

优化嗜酸乳杆菌 JYLA-191 抗逆性方法研究

吕培佳, 傅玉颖*, 李 腾

(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 083200)

摘要 为了提升益生菌的抗逆性,以明胶/果胶/海藻酸钠复合物为壁材,油凝胶为载体,采用同轴滴注法制备具有核壳结构的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸,并对其形态和菌株在加工、储存、热处理和消化过程中的稳定性进行评价。结果表明,双层滴丸有着明显的核壳结构且菌株均匀分布在内层油凝胶中。经加工双层滴丸活菌数降低了 1.02 lg(CFU/g),较单层滴丸活菌数降幅低 0.89 lg(CFU/g)。2 种滴丸均能通过上消化道并在结肠中释放。单层和双层滴丸经连续消化后活菌数分别达到 6.38 lg(CFU/g)和 8.43 lg(CFU/g)。与单层滴丸相比,双层滴丸中的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在胆盐溶液中展现出更好的抗性,细胞活性没有明显的损失($P>0.05$)。单层和双层滴丸均提升了嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的耐热性,且双层滴丸经 70 °C 热处理,细胞活性仍能达到 5.39 lg(CFU/g)。2 种滴丸在 4 °C 和 25 °C 下储存均提升了细胞的稳定性,其中 4 °C 下储存效果更好。较单层滴丸,双层滴丸包埋的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 稳定性更高。结论:双层滴丸有效提升了嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在恶劣环境下的抗逆性。

关键词 同轴滴注; 核壳结构; 滴丸; 嗜酸乳杆菌 JYLA-191; 抗逆性

文章编号 1009-7848(2024)05-0161-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.012

肠道被称为是人体的“第二大脑”,其中存在着一个庞大的微生物系统,并且肠道菌群的生长代谢和人体的健康息息相关。一旦肠道菌群遭到破坏,则会引发各类疾病的发生^[1-4]。

益生菌是一种活的微生物,当给予足够的量时,能够为宿主的健康带来益处,对预防和治疗肠道菌群失调引发的疾病有着巨大的潜力^[5]。它们可以抑制病原菌在肠道表面附着,帮助宿主建立健康的肠黏膜保护层并增强宿主的免疫系统^[6]。嗜酸乳杆菌是常见的益生菌,它具有抑制轮状病毒感染和缓解腹泻的作用^[7]。为了充分发挥其益生特性,食品中至少含有 6 lg(CFU/g)的活菌^[8-9],并且需要有足够的活菌定植于结肠^[10-12]。然而,它们的活性容易受到环境和胃肠道不利因素的影响,极大地限制了其在食品工业中的发展与应用^[13]。为了解决这一问题,有研究通过基因工程、菌种筛选和微胶囊化来提升益生菌在不利环境中的抗逆性^[14]。由于微胶囊化操作简单、成本低廉并且可以对益生菌形成较好的保护,因此成为目前研究的

热点^[15]。

益生菌微胶囊制备方法主要有挤压法、乳化法和喷雾干燥法。挤压法是应用最广泛的微胶囊化方法^[16]。大多数研究都是将复合凝聚物挤压到 Ca^{2+} 中交联形成水凝胶珠装载益生菌^[17]。如 Dafe 等^[18]采用挤压法将植物乳杆菌包裹在 Ca^{2+} 交联后的果胶/淀粉水凝胶珠中,虽然在一定程度上对益生菌起到了保护作用,但是经连续消化和长期存储后其活性仍有较大的损失。多层包埋被认为可以进一步改善益生菌在不利环境中的生存能力^[19]。然而,这种多层载体多是在微胶囊表面喷涂薄薄的一层包衣制成的,很容易因消化而损失。Feng 等^[20]利用同轴电纺对益生菌进行双层包埋,构建了具有核壳结构的电纺纤维,有效避免了微胶囊包衣的缺陷。虽然同轴电纺能显著提升益生菌的抗逆性,但是较高电压容易引起益生菌活性的损失,并且所使用的材料多为非食品级聚合物,难以在食品领域广泛应用。同轴滴注法是一种更为温和、简单的方法,也可以制备具有核壳结构的载体。目前,鲜有人用此法封装益生菌。希望通过该方法构建新一代的益生菌载体。

海藻酸钠因具有良好的生物相容性、肠溶胃不溶以及能够与 Ca^{2+} 交联形成凝胶等,常被用于包埋益生菌。然而,海藻酸钠存在着孔隙过大的缺

收稿日期: 2023-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172209,32201957);
浙江省自然科学基金项目(LQ22C200005)

第一作者: 吕培佳,男,硕士

通信作者: 傅玉颖 E-mail: webfu@126.com

点。为了克服这一缺陷,人们探索了明胶与海藻酸盐络合形成水凝胶包埋益生菌^[21]。虽然能够提升益生菌的胃肠稳定性,但是还不足以将益生菌靶向递送至结肠,如 Annan 等^[21]制备了海藻酸钠包被明胶的益生菌胶囊,在模拟肠液中 1 h 完全崩解,使益生菌暴露于胆盐和酶中,造成活性的损失。果胶是一种酶敏聚合物,只有在结肠中才会被果胶酶所降解^[22]。果胶的加入或许能够进一步提升水凝胶的致密性并实现结肠靶向递送。

