

两歧双歧杆菌菌株制剂的研究

II. 两歧双歧杆菌及其嗜酸乳杆菌、粪链球菌干燥菌粉胶囊的制备

钱旭初 陈彬华* 陈忆恩* 张旭帆** 黄月琴* 胡坚

(江苏省微生物研究所, 无锡)

摘要 用两歧双歧杆菌发酵液和嗜酸乳杆菌、粪链球菌发酵液经离心沉淀、真空干燥等步骤制备成混合干燥菌粉, 其每克活菌数含量达 10^{11} 。经室温存放 3 个月后, 活菌数仍可在 10^7 /g 以上, 在冰箱中存放则时间更长。这种菌粉具有较好的稳定性和实用价值。

关键词 两歧双歧杆菌; 嗜酸乳杆菌; 粪链球菌; 干燥菌粉; 胶囊

双歧杆菌制剂大多以发酵乳等液体剂型作为商品供应市场, 但货架时间较短, 经贮存一周后活菌数显著减少。为了延长保存时间和用户使用方便, 国外已制成干燥菌粉作为食品添加剂或药剂, 并同时合并乳酸杆菌和乳链球菌作成混合菌制剂供应市场^[1]。本研究将两歧双歧杆菌发酵液制成活性干燥菌粉, 同时分别将嗜酸乳杆菌、粪链球菌发酵液同样制成干燥菌粉, 三者等量拌匀成混合菌粉, 制成胶囊制剂后。经室温存放三个月, 活菌数仍能保持在 10^6 ~ 10^7 /g 以上; 在冰箱保存则时间更长。现将制备过程叙述如下。

材料和方 法

1. 发酵液制备: 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium Bifidum*) 由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所分离和鉴定; 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus Acidophilus*) 和粪链球菌 (*Streptococcus Faecalis*) 由日本岐阜药科大学北村二郎教授寄赠。双歧杆菌发酵方法详见本研究报告 I^[2]。乳杆菌和链球菌为普通发酵或厌氧发酵, 三者分别发酵, 所用培养液相同。如

将三种细菌混合发酵时, 取三种菌种子液作等量混合接种, 使最终浓度仍为 10%。然后进行厌氧培养, 培养液成份相同。

2. 干燥菌粉制备: 将三种发酵液分别经 4000r/min 离心沉淀 30 分钟, 弃上清, 取湿沉淀加入等量灭菌玉米淀粉, 均匀搅拌, 15 目过筛后, 双歧杆菌湿粉置真空干燥箱中在室温抽真空 - 760mmHg, 直至菌粉完全干燥; 嗜酸乳杆菌和粪链球菌湿粉用鼓风干燥, 37℃ 历时 2—3 小时至完全干燥。然后分别取样测定活菌数和含水量, 再将三种菌粉进行等量均匀搅拌成混合菌粉。

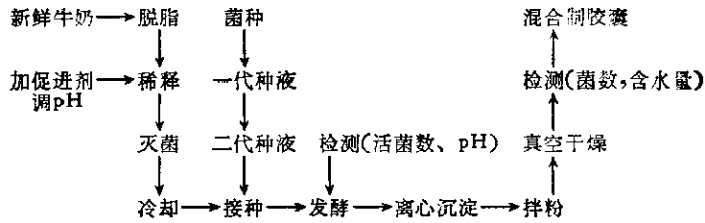
3. 胶囊制备: 将已制备的混合菌粉无菌操作分装胶囊, 每粒含混合菌粉 200mg, 总菌数为 10^{11} /g, 以 100 粒胶囊瓶装或密封塑料袋装即为成品。

4. 三种细菌发酵和菌粉制备工艺流程

本工作承刘秉阳教授指导, 特此致谢。本研究还承陈立予教授、孙志浩副研究员和刘天富总工程师、朱龙根副厂长等支持和帮助, 一并致谢。

* 上海信谊药厂。

** 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所。



5. 干燥菌粉的检测

(1) 活菌数检测方法与发酵液相同, 采用平板法^[2,3]。称取 1g 干粉加入 9ml PBS 液中溶解, 然后作 10 倍连续稀释。

(2) 含水量测定: 分别称取三种菌粉在 105°C 烘干 4 小时后再称重, 然后计算出干粉中的含水量。

结果和讨论

(一) 干燥菌粉中的活菌数

发酵液中双歧杆菌数每 ml 在 10^{10-11} 左右。嗜酸乳杆菌和粪链球菌每 ml 约 10^{11-12} 。双歧杆菌发酵液经离心沉淀、分散搅拌和减压干燥等工序处理制成干燥粉剂后, 每克干粉中活菌数降到 10^6 左右, 菌量损失较大。嗜酸乳杆菌和粪链球菌因耐氧能力较强, 虽经制粉各工序, 而细菌损耗较少, 因此菌粉中的活菌数比双歧杆菌多, 每克干粉活菌数可达 10^{8-9} 左右。

