

编者按:由中国食品科学技术学会青年工作委员会和《中国食品学报》杂志社共同主办的“第六届中国食品科学青年论坛”于 2023 年 9 月 16-17 日在南昌召开。来自全国 190 余所高校、科研单位的 1000 余名青年学者、科研人员和企业代表参加了本届论坛。

针对当前食品科学技术创新发展所面临的新问题、新挑战和新需求,论坛以“新时代下食品科学研究的目标与导向”为主题,邀请食品及相关领域的院士、专家,国家自然科学基金-杰出青年基金、优秀青年基金获得者以及全国食品青年科技工作者进行深入研究、交流。

经论坛组委会的严格评审,从收录的 200 余篇国家及各省青年科学基金项目论文中优选出 33 篇论文,现以专刊报道,以飨广大的食品科技工作者。

乳酸乳球菌的单菌包埋技术及在胃肠道环境中的性能评价

万昊, 谢安琪, 冯蕾

(南昌大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室 南昌 330029)

摘要 由于益生菌对消化系统的强酸和高浓度胆汁盐环境较为敏感,并且在肠道中定殖能力较低,因此开发新颖有效的益生菌包埋体系用于解决上述问题很有必要。本研究使用羧甲基化 β -葡聚糖(mGN),通过金属-酚醛网络结构(Fe-TA)的桥联作用,将其黏附在乳酸乳球菌(LL)表面,构建乳酸乳球菌的包埋体系 LL@Fe-TA@mGN,并评价 LL@Fe-TA@mGN 对胃液与胆盐的抗性及其在体内的滞留能力。结果表明:当 mGN 的质量浓度为 0.12 mg/mL 时,LL@Fe-TA@mGN 体系的粒径和 zeta-电位都达到峰值,表明该质量浓度为 mGN 包埋单个乳酸乳球菌的最佳质量浓度。在 MRS 液体培养基中,LL@Fe-TA@mGN 的生长曲线与 LL 的生长曲线没有显著性差异,说明 mGN 的毒性可以忽略不计。在扫描电镜与透射电镜分析中均可清晰地看到一层“膜”完整地包覆在乳酸乳球菌表面。经 2 h 模拟胃液与胆盐的孵育,mGN 包埋后的 LL 抗胃液能力与抗胆盐能力相比于未包埋的 LL 分别提升 14.63 倍与 1.94 倍。体内荧光成像实验证实 LL@Fe-TA@mGN 具有更强的肠道滞留能力。综上,本研究开发的乳酸乳球菌单菌包埋技术能够显著提升乳酸乳球菌的胃肠道抗性与体内滞留能力。研究结果可为益生菌包埋系统的开发与利用提供新的思路和策略。

关键词 羧甲基化 β -葡聚糖; 乳酸乳球菌; 抗胃液; 抗胆盐; 体内滞留

文章编号 1009-7848(2024)04-0001-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.04.001

1980 年,俄罗斯诺贝尔奖获得者 Elie Metchnikoff 首次提出益生菌的概念,阐述了乳酸菌对人体的潜在益处,并提出乳酸菌长寿论^[1]。在随后的几十年时间里,人们对益生菌的研究越来越深入。研究表明,益生菌对宿主健康状况存在积极的影响。保持益生菌在胃肠道的高存活率,是益生菌在宿主体内发挥有效功能的必要条件^[2-3]。然而,在口服过程中,由于益生菌对胃肠道强酸和高浓度胆汁盐的环境较为敏感,经胃肠道消化后很难存活

与定殖,使最终定殖在肠道中的益生菌的数量低于世界粮农组织(FAO)所建议的最低理论值^[4]。此外,由于益生菌对肠壁的附着力差,定殖效率低,进一步影响了益生菌的功效^[5]。鉴于此,研究开发保护益生菌的方法,对于提高益生菌在胃肠道的存活率及在肠道的定殖率具有重大的现实意义。

目前,有多种方法可以帮助益生菌在口服过程中存活和繁衍,并提高益生菌的肠道定殖效率,如挤出^[6]、冷冻干燥^[7]、喷雾干燥^[8]和微胶囊化^[9]等。这些方法虽然在一定程度上提升了益生菌在肠道中的活性,但是存在操作复杂、产率低等问题,同时可能对益生菌造成机械损伤^[10]。因此,迫切需要找到一种简单有效的方法来包埋益生菌,以增强益生菌对胃肠道环境应激的抵抗能力,延长益生菌在肠道的滞留时间,提高益生菌定殖率,达到更

