

海藻酸钠二次包衣对益生菌微胶囊包埋效果的影响研究

邹强¹, 梁华忠², 吴梦佳¹, 刘达玉¹, 王卫¹, 李翔^{1*}

(1. 成都大学生物产业学院, 食品加工和应用四川省高校重点实验室, 四川成都 610106;

2. 四川高福记生物科技有限公司, 四川成都 610106)

摘要:为了考察海藻酸钠二次包衣对两歧双歧杆菌F-35包埋效果的影响, 本研究分别制备得到了海藻酸钠微胶囊(AL-M)、蛋白质微胶囊(WP-M)和海藻酸钠二次包衣的微胶囊(AL-CM), 并从三个方面(壁材降解速度、益生菌释放速度和益生菌存活情况)对这三种微胶囊在连续模拟胃肠液环境下的降解进行了比较。结果表明, 海藻酸钠二次包衣能够显著降低胃蛋白酶对乳清蛋白的降解作用。相比于AL-M和WP-M, AL-CM会延缓两歧双歧杆菌F-35在模拟肠液中的释放速率, 并且在连续的模拟胃肠道中经过二次包以后的微胶囊中对两歧双歧杆菌F-35保护效果最好, 两歧双歧杆菌F-35最终的存活率高达51.0%。

关键词:海藻酸钠, 二次包衣, 蛋白质, 微胶囊, 两歧双歧杆菌

The influence of double-coating on the effectiveness of probiotic microcapsules

ZOU Qiang¹, LIANG Hua-zhong², WU Meng-jia¹, LIU Da-yu¹, WANG Wei¹, LI Xiang^{1*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. Si Chuan Gao Fu Ji Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 610106, China)

Abstract: In order to evaluate the influence of double-coating using alginate on the effectiveness of probiotic microcapsules, this study prepared three different microcapsules: alginate microcapsules, protein microcapsules, alginate-coated microcapsules, and compared these three microcapsules in three aspects, including: degradation rate of coating material, release rate of microencapsulated probiotics and survival rate of microencapsulated probiotics. The results showed that the outer alginate membrane could significantly reduce the degradation rate of pepsin on whey protein matrix. Beside, the coated microcapsules could delay the release rate of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in simulated intestinal juice, but they provided the best protection for microencapsulated cells in sequential simulated gastrointestinal juice, the survival rate was up to 51.0%.

Key words: alginate; double-coating; protein; microcapsules; *Bifidobacterium bifidum*

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)02-0104-04

益生菌要发挥益生作用, 就必须通过人体上消化道, 并以一定数量的活菌定植于大肠处。但是, 人胃部的低酸环境(pH1.5~4.0)对于益生菌的转运具有巨大的阻碍作用, 极易造成益生菌失活^[1-2]。目前, 利用微胶囊对益生菌进行包埋已经作为一种最为有效的保护策略, 并被广泛用来提高益生菌在胃液中的存活率^[3-5]。但是, 微胶囊对益生菌的包埋效果不仅是指微胶囊对其在模拟胃液中的进行保护, 还体现在微胶囊在进入肠道之后逐步发生降解, 将其包埋的活菌在大肠中进行靶向释放, 才能起到将活菌载体并定植于大肠处的作用^[6-8]。因此, 除了研究在模拟胃液中微胶囊壁材的降解之外, 必须还要研究壁

材在连续模拟胃肠液中的变化。先前的研究发现: 海藻酸钠对益生菌微胶囊进行二次包衣能有效提高包埋细胞在模拟胃液中的存活率^[9-10]。本研究的主要目的是在此基础上, 进一步考察海藻酸钠二次包衣之后的微胶囊在人工模拟胃肠道环境下的降解中的降解速度、包埋益生菌在模拟胃肠液中的释放速度和包埋益生菌在连续模拟胃肠液中的存活情况, 能有效的拓宽海藻酸钠二次包衣法在益生菌微胶囊体系中的应用范围, 同时有利于为构建活性益生菌的高效靶向释放载体技术提供相应的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

两歧双歧杆菌F-35 (*Bifidobacterium bifidum* F-35) 本实验室保藏; 分离乳清蛋白(WPI, 94.0%) 北京银河经贸有限公司; 海藻酸钠 Sigma公司; 转谷氨酰胺酶(1000U/g) 江苏一鸣生物科技有限公

收稿日期: 2013-06-13 * 通讯联系人

作者简介: 邹强(1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 四川科技支撑计划(11ZH2037NC)。

