牛初乳与双歧杆菌复合微胶囊的研制

杨 柳, 尤丽新, 张英楠, 刘 艳, 徐 静

(吉林农业大学发展学院, 吉林 长春 130600)

摘 要: 以双歧杆菌发酵免疫牛初乳, 然后采用真空冷冻干燥技术研制成冻干粉, 并以冻干粉为芯材、以肠溶材料欧巴代为壁材、以保护剂为润湿剂, 采用空气悬浮微胶囊化的方法制成免疫与微生态双活性肠溶制剂。通过正交试验确定空气悬浮造粒机的最佳工艺参数为进风量 $200\text{ m}^3/\text{h}$ 、进气温度 45°C 、排气温度 36°C 、物料温度 37°C 、喷浆速率 6 r/min 。得到的微胶囊产品为浅绿色圆形颗粒状、不粘连、流动性好、粒径大小基本均匀。

关键词: 双歧杆菌; IgG; 悬浮造粒; 微胶囊; 肠溶性

Development of Complex Microcapsules with Immune Colostrum and *Bacillus bifidus*

YANG Liu, YOU Li-xin, ZHANG Ying-nan, LIU Yan, XU Jing

(Development College of Jilin Agricultural University, Changchun 130600, China)

Abstract : *Bacillus bifidus* and immunoglobulin are materials with fundamental biological activities in immune colostrum. However, the activities of *Bacillus bifidus* and immunoglobulin are greatly damaged by proteases and bile in gastrointestinal tract, which brings a challenge in the utilization of *Bacillus bifidus* and immunoglobulin in food processing. The powder of fermented immune colostrum with *Bacillus bifidus* was obtained by lyophilization. A kind of intestinal soluble microcapsules was prepared using lyophilized powder as the core material, Opadry as the wall material and protectant as wetter through air suspension microencapsulation technology. The preparation process was explored by orthogonal array design experiments. The optimal conditions for microcapsules were 200 m³/h for air-input capacity, 45 °C for air-input temperature, 36 °C for air-release temperature, 37 °C for material temperature and 6 r/min for gunite speed.

Key words: *Bacillus bifidus*; immunoglobulin; air suspension microencapsulation technology; microcapsule; intestinal solubility

中图分类号: TS252.42

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0194-04

免疫乳是指对哺乳动物(主要是牛、羊等)选择性地免疫接种一些能够引起人或动物疫病的细菌或病毒或其他一些外来的抗原,进而刺激机体产生特异性免疫应答反应,以分泌特异性抗体进入乳中,这种乳称为免疫乳^[1-2]。人服用免疫乳,小肠无需吸收抗体即可起到被动免疫保护作用,只要乳中的免疫球蛋白到达肠道后活性不丧失,就可特异性地中和并清除肠道中的病原菌,从而对疾病有一定地预防和治疗作用^[3-4]。

双歧杆菌是人体肠道内 100 多种细菌中典型的对人体有益无害细菌,它与人的一生始终保持着和谐的共生关系,是健康个体肠道中的优势菌,其促进人体健康的有益作用远远超过其他乳酸菌^[5-8]。日前,尽管对双歧杆菌促进人体健康的功能性及其微生态调节机制尚不完全了解,但该菌的生物化学屏障、抑制致病菌和腐败菌、提供营养、提高免疫力、抗肿瘤功能及其某些

临床功效已充分肯定[9]。

然而, 双歧杆菌和免疫球蛋白在人体内胃酸、胆汁酸、蛋白酶的作用下活性大大降低, 限制了IgG及双歧杆菌在食品加工中的应用。为使双歧杆菌和IgG能顺利通过肠道, 避免胃酸、胆汁酸对二者活性的影响, 本研究采用流化床悬浮微胶囊化肠溶包埋技术, 制备免疫牛初乳与双歧杆菌双活性复合微胶囊制剂。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脱脂乳 黑龙江省完达山乳业股份有限公司；青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、改良牛乳培养基、TYG 固体培养基 吉林农业大学食品科学与工程学院乳品研究室。

