

耐热型罗伊氏乳杆菌液态微胶囊的制备及其体外模拟消化特性

冯明星, 管军军*, 崔耀明

(河南工业大学生物工程学院, 河南郑州 450000)

摘要: 为了提高罗伊氏乳杆菌的耐热性, 该研究以麦芽糊精与磷脂作为复合壁材, 对其进行包埋处理形成罗伊氏乳杆菌液态微胶囊。结果表明: 随磷脂、麦芽糊精浓度增加及乳化时间的延长, 微胶囊的包埋率、EAI、ESI 及电位绝对值呈先增加后减小的趋势 ($P<0.05$), 平均粒径呈先减小后增加的趋势 ($P<0.05$)。通过响应面设计得到该微胶囊最佳制取工艺: 磷脂添加量 14.83% (m/m), 麦芽糊精溶液质量分数 15% (m/m), 乳化时间 86.39 min, 包埋率为 99.11%。罗伊氏乳杆菌微胶囊热处理后其活菌数明显提高 ($P<0.05$)。体外模拟消化试验显示, 胃消化阶段, 肠消化阶段活菌数随时间逐渐增多 ($P<0.05$), 2 h 后微胶囊活菌数达到 1.85×10^8 CFU/mL。综上, 由麦芽糊精、磷脂复合壁材制备的罗伊氏乳杆菌液态微胶囊包埋效果良好, 提高了罗伊氏乳杆菌的耐热性和胃肠道存活率。研究结果为罗伊氏乳杆菌微胶囊的生产应用提供理论依据。

关键词: 罗伊氏乳杆菌; 微胶囊; 耐热性; 消化特性

文章编号: 1673-9078(2024)02-54-65

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.0172

Preparation of Heat-resistant *Lactobacillus reuteri* Liquid Microcapsules and Assessment of Their *in Vitro* Simulated Digestion Characteristics

FENG Mingxing, GUAN Junjun*, CUI Yaoming

(College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: To improve the heat resistance of *Lactobacillus reuteri*, maltodextrin and phospholipid were used as composite wall materials. These constituents were embedded to encapsulate *L. reuteri*, resulting in the formation of liquid microcapsules. The results showed that, as the concentrations of phospholipids and maltodextrin increased and the emulsification time was prolonged, the encapsulation efficiency, EAI, ESI, and absolute potential values of microcapsules demonstrated a trend of first increasing and then decreasing ($P<0.05$). Concurrently, the average particle size demonstrated a trend of first decreasing and then increasing ($P<0.05$). The optimal preparation process for the microcapsules, obtained through response surface design, was as follows: 14.83% (m/m) phospholipid, 15% (m/m) maltodextrin, emulsification time of 86.39 minutes, and embedding rate of 99.11%. The number of viable bacteria in the *L. reuteri* microcapsules was

引文格式:

冯明星,管军军,崔耀明.耐热型罗伊氏乳杆菌液态微胶囊的制备及其体外模拟消化特性[J].现代食品科技,2024,40(2):54-65.

FENG Mingxing, GUAN Junjun, CUI Yaoming. Preparation of heat-resistant *Lactobacillus reuteri* liquid microcapsules and assessment of their *in vitro* simulated digestion characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 54-65.

收稿日期: 2023-02-18

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1300300)

作者简介: 冯明星 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 2649567689@qq.com

通讯作者: 管军军 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: junjunguan@163.com

significantly increased after heat treatment ($P<0.05$). *In vitro* simulated digestion experiments showed that, during the gastric digestion stage, the number of viable bacteria gradually increased over time ($P<0.05$), and after 2 h, the quantity of viable bacteria in the microcapsules reached 1.85×10^8 colony-forming units/mL. In conclusion, liquid microcapsules of *L. reuteri* prepared using the composite wall material of maltodextrin and phospholipid demonstrated a good embedding effect, and they improved the heat resistance and gastrointestinal survival rate of *L. reuteri*. These data provide a theoretical basis for the production and application of *L. reuteri*.

Key words: *Lactobacillus reuteri*; microcapsules; heat resistance; digestive properties

益生菌在维持肠道菌群和阻止致病微生物在肠道定植方面起着重要作用^[1]。罗伊氏乳杆菌是一种存在于人和动物肠道中的重要益生菌，具有很强的肠黏附能力^[2]，能产生独特的抗菌物质罗伊氏菌素，抑制大肠杆菌、沙门氏菌等有害细菌的生长，维持肠道健康而不对正常菌群产生不良影响等^[3]。近年来，罗伊氏乳杆菌应用于酸奶、豆奶、酸奶和冰淇淋，除此之外，罗伊氏乳杆菌还可以取代抗生素作为生物防腐剂，并被添加到饲料、乳制品和肉制品中^[4]，但是在生产、加工、储存、运输、销售、消费等过程中，受到温度、食品成分（高酸、高盐、添加剂等）和宿主的消化系统（胃酸、消化酶等）的影响^[5]，导致活菌数量下降。磷脂是一种天然的表面活性剂，具有亲水基团和亲油基团，可作为乳化剂稳定剂。麦芽糊精具有糊粘度高、溶解性好、增稠稳定性强等特性。研究表明^[6-8]，采用微胶囊包埋技术可显著提高菌体对不利环境的耐受力^[8]，增加菌体进入肠道内的存活数量。

目前益生菌微胶囊技术有喷雾干燥、冷冻干燥、乳化法等^[9]。喷雾干燥法是一种通过热干燥介质使液体从液体形态转变为粉末颗粒，该过程在热气流的条件会降低菌体的存活率；而冷冻干燥是指通过升华从冻结的生物产品中去掉水分或其他溶剂的过程，样品在冷冻过程中水分由于热胀冷缩会破坏菌体细胞，而且冷冻干燥技术耗时长成本高；乳化法是一种化学包埋方法，将益生菌和壁材料溶液混合搅拌形成稳定的水油乳液^[10]。将益生菌进行微囊化，从而形成液体微胶囊。因为大多数益生菌通常是亲水性的该方法可以维持乳化液体系的平衡，从而提高微胶囊的包埋率，该方法工艺流程简单，便于工业化生产。由于加工的需要，对罗伊氏乳杆菌耐热性的研究很有必要，王巧丽等^[11]和张巧玲^[12]对罗伊氏乳杆菌在 65 °C 处理 2 h 活菌数为 5×10^8 CFU/mL 和 75 °C 处理 30 s 活菌数为 3.54×10^9 CFU/mL。对菌体

存活的影响，目前通过微胶囊化提高其耐热性的研究尚不多见。

为了提高罗伊氏乳杆菌在更高温度加工的存活数量，本试验在前期研究的基础上^[13]，以磷脂和麦芽糊精作为耐热保护剂，制备罗伊氏乳杆菌液态微胶囊，探讨 70~100 °C 对罗伊氏乳杆菌存活的影响，并研究罗伊氏乳杆菌液态微胶囊的包埋效果、电位、粒径、微观结构等，为罗伊氏乳杆菌微胶囊的生产应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

MT476913 罗伊氏乳杆菌，河南省工业微生物菌种保藏与繁育工程实验室（河南郑州）；黄豆，郑州永辉公园茂超市采购；磷脂，郑州四维科技有限公司；金龙鱼大豆油，益海粮油工业有限公司；胃蛋白酶（10 000 NFU/mg），生工生物工程（上海）股份有限公司；脂肪酶（活性 20 000 U/g），索莱宝生物科技有限公司；胰蛋白酶（10 000 NFU/mg），生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.2 主要设备

JJ-CJ-1FD 超净工作台，广州瑞丰实验设备有限公司；DSX-30L 手提式高压蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂；JP-100A-2 高速离心机，永康市久品工贸有限公司；TGL-16B 离心机，上海安亭科学仪器厂；85-2 磁力搅拌器，河南智诚科技发展有限公司；NANOS90 纳米粒度仪，英国马尔文仪器有限公司；Zata 电位分析仪，英国马尔文仪器有限公司；SPX-250B 智能型生化培养箱，常州讯生仪器有限公司；BH200 生物显微镜，舜宇光学科技集团有限公司；722N 分光光度计，上海精科实业有限公司；HH-4 恒温水浴锅，河南智诚科技发展有限公司；SHB 循环水式多用真空泵，郑州长城科工贸有限公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基

