

肠溶性植物乳杆菌微胶囊的制备及其环境耐受性和贮藏稳定性研究

占英¹, 李金梅¹, 李新瑞¹, 魏华^{1,2}, 张志鸿^{1,2*}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

(2. 南昌大学中德联合研究院, 江西南昌 330047)

摘要: 植物乳杆菌 ZDY2013 是一株能代谢复杂碳水化合物并维持胃肠道稳态的乳酸菌, 为提高菌株到达肠道的存活率, 制备了肠道靶向释放植物乳杆菌的微胶囊。以植物乳杆菌 ZDY2013 及低聚木糖为芯材, 海藻酸钠及乳清蛋白为壁材制备微胶囊; 采用响应面分析法优化微胶囊的制备工艺, 并对优化后的微胶囊耐受极端环境的能力及在胃肠道释放的水平进行评价; 同时, 考察肠溶性微胶囊的贮藏稳定性。结果表明, 制备微胶囊的最佳工艺条件是海藻酸钠、乳清蛋白、氯化钙的质量分数分别为 2.0%、4.0%、2.0%, 微胶囊包埋率为 96.67%, 存活率达到 95.82%; 微胶囊化后, 植物乳杆菌在 pH 值 1.50 和 0.45%胆盐条件下孵育 5 h 的存活率相比对照组分别提高了 25.58%和 7.11%, 且 65 °C 条件下热水浴 10 min 后仍有 67.63%的存活率; 微胶囊在胃液中释放率只有 0.90%, 但在结肠液中释放率达 81.90%, 能靶向肠道释放; 此外, 该微胶囊在-20 °C 条件下贮藏 60 d 后, 活菌数维持在 10¹⁰ CFU/g 以上。综上, 肠溶性植物乳杆菌微胶囊具有良好的环境耐受性及肠道靶向释放特点, 为植物乳杆菌 ZDY2013 协同低聚木糖在特定环境中的功能开发奠定基础。

关键词: 植物乳杆菌; 微胶囊; 肠溶性; 低聚木糖; 贮藏稳定性

文章编号: 1673-9078(2023)07-110-119

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0957

Preparation, Environmental Tolerance, and Storage Stability of Enteric-soluble *Lactobacillus plantarum* Microcapsules

ZHAN Ying¹, LI Jinmei¹, LI Xinrui¹, WEI Hua^{1,2}, ZHANG Zhihong^{1,2*}

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

(2.Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 is a strain of lactic acid bacteria that can metabolize complex carbohydrates and help maintain gastrointestinal homeostasis. To improve the survival rate of *L. plantarum* ZDY2013 in the digestive tract and allow intestine-targeted release, microcapsules were prepared using *L. plantarum* ZDY2013 and xylo-oligosaccharides as core materials and sodium alginate and whey protein as wall materials. The preparation parameters were optimized using response surface methodology, and the optimized microcapsules were assessed in terms of their ability to withstand extreme environments and gastrointestinal release. The storage stability of the enteric-soluble microcapsules was also evaluated, with result indicating that the optimal microcapsule is prepared using sodium alginate, whey protein, and a calcium chloride mass fractions of 2.0%, 4.0%, and 2.0%, respectively, which results in a microencapsulation rate of 96.67% and survival rate of 95.82%. Microencapsulation improved the survival rate of *L. plantarum* ZDY2013 by 25.58% and 7.11% in pH 1.5 and 0.45% bile salt conditions (under five hours incubation), respectively. Furthermore, the survival rate of microencapsulated *L. plantarum* ZDY2013 was 67.63% after 10 minutes in a 65 °C hot water bath. The obtained rate of release for the microcapsule was only 0.90% in gastric juice; however, it was

引文格式:

占英,李金梅,李新瑞,等.肠溶性植物乳杆菌微胶囊的制备及其环境耐受性和贮藏稳定性研究[J].现代食品科技,2023,39(7):110-119.

ZHAN Ying, LI Jinmei, LI Xinrui, et al. Preparation, environmental tolerance, and storage stability of enteric-soluble *Lactobacillus plantarum* microcapsules [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 110-119.

收稿日期: 2022-07-30

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (32101915); 江西省自然科学基金青年项目 (20212BAB215033); 江西省研究生创新专项基金 (YC2021-S115)

作者简介: 占英 (1998-), 女, 硕士生, 研究方向: 乳酸菌功能, E-mail: 2018339130@qq.com

通讯作者: 张志鸿 (1988-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 益生菌与肠道健康, E-mail: azhangzhihong@163.com

81.90% in colonic fluid, which allows targeted delivery to the intestines. Furthermore, after the microcapsules were stored at -20 °C for 60 days, the viable counts of *L. plantarum* remained above 10^{10} CFU/g. In summary, the developed enteric-soluble *L. plantarum* microcapsules have excellent environmental tolerance and can facilitate intestine-targeted release, providing a solid foundation for the functional development of *L. plantarum* ZDY2013 and xylo-oligosaccharides in specific environments.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum*; microcapsules; enteric solubility; xylo-oligosaccharide; storage stability

随着益生菌功能研究的不断深入,其在发酵食品和微生态制品中的应用越来越受到食品工业、大健康领域的重视^[1]。然而,益生菌普遍存在耐酸性弱、不耐贮藏等抗胁迫性差问题^[2],且益生菌产品在加工、运输过程中,不可避免会接触高温、高氧含量等应激因素的影响,导致进入人体后的活菌量往往达不到发挥健康功效的水平^[3]。因此,开发有效保护益生菌及相关微生态制剂活性的技术具有重要意义。

微胶囊包埋技术是以天然或合成材料为壁材,将芯材益生菌和/或益生元包裹成微胶囊的技术,可以有效避免菌株与外界不利环境的直接接触,减少活性物质在加工或贮藏过程中的损失,保证产品的稳定性,同时能克服胃酸破坏溶解,使芯材具有较好的肠道靶向性^[3-5]。目前,制备益生菌微胶囊较为常用壁材主要有多糖(海藻酸盐、壳聚糖及卡拉胶等)及蛋白质(明胶及乳清蛋白等)和脂肪等^[6-8]。其中,海藻酸钠因其具有良好的生物相容性可作为冻干保护剂,保护细胞活力^[9];另外,研究发现,在高酸性环境条件下,当pH值低于乳清蛋白的等电点时,乳清蛋白的静电荷为正,与带负电荷的海藻酸钠产生静电相互作用,形成牢固的微胶囊膜结构,从而有效保护益生菌免受外界破坏^[10]。

