

## 含益生菌的微胶囊制备及稳定性研究

李思媛, 孙晓琛, 端木传宇, 王英, 刘小莉, 范琳琳\*

(江苏省农业科学院农产品加工研究所 南京 210014)

**摘要** 植物乳杆菌具有许多功能特性,如改善营养、风味特性、抗氧化活性、抗菌活性等。当人体摄入足够量时,有益于身体健康。然而,益生菌在加工以及胃肠道消化过程中,受到不同恶劣环境条件的影响,有效定植存活率显著降低。为提高植物乳杆菌在人体胃肠道内和加工、贮藏期间的稳定性,以乳清分离蛋白纳米纤维(WPIF)和海藻酸钠(ALG)为壁材,采用挤出法制备植物乳杆菌(*L. plantarum* 90)核壳微胶囊。以包封率为指标,研究复合壁材的质量浓度、CaCl<sub>2</sub>质量浓度对植物乳杆菌包埋效果的影响。结果表明:植物乳杆菌微胶囊的最佳制备工艺是:WPIF质量分数为2%,ALG质量分数为2%,CaCl<sub>2</sub>质量分数为1%,此条件下,植物乳杆菌微胶囊的包埋率最高可达92.13%。对WPIF-ALG-*L. plantarum* 90核壳微胶囊连续5h体外胃肠消化和4℃下的贮存稳定性进行研究,在模拟胃液中,植物乳杆菌的存活率为87.65%,肠液中释放率为89.18%,并且4℃贮存25d,存活率为79.98%。核壳微胶囊具有较好的耐受性、肠溶性和贮存稳定性。

**关键词** 乳清分离蛋白纳米纤维;植物乳杆菌;挤出法;微胶囊;稳定性

**文章编号** 1009-7848(2024)10-0238-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.022

益生菌(Probiotics)是一类对宿主有益的活性微生物。当达到足够数量(至少10<sup>6</sup> CFU/g以上)时,益生菌可以通过调节宿主黏膜与系统免疫功能或调节肠道内菌群平衡,对宿主发挥健康作用<sup>[1]</sup>。然而,这些有益影响在很大程度上取决于益生菌在加工、储存、摄取及到达结肠过程中的活力。在食品生产、储存和运输过程中,益生菌的存活率很容易受到一些环境因素,如高温、强酸、氧气暴露、相对湿度、渗透压等的影响。此外,益生菌在胃肠道中会受到不同条件的影响,特别是在胃酸和胆汁盐影响下,其在结肠活性部位的有效定植效率会大大降低<sup>[2-3]</sup>。如何保持益生菌活性,提高到达肠道的活菌数量成为研究热点。Kailasapath<sup>[4]</sup>提出,为益生菌提供一定的物理屏障,帮助抵御或者延缓胃酸、胆盐等有害物质的渗透,可以对益生菌起到保护作用。在食品、药品与生物医学等工业生产中,微胶囊作为一种包埋技术被广泛应用。包埋技术是运用物理、化学等技术手段将菌体包裹,使菌体与外界隔离,降低了不良环境和相关因素对菌体的影响,是提高菌体耐受性,保持菌体活性

和稳定,促进益生作用发挥的有效方法<sup>[5-6]</sup>。

为了提高益生菌的有效运载,微胶囊壁材的选择成为首要关注的问题。目前,被广泛应用于微胶囊制备的壁材有多糖、蛋白质、微晶纤维等。蛋白质因具有良好的生物降解性及生物相容性等特性,故在益生菌活性保护与运载方面显示出良好的应用潜质<sup>[7]</sup>。蛋白质淀粉样纳米纤维是具有典型的交叉 $\beta$ 二级结构的蛋白质聚集体,直径为几纳米,最近被用作先进的纳米技术材料。由于蛋白质纳米纤维比天然蛋白质更适合作为传递载体<sup>[8]</sup>,因此可作为益生菌包埋的壁材。乳清分离蛋白(Whey protein isolate, WPI)是益生菌的天然培养基。然而,目前以乳清分离蛋白纳米纤维(Whey protein isolate fibril, WPIF)为壁材组分包埋益生菌的研究较少。本研究以WPIF和海藻酸钠为主要壁材,以植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)为益生菌模型,研究乳清分离蛋白纳米纤维-海藻酸钠核壳微胶囊挤出制备工艺,并评价其在胃肠道释放性能和贮存稳定性,以期对乳清分离蛋白纳米纤维在益生菌微胶囊的开发、利用提供参考依据。

收稿日期:2023-10-28

基金项目:江苏省重点研发计划项目(BE2022367)

第一作者:李思媛,女,硕士

通信作者:范琳琳 E-mail: fanlinlin@jaas.ac.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* 90),