油脂因具有较低的相对湿度,对环境阻隔性好,故被认为能够提高益生菌加工和储存过程中的稳定性^[23]。如鱼油^[24]、葡萄籽油^[25]和硬化油^[26]等已被用作益生菌的载体。Silva 等^[27]以 2 种不同熔点的油脂作为益生菌的载体,发现熔点较高的油脂对益生菌的保护效果更好。可能是因为益生菌在低熔点油脂中容易发生聚集沉降,增加了与外界环境的接触机会而导致其活性降低。然而,高熔点油脂大多为氢化油,会危害人体的健康。油凝胶是用油凝胶剂将液体油凝胶化而成的半固态体系,常用作疏水活性物质的载体并改善油脂稳定性^[28],是一种潜在的益生菌载体。目前,以油凝胶为载体包裹益生菌的研究还很少,对益生菌的保护效果尚未可知,亟需深入研究。

由于不健康的生活习惯,导致血液中胆固醇含量升高,这是引起心血管疾病的关键因素。为了降低心血管疾病的发生概率,提供一种可以降低胆固醇的食品迫在眉睫。嗜酸乳杆菌 JYLA-191 可以和肠道内的胆固醇相结合,减慢胆固醇的吸收,降低血液中脂蛋白的形成速度,减少循环系统中的胆固醇含量,是一种理想的降低胆固醇食品^[29]。本研究采用同轴滴注法将嗜酸乳杆菌 JYLA-191 装载于以油凝胶为芯层,明胶/果胶/海藻酸钠复合凝聚物为壳层的双层滴丸中,并与单轴滴注法制备的单层益生菌滴丸进行比较,检测滴丸的形态和嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在不利环境下的抗逆性。

1 材料与方法

1.1 材料

明胶、果胶、氯化钙、柠檬酸钠、尼罗红、蜂蜡和氯化钠,上海阿拉丁生化科技有限公司;海藻酸

钠、胃蛋白酶、胆盐、胰蛋白酶、罗丹明 123 和甘油,上海麦克林生化科技有限公司;33 ℃棕榈油,广州佰金化工有限公司;MRS 肉汤和琼脂,杭州微生物试剂有限公司;嗜酸乳杆菌 JYLA-191 冻干菌粉,山东中科嘉亿生物工程技术有限公司。

1.2 设备与仪器

LD-P2020II 注射泵,上海蓝德医疗器械有限公司;LRH 生化培养箱,上海一恒科技有限公司;D2F-6050 真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;YXQ-SG46-280S 手提式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司;LC-LX-HR185C 台式高速冷冻离心机,上海力辰邦西仪器科技有限公司;SW-CJ-2FD 超净工作台,苏州净化设备有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;PB-10 酸度计,赛多利斯科学仪器有限公司;实验室自制同轴滴头、单轴滴头。

1.3 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 培养

将储存于-20 ℃中的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 冻干菌粉接种于灭菌 MRS 肉汤中,在(37±1)℃中培养 18 h。然后将菌液在 4 000 r/min,4 ℃下离心 6 min。收集菌泥,并用 1 mL 0.9% 无菌生理盐水进行重悬,置于 4 ℃冰箱备用。

1.4 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸制备

1.4.1 单层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸的制备 将明胶(Gel,20%)和 7 mL 甘油加入 100 mL pH 值为 3 的无菌水溶液中,60 ℃水浴搅拌溶解。往其中加入果胶(PEC,1.25%)和海藻酸钠(SA,1.3%),待充分溶解后,放于 40 ℃恒温箱中,冷却至恒温,然后往其中缓慢加入菌悬液,并搅拌均匀,制得水凝胶与菌的混合液。在 40 ℃下,利用微量注射泵将混合液以 15 mL/h 的速度,通过滴头挤入预冷的葵花籽油中,并将其液面高度控制在 15 cm。滴制完成后,将单层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸置于 2% CaCl₂ 溶液中固化 5 min 后进行脱油处理,然后在 37 ℃下真空干燥 12 h 制成(图 1a)。

1.4.2 双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸的制备 以 1.4.1 节所制备的水凝胶为壁材,芯材则是先将 20 mL 熔点为 33 ℃的棕榈油与 0.8 g 蜂蜡混合并于 70 ℃的水浴中搅拌。待蜂蜡全部溶解后,置于 40 ℃冷却至恒温。往其中加入 5 g 嗜酸乳杆菌 JYLA-

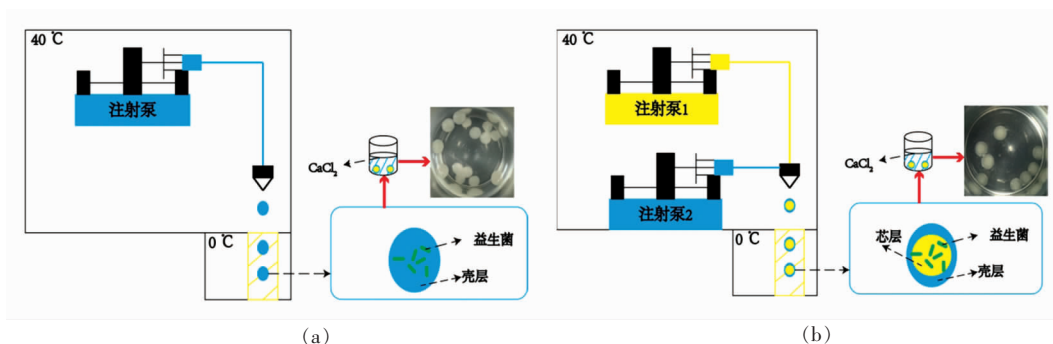


图 1 单层(a)和双层(b)嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸制备流程图

Fig.1 Flow chart of preparation of single-layer (a) and double-layer (b) *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 dropping pills

