

双乳化法包埋植物乳杆菌的工艺条件优化

刘翠, 吕嘉桡*, 杜倩茹, 楚京赢, 许双双
(陕西科技大学食品科学与工程学院, 陕西西安 710021)

摘要: 以 *Lactobacillus plantarum* 330G4 为被包埋菌株, 选用天然食品级材料为水相和油相包埋材料, 采用超声波辅助双乳化法, 通过单因素和响应面优化试验, 筛选油包水 (Water-in-oil, W/O) 和水包油包水 (Water-in-oil-in-water, W/O/W) 包埋乳液的最佳条件。结果为菜籽油、果胶和乳清蛋白是双乳化法良好的油相和水相包埋材料; 油相体积分数、乳化剂质量分数和功率对 W/O 乳液包埋率影响较大, 响应面优化制备 W/O 乳液的最佳条件为乳清蛋白质量分数 8%、菜籽油体积分数 64%、聚甘油蓖麻醇酸酯质量分数 3.30%、功率 505 W、时间 30 s; W/O 乳液体积分数、功率和时间对 W/O/W 乳液包埋率影响较大, 响应面优化制备 W/O/W 乳液的最佳条件为果胶质量分数 0.25%、W/O 乳液体积分数 16.60%、功率 75 W、时间 3 min; 被包埋菌中的活菌数 10.34 lg CFU/mL、包埋率 92.82%、稳定性 99.06%、平均粒径 10.53 μm; 与未包埋活菌数相比, 经模拟消化后活菌数提高了 7.34 lg CFU/mL; 经 50、70、90 °C 热处理 30 min 后, 活菌数分别提高了 4.17、3.20、4.58 lg CFU/mL; 经 25 °C 贮存 30 d 后, 活菌数提高了 6.05 lg CFU/mL。表明超声波辅助双乳化法包埋植物乳杆菌是提高益生菌活性的有效途径。研究结果可为其它益生菌的包埋和提高其活性提供参考, 也可开发研制新型高活性益生菌产品提供新途径。

关键词: 益生菌; *Lactobacillus plantarum*; 包埋; 超声波; 双乳化法; 抗性
文章编号: 1673-9078(2025)09-95-111 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.9.1003

Optimization of Process Conditions for *Lactobacillus plantarum* Encapsulation by Double Emulsion

LIU Cui, LYU Jiali*, DU Qianru, CHU Jingying, XU Shuangshuang

(School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: *Lactobacillus plantarum* 330G4 was encapsulated using natural food-grade materials such as water- and oil-phase materials. An ultrasound-assisted double emulsion method was combined with single-factor experiments and response surface methodology to determine the optimal conditions for preparing water-in-oil (W/O) and water-in-oil-in-water (W/O/W) encapsulated emulsions. The results revealed that rapeseed oil was an effective oil-phase encapsulating material, whereas pectin and whey protein were water-phase encapsulating materials in the double emulsion method. The volume fraction of the oil phase, mass fraction of the emulsifier, and ultrasound power strongly influenced the encapsulation rate of W/O emulsions. According to response surface optimization, the optimal conditions for W/O emulsion preparation were as follows: whey protein volume fraction of 8%, rapeseed oil volume fraction of 64%, glyceryl ricinoleate mass fraction

引文格式:

刘翠,吕嘉桡,杜倩茹,等.双乳化法包埋植物乳杆菌的工艺条件优化[J].现代食品科技,2025,41(9):95-111.

LIU Cui, LYU Jiali, DU Qianru, et al. Optimization of process conditions for *Lactobacillus plantarum* encapsulation by double emulsion [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(9): 95-111.

收稿日期: 2024-07-15; 修回日期: 2024-08-30; 接受日期: 2024-09-13
基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471225)
作者简介: 刘翠 (2001-), 女, 在读硕士, 研究方向: 食品加工, E-mail: 1353922349@qq.com
通讯作者: 吕嘉桡 (1964-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 益生菌研究与应用, E-mail: lujl@sust.edu.cn