植物乳杆菌 ZDY2013 为具有自主知识产权的耐酸乳酸菌,是乳制品发酵过程中的优势菌株,能抑制食源致病菌的繁殖^[11],调节肠道菌群并恢复其稳态^[12,13],改善结肠炎症^[14]等。另外,该菌株能特异性发酵不被人体消化吸收、定向促进乳酸菌在肠道定植的功能性低聚木糖,提高发酵液抗氧化活性^[15,16]。为此,本文以植物乳杆菌 ZDY2013 和低聚木糖为芯材,以海藻酸钠和乳清蛋白为壁材制备了肠溶性微胶囊,通过响应面法分析了微胶囊制备的最佳工艺条件,评价了微胶囊耐受极端环境的能力及胃肠道释放水平,并考察了肠溶性微胶囊在实际应用环境中的稳定性。本研究将为植物乳杆菌 ZDY2013 功能最大化研究及应用稳定性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*, *L.*

plantarum) ZDY2013, 分离于农家自然发酵酸豆角,目前保存于食品科学与技术国家重点实验室。

琼脂粉、MRS 肉汤培养基,北京索莱宝科技有限公司;低聚木糖(Xylo-oligosaccharide, XOS)、海藻酸钠、乳清蛋白、氯化钙、壳聚糖,上海阿拉丁科技股份有限公司;氯化铵、四水硫酸镁、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、半胱氨酸盐、七水硫酸镁和吐温-80,西陇化工股份有限公司;其他有机试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Anaerobox IV 型厌氧培养箱,美国 Gene Science 公司;ZXSD-B1090 型恒温培养箱,中国上海智城分析仪器有限公司;YXQ-LS-50A 型立式压力蒸汽灭菌器,中国上海博迅医疗生物仪器有限公司;ST 16R 型台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;冷冻干燥机,Labconco 公司;XL-30-E 型环境扫描电子显微镜(SEM),荷兰 Philips 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌体的获取

将植物乳杆菌 ZDY2013 按 1% (V/V) 的量接种于 5 mL MRS 液体培养基中,37 °C 恒温培养 24 h,活化两次后,再按 1% 的量接种于 250 mL MRS 液体培养基中,37 °C 恒温培养 24 h,于 6 000 r/min 条件下离心 10 min 获取菌体,1×PBS 洗涤两次,即得菌体。

1.3.2 溶剂的配制

解囊液^[17]:取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.80 g、柠檬酸 10.50 g,加去离子水,搅拌溶解并定容至 1 000 mL,调 pH 值至 7.25,121 °C 高压灭菌 20 min,4 °C 保存备用;模拟胃液^[18]:10 g/L 胃蛋白酶,用 0.10 mol/L 稀盐酸溶解,加无菌水定容,调节 pH 值为 1.50,采用 0.22 μm 滤膜除菌,放入冰箱备用;模拟胆汁液^[19]:1.00 g/L 七号胆盐,无菌水溶解,充分搅拌至均匀后,定容到 100 mL,配制成浓度为 1% (m/V) 的人工模拟胆汁液,放入冰箱备用;模拟肠液^[18]:10 g/L 胰蛋白酶,磷酸二氢钾 6.80 g/L,无菌水溶解,pH 值调至 7.40,过滤除菌,4 °C 保存备用;模拟结肠液^[20]:A 液为 0.20 mol/L 的 NaH_2PO_4 溶液,B 液为 0.20 mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液,使用时分别取 A 液 5.30 mL 和 B 液 94.70 mL,混匀后

制得 pH 值为 8.00 的磷酸盐缓冲液,接着取 0.50 g 果胶酶溶于磷酸盐缓冲液制得人工模拟结肠液。

1.4 微胶囊的制备工艺优化

1.4.1 微胶囊的制备

将植物乳杆菌 ZDY2013 (10^{10} CFU/mL)、低聚木糖 (2.0%, *m/m*)、乳清蛋白 (1.0%~10%, *m/m*) 以及海藻酸钠 (1.0%~3.0%, *m/m*) 混合,用一次性注射器逐滴滴入到氯化钙溶液 (1.0%~3.0%, *m/m*) 中,形成海藻酸钙凝胶珠,静置 30 min 后,微胶囊稳定后,置于 0.5%壳聚糖溶液中固定化,洗去多余的壳聚糖,放入超低温冰箱-80 °C 冷冻过夜,然后置于冷冻干燥机中冻干 24 h 至干燥^[19]。

1.4.2 单因素试验

本研究采用一步包埋法制备植物乳杆菌微胶囊,其中乳清蛋白、海藻酸钠及氯化钙等质量分数的选择是其制备的主要影响因素。依照 1.4.1 方法制备微胶囊的 3 种条件如下:(1)乳清蛋白质量分数为 1.0%、2.5%、5.0%、7.5%和 10%的乳清蛋白、海藻酸钠 2%、氯化钙 2%;(2)海藻酸钠质量分数为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%和 3.0%的海藻酸钠、乳清蛋白 5%、氯化钙 2%;(3)氯化钙质量分数为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%和 3.0%的氯化钙、海藻酸钠 2%、乳清蛋白 5%,评价以上三种主要因素对微胶囊的包埋率及在模拟胃液中孵育 3 h 后的存活率的影响。

1.4.3 响应面试验

根据单因素试验结果及 Box-Behnken 试验设计方法^[21],以乳清蛋白 (X_1)、海藻酸钠 (X_2) 和氯化钙 (X_3) 质量分数为自变量,以在模拟胃液中孵育 3 h 后植物乳杆菌的存活率为响应值,并用 Design-Expert V8.0.6.1 软件设计回归模型,优化制备工艺条件。试验因素水平如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 响应面设计因素与水平

Table 1 Factor and level of Box-Behnken response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 乳清蛋白/%	3	4	5
X_2 海藻酸钠/%	1	2	3
X_3 氯化钙/%	1	2	3

1.5 微胶囊的菌株包埋率及存活率

微胶囊解囊方法参见发表文献^[17],称取湿胶囊样品 0.10 g (干胶囊 0.01 g),加入 0.90 mL 解囊液中,振荡 10 min 至完全解囊,接着取菌液 100 μ L,进行梯度稀释及平板计数,采用方程 (1) 确定植物乳杆菌 ZDY2013 的包埋率 (Er)。另外,准确称取湿微胶囊

0.10 g (干胶囊 0.01 g),加入 0.90 mL 模拟胃液,180 r/min 处理 3 h,接着在 8 000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清,加入 1 mL 解囊液,解囊并采用方程 (2) 计算微胶囊中植物乳杆菌在模拟胃液中的存活率 (Sr)。

$$Er = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Er ——植物乳杆菌 ZDY2013 的包埋率, %;

A_1 ——0.10 g 湿胶囊中的活菌数, CFU/mL;

A_0 ——包埋前菌液中的活菌数, CFU/mL。

$$Sr = \frac{B_2}{B_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

Sr ——微胶囊中植物乳杆菌在模拟胃液中的存活率, %;

B_1 ——0.10 g 湿胶囊中的活菌数, CFU/mL;

