

晶球益生菌产品在贮藏期色泽与菌活稳定性的变化

张娜, 李明松, 王红强*

(华宝香精股份有限公司, 上海 201800)

摘要: 该文研究了芯层油脂、囊壳水分、产品加工及贮藏条件对晶球益生菌产品贮藏期间其色泽和活菌数的影响, 分析了该产品在贮藏期间其颜色发生褐变和活菌数逐步下降的原因, 并对晶球益生菌产品的囊壳配方进行了优化设计。结果如下: 在 37 °C, 65% RH 环境下, 晶球益生菌产品的芯层油脂在贮藏期间未发生明显变化, 而芯层菌粉晶体则发生明显褐变; 当囊壳水分质量分数高于 14.10%, 产品在 37 °C, 65% RH 贮藏 2 个月后褐变更明显, 其活菌数低于 10⁶ CFU/g, 当囊壳水分质量分数降至 10.30% 时, 晶球会发生破裂; 产品加工时益生菌高温暴露 2 h 内对芯层菌粉色泽无显著影响, 相比 25 °C, 产品在 37 °C 贮藏期间其芯层菌粉褐变更严重, 活菌数下降至更低; 囊壳配方的优化提高了晶球益生菌外壳的断裂伸长率, 避免了在较低的囊壳水分质量分数 (3.45%) 时产品的破裂, 囊壳优化后晶球益生菌的活菌数提高了 1.85 倍。该研究有效解决了晶球益生菌产品在贮藏期褐变和菌活低的问题, 为晶球益生菌工业化生产提供了理论指导。

关键词: 晶球益生菌; 褐变; 菌活; 囊壳水分; 囊壳优化

文章编号: 1673-9078(2025)07-199-208

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.7.0667

Change in Color and Cell Viability Stability of Probiotic Crystal Ball Products during Storage

ZHANG Na, LI Mingsong, WANG Hongqiang*

(Huabao F&F Co. Ltd., Shanghai 201800, China)

Abstract: The effects of the core lipid, shell moisture, product processing, and storage conditions on the color and viable bacterial count of probiotic crystal ball products during storage were studied. The reasons for the browning and gradual decline in the viable bacterial count of the products during storage were analyzed, and the shell formulation of the probiotic crystal ball product was optimized. The results are as follows: at 37 °C and 65% RH, the lipid in the core does not change significantly during storage, but the probiotic powder crystals in the core noticeably brown. When the moisture content of the shell exceeds 14.10%, product browning is more obvious after two months of storage at 37 °C and 65% RH, and the viable bacterial count is lower than 10⁶ CFU/g. When the moisture content of the shell is decreased to 10.30%, the probiotic crystal balls fracture. Exposing probiotics to high temperatures for two hours during product processing has no significant effects on the color of the probiotic powder in the core. Compared with 25 °C storage, 37 °C storage leads to more serious browning and more significant viable bacterial count reduction in the probiotic powder. The elongation at break of the outer shell is increased by optimizing the shell formulation, and rupturing of the product at low shell moisture content (3.45%) is avoided.

引文格式:

张娜,李明松,王红强.晶球益生菌产品在贮藏期色泽与菌活稳定性的变化[J].现代食品科技,2025,41(7):199-208.

ZHANG Na, LI Mingsong, WANG Hongqiang. Change in color and cell viability stability of probiotic crystal ball products during storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(7): 199-208.

收稿日期: 2024-05-15

作者简介: 张娜 (1996-), 女, 硕士研究生, 助理工程师, 研究方向: 益生菌发酵与制剂, E-mail: zn@hbflavor.com

通讯作者: 王红强 (1970-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品添加剂和配料, E-mail: whq@hbflavor.com

After shell optimization, the viable bacterial count of the probiotic crystal balls is increased by 1.85-fold. The problems of browning and low viability of the probiotic crystal ball products during storage were effectively solved in this research. The results provide theoretical guidance for the industrial production of probiotic crystal balls.

Key words: probiotic crystal ball; browning; viable bacterial count; shell moisture; shell optimization

益生菌泛指可在宿主胃肠道定植并改善微生态环境, 促进机体健康的一类活的微生物。益生菌具有多种益生功能, 比如促进胃肠道菌群平衡^[1]、抗肿瘤^[2]、降血脂^[3]、缓解 2 型糖尿病^[4]和保护女性阴道健康^[5]等。益生菌因其多种健康功效被制成活性制剂, 应用于动物饲料、人类食品、化妆品、抗菌等多个方面^[6]。然而, 益生菌产品在加工、运输和贮藏过程中活力会严重下降, 其进入体内也受到胃肠道极端环境及消化酶的影响^[7], 因此, 近年来, 益生菌的高效递送体系^[8]开发成为研究热点。

益生菌发挥功能的前提是有足够多的数量在肠道存活。研究者为提高益生菌的肠道存活率及货架期稳定性, 开发出多种益生菌包埋技术。占英等^[9]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益生菌微胶囊可显著提高菌株的结肠达到率。后鹏飞等^[10]以海藻酸钠、乳清蛋白和乳酸钙作为裹涂粉, 利用反向法将青稞和益生菌包埋制备益生菌青稞晶球, 晶球在人工模拟胃肠液和胆盐中的存活率比对照组高 40.6%~67.9%。利用电流体加工技术对益生菌进行封装, 可提高其贮藏活性^[11]。日本森下仁丹株式会社^[12]采用“滴落法”技术制备了无缝胶囊产品, 以亲脂性或亲水性液体为芯层, 高分子亲水胶体为壁层, 利用界面张力使外层液体无缝地包裹内容物, 形成双层胶囊结构。晶球益生菌为双层胶囊结构, 此类产品可在常温一年内可保持 10^6 CFU/g 以上活菌数, 且在肠道定点释放。

晶球益生菌加工技术趋于成熟, 但其产品仍面临两个方面的挑战, 即其在贮藏期发生褐变, 活菌数也逐步降低。一般来说, 益生菌菌粉生产所使用的配料大多包含乳粉^[13]和糖类化合物^[14], 温度及水活度是影响菌粉货架期活菌数的重要因素^[15], 较高的温度不利于益生菌的存活。菌粉吸湿后更容易发生色泽变化、结块等, 这是由于菌粉保护剂吸收水分或温度超过其玻璃化转变温度 (Glass Transition Temperature, T_g), 使得其物理状态转变为高弹态^[16], 引起菌粉粘连、结块^[17]。此外, 在益生菌加工和贮藏过程中, 氧气和 pH 值也显著影响其活