191 冻干粉,搅拌均匀。然后,使用自制同轴滴头(分别为 15 号和 11 号),通过微量注射泵将水凝胶和加入益生菌的油凝胶分别以 4:1 的挤压比,于 40 °C 恒温箱中进行挤压,滴制到预冷的葵花籽油中,并将其液面高度控制在 15 cm。滴制完成后,将双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸置于 2% CaCl_2 溶液中固化 5 min 后进行脱油处理,并于 20 °C 条件下曝气干燥 24 h 制成(图 1b)。

1.5 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸的形态特征

对 2 种嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸进行外观形态观察;分别用罗丹明 123 和尼罗红对细胞和油脂进行染色,并在荧光显微镜下观察双层滴丸中益生菌和油脂的分布情况。

1.6 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸在加工过程中的稳定性

分别取 0.1 g 不同状态下的单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸,置于 2% 柠檬酸钠溶液, (37±1)°C, 180 r/min 恒温摇床中进行崩解,然后利用稀释涂板法对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 进行活菌计数。

1.7 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸在连续消化过程中的存活能力

分别取 0.1 g 单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸置于 10 mL 模拟胃液中,在 (37±1)°C, 180 r/min 恒温摇床中孵育 2 h 后转入 10 mL 模拟肠液中,在同样的条件下振荡 2 h。在连续模拟胃肠道消化过程中,每隔 30 min 取样测定活菌数,另取游离的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 置于相同条件作对照试验。

1.8 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸对胆盐的耐受性

分别取 0.1 g 单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸置于 10 mL 1% 无菌胆盐溶液中进行耐胆盐试验,于 (37±1)°C, 180 r/min 恒温摇床中孵育 2 h,每隔 30 min 取样测定活菌数,另取游离的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 置于相同条件作对照试验。

1.9 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸在热处理下对其活性的影响

分别取 0.1 g 单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸置于 10 mL 无菌生理盐水中,然后将其放置在 40, 50, 60, 70 °C 的恒温水浴锅中进行耐热试验,静置 30 min 后取样进行活菌数测定,另取游离的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 置于相同条件作对照试验。

1.10 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸在环境下的储存稳定性

将制备好的单层、双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸和游离的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 分别置于 25 °C 和 4 °C 条件下储存。每隔 8 d 取样测一次活菌数。

1.11 数据处理

数据处理采用 Origin 2018 进行绘图处理, SPSS 26.0 进行显著性分析, $P < 0.05$ 可认为是显著的。所有试验均重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸的形态特征

根据 1.4 节的方案制备了 2 种不同类型的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸,它们的外观形态如图 2

所示。图 2a 和图 2b 分别为湿态的单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸, 可以看出它们的颗粒呈球状, 大小均匀, 并且双层滴丸有着明显的核壳结构。图 2c 和图 2d 分别为干燥后单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸, 干燥后的双层滴丸其表面光滑圆整, 颗粒呈球状, 大小均匀, 质地较硬。干燥后的单层滴丸则是表面粗糙, 具有多孔结构,

质地较脆, 可能是因为真空干燥水分快速蒸发导致的。图 2e 和图 2f 分别为嗜酸乳杆菌 JYLA-191 染色和油脂染色后的荧光显微镜图, 说明嗜酸乳杆菌 JYLA-191 以较高的活性均匀的分布在油相中, 并无泄露, 并且进一步证明了双层滴丸的核壳结构。

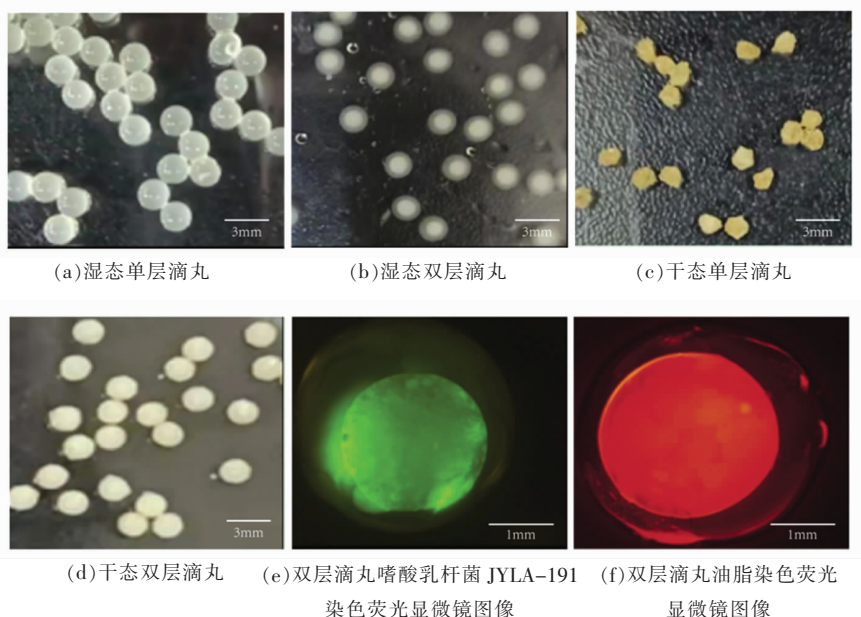


图 2 2 种嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸的形态特征

Fig.2 Morphological characterization of two *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 drops

