

吴德龙,王志耕,梅 林,等. 真空低温喷雾干燥法制备乳酸菌微胶囊的工艺参数优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):367-370.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.118

真空低温喷雾干燥法制备乳酸菌微胶囊的工艺参数优化

吴德龙, 王志耕, 梅 林, 薛秀恒

(安徽农业大学茶与食品科技学院,安徽合肥 230036)

摘要:乳酸菌是促进人体健康的一类典型益生菌,这类菌要达到其有益效果,活菌数至少应达到 100 万 CFU/g。由于受到外界与人体胃环境的不良影响,裸露的菌体不易存活,将益生菌进行微胶囊化被认为是最为有效、最有前景的一种保护方法。本研究在单因素研究的基础上,采用响应面法对真空低温喷雾干燥制备微胶囊工艺参数进行优化。试验结果表明,在真空度为 $-0.05 \sim -0.06$ MPa 条件下,最佳工艺条件为进风温度 79.07°C ,进料速度 727.54 mL/h ,菌壁比 $1:4.55$,保护载体(脱脂奶粉)量 9.80% ,此条件下的活菌数为 2.81×10^8 CFU/g。

关键词:乳酸菌;微胶囊;真空低温;喷雾干燥法;响应面;活菌数

中图分类号: TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0367-04

乳酸菌是对人体具有重要的生理和保健功能的益生菌,但乳酸菌不形成芽孢,故抗逆性差、易失活而不能很好地发挥其益生功能。研究乳酸菌保护技术以降低其在食品加工储藏、人体消化道等过程中的损失具有重要意义。目前,益生菌微胶囊化被认为是最为有效、最有前景的一种方法。微胶囊制备方法有:喷雾成型法、乳化法、挤压法、共凝聚/相分离法和静电法等^[1],其中,喷雾成型法制备乳酸菌微胶囊具有干燥速率高、时间短、产品的分散性和溶解性好、生产过程简单、适用于连续化生产等优势,成为工业化应用技术研究的重点。本试验重点研究真空低温喷雾干燥制备乳酸菌微胶囊技术,优化其工艺参数,为乳酸菌微胶囊生产提供一种低能耗、高活性产品的技术方案。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

嗜热链球菌、乳酸杆菌保存于安徽省农产品加工工程试验室畜产品加工研究平台;MRS 培养基:杭州微生物试剂有限公司;NaCl:西陇化工股份有限公司;光明脱脂奶粉:光明乳业股份有限公司;麦芽糊精:山东西王糖业有限公司;阿拉伯树胶粉:国药集团化学试剂有限公司。

LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂;YC-2000 实验室低温喷雾干燥机:上海雅程仪器设备有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器:巩义市予华仪器有限责任公司;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;SW-CJ-2D 双人单面超净工作台 100 级:苏州净化设备有限公司;日本日立

SEMXL-20 型扫描电子显微镜。

1.2 试验方法

1.2.1 生长曲线的测定 以培养时间为横坐标、测定的 $D_{600\text{nm}}$ 值为纵坐标,绘制 2 种菌的生长曲线。

1.2.2 菌悬液的制备 将保存的乳酸菌菌种在 MRS 固体培养基中活化 2 次后,接种于新鲜的 MRS 液体培养基中, 37°C 培养至对数期末、稳定期前。收集稳定期前期的菌液, 3500 r/min 离心 10 min。去上清,将收集到的菌体用无菌生理盐水洗涤,再次离心,重复 3 次。用 20 mL 无菌生理盐水重新悬浮菌体,备用。

1.2.3 工艺流程 将阿拉伯树胶粉与麦芽糊精按 $1:8^{[2-3]}$ 溶于相应量的去离子水,固形物含量为 $15\% \rightarrow 40^{\circ}\text{C}$ 加热, 4000 r/min 高速分散 10 min,搅拌至完全溶解 \rightarrow 静置待泡沫消除,加入含 2 种菌 ($1:1$) 的 20 mL 菌悬液, 40°C 加热, 500 r/min 搅拌 5 min \rightarrow 加入相应量的脱脂奶粉搅拌均匀 \rightarrow 设置进料速度与进风温度,喷雾干燥。