性, 过高的氧气含量会使益生菌代谢 ROS 增加^[18], 造成细胞损伤, 而 H^+ 和 OH^- 含量过多会影响其膜表面电位, 从而影响膜通透性^[19]。然而, 温度与水分对晶球益生菌产品在贮藏期间质量稳定性影响的研究少有报道。为此, 本文分析了晶球益生菌产品在贮藏期间其颜色发生褐变和活菌数逐步下降的原因, 研究了芯层油脂、囊壳水分、产品加工及贮藏条件对该产品贮藏期间其色泽和活菌数的影响, 并对其囊壳配方进行了优化设计, 有效改善了产品的色泽和菌活稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料

MRS 琼脂培养基, 海博生物技术有限公司; 食品级代可可脂, 上海和风食品有限公司; 氯化钠、甘油, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 鱼明胶、阿拉伯胶、结冷胶和卡拉胶等, 上海安谱实验科技股份有限公司; 海藻酸钠, 上海鑫泰食品公司; 果胶, 新疆阜丰生物科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

STC 150S 型恒温恒湿试验箱, 埃里森仪器设备有限公司; BX53F 型显微镜, OLYMPUS 公司; SPF-1500BE 恒温培养箱、YLE-2000 型电热干燥箱, 上海立辰邦西仪器科技有限公司; XFH-150-CA 型高压蒸汽灭菌锅, 浙江新丰医疗器械有限公司; SW-CJ-2FD 型无菌操作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; CT3 型质构仪, 美国 AMETEK BROOKFIELD 公司; FK-SG12 型酸价过氧化值检测仪, 山东方科仪器有限公司; DS-2023 型单头滴丸机, 上海杜斯仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 晶球益生菌贮藏期间色泽观察

1.3.1.1 晶球贮藏期间色泽观察

挑选市售 3 种晶球益生菌和 1 种空载晶球 (芯层未添加菌粉), 记为 1 号、2 号、3 号和 4 号。将 4 种晶球放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 65% 相对湿度的恒温恒湿培

养箱进行 20 d 的贮藏考察,以新制晶球为对照组,拍照记录样品褐变情况。

1.3.1.2 拍照

将样品放置到对色灯箱内,打开灯光,对样品进行拍照。

1.3.1.3 显微镜观察

在贮藏后期,用美工刀切开晶球益生菌拍照记录,取出芯层在 10×10 倍光学显微镜下观察褐变情况并拍照留样。

1.3.2 芯层油脂贮藏期间其酸价及过氧化值的测定

1.3.2.1 实验设计

取氢化椰子油、代可可脂、氢化椰子油与 5 wt.% 菌粉的混合物各 5 g 放置于透明玻璃瓶内,每组样品设置三个平行,设置两种样品包装条件:玻璃瓶封口但不避光(光照,非真空),瓶口充氮气以排空瓶内空气,密封后避光放置(避光,充氮)。设置 2 种贮藏条件,分别为 37 °C, 65% 相对湿度和 25 °C, 65% 相对湿度的恒温恒湿培养箱。为探究晶球益生菌在贮藏 20 d 后发生褐变是否由芯层油脂氧化酸败引起,将上述样品放置于恒温恒湿培养箱进行 28 d 贮藏实验,在贮藏第 0 天和第 28 天对样品进行酸价和过氧化值测定。

1.3.2.2 酸价测定

(1) 样品前处理:将油脂、油脂与菌粉混合物 45 °C 水浴 0.5 h,待油脂融化后,摇晃均匀,取 0.2 g 进行样品检测;

(2) 样品检测:使用酸价及过氧化值检测仪对样品酸价进行测定,具体操作参考说明书。每一组样品设置三个平行。

1.3.2.3 过氧化值测定

(1) 样品前处理:同 1.4.2 中样品前处理方法;

(2) 样品检测:使用酸价及过氧化值检测仪对样品过氧化值进行测定,具体操作参考说明书。每一组样品设置三个平行。

1.3.3 水分对晶球益生菌色泽和菌活的影响

1.3.3.1 芯层油脂吸湿情况

将晶球益生菌芯层油脂即代可可脂作为试验材料。称取适量样品放入动态水蒸气吸附分析仪的样品盘上,设置温度为 25 °C,相对湿度由 0% 缓慢升到 90%。仪器自动记录在 50 h 不同湿度下代可可脂的重量和重量变化率。

1.3.3.2 囊壳水分

配置 1 L 囊壳液,其中明胶、果胶和甘油的质

量分数分别为 18%、3% 和 3%。芯液为代可可脂和菌粉的混合物,取 500 g 代可可脂放置于烧杯中,80 °C 水浴 1 h 使其完全融化,将油脂控制在 45 °C 时加入 5% 质量分数的菌粉,使用单头滴丸机制备晶球益生菌,将新滴制的晶球益生菌放入转轮干燥机,干燥 3 h 得到成品。干燥 1、2、3 h 得到囊壳水分质量分数分别为 77.67%、37.11%、23.00% 的晶球益生菌,编号为 A1、A2、A3。将 A3 放入干燥皿中继续干燥 45、72 h 得到囊壳水分质量分数分别为 14.10% 和 10.30% 的晶球,编号为 A4 和 A5。将上述样品用铝箔袋进行分装,每袋称取 5 g,每组样品设置三个平行,放入 37 °C, 65% 相对湿度的培养箱贮藏 2 个月,在贮藏末期测定活菌数并拍照记录其色泽情况。

1.3.4 产品加工时益生菌高温暴露时长与贮藏温度对晶球益生菌芯层色泽和菌活的影响

将 2 种益生菌菌粉按质量分数 5% 的比例与 45 °C 融化的代可可脂混合,搅拌均匀 2 h,每隔 0.5 h 称取 5 g 混合物于 15 mL 玻璃瓶中,每个时间段设置三个平行,室温等待代可可脂凝固后,每组样品分别放入 37 °C, 65% 相对湿度和 25 °C, 65% 相对湿度的培养箱进行贮藏,以每组贮藏前的样品为对照,记录 / 检测贮藏 2 个月后样品色泽和菌活变化。

1.3.5 晶球益生菌贮藏期间活菌数测定

在 50 mL 玻璃烧杯中称取 1 g 晶球,加入 29 g 灭菌生理盐水,放入水浴锅 45 °C 水浴 20 min,待晶球益生菌囊壳融化后将混合液均质 2 min,再参照《GB4789.35-2016 食品安全国家标准食品微生物学检验乳酸菌检验》检测活菌数。