苏州微康益生菌有限公司,保存于江苏省农科院农产品加工研究所食品生物工程创新团队实验室,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

MRS 液体培养基,北京奥博生物技术有限公司;琼脂,德国 BIO FROXX 公司;乳清分离蛋白、海藻酸钠、氯化钙、胃蛋白酶、胰蛋白酶、猪胆盐,上海源叶生物科技有限公司;柠檬酸钠、碳酸氢钠均为分析纯级,国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 仪器与设备

BSA124S-CW 电子分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;FE-20 pH 计,梅特勒-托利多有限公司(上海)有限公司;3K-15 冷冻离心机,美国 SIGMA 公司;UV-1800 紫外分光光度计,广州晓分仪器有限公司;Gemini SEM300 场发射扫描电子显微镜,德国卡尔蔡司;CR21N 高速低温离心机,日本 HITACHI 公司;H1650-W/H1650W 台式微量高速离心机,长沙湘仪仪器有限公司。

## 1.3 试验方法

1.3.1 乳清分离蛋白纳米纤维(WPIF)的制备 参考 Priya 等<sup>[9]</sup>的方法制备 WPIF。使用超纯水配制质量分数 2%的乳清分离蛋白(WPI)溶液,用 2 mol/L HCl 将其 pH 值调节至 2,搅拌并过夜溶胀( $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 600 r/min, 12 h)。将溶胀后的 WPI 溶液水浴加热至  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,在磁力搅拌条件下(600 r/min, 12 h)使其纤维化。将纤维化后的 WPIF 置于 pH 2 的缓冲液中透析 72 h,透析袋 100 ku。先过夜透析 1 次,后续每隔 6 h 更换透析液。将 WPIF 溶液置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保藏,备用。

1.3.2 植物乳杆菌的活化 从甘油管中吸取菌液,以体积分数 3%加入 3 mL MRS 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后进行平板划线,平板倒置培养 48 h 后,挑取单菌落于 MRS 液体培养基中,传代 2 次后的菌液作为种子培养液。

1.3.3 乳清分离蛋白纳米纤维-海藻酸钠核壳微胶囊的制备 以 WPIF 和海藻酸钠(ALG)为主要原料,利用挤出法制备含有益生菌的 WPIF-ALG 核壳微胶囊。具体步骤为:将菌悬液离心后得到的菌泥与海藻酸钠溶液按照体积比 1:4 混合后,通过挤压法加入到含质量分数 1%氯化钙与 2%的 WPIF 混合溶液,静置固化 40 min 后,过滤收集微胶囊。

以微胶囊包埋率为指标,考察不同海藻酸钠质量分数(0.5%,1.0%,1.5%,2.0%)和不同氯化钙质量分数(1%,2%,3%,4%,5%)对微胶囊制备效果的影响。

1.3.4 植物乳杆菌核壳微胶囊包埋率的测定 将 1 g 植物乳杆菌微胶囊加入到 9 mL 0.06 mol/L 的柠檬酸钠与 0.20 mol/L 碳酸氢钠混合溶液(pH 7.8~8.2)中<sup>[10]</sup>,置于摇床,在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,180 r/min 条件下,孵育 1 h 后,进行活菌计数,包埋率(Encapsulation efficiency,EE)的计算如式(1)所示:

$$EE = N/N_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: $N$  为益生菌包埋后活菌数,CFU/mL; $N_0$  为益生菌包埋前活菌数,CFU/mL。

1.3.5 植物乳杆菌核壳微胶囊形态的观察

1.3.5.1 核壳微胶囊的外观形态观察 在黑色背景板下对核壳微胶囊外观进行拍照。

1.3.5.2 核壳微胶囊的场发射扫描电子显微镜(FESEM) 采用 FESEM 观察样品表面形貌及内部结构。将 ALG-WPIF 核壳微胶囊在液氮中快速冷冻,得到干燥样品。将样品分散放置在导电胶上,为了观察核壳微胶囊的内部结构,使用超薄刀片对部分样品进行切片,以便拍照其断层面,借助高真空镀膜仪将样品导电处理,在 15 kV 的电压下拍摄样品。

1.3.6 连续胃肠液条件处理植物乳杆菌核壳微胶囊活菌数的影响 微胶囊置于配制好的人工胃液于试管中,振荡,以 120 r/min 的转速振荡崩解,处理时间为 0,30,60,120 min。收集不同时间的样品,对样品进行定量稀释至适量,用倾注法进行活菌计数。胃液消化后的混合液经离心得到菌泥,继续置于配制好的人工肠液于试管中,以 120 r/min 的转速振荡崩解处理 0,30,60,120 min,采用涂布平板法对不同时间段的样品进行活菌计数,测定释放到模拟肠液中的植物乳杆菌。

