

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

保健膳食補助品之製備 -

低溫噴霧乾燥微膠囊化雙叉桿菌 (2/2)

Preparation of probiotic dietary adjunct: Encapsulation of bifidobacteria by low-temperature spray-drying (2/2)

計畫編號：NSC 89-2316-B-002-029

執行期限：88 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：周正俊 國立台灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

雙叉桿菌(bifidobacteria)具有維持人體腸道菌叢平衡，增加免疫反應及促進食物消化吸收等功能。本研究主要乃在探討以脫脂奶粉、阿拉伯膠、明膠及水溶性澱粉微膠囊化雙叉桿菌後對耐酸、耐膽鹽及貯存安定性之影響。無論用何種被覆材質進行低溫噴霧乾燥微膠囊化菌體時，所試之五株雙叉桿菌中均以 *B. longum* B6 之存活率最高。被覆材質濃度為 10 %，於出口溫度 50 °C 下，進行 *B. longum* B6 噴霧乾燥微膠囊化，存活率分別是脫脂奶粉 (82.6 %) > 明膠 (63.7 %) > 阿拉伯膠 (41.2 %) > 水溶性澱粉 (29.1 %)。隨著噴霧乾燥之出口溫度及被覆材質濃度之提高，菌體之存活率及乾燥粉末水分含量亦隨之下降。以上述四種被覆材質微膠囊化 *B. longum* B6 及 *B. infantis* CCRC 14633，均具有減少菌體於胃酸 (pH 2.0)及膽鹽 (2.0 %)下敏感性之效果，*B. longum* B6 分別經上述四種被覆材質微膠囊化後，以明膠為被覆材質者最具酸抗性，於 pH 2.0 下接觸 4 小時，仍有 76.1 %之存活率，而於 2.0 %膽鹽下則以脫脂奶粉為被覆材質者最具抗性 (存活率 1.39 %)。在 4 °C 下，雙叉桿菌之存活菌數高於在 25 °C 下貯存者。置放在玻璃瓶或同時添加脫氧劑及乾燥劑，可提高貯存時菌體之存活，經脫脂奶粉微膠囊化之 *B. longum* B6，於 4 °C 下，置於有脫氧劑及乾燥劑之玻璃瓶中，經 35 天貯存後其存活率達 74.13 %，菌數僅下

降 0.13 Log cfu/g。

關鍵字：雙叉桿菌，噴霧乾燥，存活，脫脂奶粉，阿拉伯膠，明膠，水溶性澱粉

Abstract

Bifidobacteria possesses the probiotic effects including maintenance of intestinal normal microflora, activation of immune system and increasing the digestibility of milk products. In this study, bifidobacteria were microencapsulated in skim milk, gum Arabic, gelatin or soluble starch by low temperature spray drying. Susceptibility of the microencapsulated bifidobacterium to stimulated gastric juice and bile solution as well as their stability during storage was examined.

After spray drying, it was noted that *B. longum* B6 exhibited the highest survival rate among the five bifidobacterium strains tested. Further study with *B. longum* B6 and *B. infantis* CCRC 14633 revealed that the survival rate of the test organism was higher with skim milk followed by gelatin, gum arabic and soluble starch as the microencapsulants. Increasing the concentration of wall material or raising the outlet temperature during spray drying resulted in the reduced survival rate and moisture content. Bifidobacterium encapsulated with gelatin exerted the highest increase in its resistance to 2 % bile solution. Microencapsulation with skim milk, gum Arabic, gelatin or soluble starch reduced the susceptibility of test organisms to

stimulated gastric juice (pH 2.0) and bile solution (2.0 %). Microencapsulation of test organism with gelatin exerted more marked effect than the other three wall materials on increasing the resistance of the encapsulated bifidobacterium to acid. While cell encapsulated with skim milk exhibited the highest resistance to 2.0 % bile solution. Bifidobacteria survived better at 4 °C than at 25 °C. Additions of deoxidant and desiccant to the containers increased the survival of bifidobacterium during storage. Keeping in the deoxidant and desiccant containing glass bottle, a survival rate of ca 74.13 % with a population reduction of ca 0.13 Log cfu/g was noted for the skim milk-microencapsulated *B. longum* B6 after a 35-day storage at 4 °C.