MRS 液体培养基：蛋白胨 10 g、牛肉浸膏 10 g、酵母浸膏 5 g、葡萄糖 20 g、乙酸钠 5 g、吐温 -80 1 mL、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、磷酸氢二钾 2 g、 $C_6H_4N_2O_7$ 2 g。去离子水 1 000 mL，用盐酸调节 pH 值为 6.2~6.4，于 121 °C 下高温灭菌 20 min。

MRS 固体培养基：在 MRS 液体培养基加入 18 g 琼脂，于 121 °C 下高温灭菌 20 min。

1.3.2 菌泥的制备

菌种活化，第一次活化，在 100 mL MRS 液体培养基中加 1 mL 菌种，37.0 °C 静置培养 14 h；第二次活化，在 100 mL MRS 液体培养基中加 3 mL 第一次活化菌液，37.0 °C 静置培养 14 h。取 4 mL 第二次活化的菌液，接种到 100 mL MRS 液体培养基中，37.0 °C 静置培养 14 h，5 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀得菌泥。

1.3.3 酶解大豆蛋白的制备

根据参考文献^[14]稍有改进，操作如下：

大豆分离蛋白 (Soybean Protein Isolate, SPI) 的制备：大豆进行清理除去石子等杂物，粉碎过 80 目筛，石油醚脱去脂肪，将脱脂大豆粉与蒸馏水 1:10 (*m/m*) 进行混合，搅拌 1 h，2 mol/L NaOH 调 pH 值为 8.0，50 °C 水浴 1 h，5 000 r/min 离心 30 min，取上清液用 2 mol/L HCl 调 pH 值为 4.8，4 °C 存放过夜，次日 5 000 r/min 离心 50 min，取出沉淀物用蒸馏水进行混合均匀，调 pH 值为 7.0，冷冻干燥后得 SPI。

酶解大豆蛋白 (Enzymatic Hydrolysate of Soybean Protein Isolate, ESP) 的制备：配置质量分数 3% 的 SPI 溶液，调 pH 值为 2.0 后 37 °C 搅拌 10 min，加入胃蛋白酶 (酶与底物比 1:100) 进行酶解反应，保持 pH 值恒定不变，2 h 后停止反应，调节 pH 值为 7.0 灭酶冷冻干燥后得酶解大豆蛋白。

1.3.4 模拟胃液与肠液的制备

根据参考文献^[15]稍有改进，操作如下：

模拟胃液，称取 10 g 氯化钠加蒸馏水溶解，用 1.5 mol/L HCl 将 pH 值调至 1.5，转入 500 mL 容量瓶中定容加入 0.2 g 的胃蛋白酶，现用现配。

模拟肠液，称取 6.8 g 的磷酸氢二钾加蒸馏水溶解，再加入 8.57 g 胆汁，用 1 mol/L NaOH 将 pH 值调至 7.4，转入 1 000 mL 容量瓶中定容加入 2 g

胰蛋白酶与 2 g 脂肪酶，现用现配。

1.3.5 罗伊氏乳杆菌液态微胶囊的制备

取 1 g 菌泥与 2 g 酶解大豆蛋白放入平底烧瓶中，1 000 r/min 真空搅拌 20 min。加入磷脂 6 g 和 10 g 大豆油，再加入麦芽糊精溶液 20 g 和 1 g 甘油，真空 (-0.1 MPa) 搅拌 90 min 后，得到罗伊氏乳杆菌液态微胶囊，于 4 °C 冰箱中储存。

1.3.6 包埋率的测定

将罗伊氏乳杆菌微胶囊样品进行适当的稀释，然后进行菌落计数为 N_0 ，再将样品进行适当的稀释然后进行离心取下清液，平板计数法进行菌落计数为 N 。包埋率 (ME)^[16]：

$$A = 1 - \frac{N}{N_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

A ——包埋率，%；

N ——离心下清液的菌落总数，CFU/mL；

N_0 ——微胶囊样品的菌落总数，CFU/mL。

1.3.7 粒径、Zeta电位的测定

将罗伊氏乳杆菌液态微胶囊样品用蒸馏水稀释 1 000 倍，取出 1 mL 在 25 °C 条件下，使用马尔文粒径测定仪与 Zeta 电位测定仪，测定微胶囊的粒径与 Zeta 电位。

1.3.8 乳化活性指数 (EAI) 与乳化稳定指数 (ESI) 测定

根据参考文献^[17,18]，罗伊氏乳杆菌液态微胶囊用 0.10% 十二烷基硫酸钠稀释 1 000 倍数，以质量分数 0.10% 十二烷基硫酸钠为空白组调零，500 nm 波长处测定，记录 0 min 与 30 min 时的吸光值，分别记为 A_0 与 A_{30} 。吸光度在 0.2~0.8 之间。计算乳化稳定指数 (End System Identifier, ESI)、乳化活性指数 (Emulsification Activity, EAI)：

$$B = \frac{A_0}{A_0 - A_{30}} \times 30 \quad (2)$$

式中：

B ——乳化稳定指数 (ESI)，min；

A_0 ——0 min 时的吸光度；

A_{30} ——30 min 时的吸光度。

$$C = 2 \times T \times \frac{n \times A_0}{\rho \times 10000 \times \varphi} \quad (3)$$

式中：

C ——乳化活性指数 (EAI)， m^2/g ；

T —常数 2.303；

n —稀释倍数；

ρ —乳液蛋白质质量分数，5%；

φ —油质质量分数，%。

1.3.9 显微观察

罗伊氏乳杆菌液态微胶囊进行稀释 10 倍，用光学显微镜观察，然后将样品涂布固定，革兰氏染色法进行染色，结晶紫染色 1 min，碘液媒染 1 min，体积分数 95% 的乙醇脱色 30 s，沙皇复染 1 min，并在 16×40 和 16×100（油镜）下拍照。

1.3.10 响应面优化设计

根据单因素试验结果，以磷脂含量 g (A)、麦芽糊精浓度 % (B)、乳化时间 min (C) 作为考察因素，每个因素三个水平（表 1），以包埋率为响应值，采用三因素三水平进行响应面分析，建立二次多元回归方程，得到最佳工艺条件并进行 3 次验证。

表 1 因素与水平表

Table 1 Single factors and horizontal table

因素	水平		
	-1	0	1
A	5	6	7
B	10	15	20
C	60	90	120

1.3.11 耐热性试验

取 1 g 罗伊氏乳杆菌液态微胶囊用蒸馏水稀释 10 倍，在 70、85 和 100 °C 下分别处理 30、45 和 60 s。通过梯度稀释平板法进行活菌计数，每个处理做 3 个重复^[19]，以罗伊氏乳杆菌溶液作对照试验。

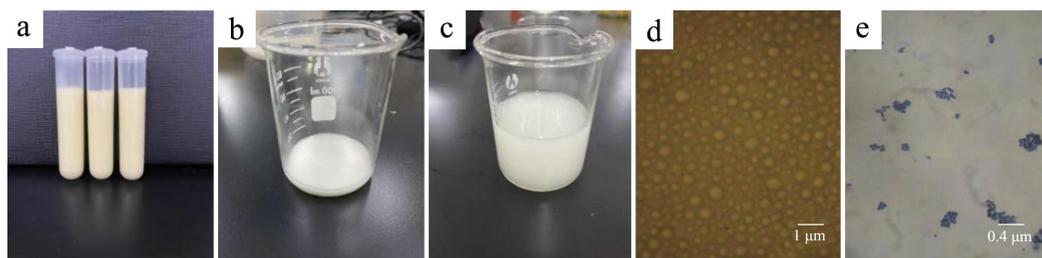


图 1 罗伊氏乳杆菌液态微胶囊 (a)，稀释 10 倍 (b) 和 100 倍 (c) 的液态微胶囊，显微观察 (d, e)

Fig.1 Liquid microcapsule of *L. reuteri* (a), 10 time diluted (b) and 100 time diluted (c), microscopic observation (d, e)

2.2 磷脂对罗伊氏乳杆菌液态微胶囊的影响

磷脂是一种天然的表面活性剂，具有亲水基团和亲油基团，可作为乳化剂稳定剂、粘合剂和润滑剂^[21]。微胶囊总体积 40 g 中根据添加磷脂不同的质

1.3.12 体外模拟消化试验

根据参考文献^[20]稍有改动，按以下操作：

静态消化，模拟胃液和罗伊氏乳杆菌液态微胶囊加入三角瓶中，37 °C 水浴 110 r/min 振荡 2 h，每隔 30 min 取样并立即测定相关指标。胃液取样完成后立即加入模拟肠液，肠液取样时间和方法与模拟胃液相同。同时进行对比实验。