1.3.6 晶球益生菌囊壳配方优化

以明胶膜断裂伸长率为指标,对明胶浓度,甘油添加量和复配胶种类进行优化。控制明胶质量分数分别为 15%、20%、25% 和 30%,加入 5% 质量分数的甘油,室温下溶胀 0.5 h 后,65 °C 下充分搅拌 1 h,使其完全溶解,称取 17~18 g 成膜液倒入聚四氟乙烯皿(12×12 cm)中均匀平铺,再将明胶凝胶放入烘箱中 50 °C 下干燥 3 h,继续在干燥皿中深度干燥至水分质量分数为 6%,将得到明胶膜放入铝箔袋抽真空保存;控制甘油添加量分别为甘油:明胶的质量比为 1:10、3:10、5:10、7:10 和 9:10 (m/m);复配胶为质量分数是 1% 果胶、1% 阿拉伯胶、1% 结冷胶、1% 卡拉胶和 1% 海藻酸进行优化,在确定复

配胶种类后,控制复配胶的质量分数分别为 1%、3%、5%、7% 和 9%,制成胶膜后测定断裂伸长率,确定复配胶的添加量。

1.3.6.1 水分和粘度的测定

使用快速水分检测仪和粘度计测定明胶膜的水分和胶液粘度。水分测定条件为加热 130 ℃, 1 g 样品,将所有明胶膜控制在同一水分;胶液粘度测定条件,转速为 30 r/min,温度为 (60±1)℃,使用 LV02 (62 号) 转子。

1.3.6.2 断裂伸长率的测定

利用质构仪在 25~28 ℃ 和 55%±5% RH 的条件下测定明胶膜的断裂伸长率。首先,将膜剪成 90 mm×10 mm 的矩形长条,随后利用夹具将其固定在质构仪上运行。夹具初始间距为 50 mm,以 50 mm/min 的速度测定 3 个样品,取平均值。断裂伸长率的计算如公式 (1) 所示。

$$E=\frac{L-L_0}{L_0}\times100\%$$

式中:

E ——明胶膜的断裂伸长率, %;

L_0 ——明胶膜的初始长度, mm;

L ——明胶膜的最终长度, mm。

1.3.7 囊壳优化后的晶球益生菌贮藏实验

根据 1.3.6 的结果,配置 1 L 囊壳液,称取 500 g 代可可脂放置于烧杯中,80 ℃ 水浴 1 h 使其完全融化,当油脂控制在 45 ℃ 时加入 5% 质量分数菌粉,使用单头滴丸机制备晶球益生菌,将制备的晶球益生菌放入转轮干燥机干燥 3 h,再放入干燥皿中深度干燥 5 d 控制其囊壳水分质量分数为 3.45%,记为 B1,以 A3 为对照组,将干燥后的样品放入 37 ℃,65% 相对湿度的培养箱贮藏 2 个月,在贮藏末期测定活菌数并拍照记录色泽情况。

1.4 数据处理

数据处理采用 Graphpad prism 8.0 软件进行分析,实验结果均为平行测定三次的值,用均数 ± 标准差 (mean±SD) 表示。采用双因素方差分析 (Two-way ANOVA) 的 Tukey's 多重检验比较不同加工时长和贮藏温度对活菌数的差异显著性;采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 的 Tukey's 多重检验比较不同囊壳水分对活菌数的差异显著性;采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 的

Dunnett's 多重检验比较不同复配胶对明胶膜断裂伸长率的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 晶球益生菌的褐变位点分析

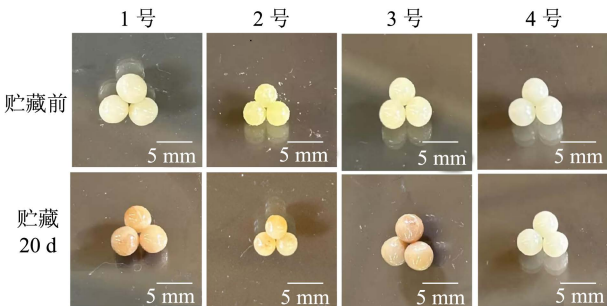


图 1 晶球益生菌在贮藏期间色泽的变化

Fig.1 Color change of probiotic crystal ball during storage

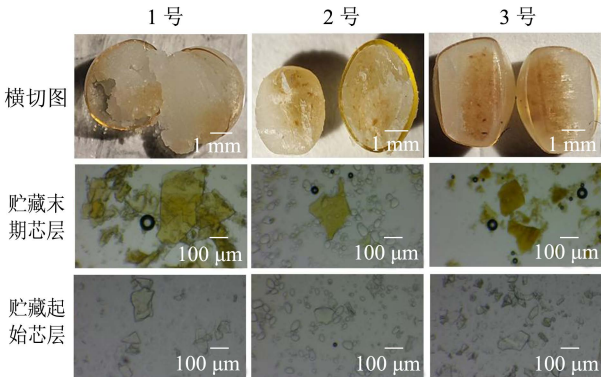


图 2 褐变晶球益生菌横切图及贮藏前后芯层微视图

Fig.2 Cross section of browned probiotic crystal ball and the micrograph of the core before and after storage

为研究晶球益生菌的具体褐变位点,将挑选的三种市售晶球益生菌和未添加菌粉的空载晶球放入 37 ℃、65% RH 培养箱中进行加速贮藏实验。由图 1 可知,在加速贮藏前,晶球益生菌 1 号、2 号、3 号和空载晶球 4 号为乳白色或黄色不透明小球,表面光滑有光泽,37 ℃、65% RH 贮藏 20 d 后三种晶球益生菌都发生了不同程度的褐变。将褐变晶球切开,微观上可见其芯层里面出现星点状、片状不均匀褐色物质,在电子显微镜下发现其芯层的菌粉晶体发生褐变 (图 2)。此外,空载晶球 (4 号晶球) 在贮藏 20 d 后未发生褐变。益生菌菌粉一般是由乳粉、糖类化合物、益生菌通过喷雾干燥或冷冻干燥制成^[20],故益生菌菌粉在适当的条件下会发生美拉德褐变反应。特别是,温度和水分对美拉德反应的影响尤为关键^[21,22],在较高贮藏温度下,固

体食品体系中增加的水分作为溶剂可使反应物迁移速率加快，且引起其 Tg 降低，引起美拉德褐变反应速度的加快^[23]。与该文结果相似地，有文献指出，将婴儿配方奶粉放置于 37 ℃和 57% RH 条件下储存 4 周后以及在 37 ℃和 75% RH 条件下储存 3 周后，均发生明显的美拉德褐变^[24]。因此，在高温高湿环境下，推测晶球益生菌的褐变是由芯层益生菌菌粉发生美拉德褐变引起的。

