

朱鹮双歧杆菌微胶囊的初步研制*

史怀平¹, 杨增岐¹, 王万云², 常秀云², 路保忠³, 任建设³, 范光丽¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省林业厅 野生动物保护处, 陕西 西安 710082;

3 陕西省洋县朱鹮饲养救护站, 陕西 洋县 723300)

[摘要] 从健康朱鹮粪便中分离出1株双歧杆菌, 经实验室鉴定为两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)。通过药敏试验发现, 该双歧杆菌对链霉素、卡那霉素等高度敏感, 但对青霉素类及诺氟沙星有耐药性; 动物致病性试验结果表明无致病性。利用此菌进行微胶囊研制, 同时进行了包埋效率、包埋产率、贮存稳定性、耐胃酸性、肠溶性等多项指标的测定, 结果表明该微胶囊包埋效率达到83.4%, 活菌数达到 $5.8 \times 10^{11} \text{ g}^{-1}$, 能抵抗胃酸, 有较好的肠溶性和一定的贮存稳定性。

[关键词] 朱鹮; 双歧杆菌; 微胶囊

[中图分类号] S858.9 [文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)04-0017-04

朱鹮(*Nipponia nippon*), 又称朱鹭或红鹤, 属鸟纲, 鹮形目, 鹮科, 是我国四大国宝之一, 以其稀少和外形美丽而闻名于世。目前, 朱鹮疾病的发生是朱鹮人工饲养与扩群过程中最难解决的问题, 每年因疾病死亡的朱鹮达20多只。在这些疾病中除少数传染病外, 以消化系统疾病(如消化不良, 腹泻等)最为常见。从微生物学角度^[1]来看, 疾病的发生是机体微生态失衡的结果。因此, 调节朱鹮失衡的消化道菌群, 对保证其正常的消化道功能, 减少或防止消化系统疾病极为重要。目前, 朱鹮的疾病通常采用抗菌药进行治疗, 而抗菌药的大量应用在很大程度上杀死了消化道的有益菌, 大大影响了朱鹮的健康状况。因此, 有必要选择合适的菌种, 研究开发出适用于朱鹮服用的微生态制剂, 以防止抗菌药的滥用, 从而提高朱鹮的机体免疫力, 减少朱鹮疾病的发生。基于此, 本试验特研制开发了朱鹮双歧杆菌微胶囊, 以利于防治朱鹮疾病, 尽快扩大其种群。

1 材料与方法

1.1 材料

两歧双歧杆菌: 由西北农林科技大学禽病研究室分离。

药敏纸片: 由上海高龙科技有限公司提供。

试验动物: 小白鼠, 由第四军医大学实验动物中心提供。

改良肉汤^[2]: 牛肉膏5g, 磷酸氢二钾1g, 蛋白胨10g, 氯化钠5g, 葡萄糖5g, 葡萄糖酸钙1g, 可溶性淀粉5g, 蒸馏水1000mL, 调pH为6.8~7.0, 灭菌后待用。

胶液: 无菌操作下准确制备50g/L海藻酸钠溶液。

固化液: 准确配制15g/L CaCl₂溶液, 121 高压蒸汽灭菌20min, 4 冰箱保存, 备用。

解囊液^[3]: 准确称取柠檬酸钠3g溶于200mL灭菌蒸馏水中, 配成pH为7.4的0.05mol/L柠檬酸钠解囊液。

生理盐水: 8.5g/L NaCl溶液, 高温灭菌。

人工胃液^[4]: 酵母膏1.25g, 蛋白胨2.5g, 乳糖0.5g, 吐温-80 0.5g, L-半胱氨酸0.05g, NaCl 1.0g, 蒸馏水500mL。将上述各种成分充分溶解后, 于121 高压蒸汽灭菌15min, 使用前用1mol/L HCl调节pH至2.5。

人工肠液^[4]: KH₂PO₄ 6.8g, 加水500mL溶解, 用4g/L NaOH调节pH为6.8; 另取胰酶10g, 加水适量使其溶解, 两液混合后, 加水稀释至1000mL。

* [收稿日期] 2004-09-21

[基金项目] 陕西省林业厅2003年科研课题计划项目

[作者简介] 史怀平(1974-), 男, 陕西宝鸡人, 在读硕士, 主要从事动物疫病防治研究。

[通讯作者] 杨增岐(1963-), 男, 陕西岐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事畜禽传染病研究。E-mail: yzq8162@163.com

