

# 耐热型植物乳杆菌微胶囊粉剂

## Study on heat-resistant powder of *Lactobacillus plantarum* microcapsule

刘艳霞 管军军 崔耀明

LIU Yanxia GUAN Junjun CUI Yaoming

(河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450000)

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

**摘要:**目的:提高植物乳杆菌的耐热性。方法:在前期研究的微胶囊乳液中加入 2-羟丙基- $\beta$ -环糊精(2-HP- $\beta$ -CD),通过喷雾干燥法制备植物乳杆菌微胶囊粉剂。通过响应面法,对不同参数进行优化。采用光学显微镜、电子显微镜对其形态进行观察,通过激光粒度分析及 Zeta 电位分析仪测定其粒径电位,利用分光光度计测定其吸光度变化,并采用烘箱加热的方式进行耐热性试验。结果:随 2-HP- $\beta$ -CD 与乳液质量比、进料速率、进风温度、进风速率增加,存活率呈先升后降的趋势( $P < 0.05$ );在 2-HP- $\beta$ -CD 与乳液质量比为 3.13、进料速率为 288 mL/h、进风速率为 112 m<sup>3</sup>/h、进风温度为 118 °C 时,菌体存活率为 (99.53±0.11)%,载菌量为 1.64×10<sup>9</sup> CFU/g;扫描电镜和显微结果显示微胶囊为中心凹陷的微粒,在水中呈球形分散,菌体聚集于内部,其水分散液吸光值 1 h 内变化不显著,Z-平均粒径为 472.7 nm 且粒径分布较集中,Zeta 电位为 -40.37 mV;微胶囊在 130 °C 处理 60 s,存活率为 96.79%,与菌泥差异极其显著( $P < 0.01$ )。结论:该微胶囊粉剂具有较高的耐热性与较稳定的水分散性。

**关键词:**植物乳杆菌;微胶囊粉剂;喷雾干燥;耐热性;存活率

**Abstract: Objective:** This study aimed to improve the heat tolerance of *Lactobacillus plantarum*. **Methods:** On the basis of the previous research on the microcapsule emulsion, a kind of powder was prepared by spray drying with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (2-HP- $\beta$ -CD). The response surface method is used to optimize different parameters. Its morphology was observed by light microscope and electron microscope, and the particle size was determined by laser particle size analyzer and Zeta potential analyzer; the absorbance change was measured by

spectrophotometer, and heat resistance test was carried out by oven heating. **Results:** With the increase of the ratio of 2-HP- $\beta$ -CD to emulsion mass, feed rate, inlet air temperature and inlet air rate, and the survival rate first increased and then decreased ( $P < 0.05$ ). By response surface methodology, the optimal parameters of spray drying were obtained as follows: the ratio of 2-HP- $\beta$ -CD to emulsion mass 3.13, feed rate 288 mL/h, inlet air rate 112 m<sup>3</sup>/h and the inlet air temperature 118 °C. Under the control for these conditions, the survival rate of bacteria was (99.53±0.11)%, and the bacterial load reached 1.64×10<sup>9</sup> CFU/g. The scanning electron microscopy and microscopy results showed that the microcapsule was a central concave particle, spherically dispersed in water with the bacteria gathered inside. The absorbance value of the water dispersion was not found changing significantly within 1 h ( $P > 0.05$ ), and the average particle size was 472.7 nm with distribution concentrated and Zeta potential at -40.37 mV. The survival rate of microcapsules was 96.79% when treated at 130 °C for 60 s, which was significantly different from the survival rate of bacterial sludge ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The microcapsule powder has high heat resistance and stable water dispersibility.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*; microcapsule powder; spray drying; heat tolerance; survival rate

植物乳杆菌是常存在于黏膜和发酵食品中的一种乳酸菌<sup>[1]</sup>,具有免疫调节、降低胆固醇、预防心血管疾病、维持肠道菌群平衡和缓解乳糖不耐症等作用,其制剂在食品、饲料和医疗健康领域应用广泛<sup>[2]</sup>。然而其对强酸、高温、氧气等不利因素敏感,在贮藏和加工过程中容易失活<sup>[3]</sup>。有研究<sup>[4]</sup>证明,益生菌产品中的活菌数必须达到 1×10<sup>7</sup> CFU/g,才能发挥其益生作用。为了满足益生菌产品加工、运输、贮藏的需要,也为了抵抗胃酸、胆盐等消化液的影响,人们通常将益生菌进行微胶囊化<sup>[5]</sup>。

喷雾干燥法是常用的固体微胶囊化方法。喷雾干燥法是将微胶囊料液雾化,在高温条件下将小液滴快速脱

基金项目:国家重点研发计划(编号:2021YFD1300300)

作者简介:刘艳霞,女,河南工业大学在读硕士研究生。

通信作者:管军军(1975—),男,河南工业大学教授,硕士生导师,博士。E-mail: junjunguan@163.com

收稿日期:2022-11-28 改回日期:2023-04-14

水干燥,通过旋风分离器分离出微胶囊,并最终将其收集在集样瓶的方法<sup>[6]</sup>。该方法具有效率高、耗能低、产品分散性好、能连续生产等优点,但在干燥的过程中菌体易受到高温胁迫、渗透压胁迫、高氧胁迫和颗粒迅速收缩带来的挤压胁迫等<sup>[6]</sup>不利因素的影响而失活。舒中玉<sup>[7]</sup>通过喷雾干燥的方法制备乳酸片球菌菌粉中菌体的存活率为67.06%,载菌量为9.58 lg(CFU/g);付博等<sup>[8]</sup>研究发现,乳酸双歧杆菌在喷雾干燥过程中菌株存活率可达72.12%,载菌量为9.53 lg(CFU/g);Sultan等<sup>[9]</sup>对酿酒酵母的变种布氏杆菌通过喷雾干燥进行微胶囊化,存活率达到84.69%,载菌量达到8.17 lg(CFU/g)以上。菌体存活率和活菌数仍有较大的提升空间。通常可通过3个途径来提高益生菌的存活率:①对益生菌进行温度驯化、酸驯化、渗透压驯化等预处理<sup>[10]</sup>;②添加合适的保护剂;③优化喷雾干燥的工艺参数<sup>[11]</sup>。