收稿日期: 2009-07-05

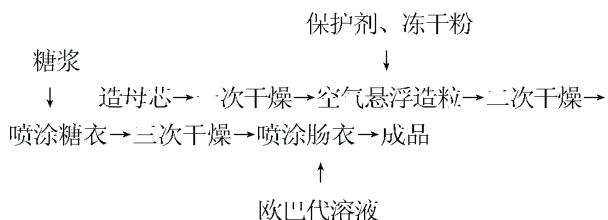
作者简介: 杨柳(1981—), 女, 助教, 硕士, 研究方向为功能性乳制品。E-mail: yangliu_2006@163.com

肠溶型欧巴代 上海卜乐康公司; 脱氧胆酸钠 中国医药上海化学试剂公司; 海藻糖、葡萄糖 南宁中诺生物工程有限责任公司; Span80 北京益利化学品有限公司; 蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉浸膏、酵母粉 北京奥博星生物技术有限责任公司; 半胱氨酸盐酸 北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

空气悬浮造粒机 Heizmedium Elektr 公司; BGB-10C 高效包衣机 中国温州市制药设备厂; 母芯造粒机 北京天民高科技开发公司; 崩解时限检测仪 天津市拓普仪器有限公司; HPX-9162MBE 数显式电热恒温干燥箱 上海博讯实业有限公司; JJ-1 精密增力电动搅拌器 金坛市江南仪器厂; TU-1810 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 复合微胶囊制备的工艺流程



1.4 操作要点

1.4.1 双歧杆菌发酵免疫牛初乳冻干粉

菌种活化: 将双歧杆菌冻干粉接入经 121℃、20min 高压灭菌的 11% 脱脂乳中, 37℃ 恒温培养, 待脱脂乳凝固后(3~4h), 连续传代 2~3 次, 使其充分活化。

镜检：待菌种充分活化后，按照革兰氏染色法染色后镜检，确定是否是纯菌种^[10]。

冻干粉的制备：免疫牛初乳以5%接种量接种双歧杆菌，凝乳4 h，加入保护剂后进行冻干制粉。

1.4.2 免疫牛初乳与双歧杆菌复合微胶囊的制备

复合微胶囊保护剂的选择：选用含量为 40g/L 的海藻糖，浓缩后的酪蛋白水解液 250ml/L，乳化剂 Span80 为 20ml/L 作为保护剂进行微胶囊的研制。

母芯的制作：母芯为蔗糖粉和可溶性淀粉的混合物，且蔗糖粉:可溶性淀粉(m/m)=7:3，母芯造粒机的参数为主机调速 80r/min、喷浆调速 110r/min、鼓风温度 27.1℃。

空气悬浮造粒：采用空气悬浮法将双歧杆菌免疫牛初乳复合冻干粉粘附在母芯上，同时通入菌体保护剂。空气悬浮造粒机控制参数为进风量、进气温度、排气温度、物料温度、喷浆速率。

干燥：采用流化床进行连续干燥，干燥条件为母粒堆积厚度3~4粒、干燥室相对湿度20%~40%、37~40℃干燥1~2h。

包糖衣：糖衣液为蔗糖溶液，且蔗糖溶液浓度为50%。

包肠溶衣：肠溶衣为醇溶性欧巴代溶液，溶解浓度为88%，包衣液浓度为15%，片芯增重15%。

流化床微胶囊化工艺参数的选择:影响空气悬浮法制备微胶囊的工艺参数主要有进风量、进气温度、排气温度、喷浆速率、物料温度等。本实验以进气温度、排气温度、喷浆速率、进风量 4 个参数为因素,每个因素取 3 个水平,并以微胶囊化效率(包埋率)为主要考察指标,结合空气悬浮造粒过程的难易程度和微胶囊制品的感官质量(粒度、气味、色泽等)等因素设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,确定最佳的空气悬浮工艺参数,因素水平表见表 1。

表1 空气悬浮工艺参数优化 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels in $L_9(3^4)$ orthogonal array design for optimizing air suspension technology

水平	A 进气温度(℃)	B 排气温度(℃)	C 喷浆速率(r/min)	D 进风量(m ³ /h)
1	40	36	4	200
2	35	30	6	250
3	45	33	8	150