1.2.4 单因素试验 考察菌壁比、进风温度、进料速度、保护载体量对活菌数的影响。

1.2.4.1 菌壁比对活菌数的影响 在进风温度 80°C 、进料速度 600 mL/h 、保护载体量 12.5% ,菌壁比(体积比)分别为 $1:2$ 、 $1:4$ 、 $1:6$ 、 $1:8$ 、 $1:10$ 条件下进行 5 组试验,每组重复 3 次。

1.2.4.2 进风温度对活菌数的影响 在进料速度 600 mL/h 、菌壁比(体积比) $1:6$ 、保护载体量 12.5% ,进风温度分别为 60 、 70 、 80 、 90 、 100°C 进行 5 组试验,每组重复 3 次。

1.2.4.3 进料速度对活菌数的影响 在进风温度 80°C 、菌壁比(体积比) $1:6$ 、保护载体量 12.5% ,进料速度分别为 200 、 400 、 600 、 800 、 1000 mL/h 进行 5 组试验,每组重复 3 次。

1.2.4.4 保护载体量对活菌数的影响 在进风温度 80°C 、进料速度 600 mL/h 、菌壁比(体积比) $1:6$,保护载体量分别为 7.5% 、 10.0% 、 12.5% 、 15.0% 、 17.5% 条件下进行 5 组试验,每组重复 3 次。

收稿日期:2014-09-30

基金项目:安徽省现代农业产业技术体系(编号:AHCYTX-07)。

作者简介:吴德龙(1988—),男,安徽和县人,硕士研究生,从事畜产品加工研究。E-mail:517571315@qq.com。

通信作者:王志耕,教授,从事畜产品加工及品质研究。E-mail:wzhg@ahau.edu.cn。

1.2.5 活菌数测定 取喷雾干燥得到的粉末 0.5 g 溶于 50 mL 灭菌生理盐水中→37 ℃、180 r/min 振荡 1 h 至粉末完全溶解→按 GB 4789.35—2010《食品微生物学检验 乳酸菌检验》,梯度稀释涂平板,得活菌数。

1.2.6 电镜扫描 对经冷冻干燥预处理的裸菌和喷雾干燥粉末电镜扫描,观察微观结构。

1.2.7 响应面分析 在单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,以进风温度、进料速度、菌壁比、保护载体量为自变量,活菌数的对数值为响应值,利用响应面法分析优化真空低温喷雾干燥制备乳酸菌微胶囊工艺参数。响应面因素和水平设计见表 1。

表 1 响应面试验因素水平编码

编码水平	A:菌壁比	B:进风温度(℃)	C:进料速度(mL/h)	D:载体量(%)
-1	1:6	70.0	400	8
0	1:4.8	77.5	600	10
1	1:4	85.0	800	12