3.30%, ultrasound power of 505 W, and reaction time of 30 s. Additionally, the volume fraction of the W/O emulsion, ultrasound power, and reaction time markedly affected the encapsulation rate of W/O/W emulsions. Based on response surface optimization, the optimal conditions for W/O/W emulsion preparation were as follows: pectin mass fraction of 0.25%, W/O emulsion volume fraction of 16.60%, ultrasound power of 75 W, and reaction of time 3 min. The viable count of the encapsulated bacteria was 10.34 lg CFU/mL. The encapsulation rate was 92.82%, stability was 99.06%, and average particle size was 10.53 μm . Compared with the viable count of unencapsulated bacteria after simulated digestion, that of encapsulated bacteria increased by 7.34 lg CFU/mL. Similarly, after heat treatment at 50, 70, and 90 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min, the numbers of viable encapsulated bacteria were 4.17, 3.20, and 4.58 lg CFU/mL higher than those of their unencapsulated counterparts, respectively. After storage at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 30 days, the number of viable bacteria increased by 6.05 lg CFU/mL because of encapsulation. Ultrasound-assisted double emulsion to encapsulate *L. plantarum* improves the activity of probiotics. These findings provide a reference for encapsulation of other probiotics and the enhancement of their activities, while also offering new directions for the development of high-activity probiotic products.

Key words: eprobiotics; *Lactobacillus plantarum*; encapsulation; ultrasound; double emulsion method; resistance

益生菌是对机体健康有促进作用的活的微生物, 其健康功效是基于益生菌活性的基础上, 但益生菌常常受到生存环境的影响而使其活性较难保持。包埋益生菌是提高益生菌活性的一条有效途径, 食用易得的包埋材料和简便易行的包埋方法是包埋益生菌需要解决的关键技术问题。目前包埋生物活性物质的方法较多, 如挤压法、乳化法、组合法、超声波法、冻干法、喷雾干燥法、静电纺丝法等。其中, 乳化法主要由两个相组成, 即分散相和连续相。分散相即水相, 含有被包埋的物质或菌体的水悬浮液, 连续相即油相, 为植物油或矿物油等^[1]。采用乳化法对益生菌进行包埋的研究鲜有报道, 赵玉萍等^[2]研究了乳化法包埋乳酸杆菌, 其中油包水 (Water-in-oil, W/O) 乳液包埋率最高为 85.11%, 水包油 (Oil-in-water, O/W) 乳液包埋率为 50%~70%, 表明 W/O 乳液效果更好。有研究者^[3,4]利用海藻酸钠与 Ca^{2+} 的交联作用, 通过外源乳化法或内源乳化法以水油两相包埋益生菌, 也有较好的效果。双乳化法是指首先通过均质内水相、油和油溶性乳化剂制备 W/O 乳液, 然后通过均质含有水溶性乳化剂的外水相溶液和 W/O 乳液制备水包油包水 (Water-in-oil-in-water, W/O/W) 乳液^[5]。双乳化法的主要优势是通过加入内水相保护益生菌免受生物和环境因素的影响, 通过中间油层将益生菌与其它水溶性成分分离, 而且油相可以限制颗粒对湿度的吸收, 有助于益生菌在储存过程中保持活力^[6]。但双乳液存在乳液不稳定、颗粒大小及形状不一等问题^[7], 有研究可以通过改变壁材的种类和浓度、乳化剂的种类和浓度、制备条件、水油比例等来控制液滴的大小

和乳液稳定性, 如秦新生^[8]通过两步乳化法制备植物乳杆菌 W/O/W 乳液, 首先搅拌油相和含有益生菌的内水相得到 W/O 乳液, 再将 W/O 乳液和外水相均质得到 W/O/W 乳液, 研究了乳化剂浓度、油相比以及外水相浓度对 W/O/W 乳液的影响, 最终得到制备 W/O/W 乳液的最佳条件, 获得的 W/O/W 乳液中包埋的益生菌体外模拟消化后, 活力几乎没有损失, 活菌数约为 7 lg CFU/mL。近年来, 超声波处理已被用于食品加工中生物活性化合物的微囊化, 使用超声波进行微囊化成本低、易规模生产, 并能够获得微米 (μm) 级分布的微胶囊^[9,10]。16~3 000 kHz 的超声频率一般适用于流体的处理, 超声波通过液体介质, 产生空化气泡, 产生强烈的剪切和机械力^[11], 导致液滴或微胶囊的形成。Porta 等^[12]通过超声波成功将嗜酸乳杆菌包埋在双乳液中, 然后用超临界乳液萃取技术制备微球, 包埋率为 80%。Pandey 等^[5]通过两步超声辅助乳化, 制备得到含有植物乳杆菌的 W/O/W 乳液, 连续消化后微囊化益生菌活菌数为 5~7 lg CFU/mL, 而游离菌全部失活。此外, 植物乳杆菌的活性在 200 s 的超声处理时间内保持稳定, 始终大于 9 lg CFU/mL, 说明采用超声波法制备微囊化益生菌是可行的。