1.3.7 冻干条件对植物乳杆菌核壳微胶囊活菌数的影响 对微胶囊样品在真空度低于 10.0 Pa,温度为  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  的条件下,进行真空冷冻干燥 24 h,结束后,向冻干后的样品中加入 0.85%的无菌生理盐水复水至原始菌液体积,涡旋混合均匀,置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中平衡 30 min。然后进行梯度稀释、倾注平板,在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后进行菌落计数,按公

式(2)计算菌体细胞冻干存活率。每组处理同等条件下进行3次平行试验后取平均值。

$$\text{冻干存活率} = N_1/N_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $N_1$  为冻干后活菌数, CFU/mL;  $N_0$  为冻干前活菌数, CFU/mL。

1.3.8 植物乳杆菌核壳微胶囊再培养 新鲜制得的植物乳杆菌微胶囊, 按照3%的接种量接种到MRS培养基, 37℃培养24 h后。测定培养基中及破囊后活菌数。

1.3.9 贮存时间对植物乳杆菌核壳微胶囊稳定性的影响 准确称取制备的已知浓度的植物乳杆菌微囊, 置于4℃下贮存, 分别在0, 5, 10, 15, 20, 25 d取样, 采用平板计数法测定其活菌数, 以其存活率反映核壳微胶囊的贮藏稳定性。

1.3.10 数据处理 使用IBM SPSS Statistics 26软件对数据进行方差分析, 运用Duncan多重比较

法对差异显著性进行比较分析 ( $P < 0.05$ ), 使用Origin 9.65 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物乳杆菌核壳微胶囊最优制备条件的确定

以包封率为指标, 对ALG-WPI-L. *plantarum* 90核壳微胶囊的制备条件进行优化, 结果如图1所示。当ALG质量分数为2%,  $\text{CaCl}_2$ 质量分数为1%时, 与2%的WPIF复配, 制备的核壳微胶囊包封率最高为92.13%。ALG质量分数为0.5%和1%时, 制备的核壳微胶囊呈不规则形状, 可能是由于ALG质量分数过低, 与 $\text{Ca}^{2+}$ 凝胶化交联不重复所致<sup>[1]</sup>。随着ALG质量分数的增加, 制备的球型核壳微胶囊表面形态良好, 饱满圆滑。Huang等<sup>[12]</sup>制备了以植物乳杆菌为模型的多层核壳微胶囊, 该核壳微胶囊由核心层(海藻酸钠/植物乳杆菌/鱼油)、

