

微囊化蜡样芽孢杆菌的喷雾干燥工艺优化

黄乐天¹, 曹丁¹, 黄魁英¹, 郑克平², 潘亮君³ (1. 广东省广州市微生物研究所, 广东广州 510000; 2. 广东省广州市华元生物科技有限公司, 广东广州 510000; 3. 广东省广州市华琪生物科技有限公司, 广东广州 510000)

摘要 [目的] 提高蜡样芽孢杆菌在压力喷雾干燥过程中的存活率, 优化喷雾干燥工艺。[方法] 以微囊化的蜡样芽孢杆菌为材料, 考察进风温度、进料流量、料液比、喷枪孔径等对喷雾细胞存活数的影响。[结果] 当进风温度为 140 ℃, 进料流量为 1.5 t/h, 料液比为 1:5, 喷枪孔径为 2.5 mm 时, 蜡样芽孢杆菌的存活率最高, 达 81%。[结论] 该研究确定了蜡样芽孢杆菌的最佳喷雾干燥工艺条件。

关键词 蜡样芽孢杆菌; 压力喷雾干燥; 工艺优化

中图分类号 S188; S-3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)20-06546-03

Optimization of Spray-Drying Process Conditions for Microencapsulated *Bacillus cereus*

HUANG Le-tian et al (Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510000)

Abstract [Objective] The spray-drying conditions were optimized for increasing the viability of microencapsulated *Bacillus cereus* by pressure spray-drying. [Method] A experimental design was constructed with air inlet temperature, feed flow rate, nozzle diameter and solid-liquid ratio as the independent variables and total viable counts as the dependent variables. [Result] The optimum spray-drying conditions for the production of maximally viable microencapsulated *Bacillus cereus* were air inlet temperature 140 ℃, feed flow rate 1.5 t/h, nozzle diameter 2.5mm, solid-liquid ratio 1:5, which the survival rate of *Bacillus cereus* was 81%. [Conclusion] The optimum spray-drying conditions for the production of maximally viable microencapsulated *Bacillus cereus* was determined.

Key words *Bacillus cereus*; Pressure spray drying; Optimization

蜡样芽孢杆菌是土壤中的优势菌, 具有作为益生菌的潜在能力, 同时也是条件致病菌, 能引起食物中毒等^[1-3]。我国已对食源性蜡样芽孢杆菌毒力基因开展了研究^[4], 也有学者构建毒力基因缺失的蜡样菌株^[5]。无毒蜡样芽孢杆菌属于益生菌, 可产生抗菌物质^[6], 具有超强的生物抑菌效应, 抑制有害微生物的繁殖, 属新型绿色微生态胃肠调节药物, 且无抗药性, 无毒副作用, 可用于禽畜养殖方面。蜡样芽孢杆菌进入肠道后, 消耗肠道内的过多氧气, 创造厌氧环境, 促进厌氧菌的生长, 调整肠道菌群失调, 改善微生态环境, 达到适于有益厌氧菌生存、抑制有害好氧菌的目的。

喷雾干燥是通过机械作用, 将需要干燥的物料, 分散成很细的微粒, 经过雾化后的液滴与热空气充分接触, 在瞬间将大部分水分除去, 使物料中的固体物质干燥成粉末。根据雾化方式的不同, 喷雾干燥可分为离心喷雾干燥法、压力喷雾干燥法、气流式喷雾干燥法 3 种。压力喷雾干燥是利用高压泵, 在 7~25 MPa 的高压条件下将液料送入压力式雾化器(喷枪)雾化成小液滴, 此方法操作简单, 稳定, 控制方便, 容易实现自动化作业。喷雾干燥法已被用于去除原料中水分, 广泛用于食品、药品、化工、各种肥料的干燥与造粒。

蜡样芽孢杆菌喷雾粉最重要的技术指标是其活菌数, 为此, 笔者利用压力喷雾干燥, 对经微囊化后的无毒蜡样芽孢杆菌进行干燥处理, 并对压力喷雾干燥中的主要影响因素: 进风温度、进料流量、喷枪孔径、料液比等进行了正交优化试验, 确定其最佳喷雾干燥工艺条件。

