

海藻酸钠-魔芋葡甘聚糖微胶囊对嗜酸乳杆菌 CGMCC1.2686 保护研究

赵萌, 蔡沙, 屈方宁, 方亚鹏

(湖北工业大学菲利普斯亲水胶体研究中心, 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430068)

摘要: 研究了海藻酸钠 (ALG)-魔芋葡甘聚糖 (KGM) 微胶囊对嗜酸乳杆菌 CGMCC1.2686 的保护效果, 特别是 KGM 分子量对微胶囊保护乳酸菌效果的影响。利用酶法制备不同分子量 KGM, 将不同分子量 KGM 与 ALG 复配, 采用内源乳化法制备乳酸菌微胶囊, 测定微胶囊物理特性和乳酸菌保护效果各指标。结果发现, ALG 与 KGM 复配, 增大了微胶囊粒径 (由 309 μm 至 412~452 μm), 且微胶囊粒径随 KGM 分子量的增加而增加; 复配微胶囊机械强度、粘弹性、乳酸菌包埋率、模拟胃液菌体存活率及胆盐菌体存活率均大于 ALG 微胶囊, 其中中等分子量 KGM-ALG 微胶囊在上述五项指标中均表现最优; 回归分析表明, 模拟胃液菌体存活率和胆盐菌体存活率与 ALG-KGM 微胶囊机械强度正相关。因而, ALG 与 KGM 复配提高了微胶囊对乳酸菌的保护效果, 同时该保护效果与 KGM 分子量大小相关。

关键词: 微胶囊; 内源乳化法; 机械强度; 乳酸菌; 海藻酸钠; 魔芋葡甘聚糖

文章编号: 1673-9078(2015)2-70-75

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.013

Alginate-konjac Glucomannan Microcapsule Preparation and Protective Effect on *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686

ZHAO Meng, CAI Sha, QU Fang-ning, FANG Ya-peng

(Glyn O. Phillips Hydrocolloids Research Centre at HUT, Hubei Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: In this study, the physical properties of alginate (ALG)-konjac glucomannan (KGM) microcapsules and their protective effect on *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 (LAB), particularly the impact of KGM molecular weight were investigated. KGM fractions with different molecular weights were prepared by enzymatic degradation. Mixtures of KGM with different molecular weights and ALG were used as composite wall material to encapsulate LAB via the emulsification/internal gelation method. The capsule mean size increased from 309 μm to between 412 and 452 μm after the addition of KGM to ALG and the mean diameter increased with increasing molecular weight of KGM. Compared to ALG microcapsules, all ALG-KGM microcapsules showed greater mechanical strength, viscoelasticity, encapsulation yield, and LAB survival rate in simulated gastric juice (SGJ) and bile salts (BS). Additionally, microcapsules prepared from intermediate-molecular weight KGM exhibited the highest values for these five indices. Regression analysis showed that survival rates in SGJ and BS positively correlated with mechanical strength of the ALG-KGM composite microcapsules. In conclusion, mixing ALG and KGM enhanced the protective effect of microcapsules on LAB, which in turn, was correlated with KGM molecular weight.

Key words: microencapsulation; emulsification/internal gelation; mechanical strength; lactic acid bacteria; sodium alginate; konjac glucomannan

乳酸菌微胶囊保护一直是食品科学与工程领域的

收稿日期: 2014-07-21

基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目 (2012FFB00705); 湖北省教育厅科学研究计划项目 (Q20141401); 湖北工业大学博士科研启动基金项目 (BSQD12051)

作者简介: 赵萌 (1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 功能性食品组分的保护及增益

通讯作者: 方亚鹏 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品胶体

研究热点, 但由于乳酸菌对酸、温度、氧和外力等环境因素高度敏感, 以及乳酸菌菌株个体差异性较大, 其有效包埋方法仍在探索中^[1]。内源乳化法是近年来兴起的一种海藻酸钠微胶囊制备方法, 已陆续成功包埋乳酸菌、胰岛素、活性酶、卡介苗、胰岛细胞、海藻等生物活性组分, 该方法具有粒径可控、工艺易放大等优点, 且制备过程中使用的都是无毒试剂和溶剂, 因而内源乳化法可用来制备物理特性可控的乳酸菌微