Keywords: bifidobacteria, spray drying, microencapsulation, skim milk, gum arabic, gelatin, soluble starch.

二、緣由與目的

雙叉桿菌在人體腸道中扮演著重要的角色，它有助於腸道中正常微生物族群之維持。它在人體內能帶來有益之影響而促進健康。這些功能主要包括 (一) 維持人體腸道菌叢平衡 (Arunachalam, 1999; Anand et al., 1985; Barbero et al., 1952; Haenel, 1970; Hose and Sozzi, 1991; Ibrahim, 1993; Rasic and Kurmann, 1983; Yoshioka et al., 1991), (二) 活化免疫系統 (Fukushima et al., 1998; Hirota, 1990; Kohwi et al., 1978; Park et al., 1999), (三) 促進蛋白質之分解 (蔡, 1990; Goodenough and Heym, 1976; Rasic and Kurmann, 1983), (四) 抗癌作用 (Lankaputhra and Cherk, 1998; Modler et al., 1990), (五) 促進乳酸之代謝 (Modler et al., 1990; Rasic and Kurmann, 1983), (六) 合成維生素 B 群 (Rasic and Kurmann, 1983; Tamura, 1983), (七) 改善乳糖不耐症 (Gilliland and Kim, 1984; Jiang et al., 1996), (八) 抗氧化性 (賴, 1999), (九) 降低血液中膽固醇 (Homma, 1988; Ishibashi et al., 1993; Klaver and Van der Meer, 1993; Tahri et al., 1993) 及 (十) 改善腹瀉及便秘 (Arunachalam, 1999; Hotta et al., 1987; Tanaka

and Shimosaka, 1982)。

攝食時，食物中 bifidobacteria 之活菌數被認為需高達 10^7 /ml or g 以上，才能顯示其 probiotic 之功能 (Ishibashi and Shimamura, 1993)。而此類微生物乃屬厭氣性者，在食物貯存過程中可能因對氧氣敏感而死亡。此外進入人體後胃中之高酸度及腸中之膽鹽亦會導致雙叉桿菌之死亡，因而如何提高 bifidobacteria 在製備過程中之存活並提高其耐胃酸及膽鹽之抵抗力乃為一極熱門探討之主題 (Ishibashi and Shimamura, 1993; Hughes and Dallas, 1991)。因此本研究乃企圖比較了解以阿拉伯膠、脫脂奶粉、水溶性澱粉及明膠為被覆材質，在不同出口溫度及被覆濃度下進行雙叉桿菌之低溫噴霧乾燥微膠囊化，期使提高雙叉桿菌之存活率、儲存安定性及抗酸抗膽鹽耐性等，進而達到製備有效保健膳食輔助品之目標。

三、結果與討論

由於雙叉桿菌具有寄主專一性 (host-specificity)，選擇雙叉桿菌作為膳食補助品 (diet adjunct) 時，必須考慮其為人體來源 (human-origin) 之菌株，才能期待在人體能發揮其機能性功能 (Ishibashi and Shimamura, 1993)。在本研究中所測試之五株菌株中，*B. longum* 是嬰兒腸道、成人腸道及人體陰道等三個部位最常見之雙叉桿菌；而 *B. infantis* 則主要分佈在嬰兒腸道中 (Scardovi, 1986; Modler et al., 1990)。

不同的雙叉桿菌株經相同被覆濃度 (10 %) 之不同被覆材質 (阿拉伯膠、明膠、水溶性澱粉及脫脂奶粉)，於進口溫度 100 °C、出口溫度 50 °C 下進行噴霧乾燥微膠囊化雙叉桿菌菌體存活率隨菌種及被覆材質之不同，而呈現明顯差異 ($p < 0.05$)。於所測試菌株中，*B. infantis* 菌株存活率均明顯低於 *B. longum* 菌株。此結果可能與菌種本身的耐熱性有關。各雙叉桿菌株於本實驗所測試之四種被覆材質中，均以 *B. longum* B6 存活率最高，其中以 10 % 脫脂奶粉為被覆材質經噴霧乾燥後，存活率達 82.6 % 最高，而以明膠為被覆材質者存活率為 63.7 % 次之。經上述噴霧乾燥處理後，雙叉桿菌數降低約 1-2