2.2 影响晶球益生菌产品色泽和菌活的因素考察

2.2.1 油脂对晶球益生菌色泽褐变的影响

晶球益生菌在 37 ℃，65% 相对湿度的环境下贮藏 20 d 发生褐变，晶球益生菌芯层油脂在贮藏期间的变质可能引起芯层菌粉褐变，因此，监测油脂及菌粉与油脂混合物在贮藏期间的变化情况。酸价和过氧化值是评价油脂水解酸败和氧化的重要指标^[25]。由表 1 可知，氢化椰子油、代可可脂及菌粉

与氢化椰子油混合物的过氧化值在不同的贮藏条件下贮藏 28 d 后均为 0，说明油脂在贮藏期间没有发生氧化。相同地，在贮藏过程中，两种油脂的酸价也未发生显著变化，菌粉与油脂混合物的酸价在贮藏后稍有升高，但其检测值也低于 GB 5009.229-2016 规定的食用植物油的酸价限量值（3 mg/g KOH）^[26]，这说明晶球益生菌的芯层油脂在贮藏期间未发生变质，也证明晶球益生菌菌粉褐变不是由芯层油脂的变质引起。

2.2.2 水分对晶球益生菌色泽和活菌数的影响

2.2.2.1 油脂吸湿情况

为分析油脂在常温贮藏环境下是否会吸湿引起芯层菌粉的褐变，对代可可脂在不同相对湿度环境下的吸湿性进行评估。从图 3 中可以看出，随着测试时间的延长，代可可脂水活度逐渐增加，但其质量和质量变化率都稳定在 3 775 mg 和 0 附近，说明代可可脂在高湿度环境下保持重量稳定，没有主动发生吸湿现象。

Table 1 Changes of acid value and peroxide value of the lipid, the mixture of probiotics powder and lipid during storage									
油脂、菌粉与油脂混合	贮藏时间/d	37 ℃、光照、非真空		37 ℃、避光、充氮		25 ℃、光照、非真空		25 ℃、避光、充氮	
		过氧化值/(g/100 g)	酸价/(mg/g KOH)	过氧化值/(g/100 g)	酸价/(mg/g KOH)	过氧化值/(g/100 g)	酸价/(mg/g KOH)	过氧化值/(g/100 g)	酸价/(mg/g KOH)
氢化椰子油	0	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.02
	28	0.00 ± 0.00	0.64 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.65 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.67 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.02
代可可脂	0	0.00 ± 0.00	0.26 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.26 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.26 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.26 ± 0.02
	28	0.00 ± 0.00	0.24 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.24 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.22 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.24 ± 0.04
菌粉 + 氢化椰子油	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	28	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.46 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.41 ± 0.03

注：表中数据均表示为“平均值 ± 标准差”。

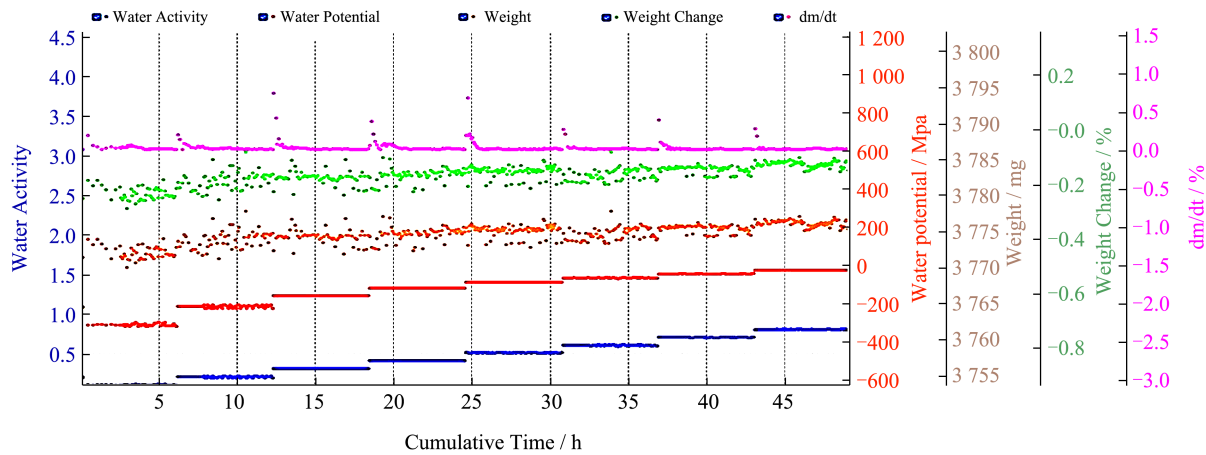


图 3 代可可脂在不同湿度下的吸湿性

Fig.3 Hygroscopic properties of cocoa butter substitute at different humidities

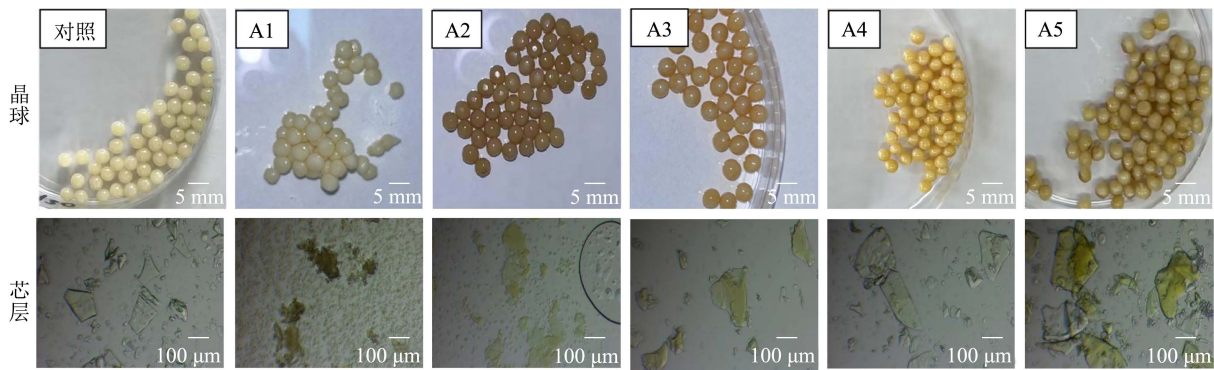


图 4 不同囊壳水分晶球益生菌贮藏 2 个月后其色泽情况与芯层微观图

Fig.4 The color of probiotic crystal balls of different shell moisture and the micrograph of the core after 2-month of storage