2.2 加工处理对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 活性影响

在加工过程中, 恶劣的外部环境会导致益生菌的活性降低, 从而增加了生产成本^[30]。故本文研究了 2 种不同的加工方式对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 活性的影响, 结果如表 1 所示。分别用单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸对重悬后的细菌和菌粉进行包埋, 它们的初始活菌数分别为 11.06 lg(CFU/g) 和 10.1 lg(CFU/g)。经干燥后, 单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸活菌数分别为 9.15 lg(CFU/g) 和 9.08 lg(CFU/g)。单层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸经过干燥后活菌数降低。而双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸的活菌数反而比干燥前高, 可能由于水分的蒸发, 导致干燥后单位质量滴丸的活菌数增加。说明与单层包埋相比, 双层包埋对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的保护效果更好。与游离菌相比, 封装干燥后, 单层和双层滴丸中的嗜酸

表 1 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在加工过程中的耐受性 [lg(CFU/g)]

Table 1 The tolerance of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 during processing [lg(CFU/g)]

封装方式	游离菌	干燥前	干燥后
A	11.06 ± 0.11 ^a	10.14 ± 0.15 ^b	9.15 ± 0.14 ^c
B	10.1 ± 0.13 ^a	8.77 ± 0.11 ^b	9.08 ± 0.17 ^c

注: 不同小写字母代表不同加工条件下样品的显著差异 ($P < 0.05$); 表中 A 为单层滴丸, B 为双层滴丸。

乳杆菌 JYLA-191 活性分别降低了 1.91 lg(CFU/g) 和 1.02 lg(CFU/g), 进一步说明了这一结果。

2.3 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在消化过程中的活性变化与消化状态

模拟胃液 (SGF) 由 330 mg 胃蛋白酶加入 0.85% 灭菌的生理盐水 (pH 2.0) 中制成。模拟肠液 (SIF) 由 300 mg 胆盐和 100 mg 胰酶加入 0.85%

(pH 7.4) 灭菌的生理盐水中制成。模拟结肠液 (SCF) 由 10 mg 果胶酶添加到 100 mL 无菌磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中制成^[31]。为了考察嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸能否顺利到达结肠, 本研究对游离菌和 2 种不同包封类型的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸在连续模拟胃肠道消化中的活性变化和消化状态进行了分析。图 3 展示了胃肠道消化对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 活性的影响, 发现游离的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 对胃部条件比较敏感, 经过 90 min 的消化后, 几乎检测不到活菌。经过包封后的嗜酸乳杆菌 JYLA-191, 在胃肠道消化后, 有着较高的存活率。其中单层和双层滴丸经连续消化后活菌数可达到 6.38 lg(CFU/g) 和 8.43 lg(CFU/g), 双层滴丸对胃肠道表现出更高的耐受性。

图 4 和图 5 分别为单层滴丸和双层在体外模拟中的消化情况, 可以看出单层和双层滴丸经 120 min 模拟胃液消化后, 颗粒发生轻微的膨胀, 当转移到模拟肠液后, 颗粒大小显著增加, 说明 2 种滴丸在模拟肠液中发生了溶胀。然而, 它们在模拟胃液和肠液中仍保持颗粒完整, 减少了细胞与胃酸、胆盐和酶接触的机会。2 种颗粒到达模拟结

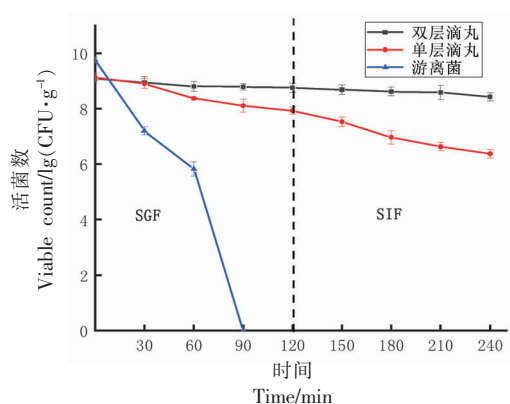


图 3 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在连续体外模拟消化下的存活率

Fig.3 The survival rate of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 under continuous simulated digestion *in vitro*

肠后, 单层滴丸发生缓释, 颗粒大小逐渐减小, 到 300 min 时已经完全崩解, 双层滴丸到达模拟结肠后则是立刻发生崩解。以上结果表明, 2 种类型的益生菌滴丸都能较好地保护嗜酸乳杆菌 JYLA-191 免受胃肠道中恶劣环境的影响, 并且能够实现其在结肠的靶向释放。