常用的微生物保护剂是蛋白质类和碳水化合物的复合物,油脂类保护剂也有其独特的优势<sup>[12]</sup>。Chávez等<sup>[13]</sup>在壁材中加入大豆分离蛋白(SPI),经过喷雾干燥和真空干燥两步干燥,制备双歧杆菌微胶囊,不仅在喷雾干燥过程中有很好的保护作用,且在30℃的条件下贮藏3个月后微胶囊的载菌量大于 $1 \times 10^7$  CFU/g。Iaconelli等<sup>[14]</sup>在喷雾干燥制备植物乳杆菌微胶囊时,在壁材中加入低熔点脂肪,其分布在菌体周围,有效降低了菌体的死亡率。2-羟丙基-β-环糊精(2-HP-β-CD)是在β-环糊精分子上引入羟基,在保留了环糊精性质的基础上使其具有更好的水溶性和生物安全性。独特的空心结构,使其可作为宿主分子,将生物活性分子嵌入内腔,起保护作用的同时改变活性分子和化合物的溶解度、稳定度以及生物的可利用度<sup>[15]</sup>。目前广泛用于制药行业、食品行业、化妆品行业等,也有研究<sup>[16]</sup>证明其作为包被材料,对提高热敏性物质的稳定性有很好的作用。然而,将其作为益生菌微胶囊壁材的研究尚不多见。课题组<sup>[17]</sup>前期研究发现,以SPI、磷脂为主要壁材制备微胶囊乳液,具有控释作用,在肠液中活菌量达到 $3.55 \times 10^8$  CFU/mL,研究拟在此基础上添加保护剂2-HP-β-CD,通过喷雾干燥的方法,制备植物乳杆菌微胶囊粉剂。通过响应面的方法优化喷雾干燥参数,并对制得的微胶囊粉剂进行耐高温和水分散性试验,以期为其工业化应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料与试剂

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)M616;河南省工业微生物菌种保藏与繁育工程实验室(河南郑州);

2-羟丙基-β-环糊精:纯度 $\geq 99.5\%$ ,上海麦克林生化科技有限公司;

D-山梨醇:纯度 $\geq 98\%$ ,北京索莱宝科技有限公司;

大豆油:金龙鱼精炼一级,益海嘉里食品营销有限公司;

浓缩磷脂:郑州四维生物科技有限公司;

大豆:市售;

胃蛋白酶:10 000 NFU/mg,生工生物工程股份有限公司;

磷酸二氢钾( $\geq 99.5\%$ )、硫酸镁( $\geq 98\%$ )等化学试剂:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司。

### 1.2 主要仪器

喷雾干燥机:OM-1500A型,上海欧蒙实业有限公司;

激光粒度分析仪及Zeta电位分析仪:ZS90型,英国马尔文仪器有限公司;

恒温磁力搅拌器:85-2型,河南智城科技发展有限公司;

可见分光光度计:722N型,上海精科实业有限公司;

立式压力蒸汽灭菌器:LS-75HD型,江阴滨江医疗设备有限公司;

离心机:TDL-5-A型,上海安亭科学仪器厂;

电热恒温培养箱:DNP-9272BS-III型,上海新苗医疗器械制造有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 酶解大豆蛋白(EHSPI)的制备

(1) SPI的制备:大豆粉碎过80目筛,脱脂后与蒸馏水以1:10的质量比混合均匀,50℃水浴60 min,用2 mol/L NaOH调pH至8.0,以5 000 r/min的转速离心30 min,上清液用2 mol/L HCl调pH至4.8后,4℃冷藏过夜,次日5 000 r/min离心50 min,取沉淀并溶于蒸馏水中,并用2 mol/L NaOH调pH至7.0,喷雾干燥制得SPI<sup>[18]</sup>。

(2) EHSPI的制备:配制3%的SPI溶液,用2 mol/L HCl溶液调节pH至2.0,磁力搅拌10 min。加入胃蛋白酶(底物与酶质量比100:1),在37℃下进行酶解反应2 h,保持pH恒定,酶解完成后调pH至7.0灭酶。用喷雾干燥法制得EHSPI<sup>[19-20]</sup>。

#### 1.3.2 培养基的配制

(1) MRS液体培养基:1 g蛋白胨,1 g牛肉膏,0.5 g酵母膏,2 g葡萄糖,0.2 g  $K_2HPO_4$ ,0.5 g乙酸钠,0.2 g柠檬酸氢二铵,0.02 g硫酸镁,0.005 g硫酸锰,0.05 g吐温80,100 mL蒸馏水,pH调至6.3。121℃高压灭菌20 min。

(2) MRS固体培养基:100 mL的液体培养基,加入1.8 g琼脂,121℃高压灭菌20 min。

1.3.3 植物乳杆菌菌泥的制备 菌种活化:取保存于-80℃的植物乳杆菌菌种1 mL,接种于100 mL液体MRS培养基,37℃恒温培养18 h,取3 mL转接到