Log/g dry wt，然其乾燥粉末所含雙叉桿菌活菌數仍能達到 10^9 - 10^{10} cfu/g dry wt，符合雙叉桿菌當作 Probiotic 之膳食補助品所需之最低菌數要求 (Ishibashi and Shimamura, 1993)。當以 10 % 之阿拉伯膠、明膠或水溶性澱粉為被覆材質，對 *B. longum* 菌株進行噴霧乾燥時，可發現存活率最高者為以明膠為被覆材質者，其次為阿拉伯膠。而對 *B. infantis* 菌株而言，噴霧乾燥後存活率最高之被覆材質為阿拉伯膠，其次為明膠，而水溶性澱粉均居末位。

雙叉桿菌於不同被覆濃度 (2-30 %)、及被覆材質 (明膠、阿拉伯膠、水溶性澱粉)，於 50 °C 出口溫度進行噴霧乾燥所得之存活率，阿拉伯膠及水溶性澱粉於 10 % 被覆濃度時，有最高之存活率，然進一步提高其濃度至 30 % 時，可發現其存活率隨濃度之提高而下降。*B. longum* B6 以明膠為被覆材質進行噴霧乾燥微膠囊化，濃度從 2 % 提高至 10 %，存活率從 58.9 % 提高至 63.7 %，次將明膠濃度提高至 20 %，其存活率驟降至 2.1 %。*B. infantis* CCRC 14633 也有相同之趨勢。但存活率僅 0.52-1.30 %。雙叉桿菌進行噴霧乾燥時，被覆材質 (明膠、阿拉伯膠、水溶性澱粉) 濃度，由 10 % 提高至 20 % 或更高濃度，經噴霧乾燥後其存活率隨被覆材質濃度之提升而下降，此結果與 Espina and Packard (1979) 對 *L. acidophilus* 進行噴霧乾燥所得結果類似，其推測可能原因為提高固形物濃度，經噴霧乾燥後，形成之微粒較大，造成菌體深陷微粒中而引起較多之熱傷害。

於噴霧乾燥過程造成菌體死亡之主要原因為熱致死傷害 (To and Etzel, 1997a)，相關研究報告指出，提高噴霧乾燥時之出口溫度，將會降低菌體之存活率 (Lichari and Potter, 1970; Labuza et al., 1972; Espina and Packard, 1979; Kim and Bhowmik, 1990; To and Etzel, 1997a,b)。本實驗中雙叉桿菌於四種被覆材質 (明膠、阿拉伯膠、脫脂奶粉、水溶性澱粉)、相同被覆濃度 (10 %) 下，將噴霧乾燥之出口溫度從 50 °C 提高至 60 °C，觀察其存活率及乾燥粉末含水率，結果顯示不論於何種被覆材質，提高噴霧乾燥之出口溫度，將使菌體存活率及水分含量下降。*B. longum* B6 以 10 % gelatin 為被覆材質，於

50 °C 出口溫度下進行噴霧乾燥，其存活率為 63.7 %，若將出口溫度提高至 60 °C，其存活率驟降至 8.2 %，而其乾燥粉末水分含量則從 7.8 % 降至 5.7 %。然而於各被覆材質間存活率降低程度不一，其中以 10 % 水溶性澱粉為被覆材質，其存活率下降最多，將出口溫度從 50 °C 升高至 55 °C，*B. longum* B6 存活率下降 90.8 倍而 *B. infantis* CCRC 14633 則下降 30.7 倍。

由於雙叉桿菌具有 probiotic 之功能，所以常被作為膳食輔助物而其應具備之特性之一即為對人體之胃部中之胃酸及消化系統具有忍受性，能在腸道中存活 (Gilliland and Rich, 1990; Kim and Bhowmik, 1990)。在人體臨床分析顯示胃酸之 pH 值會隨胃部內容物之進入時間及種類而變化，其幅度範圍在 1.5-4.5 之間，停留時間平均 4 小時 (Conway et al., 1997)。