收稿日期: 2024-04-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(32101212,32372322);
江西省自然科学基金项目(20224ACB215009,
2023ACB205024)

第一作者: 万昊,男,博士,教授

E-mail: wanhao424@ncu.edu.cn

好地发挥益生菌在体内效能的目的。

选择合适的壁材与包埋方法对益生菌的有效包埋至关重要^[11]。 β -葡聚糖(GN)是一种常见的益生元,广泛存在于大麦、小麦和燕麦等天然植物中^[12],可被肠道菌群代谢为短链脂肪酸,表现出丰富的生理活性,如改善肠道环境,增加肠道菌群丰度和修复肠道屏障等^[13]。除了优越的生物活性,GN的大孔蜂窝状结构,可以比任何其它壁材更有效地捕获微生物。由于GN在上消化道稳定^[14],可以减轻益生菌在进入肠道过程中失活的风险,提高益生菌的存活率,并将益生菌高浓度地输送到指定部位,因此现已作为益生菌包埋壁材使用^[15]。朱莹莹等^[16]利用青稞 β -葡聚糖对植物乳杆菌进行包埋,显著地提升了植物乳杆菌的胃肠道耐受性。然而,GN存在黏度大、溶解性差等问题^[17]。羧甲基化 β -葡聚糖(mGN)在不改变GN空间结构的同时,在很大程度上解决了其难溶于水的问题,并提升了GN的生物活性^[18]。然而,mGN无法直接黏附在单个益生菌的表面对其进行保护。寻找到能够连接内层益生菌与壁材mGN的“桥梁”,是实现mGN对单个益生菌包埋的关键。金属-酚醛网络是由酚类配体(如单宁酸)和金属离子(如 Fe^{3+})组成的超分子复合物,可通过一步法简便地组装成配位络合物,并黏附在多种材料表面^[19]。酚类物质具有较多羟基和较高的黏附能力,可通过氢键作用将mGN吸附到金属-酚醛网络结构的表面,达到mGN对益生菌包埋的目的。

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, LL)是乳酸菌属中的一种重要模式菌,同样也是食品级微生物(Generally regards as safe, GRAS),被广泛应用于食品工业^[20]。LL具有促进消化,维持肠胃菌群平衡,提高宿主免疫力和加固肠道黏膜等作用^[21]。然而,关于乳酸乳球菌包埋的研究较少,而包埋单个乳酸乳球菌的研究更鲜见报道。基于此,本研究以mGN作为壁材,通过金属-酚醛网络的桥联作用,将mGN黏附在LL表面,旨在探究其对所包埋的LL胃肠道耐受性及肠道滞留能力的影响。

1 材料与方法

1.1 原料、菌种、试剂与实验动物

乳酸乳球菌由南昌大学陈廷涛教授团队提

供。MRS液体培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;单宁酸(Tannic acid, TA),美国Sigma-Aldrich;六水合三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),西陇科学股份有限公司;Sulfo-Cyanine5-DBCO(Cy5),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Phosphate buffer saline(PBS)缓冲片,武汉赛维尔生物科技有限公司; β -葡聚糖,爱尔兰Megazyme有限公司。本研究中使用的所有其它试剂均为分析纯级。

10只SPF级C56BL/6J雄鼠,体质量(20 ± 2)g,周龄6~8周,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司(许可证号:SCXK(京)2019-0010)。饲养条件:房间温度为(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,12 h/12 h的灯光/黑夜循环。小鼠在自由饮食、饮水饲养适应环境1周后,将小鼠随机分为2组,每组5只,分别为LL灌胃组与LL@Fe-TA@mGN灌胃组。

1.2 设备与仪器

BSC-1304 II A2超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;HPX-11-80生化培养箱,上海跃进医疗器械有限公司;TD5A-WS台式低速离心机,湖南湘怡实验室仪器开发有限公司;ZWYR-200D恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;马尔文3000激光粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司;JSM-6701F冷场发射扫描电子显微镜(Cold field emission scanning electron microscope, SEM),日本电子株式会社;透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM),日本日立公司;活体成像系统,深圳凯佳光学科技有限公司。