1 材料与方

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌。蜡样芽孢杆菌由广州市微生物研究所实验

基金项目 广州市民生科技重大专项(201300000067; 201300000068)。
作者简介 黄乐天(1981-), 男, 江西波阳人, 中级工程师, 硕士, 从事微生物发酵研究。

收稿日期 2014-06-13

室自行分离筛选所得。

1.1.2 培养基。斜面和摇瓶培养基: LB 培养基。种子培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 葡萄糖 10 g/L, NaCl 5 g/L, 葡萄糖 20 g/L。发酵培养基: 为广州市微生物研究所实验自行设计。

1.1.3 喷雾辅料(囊材)。麦芽糊精(DE 值为 15)、水溶性淀粉购自广州泰昌生物科技有限公司。

1.1.4 主要设备及仪器。发酵罐(规格为 50, 500, 5 000 L)为广州市微生物研究所发酵工程技术研究中心提供; 压力喷雾干燥机、显微镜、电子天平等。

1.2 试验方法

1.2.1 喷雾料液的准备。蜡样芽孢杆菌发酵液的制备: 从冻干保存管接种到试管斜面, 培养温度为 37 ℃, 时间为 48 h, 再将试管斜面挑取少量菌体到三角瓶中, 三角摇瓶置于摇床内振荡培养, 37 ℃、200 r/min 培养 10 h, 然后接种到发酵罐, 经过 50, 500, 5 000 L 逐级扩大培养, 发酵液内细胞形成芽孢并脱落时, 停止培养。

喷雾辅料的添加:在上述发酵液中按各试验所需的比例添加不等量的辅料(麦芽糊精和淀粉), 充分搅拌均匀, 并溶解完全, 作为喷雾干燥试验用料液。

1.2.2 细胞计数。取 1 g 喷雾粉, 用 9 ml 生理盐水溶解, 常温下电磁搅拌 30 min, 然后用生理盐水经一系列的稀释。取稀释后的一定量菌液, 倾入 LB 琼脂板上, 37 ℃ 培养 48 h, 培养后, 记录皿上的菌落数(CFU)。细胞数量以 cfu/g 计。

喷雾粉的存活率按下式表示:

$$V(\%) = N/N_0$$

式中, N_0 、 N 分别表示喷雾干燥前后的总活菌数。

1.2.3 喷雾干燥。采用压力喷雾干燥设备, 以下各试验进风流量均保持在 40 000 m³/h, 空气压力为 0.5 MPa。喷雾过程料液保持低速搅拌, 以保证料液的质量均一。

1.2.4 进风温度对细胞存活率的影响。采用同一批发酵液作为喷雾料液,添加辅料使料液比为 1:5,喷嘴孔径为 2.0 mm,进料流量为 1.0 t/h,分别将进风温度调至 170、160、150、140、130 ℃,取样检测喷雾菌粉的活菌数,并比较各温度条件下细胞的存活率。

1.2.5 进料流量对细胞存活率的影响。采用同一批发酵液作为喷雾料液,添加辅料使料液比为 1:5,喷嘴孔径为 2.0 mm,进风温度为 150 ℃,分别将进料流量调至 0.7、0.9、1.1、1.3、1.5 t/h,取样检测喷雾菌粉的活菌数,并比较各流量下细胞的存活率。

1.2.6 喷枪孔径对细胞存活率的影响。采用同一批发酵液作为喷雾料液,添加辅料使料液比为 1:5,进料流量为 1.5 t/h,进风温度为 150 ℃,分别使用不同孔径的喷嘴,规格分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 mm,取样检测喷雾菌粉的活菌数,并比较各流量下细胞的存活率。

1.2.7 料液比对细胞存活率的影响。采用同一批发酵液作为喷雾料液,进料流量为 1.5 t/h,喷嘴孔径为 2.0 mm,进风温度为 160 ℃,分别将料液比调至 1:40、1:20、1:10、1:5、1:4,取样检测喷雾菌粉的活菌数,并比较各流量下细胞的存活率。