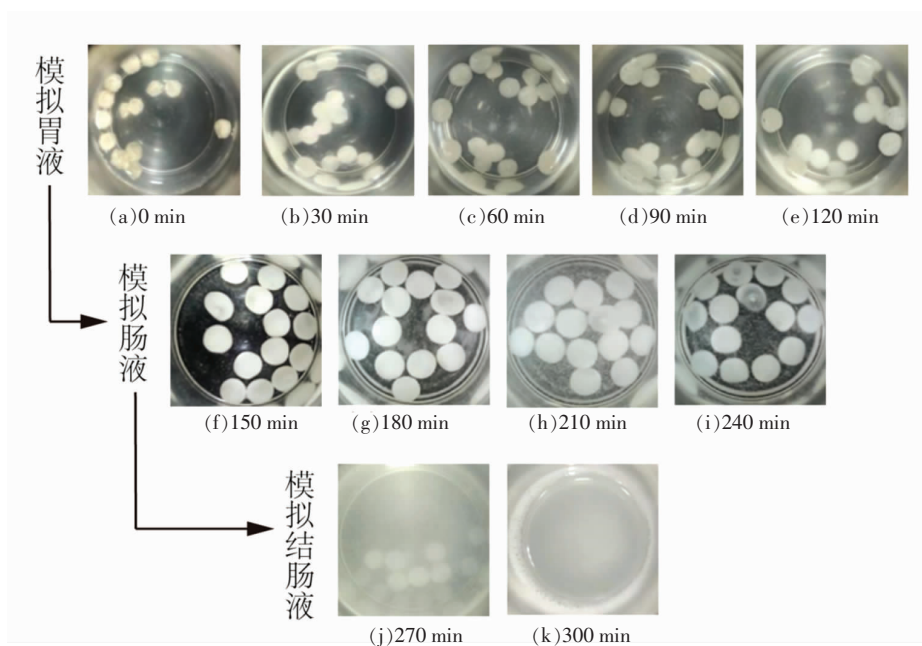


图 4 单层滴丸在连续模拟胃肠液中的消化情况

Fig.4 Digestion of monolayer drops in continuous simulated gastrointestinal fluid

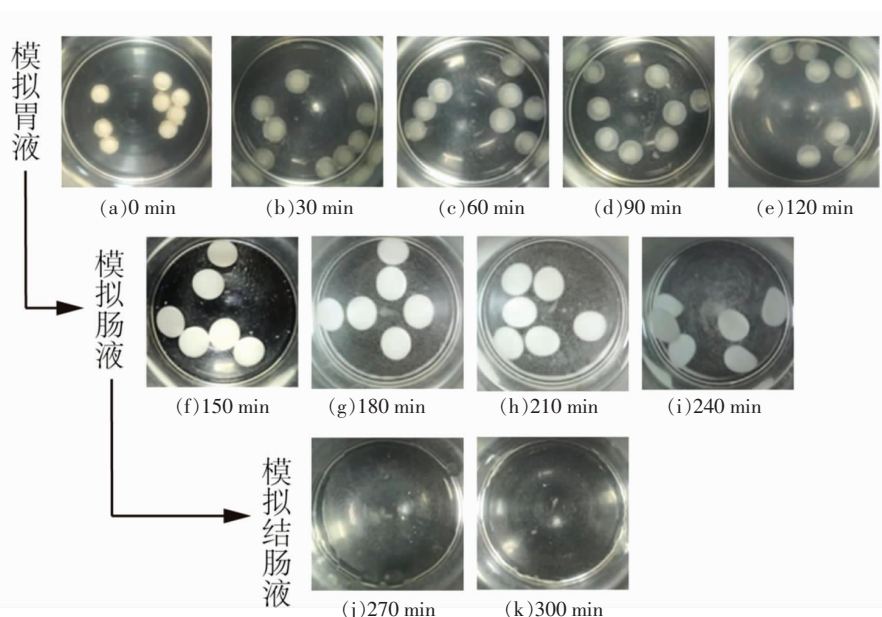


图5 双层滴丸在连续模拟胃肠液中的消化情况

Fig.5 Digestion of bilayer drops in continuous simulated gastrointestinal fluids

2.4 胆盐对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 活性影响

在正常情况下,小肠中胆盐质量分数约为0.05%~2%,然而胆盐的存在会对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的细胞膜造成破坏,从而导致细胞活性的损失^[32]。考虑到胆盐的存在对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的活性影响较大,于是本研究将所制备的单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸进行耐胆盐试验,并以未包封的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 作对照。从图 6 可知,3 种形式的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的活性均呈现下降趋势,其中单层包埋的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 和游离的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 活性下降最大,在 30 min 时,它们的活菌数分别降低了 3.21 lg(CFU/g)和 6.76 lg(CFU/g),说明单层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸在一定程度上保护其免受胆盐的破坏。然而,经过 60 min 后,两者均已检测不到活菌。可能是因为真空干燥过程中,水分的快速蒸发增加了滴丸的孔隙率,导致对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的保护减少,在胆盐溶液中溶胀后,导致胆盐渗透到滴丸中并与嗜酸乳杆菌 JYLA-191 直接接触,导致细胞活力下降和死亡。对于双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸,经过 120 min 胆盐处理后,其细胞活性降低了 0.87 lg(CFU/g),表现出更好的胆盐抗性。可能是因为烘干形成的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸形成的孔隙小,较

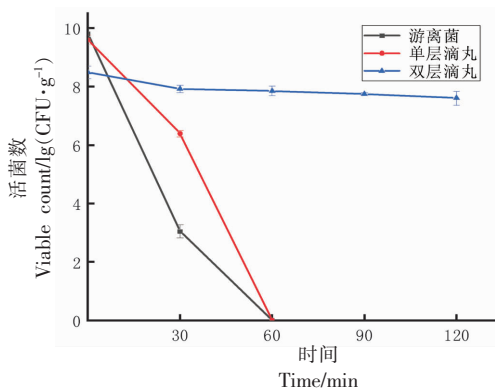


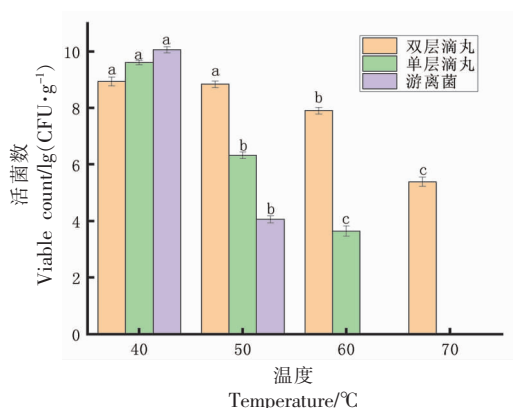
图6 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的胆盐耐受性