1.4.3 免疫牛初乳与双歧杆菌复合微胶囊的理化指标测定

双歧杆菌活菌数：参照文献[11]的方法测定；免疫球蛋白活性：采用试管凝集法^[12-13]测定；免疫球蛋白(Ig)含量：采用紫外吸收差法^[14]测定， $Ig(mg/ml) = (OD_{280} \times 1.45 - OD_{260} \times 0.74) \times \text{稀释倍数}^{[15]}$ ；包囊效率(包埋率)：参照文献[16]的方法测定；包埋产率：参照文献[16]的方法进行测定；粒径：使用测微尺测定大量微胶的粒径后取平均值；感官质量考察：考察气味、色泽、组织状态。

2 结果与分析

2.1 流化床微胶囊化工艺参数的确定

2.1.1 进风量对微胶囊化的影响

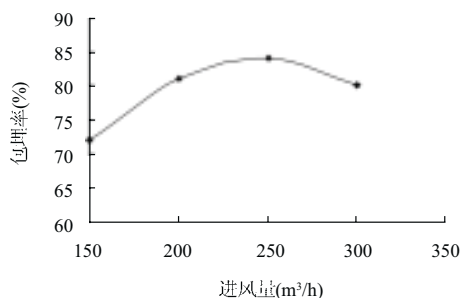


图1 不同进风量对微胶囊包埋率的影响
Fig.1 Effect of air-input capacity on embedding rate of microcapsules

分别选用进风量为 150、200、250、300m³/h, 并以包埋率为考察指标, 确定微胶囊化的最佳进风量, 结果见图 1。

从图 1 可以看出, 当进风量为 250m³/h 时, 微胶囊的包埋率最高达到 84%, 以后随着进风量的增加微胶囊的包埋率反而降低。进风量控制了囊芯物在床内的流动程度, 适当提高进风量将增加囊液与囊芯物的接触机会, 降低物料损耗, 减少物料的粘连, 有利于形成完整的微胶囊, 提高包埋率。

2.1.2 进气温度对微胶囊化的影响

分别选用进气温度为 40、45、50℃, 并以包埋率为考察指标, 确定微胶囊化的最佳进气温度, 结果见图 2。

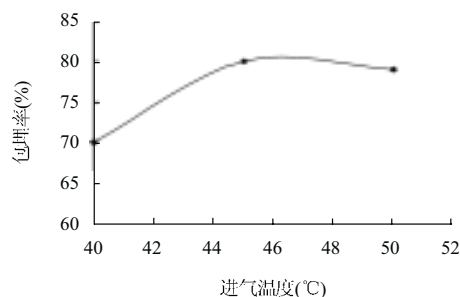


图2 不同进气温度对微胶囊包埋率的影响

Fig.2 Effect of air-input temperature on embedding rate of microcapsules

从图 2 可以看出, 当进气温度为 45℃时, 微胶囊化效率达到最高为 80%, 以后随着进气温度的升高, 微胶囊化的效率反而降低。进气温度影响到空气悬浮微胶囊化产品的颗粒结构、吸湿性和热敏性成分的稳定性。随着空气悬浮进气温度的升高, 微胶囊化效率略有上升, 但随后明显下降。这是由于过高的进气温度会使水分散失速度过快, 囊壁表面产生凹陷, 导致产品粒子表面开裂, 使已成型的微胶囊发生破裂, 引起效率显著下降, 同时还会使壁材变性, 降低其溶解性, 且加速了芯材的氧化变质, 从而降低微胶囊的质量^[5]。降低进风温度, 可防止芯材的挥发和损失, 保持粒子结构完整。结果表明进风温度在 40~50℃时比较适宜。低于 40℃, 含水率高、流动性不好、易粘壁。