1.2.8 最佳喷雾工艺的确定。通过预试验的结果,确定进风温度、进料流量、喷嘴孔径、料液比为影响细胞存活率的因素,采用正交试验确定蜡样芽孢杆菌最佳存活率的喷雾条件,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,分别以进风温度、进料流量、喷嘴孔径、料液比作为试验因素,每个因素设置 3 个水平,以确定最佳喷雾工艺。

2 结果与分析

2.1 进风温度对细胞存活率的影响 喷雾干燥是将料液雾化成液滴后与热空气充分接触,在瞬间蒸发掉大部分水分。当进料流量一定的条件下,进风温度的高低直接影响到喷塔内的温度和出风温度^[7],设定进风温度为 130、140、150、160、170 ℃时,出风温度相应为 70、77、83、90、96 ℃。由于干燥时间极短,大量水分蒸发吸热使得粉粒温度在极短时间内急剧下降,若进风温度过高,水分蒸发后粉粒的温度仍处于高位,不利于细胞存活,即出风温度过高会对微生物产生长时间热激反应,使得细胞内的高分子物质发生不可逆变性,导致细胞失活。由图 1 可知,进风温度高于 150 ℃时,细胞存活率会显著下降,细胞存活率与进风温度成反向关系。为了保证喷雾效果,出风温度不宜超过 80 ℃。

2.2 进料流量对细胞存活率的影响 进料流量增大,单位时间内需要蒸发的水分就会增多,消耗的空气热量也会增多,出风温度就降低,细胞存活率也变高。由图 2 可知,进料流量为 0.9 t/h 时,出风温度为 86 ℃,此温度下细胞的存活率较低。进料流量越大,细胞存活率越高,两者呈正比关系,流量从 0.7 t/h 至 1.5 t/h 时,细胞损失数显著减少,存活率提高了 77%。但进料流量过大也不利,此时存活率没有得到进一步提升,相反喷雾粉的残水量增多,贴壁现象严重,使得回收率和保质期受到影响,粉尘的流动性差,颗粒粒径增大。

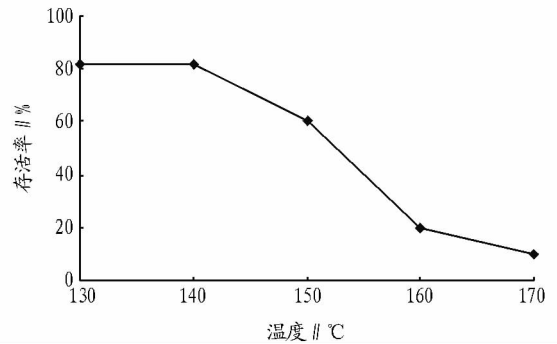


图 1 进风温度对细胞存活率的影响

所以应综合考虑选择适宜的进料流量。

另一方面,当雾化器孔径确定时,进料流量的变化易引起高压泵压力的变化。该试验中,流量为 0.7 t/h 时料液压力为 9.1 MPa,而流量为 1.5 t/h 时料液压力上升到 12.7 MPa,特别在喷枪孔径较小时,此种变化更显著(数据没有显示)。微生物细胞对外界压力具有一定的耐受范围,当超出其耐受范围,细胞膜会破裂,导致其失活。