超声波辅助双乳化法作为包埋益生菌的新方法, 与其它包埋方法相比, 条件温和, 稳定性好, 包埋材料广泛、食用、易取, 操作简便易行, 处理量大, 规模化推广应用价值高等^[5,6,8-10,12]。但目前对被包埋益生菌适用的可食用包埋材料, 以及形成稳定、包埋率高的包埋颗粒等条件尚不清楚。为此, 试验以益生菌 *Lactobacillus plantarum* 330G4 为被包

埋菌株, 选用最常用的天然食品级乳清蛋白、果胶为水相壁材, 菜籽油为油相壁材, 采用超声波辅助双乳化法, 通过单因素和响应面优化试验, 筛选制备稳定的 W/O 和 W/O/W 包埋菌体乳液的最佳条件。研究结果可为其它益生菌的包埋和提高其活性提供参考, 也可为开发研制新型高活性益生菌产品提供新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

益生菌植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 330G4 (LP330G4) 由陕西科技大学食品科学与工程学院益生菌研究与应用团队提供, 从自然发酵果蔬食品中分离。

1.1.2 试剂药品及配制

MRS 肉汤 (生物试剂), 北京奥博星生物技术有限责任公司; 戊二醛 (分析纯), 陕西普罗安蒂生物科技发展有限公司; 低聚半乳糖、果胶、乳清蛋白、聚甘油蓖麻醇酸酯、胃蛋白酶 (猪胃黏膜)、胰蛋白酶 (猪胰)、猪胆盐、SYTO9 染液、PBS 磷酸缓冲液、甲苯胺蓝等生物试剂, 上海源叶生物有限公司; 菜籽油 (食品级), 河北丝路晨光油脂有限公司。

1.2 试验仪器与设备

HC-3018R 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳仪器有限公司; LECIA DM750 光学显微镜, 德国徕卡 (Leica) 仪器有限公司; PHENOM-PRO 台式扫描电镜, 上海飞纳仪器有限公司; LSM800 激光共聚焦显微镜, 卡尔蔡司光学 (中国) 有限公司; MasterSize2000 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; SCIENTZ-II D 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; FSH-2A 匀浆机, 旭日仪器。

1.3 试验方法

1.3.1 LP330G4菌悬液的制备

在 MRS 肉汤厌氧管中接种 LP330G4 菌株, 于 37 ℃ 培养 16~18 h 后, 8 000 r/min 离心 10 min 获得菌体, 用 PBS 磷酸缓冲液洗涤 2 次后用生理盐水重悬, 制备菌浓 10¹¹ CFU/mL 的 LP330G4 菌悬液。

1.3.2 W/O乳液制备

1.3.2.1 单因素试验

按照表 1 中所列的因素和水平进行 5 因素 5 水平单因素试验。对制备的 W/O 乳液的包埋率、稳定性、平均粒径进行检测, 并在光学显微镜下进行显微表征。

表 1 W/O乳液制备单因素试验 Table 1 W/O emulsion Single-factor test	
因素	水平
内水相壁材乳清蛋白质量 分数 (%)	2、4、6、8、10
乳化剂聚甘油蓖麻醇酸酯 质量分数 (%)	1、2、3、4、5
油相体积分数 (%)	40、50、60、70、80
超声波功率 (W)	400、450、500、550、600
超声波时间 (s)	10、15、20、25、30

1.3.2.2 响应面优化

依据单因素试验结果, 选择对 W/O 乳液制备影响较大的 3 个因素, 使用 Design-Expert 11 软件进行响应面优化。使用 Box-Behnken 设计试验, 以包埋率为响应值, 对模型进行方差分析与残差分析, 并分析各因素之间的交互作用, 验证响应面最优解。

1.3.3 W/O/W乳液制备

1.3.3.1 单因素试验

按照表 2 中所列的因素和水平进行 5 因素 5 水平单因素试验。对制备的 W/O/W 乳液的包埋率、稳定性、平均粒径进行检测, 并在光学显微镜下进行显微表征。

表 2 W/O/W乳液制备单因素试验 Table 2 W/O/W emulsion Single-factor test	
因素	水平
外水相壁材果胶质量 分数 (%)	0.10、0.15、0.20、0.25、0.30
W/O 乳液体积分数 (%)	5、10、15、20、25
超声波功率 (W)	60、90、120、150、180
超声波时间 (min)	1、2、3、4、5