B_2 ——微胶囊经胃液处理并解囊后的活菌数, CFU/mL。

1.6 微胶囊耐受性试验

取 0.01 g 冻干微胶囊加入到 0.90 mL pH 值为 1.50 或含 $m=0.45\%$ 牛胆盐的 MRS 液体培养基中,充分混匀 15 s,在 37 °C 条件下,以 200 r/min 振荡处理 3、4 和 5 h,离心收集沉淀,加入 1 mL 解囊液,进行解囊并计数,对照组采用未包埋的菌体进行同样操作,通过存活率来评价植物乳杆菌进行微胶囊后耐酸和胆盐能力的变化^[22,23]。另外,取 0.01 g 冻干微胶囊加入到 0.9 mL MRS 培养基中,在 65 °C 下分别加热 0、2、4、6、8 和 10 min,离心收集沉淀,加入 1 mL 解囊液,进行解囊并计数,对照组采用未包埋的菌体进行同样操作,通过存活率来评价植物乳杆菌进行微胶囊后耐热能力的变化^[22]。

1.7 微胶囊在消化液中的释放

参考 Chen 等^[24]的方法,通过计算植物乳杆菌 ZDY2013 在不同消化液中的释放率对微胶囊的肠溶性进行评估。取 0.10 g 冻干微胶囊于 30 mL 解囊液中,进行活菌计数;取 0.10 g 冻干微胶囊分别加入 30 mL 的模拟胃液、胆汁、小肠溶液及结肠溶液中,200 r/min 振荡处理 2 h 后,500 r/min 离心 5 min,收集上清进行平板计数,采用方程 (3) 对植物乳杆菌的释放率 (Rr) 进行计算,并观察胶囊形态观察其溶解情况。

$$Rr = \frac{A_n}{A} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

Rr ——植物乳杆菌的释放率, %;

A_n ——某种消化液上清中的活菌数, CFU/mL;

A ——解囊液中完全解囊的活菌数, CFU/mL。

1.8 微胶囊的贮存加速及稳定性分析

贮藏加速实验：准确称取 0.10 g 冻干胶囊，装在锡箔纸袋中，抽真空密封包装。把样品分别放置于 60、55、50 和 45 ℃ 恒温恒湿培养箱中，分别在 0、1、2、3 和 4 h 取出一袋，进行活菌计数。依照文献报道^[25]及结合 Arrhenius 方程（4），预测 25 ℃ 条件下植物乳杆菌活菌数下降两个数量级所需的时间。

$$\ln K = \ln k_0 - \left(\frac{E_a}{RT} \right) \quad (4)$$

式中：

K ——失活速率常数，min；

k_0 ——前因子（又称频率因子），min；

E_a ——表观活化能，J/mol；

T ——绝对温度，K；

R ——气体常数，8.3144 J/(mol·K)。

依据 Zhou 等^[26]报道的方法，把密封包装样品分别置于 -20、25 及 37 ℃ 恒温恒湿培养箱中，在第 0、15、30、45 及 60 天各取出一袋，测其活菌数，以植物乳杆菌存活率来评价所制得微胶囊的贮存稳定性。

1.9 数据分析

试验均重复 3 次，结果用均数表示。采用 GraphPad Prism 8.0 软件及 Design-Expert V8.0.6.1 对数据进行处理和统计分析，各组总体均数采用单/双因素方差分析（One/Two-way ANOVA）进行显著性比较，其中 $P < 0.05$ ，表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 影响微胶囊制备的因素

2.1.1 乳清蛋白的质量分数对微胶囊制备质量的影响

乳酸菌微胶囊制备过程中，乳清蛋白的质量分数越高，与海藻酸钠形成的三维晶格结构衔接的越紧密，有利于保护乳酸菌的活力^[27]。本试验以乳清蛋白的质量分数为变量制备植物乳杆菌 ZDY2013 微胶囊，结果如图 1a 所示，随着乳清蛋白质量分数的提高，植物乳杆菌的包埋率先升高后降低，当质量分数为 5.0% 时，包埋率达到 93.71%，显著高于其它组（ $P < 0.05$ ）。另外，微胶囊化后植物乳杆菌在胃酸中的存活率随着乳清蛋白质量分数的升高而提高，在质量分数超过 5.0% 时趋于稳定，且存活率均超过 96%（图 1b），该结果优于周莉等^[27]制备的两歧双杆菌微胶囊，其乳清蛋白质量分数为 5.0% 时对应的菌株存活率仅为 62%。依照

图 1c、1d 微胶囊表观结果可知，当乳清蛋白质量分数为 1.0% 时，微胶囊成型效果不佳，呈雨滴状，同时颜色为透明的亮白色，结构不紧密；当乳清蛋白质量分数高于 2.5% 时，微胶囊呈乳白色、非透明、紧密的球形结构，说明乳清蛋白与海藻酸钠形成了紧密结构^[7]；然而，当乳清蛋白的质量分数高于 5.0% 时，微胶囊紧密的结构并不利于包埋率的提高，这可能是由于体系过于粘稠，促使包埋率降低。综上所述，采用质量分数为 5.0% 的乳清蛋白制备微胶囊最佳。

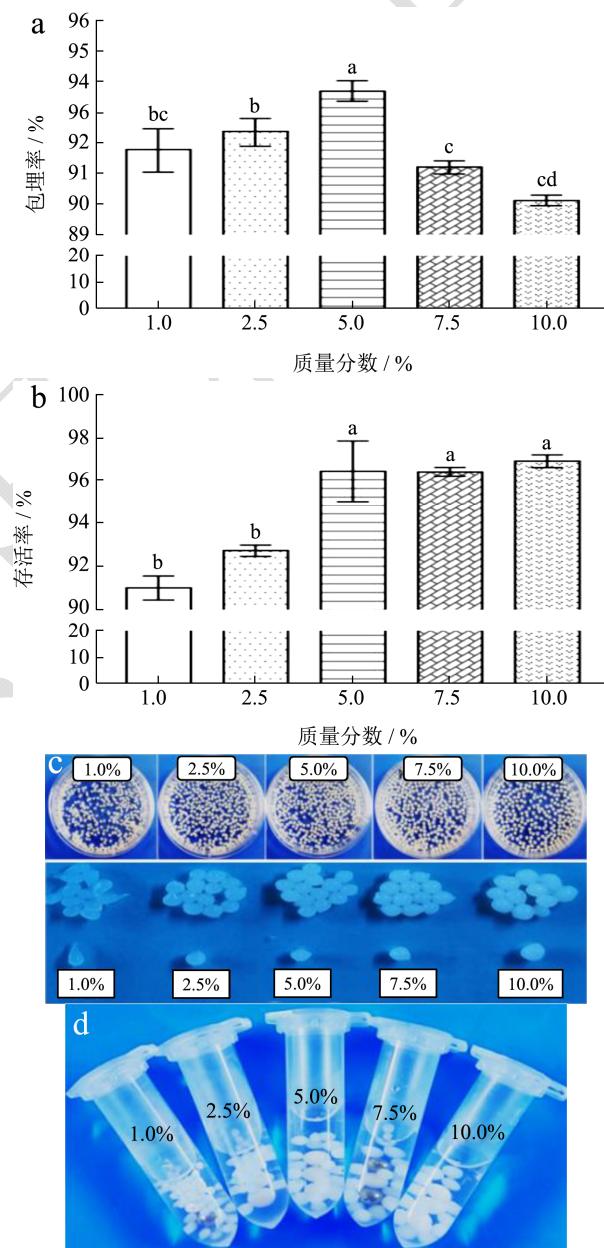


图 1 乳清蛋白含量对微胶囊的影响

Fig.1 Effect of the content of whey protein on the microcapsules with *L. plantarum*