吾人將 *B. longum* B6 及 *B. infantis* CCRC 14633，利用 10 % 不同被覆材質，進行噴霧乾燥取得之微膠囊化菌體置於模擬胃酸中，歷經 4 小時，觀察其間菌體存活之情形。結果顯示無論是否經過微膠囊化，所測試之雙叉桿菌菌株在 pH 2.0 模擬胃液中之存活，均較在 pH 3.0 者低，此外經被覆材質微膠囊化之菌體在 pH 2.0 模擬胃酸中之存活率亦明顯較未微膠囊化者高，且此抗酸作用產生於噴霧乾燥後之微膠囊顆粒，僅含有被覆材質之懸濁液則無。在 pH 2.0 之模擬胃酸接觸 4 小時後，*B. longum* B6 未微膠囊化菌體之存活率僅有 1.32 %。至於以明膠、水溶性澱粉、阿拉伯膠或脫脂牛乳微膠囊化者之存活率則分別尚有 76.1、74.5、57.0 及 4.34 %。

微膠囊化及未微膠囊化 *B. infantis* CCRC 14633 菌體在模擬胃酸中之存活情形大致與 *B. longum* B6 有相同之趨勢。在暴露於 pH 2.0 之模擬胃酸中，作用 4 小時後微膠囊化存活率為明膠 > 阿拉伯膠 > 水溶性澱粉 > 脫脂奶粉，其中以明膠為被覆材質者存活率為 51.5 %。此外比較所測試二株菌株之存活率，亦可發現 *B. infantis* CCRC 14633 無論有無經過微膠囊化，在模擬胃酸之情況下，其耐酸能力均較 *B. longum* B6 低。此與 Clark et al. (1993) 之報告相一致。

雙叉桿菌對膽鹽之忍受性是選擇菌株呈現 probiotic 功能的另一重要指標 (Chung et al., 1999 ; Prasad et al., 1999) 一般食物進入小腸後消化的第 1 個小時內膽汁濃度達到 2 % , 其後第二個小時內會降至 0.5 % (Davenport, 1977)。而食物在腸道內停留時間, 是影響菌體存活之主要變因。大部分食品及發酵乳品因較易消化, 一般在 12 小時內便會通過腸胃道 (Clark and Martin, 1994)。

微膠囊化及未微膠囊化之 *B. longum* B6 及 *B. infantis* CCRC 14633 在含 2.0 % (w/w) 及 0.5 % (w/v) Ovgall 下存活之情形於本實驗中被測試。 *B. longum* B6 經上述四種被覆材質微膠囊化後, 在 0.5 % Ovgall 存在下, 經 12 小時接觸後, 存活率仍可達 93.4 % 100.0 % , 與未微膠囊化之新鮮菌液存活率之 94.5 % , 在統計上並無顯著性 ($p>0.05$) 之差異。而 *B. longum* B6 不論是否經過微膠囊化與 2.0 % Ovgall 接觸立即取樣, 即測得菌數顯著下降之情形。經脫脂奶粉、明膠、水溶性澱粉及阿拉伯膠微膠囊化菌體在 0 小時之存活率分別為原先之 32.2 %、29.1 %、27.2 % 及 1.77 % , 然而未微膠囊化之新鮮菌液與 2.0 % Ovgall 接觸後 (0 小時) 之存活率則僅有 0.07 % 。隨著作用時間之增長 *B. longum* B6 之存活率均呈下降之情形, 經過 12 小時接觸後, 脫脂奶粉微膠囊化菌體之存活率為 1.39 % 最具抗性, 而以明膠微膠囊化菌體之存活率為 1.21 % 次之。至於未微膠囊化之新鮮菌液存活率則下降為 0.002 % , 菌數約下降了 4.70 Log cfu/ml。由此結果顯示以脫脂奶粉或明膠微膠囊後比未微膠囊化之新鮮菌體有較強之膽鹽忍受性。 *B. infantis* CCRC 14633 菌體在所試膽鹽存在下之存活趨勢大致亦與 *B. longum* B6 相類似。