胶囊^[2]。

海藻酸钠 (ALG), 是由 α -L-古罗糖醛酸 (G) 和 β -D-甘露糖醛酸 (M) 两种单体通过 (1→4) 糖苷键连接形成的线性嵌段共聚高分子, 免疫原性低、生物相容性好, 常用于包埋乳酸菌。但单一海藻酸钠对乳酸菌的保护效果一般, 复合壁材能填充海藻酸钠凝胶的多孔结构, 可有效提高微胶囊对乳酸菌的保护效果^[1]。魔芋葡甘聚糖 (KGM), 是主链由 D-甘露糖和 D-葡萄糖以 β -1,4 糖苷键链接的杂多糖, 来源于中国特色经济作物魔芋, 因其具有良好的成膜、热稳定性、酸稳定等特性, 而作为微胶囊壁材来包埋核酸^[3]、胰岛素^[4]、酶^[5]、精油^[6]等生物活性物质, 同时广泛应用于食品加工中, 以改善食品口感、硬度和色泽等品质^[7-8]。Wang 等比较了 ALG 和 ALG-KGM 胰岛素微胶囊的各项特性, 发现添加 KGM 使得电镜下微胶囊结构更加紧实, 同时提高了微胶囊中胰岛素的载药量^[4]。因而, 本文将考察 ALG 与 KGM 复配微胶囊对乳酸菌的保护效果。

另一方面, KGM 分子量可能会对 ALG-KGM 微胶囊对乳酸菌保护效果产生重大影响。Yang 等添加少量吐温 80, 将不同粘度的 KGM 水解物做壁材, 通过乳化-喷雾干燥过程制备甜橙油微胶囊, 研究发现中等粘度 (200 mPa) KGM 水解物对甜橙油包埋率最高^[6]。Chen 等通过小鼠实验, 发现 KGM 和 KGM 水解物均大大提高了小鼠肠道短链脂肪酸含量、双歧杆菌数目, 而与原始 KGM 相比, KGM 水解物益生效果更优^[9]。因而, 本文进一步考察了 KGM 分子量对 ALG-KGM 微胶囊保护乳酸菌效果的影响。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 菌种

嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus* CGMCC1.2686) 购自中国普通微生物保藏管理中心。

1.1.2 培养基

MRS 培养基: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、牛肉浸膏 10 g、酵母浸膏 5 g、醋酸钠 5 g、磷酸氢二钾 2 g、柠檬酸三铵 2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g、吐温 80 1 mL、水 1 L、pH 6.8~7.0。

1.1.3 主要试剂

ALG 由美国 FMC BioPolymer 公司提供; KGM 由武汉清江魔芋制品有限公司提供; 纳米级 $CaCO_3$ 为分析纯, 购自中国上海振欣试剂厂; 3 号胆盐、胃蛋白酶 (3000 U/mg) 和其它试剂均为分析纯, 购自

国药集团化学试剂有限公司。

1.1.4 主要溶液

模拟胃液 (SGJ): NaCl 0.2% (*m/m*), 用盐酸调 pH 至 2.0, 灭菌后, 加入一定量的胃蛋白酶 (0.32% *m/m*);

胆盐溶液 (BS): 磷酸二氢钾 0.68% (*m/m*), 胆盐 1.0% (*m/m*), 用氢氧化钠调 pH 至 6.8, 灭菌备用;

磷酸盐-氯化钠缓冲溶液 (PS): pH 7.0, 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠 0.1 M, 氯化钠 0.9% (*m/m*), 灭菌备用。

1.2 主要仪器设备

Mastersizer 2000 激光粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; Haake Rheostress 6000 旋转流变仪, 美国 Scientific 公司; PT-MR 2100 高速剪切乳化机, 瑞士 Kinematica 公司; SXJQ-1 数显直流无级调速搅拌器, 郑州长城科工贸有限公司; TGL-20M 台式高速冷冻离心机, 长沙平凡仪器仪表有限公司; HZWS 智能恒温恒湿箱, 无锡华泽科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌体的收集

MRS 培养基中, 37 °C 下静置培养嗜酸乳杆菌 24 h, 冷冻离心 10 min (4 °C、8000 g), 弃上清, 用无菌生理盐水洗涤菌泥两次后, 重悬于无菌生理盐水中。此时控制菌悬液细胞个数在 10^9 CFU/mL 左右。

1.3.2 不同分子量 KGM 的制备

配制 KGM 溶胶 (2% *m/m*), 加入纤维素酶进行酶解制备不同分子量的 KGM, 具体纤维素酶添加量见表 1, 在转速为 100 r/min 的摇床中 55 °C 下反应 6 h, 沸水浴中灭酶 10 min。