注：a 植物乳杆菌包埋率；b 植物乳杆菌存活率；c、d 微胶囊表观图。

2.1.2 海藻酸钠的质量分数对微胶囊制备质量的影响

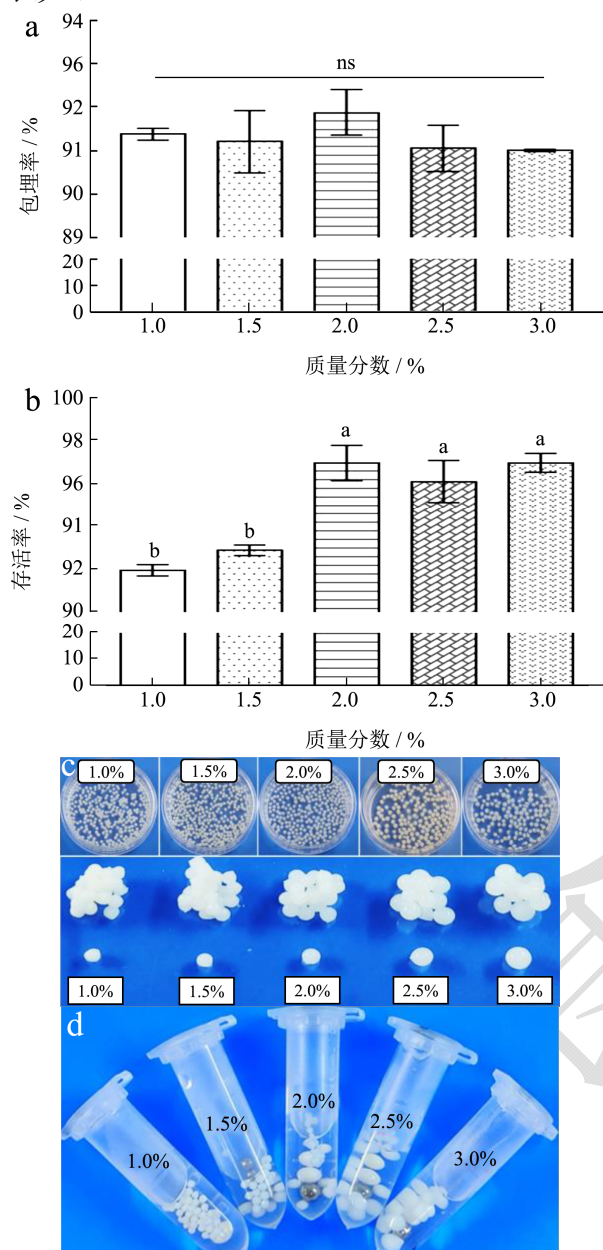


图2 海藻酸钠含量对微胶囊的影响

Fig.2 Effect of the content of sodium alginate on the microcapsules with *L. plantarum*

注: a 植物乳杆菌包埋率; b 植物乳杆菌存活率; c、d 微胶囊表面观图。

海藻酸钠质量分数越低,微胶囊表面张力越小,形成胶束孔径大,机械强度低,从而可能影响乳酸菌的包埋率及存活率^[7]。如图2a所示,当海藻酸钠质量分数为2.0%时,微胶囊中植物乳杆菌 ZDY2013 的包埋率最高,达到 91.88%,但与其它组无显著差异;当质量分数为2.0%~3.0%时,微胶囊中植物乳杆菌在胃酸中的存活率大于 96%,显著高于质量分数为1.0%和1.5%时的存活率(图2b, $P<0.05$),这可能是因为海藻酸质量分数升

高时,有利于与氯化钙交联形成凝胶,而质量分数较低时,微胶囊的机械强度低,不利于保护菌株^[27]。结合图2c、2d所示,当海藻酸钠质量分数高于2.0%时,微胶囊粒径会过大,这可能是由于混合物黏度过高导致的,与文献报道的高浓度海藻酸钠与乳清蛋白结合会提高粒径的结果类似^[27]。综上结果,当海藻酸钠质量分数达到2.0%时,植物乳杆菌 ZDY2013 的包埋率和存活率均佳,因此,选择2.0%的海藻酸钠进行后续研究。

2.1.3 氯化钙的质量分数对微胶囊制备质量的影响

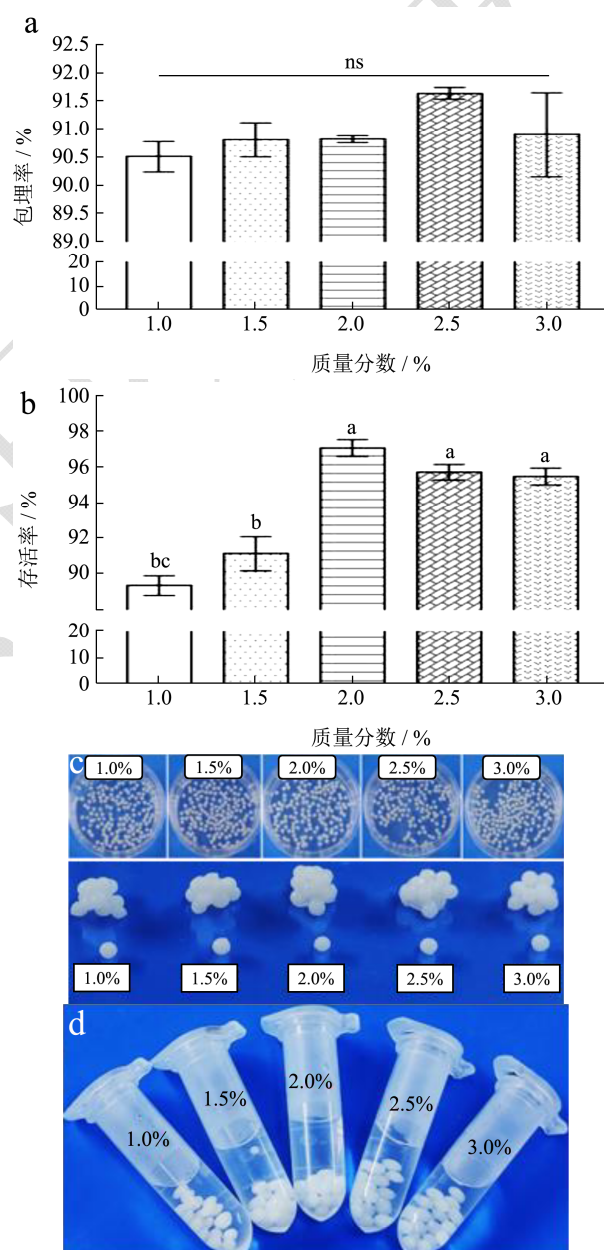


图3 氯化钙含量对微胶囊的影响

Fig.3 Effect of the content of calcium chloride on microcapsules with *L. plantarum*