100 mL 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 恒温培养 18 h, 制得种子液。

取 3 mL 种子液接种于 100 mL MRS 液体培养基, 37 °C 培养 18 h, 5 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀物用磷酸盐缓冲液洗涤, 重新悬浮并离心, 重复 3 遍, 制得菌泥。

1.3.4 植物乳杆菌微胶囊粉剂的制备 将植物乳杆菌菌泥与 EPSPI 以 1 : 1.83 的质量比混合并以 500 r/min 磁力搅拌 30 min, 分别按照与菌泥 1 : 6 和 1 : 1 的质量比加入 70% 的 D-山梨醇溶液和浓缩磷脂, 磁力搅拌 90 min, 制得植物乳杆菌微胶囊乳液<sup>[17]</sup>。以上所有搅拌均在真空度 < 0.95 MPa 的条件下进行。

将浓度为 40% 的 2-HP-β-CD 溶液与上述步骤制备的微胶囊乳液按一定比例混合, 在真空度 < 0.95 MPa 条件下磁力搅拌 30 min, 制得喷雾干燥的料液。

将上述步骤制得的料液进行喷雾干燥, 制备植物乳杆菌微胶囊粉剂。

1.3.5 活菌计数及存活率的计算 采用标准平板计数法测定喷雾料液和益生菌微胶囊粉剂中的活菌数<sup>[21]</sup>。称取样品 1 g, 用磷酸盐缓冲液稀释 100 倍, 继续等梯度稀释, 分别吸取  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  3 个稀释梯度的液体 1 mL, 接种于 MRS 固体培养基, 37 °C 培养 48 h, 计算活菌数。

按式(1)计算菌体存活率。

$$v = \frac{\lg y_2}{\lg y_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

$v$ ——存活率, %;

$y_1$ ——喷雾料液中的总活菌数, CFU;

$y_2$ ——微胶囊粉末中的总活菌数, CFU。

1.3.6 粒径和 Zeta 电位的测定 取植物乳杆菌微胶囊粉剂 1 g, 加 100 g 蒸馏水搅拌均匀, 用马尔文激光粒度仪测其粒度, 折射率 1.545%, PDI 在 0.7 以下为有效数据。每个样品测定 3 次。

取上述微胶囊分散液, 用 Zeta 电位仪测其电位, 折射率 1.545%。每个样品测定 3 次。

1.3.7 微胶囊粉剂水分散液吸光值(OD 值)测定 根据文献[22]的方法修改如下: 取植物乳杆菌微胶囊粉剂 1 g, 分散于 600 g 蒸馏水中。搅拌形成微胶囊粉剂分散液, 静置, 每 10 min 取样, 测其 500 nm 处 OD 值, 每次重复测定 3 个样品。

1.3.8 耐热性试验 分别取适量植物乳杆菌微胶囊粉剂或植物乳杆菌菌泥, 放入 110, 130 °C 的烘箱中处理 30, 45, 60 s。用标准平板计数法测定处理前和处理后的活菌数, 并计算存活率。

1.3.9 显微观察 取植物乳杆菌微胶囊粉剂 1 g, 加入 20 g 蒸馏水, 混合均匀, 取一滴于载玻片上, 用光学显微镜放大 16×40 倍, 观察其在水中的形态。用革兰氏染色

液进行染色后, 于 16×100 倍油镜下, 观察其中植物乳杆菌的分布情况。

1.3.10 扫描电子显微镜 将样品固定在导电胶带上, 镀金, 在 3.00 kV 的束流能量下观察。

1.3.11 单因素试验 单因素试验主要测定菌体存活率和活菌量, 并以菌体存活率为喷雾干燥效果的主要评价指标。

(1) 2-HP-β-CD 与乳液质量比: 在进风温度 120 °C, 进料速率 360 mL/h, 进风速率 140 m<sup>3</sup>/h 条件下, 考察 2-HP-β-CD 与乳液质量比 ( $m_{2-HP-\beta-CD}/m_{乳液}$ ) 分别为 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5) 对喷雾干燥效果的影响。

(2) 进风温度: 在 2-HP-β-CD 与乳液质量比为 3.5, 进料速率 180 mL/h, 进风速率 140 m<sup>3</sup>/h 条件下, 考察进风温度(80, 100, 120, 140, 160 °C) 对喷雾干燥效果的影响。

(3) 进料速率: 在 2-HP-β-CD 与乳液质量比为 3.5, 进风速率 140 m<sup>3</sup>/h, 进风温度 120 °C 条件下, 考察进料速率(180, 360, 540, 720, 900 mL/h) 对喷雾干燥样品的影响。

(4) 进风速率: 在 2-HP-β-CD 与乳液质量比为 3.5, 进风温度 120 °C, 进料速率 360 mL/h 条件下, 考察进风速率(28, 56, 84, 112, 140 m<sup>3</sup>/h) 对喷雾干燥样品的影响。

1.3.12 响应面试验设计 以植物乳杆菌为研究对象, 以菌体存活率为响应值, 利用 Design-Expert 8.06, 选用 2-HP-β-CD 与乳液质量比 ( $m_{2-HP-\beta-CD}/m_{乳液}$ )、进风温度、进风速率、进料速率 4 个因素, 各因素设计 3 个水平, 采用 Box-Behnken's 法设计 27 组试验。

## 1.4 数据处理

试验数据均测定 3 次, 数据以平均值 ± 标准差表示, 采用 SAS 9.2 统计学软件进行方差分析和多重比较 (Fisher's LSD 法),  $P < 0.05$  认为不同处理组之间差异显著, 具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 2-HP-β-CD 与乳液质量比对喷雾干燥效果的影响

