

基于微囊包埋制备益生菌口含片的工艺研究

郑文颖, 李逸佳, 庞心玥, 吴丽艳*

珠海科技学院药学与食品科学学院, 广东 珠海

收稿日期: 2022年7月11日; 录用日期: 2022年7月27日; 发布日期: 2022年8月12日

摘要

本项目通过分析目前比较热门的可使用益生菌种类, 对其进行筛选、培养与组合, 选用了干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌两种目标菌种, 研制出一种包含目的菌种, 可以促进人们口腔健康和调节肠道菌群的益生菌口含片。该口含片既可以满足消费者品尝口含片的快感, 又可以使口腔变得健康, 肠道消化功能变得更好。本项目采用鼠李糖乳杆菌和干酪乳杆菌两种益生菌进行包埋和制片, 并对这两种益生菌对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌两种致病菌的抑制作用进行探究。经过实验分析, 两种益生菌对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有较好的抑制作用, 且干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌相互无拮抗作用, 符合预期口含片的制备。为了保护益生菌在口腔和胃部中不被其中的各类酶或其他化学物质降解及实现其在小肠上释放, 实验以可溶性淀粉吸附益生菌, 再将其包埋入海藻酸钠和氯化钙、壳聚糖组成的外壁里, 得到载运益生菌的淀粉微胶囊, 在10x显微镜下观察到菌种已被包埋进微胶囊中, 最后加之辅料制备成片剂。

关键词

益生菌, 包埋技术, 微胶囊, 口含片

Process Study on the Preparation of Probiotic Oral Tablets Based on Microencapsulation

Wenyong Zheng, Yijia Li, Xinyue Pang, Liyan Wu*

School of Pharmacy and Food Science, Zhuhai College of Science and Technology, Zhuhai Guangdong

Received: Jul. 11th, 2022; accepted: Jul. 27th, 2022; published: Aug. 12th, 2022

Abstract

In this project, by analyzing the current relatively popular species of usable probiotics, screening,

*通讯作者。

文章引用: 郑文颖, 李逸佳, 庞心玥, 吴丽艳. 基于微囊包埋制备益生菌口含片的工艺研究[J]. 药物化学, 2022, 10(3): 257-264. DOI: 10.12677/hjmce.2022.103026

culturing and combining them, two target species of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* were selected, and a probiotic oral tablet containing the species of interest can promote people's oral health and regulate the intestinal flora. This buccal tablet serves both to satisfy the pleasure of the consumer in tasting the buccal tablet and to make the mouth healthier and the gut digestive function better. Two probiotics, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*, were used for embedding and tableting in this project, and the inhibitory effects of these two probiotics on two pathogenic bacteria of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were also investigated. After experimental analysis, both probiotics showed better inhibitory effects on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* had no antagonistic effect on each other, which was in accordance with the expected preparation of the buccal tablets. To protect the probiotic bacteria from degradation by various types of enzymes or other chemicals in the mouth and stomach and achieve their release on the small intestine, experiments have adsorbed the probiotic bacteria from soluble starch, which was then embedded into the outer wall consisting of sodium alginate and calcium chloride, chitosan, to obtain the probiotic loaded starch microcapsules, under the 10x microscope, it was observed that the species have been embedded into the microcapsules, and finally, the excipients were prepared as tablets.

Keywords

Probiotics, Encapsulation Technology, Microcapsules, Oral Tablets

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

益生菌作为人和动物体内不可缺少的重要生物菌群，具有重要的生理功能。随着生活水平的提高，人们对保健类食品的消费意向更加明显。益生菌也成为人们调节肠道健康和减少胃肠疾病的重要生物调节剂。它具有快速的短期效应，例如防治急慢性腹泻、便秘，改善胃肠功能等功能；它还具有积极的长期作用，如降低人体内毒素水平，改善肝病症状，改善抗病毒、抗肿瘤能力强[1]。