1.2 方法

1.2.1 双歧杆菌的耐药性检测 用灭菌棉签将两歧双歧杆菌肉汤培养物涂抹于普通琼脂平板, 随后将药敏纸片贴压于普通平板上, 37℃ 培养 24 h 后进行观察。药敏纸片的种类有四环素、万古霉素、链霉素、庆大霉素、妥布霉素、红霉素、丁胺卡那霉素、氨苄青霉素、头孢唑啉、氯霉素、青霉素、复方磺胺类、卡那霉素、诺氟沙星。

1.2.2 动物急性毒性试验 取健康小白鼠 6 只, 随机分为试验组和对照组。试验组小白鼠腹腔注射两歧双歧杆菌肉汤纯培养物 0.5 mL (1×10^{10} mL⁻¹), 对照组小白鼠注射等量的生理盐水, 观察 7 d, 记录小白鼠生活情况。

1.2.3 双歧杆菌的增殖与处理 将两歧双歧杆菌接种于改良肉汤试管中, 放入 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h, 显微镜观察、检验纯度。若无杂菌生长, 则按 80~100 mL/L 的量接种于装有 250 mL 改良肉汤的盐水瓶中, 于 37℃ 恒温培养 48 h, 再次检验其纯度。之后, 用平板活菌计数法检测菌液浓度。

1.2.4 菌液浓度的检测 无菌吸取菌液 0.3 mL, 加入 2.7 mL 灭菌生理盐水中, 充分混匀, 依次做 10 倍逐级稀释, 取各稀释度的稀释液各 30 μ L, 均匀涂布于绵羊脱纤血琼脂平板上, 放入 37℃ 恒温培养箱中培养, 选择菌落数在 10~300 稀释度作为最后稀释倍数, 并取最后稀释倍数的稀释液 30 μ L, 均匀涂布于绵羊脱纤血琼脂平板上, 每个稀释液共做 3 个平板, 放入 37℃ 恒温培养箱培养 24~48 h, 观察计数。

菌液浓度/mL⁻¹ = (3 个平皿菌落数之和/3) $\times 10 \times$ 最后稀释倍数。

1.2.5 微胶囊的制备过程 在超净工作台内, 将 50 mL 双歧杆菌菌液加入 50 mL 50 g/L 海藻酸钠溶液中, 充分摇匀, 静置片刻, 便制成胶菌液。用无菌

玻璃注射器套上 8 号针头吸入胶菌液, 然后逐滴滴入适量的 15 g/L CaCl₂ 固化液中, 同时用磁力搅拌器不停搅拌, 固化 1 h 左右, 待湿微胶囊形成后, 用纱布过滤, 再用生理盐水冲洗 3 次, 最后平铺于滤纸上, 置 37℃ 温箱中烤干或常温下自然干燥。

1.2.6 微胶囊的检测 (1) 包埋效率^[4]。包埋效率 = (1- 微胶囊表面活菌数/产品中活菌数) $\times 100\%$ 。测定微胶囊表面活菌数时, 直接用 PBS (缓冲溶液) 溶解胶囊表层菌体, 进行活菌计数。测定产品中活菌数时, 将产品用解囊液溶解, 待完全溶解后计数。

(2) 包埋产率^[4]。包埋产率 = 产品中活菌数/加入的活菌数 $\times 100\%$ 。

(3) 耐胃酸性试验^[5]。方法 1: 将 1 g 微胶囊置于 37℃ 的人工胃液中保温并不断搅拌, 每隔 1 h 观察 1 次, 若胶囊无明显变化, 5 h 后取出, 用灭菌生理盐水洗涤至中性, 用解囊液溶解, 测定双歧杆菌活菌数, 并与未包埋的菌液进行比较。

方法 2: 取停饲 1 d 健康成年鸡的胃液 10 mL, 加入 2 g 微胶囊, 置于 37℃ 恒温培养箱中, 每隔 1 h 观察 1 次, 若胶囊无明显变化, 5 h 后取出, 用灭菌生理盐水洗涤至中性, 用解囊液溶解, 测定双歧杆菌活菌数, 并与未包埋的菌液进行比较。