Fig.6 Bile salt tolerance of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191

低的孔隙有利于阻碍胆汁渗透进入滴丸。同时,因为嗜酸乳杆菌 JYLA-191 被包裹于油凝胶中,避免了细胞与胆盐的直接接触,从而表现出更好的胆盐耐受性。

2.5 热处理下嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的活性

益生菌在生产加工过程中,较高的温度会显著降低细胞活性,这对益生菌的应用产生了极大地限制。研究了 2 种不同包封类型的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸在热处理下对其的保护效果,并以游离的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 作对照。试验结果如图 7 所示,随着温度的升高,嗜酸乳杆菌 JYLA-



注:不同字母代表不同温度下样品的显著差异($P < 0.05$)。

图 7 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在不同温度处理下的细胞活性

Fig.7 Cell activity of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 at different temperatures

191 的活性也随之降低。游离的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 活性在 60 °C 和 70 °C 下已完全丧失。对于单层滴丸,在 60 °C 其活性降低了 3 lg(CFU/g),在 70 °C 时,几乎检测不到活菌,说明单层滴丸在一定程度上保护了嗜酸乳杆菌 JYLA-191。可能是因为滴丸所形成的凝胶网络导热系数比水低,从而可以延缓热量从表面传递到核心,减少了嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的死亡^[33]。值得注意的是,在 70 °C 下双层滴丸仍有较高的细胞活性,其活菌数仍维持在 5.39 lg(CFU/g),说明双层滴丸可以对包裹的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 提供更好的保护,提高了其热稳定性。可能是因为油凝胶和水凝胶对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的双层包裹,可以有效阻止热

量的传递,大幅提高了滴丸中嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的热稳定性。

2.6 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在储存过程中的稳定性

益生菌在储存过程中容易受到氧气、温度、湿度和渗透压等各种环境压力的影响^[34],导致益生菌的活性降低,在口服进入人体后只有少量益生菌能够顺利到达肠道,难以发挥其益生特性。在本研究中测定了游离菌和 2 种类型滴丸中的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在 4 °C 和 25 °C 下的活力变化,如图 8a 所示,在 4 °C 下放置 40 d 后,单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸细胞活性分别降低了 1.51 lg(CFU/g) 和 0.59 lg(CFU/g),游离菌活力则发生显著下降,活菌数减少了 4.53 lg(CFU/g)。结果表明,与游离菌相比,用滴丸包埋的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 展现出更高的储存稳定性,延长了其储存时间。双层滴丸比单层滴丸包埋的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的细胞活性降幅更小,说明双层滴丸对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的保护效果更好,可能是因为双层滴丸致密的水凝胶壳层和油脂芯层有效的阻隔了环境中的水分和氧气,从而使其表现出更好储存稳定性。单层滴丸由于经过真空干燥,水分快速蒸发,使其表面形成了多孔结构,增加了细胞与外部环境接触的机会,导致细胞的储存稳定性降低^[35]。图 8b 显示了在 25 °C 储存 40 d 期间的细胞稳定性,发现游离菌和单层滴丸包埋的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在储存 8 d 后细胞活性呈直线下降的趋势,分别在 40 d 和 32 d 后几乎检测不到

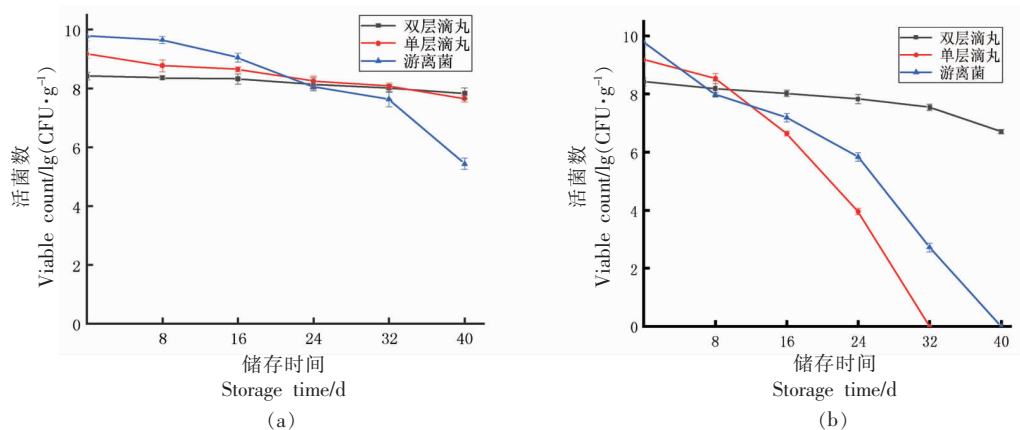


图 8 嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在 4 °C(a) 和 25 °C(b) 下的储存稳定性

Fig.8 Storage stability of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 at 4 °C (a) and 25 °C (b)