为了保护益生菌的实际效果，本项目设计了以可溶性淀粉吸附益生菌，用包埋法制得的固定化细胞可以达到较高的细胞浓度。此法操作时条件温和，对活细胞损伤小，机械强度高，固化、成形方便，对微生物毒性小，催化活性保留和存活力都较高[2]。再将其包埋入海藻酸钠和氯化钙、壳聚糖组成的外壁里，得到载运益生菌的淀粉微胶囊，再通过制软材、制粒、压制成片，获得一种用于肠道保健的益生菌口含片。

2. 材料与仪器

2.1. 实验菌种

金黄色葡萄球菌，大肠杆菌，干酪乳杆菌，鼠李糖乳杆菌，四种菌种均从 CGMCC 购买。

2.2. 实验试剂

蛋白胨(北京奥博星生物技术有限公司 AOBX01-001BR)、牛肉膏、酵母膏、柠檬酸氢二铵、琼脂、柠檬酸钠、酒石酸、硬脂酸镁、乙酸钠、磷酸氢二钾、海藻酸钠、壳聚糖、可溶性淀粉、吐温-80、糊精(均购于广东环凯有限公司)、1 mol/L 50%葡萄糖溶液、0.5 mol/L 10%硫酸镁、硫酸锰、蒸馏水。

2.3. 实验仪器

安泰 BSC-1304IIA2 生物超净工作台; 上海博讯 HH.S21-4 恒温水浴锅; 上海博讯 SHZ-B 水浴振荡器; 上海奥豪斯 FC-5076 离心机; 赛多利斯集团 SECURA 224 电子天平; 北京普析通用 T6 紫外分光光度计; 南京江南永新光学有限公司 BM2000 显微镜; 北京松源华兴科技发展有限公司 LGJ-10 冻干机; 上海申安 LDZF-50KB-III 灭菌锅; 赛洛捷克 MS-H280-PRO 磁力搅拌器; 广州广思腾贸易有限公司 ZPS008 智能旋转压片机; 上海博讯 BSD-TX345 恒温气浴摇床(台式摇床); 上海一恒 DHG-9123A 电热鼓风干燥箱。实验仪器均由珠海科技学院药学与食品科学学院学生大创实验室提供。

3. 工艺制备方法

3.1. 培养基的制备

MRS 液体培养基: 蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 10.0 g、酵母膏 5.0 g、柠檬酸氢二铵 2.0 g、葡萄糖 20.0 g、吐温-80 1.0 mL、乙酸钠 5.0 g、磷酸氢二钾 2.0 g、硫酸镁 0.58 g、硫酸锰 0.25 g、琼脂 18.0 g, 定容至 1000 ml, 调 pH6.2~6.6。搅拌后加热, 煮沸两分钟, 在 121℃ 温度下灭菌 30 min。

MRS 固体培养基: 在 MRS 液体培养基基础上加入 1.5% 的琼脂。培养基需要 200 ml, 按原料的 2/10 即可, 分装到 2 个平板中。

营养肉汤培养基: 蛋白胨 2 g, 牛肉膏 0.6 g, 氯化钠 1 g, 蒸馏水 200 ml, 配置 250 ml 烧杯中, 分装各 50 ml 于两个 100 ml 锥形瓶中, 灭菌处理。

3.2. 菌种活化和大量培养

在适量试管中分别装入 1/2 体积的 MRS 液体培养基, 包扎后进行高压蒸汽灭菌, 待冷却至室温。用手温将鼠李糖乳杆菌和干酪乳杆菌融化, 用移液枪各吸取 0.6 ml 于 18 mm × 180 mm 的两个试管中, 再取 0.1 ml 接种于已经灭菌的试管中, 在 37℃ 恒温培养箱培养 24 小时。将灭菌后的固体培养基倒入平皿中, 待冷却后, 用接种环进行平面划线, 于 37℃ 恒温箱培养 48 小时[3]。供抑菌实验和拮抗实验使用。

在适量 15 mm × 150 mm 的试管中分别装入 1/2 体积的 MRS 液体培养基, 包扎后进行高压蒸汽灭菌, 待冷却至室温, 分别加入 0.1 ml 的干酪乳杆菌菌液和鼠李糖乳杆菌菌液, 37℃ 培养 24 h 后转至锥形瓶大量培养(需用封口膜封住锥形瓶口, 避免氧气过量), 同样 37℃ 培养 24 h, 供包埋使用, 如图 1 所示。