司;胃蛋白酶(10000NFU·mg⁻¹) BBI公司;胰蛋白酶(来自于猪胰腺) BBI公司;其他试剂均为分析纯。

ULTRA-TURRAX T8均质机 德国IKA公司;光学显微镜(Leica DM2000) 德国莱卡公司;BT-9300H激光粒度分析仪 辽宁百特仪器有限公司;紫外-可见分光光度计(日立650-60) 日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 微胶囊的制备 海藻酸钠微胶囊(AL-M)的制备:参照Zou等^[9]的制备方法;蛋白质微胶囊(WP-M)的制备:参照邹强等^[10]的制备方法;海藻酸钠二次包衣的微胶囊(AL-CM)的制备:主要参照Annan等^[11]的包衣方法,并在此基础上对工艺进行改进:将大约15g蛋白质微胶囊加入到100mL pH为5.5和浓度为0.5%的海藻酸钠溶液中,通过搅拌(200r/min)使其充分分散,20min之后,过滤收集经海藻酸钠溶液浸润后的蛋白质微胶囊,然后再将它们重悬于75g含有吐温(5g/L)和浓度为0.07mol/L的CaCl₂大豆油中,在500r/min转速的搅拌过程中,通过Ca²⁺的交联作用,使得微胶囊表面的海藻酸钠形成凝胶,20min后,向大豆油中加入100mL的CaCl₂(0.05mol/L)来回收经海藻酸钠包衣后的蛋白质微胶囊,最后用0.1% NaCl溶液清洗并过滤回收得到微胶囊,重复操作两次以清除剩余的油相。

1.2.2 微胶囊的形态观察 取一小滴微胶囊分散液置于载玻片上,盖上盖玻片,在光学显微镜下观察其形态。

1.2.3 *B.bifidum* F-35在连续的模拟胃肠液中的存活实验 人体模拟胃液(SGJ)和人体模拟肠液(SIJ)的配制参照Annan等^[11],SGJ的配制:用浓盐酸溶液将NaCl溶液(0.2%, w/v)的pH调节到2.0,然后加入一定量的胃蛋白酶并使其终浓度为0.3g/L,最后用0.22μm的膜进行过滤灭菌。SIJ的配制:将胰蛋白酶和胆盐均匀地分散于磷酸盐缓冲液中,使其终浓度分别为1.0g/L和4.5g/L,然后用0.1mol/L的NaOH溶液将此混合液的pH调至7.4并过滤灭菌。SGJ和SIJ都是现配现用。

将0.5g微胶囊均匀地分散到4.5mL在37℃下预热的SGJ,温育1h后,快速加入37℃下预热的SIJ,用0.1mol/L的NaOH调pH至7.4,再用磷酸盐缓冲液将体积定容至10mL。然后此混合液在37℃、100r/min下温育4h。在60、120、180、240min时取样,用高速均质器对样品溶液进行破碎,用ULTRA-TURRAX T8均质机在10000r/min下均质45s,分别取样用涂布平板法计算活菌数。

1.2.4 微胶囊在连续的模拟胃肠液中的降解实验 将0.5g湿微胶囊加入到5mL的SGJ中,漩涡振荡使其分散均匀,并在37℃持续搅拌(100r/min)的条件下处理1h,之后将37℃预热的SIJ加入到上述SGJ中,用1mol/L的NaOH溶液调节pH到7.4,并用pH为7.4的磷酸盐缓冲液(0.2mol/L)定容至50mL,然后在相同条件下处理4h。样品(2mL)在10000r/min下离心1min后,取上清液,并在280nm波长下测定其吸光值。同时向原样中加入2mL的新鲜SIJ以维持固定体积的模拟

胃肠液。在整个连续的模拟胃肠道实验中,用显微镜监测微胶囊形态结构的变化情况。

1.2.5 *B.bifidum* F-35在模拟肠液中的释放实验 取1.0g湿微胶囊,将它们分散于49g加或未加胰蛋白酶的模拟肠液中,在37℃和持续搅拌(100r/min)的条件下用模拟肠液处理4h。并在预定的时间间隔取1mL样品溶液,通过上述方法计数释放到模拟肠液中的*B.bifidum* F-35,同时,向原样中加入相同体积的新鲜SGJ以维持固定体积的SGJ。