活菌的存在,双层滴丸包埋的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在经过 40 d 的储藏后,活菌数降低了 1.73 lg (CFU/g)。上述结果表明,温度对嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的储存活性有着巨大的影响,与 25 ℃ 的储存环境相比,在 4 ℃ 储存嗜酸乳杆菌 JYLA-191 有着更高的稳定性,可能是因为在低温条件下细胞代谢缓慢,处于半休眠状态,从而延长了它们的储存时间,这与 Eratte 等^[36]的研究结果类似。

3 结论

本试验采用滴注法制备了 2 种类型的滴丸包埋嗜酸乳杆菌 JYLA-191。形态分析表明湿态的单层和双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸呈球状,大小均匀,且双层嗜酸乳杆菌 JYLA-191 滴丸有着明显的核壳结构,嗜酸乳杆菌 JYLA-191 均匀的分布在内层油凝胶核心中。经加工后单层和双层滴丸中的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 活性分别降低了 1.91 lg(CFU/g)和 1.02 lg(CFU/g);体外消化研究表明,2 种滴丸均能顺利通过上消化道并实现结肠靶向释放,单层和双层滴丸经连续消化后活菌数可达到 6.38 lg(CFU/g)和 8.43 lg(CFU/g);在胆盐溶液处理后,与单层滴丸相比,双层滴丸中的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 展现出更好的胆盐抗性;热处理研究表明,单层和双层滴丸均能有效提升嗜酸乳杆菌 JYLA-191 的耐热性,且双层滴丸在 70 ℃ 热处理后,细胞活性仍能达到 5.39 lg(CFU/g);储存试验表明,2 种滴丸包埋的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在 4 ℃ 和 25 ℃ 下储存均展现出良好的储存稳定性,且 4 ℃ 下储存效果更好。与单层滴丸相比,双层滴丸包埋的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 储存稳定性更高。因此,本研究利用同轴滴注法制备的双层滴丸可有效提升嗜酸乳杆菌 JYLA-191 在加工、胃肠消化、热处理和长期储存下的稳定性,可作为包埋益生菌的潜在载体,为益生菌制剂提供了新包埋方式,进一步拓宽了在食品工业中的应用。

参 考 文 献

[1] 童晶晶,黎军,周裕文,等. 肠道菌群与疾病的研究进展[J]. 医学信息, 2019, 32(21): 22-25.

- TONG J J, LI J, ZHOU Y W, et al. Advances in research on intestinal flora and diseases[J]. Medical Information, 2019, 32(21): 22-25.
- [2] AURA I, SIGITA P. Encapsulation of probiotics: Proper selection of the probiotic strain and the influence of encapsulation technology and materials on the viability of encapsulated microorganisms[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2018, 10(1): 1-10.
- [3] KERRY R G, PATRA J K, GOUDA S, et al. Benefaction of probiotics for human health: A review[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(3): 927-939.
- [4] PAL S T, HARANAHALLI N B. Next-generation probiotics: A promising approach towards designing personalized medicine[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2021, 47(4): 479-498.
- [5] 中国食品科学技术学会益生菌分会. 益生菌的科学共识(2020年版)[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 303-307.
- Probiotics Society of the Chinese Institute of Food Science and Technology. Scientific consensus on probiotics (2020)[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 303-307.
- [6] WANG X Z, ZHANG P, ZHANG X. Probiotics regulate gut microbiota: An effective method to improve immunity[J]. Molecules, 2021, 26(19): 6076.
- [7] MINJ J, CHANDRA P, PAUL C, et al. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: Current applications and research perspectives [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 61(4): 1-18.
- [8] TEOH L P, MIRHOSSEINI H, MUSTAFA S, et al. Recent approaches in the development of encapsulated delivery systems for probiotics[J]. Food Biotechnology, 2011, 25(1): 77-101.
- [9] 朱获,陈莎男,梅晓宏,等. 提高益生菌耐加工贮藏稳定性和体内存活率的递送系统研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(21): 1-13.
- ZHU D, CHEN S N, MEI X H, et al. Advances in the delivery systems for improving the processing stability, storage stability and *in vivo* survival rate of probiotics[J]. Food Science, 2023, 44(21): 1-13.
- [10] DODOO C C, WANG J, BASIT A W, et al. Tar-