动态消化，罗伊氏乳杆菌液态微胶囊加入三角瓶中，37 °C 水浴 110 r/min 振荡 2 h，将模拟胃液以 25 mL/h 加入到三角瓶中，每隔 30 min 取样并立即测定相关指标。胃液取样完成后，将模拟肠液以 50 mL/h 加入到三角瓶中，每隔 30 min 取样并立即测定相关指标。同时进行对比实验。

1.4 数据处理

数据采用 SAS 9.0 软件进行方差分析、多重比较 (Fisher's LSD) 和响应面优化 (Box-Behnken)。每组试验重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 罗伊氏乳杆菌液态微胶囊外观及显微观察

罗伊氏乳杆菌液态微胶囊由壁材磷脂、麦芽糊精等包埋罗伊氏乳杆菌而成，图 1a 制备好的微胶囊为乳白色液体，稀释 10 倍（图 1b）为白色液体进行显微观察，40 倍镜下为大小均匀的球状（图 1d），100 倍油镜下观察为菌体聚团（图 1e）。说明液态微胶囊化对菌体进行了包裹，壁材在菌体外围形成一种屏障，使菌体与外界环境相隔离，增强了菌体的稳定性与活性。将制备好的微胶囊稀释一定的倍数（图 1c）来测定相关指标。

量，探究微胶囊的特性。结果如下，由图 2 可知，随着磷脂浓度的增加乳化稳定性、乳化活性、包埋率变化显著，先增加后减少 ($P < 0.05$)。当磷脂含量为 6 g 时，乳化稳定值、乳化活性值和包埋率都

最大。随着磷脂含量的增加,该体系的乳化稳定性包埋率都在不断提高 ($P < 0.05$), e_1 比 e_2 圆球密集且多, e_3 比 e_4 菌体聚团大。当添加 7 g 的磷脂时明显下降 ($P < 0.05$)。由于磷脂是一种乳化剂,体系中的蛋白与磷脂都是双亲,磷脂疏水基团和蛋白疏水基团能更好地包裹油滴,磷脂亲水基团和蛋白亲水基团更好地延展到水相中,从而形成乳液的稳定结构,降低水与油的界面张力^[22],但当磷脂达到

一定浓度时,蛋白质与磷脂的结合达到饱和,乳液的乳化性能趋于平缓,甚至降低了稳定性与李秋慧等^[23]研究相符合,磷脂添加过量导致复合体系形成不同尺寸的乳滴,导致乳液滴分布不均匀,易迁移、流动等。随着磷脂含量的增加粒径先减小后增加,磷脂含量在 3、5、7 g 时有两个主要峰,在 4 g 时峰相对较矮且宽,而 6 g 时峰高且窄,说明乳液滴分布相对比较均匀。

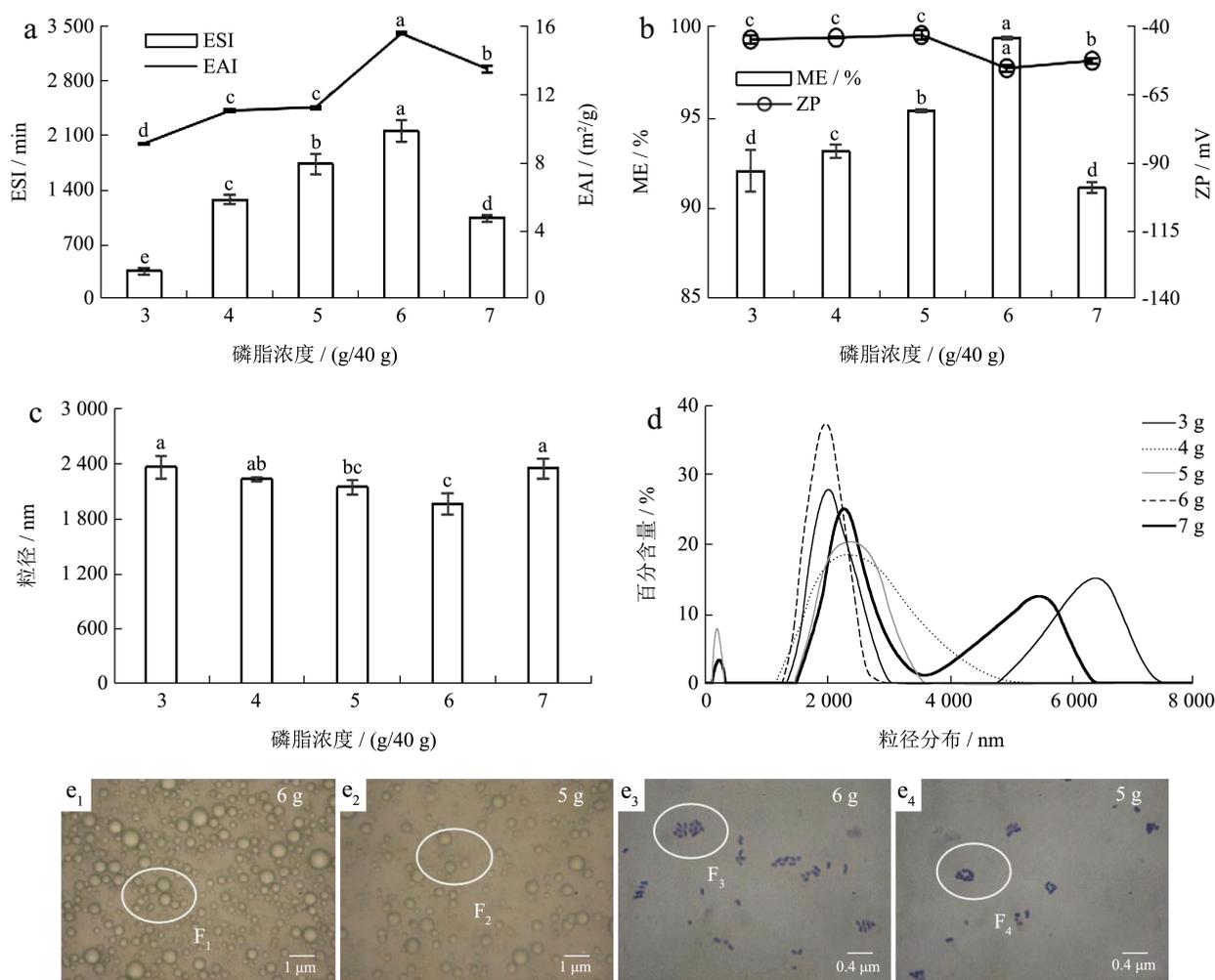


图2 磷脂对罗伊氏乳杆菌液态微胶囊的影响 ESI、EAI(a), 包埋率和电位 (b), 平均粒径 (c), 粒径分布 (d) 以及显微观察 ($e_1 \sim e_4$)

Fig. 2 The effects of phospholipids on *L. reuteri* liquid microcapsules ESI and EAI (a), embedding rate and potential (b), average diameter (c), diameter distribution (d) and microscopic observation ($e_1 \sim e_4$)

注: 角标中含有不同小写字母的数据之间差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。

2.3 麦芽糊精质量分数对罗伊氏乳杆菌液态微胶囊的影响

麦芽糊精是食品微胶囊的天然优良壁材之一,已应用于不同的食品领域,如包埋功能油、风味物质、益生菌等^[24],有很好的乳化效果和良好的成膜性,易被人体吸收,也特别适合作为病人和婴儿食

品的基本原料^[25]。随着麦芽糊精质量分数的增加,EAI 和 ESI 都随着麦芽糊精质量分数的增加先增大后减小 ($P < 0.05$),当麦芽糊精质量分数达到 15% 时,EAI 和 ESI 值最大。包埋率随着麦芽糊精质量分数的增加先增大后减小 ($P < 0.05$),当麦芽糊精质量分数到达 15% 时包埋率最高; e_1 比 e_2 圆球