2.2.2.2 囊壳水分

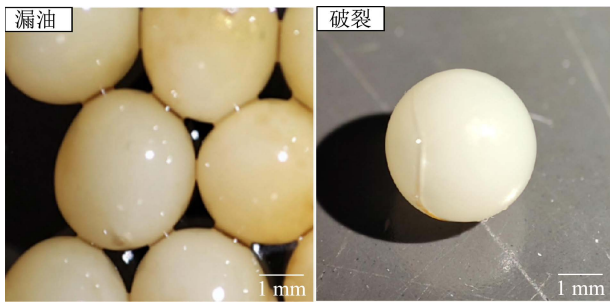


图 5 10.30% 囊壳水分的晶球益生菌贮藏 2 个月后其色泽情况

Fig.5 The color of probiotic crystal ball with its shell moisture of 10.30% after 2-month of storage

前述结果表明晶球益生菌褐变是由芯层菌粉褐变引起的。由图 4 可知，不同囊壳水分的晶球益生菌褐变程度差异明显，当囊壳水分质量分数高于 14.10%（A4）时，随着含水量增加，芯层菌粉褐变越严重，菌粉晶体出现融化。当囊壳水分质量分数降低至 10.30% 时，晶球在贮藏末期出现囊壳破裂，漏油现象（图 5），其芯层菌粉晶体也发生了褐变（图 4）。有文献指出，非晶态食品固体在温度升高至 T_g 以上时，随着水分的增加，非晶态固体分子迁移率的提高会导致其严重的结晶、结块、粘连等问题^[17]。基于此，推测在 37℃ 贮藏环境下，因为晶球芯层菌粉的吸湿性，导致水分从囊壳迁移到了芯层菌粉。芯层菌粉吸收水分，加重了芯层菌粉晶体的褐变，降低了对益生菌的保护效果，在宏观上表现为晶球的褐变。

不同囊壳含水量的晶球益生菌在贮藏末期活菌数的变化趋势与褐变情况一致，囊壳水分质量分数高于 14.10% 时，晶球益生菌在贮藏末期其活菌数随着其囊壳水分质量分数的升高而降低，相似地

是，Shweta 等^[27]的研究也发现，在 25℃，50% RH 贮藏条件下，含小米乳益生菌菌粉的活菌数随着含水量的增加而降低，且发生菌粉结块。这说明在室温或较高温度贮藏下，随着水分的增加，菌粉保护剂的晶体形态发生了转变，削弱了其通过氢键与益生菌磷脂极性位点的相互作用，从而降低了对益生菌细胞膜的保护作用^[28]。当壳含水量进一步降低至 10.30%，活菌数由 8.14 下降至 4.95 lg CFU/g（表 2），这是由于囊壳水分质量分数过低导致囊壳在贮藏期间破裂，降低了对益生菌的保护效果。以上结果表明，囊壳水分质量分数为 14.10% 时，晶球益生菌产品在贮藏期间色泽和菌活稳定性良好，囊壳水分质量分数高于 14.10% 或低于 10.30% 时，晶球益生菌芯层菌粉吸湿或囊壳破裂，导致其色泽和菌活的稳定性也随之下降。

表 2 囊壳水分对晶球益生菌贮藏期间活菌数的影响

Table 2 Effect of capsule shell moisture on viable counts of probiotic crystal balls during storage

编号	囊壳水分/%	活菌数/(lg CFU/g)
A1	77.67 ± 2.62	2.75 ± 0.12 ^e
A2	37.11 ± 2.31	3.92 ± 0.07 ^d
A3	23.00 ± 1.63	4.66 ± 0.09 ^c
A4	14.10 ± 0.86	8.14 ± 0.02 ^a
A5	10.30 ± 1.91	4.95 ± 0.11 ^b

注：同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异（ $P < 0.05$ ），表中数据均表示为“平均值 ± 标准差”。

2.2.3 产品加工时益生菌高温暴露时长与贮藏温度对芯层菌粉色泽的影响

为分析产品加工时益生菌高温暴露时长和贮藏温度对晶球益生菌芯层色泽的影响，本文将 2 种菌粉分别与代可可脂混合进行贮藏实验，观察芯层色泽的

变化。由图 6 可知, 2 种菌粉在 45 ℃ 水浴 0~2 h 的即时色泽没有明显差异, 说明 45 ℃ 加工 2 h 对菌粉色泽无影响, 而经过不同温度贮藏 2 个月后, 1 号发生褐变, 褐变程度与益生菌高温暴露时长无关, 且 37 ℃ 比 25 ℃ 贮藏后褐变加深 (图 6a), 而 2 号菌粉在 2 种贮藏条件下未发生明显褐变 (图 6b)。综上, 芯层菌粉褐变与贮藏温度及菌粉种类相关, 而产品加工时益生菌高温暴露时长在该考察范围内对色泽无影响。

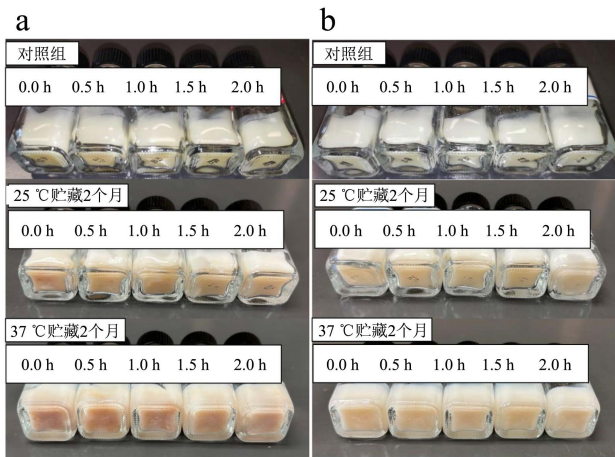


图 6 贮藏温度与益生菌高温暴露时长对 2 种菌粉色泽的影响

Fig.6 Effect of storage temperature and high temperature exposure time on the color of two probiotics powders