1.2.8 数据统计分析 将试验结果利用 Excel、Design-Expert 8.0 进行直观分析和方差分析。

2 结果与分析

2.1 生长曲线

从图 1 可以看出,嗜热链球菌在 16 h 后基本完成对数期,故选择培养时间为 16 h;同理乳酸杆菌选择培养 18 h(图 2)。

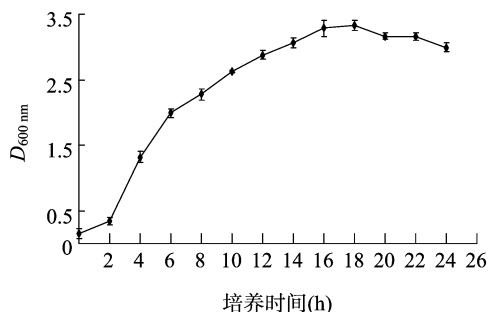


图1 嗜热链球菌生长曲线

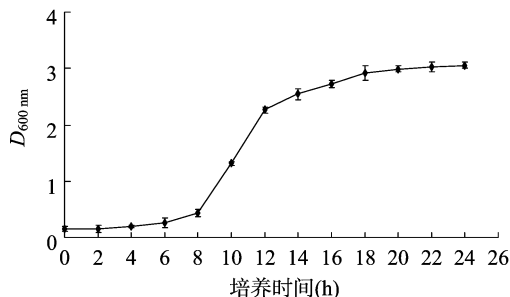


图2 乳酸杆菌生长曲线

2.2 单因素试验

2.2.1 菌壁比对活菌数的影响 从图 3 可以看出,芯材与壁材在一个合适的比例得到的活菌数最高。菌壁比过高,芯材不能完全被包覆,包埋率下降,裸露的菌体在高温下失活,活菌数降低。菌壁比过低,一方面降低单位体积的菌浓度,另一方面降低壁材利用率。本研究选择菌壁比 1:4 左右较为合适。

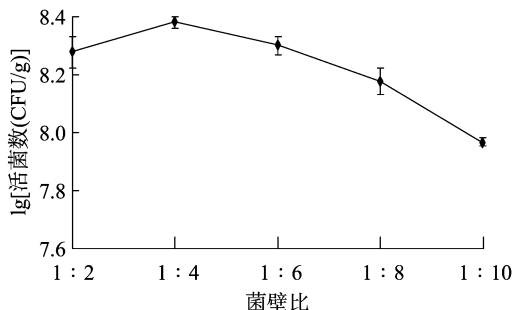


图3 菌壁比对活菌数的影响

2.2.2 进风温度对活菌数的影响 在喷雾干燥工艺中进风温度是主要考虑的因素之一^[4-6],从图 4 可以看出,随着进风温度的升高,活菌数总体呈下降趋势,60~80 ℃下降缓慢,80 ℃以后急剧下降。60~70 ℃时喷出的粉末含水率接近 5%,不利于后期贮藏;而当温度升高至 80 ℃时粉末的含水量降为 3.9%,符合 GB/T 5410—2008《乳粉(奶粉)》。温度超过 80 ℃使活菌数急剧下降,因此选择进风最佳温度 80 ℃左右。

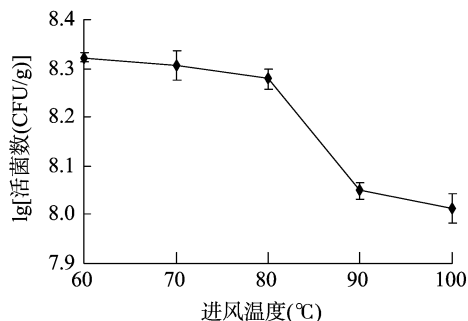


图4 进风温度对活菌数的影响

2.2.3 进料速度对活菌数的影响 在喷雾干燥过程中,进料速度越快,即单位时间内要被雾化器雾化为小液滴的物料就越多,将料液干燥转化为粉粒时所需的热量就越多。因此,在其他因素一定的条件下,即单位时间内,热风提供给物料的热量一定时,进料速度越大,干燥效果就越差^[7]。另一方面本研究的芯材为生物活性物质,干燥时间越长,失活程度越大。从图 5 可以看出,进料速度为 200~600 mL/h 时,物料与热风接触时间过长,随着进料速度加快,活菌数上升。进料速度为 600~1 000 mL/h,进料速度过快,随着进料速度的加快,干燥效果变差,活菌数下降。故选择进料速度为 600 mL/h。

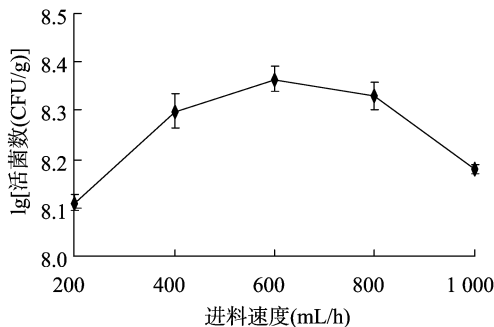


图5 进料速度对活菌数的影响

2.2.4 载体量对活菌数的影响 添加载体可带走一部分水分蒸发的热,减少热对内部微生物的伤害,相关研究表明,脱

脂奶粉在与其他载体相比较时,具有优越性^[5]。从图 6 可以看出,脱脂奶粉含量 7.5%~10.0% 时,随着脱脂奶粉含量的增加,溶液黏度有规律递增,体系稳定,且水分蒸发时可带走体系一部分热量,使活菌数上升。脱脂奶粉含量 10.0%~17.5% 时,随着脱脂奶粉含量的增加,溶液固形物含量偏高,出现粘壁现象,活菌数下降。故选择载体量 10.0% 为最佳。