注: a 植物乳杆菌包埋率; b 植物乳杆菌存活率; c、d 微胶囊表面观图。

氯化钙是影响微胶囊制备质量的另一因素，其与海藻酸钠反应可形成亲水性网状结构凝胶，而氯化钙质量分数的高低与菌体活性强弱可能相关^[28]。本研究采用不同质量分数的氯化钙制备微胶囊，发现植物乳杆菌 ZDY2013 的包埋率与氯化钙含量无显著相关性，其中，当质量分数为 2.5% 时，包埋率最高，达 91.50%（图 3a）；由图 3b 所知，微胶囊包埋后的植物乳杆菌在胃酸中的存活率随氯化钙质量分数提高而先升高再趋于下降，在 2.0% 时达 97.08%，然而，氯化钙质量分数的升高对微胶囊的形态特点影响不明显（图 3c、3d）。结合前期文献的相似报道^[29]，氯化钙质量分数为 2.0% 时有利于保持保加利亚乳杆菌微胶囊的高活性，而当质量分数升至 3% 时存活率降为 60%，这可能与微胶囊的囊壁过厚影响菌体的释放有关。因此，选择质量分数为 2.0% 的氯化钙作为提高植物乳杆菌存活率的最佳条件。

2.2 微胶囊制备条件的优化

2.2.1 响应面试验结果与分析

微胶囊中植物乳杆菌 ZDY2013 的存活率为影响微胶囊质量的最主要因素。基于单因素试验结果及 Box-Behnken 设计原理，对影响微胶囊中菌株存活率的乳清蛋白（ X_1 ）、海藻酸钠（ X_2 ）及氯化钙（ X_3 ）的质

量分数进行响应面优化，试验设计与结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 中心组合试验结果与分析

Table 2 Results and analysis of Box-Behnken central composition for microcapsules

试验号	X_1 乳清蛋白/%	X_2 海藻酸钠/%	X_3 氯化钙/%	X 存活率/%
1	5	2	3	96.30
2	4	2	2	96.08
3	3	3	2	96.65
4	3	2	1	92.53
5	4	2	2	96.67
6	4	3	3	95.89
7	4	2	2	96.70
8	3	1	2	91.42
9	4	2	2	96.73
10	4	1	3	92.47
11	4	1	1	93.71
12	4	2	2	96.75
13	5	2	1	94.20
14	5	3	2	96.75
15	4	3	1	94.98
16	3	2	3	93.08
17	5	1	2	95.68

表 3 Box-Behnken 中心组合试验设计与结果

Table 3 The experimental design and results of microcapsules for Box-Behnken central composite

方差来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	51.00	9	5.67	22.20	0.000 2	**
A	10.71	1	10.71	41.94	0.000 3	**
B	15.09	1	15.09	59.10	0.000 1	**
C	0.68	1	0.68	2.65	0.147 8	
AB	4.32	1	4.32	16.93	0.004 5	**
AC	0.59	1	0.59	2.33	0.170 7	
BC	1.16	1	1.16	4.53	0.070 8	
A2	3.04	1	3.04	11.89	0.010 7	*
B2	1.60	1	1.60	6.25	0.041 0	*
C2	12.31	1	12.31	48.20	0.000 2	**
残余	1.79	7	0.26			
失拟	1.46	3	0.49	6.00	0.058 1	不显著
纯误差	0.33	4	0.081			
矫正总和	52.79	16				

注：**表示差异高度显著（ $P<0.01$ ）；*表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

采用 Design-Expert V8.0.6.1 对数据进行回归分析，结果如表 3，拟合回归方程为：存活率（%） $X=96.59+1.16\times X_1+1.37\times X_2+0.29\times X_3-1.04\times X_1X_2+0.39\times X_1X_3+0.54\times X_2X_3-0.85\times X_1^2-0.62\times X_2^2-1.71\times X_3^2$ ，模型的决定系数

$R=0.966\ 1$ ，表示模型能解释 96.61% 的响应值变化，相关度及拟合程度好；模型失拟项 $P=0.058\ 1>0.05$ ，不显著，则表明模型显著性较好，因此模型能较好地预测和反应各因素与植物乳杆菌在胃液中孵育 3 h 的存

活率; 误差 $CV=1.93\%$, 说明试验稳定性较好。综上结果表明, 一次项中影响植物乳杆菌存活率的影响因素按大小排序依次为: X_2 (海藻酸钠) $> X_1$ (乳清蛋白) $> X_3$ (氯化钙); X_1X_3 交互作用显著, X_1X_2 、 X_2X_3 的交互作用不显著, 表明各个影响因素与响应值之间不是简单的线性关系。

图 4 为各个因素交互作用的等高线和响应面图, 其直观描述了 3 个因素对响应值的影响。响应面坡度越陡峭, 等高线越扁, 且排列越密集, 说明各因素影响越显著, 微胶囊中植物乳杆菌存活率对各因素变化越敏感。当其他因素取零水平时, 植物乳杆菌存活率随乳清蛋白、海藻酸钠及氯化钙质量分数单一变量的增大, 均呈先升高后降低趋势, 故在所选因素参数范围内均存在极值, 可对微胶囊化植物乳杆菌的最佳工艺进行预测。结合响应面分析结果可知模型预测微胶囊化的最佳工艺条件为: 乳清蛋白质量分数为 4.22% 、海藻酸钠质量分数为 2.22% 、氯化钙质量分数为 1.87% , 植物乳杆菌的理论存活率为 96.90% 。

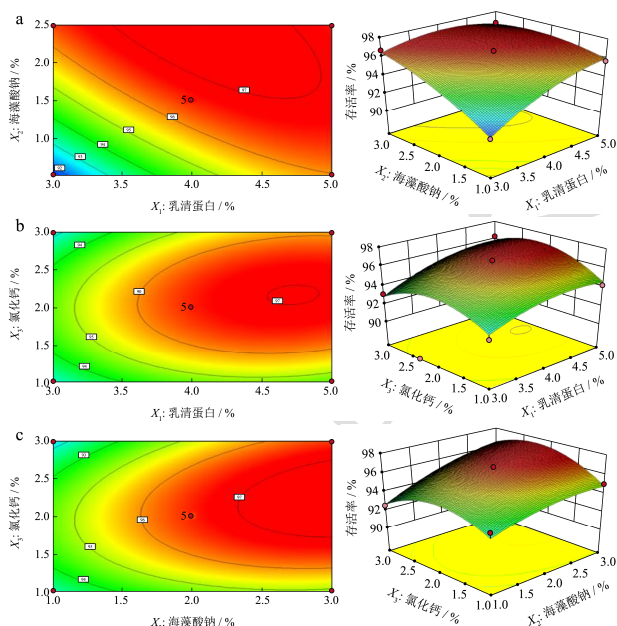


图 4 不同因素对植物乳杆菌存活率交互影响的等高线及响应面图

Fig.4 The contour line and response surface diagram of interaction of various factors on the survival rate of *L. plantarum*