1.3.3 乳酸菌微胶囊的制备

内源乳化法制备乳酸菌微胶囊的过程主要参照文献中^[10-11]的方法, 并在此基础上有所改变。称取一定量的 ALG、KGM 和碳酸钙粉末, 缓慢加入水中, 60 °C 下机械搅拌 (250 r/min) 3 h, 配制含 3% ALG、0.6% KGM 和 37.5 mM 碳酸钙的混合液; 取 20 mL 上述混合液与 10 mL 菌体悬浮液, 混合均匀; 将其加入到含 1% span 的 70 mL 大豆油中, 300 r/min 搅拌 15 min, 形成油包水液滴; 加入 20 mL 大豆油 (含 0.18 g 冰醋酸, 酸钙摩尔比值为 4), 100 r/min 搅拌 30 min, 进行微胶囊固化; 加入 200 mL PS 溶液, 静置 30 min; 吸走上层油相, 分液漏斗分层, 弃去油层, 待大部分油滴除去后, 过滤得 ALG-KGM 微胶囊。ALG 微胶囊制备过程中没有添加 0.6% KGM, 其余条件与

ALG-KGM 微胶囊相同。

1.3.4 ALG-KGM 乳酸菌微胶囊粒径特性的测定

通过激光粒度分析仪 (Marstersizer 2000) 来测定微胶囊粒径大小和粒径跨度系数。用超纯水做分散剂, 折光率、样品折射率和吸收率分别设定为 1.33、1.52、0.1。粒径跨度系数 $=[D(v, 90)-D(v, 10)]/D(v, 50)$, 其中 $D(v, 90)$ 、 $D(v, 10)$ 和 $D(v, 50)$ 分别代表直径在 90%、10% 和 50% 处的微胶囊累积体积。

1.3.5 ALG-KGM 乳酸菌微胶囊机械强度和粘弹性的测定

微胶囊机械强度和粘弹性均在 Haake RheoStress 6000 旋转流变仪进行测定, 采用平行板钛合金转子 P60 TiL, 实验温度为 25.0 ± 0.1 °C。机械强度通过压迫试验来测定: 取 3 g 微胶囊平铺于平行板上, Gap 初始间距设为 1 mm, 结束距离设为 0.15 mm, 以 0.005 mm/s 速度下压, 采集下压过程中的法向应力值。微胶囊粘弹性以其弹性储能模量 (G') 和粘性损耗模量 (G'') 来表征, 通过应力-应变扫描实验和小振幅动态频率扫描实验来进行测定: 应力-应变扫描实验确定线性粘弹区范围, 频率设定为 1 Hz, 应变设定为 0.1%~1000%; 小振幅动态频率扫描: 测定体系的弹性储能模量 (G') 和粘性损耗模量 (G'') 随角频率 ω 的变化, 扫描频率范围为 0.1~100 rad/s, 设定对数模式采集数据点。

1.3.6 乳酸菌包埋率的测定

乳酸菌包埋率的测定主要参照文献中^[10-11]的方法。将 1 g 微胶囊加入到 9 g PS 溶液中, 用高速均质机 (10000 r/min, 30 s) 破碎该微胶囊混合液, 摇床中 37 °C、100 r/min 下摇晃 30 min。取 1 mL 该破碎混合液, 用 PS 溶液稀释后, 涂布于 MRS 培养基上, 37 °C、厌氧条件下培养 48 h 后计数, 计算乳酸菌活细胞包埋数。同时, 取包埋前菌悬液, 稀释、涂布平板、培养计数, 计算细胞总菌数。乳酸菌包埋率 (EY) 可表示为:

$$EY = \frac{\text{乳酸菌活细胞包埋数}}{\text{细胞总菌数}} \times 100\%$$

1.3.7 模拟胃液菌体存活率的测定

模拟胃液菌体存活率的测定主要参照文献中^[10-11]的方法。将 1 g 微胶囊加入到 9 g 模拟胃液 (SGJ) 中, 摇床中 37 °C、100 r/min 下温育 2 h; 用高速均质机 (10000 r/min, 30 s) 破碎该微胶囊混合液; 取 1 mL 破碎混合液于 4 °C、10000 g 的条件下冷冻离心 20 min, 弃去上清液, 加入 1 mL PS 溶液振荡均匀, 稀释、涂布平板、培养计数, 计算模拟胃液乳酸菌存活数。同