注: a、b 分别表示 1 号、2 号菌粉与代可可脂混合后贮藏。

2.2.4 产品加工时益生菌高温暴露时长与贮藏温度对芯层菌粉活菌数的影响

图 7 中显示了产品加工时益生菌高温暴露时长和贮藏温度对芯层菌粉活菌数的影响, 随着高温暴露时间的延长, 芯层 2 种菌粉初始活菌数逐渐降低, 但 45 ℃ 暴露时长 2 h 内, 2 种菌粉起始活菌数保持在一个数量级或只下降一个数量级, 说明加工高温暴露时长对初始活菌数有一定的负面影响。Nur 等^[29]的研究结果也表明, 将益生菌菌粉与代可可脂混合后经 40 ℃、50 ℃ 热处理并没有使活菌数发生数量级衰减。1 号和 2 号菌粉经过两种贮藏条件后活菌数都显著下降 ($P < 0.01$), 相比 25 ℃ 贮藏, 37 ℃ 贮藏不利于活菌数稳定, 不同的是, 1 号菌粉在贮藏末期其活菌数 $\leq 10^8$ CFU/g, 而 2 号菌粉在贮藏末期活菌高于 10^8 CFU/g。Phùng 等^[30]也发现, 含乳清分离蛋白和木质素复合物的罗伊氏乳杆菌菌粉经 4 ℃ 和 37 ℃ 贮藏 2 个月后, 其活菌数由 9.34 分别下降至 9.10 和 7.25 lg CFU/g。综上可知, 在本

实验中, 加工时益生菌高温暴露时长对活菌数的影响小于贮藏温度, 益生菌高温暴露时长与贮藏温度对活菌数的影响程度与菌粉种类相关。这可能是由于不同菌株的耐热性是不同的^[31], 大多数益生菌的最适生长温度为 37~40 ℃^[32], 较高的贮藏温度会增加细胞膜的流动性, 抑制细胞代谢活性^[33]。整体而言, 2 号菌粉经过贮藏后活菌数更稳定, 影响晶球益生菌芯层菌粉活菌数稳定性的因素大小为: 37 ℃ 贮藏 > 25 ℃ 贮藏 > 益生菌高温暴露时长。

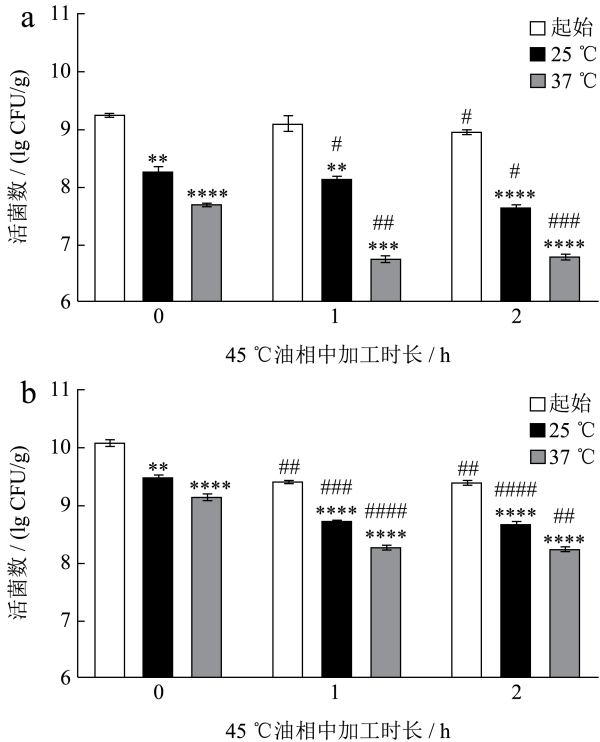


图 7 贮藏温度与加工时益生菌高温暴露时长对 2 种菌粉活菌数的影响

Fig.7 Effects of storage temperature and high temperature exposure time on viable counts of two probiotic powders

注: a 为 1 号菌粉, b 为 2 号菌粉。* 代表与起始组相比, 不同贮藏温度对活菌数的显著性, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$; # 代表与加工 0 h 组相比, 不同加工高温暴露时长对活菌数的显著性, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, $^{\#\#\#\#}P < 0.0001$ 。

2.3 晶球益生菌囊壳配方优化

根据表 2 和图 4、5 的结果, 发现囊壳水分质量分数过低 (10.30%) 会导致晶球在贮藏期间破裂, 在此进一步对晶球益生菌囊壳的配方进行优化, 以其断裂伸长率为指标, 筛选出低水分含量下延展性优良的囊壳。已有文献表明, 明胶膜中添

加增塑剂、多糖可通过氢键等非共价相互作用维持三螺旋结构的稳定,从而增强明胶膜的机械性能^[34,35]。例如,研究者发现在鱼明胶中加入0.5%质量分数黄原胶能显著降低薄膜含水率和水蒸气透过率,大大提高明胶膜的力学性能^[36]。本文以断裂伸长率为指标,对明胶浓度、甘油添加量、复配胶种类和浓度进行优化,干燥后控制明胶膜的水分质量分数为6%。图8可知,随着明胶浓度的增加,断裂伸长率先升高后不变,质量分数为20%时达到最高,为77.79%。胶液粘度随明胶浓度的增加而增加。当甘油添加量为明胶质量的一半(甘油:明胶, $m/m=1:2$)时,断裂伸长率最高,胶液粘度与甘油添加量成正比。与对照组相比,在明胶膜加入1%质量分数不同种类复配胶可显著提高断裂伸长率($P<0.0001$),改善明胶膜机械性能。Zhang等^[37]也发现在明胶膜中添加2%质量分数海藻酸钠可明显改善共混膜的机械性能,使其断裂伸长率达到85.47%。由图8c可知,添加阿拉伯胶和果胶可使断裂伸长率达到最高,因果胶在食品工业中研究和应用更广泛,因此,选择果胶作为复配胶,当果胶的质量分数为1%时,断裂伸长率最高,粘度适中,适合晶球益生菌的滴制。实践经验表明,在60℃时,当胶液的粘度 ≤ 200 cp时,适合食品工业中晶球的大规模生产。因此,优化后胶液的配方为,明胶的质量分数为20%,甘油:明胶的质量比为1:2,果胶的质量分数为1%。

2.4 囊壳优化后的晶球益生菌贮藏结果

根据图8的结果,使用优化后的囊壳配方制备了晶球益生菌样品,与囊壳优化前的晶球益生菌成品(A3)相比,B1的囊壳水分质量分数可降至3.45%(表3),且在37℃贮藏期间晶球未发生破裂漏油现象,这说明配方优化后的囊壳在低水分含量条件下具有良好的延展性。由图9可知,囊壳优化后的晶球益生菌在37℃,65%相对湿度的环境下贮藏2个月后色泽未发生明显变化,芯层菌粉晶体晶型完整,也未发生褐变。活菌数的变化与色泽变化一致,在贮藏末期活菌数仍有8.62 lg CFU/g,与贮藏前(9.72 lg CFU/g)相比只降低了一个数量级(表3),且与A3组样品相比,囊壳优化后的晶球益生菌的活菌数提高了1.85倍。总的来说,配方优化后的囊壳具有优良的弹性,也提高了对晶球益生菌芯层菌粉的保护效果,改善了晶球益生菌在相对高温高湿贮藏环境下的色泽和菌活稳定性问题。