1.3 改性葡聚糖包埋乳酸乳球菌体系的构建

参考本课题组以往方法^[22]并加以改进。LL接种于8 mL MRS液体培养基中,并置于37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养振荡器中培养过夜。培养结束后离心(6 000 r/min, 4 min)获得菌泥,并用PBS缓冲液洗涤菌泥2次。随后将菌泥重悬于1 mL PBS缓冲液中,备用。将100 μL 菌悬液(活菌数约为 1×10^8 CFU/mL)、10 μL TA溶液(40 mg/mL)和10 μL FeCl_3 溶液(10 mg/mL)分别加入880 μL PBS缓冲液中,涡旋60 s,使其在LL表面形成牢固的金属-酚醛网络(Fe-TA)结构,获得LL@Fe-TA体系。用PBS缓冲液洗涤该体系2次,以除去未反应的TA

和 Fe^{3+} 。将 LL@Fe-TA 体系重悬于 990 μL 的 PBS 缓冲液中, 随后加入 10 μL 不同质量浓度的 mGN, 使得 mGN 在体系中最终质量浓度为 0~0.2 mg/mL, 并获得羧甲基化 β -葡聚糖包埋乳酸乳球菌体系 LL@Fe-TA@mGN。最后用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 以除去体系中多余的 mGN。

1.4 LL@Fe-TA@mGN 的粒径与电位分析

取 1 mL 新鲜制备的 LL@Fe-TA@mGN 稀释于 9 mL 去离子水中, 轻轻涡旋, 使其充分分散于离心管中, 使用激光粒度分析仪对 LL@Fe-TA@mGN 的粒径与电位进行测定。

1.5 LL@Fe-TA@mGN 的生长曲线测定

将 LL@Fe-TA@mGN 按照 2% (体积分数) 的接种量接种于新鲜的 MRS 液体培养基中。将该体系置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中, 轻轻摇晃, 以未接种的 MRS 液体培养基作为空白组, 未包埋的 LL 作为对照组。培养 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 后, 使用酶标仪测定菌株在波长 600 nm 处的 OD 值。

1.6 LL@Fe-TA@mGN 的微观形态分析

根据 Feng 等^[23]的方法, 使用 SEM 观察 LL@Fe-TA@mGN 的表面形态。将 MRS 液体培养基中的菌体样本离心 (6 000 r/min, 4 min) 并去除上清液, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。随后将沉淀用 2.5% 的戊二醛溶液固定 3 h。紧接着被固定的样本用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 再用清水洗涤 2 次。用体积分数 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 的乙醇溶液连续对样本进行脱水, 每次脱水 15~20 min。之后用 100% 的乙醇溶液脱水 2 遍, 每次脱水 15~20 min。使用干燥箱在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下对样品进行干燥 10~15 min, 随后进行喷金并上样观察。将 1 滴细菌悬浮液小心地沉积在 Formvar/carbon 200 目网格上并在空气中干燥, 随后进行 TEM 观察。

1.7 LL@Fe-TA@mGN 的胃液与胆盐耐受性研究

将等量 LL 和 LL@Fe-TA@mGN (1×10^9 CFU/mL) 分别转移到 1.6 mL 新鲜的模拟胃液中 (Simulated gastric fluid, SGF; pH 2.5, 1 000 mL 蒸馏水, 5 g 胃蛋白酶, 8.5 g NaCl) 和 4% 胆汁盐中。然后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 的摇床条件下孵育。在预定时间点 (0, 1, 2 h) 取 300 μL 反应溶液, 离心 (6 000 r/min, 4 min) 得到沉淀, 并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次。在连续稀释后, 将获得的细菌悬液涂布在固体

MRS 平板上。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后, 进行菌落计数。

1.8 LL@Fe-TA@mGN 的体内滞留成像

将 10 只 C57BL/6J 小鼠 (禁食 12 h) 分为 2 组, 分别口服 Cy5 标记的 LL@Fe-TA@mGN 和 LL (1×10^9 CFU/mL)。使用活体成像系统在小鼠口服给药后预定时间点 (4 h, 8 h) 获取小鼠活体胃肠道图像。

1.9 数据处理与分析

采用 GraphPad Prism 8 进行统计分析, 数据以“平均值 \pm 标准差”表示。统计学显著性分析采用单因素方差分析 (ANOVA)。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 LL@Fe-TA@mGN 的粒径与电位