密集且多, e_3 比 e_4 菌体聚团。麦芽糊精是很好的乳化剂和包埋剂壁材, 随着质量分数的增加乳化作用增强更好的与油相相融合, 所以大幅度的提高了包埋效果; 当麦芽糊精质量分数到达 20% 和 25% 时, 可能是麦芽糊精与乳化剂磷脂有很强的相互作用, 影响了微胶囊的稳定性从而影响了包埋效果^[26]。电位随着麦芽糊精质量分数的增加其绝对值先减少后增大 ($P < 0.05$), 麦芽糊精质量分数为 15% 时其绝对值最大。麦芽糊精质量分数在 5% 和 10% 时

粒径是没有显著差异的 ($P < 0.05$), 当麦芽糊精质量分数到达 15% 时粒径减小 ($P < 0.05$), 之后随着质量分数的增加粒径逐渐增大 ($P < 0.05$); 5% 和 10% 质量分数下的平均粒径分布峰窄而且低, 20% 和 25% 质量分数下的峰都有两个峰低并且峰比较宽宽, 说明包被不均匀; 15% 质量分数的峰最高有一个峰并且峰窄, 说明麦芽糊精质量分数在 15% 时, 微胶囊乳液滴分布比较均匀。

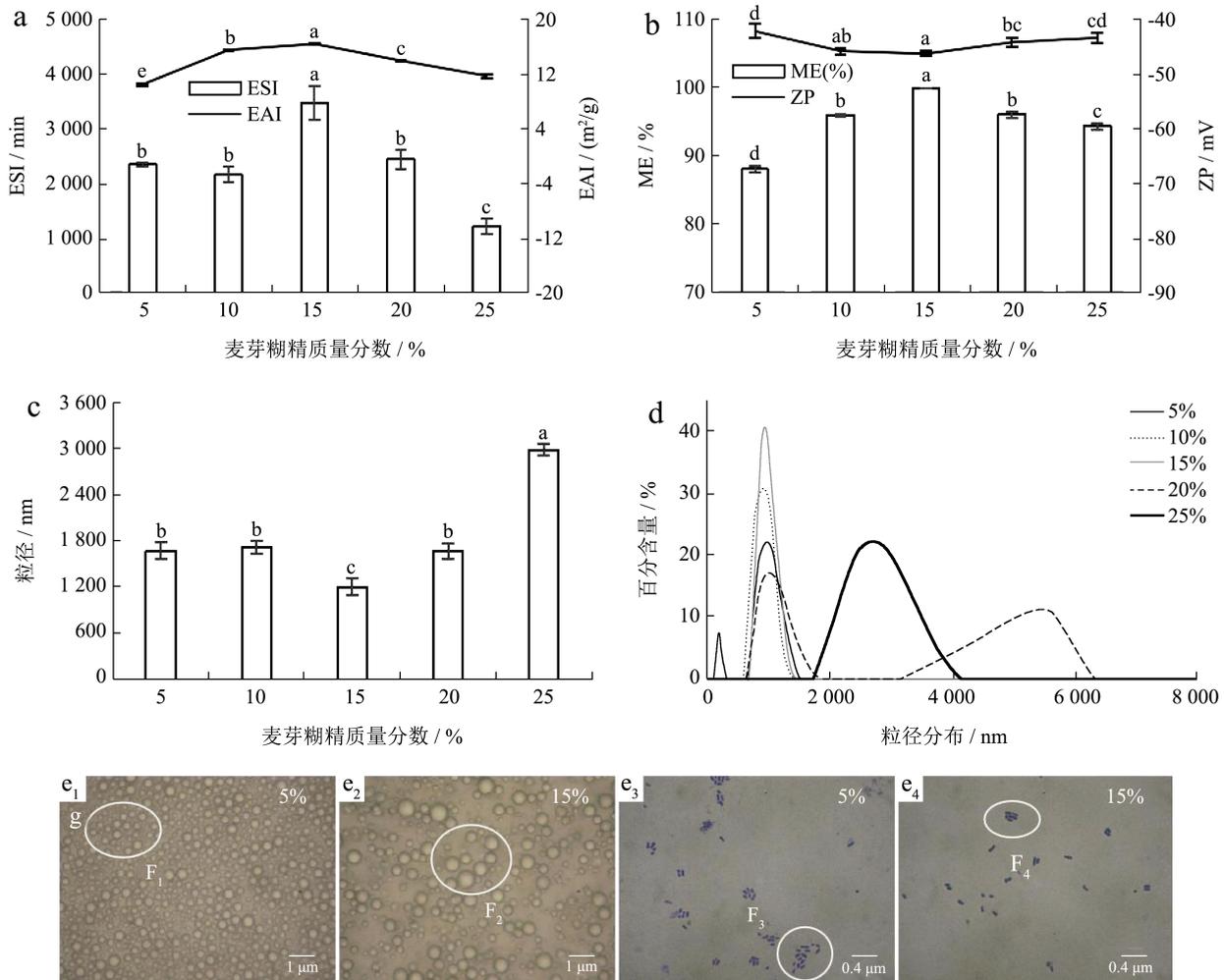


图 3 麦芽糊精质量分数对罗伊氏乳杆菌液态微胶囊的影响 ESI、EAI (a), 包埋率和电位 (b), 平均粒径 (c), 粒径分布 (d) 以及显微观察 ($e_1 \sim e_4$)

Fig.3 Effect of maltodextrin concentration on liquid microcapsules ESI and EAI (a), embedding rate and potential (b), average diameter (c), diameter distribution (d) and microscopic observation ($e_1 \sim e_4$) of *L. reuteri*

2.4 乳化时间对罗伊氏乳杆菌液态微胶囊的影响

随着乳化时间的增加 EAI 和 ESI 先逐渐上升 ($P < 0.05$), 当乳化时间到达 90 min 时达到最大, 当乳化时间再增加时 EAI 和 ESI 没有明显的

变化 ($P < 0.05$)。包埋率随着乳化时间的增加先增大后减小 ($P < 0.05$), 乳化时间在 30~90 min 到达逐渐增大 90 min 时包埋率最大, 其原因是随着乳化时间的逐渐增加, 磷脂的亲水性和亲油性基团不断与油相和水相结合, 包埋率逐渐增加, 乳液在短时

间内混合不够均匀并且乳化不够完全，乳液没有完全处于真空状态，液滴内存在大量空气，导致部分菌体没有包埋进去包埋不够紧密，乳化不完全也可能影响了麦芽糊精的成膜效果所以包埋率低；当乳化时间超过 90 min 时包埋率下降 ($P < 0.05$)，图 e₁ 比图 e₂ 球体密集且多，图 e₃ 比图 e₄ 菌体聚团大，可能由于长时间的磁力搅拌，破坏了包埋体系打破了麦芽糊精与乳化剂磷脂的相互作用，降低了乳液的稳定性造成乳液破乳，乳液中的游离菌体增加从而降低了包埋率^[27]。粒径随着乳化时间的增加先减小后增大，30 min 的平均粒径图峰窄且矮，60 min 的图峰比 90 min 和 150 min 的峰高且峰比较宽，120 min 的峰有两个峰说明乳液粒径分布不均匀，然而 90 min 的峰又尖又窄说明乳液分布比较均匀。