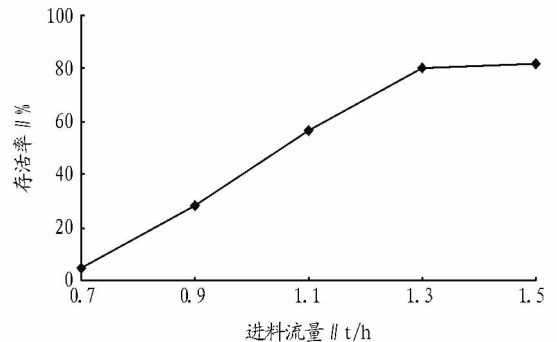


图 2 进料流量对细胞存活率的影响

2.3 喷枪孔径对细胞存活率的影响 喷枪孔径越小,雾化效果越好,但喷枪孔径也直接影响到料液高压泵的压力变化,孔径的微小变化能引起料液压力的巨大变化,压力过高会导致细胞失活,同时增加了设备的负担。该试验中,料液流量为 1.5 t/h,喷枪孔径为 1.0、1.5、2.0 mm 时,料液的压力分别为 33.4、22.5、12.7 MPa,喷枪孔径与压力的关系可以通过物料平衡和伯努利公式推出(没有显示)。压力过高,极易导致细胞失活,由图 3 可知,当外界压力在 20 MPa 以上时,细胞的存活率降低。

为了保证喷雾干燥菌粉的细胞存活率在 70% 以上,喷枪孔径适宜在 2.0 mm 以上。但喷枪孔径也不能太大,否则雾化效果不好,水分干燥不彻底,喷雾粉残水量大,粉尘粒径偏大,易贴壁,影响产品得率。

2.4 料液比对细胞存活率的影响 喷雾干燥能用于多种微生物或食品的微囊化处理,微囊化既可增强产品的功能效果、提高保质期,也可以减少细胞在喷雾干燥过程中受到高温的损伤。该试验采用常用的辅料麦芽糊精和淀粉作为蜡样芽孢杆菌微囊化的材料。

由图 4 可知,当囊材数量偏少时,喷雾干燥的辅料保护作用不明显,料液比为 1:40 时,喷雾效果很差,其中一个原

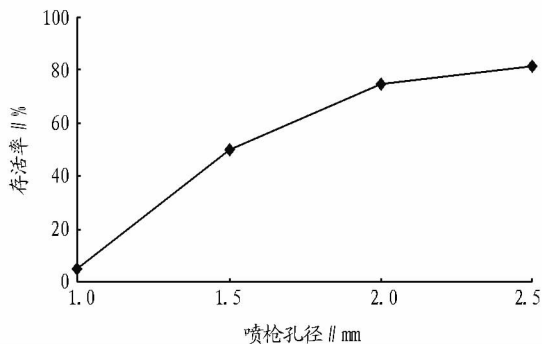


图3 喷枪孔径对细胞存活率的影响

因是辅料没有起到包埋菌体的作用或包埋效果不好。另外,料液中的固形物浓度高低会影响高压泵的压力大小,试验发现当料液比越高时(其他喷雾条件不变),高压泵的压力会相应变高,当料液比为1:40、1:5时,高压泵的压力分别为8.3、13.2 MPa。当料液比达到一定值时,其对喷雾粉细胞存活率的影响作用不明显,此时辅料已经完全起到包埋效果,不宜再增加辅料量,过高的料液比反而会增加高压泵的承受负担及细胞的外受压力,影响细胞存活率。

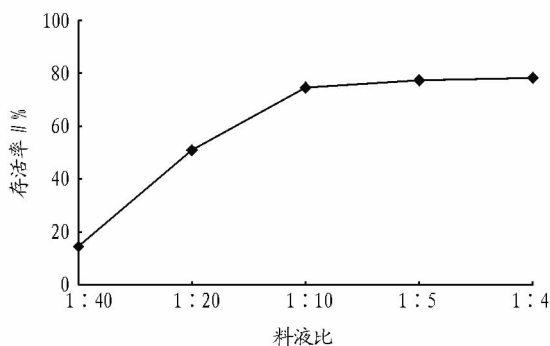


图4 料液比对细胞存活率的影响

2.5 蜡样芽孢杆菌最佳存活率的喷雾工艺优化 通过上述预试验,选取进风温度(A)、进料流量(B)、料液比(C)、喷枪孔径(D)作为正交试验中的4个影响因素,各因素选取3个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交设计(表1),试验结果见表2。

表1 正交试验的因素与水平

水平	因素			
	进风温度(A) ℃	进料流量(B) t/h	料液比 (C)	喷枪孔径(D) mm
1	140	0.7	1:20	1.5
2	150	1.0	1:10	2.0
3	160	1.5	1:5	2.5