时, 以生理盐水替换模拟胃液, 其它步骤不变, 计算空白对照中菌体存活数。模拟胃液菌体存活率可表示为:

$$\text{模拟胃液菌体存活率} = \frac{\text{模拟胃液乳酸菌存活数}}{\text{空白对照中乳酸菌存活数}} \times 100\%$$

1.3.8 胆盐菌体存活率的测定

胆盐菌体存活率的测定主要参照文献中^[10-11]的方法。将 1 g 微胶囊加入到 9 g 胆盐溶液 (BS) 中, 摇床中 37 °C、100 r/min 下温育 0.5 h 后; 用高速均质机 (10000 r/min, 30 s) 破碎该微胶囊混合液; 取 1 mL 破碎混合液于 4 °C、10000 g 的条件下冷冻离心 20 min, 弃去上清液, 加入 1 mL PS 溶液振荡均匀, 稀释、涂布平板、培养计数, 计算胆盐溶液乳酸菌存活数。同时, 以生理盐水替换胆盐溶液, 其它步骤不变, 计算空白对照中菌体存活数。胆盐菌体存活率可表示为:

$$\text{胆盐菌体存活率} = \frac{\text{胆盐乳酸菌存活数}}{\text{空白对照中乳酸菌存活数}} \times 100\%$$

1.3.9 数据分析与处理

实验数据差异显著性用 SPSS 17.0 软件进行分析, ANOVA 程序用于方差分析, 当 $p \leq 0.05$ 时认为平均值之间有显著差异。回归分析使用 Excel 2007 中的“数据分析-回归”来确定模型方程, 相关系数 R 表示变量之间的密切关系, R 越接近 1, 表明变量之间的线性关系越密切。

2 结果与讨论

2.1 不同分子量 KGM 的制备

表 1 GPC-MALLS 测定的 KGM 的分子量

KGM	KGM-0	KGM-1	KGM-2	KGM-3	KGM-4
酶底比(U/g)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4
重均分子量 Mw	8.11×10^5	7.36×10^5	2.04×10^5	1.03×10^5	8.03×10^3

纤维素酶是复合酶, 主要由 3 种酶组成: 内切 β -1,4-葡聚糖酶、外切 β -1,4-葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶^[12]。纤维素酶法降解 KGM 的主要原理为: 利用内切 β -1,4-葡聚糖酶对 KGM 中的 β -1,4-葡萄糖苷键的破坏作用, 将 KGM 切割成许多短链。该方法简单易行, 在文献中多次报道^[6]。由表 1 可以看出, 通过设定不同的酶底比梯度, 成功将 KGM 从起始分子量 8.11×10^5 降解到 8.03×10^3 , 且各组分间分子量成梯度下降的趋势。为区分各组分区别, 将各组分由分子量从大到小的顺序命名为 KGM-0、KGM-1、KGM-2、KGM-3、KGM-4。

2.2 微胶囊的粒径特性

表 2 ALG-KGM 微胶囊的平均粒径和粒径跨度系数

Table 2 Mean diameter and span factor of ALG-KGM

microcapsules		
微胶囊	平均粒径/ μm	粒径跨度系数
ALG+KGM-0	452 \pm 54 ^a	1.28 \pm 0.02 ^a
ALG+KGM-1	480 \pm 35 ^a	1.11 \pm 0.06 ^a
ALG+KGM-2	489 \pm 39 ^a	1.13 \pm 0.08 ^a
ALG+KGM-3	472 \pm 51 ^a	1.10 \pm 0.08 ^a
ALG+KGM-4	412 \pm 9 ^a	1.22 \pm 0.05 ^a
ALG	309 \pm 22 ^b	0.80 \pm 0.05 ^b

注：表中数据为均值 \pm 标准误差，n=3；a-b同列中具有不同字母者为组内差异显著（P<0.05）。

如表 2 所示，ALG 微胶囊平均粒径为 309 μm ，当向 ALG 中添加 KGM 后，ALG-KGM 微胶囊粒径显著增加至 412~489 μm ，但不同分子量 KGM-ALG 微胶囊间的粒径差异不显著。同样地，与 ALG 微胶囊相比，ALG-KGM 微胶囊粒径跨度系数显著增加，KGM 分子量对 KGM-ALG 微胶囊间的粒径跨度系数影响不显著。Silva 等利用内源乳化法制备胰岛素微胶囊，同样得到了复配微胶囊粒径和粒径跨度系数均大于单一壁材微胶囊的实验结果^[13]。