2.1.3 排气温度对微胶囊化的影响

分别选用排气温度为 32、34、36、38℃, 并以包埋率为考察指标, 确定微胶囊化的最佳排气温度, 结果见图 3。

从图 3 可以看出, 当排气温度为 36℃时微胶囊化效率达到最高为 77%, 以后随着排气温度的升高, 微胶囊化的效率反而降低。排气温度影响到产品的干燥时

间, 对于微胶囊结构和水分含量有较大的影响, 排气温度应与适当的进气温度相匹配, 排气温度高, 可使微胶囊制品迅速干燥。但过高的排气温度会导致产品过度受热而开裂, 反而会影响微胶囊化效率, 降低产品质量。且温度过高也会影响到双歧杆菌及 IgG 活性。

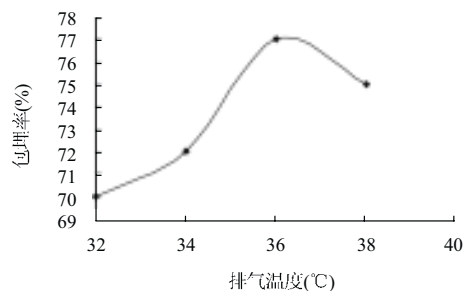


图3 不同排气温度对微胶囊包埋率的影响

Fig.3 Effect of air-release temperature on embedding rate of microcapsules

2.1.4 喷浆速率对微胶囊化的影响

喷浆速率对微胶囊的包埋率有一定的影响, 本研究采用喷浆速率分别为 4、6、8r/min, 以微胶囊的包埋率为试验指标, 确定微胶囊化的最佳喷浆速率。

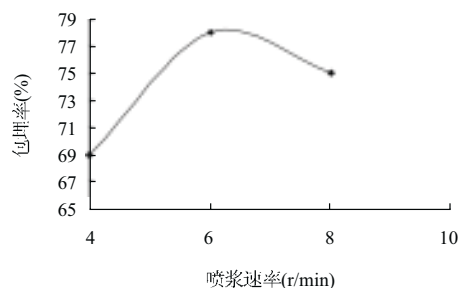


图4 不同喷浆速率对微胶囊包埋率的影响

Fig.4 Effect of gunite speed on embedding rate of microcapsules

从图 4 可以看出, 随着喷浆速率的增加, 微胶囊的包埋率逐渐增高, 当喷浆速率为 6r/min 时, 微胶囊的包埋率达到最高为 78%, 以后随着喷浆速率的增加, 微胶囊的包埋率反而降低。

2.2 正交试验对空气悬浮工艺参数的优化

选择适合的空气悬浮微胶囊化工艺参数, 可以提高复合微胶囊的包埋率, 为确定出较合理的空气悬浮工艺参数, 在单因素试验的基础上本研究做了一组正交试验, 以进气温度、排气温度、喷浆速率、进风量为 4 个因素, 每个因素取 3 个水平, 设计 L₉(3⁴) 正交试验, 并以复合微胶囊的包埋率为试验指标, 从而确定出最佳的工艺参数, 正交试验结果和分析见表 2。

表2 空气悬浮工艺参数优化 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal array design experiments for optimizing air suspension technology

试验号	A 进气温度(℃)	B 排气温度(℃)	C 喷浆速率(r/min)	D 进风量(m^3/h)	微胶囊化效率(%)
1	1(40)	1(36)	1(4)	1(200)	79.46
2	1	2(30)	2(6)	2(250)	84.50
3	1	3(33)	3(8)	3(150)	76.12
4	2(35)	1	2	3	82.38
5	2	2	3	1	71.27
6	2	3	2	1	68.81
7	3(45)	1	3	2	80.22
8	3	2	1	3	76.75
9	3	3	2	1	87.36
K_1	240.08	242.06	225.02	238.09	
K_2	222.46	232.56	254.24	233.53	
K_3	244.33	232.29	227.61	235.25	
k_1	80.03	88.69	75.00	79.36	
k_2	74.15	77.51	84.75	77.84	
k_3	81.44	77.43	75.87	78.42	
极差	7.29	3.26	9.75	1.52	