如图 1 所示, 随着 2-HP-β-CD 与乳液质量比的增加, 存活率与载菌量呈先上升后下降的趋势。当 2-HP-β-CD 与乳液质量比为 3.5 时, 载菌量和存活率最大, 并且与其他添加量下的结果差异显著 ( $P < 0.05$ ), 存活率为 98.99%, 载菌量为  $6.34 \times 10^9$  CFU/g。表明 2-HP-β-CD 的添加可提高植物乳杆菌存活率, 但是添加量过多时, 并不能提高其存活率。2-HP-β-CD 添加量过低, D-山梨醇在微胶囊中所占比例过高, D-山梨醇玻璃化转变温度低, 黏度较大, 干燥过程中干燥塔和旋风分离器粘壁现象越严重, 微胶囊粉剂的得率越低, 包被效果差。因此, 较优的 2-HP-β-CD 与乳液质量比为 2.5~4.5, 后续的单因素

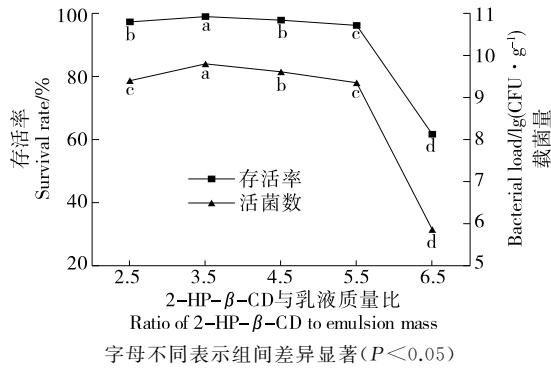


图1 2-HP-β-CD与乳液质量比对存活率及活菌数的影响  
Figure 1 Effects of 2-HP-β-CD supplementation on survival rate and viable bacteria count

研究中 2-HP-β-CD 与乳液质量比设定为 3.5。

### 2.2 进风温度对干燥效果的影响

如图 2 所示,随着进风温度的升高植物乳杆菌的存活率和载菌量呈先上升后下降的趋势。当进风温度为 120 °C 时存活率和载菌量最高,分别为 99.26% 和 2.15 × 10<sup>9</sup> CFU/g,并且与其他考察温度的结果差异显著 (P < 0.05); 温度低于 80 °C 时,由于干燥不完全,干燥过程中粘壁严重,使微胶囊粉剂得率降低;当温度高于 120 °C 时,菌体受到高温影响,载菌量和存活率开始急剧降低。因此,较优的进风温度为 100~140 °C,后续的单因素试验进风温度设定为 120 °C。

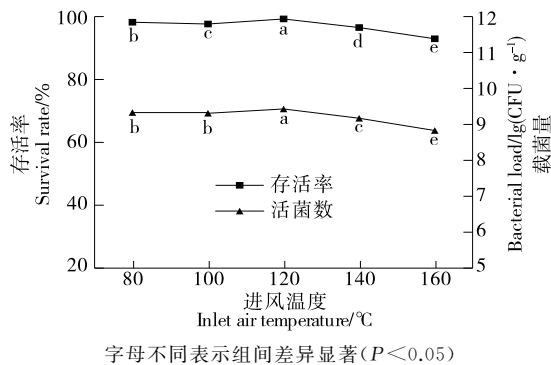


图2 进风温度对存活率及活菌量的影响  
Figure 2 Effects of inlet air temperature on survival rate and viable bacteria quantity

### 2.3 进风速率对干燥效果的影响

如图 3 所示,随着进风速率的增加存活率和载菌量呈先上升后下降的趋势。进风速率为 28~112 m<sup>3</sup>/h 时单位质量微胶囊的活菌数和存活率与进风速率呈正相关,在进风速率为 112 m<sup>3</sup>/h 时,菌体存活率为 98.14%,载菌量为 3.26 × 10<sup>9</sup> CFU/g。当进风速率为 140 m<sup>3</sup>/h 时,存活率明显下降。因此,较优的进风速率为 84~140 m<sup>3</sup>/h,后续的单因素试验进风速率设定为 112 m<sup>3</sup>/h。

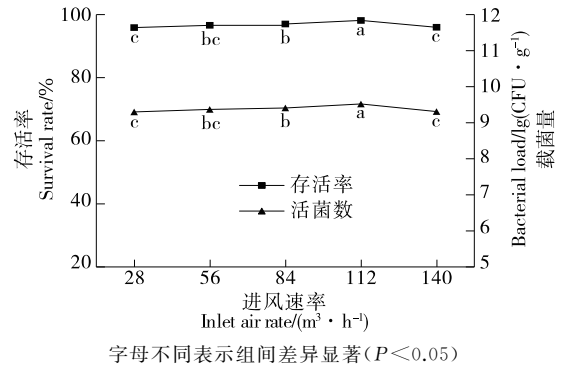


图3 进风速率对存活率及活菌量的影响  
Figure 3 Effects of air inlet rate on survival rate and viable bacteria quantity

### 2.4 进料速率对干燥效果的影响

如图 4 所示,随着进料速度的增加,植物乳杆菌存活率呈先上升后下降的趋势。在进料速度为 360 mL/h 时存活率为 98.76%,载菌量为 3.69 × 10<sup>9</sup> CFU/g,且与其他进料速度间差异显著 (P > 0.05)。因此,较优的进料速率为 180~540 mL/h。