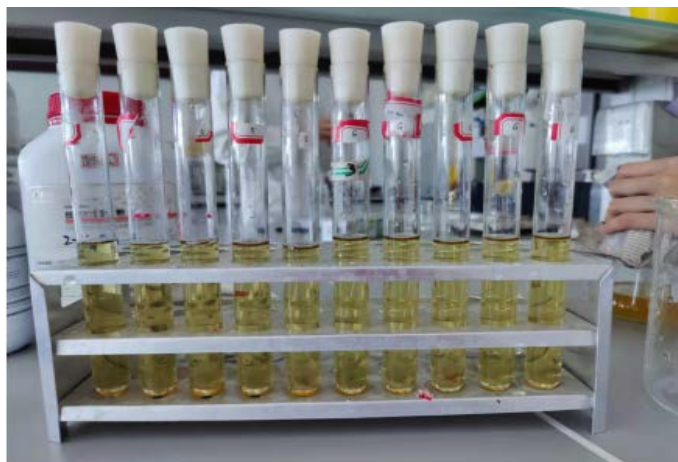


Figure 1. MRS liquid culture medium chart
图 1. MRS 液体培养基图

将大肠杆菌和金黄葡萄球菌在室温下融化，再取 1 ml 培养液加入已灭菌的营养肉汤培养基，于摇床 37℃ 下培养 24 小时，如图 2 所示。



Figure 2. Nutrient broth culture medium chart
图 2. 营养肉汤培养基图

3.3. 干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌培养情况

Table 1. Growth of two probiotics

表 1. 两种益生菌生长情况

菌	干酪乳杆菌	鼠李糖乳杆菌
特性	革兰氏阳性，不产芽孢，无鞭毛，不运动，兼性异型发酵乳糖	兼性厌氧耐酸、不产芽孢的一种革兰氏阳性益生菌。
培养条件	最适生长温度为 37℃	最适生长温度 39℃，最适 pH 为 6
形态特征	白色，圆形，表面光滑湿润，边缘整齐、凸起的菌落。	在 MRS 琼脂培养基中生长呈大的、奶油白色菌落，且散发奶油味。

如表 1 所示，平板划线观察干酪乳杆菌为乳白色颗粒圆球状，鼠李糖乳杆菌为乳白色，呈现片状生长的形态；显微镜观察干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌均为杆状，但干酪较长，鼠李糖较短。观察如图 3、图 4 所示。

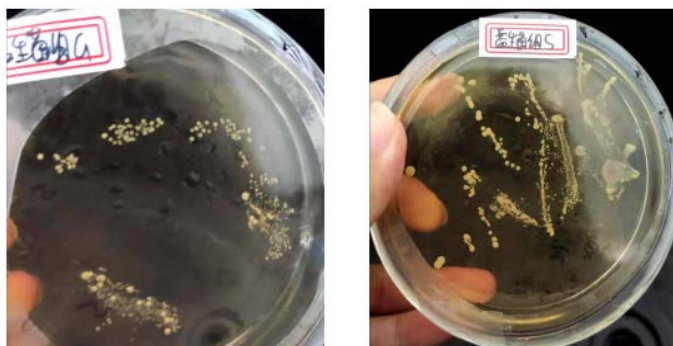


Figure 3. Two probiotic plate morphology diagrams (*Lactobacillus casei* on the left, *Lactobacillus rhamnosus* on the right)

图 3. 两种益生菌平板形态图(左为干酪乳杆菌，右为鼠李糖乳杆菌)