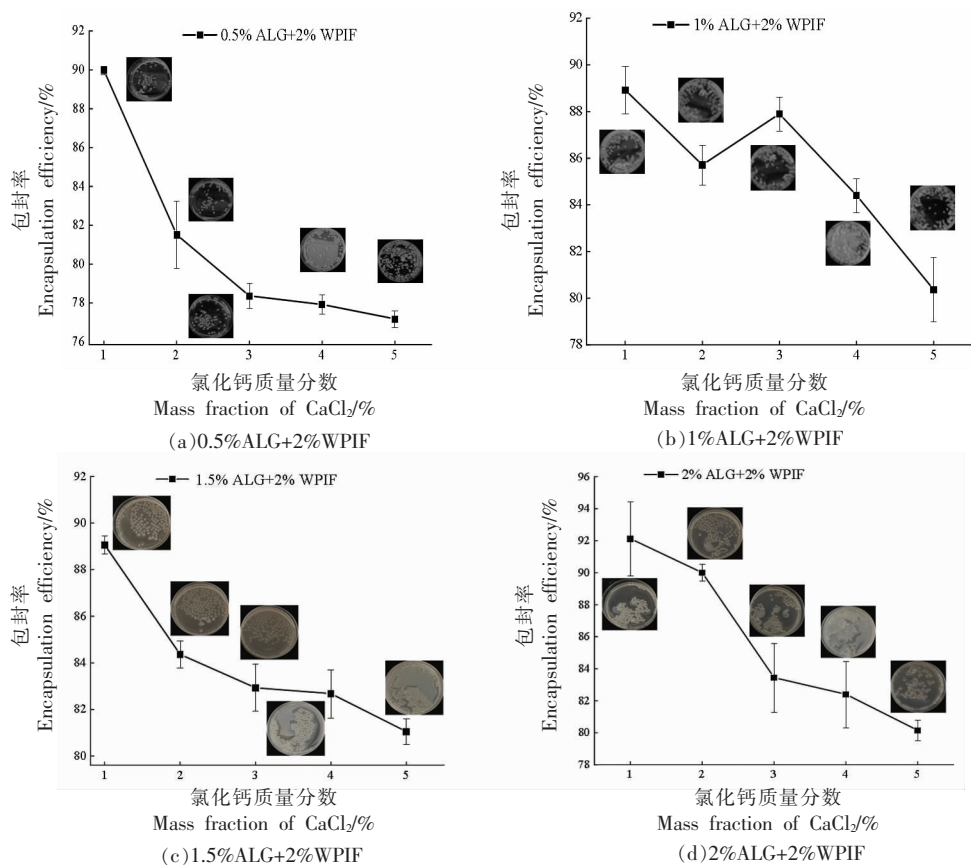


图1 不同质量分数ALG和 $\text{CaCl}_2$ 对核壳微胶囊包封率和外观的影响

Fig.1 Effects of different mass fractions of ALG and  $\text{CaCl}_2$  on encapsulation rates and core-shell characteristics of microcapsules



外壳层(海藻酸钠/果胶)和最外层(大豆分离蛋白)构建而成,未添加鱼油的核壳微胶囊包封率为 87.23%,添加 20  $\mu\text{L}$  鱼油的核壳微胶囊包封率为 95.18%。同样地,Luo 等<sup>[13]</sup>制备了以植物乳杆菌为模型的核壳微胶囊,分别以海藻酸盐-乳清分离蛋白和海藻酸盐-果胶-乳清分离蛋白为核壳材料对植物乳杆菌进行封装,两种核壳微胶囊包封率均能达到 99%以上。包封率存在差异的原因可能是受到配方中使用的海藻酸盐和  $\text{CaCl}_2$  的浓度、封装微生物的种类、使用的方法和颗粒大小等几种因素的影响<sup>[14]</sup>。尽管由于生产方法的差异,很难直接进行比较,但本研究所用方法可获得可接受的包封率。

## 2.2 植物乳杆菌核壳微胶囊的场发射扫描电镜形态表征

如图 2a 所示,ALG-*L. plantarum* 90 微胶囊

由于在冷冻干燥过程中失水,其形态出现萎缩、皱缩,微胶囊表面形成多孔;WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 核壳微胶囊呈微球形状,表面更光滑致密(图 2d)。对这些核壳微球切片,从剖面图可以看出,单一组分 ALG 形成的微球,内部结构松散(图 2b),WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 微球的剖面(图 2e),内部结构更加致密规整,整体呈现出蜂巢式结构,且菌体附着于“巢穴”内部。这种结构是由 WPIF 和 ALG 通过静电相互作用吸附而成。WPIF 比天然蛋白质更适合作为包埋载体,是因为热处理后蛋白质加速分解,导致肽的释放,暴露出更多的活性基团,在纤维化过程中,经过初始阶段、水解肽、成核和生长 4 个阶段,有更多的功能团,有利于与各种营养物质和药物的不同相互作用,促进了其与多糖的相互作用,促使致密结构形成,更加有利于包埋保护益生菌<sup>[15]</sup>。

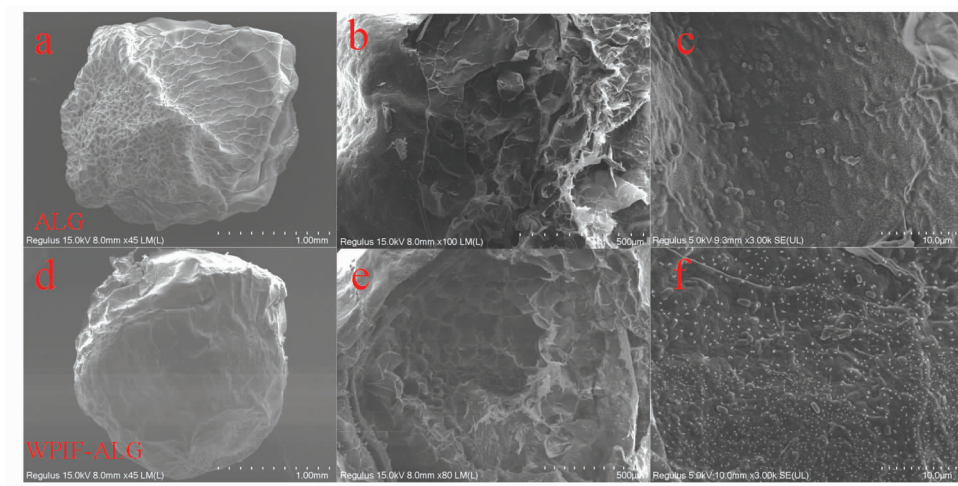


图 2 植物乳杆菌核壳微胶囊的场发射扫描电子显微镜表征

Fig.2 Characterization of core-shell microcapsules of *Lactobacillus plantarum* by field emission scanning electron microscopy