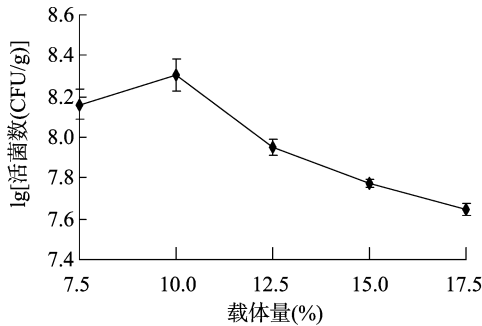


图6 载体量对活菌数的影响

2.3 响应面优化结果分析

2.3.1 显著性分析 Box-Behnken 试验设计及结果见表 2,各因素经回归拟合,得出二次回归方程:

$$Y = -8.45 + 0.0075A + 0.019B + 0.022C + 0.005D + 0.0025AB + 0.017AC - 0.0075AD - 0.01BC - 0.015BD - 0.037CD - 0.038A^2 - 0.036B^2 - 0.022C^2 - 0.12D^2$$

从表 3 可以看出,模型的 P 值 <0.0001 ,失拟项 P 值为 $0.8368 > 0.05$,不显著,该资料适用于二次项拟合。该模型的 R^2 为 93.53%,修正后 87.06%,说明该模型能解释 87.06% 的响应值变化,该模型与实际的拟合性较好。

从表 3 方差分析可以看出,菌壁比、载体量对活菌数的影响不显著,进风温度对活菌数的影响显著,进料速度对活菌数的影响极显著,表明进风温度与进料速度对活菌数的影响呈较明显的线性关系;进料速度与载体量之间交互作用极显著,其他各因素之间的交互作用均不显著,说明进料速度与载体量相互影响,不是简单的主效应叠加;进料速度的二次项对活菌数的影响显著,菌壁比、进风温度、载体量的二次项对活菌数的影响极显著,说明该模型中的二次项与活菌数并不是简单的线性关系而是抛物线关系,这点可以从单因素看出。

剔除对回归方程不显著的、贡献率不大的因素,得到二次回归方程如下:

$$Y = 8.45 + 0.019B + 0.022C - 0.037CD - 0.038A^2 - 0.036B^2 - 0.022C^2 - 0.12D^2$$

得到最佳工艺条件为菌壁比 1:4.76、进风温度 79.52℃、进料速度 714.47 mL/h、载体量 9.82%。在此工艺参数条件下,产品活菌数 2.88×10^8 CFU/g。

从表 3 可以看出,各单因素对活菌数的影响大小排序为进料速度>进风温度>菌壁比>载体量。

2.3.2 响应面立体图分析 由回归方程得出拟合的进料速度与载体量对活菌数的影响的响应面见图 7。表示当进风温度和菌壁比为零水平时,进料速度和载体量对活菌数的影响。响应曲面的坡度陡峭程度反映了因素对响应值的影响力大小,表明因素间交互作用的强弱。从图 7 可以看出,进料速度与载体量之间的交互作用显著。图 8 为等高线图,等高线的