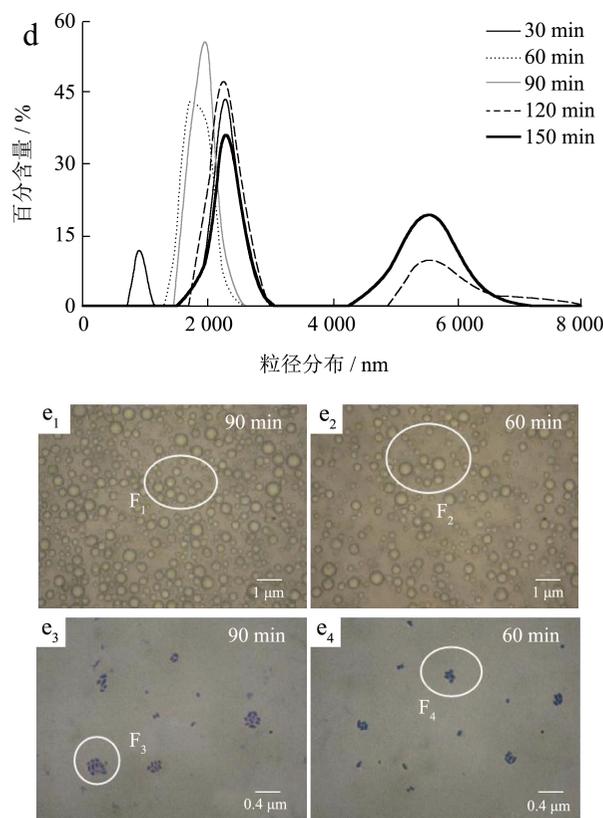
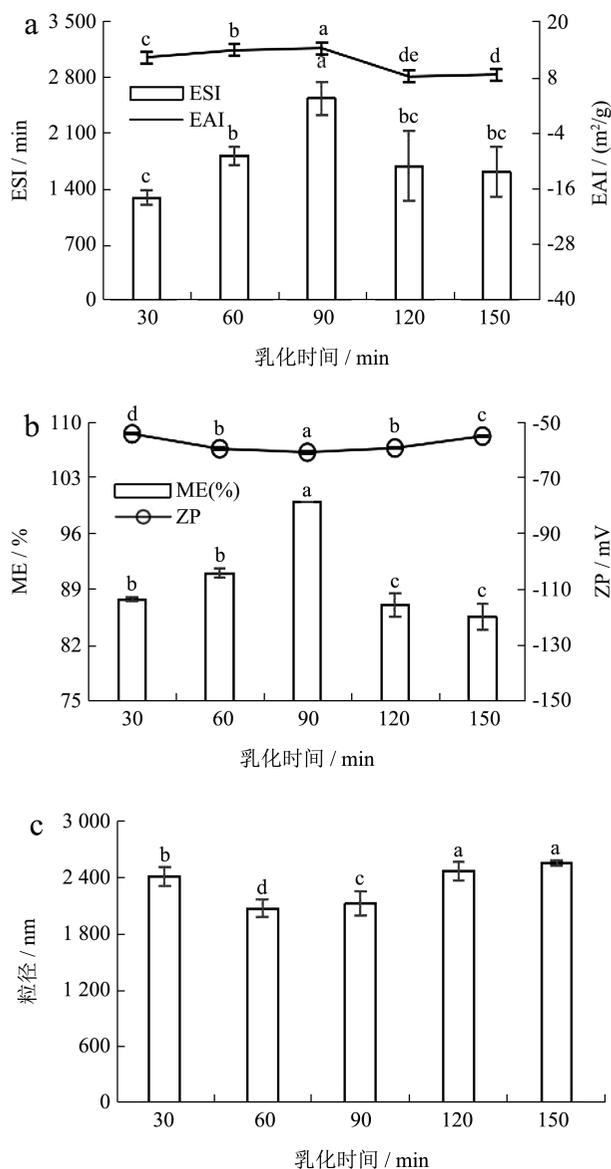


图 4 乳化时间对罗伊氏乳杆菌液态微胶囊 ESI 和 EAI(a), 包埋率和电位 (b), 平均粒径 (c), 粒径分布 (d) 以及显微观察 (e₁~e₄)

Fig.4 Effect of emulsification time on ESI and EAI (a), embedding rate and potential (b), average diameter (c), diameter distribution (d) and microscopic observation (e₁~e₄)

of *L. reuteri* liquid microcapsules

表 2 响应面分析设计及结果

Table 2 Response surface analysis design and results

试验序号	因素			响应值 包埋率/%
	A/g	B/%	C/min	
1	-1	-1	0	89.96
2	-1	1	0	86.89
3	-1	-1	0	84.45
4	1	1	0	86.88
5	0	-1	-1	92.81
6	0	-1	1	86.77
7	0	1	-1	94.22
8	0	1	1	87.67
9	-1	0	-1	85.93
10	1	0	-1	84.61
11	-1	0	1	88.45
12	1	0	1	85.93
13	0	0	0	99.49
14	0	0	0	99.77
15	0	0	0	97.82

2.5 响应面试验结果

表 3 回归模型方差分析
Table 3 ANOVA with regression models

	自由度	平方和	均方	F 值	Pr>F
模型	9	351.21	39.02	4.96	0.046 2
A	1	11.57	11.57	1.47	0.279 2
B	1	0.35	0.35	0.04	0.84
C	1	10.13	10.13	1.29	0.307 8
AB	1	7.56	7.56	0.96	0.371 7
AC	1	0.53	0.53	0.07	0.804 9
BC	1	0.07	0.07	0.01	0.929 7
A2	1	231.85	231.85	29.51	0.002 9
B2	1	51.21	51.21	6.52	0.051 1
C2	1	78.27	78.27	9.96	0.025 2
线性	3	22.05	7.35	0.94	0.489 1
二次方程	3	321.01	107.01	13.62	0.007 7
交叉	3	8.16	2.72	0.35	0.794 1
残差	5	39.29	7.86		
失拟项	3	33.99	11.33	4.27	0.195 5
误差	2	5.31	2.65		
总和	14	390.51			

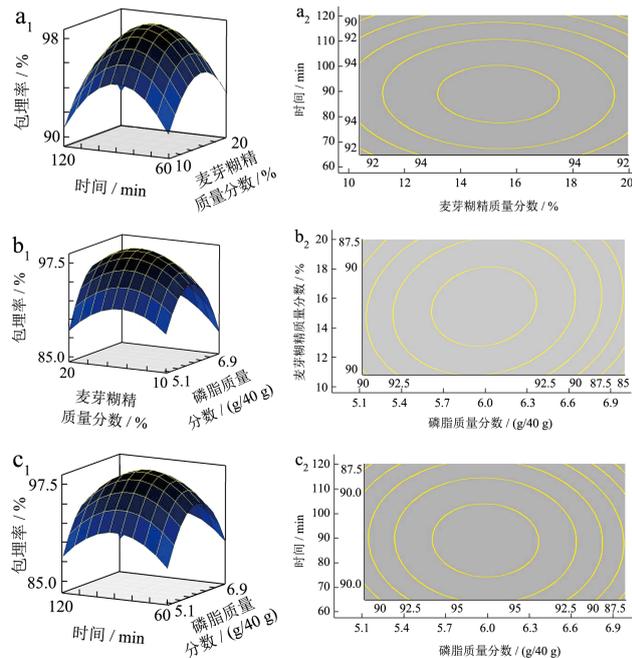


图 5 乳化时间和麦芽糊精质量分数 (a₁、a₂)、麦芽糊精质量分数和磷脂含量 (b₁、b₂)、乳化时间和磷脂含量 (c₁、c₂) 对 ME 影响的响应面图和高线图
Fig.5 Response surface map and height map of the effect of emulsification time and maltodextrin concentration on ME (a₁, a₂), maltodextrin concentration and phospholipid content on ME (b₁, b₂), emulsification time and phospholipid content on ME (c₁, c₂)

建立的二次多元回归方程为： $Y=-206.58+90.35A+0.83C-7.63A^2-0.01C^2$ 回归模型方差分析结果见表 2，可知 $Pr>F=0.04<0.05$ ，表明所建立的二次回归模型显著；失拟项 $P=0.19>0.05$ ，失拟项不显著，表明所建立的回归方程拟合较好。计算得到，磷脂的最佳质量分数为 14.83%，麦芽糊精质量分数为 15% 乳化时间为 86.39 min 的条件下，罗伊氏乳杆菌微胶囊包埋率为 99.03%。3 次验证试验的平均包埋率为 99.11%，可用于罗伊氏乳杆菌微胶囊的制备。得罗伊氏乳杆菌微胶囊的制备配方：菌泥 1 g，5% (m/m) 酶解大豆蛋白 2 g，磷脂 5.93 g，大豆油 10 g，15% (m/m) 麦芽糊精 20 g，甘油 1 g。

2.6 耐热性试验结果

大多数益生菌是不耐热的，提高耐热性可以增加益生菌在加工过程中活菌数。在试验前，首先将菌液和微胶囊的菌落总数分别稀释为 1.8×10^9 CFU/mL 和 2.1×10^9 CFU/mL。由图 6 可知，70 °C 时对照组随着处理时间的加长菌落总数显著下降 ($P<0.05$)，微胶囊组也随着处理时间的加长菌落总数也存在显著下降 ($P<0.05$)，而且对照组和微胶囊组菌落总数相差不是很大，对照组为菌液，菌液里面含有 MRS 培养基对菌体有一定的保护作用。在 85 °C 时随着处理时间的加长，对照组和微胶囊组都没有明显的变化，但微胶囊组菌落总数明显多于对照组，说明包被壁材具有一定的抗热性能。在 100 °C 时随着处理时间的加长对照组和微胶囊组都变化不显著，但菌液对照组菌体存活数在每个时间处理段微胶囊组菌落总数明显多于对照组，说明包被壁材麦芽糊精具有很好的耐热性。