(4) 肠溶性试验^[1]。将双歧杆菌微胶囊成品在模拟人工肠液中 37℃ 下保存, 并用磁力搅拌器搅拌, 观察胶囊有无变化, 待溶解后, 测定菌体存活率。

(5) 贮藏稳定性观察^[4]。将双歧杆菌微胶囊成品分别置于 4℃、室温下, 并于第 10, 20, 30 天测定活菌数。贮存中菌体存活率 = 贮存后产品中活菌数/原产品中活菌数 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 耐药性试验结果

两歧双歧杆菌药敏性试验结果见表 1。

表 1 两歧双歧杆菌药敏性试验结果

Table 1 Results of bacterial susceptibility tests

药敏纸片 Antimicrobial disk susceptibility tests	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibitory circle	药敏纸片 Antimicrobial disk susceptibility tests	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibitory circle
四环素 Decycline	18	氯霉素 Chloromycetin	26
万古霉素 Vancocin	22	青霉素 Penicillinum	0
链霉素 Streptomycinum	34	卡那霉素 Kanamycin	20
庆大霉素 Gentamycin	14	丁胺卡拉霉素 Amikacin	18
妥布霉素 Tenemycin	8	氨苄青霉素 Ampicillinum	0
红霉素 Erythromycinum	28	复方磺胺类 Compound sulfadiazine	30
头孢唑啉 Cefazolin	38	诺氟沙星 Norfloxacin	0

由表1可知, 两歧双歧杆菌对头孢唑啉、链霉素、红霉素、复方磺胺类、氯霉素、万古霉素、卡那霉素、丁胺卡拉霉素和四环素高度敏感, 对庆大霉素和妥布霉素中度敏感, 对青霉素、氨苄青霉素和诺氟沙星有耐药性。

2.2 动物急性毒性试验结果

连续观察小白鼠7d, 试验组和对照组小白鼠均精神良好, 活跃好动, 食欲正常, 未见明显的病理性体征。

2.3 菌液浓度测定结果

最后稀释倍数为 10^{10} , 3个平皿中菌落数分别为80, 96, 74个, 菌液浓度为 $8.3 \times 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ 。

2.4 微胶囊的检测结果

2.4.1 微胶囊的粒度 微胶囊干燥后为棕褐色, 均匀, 直径在0.5~1.0mm。

2.4.2 包埋效率 经计算, 包埋效率为83.4%。

2.4.3 包埋产率 经计算, 包埋产率为70%。

2.4.4 耐胃酸性试验结果 按方法1处理5h后未见胶囊溶解, 将其取出, 经测定活菌数为 $6.21 \times 10^{10} \text{ g}^{-1}$ 。按方法2处理5h后也未见胶囊溶解, 将其取出, 经测定活菌数为 $6.07 \times 10^{10} \text{ g}^{-1}$ 。

2.4.5 肠溶性试验结果 经磁力搅拌器搅拌30min后, 人工肠液变浑浊, 胶囊壁变软; 1h后胶囊完全溶解, 经测定, 活菌数为 $5.43 \times 10^{10} \text{ g}^{-1}$ 。

2.4.6 贮藏稳定性观察 观察结果见表2。由表2可知, 双歧杆菌微胶囊对于活菌的保存具有一定作用。第30天4℃保存的菌体存活率为0.016%, 室温保存的菌体存活率为0.007%, 可见两者保存不理想, 但4℃保存比室温效果较好, 两者活菌数都在 10^7 g^{-1} 以上。

表2 4℃和室温下贮存双歧杆菌胶囊成品的活菌数

Table 2 Living bacteria number of *Bifidobacterium microencapsulation* stored under 4℃ and room temperature g^{-1}

温度/ Temperature	贮藏时间/d Time of storages			
	0	10	20	30
4	5.8×10^{11}	2.5×10^{10}	5.4×10^9	9.6×10^7
室温 Room temperature	5.8×10^{11}	8.4×10^9	7.3×10^8	3.9×10^7

3 讨论

由于朱鹮是野生动物, 体内几乎或很少有耐药性细菌存在, 因此对于制作微生态制剂的菌株有必要检查其耐药性。通过药敏试验可知, 此双歧杆菌对许多药物敏感, 符合制作微胶囊的要求。另外, 动物试验结果也证明此菌株对动物无不良反应, 是一种很好的制作微胶囊的菌株。