### 2.5 响应面试验

试验因素水平与编码见表 1,试验设计及结果见表 2。

通过 Design-Expert 8.06 软件对表 2 数据进行二阶多元非线性回归拟合,得到响应值 Y 对 A、B、C、D 的二次

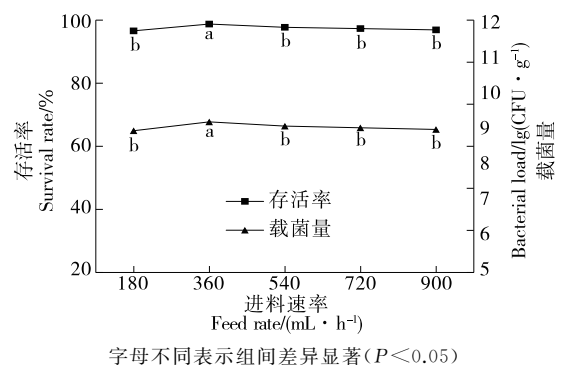


图4 进料速率对存活率和活菌数的影响  
Figure 4 Effects of feeding rate on survival rate and viable bacteria count

表 1 响应面设计优化设计因素水平与编码

Table 1 Level and coding of optimal design factors for response surface design

水平	A $m_{2-HP-\beta-CD}/m_{乳液}$	B 进料速率/ (mL · h <sup>-1</sup> )	C 进风速率/ (m <sup>3</sup> · h <sup>-1</sup> )	D 进风温 度/°C
-1	2.5	180	84	100
0	3.5	360	112	120
1	4.5	540	140	140



表 2 响应面优化试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface optimization

序号	A	B	C	D	存活率/%
1	-1	-1	0	0	97.78
2	-1	1	0	0	97.70
3	1	-1	0	0	96.01
4	1	1	0	0	96.70
5	0	0	-1	-1	89.80
6	0	0	-1	1	96.60
7	0	0	1	-1	95.99
8	0	0	1	1	92.99
9	-1	0	0	-1	94.65
10	-1	0	0	1	93.72
11	1	0	0	-1	94.82
12	1	0	0	1	94.29
13	0	-1	-1	0	97.05
14	0	-1	1	0	96.04
15	0	1	-1	0	97.21
16	0	1	1	0	96.80
17	-1	0	-1	0	97.74
18	-1	0	1	0	95.68
19	1	0	-1	0	94.61
20	1	0	1	0	88.89
21	0	-1	0	-1	97.61
22	0	-1	0	1	96.55
23	0	1	0	-1	98.98
24	0	1	0	1	98.80
25	0	0	0	0	99.09
26	0	0	0	0	99.96
27	0	0	0	0	99.80

多项式回归方程:

$$Y = 99.61667 - 1.4125A + 0.2625B - 0.301667C - 0.908333D - 2.61A^2 + 0.4425AB - 0.415AC - 0.4AD + 0.345B^2 + 0.15BC - 0.03BD - 2.75875C^2 - 3.7CD - 2.70875D^2 \quad (2)$$

对该回归方程进行方差分析,其结果如表 3 所示。该模型差异显著( $P < 0.05$ ),失拟项  $P = 0.0872$ ,不显著,且  $R^2 = 0.8880$ ,说明该模型的拟合程度较高。其他因素保持在中心水平时,观察两个因素交互作用对响应值的影响。如图 5(a)~图 5(c)所示,椭圆形表示交互作用显著,圆形表示交互不显著,进风速率、进风温度和进风速率、进料速率交互作用显著,其余不显著。如图 5(d)~图 5(f)所示,在试验范围内,随着 2-HP-β-CD 的添加量、进风温度、进风速度的增大,存活率增高,但是超过一定

表 3 响应面回归模型的方差分析†

Table 3 Variance analysis of regression model of response surface test

差异项	自由度	平方和	均方	P 值
A	1	23.941880	23.941880	0.0045
B	1	0.826875	0.826875	0.5300
C	1	1.092033	1.092033	0.4716
D	1	9.900833	9.900833	0.0450
A <sup>2</sup>	1	36.331200	36.331200	0.0011
AB	1	0.783225	0.783225	0.5408
AC	1	0.688900	0.688900	0.5659
AD	1	0.640000	0.640000	0.5798
B <sup>2</sup>	1	0.634800	0.634800	0.5814
BC	1	0.090000	0.090000	0.8346
BD	1	0.003600	0.003600	0.9667
C <sup>2</sup>	1	40.590410	40.590410	0.0007
CD	1	54.760000	54.760000	0.0002
D <sup>2</sup>	1	39.132410	39.132410	0.0008
模型	14	188.038500	13.431320	0.0010
残差	12	23.719910	1.976659	
失拟	10	23.291040	2.329104	0.0872
纯误差	2	0.428867	0.214433	
总和	26	211.758400		

†  $R^2 = 0.8880$ 。

的范围,菌体存活率下降。

通过回归模型预测的最佳工艺组合为:2-HP-β-CD 与乳液质量比为 3.13,进料速率 288 mL/h,进风温度 118.2 °C,进风速率 113.12 m<sup>3</sup>/h。为方便操作将进风温度和进风速率修改为 118 °C、112 m<sup>3</sup>/h。在各因素最优的水平下,预测最大的菌体存活率为(99.86 ± 0.76)%。进行 3 次验证实验,得到菌体的存活率为(99.53 ± 0.11)%,载菌量为(1.64 ± 0.24) × 10<sup>9</sup> CFU/g,在预测的区间内,表明此模型可靠。

最优工艺组合下生产的菌体的存活率相比 Zhu 等<sup>[23]</sup>、麻丽丽<sup>[24]</sup>通过喷雾干燥制备植物乳杆菌微胶囊得到的 75.70%、77.40%的菌体存活率具有明显优势。

### 2.6 显微观察结果

耐热型植物乳杆菌微胶囊为白色粉末,分散于水中为乳白色液体,分布均匀,无聚团。如图 6 所示,微胶囊粉剂复水后,在水中呈大小相近的圆球状分布,并且菌体呈聚团出现。其可能的原因是在加工过程中各壁材和菌之间通过氢键、共价键等作用力,形成了相对稳定的包合结构<sup>[25]</sup>。