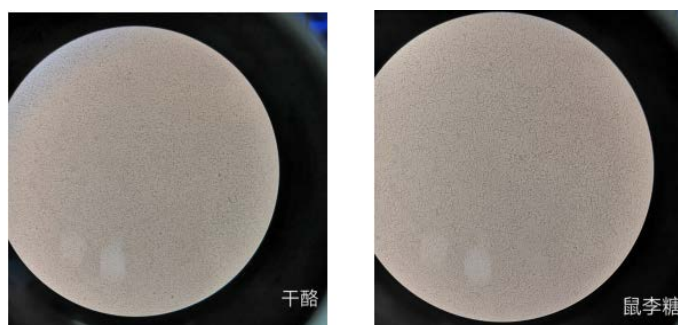


Figure 4. Microscopic morphology of two probiotics (*Lactobacillus casei* on the left, *Lactobacillus rhamnosus* on the right)

图 4. 两种益生菌显微镜下形态图(左为干酪乳杆菌, 右为鼠李糖乳杆菌)

3.4. 益生菌拮抗实验

将干酪乳杆菌稀释后取 1 mL 稀释液于灭菌的平皿中, 倒入 MRS 培养基混匀待凝固后, 再将鼠李糖乳杆菌接于凝固的平板上, 将平板倒置于 37°C 培养箱培养, 2 d 后观察实验结果, 实验现象表明这两个菌株相互交叉, 生长良好, 表明每个菌株可以共存并相互作用它们之间没有拮抗作用, 没有拮抗反应的菌株可以混合培养[4], 如图 5 所示。

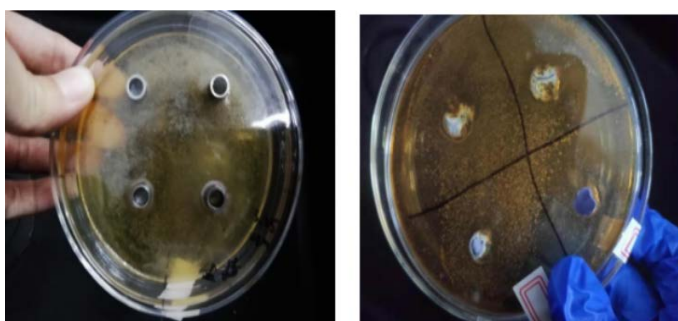


Figure 5. Two probiotic antagonism experimental graph (front and back view of perforated plate)

图 5. 两种益生菌拮抗实验图(打孔平板正反图)

3.5. 益生菌抑菌实验

利用待测药物在琼脂平板中扩散使其周围的细菌生长受到抑制而形成透明圈, 即抑菌圈, 根据抑菌圈大小判定待测药物抑菌效价的一种方法[5]。

配置营养肉汤固体培养基, 高温灭菌后, 待培养基稍冷时分别加入大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 倒于培养皿中。待凝固后用打孔器打孔, 取出多余培养基后, 分别加入干酪乳杆菌菌液和鼠李糖乳杆菌菌液 0.1 mL, 外加生理盐水作为对比。一段时间后观察培养基中菌落生长状况。实验观察到抑菌圈出现被污染现象, 证明两种菌种抑菌效果良好, 如图 6 所示。

3.6. 微胶囊制作

取适量 7% 预胶化淀粉溶液, 加入适量菌液, 配成一系列药辅质量比为 1:3 的混合液, 放入 30°C 恒温水浴振荡器里吸附 60 min, 设定好转速, 之后与 20 g/L 海藻酸钠 10 mL 搅动均匀, 取 10 g/L 壳聚糖和 15 g/L 氯化钙各 25 mL 搅拌均匀并调节 pH 为 5 [6]。用齿轮泵将预胶化淀粉、菌液与海藻酸钠混合液匀

速泵入装有壳聚糖、氯化钙的烧杯里，静置 20 min 后过滤并水洗，离心后的沉淀冷冻干燥即得微胶囊，取部分已微胶囊于烧杯中，并加入适量柠檬酸钠溶液使微胶囊溶解镜检，如图 7、图 8 所示。