粒径与电位分析是验证益生菌包埋是否成功的重要手段。当使用具有不同电势的壁材包埋益生菌时, 所得益生菌包埋体系的整体带电情况会发生相应改变。Anselmo 等^[24]利用层层自组装的方法对芽孢乳酸菌进行包埋, 未包埋的益生菌带有负电, 包裹上一层壳聚糖后, 体系变成正电, 随后在最外层包裹上带负电的海藻酸钠, 使体系的整体电势变成负电。Liu 等^[25]也通过粒径与电位的变化来说明益生菌的包埋情况。本研究中, 通过 LL@Fe-TA@mGN 的粒径与电位分析, 确定了 LL 的包埋情况与最外层 mGN 的最佳使用剂量。如图 1 和图 2 所示, 相对于未包埋的 LL, LL@Fe-TA@mGN 的粒径与电位都有显著变化, 说明 mGN 被金属-酚醛网络结构 (Fe-TA) 吸附在 LL 的表面。当包埋 LL 的 mGN 质量浓度为 0.12 mg/mL 时, LL@Fe-TA@mGN 的粒径和 zeta-电位都达到峰值, 表明在该质量浓度下, 单个 LL 被 mGN 完全包裹。

2.2 LL@Fe-TA@mGN 的生长曲线测定

为了排除 mGN 包埋抑制 LL 生长的可能性, 对比了 12 h 内 LL@Fe-TA@mGN 与未包埋的 LL 的生长曲线。由图 3 可知, mGN 包埋未影响 LL 的生长, 为后续研究奠定了基础。

2.3 LL@Fe-TA@mGN 的微观形态分析

通过 SEM 与 TEM 表征可以观察到包埋前、后的 LL 形态。从图 4 可以发现, 未包埋的 LL 表

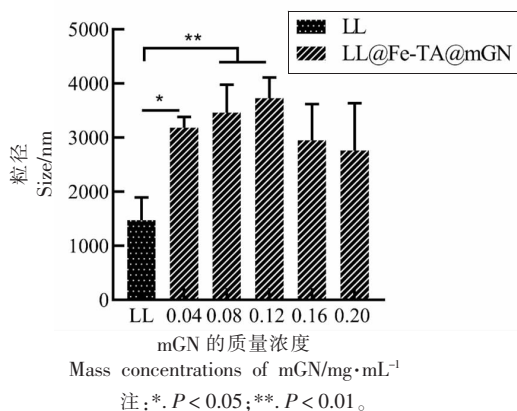


图1 包埋过程中使用的 mGN 质量浓度(0~0.2 mg/mL)对 LL@Fe-TA@mGN 粒径的影响

Fig.1 Size distribution characterization of LL@Fe-TA@mGN encapsulated with different mass concentrations of mGN (from 0 to 0.2 mg/mL) during the encapsulation process

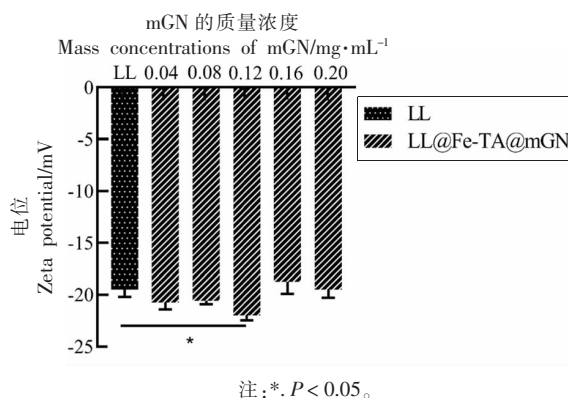


图2 包埋过程中 mGN 质量浓度(0~0.2 mg/mL)对 LL@Fe-TA@mGN zeta-电位的影响

Fig.2 Zeta potential characterization of LL@Fe-TA@mGN encapsulated with different mass concentrations of mGN (from 0 to 0.2 mg/mL) during the encapsulation process

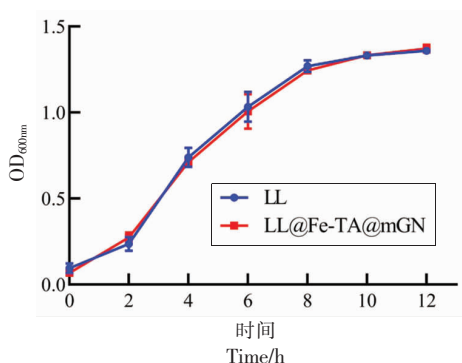


图3 LL 与 LL@Fe-TA@mGN 的生长曲线

Fig.3 Growth curves of LL and LL@Fe-TA@mGN

面光滑,而包埋后的 LL 结构完整,表面粗糙,且没有 LL 暴露在外面。这一结果说明通过金属-酚醛网络结构的桥联作用,可将 mGN 作为壁材有效地包埋单个 LL。TEM 分析结果也证明了 mGN 被黏附在单个 LL 的表面。此外,SEM 与 TEM 分析结果表明,包埋后的 LL 粒径会发生显著变化。