注: a 乳清蛋白和海藻酸钠对应的等高线和响应面图; b 氯化钙和乳清蛋白对应的等高线和响应面图; c 氯化钙和海藻酸钠对应的等高线和响应面图。

2.2.2 验证工艺条件

考虑到实际操作条件, 参数调整为: 乳清蛋白质量分数为 4.0% 、海藻酸钠质量分数为 2.0% 、氯化钙质量分数为 2.0% 。为了进一步考察工艺条件的可靠性, 进行了三次平行实验, 得到微胶囊中植物乳杆菌在胃

酸中的存活率分别为 95.29% 、 96.62% 、 95.56% , 平均值为 95.82% , 与理论值相对误差为 $1.1\% < 5.0\%$, 说明响应面法优化后的工艺条件可靠。

2.3 微胶囊的形态及结构表征

如图 5a 所示, 采用最佳工艺条件制备的微胶囊形态为乳白色小球, 胶囊粒径分布均一, 说明湿胶囊成型效果较好; 微胶囊冻干后, 圆形小球状结构未发生变化, 但表面变得粗糙、不平滑 (图 5b), Han 等^[10]构建的藻酸钙-乳清蛋白微胶囊具有类似表面粗糙结构。扫描电镜结果显示, 冻干微胶囊表面呈褶皱状 (图 5c), 这是由于微胶囊冻干后粒径会减小, 且壁材海藻酸钠形成的微胶囊具有多孔性^[19]。另外, 扫描电镜结果可以明显观察到植物乳杆菌 ZDY2013 被均匀包埋在胶囊内部, 说明该工艺制备的微胶囊质量可靠。

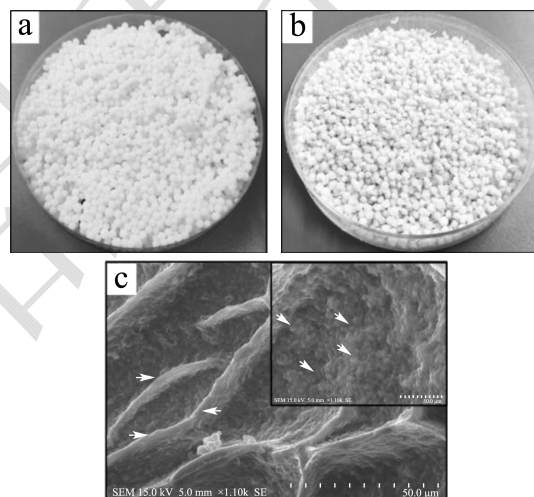


图 5 优化的微胶囊形态及其扫描电镜图

Fig.5 The shape and SEM images of optimized microcapsules with *L. plantarum*

注: a 湿胶囊形态; b 冻干后胶囊形态; c 微胶囊内部图 ($50\mu\text{m}$); $\rightarrow$ 为褶皱; $\searrow$ 为植物乳杆菌。

2.4 微胶囊化提高植物乳杆菌 ZDY2013 环境耐受性

乳酸菌相关产品能否给人体健康发挥益生作用, 需要耐受胃肠道消化系统环境, 因此, 评价其抵抗消化道强酸和胆盐等极端条件的能力至关重要^[30]。由图 6a 可知, 植物乳杆菌 ZDY2013 菌体在 pH 值 1.50 条件下, 随处理时间的延长, 存活率不断下降, 处理 5 h 后, 存活率低至 62.80% 。然而, 同样条件下微胶囊中植物乳杆菌存活率始终维持在 90% 左右, 且均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。胆盐耐受具有相似的结果, 植物

乳杆菌菌体的存活率随胆盐处理时间的延长由 95.11% 降至 90.76%, 并均显著低于微胶囊中的存活率 (图 6b, $P<0.001$)。上述结果说明微胶囊技术能有效增强乳酸菌耐受胃肠道环境的能力。

此外, 热环境是乳酸菌产品面临的另一个极端条件, 评价微胶囊中植物乳杆菌的耐热能力, 能为其工业应用提供基础数据^[22]。如图 6c 所示, 热处理可以损伤植物乳杆菌的活性, 且随着处理时间的延长, 活性不断下降。其中, 对照组存活率在热处理后较处理前最终下降了 59.64%, 而微胶囊组仅下降了 32.86%。然而, 微胶囊中植物乳杆菌的活性始终优于菌体本身 ($P<0.05$), 这与文献报道的微胶囊化能改善嗜酸乳杆菌抵抗热处理的效果相似^[31]。

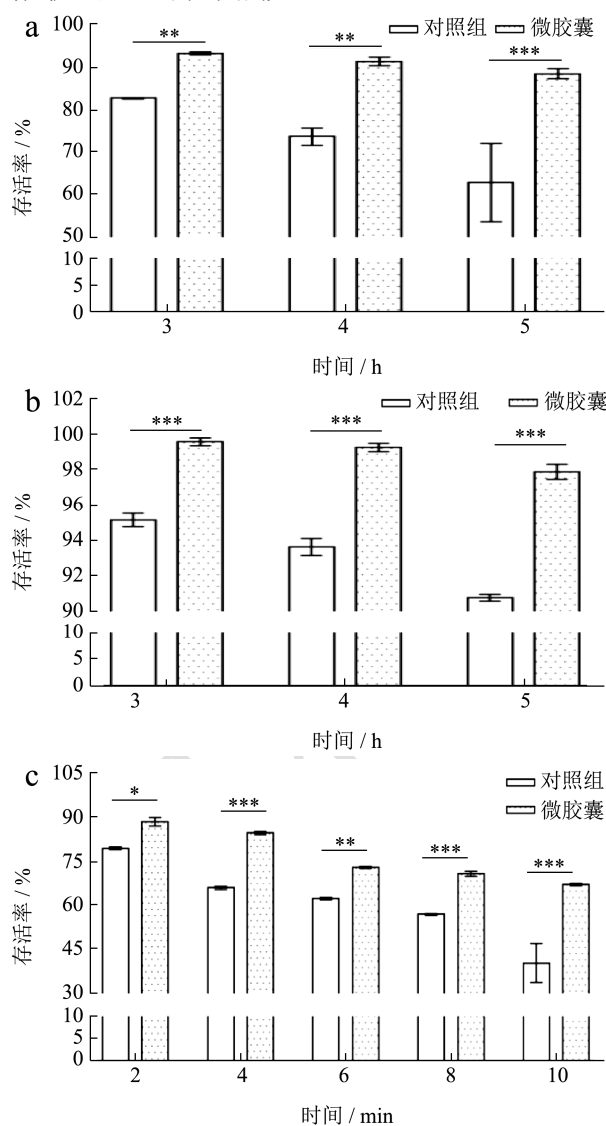


图 6 微胶囊的环境耐受性

Fig.6 Environmental tolerance of microcapsules with *L. plantarum*

注: a: 耐酸性, pH 值 1.5; b: 耐胆盐性, 0.45%胆盐; c: 耐热性, 65 °C 热水浴; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