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	lg 活菌数
1	1	-1	0	0	8.38
2	1	1	0	0	8.43
3	0	0	1	-1	8.36
4	0	0	0	0	8.48
5	-1	1	0	0	8.4
6	0	0	0	0	8.46
7	-1	-1	0	0	8.36
8	0	0	-1	-1	8.26
9	0	0	1	1	8.31
10	0	0	-1	1	8.38
11	1	0	0	-1	8.29
12	0	-1	-1	0	8.33
13	1	0	0	1	8.28
14	0	0	0	0	8.48
15	-1	0	0	1	8.30
16	0	1	1	0	8.43
17	0	1	-1	0	8.40
18	0	-1	1	0	8.40
19	-1	0	0	-1	8.28
20	0	1	0	1	8.28
21	-1	0	1	0	8.38
22	0	0	0	0	8.42
23	0	1	0	-1	8.31
24	0	0	0	0	8.42
25	1	0	-1	0	8.35
26	0	-1	0	1	8.29
27	1	0	1	0	8.44
28	0	-1	0	-1	8.26
29	-1	0	-1	0	8.34

表 3 回归方程方差分析

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.12	14	0.008436	14.450	<0.0001	**
A	0.000675	1	0.000675	1.160	0.3004	
B	0.004408	1	0.004408	7.550	0.0157	*
C	0.005633	1	0.005633	9.650	0.0077	**
D	0.000300	1	0.0003	0.510	0.4852	
AB	0.000025	1	0.000025	0.043	0.8390	
AC	0.001225	1	0.001225	2.100	0.1694	
AD	0.000225	1	0.000225	0.390	0.5447	
BC	0.000400	1	0.0004	0.690	0.4217	
BD	0.000900	1	0.0009	1.540	0.1598	
CD	0.005625	1	0.005625	9.640	0.0078	**
A ²	0.009408	1	0.009408	16.120	0.0013	**
B ²	0.008213	1	0.008213	14.070	0.0021	**
C ²	0.003092	1	0.003092	5.300	0.0372	*
D ²	0.096000	1	0.096000	164.950	<0.0001	**
残差	0.008172	14	0.0005837			
失拟项	0.004492	10	0.0004492	0.490	0.8368	不显著
纯误差	0.003680	4	0.00092			
总误差	0.130000	28				

注:“*”“**”分别表示差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。

形状反映出交互效应的强弱,越趋向椭圆表明交互作用越强,越趋向圆形则相反,表明交互作用越弱^[8]。从图 8 可以看出二者交互作用强。

2.4 电镜扫描图片与菌粉图

电镜条件为加速电压 3 kV,工作距离 8.2 mm。3 000 倍

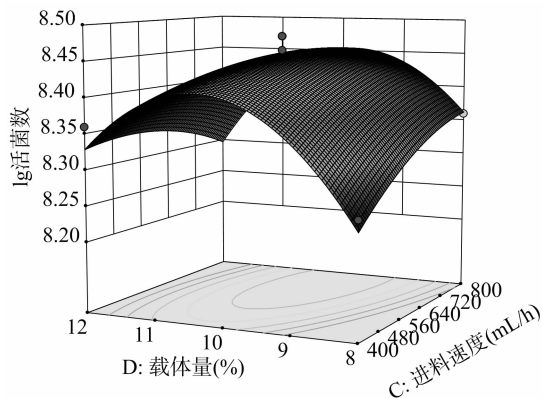


图7 进料速度与载体量的响应面

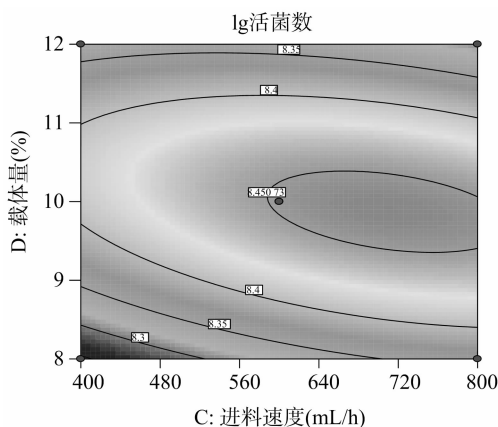


图8 等高线

电镜扫描的图片见图9,左图是微胶囊处理前,右图是微胶囊处理后。8 000 倍电镜扫描图片见图10,左图是微胶囊处理前,右图是微胶囊处理后。对比可知乳酸菌包被效果良好,微胶囊的微观结构呈凹面空腔,表现为“扁球效应”^[9-10]。