### 2.7 扫电镜观察结果

如图 7 所示,视野内观察到中部凹陷、形态一致的微

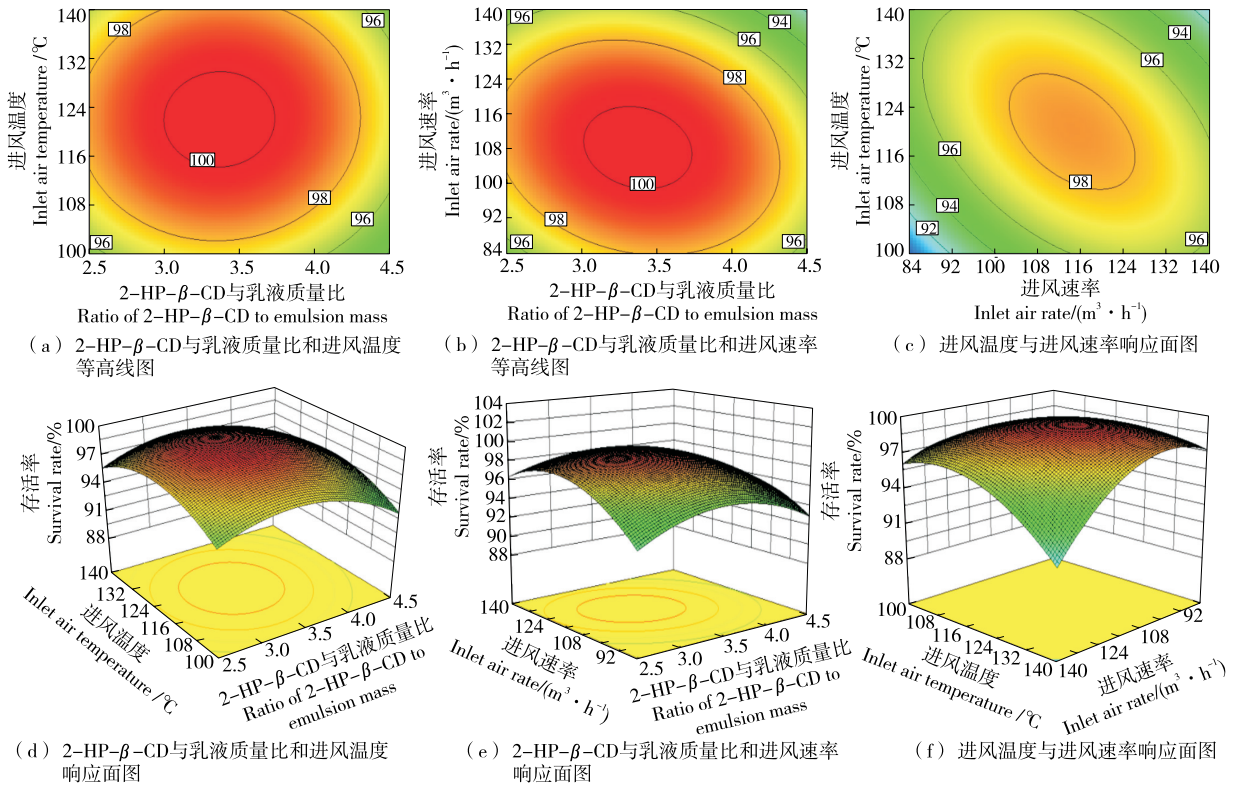


图5 等高线图和响应面曲面图

Figure 5 Curved surface and contour diagram of response surface

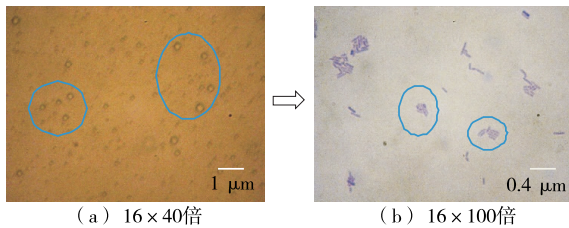


图6 微胶囊显微在水中分散情况

Figure 6 Dispersion of microcapsules in water

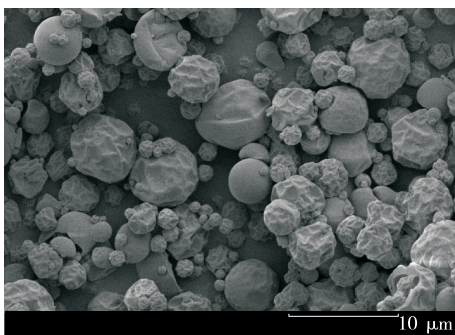


图7 电镜观察结果

Figure 7 Observation results by scanning electron microscope

粒,说明各种壁材及菌体通过某种相互作用,形成了微胶囊。多数微胶囊中部凹陷,部分凹陷后出现不同形式的

折叠,可能是由于喷雾干燥过程中,微胶囊快速失水干燥收缩导致的<sup>[26]</sup>,包裹完整无破裂,表面无菌体分布,表明菌体分布在微胶囊内部。

### 2.8 微胶囊粉剂水分散性

如图8所示,耐热型植物乳杆菌微胶囊分散液的粒径呈正态分布且峰较窄,表明粒径分布均匀。平均粒径均值为472.7 nm,粒径分散指数(PDI)平均值为0.157。根据不同加工工艺的需要,对益生菌微胶囊颗粒大小的判定标准也不同。Fareez等<sup>[27]</sup>认为微胶囊的粒径越大,微球的比表面积越小,可以对益生菌有更好的保护效果;邹强等<sup>[28]</sup>认为,更小粒径的微胶囊有利于提高添加到食品或者饲料后的整体口感。通常认为当粒径<100 μm时,都不会给所添加的食品的感官造成不良影响<sup>[29]</sup>。相比之下,研究制备得到的益生菌胶囊处在较为理想的尺寸范围内。