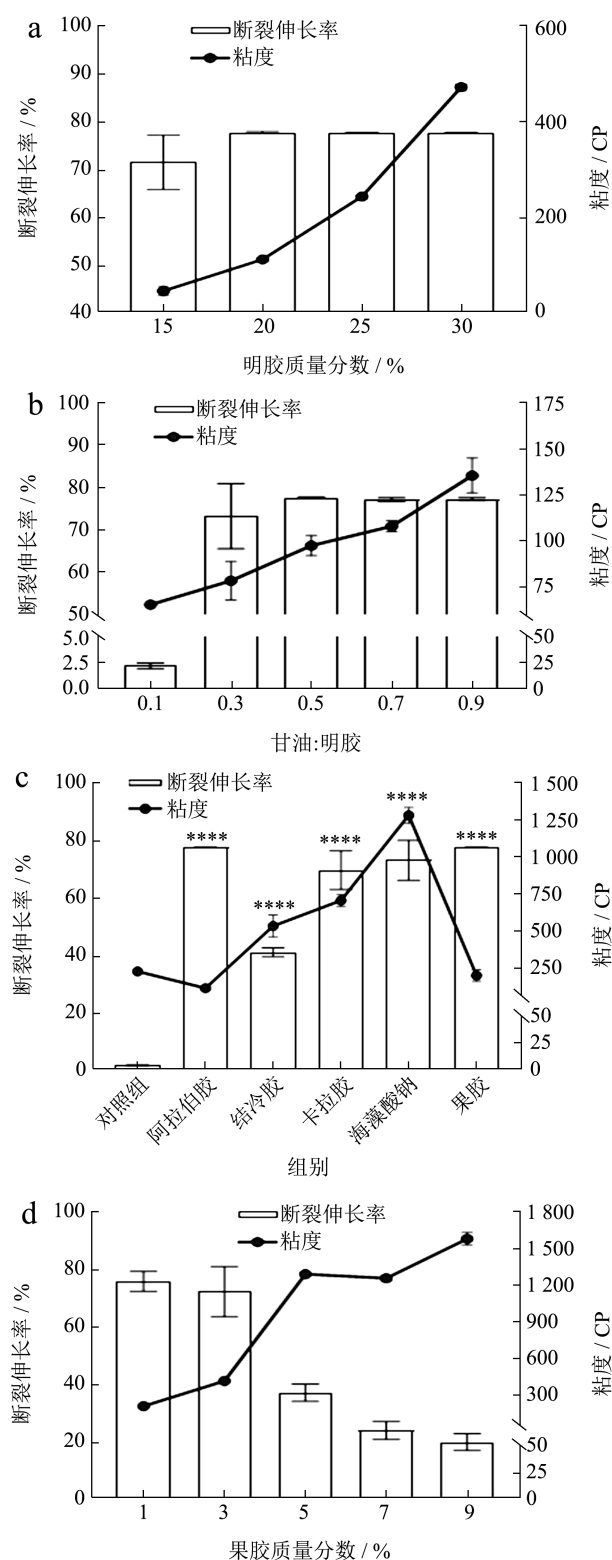


图8 晶球益生菌囊壳配方优化

Fig.8 Formulation optimization of crystal ball probiotics capsule shell

注: a表示明胶膜质量分数优化, b表示甘油添加量优化, c表示复配胶种类筛选, d表示复配胶质量分数优化。
*代表与对照组相比, 不同种类复配胶对明胶膜断裂伸长率的显著性, **** $P<0.0001$ 。

表 3 囊壳优化前后的晶球益生菌在37 °C贮藏期间的活菌数

Table 3 Viable bacteria counts of probiotic crystal ball of original shell and optimized shell at 37 °C storage period			
编号	囊壳水分/%	贮藏前活菌数/(lg CFU/g)	贮藏 2 个月 后活菌数/(lg CFU/g)
囊壳优化前晶球益生菌 (A3)	23.00 ± 1.63	9.79 ± 0.04	4.66 ± 0.09
囊壳优化后晶球益生菌 (B1)	3.45 ± 0.13	9.72 ± 0.01	8.62 ± 0.05

注：表中数据均表示为“平均值 ± 标准差”。

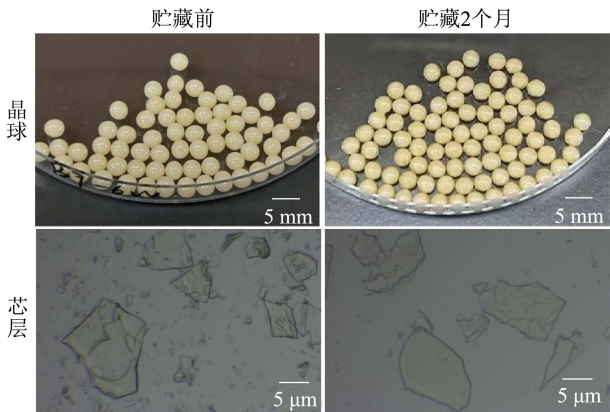


图 9 囊壳优化后的晶球益生菌 37 °C贮藏期间色泽变化情况
Fig.9 Changes of the color of probiotic crystal balls of optimized shell at 37 °C storage period

3 结论

晶球益生菌产品在短期内发生色泽褐变与菌活快速衰减，其主要原因是芯层菌粉受“如下”不良因素的影响而变质失活。当产品囊壳水分质量分数高于 14.10%时，芯层菌粉将快速吸收囊壳中的水分，诱导美拉德反应的发生而使菌粉发生褐变与菌活衰减。较高的产品贮藏温度，如高于 37 °C，将进一步加速这种色泽的褐变和菌活的衰减。该研究为降低囊壳水分且防止晶球益生菌干裂，开发了一种在极低囊壳水分下仍具有高延展性的胶皮，并且使用该胶皮成功地制备了一款晶球益生菌产品，其在 37 °C 和 65% RH 下贮藏 2 个月后色泽和菌活都保持相对稳定。

参考文献

[1] HORI T, MATSUDA K, OISHI K. Probiotics: a dietary factor to modulate the gut microbiome, host immune system, and gut-brain interaction [J]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1401.