表2中各因素的极差值的大小顺序为 $C > A > B > D$, 极差值越大, 反映该因素对指标值的影响越大, 也就是说, 在空气悬浮微胶囊化工艺的4个因素中, 影响微胶囊化效率最主要的因素是喷浆速率, 进气温度次之, 然后是排气温度, 最后是进风量。最佳组合为 $A_3B_1C_3D_1$, 但从表2中可以看出包埋率最高为87.36%, 故须进行再一次的验证实验, 经证明空气悬浮微胶囊化双歧杆菌及免疫牛初乳最佳工艺参数为进气温度 45°C 、排气温度 36°C 、喷浆速率 6r/min 、进风量 $200\text{m}^3/\text{h}$ 。

2.3 产品理化指标

经测定, 微胶囊中双歧杆菌活菌数达 $6.3 \times 10^8\text{CFU/ml}$; 免疫球蛋白含量达6.4%, 活性为 2^8 ; 免疫牛初乳与双歧杆菌复合微胶囊的感官考察结果为气味纯正、微甜, 并带有牛乳的清香, 颜色呈浅绿色, 颗粒细小均匀, 具有一定的流散性, 混合性较好; 物理性质评定结果为包裹效率85.9%、包埋率19%、粒径 $0.9 \sim 1.6\text{mm}$ 。

3 结 论

3.1 采用肠溶材料欧巴代作为包衣材料, 并用空气悬浮微胶囊化的方法进行微胶囊的研制, 通过正交试验确定空气悬浮微胶囊化的最佳工艺参数为进风量 $200\text{m}^3/\text{h}$ 、进气温度 45°C 、排气温度 36°C 、喷浆速率 6r/min 。且因双歧杆菌及IgG均不耐热, 因此物料温度选择 37°C 。

3.2 本工艺得到的微胶囊产品为浅绿色圆形颗粒状、不粘连、流动性好、粒径大小基本均匀、90%以上的微粒直径均处于 $0.9 \sim 1.6\text{mm}$ 范围内。微胶囊中双歧杆菌活菌数达 $6.3 \times 10^8\text{CFU/ml}$, 免疫球蛋白含量达6.4%, 活性为 2^8 , 包埋率达85.9%。

参考文献:

- [1] 张和平, 郭军著. 免疫乳: 科学与技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [2] 江吉东, 王艳玲, 杨国宇, 等. 免疫乳研究概述和最新研究进展[J]. 动物科学和动物医学, 2004, 21(10): 1-3.
- [3] 郭木林. 功能性乳制品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [4] 李国强. 抗哮喘病免疫乳的研究[D]. 天津: 天津商学院, 2003.
- [5] RASIC J L. Bifidobacteria and their Role[M]. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 1983.
- [6] 杜敏, 南庆贤, 龚海岩, 等. 双歧杆菌及其保健机理[J]. 食品与发酵工业, 1995, 21(2): 81-83.
- [7] 王占武, 张旻. 双歧杆菌与人体健康[J]. 中国乳品工业, 1996, 24(1): 24-27.
- [8] HILL M T, GROWTHER S, DRASAR B S, et al. Bacteria and etiology of cancer of large bowel[J]. Lancet, 1971, 14: 95-100.
- [9] 田洪涛, 张柏林, 贾英民. 双歧杆菌与人体胃肠道微生态[J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 84-86.
- [10] POTHAKAMURY U R, BARBOSA-CANOVAS G V. Fundamental aspects of controlled release in foods[J]. Trends in Food Science and Technology, 1995, 6(12): 399-406.
- [11] 唐宝英, 朱晓慧, 刘佳. 双歧杆菌高剂量微囊技术的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003(4): 94-95.
- [12] 王春风. 抗人轮状病毒和大肠杆菌免疫奶的研制[D]. 长春: 吉林农业大学, 1997.
- [13] 何昭阳. 病原细菌检验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1986.
- [14] 周鹏, 郑为宪. 食品中常用的微胶囊技术开发及应用[J]. 食品研究与开发, 2001, 2(1): 25-27.
- [15] 何昭阳, 胡桂学, 王春风. 动物免疫学试验技术[M]. 长春: 吉林科技出版社, 2002.
- [16] 曹永梅, 许时婴, 张灏. 肠溶性双歧杆菌微胶囊的制备[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(2): 71-74.