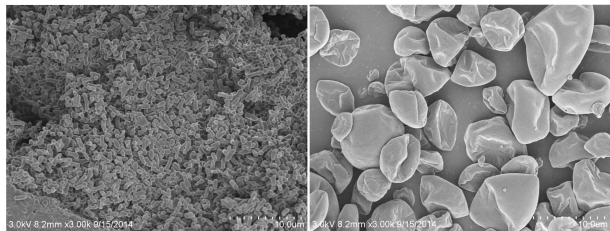


图9 微胶囊电镜扫描结果(3 000×)

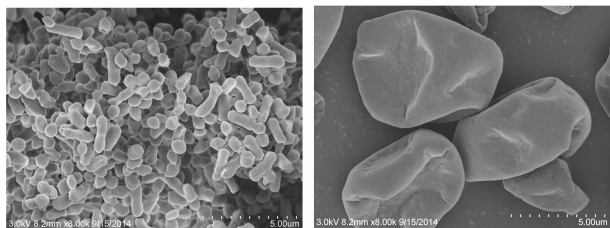


图10 微胶囊电镜扫描结果(8 000×)

喷雾干燥后的粉末样见图11,样品呈淡黄色,质感细腻,有淡淡乳香。

2.5 最佳工艺条件的预测和验证

根据试验所得模型预测出理论条件下低温真空喷雾干燥制备微胶囊的最佳工艺条件为:菌壁比1:4.55,进风温度



图11 菌粉

79.07℃,进料速度727.54 mL/h,载体量9.80%,活菌数 2.88×10^8 CFU/g。按最佳组合工艺参数重复试验3次,得实际活菌数 2.81×10^8 CFU/g,与预测值的相对偏差小于3%。因此,基于响应面法得到的优化工艺参数准确可靠,有实用价值。

3 结论

研究在单因素试验的基础上,通过响应面试验设计对低温喷雾干燥制备乳酸菌微胶囊的工艺进行了优化。优化结果表明,菌壁比、进风温度、进料速度、载体量4个因素对喷雾干燥制备乳酸菌微胶囊的影响大小依次为:进料速度>进风温度>菌壁比>载体量,最佳工艺条件为菌壁比1:4.55,进风温度79.07℃,进料速度727.54 mL/h,载体量9.80%,此条件下得到的微胶囊活菌数为 2.81×10^8 CFU/g,满足一般产品加工要求。

参考文献:

- [1] Liu X G, Xie Y T. Comparison of preparation methods of micro-encapsulation[J]. Cereal & Food Ind, 2005, 12(1): 28-31.
- [2] Kurozawa L E, Park K J, Hubinger M D. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 94(3/4): 326-333.
- [3] 韩冬冬. 革兰氏阴性菌微胶囊制备技术的研究[D]. 大连:大连理工大学, 2007: 44-45.
- [4] 张煜, 孙波, 接伟光. 活性乳酸菌豆粉喷雾干燥工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 260-263, 267.
- [5] 刘绘景, 陆海霞, 楼加佳, 等. 喷雾干燥对双歧杆菌存活影响的研究[J]. 食品与机械, 2004, 20(3): 11-12, 22.
- [6] 付博, 马齐, 王卫卫, 等. 真空冷冻干燥与喷雾干燥长双歧杆菌的工艺比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 188-192.
- [7] 谢明, 王伟良, 黄建科, 等. 基于响应面分析法的小球藻藻粉喷雾干燥工艺优化[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 263-266, 271.
- [8] 国蓉, 李剑君, 国亮, 等. 采用响应曲面法优化甘草饮片中甘草酸的超声提取工艺[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(9): 187-192.
- [9] de Castro - Cislach F P, Carina D S, Fritzen - Freire B C, et al. Bifidobacterium Bb - 12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 113(2): 186-193.
- [10] Maciel G M, Chaves K S, Grosso C R, et al. Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus La - 5 by spray - drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(4): 1991-1998.