2 结果与讨论

2.1 微胶囊在连续的模拟胃肠道中外观形态的变化

在外观形态上,经过包衣的AL-CM(图1a)和未经过包衣的WP-M(图2b)具有明显的差别,AL-CM外部多了一个包衣层,且呈球形不如AL-M,这可能是因为WP-M在包衣过程中,强烈的搅拌作用导致微胶囊球形结构发生变化。在模拟胃液中,AL-CM在结构形态上表现出一定的稳定性,微胶囊表面的海藻酸钠薄膜结构基本没有消失,只是随着时间的延长,微胶囊的结构变得相对不规则,这可能是因为乳清蛋白胶体在酸性环境中会有紧缩的特点所致^[12-13](图1c、d)。当微胶囊被转运到模拟肠液后(15min),外层的海藻酸钠薄膜快速消失,同时还伴有乳清蛋白包埋壁材被胃蛋白酶部分水解的现象,这是因为在模拟肠液中,中性的pH环境和磷酸盐的螯合作用使得海藻酸钠胶体重新溶解^[14-15],从而使得乳清蛋白胶体能够暴露于模拟肠液中,并被胰蛋白酶水解

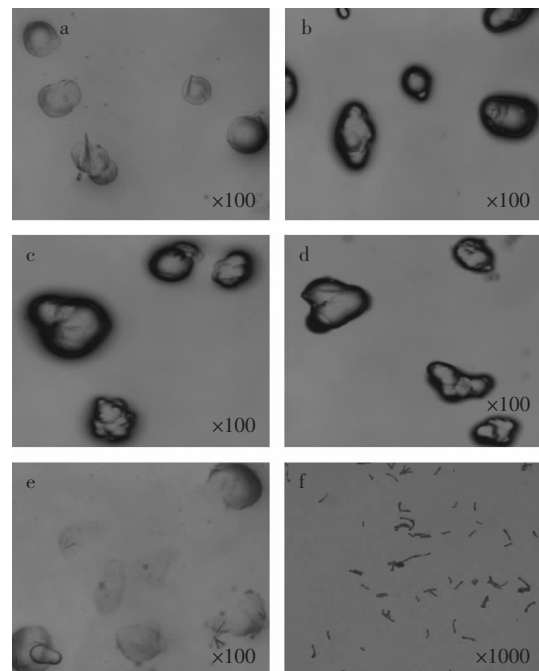


图1 海藻酸钠包衣的乳清蛋白微胶囊在连续的模拟胃肠道中的光学显微镜观察结果

Fig.1 Optical microphotographs of alginate-coated whey protein microcapsules during sequential incubation

注:图a蛋白质微胶囊,图b经过海藻酸钠二次包衣后的微胶囊,图c模拟胃液30min,图d模拟胃液60min,图e模拟肠液15min,图f模拟肠液30min。

(图1e)。在模拟肠液30min时,几乎所有微胶囊在胰蛋白酶的作用下都全部溶解,将包埋的*B.bifidum* F-35全部释放于模拟肠液中(图1f)。

2.2 海藻酸钠包衣对乳清蛋白在连续的模拟胃肠道中降解速度的影响

包衣和未经包衣的乳清蛋白微胶囊在连续的模拟胃液中的降解速度有明显的不同,结果如图2所示。WP-M在SGJ中降解得非常快,在不到1h的时间里几乎所有的微胶囊都被胃蛋白酶水解殆尽。相反,AL-CM却能够有效地延缓乳清蛋白壁材在SGJ中的降解,1h内仅被降解了13.5%。其原因可能有两个:第一,海藻酸钠薄膜可作为一层有效的“屏障”,它能减少内部的蛋白质壁材和外部胃蛋白酶的接触机会;二,海藻酸钠可以与同处于微胶囊表面的乳清蛋白在酸性条件下发生复合凝聚,生成对酶稳定且结构紧密的聚合物。但将AL-CM连续地转运至SIJ中发现,微胶囊的降解速度又变得非常快,在90min时总共有超过85%的乳清蛋白凝胶壁材发生了降解,这说明了海藻酸钠包衣层在SIJ的消失是导致乳清蛋白壁材快速降解的主要原因。

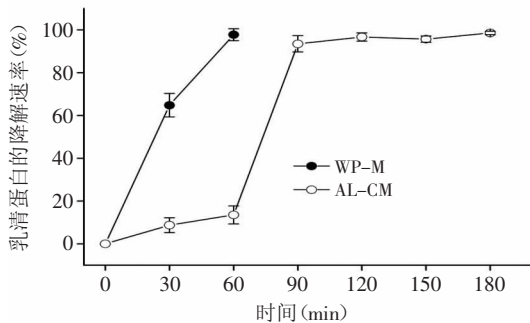


图2 乳清蛋白在连续的模拟胃(1h, 37°C, SGJ)肠(2h, 37°C, SIJ)道中的降解

Fig.2 Degradation of whey protein during sequential incubation (1h, 37°C) in simulated gastric juice (SGJ) and (2h, 37°C) intestinal juice (SIJ)