(二) 干燥菌粉的稳定性试验

为使干燥菌粉中的活菌数能较持久稳定, 曾试用各种淀粉类分散剂和不同组合形式进行几十次摸索试验, 发现可溶性淀粉、玉米淀粉和环状糊精等分散剂能使细菌存活较持久。将制

成的菌粉分别存放在室内 (15—20°C) 和冰箱 (4—10°C) 中保存, 然后定时取样检测菌量以观察干粉中活菌的稳定性。

1. 试验结果表明, 双歧杆菌单菌粉在室温中保存 3 个月以后, 活菌数虽有下降, 但仍能维持在 10^6 /g 的水平上。在冰箱中保存 10 个月以后, 菌量还在 10^6 /g 以上(表 1)。据报道, 发酵液中的活菌数在 10°C 保存 10 天, 即从 10^{7-3} /ml 下降到 10^{4-3} /ml^[4]。因而显示出双歧杆菌在干粉中要比在发酵液中稳定, 存放在冰箱中更稳定。

2. 将双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和粪链球菌同时分别制成三种单菌粉以及将它们等量拌匀成混合菌粉, 同时检测四种菌粉的稳定性。结果表明三种菌粉保存 3 个半月后, 仍都能保持相对稳定性。我们用乳酸菌培养基和 GAM 培养基二种平板同时检测比较, 结果较为近似(表 2)。

3. 将三种细菌进行混合发酵, 分别用可溶性淀粉和玉米淀粉作分散剂, 制成混合菌粉, 在室温中保存 106 天 (3 个半月) 和冰箱中保存 276 天(9 个月)后, 活菌数均能维持在 10^6 /g 以上(表 3)。表 3 表明, 在冰箱中比室温中更为稳定。但是这种混合发酵的缺点是难以控制菌

表 1 两歧双歧杆菌以可溶性淀粉作分散剂制成干燥菌粉在室温和冰箱中保存试验结果

保存天数	室温(活菌数/g)	冰箱(活菌数/g)	保存天数	室温(活菌数/g)	冰箱(活菌数/g)
0	5.7×10^7		110	未做	4.3×10^6
8	1.7×10^7	4.8×10^4	140	同上	3.2×10^5
16	5.7×10^6	3.5×10^7	168	同上	5.0×10^6
21	1.8×10^6	1.0×10^7	183	同上	3.6×10^6
35	2.2×10^6	6.0×10^7	205	同上	2.3×10^7
44	1.3×10^5		230	同上	2.9×10^6
58	3.3×10^6	$> 10^7$	261	同上	2.1×10^6
71	1.4×10^7	1.0×10^7	293	同上	3.2×10^6
86	1.2×10^5	2.0×10^7	338	同上	5.3×10^6

表 2 用玉米淀粉制备的四种菌粉、在室温和冰箱保存后的稳定性

保存时间和条件	菌粉种类	乳酸菌琼脂(活菌数/g)	GAM 琼脂(活菌数/g)
菌粉制备时菌量	Mixt**	1.3×10^9	1.9×10^8
	S. f.	9.8×10^8	4.6×10^8
	L. a.	1.3×10^8	6.0×10^7
	B. b.	—*	3.1×10^6
室温保存 33 天	Mixt	2.4×10^8	2.7×10^8
	S. f.	5.1×10^7	2.5×10^7
	L. a.	1.9×10^7	1.3×10^7
	B. b.	—	未计数
冰箱保存 59 天	Mixt	8.1×10^7	1.3×10^8
	S. f.	7.1×10^7	2.6×10^8
	L. a.	4.4×10^7	2.8×10^7
	B. b.	—	3.1×10^6
室温保存 76 天	Mixt	1.0×10^8	1.2×10^8
	S. f.	8.1×10^7	6.4×10^7
	L. a.	1.7×10^7	2.2×10^7
	B. b.	—	1.2×10^6
冰箱保存 102 天	Mixt	5.6×10^7	3.0×10^7
	S. f.	9.6×10^6	1.5×10^7
	L. a.	5.0×10^7	1.6×10^7
	B. b.	—	1.8×10^6
室温保存 102 天	Mixt	7.7×10^7	3.9×10^7
	S. f.	3.8×10^7	5.0×10^7
	L. a.	6.0×10^6	8.9×10^6
	B. b.	—	1.4×10^6