双歧杆菌通过定植于宿主的肠粘膜上形成生物屏障而发挥其生理作用^[1,5]。首先, 它必须通过胃环境以大量的存活菌到达肠道, 并定植于肠粘膜上, 但由于胃酸的杀菌作用, 双歧杆菌的活菌数在此过程中会大幅度下降。因此, 为了保护双歧杆菌制品中的活菌数, 拟采用微胶囊化技术, 将双歧杆菌与氧气等外界不利的环境分开, 防止胃液破坏。另外, 微胶囊能掩盖双歧杆菌特有的不良气味, 提高适口性, 可方便地添加到饲料中^[6]。正是基于以上目的, 本研究利用海藻酸钠作为胶囊材料, 对所分离到的两歧双歧杆菌进行微胶囊研制, 成功制备出了棕褐色的、直径

为0.5~1.0mm的微胶囊, 为朱鹮疾病防治提供了一种新型的微生态制品, 对保护朱鹮这一珍稀物种有重要意义。

目前, 针对朱鹮双歧杆菌体外增殖条件的研究较少, 对适用于朱鹮双歧杆菌生长的温度、pH值、培养基的碳源和氮源及生长因子的选择等尚需进一步研究。本试验选用了普通蛋白胨水、肉汤、改良肉汤培养基, 经过相同的时间和温度培养后, 在改良肉汤培养基中的双歧杆菌生长较好, 菌液浓度达到 10^9 mL^{-1} 以上, 比另外2种培养基高, 因此选用改良肉汤培养基作为双歧杆菌的体外增殖培养基。

本研究制得的微胶囊包埋效率达到83.4%, 活菌数达到 $5.8 \times 10^{11} \text{ g}^{-1}$, 完全达到了专家推荐的剂量标准^[7](每克双歧杆菌成品中应含活菌 10^6 以上才可起到保健作用)。但是从贮藏稳定性观察试验中可知, 该微胶囊在室温下贮藏30d后, 活菌数已由 $5.8 \times 10^{11} \text{ g}^{-1}$ 下降至 $3.9 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$, 说明其贮藏稳定性不甚理想, 还需在囊材的选择、菌液浓度及添加营养剂等方面进一步研究, 以提高其贮藏稳定性。

[参考文献]

- [1] 郭兴华. 益生菌基础与应用[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2002
- [2] 张德纯, 周广, 赖国旗, 等. 正常动物肠菌群的微囊化及保质观察[J]. 中国微生态学杂志, 1996, 8(5): 17- 18
- [3] 李晓卉, 蒋元生, 裴青生. 鸡源双歧杆菌微囊化及存活率的研究[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2000, 30(5): 8
- [4] 曹永梅, 许时婴. 微胶囊化双歧杆菌产品的特性[J]. 食品工业, 2001, (3): 28- 29
- [5] 田洪涛, 王占武, 张柏林, 等. 双歧杆菌微生态制剂保藏技术研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2000, (3): 74- 77
- [6] 曹永梅, 许时婴. 微胶囊技术在双歧杆菌中的应用[J]. 食品科技, 2000, (5): 8- 11
- [7] 苏世彦. 双歧杆菌的胶囊化研究[J]. 彭城职业大学学报, 1998, 13(4): 106- 108

Research on microencapsulation of bifidobacterium in *Nipponia nipponia*

SHI Huaiping¹, YANG Zengqi¹, WANG Wan-yun², CHANG Xu-yun²,
LU Bao-zhong³, REN Jian-she³, FAN Guang-li¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Animal Protection Unit of Shaanxi Provincial Forestry Department, Xi'an, Shaanxi 710082, China;

3 *Nipponia nipponia* Feeding and Fescuing Unit of Yang County of Shaanxi Province, Yangxian, Shaanxi 723300, China)

Abstract: Bifidobacterium isolated from the fresh droppings of healthy *Nipponia nipponia* was identified *B. bifidum*. It was sensitive to kanamycin and streptomycin while resistant to penicillin and norfloxacin. Challenge test showed that Bifidobacteria *B. bifidum* had nothing harmful to mice. Then the living bifidobacterium was encapsulated with alginate sodium. After that a multiple of indexes were determined, including the rate of covering, the preservation stability and anti-gastric acid and enteric tests. The results showed that the microcapsules were anti-gastric acid, enteric, stable in preservation, and the rate of covering was approximately 83.4% and the survival numbers were $5.8 \times 10^{11} \text{ g}^{-1}$. It will make a solid foundation for further study on the microcapsule suitable for *Nipponia nipponia*.

Key words: *Nipponia nipponia*; *Bifidobacterium*; microencapsulation