- geted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonisation[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 5173(17): 29-39.
- [11] HU X X, LIU C Y, ZHANG H T, et al. *In vitro* digestion of sodium alginate/pectin co-encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* and its application in yogurt bilayer beads[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 193: 1050-1058.
- [12] YOHA K S, NIDA S, DUTTA S, et al. Targeted delivery of probiotics: Perspectives on research and commercialization[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021, 14(1): 1-34.
- [13] MU R, YUAN Y, WANG L, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with konjac glucomannan hydrogel[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 76: 42-48.
- [14] LIU Y, LIU B, LI D, et al. Improved gastric acid resistance and adhesive colonization of probiotics by mucoadhesive and intestinal targeted konjac glucomannan microspheres[J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30(35): 1-11.
- [15] YAO M F, XIE J J, DU H J, et al. Progress in microencapsulation of probiotics: A review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(2): 857-874.
- [16] CENTURION F, BASIT A W, LIU J, et al. Nanoencapsulation for probiotic delivery[J]. ACS Nano, 2021, 15(12): 18653-18660.
- [17] 纪瑞, 邵雷, 王健, 等. 益生菌微囊制备中常用的包衣技术与材料[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(7): 893-900.
- JI R, SHAO L, WANG J, et al. Coating technology and materials used in preparation of probiotics microcapsules[J]. Chinese Journal of Pharmaceutics, 2018, 49(7): 893-900.
- [18] DAFE A, ETEMADI H, DILMAGHANI A, et al. Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria[J]. International Journal of Biological Macromolecules 2017, 97(16): 536-543.
- [19] RAMOS P E, CERQUEIRA M, TEIXEIRA J A, et al. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2018, 58(11): 1-14.
- [20] FENG K, HUANG R M, WU R Q, et al. A novel route for double-layered encapsulation of probiotics with improved viability under adverse conditions[J]. Food Chemistry, 2020, 310(25): 1-7.
- [21] ANNAN N T, BORZA A D, HANSEN L T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions[J]. Food Research International, 2008, 41(2): 184-193.
- [22] ASGARI S, POURJAVADI A, LICHT T R, et al. Polymeric carriers for enhanced delivery of probiotics[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2020, 161(162): 1-21.
- [23] SU J Q, CAI Y J, TAI K D, et al. High-internal-phase emulsions (HIPEs) for co-encapsulation of probiotics and curcumin: Enhanced survivability and controlled release[J]. Food & Function, 2020, 12(1): 70-82.
- [24] ERATTE D, DOWLING K, BARROW C J, et al. *In-vitro* digestion of probiotic bacteria and omega-3 oil co-microencapsulated in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates[J]. Food Chemistry, 2017, 227(15): 129-136.
- [25] SU J L, WANG X Q, LI W, et al. Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* as probiotics through encapsulation with the high internal phase emulsions stabilized with whey protein isolate microgels[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2018, 66(46): 12335-12343.
- [26] ERATTE D, MCKNIGHT S, GENGENBACH T R, et al. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19(8): 882-892.
- [27] SILVA M P, TULINI F L, RIBAS M M, et al. Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes[J]. Food Research International, 2016, 89(1): 582-590.
- [28] LI L, TAHA A, GENG M J, et al. Ultrasound-assisted gelation of β -carotene enriched oleogels based on candelilla wax-nut oils: Physical properties and *in-vitro* digestion analysis[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 79: 105672.

- [29] 潘仕城, 司书锋, 周文浩, 等. 一种降低血液中胆固醇含量的嗜酸乳杆菌 JYLA-191 及其应用: CN112592874B[P]. 2021-05-28.
PAN S C, SI S F, ZHOU W H, et al. A kind of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 that reduces blood cholesterol level and its application: CN112592874B[P]. 2021-05-28.
- [30] JOTHAM S, NIV Z, ERAN S, et al. The pros, cons, and many unknowns of probiotics[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(5): 716-729.
- [31] HUANG R M, FENG K, LI S F, et al. Enhanced survival of probiotics in the electrosprayed microcapsule by addition of fish oil[J]. *Journal of Food Engineering*, 2021, 307(9): 1-9.
- [32] RUIZ L, MARGOLLES A, SANCHEZ B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 396.
- [33] HE C, SAMPERS I, WALLE D, et al. Encapsulation of *Lactobacillus* in low-methoxyl pectin-based microcapsules stimulates biofilm formation: Enhanced resistances to heat shock and simulated gastrointestinal digestion[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(22): 81-90.
- [34] CENTURION F, BASIT A W, LIU J, et al. Nanoencapsulation for probiotic delivery[J]. *American Chemical Society*, 2021, 15(18): 653-660.
- [35] SLATTERY J, MACFABE D F, FRYE R E. The significance of the enteric microbiome on the development of childhood disease: A review of prebiotic and probiotic therapies in disorders of childhood[J]. *Clin Med Insights Pediatr*, 2016, 10(10): 1557-1571.
- [36] ERATTE D, WANG B, DOWLING K, et al. Survival and fermentation activity of probiotic bacteria and oxidative stability of omega-3 oil in co-microcapsules during storage[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 23(4): 485-496.

Study on the Method of Optimizing the Resistance of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191

Lü Peijia, Fu Yuying*, Li Teng

(College of Food and Bioengineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 083200)

Abstract In order to improve the stress resistance of probiotics, the core-shell structure of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 dropping pills were prepared by coaxial dropping method with gelatin/pectin/sodium alginate complex as wall material and oil gel as carrier, the morphology and stability of the strain during processing, storage, heat treatment and digestion were evaluated. The results showed that the double-layer dropping pills had obvious core-shell structure and the strains were distributed evenly in the inner oil gel. After processing, the viable count of the double-layer dropping pills decreased by 1.02 lg (CFU/g), which was lower than that of the single-layer dropping pills by 0.89 lg (CFU/g). Both kinds of dropping pills could pass through the upper digestive tract and be released into the colon. The viable bacterial counts of single-layer and double-layer dropping pills could reach 6.38 lg (CFU/g) and 8.43 lg (CFU/g) after continuous digestion. *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 in double-layer dropping pills exhibited better resistance in high concentrations of bile salts than in single-layer dropping pills, with no significant loss of cellular activity ($P>0.05$). Both single-layer and double-layer dropping pills increased the heat resistance of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191, and the activity of double-layer dropping pills could still reach 5.39 lg (CFU/g) after 70 °C heat treatment. The two kinds of dropping pills were stored at 4 °C and 25 °C to enhance the stability of cells, and the storage effect at 4 °C was better than that at single-layer dropping pills and double-layer dropping pills. The results showed that the double-layer dropping pills could effectively enhance the stress resistance of *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191 in harsh environment.

Keywords coaxial instillation; core-shell structure; dropping pills; *Lactobacillus acidophilus* JYLA-191; stress resistance