2.3 微胶囊的机械强度

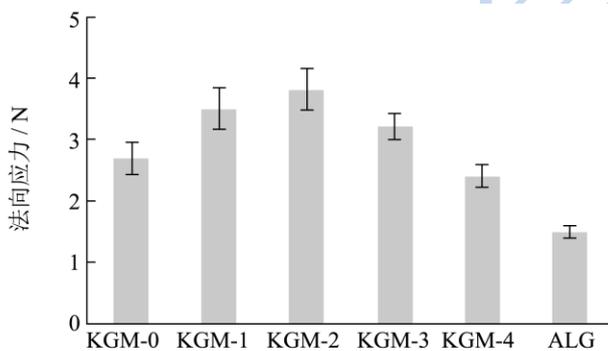


图 1 乳酸菌微胶囊在间距 0.15 mm 处的法向应力值

Fig.1 Values of normal stress when each LAB microcapsule is at a distance of 0.15 mm

通过压迫实验，在旋转流变仪上测定了各微胶囊在间距 0.15 mm 处的法向应力值，以此来表征微胶囊机械强度。如图 1 所示，添加 KGM 后，所有 ALG-KGM 微胶囊的机械强度比 ALG 微胶囊都有所增加，而随着 KGM 分子量的减小，ALG-KGM 微胶囊机械强度呈现先增大后减小的变化规律，具体微胶囊机械强度排序如下：KGM-2>KGM-1>KGM-3>KGM-0>KGM-4>ALG。

2.4 微胶囊的粘弹性

通过小振幅动态扫描实验，测定了微胶囊在角频率 0.1~100 rad/s 范围内的弹性储能模量 (G') 和粘性损耗模量 (G'')，来表征微胶囊粘弹性。如图 2 所示，对 6 种乳酸菌微胶囊而言，在角频率扫描范围内， G' 均大于 G'' ，同时 G' 基本保持恒定，这是弹性体物质的典型特征，也证明了本文中的微胶囊已凝胶化。为清晰比较 6 种乳酸菌微胶囊的粘弹性大小，特将 $\omega=1$ rad/s 时的微胶囊 G' 和 G'' 值做成表格，如表 3 所示。加入 KGM 后，复配微胶囊粘弹性均增大；而随着 KGM 分子量的减小，ALG-KGM 微胶囊的粘弹性呈现出先增大后减小的趋势，这与 ALG-KGM 微胶囊机械强度的变化趋势相同。

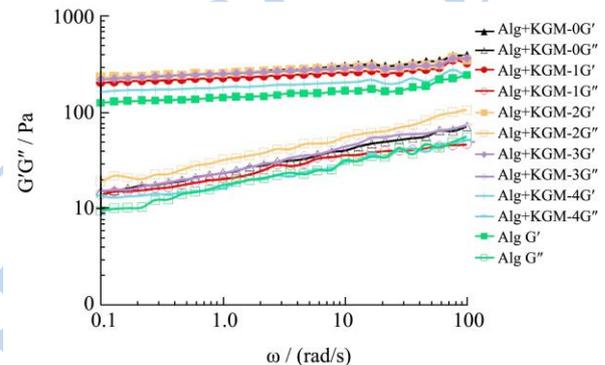


图 2 乳酸菌微胶囊的粘弹性曲线

Fig.2 Viscoelasticity of LAB microcapsules

表 3 乳酸菌微胶囊在 $\omega=1$ rad/s 时的 G' 和 G'' 值

Table 3 Values of G' and G'' at $\omega=1$ rad/s for different

microcapsules		
微胶囊	G'/Pa	G''/Pa
ALG+KGM-0	230.5	20.3
ALG+KGM-1	257.8	23.5
ALG+KGM-2	258.7	32.1
ALG+KGM-3	252.9	23.3
ALG+KGM-4	183.9	17.6
ALG	144.1	16.3

2.5 微胶囊的乳酸菌包埋率

表 4 中列出了各微胶囊乳酸菌包埋率，可以看出，添加 KGM 显著提高了微胶囊的菌体包埋率。这可能与 KGM 的粘附性相关，Wang 等报道了向 ALG 添加 KGM 显著提高了微胶囊中胰岛素载药量^[4]，与本文结果相似。另外，KGM 分子量也影响了 ALG-KGM 微胶囊的菌体包埋效果，随着 KGM 分子量减小，微胶囊菌体包埋率呈现先增加后减小的趋势。同样地，Yang 等以 KGM 水解物为壁材，通过乳化-喷雾干燥