2.4 LL@Fe-TA@mGN 的胃液与胆盐耐受性研究

益生菌对胃液是非常敏感的。在通过胃部环境的时候,益生菌常因受到强酸($\text{pH} \leq 2.5$)的影响而失活,因此增强益生菌在胃部环境的抗性是其发挥生物活性的前提^[26]。如图 6 所示,未包埋的 LL 在模拟胃液(SGF)的环境下孵育 0.5 h,存活率降至 39.35%;孵育 1 h 后,存活率为 13.00%;孵育 2

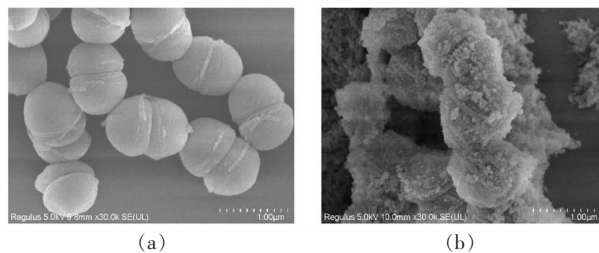


图4 LL(a)与 LL@Fe-TA@mGN(b)的 SEM 图($\times 30\text{k}$)

Fig.4 SEM images of LL (a) and LL@Fe-TA@mGN (b) ($\times 30\text{k}$)

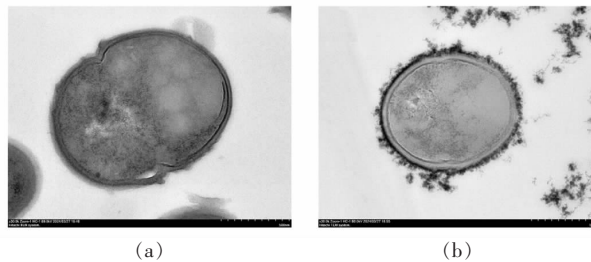


图5 LL(a)与 LL@Fe-TA@mGN(b)的 TEM 图($\times 30\text{k}$)

Fig.5 TEM images of LL (a) and LL@Fe-TA@mGN (b) ($\times 30\text{k}$)

h 后,LL 基本全部死亡,存活率仅有 0.71%。而包埋过的 LL 存活率始终高于未包埋的 LL,且存在显著性差异。LL@Fe-TA@mGN 在 SGF 环境下孵育 0.5 h 的存活率高达 68.60%,孵育 1 h 后存活率

变为 31.79%。即使在孵育 2 h 后,益生菌的存活率仍然有 10.39%,是未包埋益生菌存活率的 14.63 倍。该结果表明,经 mGN 包埋后 LL 抵抗胃液的能力显著提升。

人们在摄入食物时,十二指肠会分泌荷尔蒙,从而刺激胆囊收缩。胆汁在胆囊收缩的影响下通过胆管进入肠道^[27]。胆盐承担了胆汁的主要消化功能,由于胆盐在人体中易形成胶束,且肠道-肝脏循环系统的存在,使得每个胆盐分子在消化阶段能够被重复利用多次,这极大地影响了益生菌的活性。因此为了能够以一定的数量定殖于肠道并发挥生物活性,益生菌还需要抵抗胆盐的降解^[28]。由图 7 可知,包埋后的 LL 抵抗胆盐的能力显著提升,即使在胆盐中孵育 2 h,活菌数量仍然有 42.66%,相对于未包埋的 LL 的存活率(22.01%)具有显著性差异。以上结果表明,mGN 赋予了 LL 较好的抗胆盐性能。