貯存實驗為將 *B. longum* B6 及 *B. infantis* CCRC 14633 菌株, 以上述四種不同被覆材質進行微膠囊化後, 置放於聚酯塑膠瓶(PET)或玻璃瓶 (Glass), 並在 4 與 25 下貯存時觀察其菌體存活之情形。大致而言微膠囊化菌體在 4 下貯存之存活率均高於在 25 下貯存者。四種被覆材質不論是在聚酯塑膠瓶 (PET) 或玻璃瓶 (Glass)、4 或 25 下有添加乾燥劑與脫氧劑者, 經 35 天貯存其存活

率均為脫脂奶粉 > 阿拉伯膠 > 明膠 > 水溶性澱粉, 其中以脫脂奶粉微膠囊化菌體置入有添加乾燥劑與脫氧劑之玻璃瓶中, 經 35 天 4 貯存, 菌數僅下降 0.13 Log cfu/g。

四、計畫成果自評

本研究以低溫噴霧乾燥進行雙叉桿菌之微膠囊化時, 菌體之存活率因所使用之脫脂奶粉、阿拉伯膠、明膠及水溶性澱粉被覆材質及其濃度, 噴霧乾燥機之出口溫度與雙叉桿菌菌株之不同而有所差異。大致而言, 噴霧乾燥時 *B. longum* 菌株之存活率均高於 *B. infantis* 菌株者。

本研究所得有關利用不同被覆材質(脫脂奶粉、阿拉伯膠、明膠及水溶性澱粉), 及在不同之出口溫度 (50、55、60) 下, 進行 *B. longum* B6 與 *B. infantis* CCRC 14633 之低溫噴霧乾燥微膠囊化後, 菌體之存活、耐酸、耐膽鹽性與貯存安定性等之探討, 除具學術意義外, 本研究所得之方法與條件更可作為實際製備保健性雙叉桿菌膳食補助品時之參考。

五、參考文獻

1. Arunachalam, K. D. 1999. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr. Res.* 19(10): 1559-1597.
2. Berrada, N., Lemeland, J. F., Laroche, G., Thovenot, P. and Piaia, M. 1991. Bifidobacterium from fermented milks : survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74: 409-413.
3. Benno, Y., Sawada K. and Mitsuoka T. 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol.* 28: 975-986.
4. Berrada, N., Lemeland, J. F., Laroche, G., Thovenot, P. and Piaia, M. 1991. Bifidobacterium from fermented milks : survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74: 409-413.
5. Blanchette, L. and Roy, D. 1995. Production of cultured cottage cheese dressing by bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 78:

- 1421-1424. *Carbohydr. Chem.* 16: 239-241.
6. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 84: 759-768.
 7. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int. J. Food Microbio.* 35: 1-27.
 8. Clark, P. A. and Martin, J. H. 1994. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods:
 - Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. *Cult. Dairy Prod. J.* 29(3): 18-21.
 9. Clark, P. A., Cotton, L. N. and Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods:
 - Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J.* 28(4): 11-14.
 10. Chung, H. S., Kim, Y. B., Chun, S. L. and Ji, G. E. 1999. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteris. *Int. J. Food Microbiol.* 47: 25-32. 18: 42-44.
 11. Collins, J. K., Thornton, G. and Sullivan, G. O. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* 8: 487-490.
 12. Fu, W. Y. and Etzel, M. R. 1995. Spray drying of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 and cellular injury. *J. Food Sci.* 60: 195-200.
 13. Gomes, A. M. P. and Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus* : biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 139-157.
 14. Rao, A., Shiwnarain, V. N. and Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Can. Inst. Food Technol. J.* 22: 345-349.
 15. Teixeira, P., Castro, H. and Kirby, R. 1995. Spray Drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 456-462.
 16. To, B. C. S. and Etzel, M. R. 1997a. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *J. Food Sci.* 62: 576-578.
 17. To, B. C. S. and Etzel, M. R. 1997b. Survival of *Brevibacterium linens* ATCC9174 after spray drying, freeze drying, or freezing. *J. Food Sci.* 62: 167-170.