## 2.3 挤出法对核壳微胶囊增殖的影响

为考察挤出过程对核壳微胶囊中益生菌的增殖影响,对核壳微胶囊进行了再培养,结果如图 3 所示。从图中可以看出,WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 核壳微胶囊具有增殖能力。WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 微胶囊破囊后的初始菌落总数为 7.24 lg(CFU/mL),经在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后,培养基中 WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 的菌落数

增加至 7.86 lg(CFU/mL),WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 破囊后菌落总数增至 9.94 lg(CFU/mL),裸菌植物乳杆菌 90 经在培养后,菌落数为 8.11 lg(CFU/mL)。核壳微胶囊再培养菌落数高于裸菌菌落数的可能原因是 WPIF 提供了一定的营养物质。这进一步表明 WPIF 适合作为益生菌壁材,其与 ALG 复合包埋有利于植物乳杆菌 90 的生长增殖。

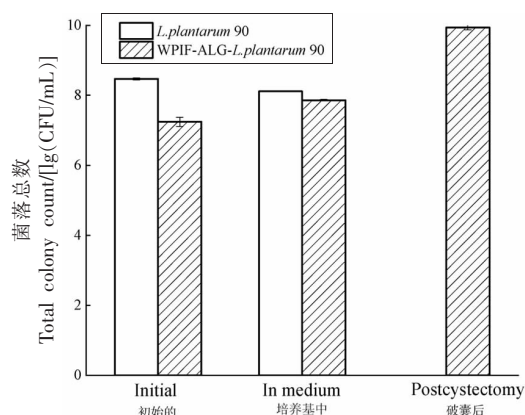


图3 挤出法对植物乳杆菌核壳微胶囊增殖的影响

Fig.3 Effect of extrusion on proliferation of *L. plantarum* core-shell microcapsules

## 2.4 连续体外胃肠消化对核壳微胶囊的影响

对胃肠道状况的耐受能力是评价微胶囊保护效果的重要因素。图4总结了裸菌植物乳杆菌90和WPIF-ALG-*L. plantarum* 90核壳微胶囊在模拟胃液和模拟肠液中不同暴露时间的活力结果。从图中可以看出,裸菌植物乳杆菌90的初始菌落数为8.50 lg(CFU/mL),通过挤出法制得的WPIF-ALG-*L. plantarum* 90微胶囊的初始菌落数为7.95 lg(CFU/mL),经过胃液2 h消化后,裸菌植物乳杆菌90在胃液消化2 h后的存活率为52.35%,

活菌数为4.45 lg(CFU/mL),WPIF-ALG-*L. plantarum* 90微胶囊在胃液消化2 h后的存活率分别为87.65%,活菌数为7.64 lg(CFU/mL)。WPIF-ALG-*L. plantarum* 90微胶囊延迟了胃中*L. plantarum* 90的释放,从而在保持高活性的同时成功地到达肠道。前期研究<sup>[15]</sup>表明WPIF、ALG作为壁材对植物乳杆菌90具有良好的包埋和保护作用。本研究添加WPIF为壁材制备的微胶囊表面致密完整,可有效阻止环境中的不良物质进入微胶囊,限制了益生菌微胶囊与胃液的接触,保护了植物乳杆菌90微胶囊的活性。后进入肠液消化阶段,与胃液消化相似,裸菌植物乳杆菌90经3 h肠液消化后,释放率为38.35%,活菌数为3.26 lg(CFU/mL),WPIF-ALG-*L. plantarum* 90微胶囊在肠液消化3 h后的释放率为89.18%,活菌数为7.58 lg(CFU/mL)。以上结果可以看出,WPIF-ALG核壳微胶囊对肠道的恶劣环境有较好的耐受性,对包埋的植物乳杆菌90具有显著的保护作用。已有研究也表明益生菌微胶囊可以保护和有效传递益生菌产品,更好地保护胃肠道益生菌的活性,延长其滞留、释放时间,促进其功能发挥,从而显著提高益生菌模拟消化后的存活率,发挥肠道协同作用<sup>[16]</sup>。