2.5 LL@Fe-TA@mGN 的体内滞留成像

肠道蠕动加速了益生菌的排泄。减缓益生菌被排出体外的速度有利于益生菌在肠道的定殖。mGN 作为一种益生元,可被肠道中的肠道菌群代谢形成短链脂肪酸。随着最外层 mGN 的破坏,Fe-TA 结构随之暴露。鉴于金属-酚醛网络结构较强的黏附能力,进一步探究了 LL@Fe-TA@mGN 在体内的滞留能力。使用 Cy5 对 LL 进行标记^[22],并构建 Cy5 标记的 LL@Fe-TA@mGN。用标记后的 LL 或者 LL@Fe-TA@mGN 灌胃小鼠,分别在 4 h 和 8 h 后进行活体成像,结果如图 8 所示。由图 8 可知,给药 4 h 后,被灌胃 LL 组的小鼠的体内荧光强度显著弱于灌胃 LL@Fe-TA@mGN 的小鼠,说明 LL 被大量的代谢排出体外。即使在灌胃 8 h 后,LL@Fe-TA@mGN 在小鼠体内仍然保持较高的益生菌数量,而 LL 基本被排出体外。以上结果表明,LL@Fe-TA@mGN 具有更好的体内滞留能力。

3 结论

本文以羧甲基化 β -葡聚糖为壁材,通过金属-酚醛网络结构的桥联作用,可实现对单个乳酸乳球菌的完整包埋。这种包埋方法简单、快速,在不改变乳酸乳球菌自身结构的情况下,可显著提升乳酸乳球菌的抗胃液与抗胆盐能力,并延长其

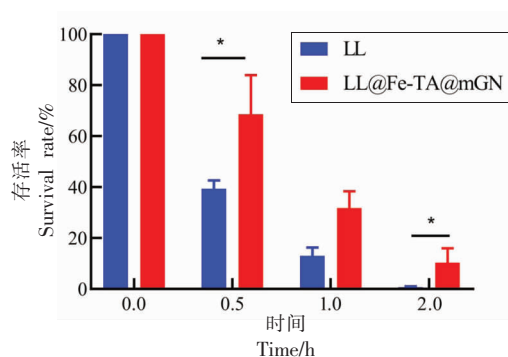


图 6 LL 与 LL@Fe-TA@mGN 暴露在模拟胃液 (pH 2.5) 中的存活率

Fig.6 Survival rate of LL and LL@Fe-TA@mGN after exposure to SGF (pH 2.5)

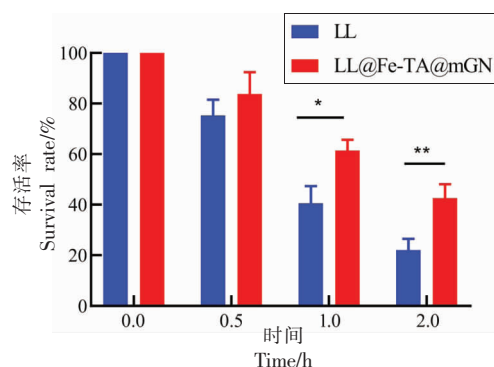


图 7 LL 与 LL@Fe-TA@mGN 暴露在胆盐中的存活率

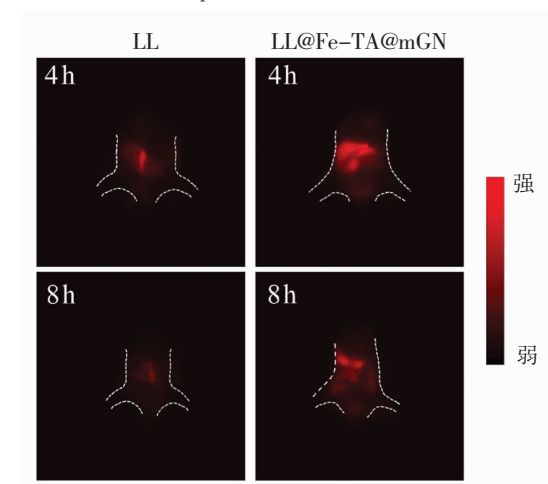


图 8 小鼠灌胃 Cy-5 标记的 LL 或者 LL@Fe-TA@mGN 后的体内成像

Fig.8 *In vivo* fluorescence imaging of mice gavage with Cy-5 labeled LL@Fe-TA@mGN or LL