2.3 海藻酸钠包衣对*B.bifidum* F-35在模拟肠液中释放速度的影响

不同的微胶囊在模拟肠液中对*B.bifidum* F-35的释放速率也不一样,其结果如图3所示。WP-M和AL-CM在不加胰蛋白酶的模拟肠液中具有相对较慢的释放速率,在4h里对*B.bifidum* F-35释放率分别为17.9%和11.8%。在中性条件下,乳清蛋白胶体因为静电斥力会有溶胀现象^[16],所以仍有部分包埋的*B.bifidum* F-35通过疏松的凝胶网状结构释放到外界环境中。随着胰蛋白酶的加入,WP-M的释放速度急剧提高,在0.5h时,内包埋的*B.bifidum* F-35就已经释放了超过90%,这说明胰蛋白酶是影响WP-M释放的主要因素。相对于其他两种微胶囊,AL-CM释放速度相对较慢,在1h时将包埋的*B.bifidum* F-35释放了90%。海藻酸钠包衣延缓了包埋的*B.bifidum* F-35在模拟肠液中的释放速率,但这并不影响AL-CM将全部细胞释放于人体肠道中。这是因为AL-M转运到

人体肠道后,表面的海藻酸钠凝胶层在肠道中性环境中溶解并暴露内部的蛋白质凝胶层,蛋白质在肠道胰蛋白酶的作用下迅速水解,从而释放包埋的细胞,并实现益生菌肠道定点释放的目的。

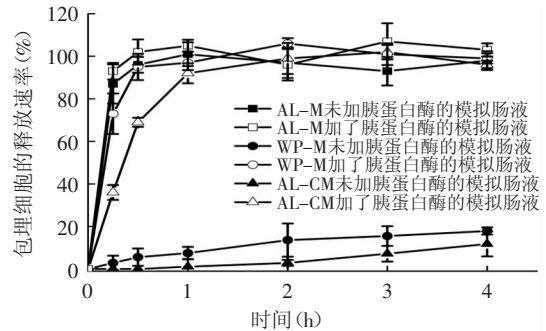


图3 *B.bifidum* F-35在模拟肠道(4h, 37°C)中的释放速率
Fig.3 The release rate of *B.bifidum* F-35 from microcapsules in simulated intestinal juice (4h, 37°C)

2.4 海藻酸钠包衣对*B.bifidum* F-35在连续的模拟胃肠道中保护效果的影响

在连续的模拟胃肠道中,AL-M对*B.bifidum* F-35的保护效果最差,在5h里,*B.bifidum* F-35的存活率下降了接近5个对数值。包埋于WP-M和AL-CM的*B.bifidum* F-35在存活率上都经历了一个先降后升的过程,这是因为乳清蛋白和它的水解产物是益生菌可以利用的氮源,这些氮源在肠道的中性环境中能够促进益生菌的生长。但最终的存活率还是有不同程度的降低,总的来说,AL-CM对*B.bifidum* F-35的保护效果最好,存活率高达51.0%,其次为WP-M(5.5%) (图4)。

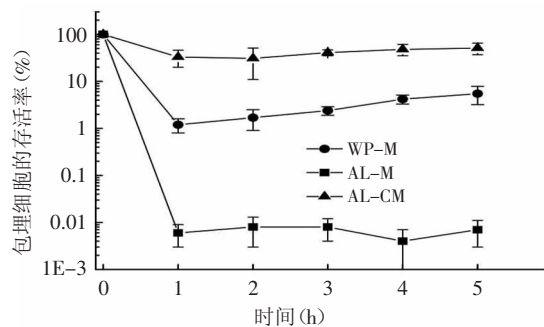


图4 *B.bifidum* F-35在连续的模拟胃(1h, 37°C)肠(4h, 37°C)道中的存活率

Fig.4 Survival of *B.bifidum* F-35 during sequential incubation (1h, 37°C) in simulated gastric juice (SGJ) and (4h, 37°C) intestinal juice (SIJ)

3 结论

实验证实了该包衣方法能有效地将海藻酸钠包覆于蛋白质微胶囊表面,并且外部的这层薄膜能够显著降低胃蛋白酶对乳清蛋白的降解作用。相比于AL-M和WP-M,AL-CM会延缓*B.bifidum* F-35在模拟肠液中的释放速率,但在连续的模拟胃肠道中对*B.bifidum* F-35保护效果最好,*B.bifidum* F-35最终的