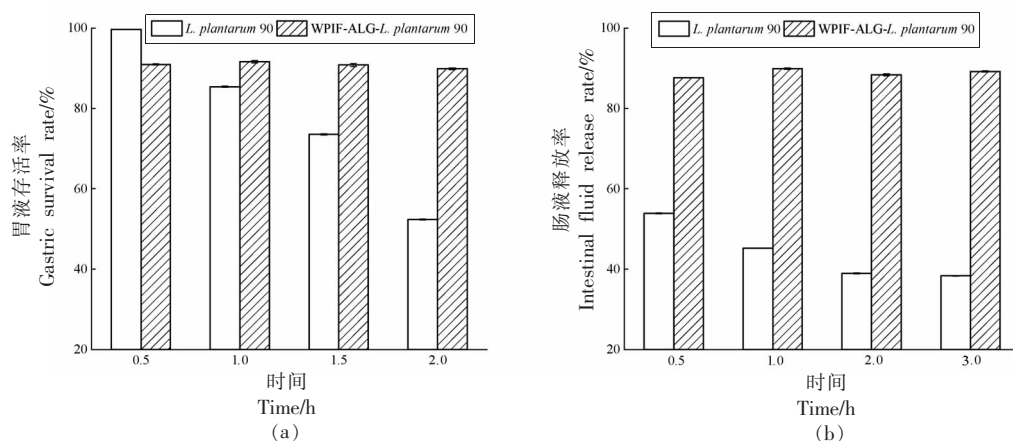


图4 连续体外胃肠消化对植物乳杆菌核壳微胶囊胃液存活率和肠液释放率的影响

Fig.4 Effects of continuous *in vitro* gastrointestinal digestion on gastric fluid survival rate and intestinal fluid release rate of *L. plantarum* core-shell microcapsules

## 2.5 冷冻干燥处理对核壳微胶囊的影响

图5a显示了冷冻干燥过程中植物乳杆菌活菌数变化情况。在冷冻干燥过程中,由于细胞膜的

损伤和冷冻过程中水结晶引起的渗透失衡,造成植物乳杆菌活菌数的减小。因此,通过分析冷冻干燥处理包埋后的核壳微胶囊变化情况,评价微胶

囊对植物乳杆菌的保护作用。从图 5b 可以看出, WPIF-ALG 的核壳微胶囊, 形态完整呈现球状。冷冻干燥处理前, 裸菌植物乳杆菌 90 的活菌数为  $10.11 \lg(\text{CFU/mL})$ , 经液氮速冻后, 活菌数下降至  $1.69 \lg(\text{CFU/mL})$ 。最后经冷冻干燥 24 h 后, 活菌数下降至  $6.79 \lg(\text{CFU/mL})$ , WPIF-ALG 的核壳微胶囊经冷冻干燥后植物乳杆菌的存活率为 89.66%, 活菌数分别为  $8.84 \lg(\text{CFU/mL})$ , 显著高于裸菌植物乳杆菌 90。已有研究表明, 核壳微胶囊会对益生菌起到保护效果, 而冻干会降低海藻酸盐基质对益生菌的保护作用, 从而导致海藻酸盐微胶囊变形甚至破裂<sup>[17-18]</sup>。本研究所采用的多糖和蛋白纳米纤维复合形成的核壳结构, 是在海藻酸钠表层上形成一层致密结构, 减小了囊孔大小, 增强了囊膜抵抗外力破坏的能力, 使其更能抵抗冻干的影响为植物乳杆菌 90 提供了更好的保护效果。

## 2.6 贮存时间对植物乳杆菌微胶囊的影响

对核壳微胶囊在  $4^\circ\text{C}$  下的贮存稳定性进行评价, 由图 6 所示, 经包埋后的 WPIF-ALG 核壳微胶囊的存活率显著高于裸菌植物乳杆菌 90。经 25 d 贮藏后, 裸菌植物乳杆菌 90 存活率降至 51.67%, WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 存活率维持在 79.98%。该包埋方法可提高益生菌在储存过程中的稳定性。Yao 等<sup>[2]</sup>研究发现, 通过桃胶和大豆蛋白喷雾干燥封装植物乳杆菌 550, 随着在  $4^\circ\text{C}$  储藏时间的增加, 所有样品中益生菌的活力损失都有所增加。贮藏过程中核壳微胶囊的存活率高于裸菌的存活率。在近年来的研究中也发现, 各种蛋白质-多糖混合物被用于包埋生物活性物质及益生菌, 例如, 酪蛋白酸钠-低甲氧基果胶<sup>[19]</sup>、乳清分离蛋白-阿拉伯胶<sup>[20-21]</sup>和亚麻籽蛋白-亚麻籽胶<sup>[22]</sup>, 增强了对益生菌的保护作用。本研究采用 WPIF 作为一种新型材料, 与海藻酸钠形成核壳胶囊, 有效提高了植物乳杆菌在不同加工条件下的稳定性。