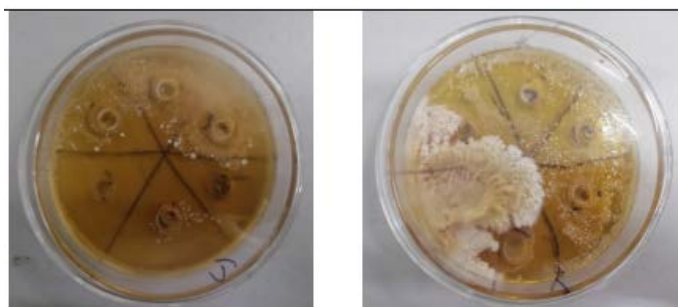


Figure 6. Two kinds of probiotics anti-bacterial effect chart (comparison diagram before and after bacterial contamination)

图 6. 两种益生菌抑菌效果图(菌种污染前后对比图)

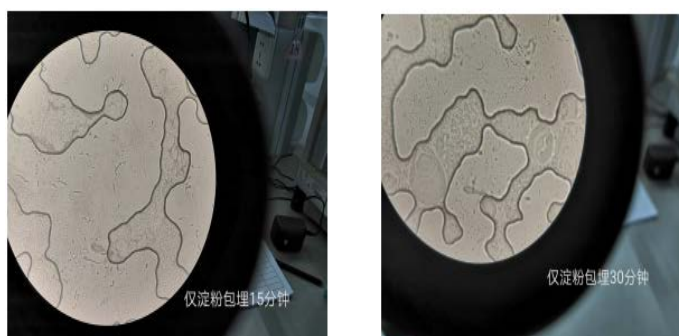


Figure 7. Only starch-embedded pre-experiment observation phenomenon graph (comparison diagram of embedding for 15 minutes and 30 minutes)

图 7. 仅淀粉包埋预实验观察现象图(包埋 15 分钟和 30 分钟对比图)

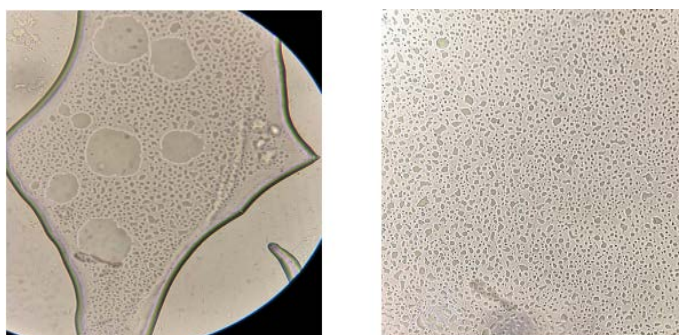


Figure 8. Microscopic phenomenon of probiotic microcapsules (observed under 10× microscope)

图 8. 益生菌微胶囊显微镜下现象图(10 倍镜下观察)

3.7. 口含片的制备

【处方】微胶囊 20 g

糊精 12 g

淀粉 8 g

酒石酸 0.4 g
 硬脂酸镁 0.4 g
 乙醇(50%)适量
 100 片量(0.4 g/片)

称取规定量微胶囊、淀粉、糊精混合均匀。将酒石酸溶于 50%乙醇(润湿剂)中,按适宜量一次性加入混合粉末中,加入时分散面要大,混合均匀,制成软材,通过 18~20 目尼龙筛制成湿粒,60℃以下干燥,近干时可升至 70℃以下,加速干燥,干粒水分控制在 1.5%以下。以制湿粒时同目筛整粒,筛出干粒中细粉与大颗粒,观察外观,调试压片机压片。在适量试管中分别装入 1/2 体积的 MRS 液体培养基,包扎后进行高压蒸汽灭菌,待冷却至室温。用手温将鼠李糖乳杆菌和干酪乳杆菌融化,如图 9 所示。



Figure 9. Finished probiotic oral tablets
 图 9. 益生菌口含片成品

3.8. 口含片感官评分

本试验评分办法采取 6 位随机同学组成评分小组,从产品的质地色泽、气味持香性、口感、咀嚼时间进行感官评定评分。因试验各因素的影响程度不同,所以各因素在评分中所占比例也不同。按百分制:外观形态占 10 分,气味占 10 分,口感占 20 分,香味占 20 分,香味持久性占 10 分,耐咀嚼程度占 30 分[7]。结果如表 2 所示。