制备甜橙油微胶囊, 研究发现中等粘度 KGM 水解物的包埋率最高^[6]。这可能是由于高分子量的 KGM 极大地增加了 ALG 溶胶粘度, 不利于乳化液滴形成, 低分子量的 KGM 失去了成膜能力, 不能将乳酸菌有效包裹在微胶囊内。

表 4 乳酸菌微胶囊的包埋率

Table 4 Encapsulation yield of LAB microcapsules

微胶囊	乳酸菌活细胞包埋数/个	总菌数/个	包埋率/%
ALG+KGM-0	8.5±0.4×10 ⁸	5.5±0.1×10 ⁹	15.5±0.7 ^d
ALG+KGM-1	1.2±0.1×10 ⁹	6.0±0.1×10 ⁹	19.4±0.7 ^b
ALG+KGM-2	1.4±0.1×10 ⁹	6.3±0.2×10 ⁹	22.2±1.2 ^a
ALG+KGM-3	1.0±0.1×10 ⁹	5.9±0.3×10 ⁹	17.4±1.0 ^c
ALG+KGM-4	6.5±0.4×10 ⁸	4.7±0.3×10 ⁹	13.7±1.1 ^e
ALG	3.0±0.1×10 ⁸	4.3±0.5×10 ⁹	7.0±0.8 ^f

注: 表中数据为均值±标准误差, n=3; a-f同列中具有不同字母者为组内差异显著 (P<0.05)。

2.6 微胶囊模拟胃液菌体存活率

表 5 乳酸菌微胶囊及自由菌的模拟胃液菌体存活率

Table 5 Survival rates of LAB within LAB microcapsules and as free bacteria in SGJ

微胶囊	模拟胃液乳酸菌存活数/个	空白对照中乳酸菌存活数/个	模拟胃液菌体存活率/%
ALG+KGM-0	1.1±0.1×10 ⁸	1.7±0.1×10 ⁹	6.5±0.2 ^d
ALG+KGM-1	1.5±0.1×10 ⁸	2.0±0.1×10 ⁹	7.8±0.2 ^b
ALG+KGM-2	1.8±0.1×10 ⁸	2.2±0.1×10 ⁹	8.2±0.2 ^a
ALG+KGM-3	1.2±0.1×10 ⁸	1.8±0.1×10 ⁹	6.9±0.2 ^c
ALG+KGM-4	7.7±0.2×10 ⁷	1.3±0.1×10 ⁹	6.0±0.1 ^e
ALG	1.2±0.2×10 ⁷	2.2±0.1×10 ⁸	5.5±0.3 ^f
自由菌	2.7±1.5×10 ²	2.7±0.5×10 ⁸	1.0±0.5×10 ^{-4g}

注: 表中数据为均值±标准误差, n=3; a-g同列中具有不同字母者为组内差异显著 (P<0.05)。

如表 5 所示: 通过微胶囊包埋, 模拟胃液菌体存活率提高了 10⁴ 个数量级, 在酸胁迫条件下较好地保护了乳酸菌; 与 ALG 微胶囊相比, ALG-KGM 微胶囊模拟胃液菌体存活率都有一定程度的提高; KGM 分子量影响了 ALG-KGM 微胶囊的模拟胃液菌体存活率, 随着 KGM 分子量减小, 微胶囊菌体包埋率呈现先增加后减小的趋势。由于机械强度是一项重要的微胶囊物理特性, 故进一步对微胶囊模拟胃液菌体存活率和机械强度进行回归分析。如图 3 所示, 通过 Excel 2007 进行一元线性回归分析, 得到微胶囊模拟胃液菌体存活率与机械强度的线性回归方程为 $y=1.194x+3.412$, 其中, 相关系数 $R=0.96207>R(0.05,$

$4)=0.81140, F=49.745, P=0.002<0.05$, 表明该回归方程显著且微胶囊模拟胃液菌体存活率与机械强度正相关。与本文结果类似, Sandoval 等报道了在酸奶和模拟胃液中, *Lb. casei* 的存活率与微胶囊机械强度正相关^[14]。这主要是由于微胶囊机械强度越大, 结构越坚实, 溶胀越小, 微胶囊对乳酸菌的酸保护效果越好。