由Zeta电位仪测得,植物乳杆菌微胶囊粉剂分散在蒸馏水中带负电荷,平均电位为-40.37 mV。说明该分散体系相对稳定<sup>[30]</sup>。

在0~60 min的时间范围内,微胶囊粉剂分散液的OD值呈缓慢下降的趋势,且各时间点差异均不显著( $P>0.05$ ),表明此分散液的悬浮稳定性较好<sup>[22,31]</sup>。

### 2.9 微胶囊粉剂耐热性

由图9可知,无论是菌泥还是微胶囊粉剂,在110 °C

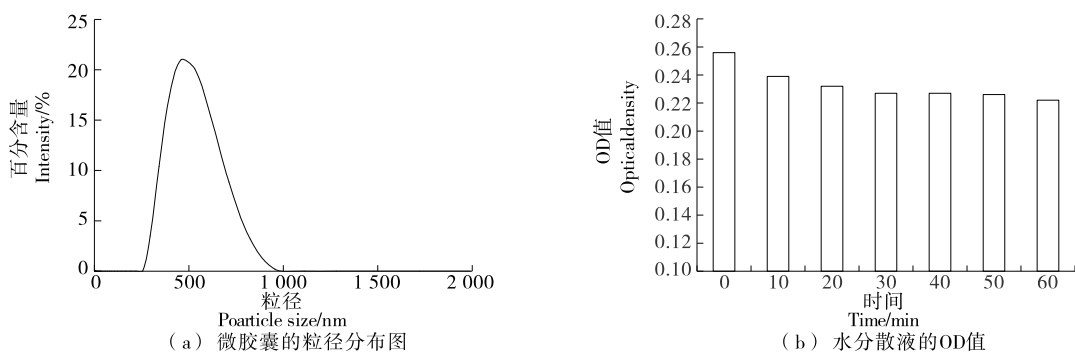
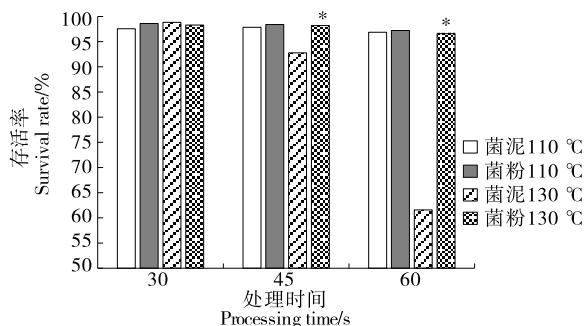


图 8 微胶囊水分散液的水分散性  
Figure 8 Water dispersion of microencapsulated water dispersions



\* 表示菌粉、菌泥在同一条件下,存活率差异显著( $P < 0.05$ )

图 9 高温对菌泥和微胶囊粉剂的影响

Figure 9 Effects of high temperature on bacterial sludge and microcapsule powder

均表现出了较高的耐受性,微胶囊粉剂的耐受性虽然高于菌粉的趋势,但差异并不显著( $P > 0.05$ )。但在 130 °C 下,微囊化的优势得到了显著的提升,在处理 60 s 条件下,菌泥的存活率为 61.59%,微胶囊粉剂的存活率仍然高达 96.76%,与菌泥同条件下的存活率相比差异极其显著( $P < 0.01$ )。

### 3 结论

研究将 2-HP-β-CD 添加于植物乳杆菌微胶囊乳液,在适当的条件下,通过喷雾干燥的方法制备微胶囊粉剂,存活率达到(99.53±0.11)%,130 °C 干热处理 60 s 后存活率为 96.76%。因此,大大提高了喷雾干燥法制备益生菌微胶囊时益生菌的存活率,很好地解决了其在加工、贮存过程中不耐热的问题。为更有效地应用该益生菌微胶囊,使其具备良好的过胃保护和在肠道定点释放及定植的特性,仍需对其进行体内外试验等方面的研究。

#### 参考文献

[1] VRIESM C, VAUGHAN E E, KLEEREBEZEM M, et al. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract[J]. International Dairy Journal, 2006, 16: 1 018-1 028.

[2] 王水泉,包艳,董喜梅,等.植物乳杆菌的生理功能及应用[J].中国农业科技导报,2010,12(4):49-55.  
WANG S Q, BAO Y, DONG X M, et al. Physiological function and application of *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2010, 12(4): 49-55.

[3] SHAH N P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods[J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83(4): 894-907.

[4] FAREEZ I M, LIM S M, LIM F T, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus* sp. using chitosan-alginate-xanthan gum-β-cyclodextrin and characterization of its cholesterol reducing potential and resistance against pH, temperature and storage [J]. Journal of Food Process Engineering, 2017, 40(3): 12458.

[5] 吴克刚. 益生菌的生理功能及微胶囊化的必要性和方法[J]. 广州食品工业科技, 2004(20): 72-75.  
WU K G. Physiological action, necessary to be microencapsulate and manufacture methods of probiotics [J]. Modern Food Science and Technology, 2004(20): 72-75.

[6] 傅楠,陈晓东. 益生菌在喷雾干燥过程中的活性变化与保护策略[J]. 化工进展, 2018, 37(5): 1 633-1 645.  
FU N, CHEN X D. Changes in the viability of probiotics during spray drying process and the strategies to protect probiotic cells [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2018, 37(5): 1 633-1 645.