2.7 体外模拟静态消化试验结果

在试验前将对照组和微胶囊组菌落总数调为一致。试验结果为，由图 7a 可知，微胶囊在模拟胃液消化过程中没有显著变化 ($P>0.05$)，在肠液中增加后没有显著变 ($P>0.05$)；对照菌液组在刚加入胃液后显著变小 ($P<0.05$)，之后在胃液和肠液中都没有显著变化 ($P<0.05$)；说明都能够顺利通过胃液到达肠液并裂解出来，由于包埋壁材对罗伊氏乳杆菌有一定的保护作用，避免强酸环境对罗伊氏乳杆菌的破坏；当微胶囊到达肠液中，肠液为碱性和胃液酸性中和，导致溶液的 pH 值增大反而适合罗伊氏菌的生长，所以在肠液中菌的菌落总数要多于胃液；对照组中菌液含有液体培养基，培养基本身也是一种营养物质同时也为罗伊氏乳杆菌提供营养，在肠液中 pH 值增大也促进菌体生长繁殖以至于肠液中菌落总

数多于胃液。

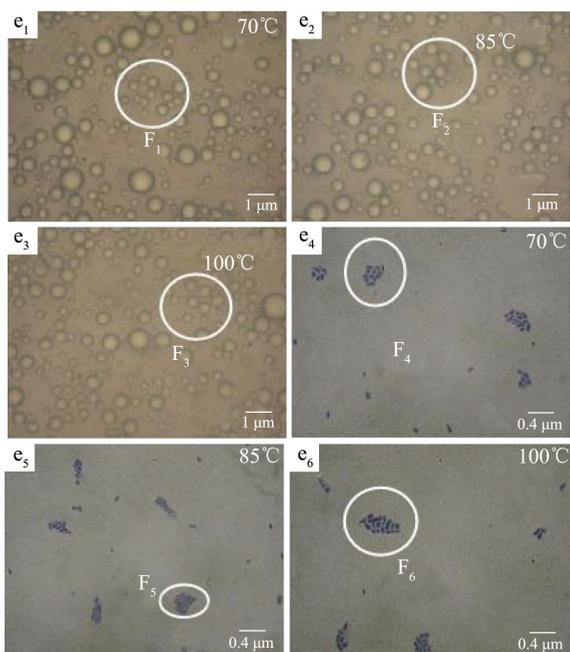
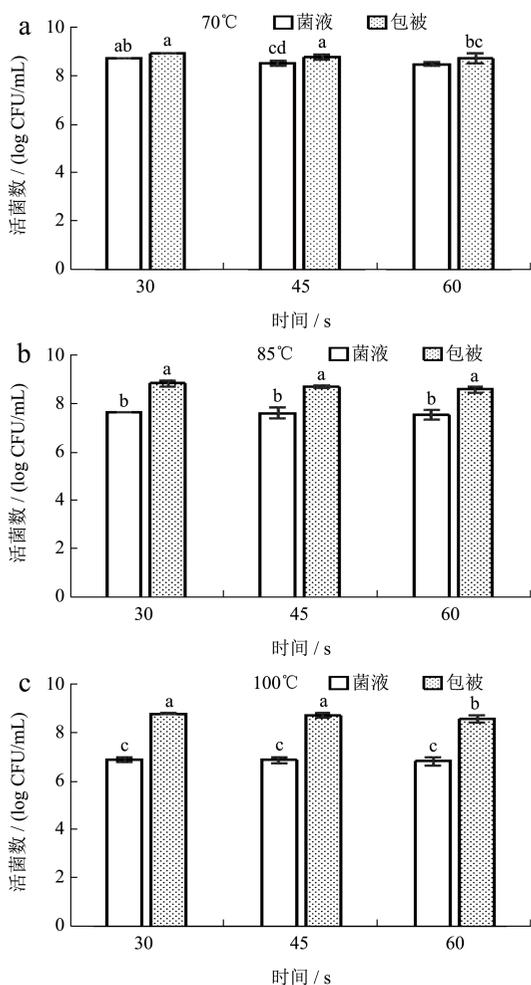
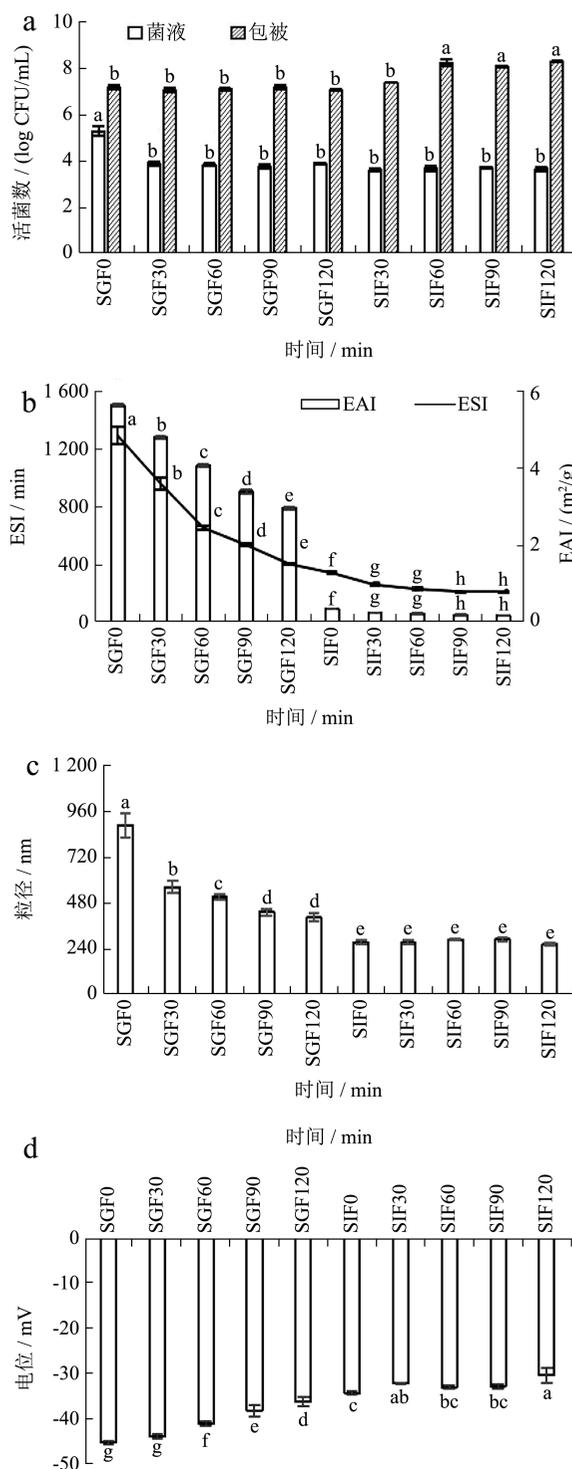


图6 温度对罗伊氏乳杆菌微胶囊和菌液的菌落总数的影响以及显微观察 (e₁~e₆)

Fig.6 Effect of temperature on microencapsulated bacteria and liquid bacteria of *L. reuteri* and microscopic observation (e₁~e₆)

由图7b可知,随着消化时间的增加,EAI和ESI都逐渐下降到肠液之后变化不显著($P>0.05$),加入胃液后pH值快速减小微胶囊处于强酸环境中,降低了稳定性所以导致EAI和ESI都逐渐下降。由图7c可知,粒径在胃液中随着消化时间的增加粒径减小($P<0.05$),在肠液中没有显著变化在小肠中微胶囊裂解然后进行了二次乳化,大小均匀;在整个消化中电位数值的绝对值随着消化时间的增加逐渐减小($P<0.05$)。