感官指标:

- 1) 质地: 表面光滑,质地均匀;
- 2) 色泽: 糖体外观完美,色泽均匀;
- 3) 口感: 不糊口,不粘牙,软硬适中;
- 4) 气味持香性: 香气适中,无异味;
- 5) 耐咀嚼程度: 作为可食用型口香糖,咀嚼程度应适中。

Table 2. Probiotic oral tablets sensory rating scale

表 2. 益生菌口含片感官评分表

实验号	质地(10分)	色泽(10分)	口感(10分)	气味持香性(40分)	耐咀嚼程度(30分)	综合评分(100分)
1	9	8	10	37	28	92

Continued

2	9	7	9	36	28	89
3	9	9	9	35	27	89
4	8	9	8	35	26	86
5	9	9	10	38	29	95
6	8	9	9	38	29	93

4. 实验过程不足

已有研究表明干酪乳杆菌能对致病性大肠埃希氏菌起到抑制作用，其机制是共凝现象。但采用鼠李糖乳杆菌单一菌液、干酪乳杆菌单一菌液、以及两种益生菌不同比例混合菌液，在预实验中用杯碟法进行益生菌与致病菌拮抗实验，未得理想的抑菌效果，可能原因为用菌液代替抗生素注入到牛津杯中，但菌液所需营养成分不足或生长环境不适合产生抗菌物质，导致了抑菌结果的不理想。后改进抑菌实验，采用打孔器代替牛津杯进行实验，得到了较好的结果。

5. 结论

本项目采用鼠李糖乳杆菌和干酪乳杆菌两种益生菌进行包埋和制片，并对这两种益生菌对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌两种致病菌的抑制作用进行探究。考虑到益生菌的存活率是影响效果的关键，对其进行微囊包埋，给益生菌提供了一个强大的保护层，使其能够避免外界造成的损伤。淀粉溶液与菌液混合时，将淀粉溶液中滴入菌液，使淀粉溶液更好地将菌体包住，而且使用磁力搅拌器来适当延长搅拌时间和控制搅拌力度，得到了较好的多包埋效果。最后将微囊和片剂辅料混合，使用片剂制备工艺制备出一种益生菌口含品，经六名随机同学进行口含片感官评分，总体评价较好。

致 谢

感谢珠海科技学院药学与食品科学学院吴丽艳老师以及其他项目成员的指导和帮助。感谢基金资助珠海科技学院大学生创新训练项目“基于包埋技术制备益生菌口香糖的工艺研究”项目编号：DC2020070。

基金项目

珠海科技学院大学生创新训练项目“基于包埋技术制备益生菌口香糖的工艺研究”项目编号：DC2020070。

参考文献

- [1] 李来酉. 双歧杆菌等三联益生菌培养条件及微囊化的研究[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [2] 段海明. 海藻酸钠固定化细菌对毒死蜱的降解特性[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(12): 1636-1642.
- [3] 许丽娟, 王震, 吴迎奔, 陈薇, 尹红梅, 刘惠知. 除臭微生物单株及混合培养对生物量的影响[J]. 广东农业科学, 2018, 45(7): 68-72. <https://doi.org/10.16768/j.issn.1004-874X.2018.07.011>
- [4] 韩梅, 李丽娜, 魏冉, 彭帅, 韩晓日. 混合培养提高菌株解磷解钾能力的探讨[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(5): 74-77.
- [5] 谭才邓, 朱美娟, 杜淑霞, 姚勇芳. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. 食品工业, 2016, 37(11): 122-125.
- [6] 刘天棋, 张根义. 淀粉微胶囊对茶多酚的载运及其对餐后血糖反应的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(8): 1-9.
- [7] 孙宏伟, 冯雁波, 董爱荣, 曹俊平, 任洪婷, 刘雪峰. 阿里红口香糖的制作工艺研究[J]. 中国食用菌, 2016, 35(3): 58-64. <https://doi.org/10.13629/j.cnki.53-1054.2016.03.013>