2.5 微胶囊的肠溶性

微胶囊化能保护益生菌抵御胃内环境并促使其定向进入肠道, 从而提高菌株在肠道的定植率及益生功效^[2]。本研究在明确微胶囊能耐受胃肠道环境后, 进一步评价其进入肠道后的肠溶性有利于阐明菌株在肠道发挥益生作用的潜力。如图 7 所示, 冻干微胶囊在经模拟人体胃液处理 2 h 后, 植物乳杆菌几乎未释放; 在胆汁液中消化 20 min 后, 释放率只有 12.24%, 这主要是因为微胶囊需经历缓慢吸水阶段, 同时, 带正电荷的乳清蛋白与带负电荷的海藻酸钠通过静电结合, 形成紧密的保护层, 从而有效阻止其在胃液和胆汁中的释放^[10]。然而, 微胶囊在经过小肠液和结肠液消化后, 溶出度相比于胃液中有显著增加, 释放率分别为 60.06% 和 81.90%, 证明制备的微胶囊具有良好的肠溶效果, 这可能是由于海藻酸钠-乳清蛋白复合物所具有的良好肠溶性所决定的, 该结果与 Banerjee 等^[32]报道的干酪乳杆菌微胶囊在肠液中的释放特征一致。

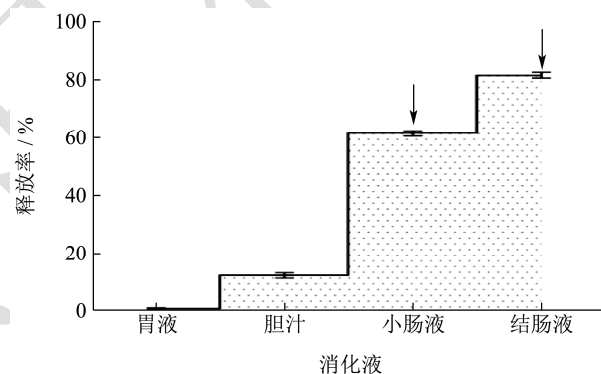


图 7 微胶囊在模拟消化道的释放率

Fig.7 Release rate of *L. plantarum* of microcapsules in simulated digestive tract

2.6 肠溶性微胶囊的贮藏稳定性

微胶囊中植物乳杆菌活性在贮藏过程中的变化是判断微胶囊稳定性的重要指标^[18]。微胶囊贮藏加速实验结果如图 8a 所示, 不同温度条件下贮藏, 植物乳杆菌 ZDY2013 的活菌数均随时间延长而下降, 其中, 其中 60 °C 条件下下降最明显, 再跟据 Arrhenius 方程进行分析, 预测 25 °C 的贮藏温度下, 微胶囊中植物乳杆菌活菌数下降 2 个数量级的贮藏期为 56 d, 与 Moumita 等^[33]报道的屎肠球菌微胶囊的贮藏期基本相同。

此外, 常规温度贮藏条件下, 冻干微胶囊的活菌数也是随着贮藏时间的延长而逐渐下降, 温度越高活菌数下降越快 (图 8b)。当存储于 -20 °C 时, 微胶囊稳定性最好, 60 d 后活菌数相比第 0 d 只下降了 0.39 个对数值; 在 25 °C 条件下存储时, 微胶囊活菌数下降比

较明显,经过 60 d,活菌数降低了 1.96 个对数值,与贮藏加速实验理论值一致;然而,当存储于 37 °C 条件时,60 d 后活菌数相较于初始状态下降了 3.24 个对数值。整体而言,冻干微胶囊的贮藏稳定性良好,对植物乳杆菌的活性有很好的保护作用。低温更有利于保证微胶囊的稳定性及菌株的活性。

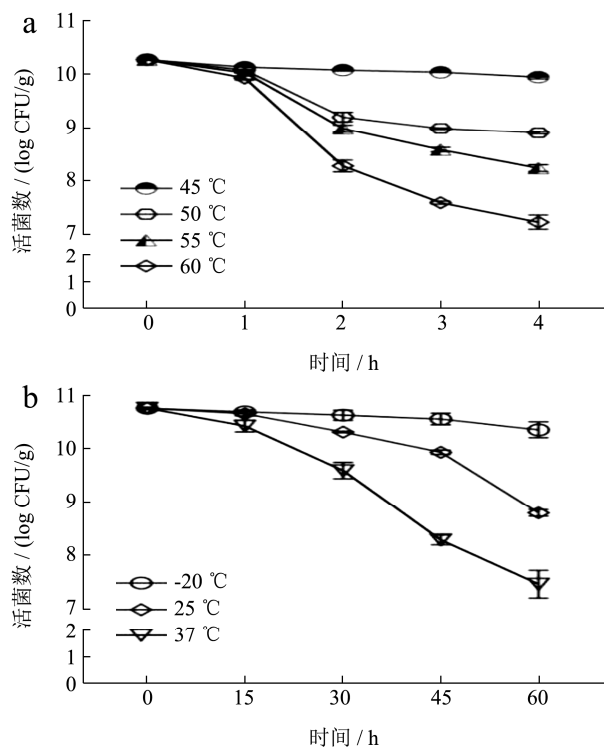


图 8 不同贮存条件对微胶囊化植物乳杆菌 ZDY2013 活性的影响

Fig.8 The effect of different storage condition on the activity of microencapsulated *L. plantarum* ZDY2013

注: a 贮藏加速实验; b 贮藏稳定性实验。

3 结论

乳酸菌产品在加工、贮藏过程中会面临光、氧、热等外界因素的负面影响,而其活性的稳定性决定着其在肠道发挥益生作用的潜力。因此,控制产品中乳酸菌在特定环境、特定载体中的释放速度具有重要意义。本研究借助微胶囊技术来阻止外界环境胁迫对植物乳杆菌 ZDY2013 的影响,发现壁材乳清蛋白和海藻酸钠等影响肠溶性微胶囊的制备。经单因素分析及 Box-Behnken 响应面试验确定了微胶囊制备的最佳工艺条件为 4.0%乳清蛋白、2.0%海藻酸钠以及 2.0%氯化钙;制备的微胶囊外表为乳白色小球且粒径均一,另外扫描电镜分析确定植物乳杆菌均匀分布在胶囊内部;微胶囊化显著改善植物乳杆菌耐受极端环境的能力,并促使菌株在肠道定点释放;同时,该肠溶性微胶囊稳定性良好,能在-20 °C 条件下储存 60 d 保持菌株活性基本不变。本研究将有效解决实际生产应用中