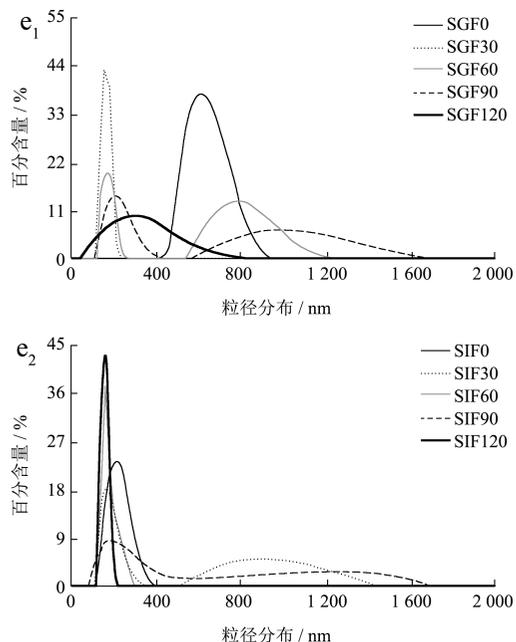


图7 不同消化时间胃肠液中的微胶囊和菌液的菌落总数 (a), EAI 和 ESI 的影响 (b), 粒径和电位的影响 (c、d), 粒径分布 (e₁、e₂)

Fig.7 The total number of microcapsules and bacterial fluid in gastrointestinal juice at different digestion time (a), the effect of different digestion time on EAI and ESI (b), the effect of different digestion time on particle size and potential (c, d), particle size distribution (e₁, e₂)

在图 8 中, a₁~a₅ 的显微图片圆球密集且多, b₁~b₅ 的显微图片圆球稀少, 与消化试验中随着消化

时间的增加, EAI 和 ESI 都逐渐下降 ($P < 0.05$), 到达肠液之后变化不显著 ($P < 0.05$); c₁~c₅ 和 d₁~d₅ 可以得出微胶囊在胃液消化中一直处于聚团状态, 到达肠液后随着消化时间的增加逐渐散开直至没有聚团, 说明微胶囊在胃液中保护了菌体不被破坏, 让菌体顺利达到肠道中。

2.8 体外模拟动态消化试验结果

在试验前将对照组和微胶囊组菌落总数调为一致。实验结果如下, 在图 9 中, 随着消化时间的增加, 微胶囊包被组菌落总数在胃液中先减少到达肠液中再慢慢增加均有一定的缓释效果 ($P < 0.05$), 对照组在胃液中先减少后变化不显著 ($P < 0.05$); EAI 和 ESI 随着消化时间的增加先减小 ($P < 0.05$), 之后变化不显著 ($P < 0.05$); 粒径先增大后减小 ($P < 0.05$); 电位的数值绝对值先减小后增大又减小 ($P < 0.05$)。

在图 10 中, a₁ 的圆球密集且多, 而 a₂~a₅ 的圆球要大一些, 圆球出现了大小不一的聚集, 可能液态微胶囊遇到强酸发生了不规则的聚集, 但圆球完整没有出现破乳现象, 说明微囊化中的罗伊氏乳杆菌在通过胃时可以受到保护。随着肠液不断的加入, pH 值增大微胶囊不规则聚集被破坏, b₁~b₅ 的圆球逐渐变小散开; c₁~c₅ 和 d₁~d₅ 可以得出微胶囊在胃液消化中一直处于聚团状态, 到达肠液后随着消化时间的增加逐渐散开直至没有聚团, 说明微胶囊在胃液中保护了菌体不被破坏, 让菌体顺利达到肠道中。

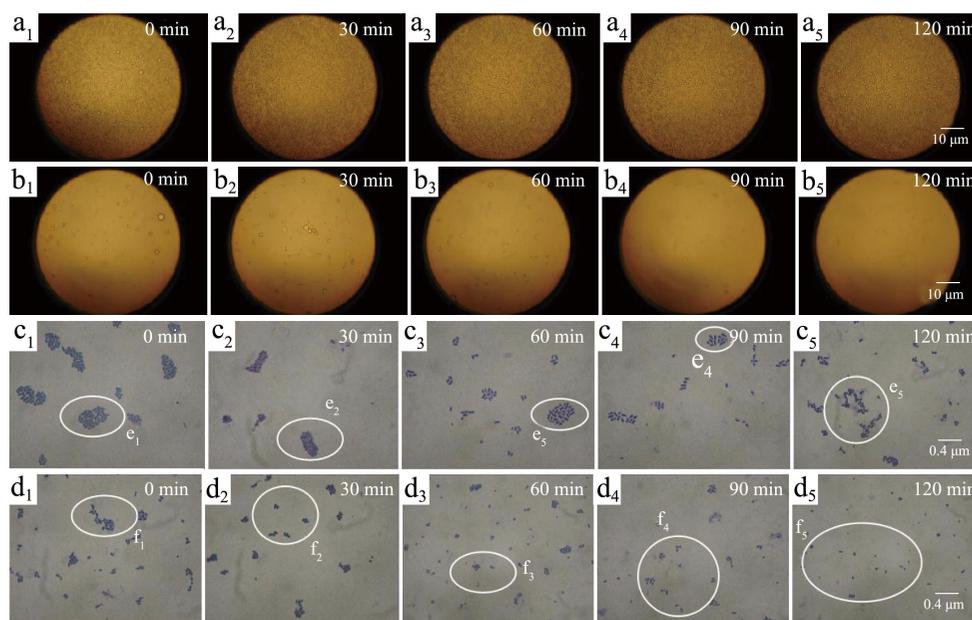


图 8 不同消化时间胃肠液中的微胶囊的显微图

Fig. 8 Micropictures of microcapsules in gastrointestinal juice at different digestion times

注: a₁~a₅ 为胃液消化中 40 倍镜下的显微图; c₁~c₅ 为胃液消化中 100 倍镜下的显微图; b₁~b₅ 为肠液消化中 40 倍镜下的显微图; d₁~d₅ 为肠液消化中 100 倍镜下的显微图。图 10 同。