## 3 结论

微胶囊包埋是提高益生菌加工条件下存活率的有效途径之一。本文以包埋率为指标, 以 WPIF 和 ALG 为壁材, 通过优化挤出制备条件得出, 在

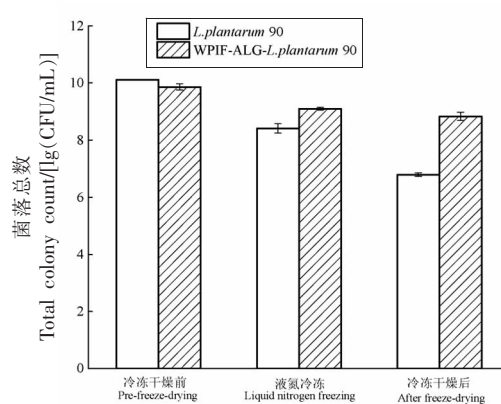


图 5 冷冻干燥处理对植物乳杆菌核壳微胶囊活菌数的影响

Fig.5 Effect of freeze-drying treatment on viable bacteria count of *L. plantarum* core-shell microcapsules

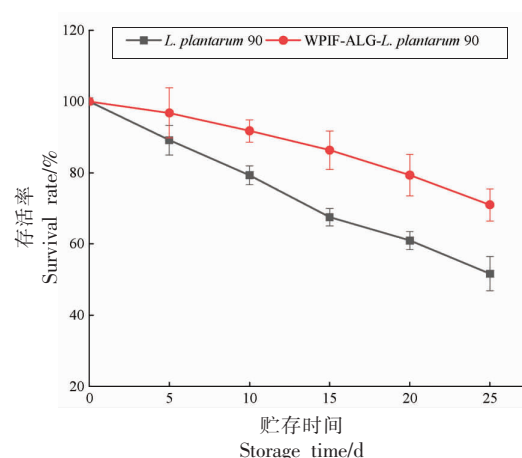


图 6 贮存时间对植物乳杆菌核壳微胶囊活菌数的影响

Fig.6 Effect of storage time on viable bacteria count of *L. plantarum* core-shell microcapsules

质量分数 2%WPIF、2%ALG 与 1%CaCl<sub>2</sub> 条件下可以成功制备出 WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 核壳微胶囊, 制备的球型核壳微胶囊表面形态良好、饱满圆滑, 包封率最佳, 为 92.13%。包埋后的益生菌在经连续 4 h 体外胃肠消化后, 在肠液的释放率为 89.18%, 活菌数为  $7.58 \lg(\text{CFU/mL})$ , 经冷冻干燥处理后的核壳微胶囊的存活率为 89.66%, 活菌数为  $8.84 \lg(\text{CFU/mL})$ , 随着贮藏时间的延长, WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 核壳微胶囊和裸菌植物乳杆菌 90 活力均有损失, 而核壳微胶囊损失程度更小。因此, 通过挤出法制备的 WPIF-ALG 核壳微胶囊可以保护益生菌。同时, 本研究将乳清分离蛋白纳米纤维这一材料用作核壳微胶囊的新



型壁材,并确定了乳清分离蛋白纳米纤维可以与海藻酸钠复合形成致密壳层,对植物乳杆菌起到一定的保护作用,这为核壳微胶囊新型壁材的开发提供了原材料,同时也为乳清分离蛋白的综合应用开辟了途径。