[7] 舒中玉. 乳酸片球菌 S204 益生特性、发酵及喷雾干燥工艺的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018: 44.  
SHU Z Y. Research on Biological characteristics, fermentation process and spray drying process of *Pediococcus acidilactici* s204 [D]. Wuhan: Hua Zhong Agricultural University, 2018: 44.

[8] 付博,马齐,王卫卫. 乳酸双歧杆菌喷雾干燥工艺研究[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(5): 12-15.  
FU B, MA Q, WANG W W. Spray drying technics of *Bifidobacterium lactis* [J]. China Dairy Industry, 2011, 39(5): 12-15.

[9] SULTAN A, MUSTAFA E, ISMAIL T, et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* with different wall materials by spray drying [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 685-690.

[10] 庄若茹,张巧玲,王俊国. 不同应激处理方式对乳酸菌喷雾干

- 燥过程中存活率的影响及内在机制[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(1): 55-60.
- ZHUANG R R, ZHANG Q L, WANG J G. Effects and mechanism of different stress treatments on the survival rate of lactic acid bacteria after spray drying [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2022, 45(1): 55-60.
- [11] 肖怀秋, 李玉珍, 赵谋明, 等. 枯草芽孢杆菌 Prob1822 喷雾干燥制备益生菌粉工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 114-120.
- XIAO H Q, LI Y Z, ZHAO M M, et al. Optimization of spray drying parameters for the probiotic powder preparation of *Bacillus subtilis* Prob 1822[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(2): 114-120.
- [12] JIANG J Y. Spray drying co-encapsulation of lactic acid bacteria and lipids: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 129: 134-143.
- [13] CHÁVEZ B E, LEDEBOER A M. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival[J]. Drying Technology, 2007, 25(7/8): 1 193-1 201.
- [14] IACONELLI C, LEMETAIS G, KECHAOU N, et al. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 214: 17-25.
- [15] 吴雨婷, 钱永芳, 吕丽华. 2-羟丙基- $\beta$ -环糊精对槲皮素的包合作用[J]. 上海纺织科技, 2022, 50(4): 61-64.
- WU Y T, QIAN Y F, LU L H. Encapsulation of quercetin with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin[J]. Shang Hai Textile Science & Technology, 2022, 50(4): 61-64.
- [16] LI S Y, YUE J Z, ZHOU W, et al. An investigation into the preparation, characterization and antioxidant activity of puerarin/cyclodextrin inclusion complexes [J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2015, 82(3/4): 453-460.
- [17] 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.
- [18] MEINLSCHMIDT P, SCHWEIGGERT-WEISZ U, BRODE V, et al. Enzyme assisted degradation of potential soy protein allergens with special emphasis on the technofunctionality and the avoidance of a bitter taste formation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 68: 707-716.
- [19] XU D X, ZHANG J J, CAO Y P, et al. Influence of microcrystalline cellulose on the microrheological property and freeze-thaw stability of soybean protein hydrolysate stabilized curcumin aggregate particles[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 66: 590-597.
- [20] 郑建璋, 管建军, 路新开, 等. 酶解大豆分离蛋白-磷脂复合乳液的制备及稳定性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 244-251.
- ZHENG J Z, GUAN J J, LU X K, et al. Stability of enzymatic hydrolysate of soy protein isolate-phospholipid composite emulsion[J]. Food Science, 2020, 41(16): 244-251.
- [21] AROONRAT T A, MANOP S, UTHAI K. Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides[J]. Biological and Microbial Control, 2003, 96(2): 292-299.
- [22] ROBERTSON B V, CHANDLER G L. Effect of pectic enzymes on cloud stability and soluble limonin concentration in[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1983, 34: 599-611.
- [23] ZHU Z, LUAN C G, ZHANG H X, et al. Effects of spray drying on *Lactobacillus plantarum* BM-1 viability, resistance to simulated gastrointestinal digestion, and storage stability [J]. Drying Technology, 2016, 34(2): 177-184.
- [24] 麻丽丽. 提高植物乳杆菌 LIP-1 喷雾干燥耐热性方法的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020: 26.
- MA L L. Study on method to improve the heat resistance of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 during spray-drying[D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020: 26.
- [25] 刘凡. 油脂微胶囊壁材主要成分相互作用研究及微观结构分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2013: 41-44.
- LIU F. Study of the interaction among the main components of oil microcapsule wall material and its microstructure analysis [D]. Nanchang: Nanchang University, 2013: 41-44.
- [26] COOK M T, TZORTZIS G, CHARALAMPOPOULOS D, et al. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria [J]. Biomacromolecules, 2011, 12(7): 2 834-2 840.
- [27] FAREEZ I M, LIM M S, MISHRA R K, et al. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 1 419-1 428.
- [28] 邹强, 梁华忠, 龚雷淋, 等. 益生菌微胶囊二次包衣工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(22): 250-252, 270.
- ZOU Q, LIANG H Z, GONG L L, et al. Optimization of preparation for double-coated probiotic microcapsules[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(22): 250-252, 270.
- [29] CHAMPAGNE C P, FUSTIER P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18(2): 184-190.
- [30] 张涵雨. 香桂复合纳米乳制备及其对急性肠炎小鼠肠道功能的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2022: 22.
- ZHANG H Y. Preparation of carvacrol and cinnamaldehyde nano-emulsion and its effect on intestinal function of acute enteritis mice[D]. Chongqing: Southwest University, 2022: 22.
- [31] 刘凤霞. 基于超高压技术芒果汁加工工艺与品质研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014: 82-83.
- LIU F X. Effect of high hydrostatic pressure on processing and qualities of mango juice [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014: 82-83.