由表2可知,4个因素中料液流量对存活率的影响最大,进风温度次之,喷枪孔径的影响第3,料液比的影响最小,即 $B > A > D > C$ 。以细胞存活率为考察目标,最佳喷雾干燥条件为 $A_1 B_3 C_3 D_3$,即进风温度140℃,进料流量1.5 t/h,料液比为1:5,喷枪孔径为2.5 mm。

由于最优组合不在正交试验表中,因此需要进一步验证优化工艺的可靠性。按照最佳喷雾工艺条件进行验证试验,喷雾粉的细胞存活率为81%,高于正交试验(表2)的结果,因此选择的最佳工艺条件可行。

表2 蜡样芽孢杆菌喷雾干燥最佳工艺优化结果

试验号	A	B	C	D	存活率//%
1	3	3	3	1	50.6
2	3	1	2	3	7.3
3	2	3	1	3	61.2
4	1	1	1	1	18.9
5	1	3	2	2	72.1
6	1	2	3	3	31.8
7	2	1	3	2	15.6
8	3	2	1	2	11.4
9	2	2	2	1	17.2
K_1	40.93	13.93	30.50	28.90	
K_2	31.33	20.13	32.20	33.03	
K_3	23.10	61.30	32.67	33.43	
R	17.83	47.37	2.17	4.53	

3 结论与讨论

(1) 该研究利用麦芽糊精和淀粉对蜡样芽孢杆菌微囊化处理,然后用压力喷雾干燥机对其进行干燥。结果发现,喷雾的进风温度、进料流量、料液比、喷枪孔径等因素对细胞存活率均有影响,其中进风温度和进料流量对存活率的影响较大,两者主要是通过影响出风温度进而影响到细胞的存活情况,当出风温度高于80℃时,细胞的存活率明显降低。料液比的大小影响细胞的包裹效果,从而影响细胞的耐温能力,当料液比低于1:20时,细胞失活率明显增大(>50%)。喷枪孔径能显著改变高压泵压力(即料压),料压过大易造成细胞膜损伤,引起细胞失活,料压最好不要高于20 MPa。

(2) 通过正交试验,得到细胞存活率最佳的喷雾干燥工艺条件为进风温度140℃,进料流量1.5 t/h,料液比为1:5,喷枪孔径为2.5 mm,此条件下细胞存活率达81%。

(3) 喷雾干燥工艺除考察细胞存活率指标外,喷雾粉的含水量、回收率、物理化学特性(如粉尘粒径、流动性、水活性、吸湿性、溶解性、玻璃化温度等)等也是影响产品质量的重要指标^[8],如喷雾粉的水活性会影响其保质期,喷嘴孔径影响粉尘粒径等,这些问题需要进一步的研究及优化。

参考文献

- [1] 张伟伟,鲁隼,张金兰,等. 食品中蜡样芽孢杆菌的研究进展[J]. 中国酿造,2010(5):1-4.
- [2] 孟红岩,李家洪,石磊. 一起蜡样芽孢杆菌食物中毒的调查[J]. 中国消毒学杂志,2012(6):536-537.
- [3] 徐静,梁继新,牛晓虹,等. 一起细菌性食物中毒的实验室结果分析[J]. 疾病监测与控制,2009(9):533.
- [4] 庄子慧,何丽,郭云昌,等. 我国食源性蜡样芽孢杆菌毒力基因和药物敏感性研究[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(3):198-201.
- [5] 吴威,郑经成,闫广谋,等. 蜡样芽孢杆菌 ATCC14579 毒力基因 *plcR* 缺失株的构建及其一般特性[J]. 基因组学与应用生物学,2010(4):658-664.
- [6] 侯雨文,韩春艳. 蜡样芽孢杆菌对大肠杆菌的体外抑制研究[J]. 中国畜禽种业,2007(3):51-52.
- [7] SOLMAZ B J,CHRISTOS S,LINA Y,et al. Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748[J]. Drying Technology,2013,31(11):1274-1283.
- [8] DAN Y Y,MEI C P,LUZ S,et al. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage[J]. Journal of Food Science,2010,75(9):588-595.