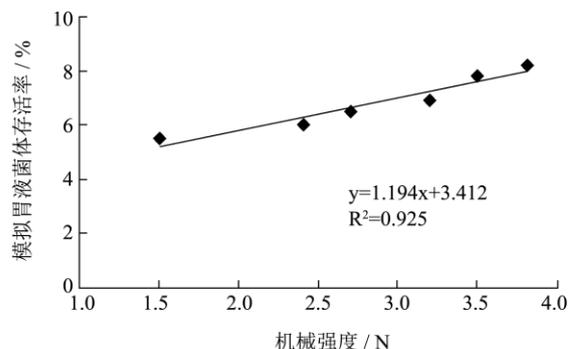


图 3 ALG-KGM 微胶囊机械强度与模拟胃液菌体存活率的相关性曲线

Fig.3 Correlation curve between cell survival rate in SGJ and mechanical strength of ALG-KGM microcapsules

2.7 微胶囊胆盐菌体存活率

表 6 乳酸菌微胶囊及自由菌的胆盐菌体存活率

Table 6 Cell survival rate of LAB within different microcapsules and as free bacteria in BS

微胶囊	胆盐乳酸菌存活数/个	空白对照乳酸菌存活数/个	胆盐菌体存活率/%
ALG+KGM-0	1.8±0.2×10 ⁵	3.3±0.3×10 ⁸	5.3±0.4×10 ^{-2d}
ALG+KGM-1	4.1±0.1×10 ⁵	4.2±0.3×10 ⁸	9.8±0.6×10 ^{-2b}
ALG+KGM-2	6.3±0.3×10 ⁵	5.5±0.1×10 ⁸	11.4±0.5×10 ^{-2a}
ALG+KGM-3	2.5±0.2×10 ⁵	3.8±0.4×10 ⁸	6.6±0.8×10 ^{-2c}
ALG+KGM-4	9.3±0.4×10 ⁵	3.0±0.4×10 ⁸	3.1±0.5×10 ^{-2e}
ALG	2.4±0.2×10 ⁵	1.9±0.4×10 ⁸	1.3±0.3×10 ^{-2f}
自由菌	3.8±0.5×10 ²	5.5±0.5×10 ⁸	6.9±1.2×10 ^{-5g}

注: 表中数据为均值±标准误差, n=3; a-g同列中具有不同字母者为组内差异显著 (P<0.05)。

胆盐是人体消化系统中的重要物质, 具有抑菌性, 故我们通过测定胆盐菌体存活率来表征微胶囊对乳酸菌的保护作用。如表 6 所示: 与自由菌相比, 微胶囊胆盐菌体存活率提高了 10³ 个数量级, 说明微胶囊包埋可有效阻碍胆盐对乳酸菌的伤害; 与 ALG 微胶囊相比, ALG-KGM 微胶囊胆盐菌体存活率都有一定程度的提高; KGM 分子量影响了 ALG-KGM 微胶囊的胆盐胃液菌体存活率, 随着 KGM 分子量减小, 微胶囊菌体包埋率呈现先增加后减小的趋势。同样地, 我们对微胶囊胆盐菌体存活率和机械强度进行了回归分

析。如图4所示,通过Excel 2007进行一元线性回归分析,得到微胶囊胆盐菌体存活率与机械强度的线性回归方程为 $y=4.453x-6.442$, 其中, 相关系数 $R=0.96412 > R(0.05, 4)=0.81140$, $F=52.752$, $P=0.002 < 0.05$, 表明该回归方程显著且微胶囊胆盐菌体存活率与机械强度正相关。

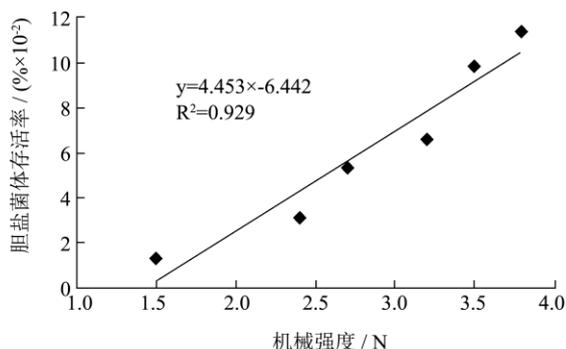


图4 ALG-KGM 微胶囊机械强度与胆盐菌体存活率的相关性曲线

Fig4 Correlation curve between cell survival in BS and mechanical strength of ALG-KGM microcapsules