* 双歧杆菌在乳酸菌培养基上生长不好。

** Mixt: 混合; S. f. 粪链球菌; L. a. 嗜酸乳杆菌; B. b. 双歧杆菌。

表 3 三种细菌混合发酵液制成混合菌粉在室温和冰箱保存后的稳定性

保存时间 (d)	分散剂和保存条件	乳酸菌琼脂(活菌数/g)	GAM 琼脂(活菌数/g)
菌粉制备时	可溶性淀粉	$>10^8$	4.9×10^8
	玉米淀粉	$>10^8$	6.5×10^8
43	可溶性淀粉(室)	3.1×10^7	1.1×10^7
	可溶性淀粉(冰)	1.0×10^7	1.1×10^7
	玉米淀粉(室)	5.1×10^7	3.1×10^7
	玉米淀粉(冰)	1.2×10^7	3.0×10^7
78	可溶性淀粉(室)	3.1×10^7	7.2×10^7
	可溶性淀粉(冰)	4.3×10^7	4.2×10^7
	玉米淀粉(室)	1.6×10^7	3.0×10^7
	玉米淀粉(冰)	6.4×10^7	3.3×10^7
106	可溶性淀粉(室)	2.3×10^8	4.5×10^8
	可溶性淀粉(冰)	4.4×10^7	9.8×10^7
	玉米淀粉(室)	1.8×10^8	2.0×10^8
	玉米淀粉(冰)	6.7×10^7	5.4×10^7
176	可溶性淀粉(冰)	4.5×10^7	4.6×10^7
	玉米淀粉(冰)	1.3×10^8	5.4×10^7
276	可溶性淀粉(冰) 玉米淀粉(冰)		4.4×10^8

量上的平衡^[5]。因为三种细菌在同一培养液中生长速度不尽相同,因此菌量也不会相同。这

就很难掌握三种细菌的实际菌数,所以此法不适宜于大批量生产。

小 结

4. 如将表 1—3 的结果以活菌数为纵座标和保存时间为横座标,即可分别绘成曲线,从中可以看出无论是单菌粉或是混合菌粉在室温和冰箱中保存后,活菌数量缓慢下跌。粪链球菌稳定性最好,嗜酸乳杆菌次之,双歧杆菌稳定性最差。这一结果和国外产品基本相似。

(三) 影响菌粉稳定性的因素

1. 菌粉中的分散剂: 日本资料^[6]认为淀粉类等碳水化合物和某些蛋白类物质与双歧杆菌相混合能起到保护层作用。不同种类的淀粉对双歧杆菌的稳定性不尽相同,他们认为马铃薯淀粉和玉米淀粉为最佳。本实验试用过 7—8 种淀粉类物质,发现玉米淀粉、可溶性淀粉和环状糊精对双歧杆菌的稳定性较好,但环状糊精价格昂贵,不适用于大批量生产。

2. 菌粉中的含水量: 据日本和法国专利介绍^[6,7],菌粉中的含水量必须控制在 4% 以下,0.2—1% 最好。含水量超过 5% 时,细菌死亡率上升。分散剂本身湿度愈小,对细菌存活愈有利。

1. 将发酵液通过离心沉淀。分散搅拌和真空干燥等工序制成两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和粪链球菌的单菌粉及其混合菌粉。每克干燥菌粉中活菌数分别为: 两歧双歧杆菌约 10^{6-7} 左右,嗜酸乳杆菌和粪链球菌约 10^{8-9} 左右。

2. 保存试验结果表明,制成的干燥菌粉具有较好的稳定性,经室温保存 3 个月活菌数能维持在 $10^6/g$ 以上,在冰箱中保存则时间更长。因此,双歧杆菌和其他乳酸菌制成的干燥菌粉具有较大的实用意义。

3. 为用户使用方便,将混合菌粉制成胶囊剂型。

参 考 文 献

1. 包启安: 食品科学, **3**(1): 1—7, 1981.
2. 钱旭初等: 微生物学通报, **17**(2): 96—98, 1999.
3. 李忠元等: 中华流行病学杂志, **4**(3): 181—184, 1983.
4. 马田三夫: 新食品工业, **24**(1): 63—70, 1982.
5. 小此木成夫等: 公开特许公报(A) JP., 59-88085, 1984.
6. 丸山哲彦等: 公开特许公报(A) JP., 58-149675, 1983.
7. 法兰西专利: 法国工业产权公报, 第 8106885 号, 1981.