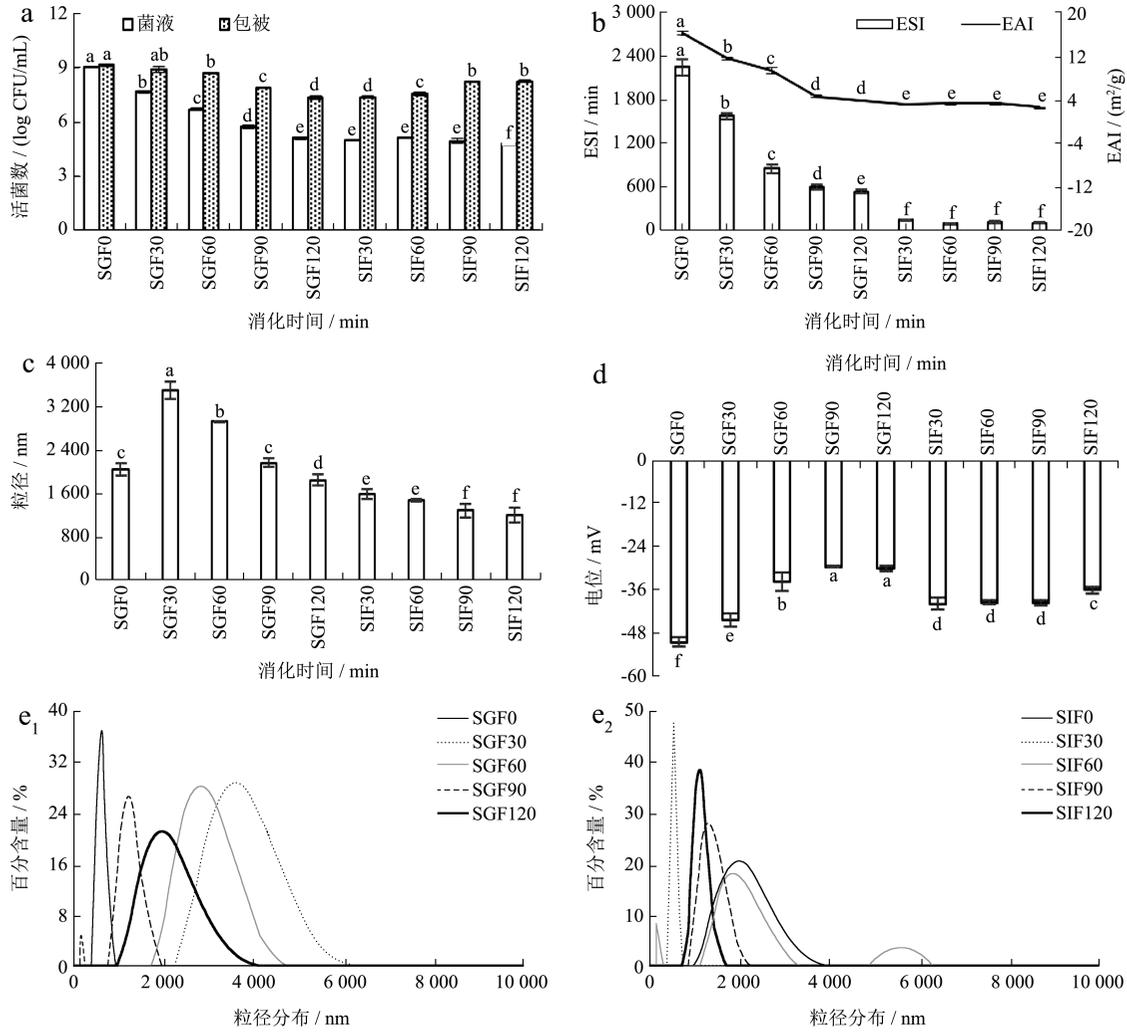


图9 不同消化时间胃肠液中的微胶囊和菌液的菌落总数 (a), EAI 和 ESI 的影响 (b), 粒径和电位的影响 (c, d), 粒径分布 (e₁, e₂)
 Fig.9 The total number of microcapsules and bacterial fluid in gastrointestinal juice at different digestion time (a), the effect of different digestion time on EAI and ESI (b), the effect of different digestion time on particle size and potential (c, d), particle size distribution (e₁, e₂)

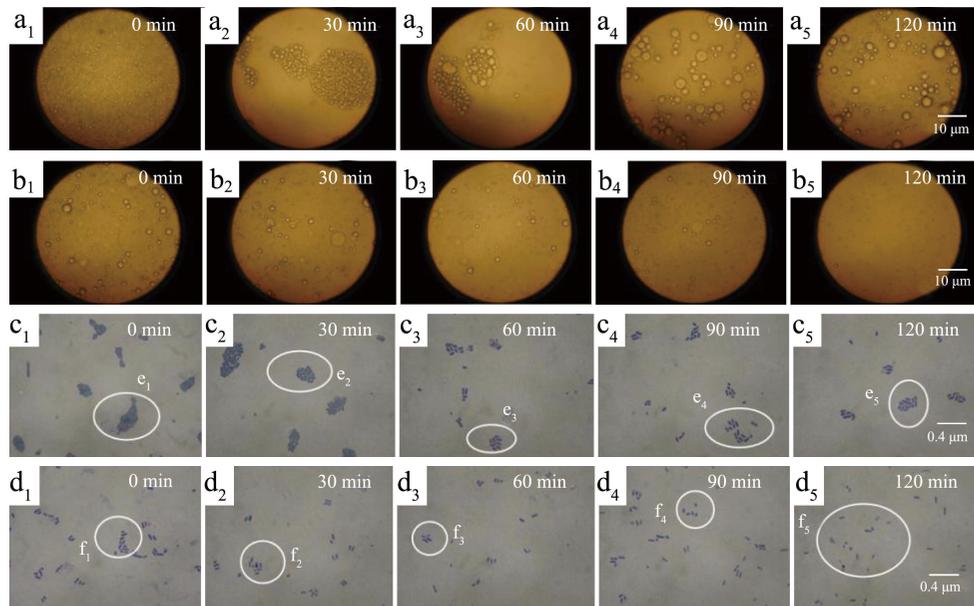


图 10 不同消化时间胃肠液中的微胶囊的显微图

Fig.10 Micropictures of microcapsules in gastrointestinal juice at different digestion times

3 结论

本研究采用磷脂、麦芽糊精等复合壁材,经乳化学法制备液态微胶囊,在100℃热处理60s活菌数为 3.86×10^8 CFU/mL,在肠道中具有缓释作用,经过胃肠液消化4h后微胶囊活菌数为 1.85×10^8 CFU/mL。因此,由磷脂、麦芽糊精等制备的罗伊氏乳杆菌液态微胶囊为乳白色液体,具有很好的耐热性和缓释性,从而提高其对消化酶等不利因素的耐受性,使其有足够多的活菌进入肠道,进而发挥益生功效,为罗伊氏乳杆菌在食品加工中的应用奠定理论基础。

参考文献

- [1] NISSEN L, CHINGWARU W, SGORBATI B, et al. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. strains: a functional study in the small intestinal cell model [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 135: 288-294.
- [2] MU Q, TAVE V J, LUO X M. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 757.
- [3] MARTENS E C, NEUMANN M, DESAI M S. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(8): 457-470.
- [4] FRAKOLAKI GEORGIA, GIANNOU VIRGINIA, KEKOS DIMITRIOS, et al. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 61(9): 1515-1536.
- [5] 黄序,戚薇,王建玲,等.肠溶性双歧杆菌微胶囊的初步研究[J]. *药物生物技术*, 2002, 9(2): 105-109.
- [6] WANG X Y, XIE W C, ZHANG S H, et al. Effect of microencapsulation techniques on the stress resistance and biological activity of bovine lactoferricin-lactoferrampin-encoding *Lactobacillus reuteri* [J]. *Foods*, 2022, 11(20): 3169.
- [7] DEMBCZYNSKI R, JANKOWSKI T. Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starchliquid-core capsules [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31(1-2): 111-115.
- [8] 赵红霞,李应彪.微胶囊包埋技术在益生菌制品中的应用[J]. *中国乳业*, 2007, 70(10): 32-34.
- [9] 桑来发.喷雾干燥法制备多孔氧化物微球及其气敏性能研究[D].青岛:山东科技大学, 2020.
- [10] FRAKOLAKI G, GIANNOU V, KEKOS D, et al. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 61(9): 1515-1536.
- [11] 王巧丽,韩向敏,季海峰,等.一株猪源罗伊氏乳杆菌的生长特性和抗逆性分析[J]. *甘肃农业大学学报*, 2013, 48(3): 4-9.
- [12] 张巧玲.金属离子对基于热激-修复处理的植物乳杆菌LIP-1耐热性影响的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学, 2021.
- [13] SONG S J, CUI Y M, JI X Y, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* with enzymatic hydrolysate of soybean protein isolate for improved acid resistance and gastrointestinal survival *in vitro* [J]. *International Journal of Food Engineering*, 2022, 18(7): 499-511.
- [14] MEINLSCHMIDT P, SCHWEIGGERT-WEISZ U, BRODE V, et al. Enzyme assisted degradation of potential soy protein allergens with special emphasis on the techno-functionality and the avoidance of a bitter taste formation [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 68: 707-716.
- [15] MICHELE S P, JOËLLE L, GWÉNAËLE H, et al. Heating and glycation of β -lactoglobulin and β -casein: Aggregation and *in vitro* digestion [J]. *Food Research International*, 2014, 55: 70-76.
- [16] NIELSEN P M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents [J]. *Food Biotechnology*, 1995, 9(3): 119-156.
- [17] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. *Agric Food Chem*, 1978, 26: 716-723.
- [18] AKIHIRO N, TARO T, RYUJI Y, et al. Emulsifying properties of soybean soluble polysaccharide [J]. *Food Hydrocolloids*, 2003, 18(5): 795-803.
- [19] 张琳,贡婷婷,蔡文涛,等.乳化凝胶化法微囊化益生菌抗胁迫作用研究[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(11): 3636-3642.
- [20] 刘雪,管军军,朱浩,等.枯草芽孢杆菌对大豆蛋白-磷脂复合乳液在体外消化中稳定性的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(1): 132-138.
- [21] 李曼.大豆磷脂在畜禽生产及饲料加工中的作用[J]. *养殖技术顾问*, 2011, 10: 72-72.
- [22] 唐仁龙.乳酸杆菌微胶囊制备及其耐热性能的研究[D].杭州:浙江农林大学, 2019.
- [23] 李秋慧,齐宝坤,隋晓楠,等.大豆分离蛋白-磷脂复合乳化体系乳化及氧化稳定性研究[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(5): 46-52.
- [24] 应欣,卢玉,李义,等.麦芽糊精的功能特性及其应用研究进展[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34(12): 131-137.
- [25] 李才明,李阳,顾正彪,等.麦芽糊精的支化修饰及其特性研究进展[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(10): 1-8.
- [26] 张欣.基于硼-碳键过氧化氢响应性微胶囊的制备与性能表征[D].保定:河北大学, 2021.
- [27] 谷克仁,金华丽.酶改性大豆磷脂乳化稳定性比较[J]. *粮油加工*, 2006, 5: 53-55.