在体内的滞留,从而帮助乳酸乳球菌在体内更好地繁殖。研究结果为乳酸乳球菌包埋体系的构建提供了新思路,并为提高乳酸乳球菌在胃肠道的活性提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] CREMON C, BARBARO M R, VENTURA M, et al. Pre- and probiotic overview[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2018, 43: 87-92.
- [2] LIN S, MUKHERJEE S, LI J, et al. Mucosal immunity-mediated modulation of the gut microbiome by oral delivery of probiotics into Peyer's patches[J]. *Science Advances*, 2021, 7: eabf0677.
- [3] 贺鼎元, 何东升, 涂家生. 工程化益生菌活菌制剂在疾病治疗中的研究进展[J]. *药学研究*, 2024, 43(2): 159-163.
- HE D Y, HE D S, TU J S. Research progress of engineered probiotic live bacteria preparation in disease treatment [J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2024, 43(2): 159-163.
- [4] DE ARAÚJO ETCHEPARE M, NUNES G L, NICOLOSO B R, et al. Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins [J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2020, 117: 108601.
- [5] 杨心远. 具有功能性涂层的益生菌递送系统增强肠道定植治疗肠炎研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2022.
- YANG X Y. Study on the probiotic delivery system with the functional coating to enhance intestinal colonization for the treatment of enteritis[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2022.
- [6] 蔡文静, 孙嘉蕾, 韩雪. 益生菌微胶囊的研究进展[J]. *食品科技*, 2022, 47(2): 36-42.
- CAI W J, SUN J L, HAN X. Research progress of probiotics microcapsule[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(2): 36-42.
- [7] 秦新生. 益生菌稳态化胶体输送体系的构建及其性能研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2023.
- QIN X S. Study on the construction of emulsion-based food colloid for protecting probiotics in colon-controlled release[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2023.
- [8] 胡丽萍, 李辉玉, 林嘉欣, 等. 基于喷雾干燥法益生菌-槲皮素的共微囊化及其耐消化性研究[J/OL]. *食品与发酵工业*: 1-10. (2023-11-13)[2024-04-13]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036942>.
- HU L P, LI H Y, LIN J X, et al. Co-microencapsulation of probiotic-quercetin based on spray-drying and its digestibility resistance study [J/OL]. *Food and Fermentation Industries*: 1-10. (2023-11-13)[2024-04-13]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036942>.
- [9] 向宁. 氧化高直链淀粉-海藻酸钠复合益生菌微胶囊的构建及性能评价[D]. 广州: 南方医科大学, 2024.
- XIANG N. Construction and performance evaluation of oxidized high amylose-sodium alginate composite probiotics microcapsules [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2024.
- [10] 陈臣, 张晓丛, 袁海彬, 等. 益生菌包埋前沿技术及其研究进展[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(1): 384-396.
- CHENG C, ZHANG X C, YUAN H B, et al. Research progress on the advanced technology of embedding for probiotics[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(1): 384-396.
- [11] 李然, 张瑛, 李一雪, 等. 益生菌与益生元共包埋微胶囊技术研究进展[J]. *生物加工过程*, 2024, 22(2): 204-212.
- LI R, ZHANG Y, LI Y X, et al. Research progress of co-embedding microcapsules of probiotics and prebiotics[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2024, 22(2): 204-212.
- [12] 高若涵, 马楠, 王霞, 等. 谷物 β -葡聚糖提取、分离纯化、生物活性及应用研究进展[J/OL]. *食品工业科技*: 1-12. (2024-03-21)[2024-04-13]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023100127>.
- GAO R H, MA N, WANG X, et al. Cereal β -glucan extraction, isolation and purification, bioactivity and application studies in review[J/OL]. *Science and Technology of Food Industry*: 1-12. (2024-03-21)[2024-04-13]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023100127>.
- [13] YANG W J, HUANG G L. Extraction methods and activities of natural glucans[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 112: 50-57.
- [14] LIN H W, HAN R Z, WU W. Glucans and applications in drug delivery[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 332: 121904.
- [15] GANI A, SHAH A, AHMAD M, et al. β -D-glu-