综合表5和表6中的实验结果,我们可以看出:1)在模拟胃液和胆盐中,KGM与ALG复配后提高了微胶囊对乳酸菌的保护效果,这与Zou等人采用相同内源乳化法包埋乳酸菌的研究结果相同^[13],这是由于复合壁材能填充海藻酸钠凝胶的多孔结构,使海藻酸钠结构更结实、更稳定;2)KGM分子量影响了ALG-KGM微胶囊对乳酸菌的保护效果,这可能是由于不同分子量KGM与ALG相互作用方式不同造成的。如图5所示,高分子ALG易于KGM发生相分离,微胶囊机械强度较弱;低分子ALG片段状存在,与ALG相互作用较弱,微胶囊机械强度较弱;中等分子KGM,与ALG相容性较好,可发生部分缠结,从而具有较高的机械强度。

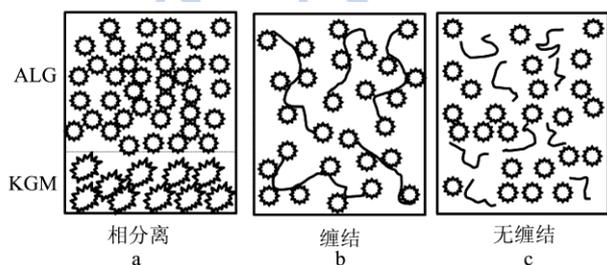


图5 不同分子量KGM与ALG作用方式

Fig5 Interactions between different molecular weight KGMs and ALG

注: a: 高分子KGM, b: 中分子KGM, c: 低分子KGM。

3 结论

本研究以不同分子量的KGM与ALG复配,通过内源乳化法制备乳酸菌微胶囊,表征了微胶囊粒径特性、机械强度、粘弹性等物理特性,并测定了微胶囊的乳酸菌包埋率、模拟胃液菌体存活率、胆盐菌体存活率等指标。结果发现:ALG与KGM复配,增大了微胶囊粒径、机械强度、粘弹性、乳酸菌包埋率、模拟胃液菌体存活率及胆盐菌体存活率,提高了微胶囊对乳酸菌的保护效果;同时,KGM分子量大小影响了ALG-KGM微胶囊对乳酸菌的保护效果,其中中等分子量KGM-ALG微胶囊具有最高的乳酸菌包埋率、模拟胃液菌体存活率和胆盐菌体存活率,这可能是与不同分子量KGM与ALG作用方式不同造成的。

参考文献

- [1] Burgain J, Gaiani C, Linder M, et al. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications [J]. Journal of Food Engineering, 2011, 104(4): 467-483
- [2] 赵萌,蔡沙,屈方宁等.内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的研究进展[J].食品工业科技,2013,22:392-396
ZHAO Meng, CAI Sha, QU Fang-ning, et al. Research progress of emulsification/internal gelation technology for the preparation of alginate microcapsules [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 22: 392-396
- [3] Wen X, Wang T, Wang Z, et al. Preparation of konjac glucomannan hydrogels as DNA-controlled release matrix [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 42(3): 256-263
- [4] Wang K, He Z. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 244(1-2): 117-26
- [5] Wang R, Xia B, Li BJ, et al. Semi-permeable nanocapsules of konjac glucomannan-chitosan for enzyme immobilization [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 364(1): 102-107
- [6] Yang J, Xiao J, Ding L. An investigation into the application of konjac glucomannan as a flavor encapsulants [J]. European Food Research and Technology, 2009, 229(3):467-474
- [7] 李莉,陈沐.风味魔芋豆腐产品研制[J].现代食品科技,2005, 1:101-102
LI Li, CHEN Mu. Study on the special flavour rivier giantarm products [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 1: 101-102
- [8] 谷绒.无糖魔芋保健蛋糕的研制[J].现代食品科技,2012, 12: 1785-1787

- GU Rong. Preparation of sugar-free konjac health cake [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 12: 1785-1787
- [9] Chen H, Fan Y, Chen M, Chan Y. Unhydrolyzed and hydrolyzed konjac glucomannans modulated cecal and fecal microflora in Balb/c mice [J]. Nutrition, 2005, 21(10): 1059-1064
- [10] Cai S, Zhao M, Fang Y, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO₃ as calcium sources [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 295-300
- [11] Zou Q, Zhao J, Liu X, et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification internal gelation [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(8): 1672-1678
- [12] Phitsuwan P, Laohakunjit N, Kerchoechuen O, et al. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy [J]. Folia Microbiologica, 2013, 58(2): 163-176
- [13] Silva CM, Ribeiro AJ, Ferreira D, et al. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation [J]. European Journal of Pharmaceutical Science, 2006, 29(2): 148-159
- [14] Sandoval CO, Lobato CC, Garcia GH. Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt [J]. Food Research International, 2010, 43(1): 111-117