外界环境损伤植物乳杆菌 ZDY2013 存活能力和益生功效的问题,同时也为该菌株及低聚木糖在指定环境发挥特定功能奠定基础。

参考文献

- [1] Cunningham M, Azcarate-Peril M A, Barnard A, et al. Shaping the future of probiotics and prebiotics [J]. Trends Microbiol, 2021, 29(8): 667-685.
- [2] Liu H, Cui S W, Chen M, et al. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(17): 2863-2878.
- [3] Ramos P E, Cerqueira M A, Teixeira J A, et al. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(11): 1864-1877.
- [4] Wang K, Ni J, Li H, et al. Survivability of probiotics encapsulated in kelp nanocellulose/alginate microcapsules on microfluidic device [J]. Food Research International, 2022, 160: 111723.
- [5] Zhao C, Zhu Y, Kong B, et al. Dual-core prebiotic microcapsule encapsulating probiotics for metabolic syndrome [J]. ACS Applied Materials & Interfaces 2020, 12(38): 42586-42594.
- [6] 赵萌,蔡沙,屈方宁,等.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[J].现代食品科技,2015, 31(2):70-75.
- [7] 杨静怡,郑红霞,高彦祥,等.复配海藻酸盐凝胶作为传递体系的研究进展[J].食品科学,2022,43(3):227-238.
- [8] 罗丹阳,韩凯宁,杨晓泉.单分散液滴发生器(MDDG)结合静电自组装制备益生菌微胶囊[J].现代食品科技,2020,36 (12):227-233,251.
- [9] Rui J, Jiahui W, Junliang Z, et al. Extending viability of *Bifidobacterium longum* in chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1389.
- [10] Han C, Xiao Y, Liu E, et al. Preparation of ca-alginate-whey protein isolate microcapsules for protection and delivery of *L. bulgaricus* and *L. paracasei* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163: 1361-1368.
- [11] Zhang Z, Tao X, Shah N P, et al. Antagonistics against pathogenic *Bacillus cereus* in milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its anti-adhesion effect

- on Caco-2 cells against pathogens [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(4): 2666-2674.
- [12] Xie Q, Pan M, Huang R, et al. Short communication: Modulation of the small intestinal microbial community composition over short-term or long-term administration with *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(9): 6913-6921.
- [13] Zhang Z, Jin M, Wang K, et al. Short-term intake of *Lactiplantibacillus plantarum* ZDY2013 fermented milk promotes homeostasis of gut microbiota under enterotoxigenic *Bacillus cereus* challenge [J]. Food Funct, 2021, 12(11): 5118-5129.
- [14] Wang Y, Guo Y, Chen H, et al. Potential of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 in relieving colitis by gut microbiota, immune, and anti-oxidative stress [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2018, 64(5): 327-337.
- [15] Chen M, Liu S, Imam K M S U, et al. The effect of xylooligosaccharide, xylan, and whole wheat bran on the human gut bacteria [J]. Frontiers Microbiology, 2020, 11: 568-457.
- [16] 张娜, 占英, 孟迎平, 等. 功能低聚糖对植物乳杆菌 ZDY2013 发酵乳发酵特性及冷藏效果的影响[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11):34-42.
- [17] 李作美, 许晓云, 刘琦. 双歧杆菌微胶囊的制备及其理化性能 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(6):155-162.
- [18] Silva T M D, Deus C D, Fonseca B D S, et al. The effect of enzymatic crosslinking on the viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus*) encapsulated by complex coacervation [J]. Food Research International, 2019, 125: 108577.
- [19] 叶贤江, 曾恒, 蔡为荣, 等. 双歧杆菌凝胶微囊制备及其胃肠释放特性研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20):146-153.
- [20] Fang C, Yue Z, Jing T, et al. Preparation and properties of purple potato anthocyanin pectin /calcium alginate composite gel spheres [J]. Applied Chemical Industry, 2020, 49(9): 2298-2302.
- [21] 唐莹, 邹波, 余元善, 等. 佛手益生菌软糖的制备及其体外消化耐受性的分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(7):256-263.
- [22] 李一娟, 邵开生, 张娜, 等. 产 Reuterin 罗伊氏乳杆菌的定向筛选及其生物学特性[J]. 食品科学, 2021, 42(14):32-38.
- [23] Zhao M, Qu F, Wu Z, et al. Protection mechanism of alginate microcapsules with different mechanical strength for *Lactobacillus plantarum* ST-III [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 66: 396-402.
- [24] Cheng Q, Liu L, Xie M, et al. A colon-targeted oral probiotics delivery system using an enzyme-triggered fuse-like microcapsule [J]. Advanced Healthcare Materials, 2021, 10(8): e2001953.
- [25] 杨凯舟, 刘云, 杨立芳, 等. 长双歧杆菌 BBMN68 微胶囊的制备及其应用性评价[J]. 食品科学, 2015, 36(9):71-77.
- [26] Zhou H B, Chen J, Li S, et al. Preparation of acid-resistant microcapsules with shell-matrix structure to enhance stability of *Streptococcus Thermophilus* IFFI 6038 [J]. Journal of Food Science, 2017, 82(8): 1978-1984.
- [27] 周莉, 王晓瑞, 谭静, 等. 海藻酸钠-乳清蛋白复合益生菌微胶囊的构建及性能评价[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(4):108-113.
- [28] Rather S A, Akhter R, Masoodi F A, et al. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297 [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 83: 50-58.
- [29] 周莉, 王晓瑞, 平洋, 等. 保加利亚乳杆菌微胶囊的制备及特性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11):188-193.
- [30] Ilha E C, Da Silva T, Lorenz J G, et al. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey [J]. European Food Research and Technology, 2014, 240(5): 977-984.
- [31] Dianawati D, Lim S F, Ooi Y B H, et al. Effect of type of protein-based microcapsules and storage at various ambient temperatures on the survival and heat tolerance of spray dried *Lactobacillus acidophilus* [J]. Journal of Food Science, 2017, 82(9): 2134-2141.
- [32] Banerjee D, Chowdhury R, Bhattacharya P. In-vitro evaluation of targeted release of probiotic *Lactobacillus casei* (2651 1951 RPK) from synbiotic microcapsules in the gastrointestinal (GI) system: Experiments and modeling [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 83: 243-253.
- [33] Moumita S, Das B, Hasan U, et al. Effect of long-term storage on viability and acceptability of lyophilized and spray-dried synbiotic microcapsules in dry functional food formulations [J]. LWT - Food Science and Technology, 2018, 96: 127-132.