- can as an enteric delivery vehicle for probiotics[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 864–869.
- [16] 朱莹莹, 尹丽莎, 杜艳, 等. 青稞非淀粉多糖-植物乳杆菌共微胶囊化对益生菌存活率的影响[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(11): 266–275.
- ZHU Y Y, YING L S, DU Y, et al. Effect of co-microencapsulation of non-starch polysaccharides from highland barley and *Lactobacillus plantarum* on the survival of probiotics[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(11): 266–275.
- [17] WANG Y X, YIN J Y, HUANG X J, et al. Structural characteristics and rheological properties of high viscous glucan from fruit body of *Dictyophora rubrovoluta*[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105514.
- [18] GUO H, FENG K L, ZHOU J, et al. Carboxymethylation of Qingke β -glucans and their physicochemical properties and biological activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 200–208.
- [19] LIN Z X, ZHOU J J, QU Y J, et al. Luminescent metal-Phenolic networks for multicolor particle labeling[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(47): 24968–24975.
- [20] 王帅, 邓木兰, 梁志成, 等. 基于 *pyrF* 的乳酸乳球菌食品级表达载体的构建[J/OL]. *食品工业科技*: 1–11. (2023–10–13)[2024–04–13]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060149>.
- WANG S, DENG M L, LIANG Z C, et al. Construction of a food-grade expression vector based on *pyrF* gene in *Lactococcus lactis*[J/OL]. *Science and Technology of Food Industry*: 1–11. (2023–10–13)[2024–04–13]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060149>.
- [21] 倪珊珊, 黄丽英. 乳酸链球菌素和乳酸乳球菌在食品工业中的应用[J]. *食品工业*, 2015, 36(11): 244–247.
- NI S S, HUANG L Y. Application of Nisin and *Lactococcus lactis* in the food industry[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(11): 244–247.
- [22] XIE A Q, JI H H, LIU Z Y, et al. Modified prebiotic-Based ‘Shield’ armed probiotics with enhanced resistance of gastrointestinal stresses and prolonged intestinal retention for synergistic alleviation of colitis[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(15): 14775–14791.
- [23] FENG P P, CAO Z P, WANG X Y, et al. On-Demand bacterial reactivation by restraining within a triggerable nanocoating[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(34): 2002406.
- [24] ANSELMO A C, MCHUGH K J, WEBSTER J, et al. Layer-by-layer encapsulation of probiotics for delivery to the microbiome[J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(43): 9486–9490.
- [25] LIU J, LI W, WANG Y X, et al. Biomaterials coating for on-demand bacteria delivery: Selective release, adhesion, and detachment[J]. *Nano Today*, 2021, 41: 101291.
- [26] SAMEDI L, CHARLES A L. Viability of 4 probiotic bacteria microencapsulated with arrowroot starch in the simulated gastrointestinal tract (GIT) and yogurt[J]. *Foods*, 2019, 8(5): 175.
- [27] STURDEVANT R A L, GOETZ H. Cholecystokinin both stimulates and inhibits human food intake[J]. *Nature*, 1976, 261: 713–715.
- [28] PATEL A K, SINGHANIA R R, PANDEY A, et al. Probiotic bile salt hydrolase: Current developments and perspectives[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 162(1): 166–180.

Single-cell Encapsulation of *Lactococcus lactis* and Evaluation of Its Performance within the Gastrointestinal Environment

Wan Hao, Xie Anqi, Feng Lei

(State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330029)

Abstract The development of novel and effective probiotic encapsulation systems is imperative in light of the susceptibility of probiotics to the acidic and highly-concentrated bile salts environment within the gastrointestinal tract. Carboxymethylated β -glucan (mGN) was utilized in this study to adhere to the surface of *Lactococcus lactis* (LL) through

the bridging of a metal-phenolic network (Fe-TA), aiming to achieve the single-cell encapsulation of LL (LL@Fe-TA@mGN) and assess the gastrointestinal stress resistance and intestinal retention capacity of LL@Fe-TA@mGN. The results demonstrated that the particle size and zeta-potential of LL@Fe-TA@mGN reached maximum values when 0.12 mg/mL mGN was applied, indicating the full encapsulation of LL at the single-cell level. No significant difference was observed for the growth curve between LL@Fe-TA@mGN and LL in the MRS medium, ruling out the potential toxicity of mGN. Both SEM and TEM clearly revealed the presence of a distinct 'film' layer on the surface of LL, providing further evidence that LL was encapsulated within the mGN. With the protection of mGN, the survival rate of LL@Fe-TA@mGN could be up to 14.63 and 1.94 times higher than that of bare LL after exposure to simulated gastric fluid and bile salts for 2 h, respectively. *In vivo* fluorescence imaging corroborated the prolonged intestinal retention ability of LL@Fe-TA@mGN. In summary, the single-cell encapsulation strategy we developed here could significantly enhance gastrointestinal resistance and prolong the intestinal retention of LL. These results offer novel insights for the development and application of probiotic encapsulation systems.

Keywords carboxymethylated β -glucan; *Lactococcus lactis*; anti-gastric fluid; anti-bile salts; prolonged intestinal retention