### 【致谢】

本研究得到了“江苏省农业科学院探索性颠覆性创新计划项目(ZX(21)1225)”的支持。

### 参 考 文 献

- [1] 余帅鹏,崔玥,王琳,等.多尺度蛋白质-多糖益生菌递送体系研究进展[J].食品工业科技,2023,44(17):470-482.  
YU S P, CUI Y, WANG L, et al. Research advances in the multiscale protein-polysaccharide based systems for probiotics delivery[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 470-482.
- [2] YAO H D, LIU B, HE L, et al. The incorporation of peach gum polysaccharide into soy protein based microparticles improves probiotic bacterial survival during simulated gastrointestinal digestion and storage [J]. Food Chemistry, 2023, 413: 135596.
- [3] RAZAVI S, JANFAZA S, TASNIM N, et al. Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 120: 106882
- [4] KAILASAPATHY K. Microencapsulation of probiotic bacteria technology and potential applications [J]. Current Issues in Intestinal Microbiology, 2002, 3 (2): 39-48.
- [5] 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.  
CHEN 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.
- [6] IRAVANI S, KORBKANDI H, MIRMOHAMMADI S V. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(8): 4679-4696.
- [7] 徐鹏翔,吴彩娥,范龚健,等.银杏蛋白-海藻酸钠制备包埋植物乳杆菌微胶囊及其性能研究[J].林业工程学报,2019,4(5):70-77.  
XU P X, WU C E, FAN G J, et al. Preparation and characteristic evaluation of *Lactobacillus plantarum* microcapsules developed with the ginkgo seed protein and sodium alginate[J]. Journal of Forestry Engineering, 2019, 4(5): 70-77.
- [8] CAO Y P, MEZZENGA R. Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2019, 269: 334-356.
- [9] PRIYA A J, VIJAYALAKSHMI S P, RAICHUR A M. Enhanced survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layers through layer-by-layer approach[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(21): 11838-11845.
- [10] 韦梦婷,王英,刘文瑞,等.微囊化酿酒酵母 FM-S-115 的高密度培养[J].食品工业科技,2020,41(15):205-210,224.  
WEI M T, WANG Y, LIU W R, et al. High cell density culture of *Saccharomyces cerevisiae* FM-S-115 in microencapsulation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(15): 205-210, 224.
- [11] ZHOU Z Q, XING M Z, ZHANG S H, et al. Process optimization of  $\text{Ca}^{2+}$  cross-linked alginate-based swellable microneedles for enhanced transdermal permeability: More applicable to acidic drugs[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 618: 121669.
- [12] 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: 110650
- [13] LUO X, FAN S Q, HE Z S, et al. Preparation of alginate-whey protein isolate and alginate-pectin-whey protein isolate composites for protection and delivery of *Lactobacillus plantarum*[J]. Food Research International, 2022, 161: 111794.
- [14] 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.
- [15] LI S Y, FAN L L, LI S J, et al. Validation of layer-by-layer coating as a procedure to enhance *Lactobacillus plantarum* survival during *in vitro* digestion, storage, and fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(3): 1701–1712.
- [16] 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(Part B): 1050–1058.
- [17] HUGUES-AYALA A M, SARABIA-SAINZ J A-I, GONZÁLEZ-RIOS H, et al. Airbrush encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in dry microbeads of alginate coated with regular buttermilk proteins[J]. LWT – Food Science & Technology, 2020, 117: 108639.
- [18] CALLEWAERT M, LAURENT-MAQUIN D, EDWARDS-LEVY F. Albumin-alginate-coated microspheres: Resistance to steam sterilization and to lyophilization[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2007, 344(1/2): 161–164.
- [19] EGHBAL N, YARMAND M S, MOUSAVI M, et al. Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM pectin and sodium caseinate[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 151: 947–956.
- [20] ERATTE D, WANG B, DOWLING K, et al. Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil[J]. Food Function, 2014, 5(11): 2743–2750.
- [21] SHARIFI S, REZAZAD-BARI M, ALIZADEH M, et al. Use of whey protein isolate and gum Arabic for the co-encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* and phytosterols by complex coacervation: Enhanced viability of probiotic in Iranian white cheese[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 113: 106496.
- [22] KAUSHIK P, DOWLING K, MCKNIGHT S, et al. Microencapsulation of flaxseed oil in flaxseed protein and flaxseed gum complex coacervates[J]. Food Research International, 2016, 86: 1–8.

## Preparation and Stability of Microcapsules Containing Probiotics

Li Siyuan, Sun Xiaochen, Duanmu Chuanyu, Wang Ying, Liu Xiaoli, Fan Linlin\*

(Institute of Agro-Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

**Abstract** *Lactobacillus plantarum*, as a probiotic, has many functional properties in the food industry, such as improved nutritional quality, flavor properties, antioxidant activity and antibacterial activity, which can be beneficial to health when consumed in sufficient quantities. However, probiotics are subject to various types of adverse environmental conditions in the gastrointestinal tract, particularly gastric acid and bile salts, which strongly inhibit their effective colonization of the active site in the colon with significantly reduced survival rates. To improve the stability of *Lactobacillus plantarum* in the human gastrointestinal tract and during processing and storage, microcapsules of *Lactobacillus plantarum* were firstly prepared by extrusion using whey isolate protein fibril and sodium alginate as wall materials. The effects of the mass concentration of the composite wall material and  $\text{CaCl}_2$  on the encapsulation effect of *Lactobacillus plantarum* were optimized by using the encapsulation rate as the index. The results showed that the optimum preparation conditions of *Lactobacillus plantarum* microcapsules were 2% mass fraction of WPIF, 2% mass fraction of ALG and 1% mass fraction of  $\text{CaCl}_2$ , under which condition the highest encapsulation rate of *Lactobacillus plantarum* microcapsules was achieved at 92.13%. The stability of WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 core-shell microcapsules were evaluated through *in vitro* gastrointestinal digestion for 5 h and storage at 4 °C. It showed that the survival rate of WPIF-ALG-*L. plantarum* 90 core-shell microcapsules was 87.65% in simulated gastric fluid and 89.18% in intestinal fluid, and the survival rate was 79.98% after 25 d storage at 4 °C. All results indicate that the core-shell microcapsules have good tolerance, intestinal solubility and storage stability.

**Keywords** whey isolate protein fibril; *Lactobacillus plantarum*; extrusion method; microcapsule; stability