[2] JAHANSHAHI M, MALEKI D P, BADEHHNOOSH B, et al. Anti-tumor activities of probiotics in cervical cancer [J]. Journal of Ovarian Research, 2020, 13(1): 68.

[3] SUN M Z, WU T, ZHANG G H, et al. *Lactobacillus rhamnosus* LRa05 improves lipid accumulation in mice fed with a high fat dietviaregulating the intestinal microbiota,

reducing glucose content and promoting liver carbohydrate metabolism [J]. Food & Function, 2020, 11(11): 9514-9525.

[4] HSIEH P S, HO H H, HSIEH S H, et al. *Lactobacillus salivarius* AP-32 and *Lactobacillus reuteri* GL-104 decrease glycemic levels and attenuate diabetes-mediated liver and kidney injury in db/db mice [J]. BMJ Open Diabetes Research & Care, 2020, 8(1): e001028.

[5] BALAGHI Z, AZIMA S, MOTAMEDIFAR M, et al. The effect of lactofem oral probiotic capsule on *Lactobacilli* colonization and some vaginal health parameters [J]. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2020, 85(3): 245-251.

[6] PATEL S, PATEL M S, PATEL A D, et al. Probiotic formulations: a patent landscaping using the text mining approach [J]. Current Microbiology, 2022, 79(5): 152.

[7] SIMÕES D S T M, PIAZENTIN A C M, MENDONCA C M N, et al. Buffalo milk increases viability and resistance of probiotic bacteria in dairy beverages under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(9): 7890-7897.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 后鹏飞,唐人杰,黄静,等.益生菌青稞晶球的制备及性能研究[J].食品与发酵科技,2022,58(2):95-101.

[11] 刘凯龙,姚国强,张和平.基于电流体加工技术对益生菌包封作用研究进展[J].食品与生物技术学报,2022,41(7): 24-31.

[12] KAMAGUCHI R, NAKANO O, HATANAKA H. Seamless capsule and method of its production:Japan, CA2850026A1 [P]. 2013-04-04.

[13] HUANG S, MéJEAN S, RABAH H, et al. Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of probiotics: towards maximal viability in pilot scale spray dryer [J]. Journal of Food Engineering, 2017, 196: 11-17.

[14] AHLAWAT A, BASAK S, ANANTHANARAYAN L. Formulation of a probiotic buttermilk powder using cell protectants by spray drying and estimation of its shelf-stability [J]. International Dairy Journal, 2023, 141:

- 105616.
- [15] VIVEK K, MISHRA S, PRADHAN R C. Characterization of spray dried probiotic sohiong fruit powder with *Lactobacillus plantarum* [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 117: 108699.
- [16] MASAVANG S, ROUDAUT G, CHAMPION D. Identification of complex glass transition phenomena by DSC in expanded cereal-based food extrudates: impact of plasticization by water and sucrose [J]. Journal of Food Engineering, 2019, 245: 43-52.
- [17] LI R J, LIN D Q, ROOS Y H, et al. Glass transition, structural relaxation and stability of spray-dried amorphous food solids: a review [J]. Drying Technology, 2018, 37(3): 287-300.
- [18] YANG X, YANG J, YE Z, et al. Physiologically inspired mucin coated *Escherichia coli* Nissle 1917 enhances biotherapy by regulating the pathological microenvironment to improve intestinal colonization [J]. ACS Nano, 2022, 16(3): 4041-4058.
- [19] 朱荻,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.
- [20] SARAO L K, ARORA M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 57(2): 344-371.
- [21] MIAO S, ROOS Y H. Comparison of nonenzymatic browning kinetics in spray-dried and freeze-dried carbohydrate-based food model systems [J]. Journal of Food Science, 2004, 69(7): 322-331.
- [22] ACEVEDO N, SCHEBOR C, BUERA M P. Water-solids interactions, matrix structural properties and the rate of non-enzymatic browning [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 77(4): 1108-1115.
- [23] YAN H, YU Z, LIU L. Lactose crystallization and Maillard reaction in simulated milk powder based on the change in water activity [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(11): 4956-4966.
- [24] 王梦琪.热杀菌温度控制对婴儿配方奶粉储存期内褐变的影响研究[D].天津:天津科技大学,2022.
- [25] 刘闪闪,陈丽.2018-2019年河南省市售食用植物油及油脂制品中酸价和过氧化值的测定与评价[J].应用预防医学,2021,27(3):222-224.
- [26] GB 5009.229-2016,食品安全国家标准食品中酸价的测定[S].
- [27] YADAV S, MISHRA S. Moisture sorption isotherms and storage study of spray-dried probiotic finger millet milk powder [J]. Journal of Stored Products Research, 2023, 102: 102128.
- [28] DIANAWATI D, MISHRA V, SHAH N P. Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: a Review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 56(10): 1685-1716.
- [29] HOSSAIN N, RANADHEERA C S, FANG Z, et al. Impact of encapsulating probiotics with cocoa powder on the viability of probiotics during chocolate processing, storage, and *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Journal of Food Science, 2021, 86(5): 1629-1641.
- [30] DIỆP H V P, RODKLONGTAN A, CHITPRASERT P. Whey protein isolate-lignin complexes as encapsulating agents for enhanced survival during spray drying, storage, and *in vitro* gastrointestinal passage of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 148: 111725.
- [31] Mbye M, Baig M A, Abuqamar S F, et al. Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(3): 1110-1124.
- [32] TERPOU A, PAPADAKI A, LAPPA I, et al. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value [J]. Nutrients, 2019, 11(7): 1591.
- [33] FERRANDO V, QUIBERONI A, REINHEIMER J, et al. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: a study *in vitro* of heat stress influence [J]. Food Microbiology, 2016, 54: 154-161.
- [34] 王丽媛,侯梦奇,李晓,等.4种改性方式对明胶膜性能的影响[J].食品科学,2015,36(6):40-44.
- [35] 陈丽.可食性狭鳕鱼皮明胶复合膜的制备、性质与应用研究[D].青岛:中国海洋大学,2009.
- [36] GUO J M, GE L M, LI X Y, et al. Periodate oxidation of xanthan gum and its crosslinking effects on gelatin-based edible films [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 243-250.
- [37] ZHANG X, MIAO F, NIU L, et al. Berberine carried gelatin/sodium alginate hydrogels with antibacterial and EDTA-induced detachment performances [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 181: 1039-1046.