1.3.3.2 响应面优化

依据单因素试验结果, 选择对 W/O/W 乳液制备影响较大的 3 个因素, 使用 Design-Expert 11 软件进行响应面优化。使用 Box-Behnken 设计试验, 以包埋率为响应值, 对模型进行方差分析与残差分析, 并分析各因素之间的交互作用, 验证响应面最优解。

1.3.4 检测方法

1.3.4.1 显微表征

光学显微镜表征：取 5 μL 制备好的 W/O 或 W/O/W 乳液置于载玻片上，盖上盖玻片，光学显微镜下直接观察。

W/O/W 乳液的扫描电子显微镜表征：将制备得到的 W/O/W 乳液冷冻干燥后，真空镀金 2 min，在 10 kV 加速电压、标准束流下观察^[13]。

激光共聚焦显微镜表征：于黑暗环境中，在 LP330G4 菌悬液中加入 SYTO9 染液（1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ）染色 15 min，然后制备 W/O 乳液。设置激发波长为 488 nm，取 10 μL W/O 乳液置于载玻片上观察。

1.3.4.2 活菌数检测

参照 GB 4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验》，平板菌落计数法^[14]。

1.3.4.3 对消化液的耐受性

模拟唾液的配制^[15]：按各成分质量分数添加氯化钾 3.72%，磷酸二氢钾 0.74%，碳酸氢钠 1.36%，六水合氯化镁 0.1%，碳酸铵 0.012%，稀盐酸 0.018%，蒸馏水 94.05%，配置得到溶液 A；在 1 mmol/L 的氯化钙溶液中溶解 α -淀粉酶，配置得到溶液 B；两者混合后，得到酶活为 75 U/mL 的模拟唾液，pH 值为 7.00。

模拟胃液的配制^[16]：蒸馏水中加入 16.4 mL 稀盐酸、10 g 胃蛋白酶，定容至 1 000 mL，pH 值为 2.00。

模拟肠液的配制^[16]：用蒸馏水溶解 6.8 g 磷酸二氢钾，调节 pH 值为 6.80；另外将 10 g 胰酶和 3 g 猪胆盐用水溶解，将二者混合并定容至 1 000 mL。

模拟结肠液的配制^[15]：磷酸二氢钾质量分数 1.40%，蒸馏水质量分数 98.60%，pH 值为 7.40。

对消化液的耐受性：以游离 LP330G4 为对照，测定初始活菌数。取 5 mL 样品与模拟唾液 1:1 混合，37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 r/min 模拟消化 2 min，每隔 1 min 取样并测定活菌数；将上一步的混合物与模拟胃液 1:1 混合，37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 r/min 模拟消化 2 h，每隔 1 h 取样并测定活菌数；将上一步模拟消化结束的混合物与模拟肠液 1:1 混合，37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 r/min 模拟消化 2 h，每隔 1 h 取样并测定活菌数；将上一步模拟消化结束的混合物与模拟结肠液 1:1 混合，37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 r/min 模拟消化 2 h，每隔 1 h 取样并测定活菌数。在每个模拟消化阶段结束时，取试验组样品在光学显微镜下观察。

1.3.4.4 包埋率

乳液包埋率的测定参考 Jiang 等^[17]和 Zhang 等^[18]的方法，并做相应修改。

W/O 乳液包埋率的测定：取 2 mL W/O 乳液，14 000 r/min 离心 10 min，将下层菌体沉淀重悬，测定活菌数，记作 N_0 ；取 2 mL W/O 乳液，4 000 r/min 离心 10 min，将下层菌体沉淀重悬，测定活菌数，记作 N_1 。根据公式（1）计算乳液包埋率（Encapsulation Efficiency, EE）。

$$B = \frac{N_0 - N_1}{N_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

B ——乳液包埋率（EE），%；

N_0 ——乳液中总益生菌数，CFU/mL；

N_1 ——乳液中未被包埋的益生菌数，CFU/mL。

W/O/W 乳液包埋率的测定：取 2 mL W/O/W 乳液，14 000 r/min 离心 10 min，将下层菌体沉淀重悬，测定活菌数，记作 N_0 ；取 2 mL W/O/W 乳液，6 000 r/min 离心 10 min，将下层菌体沉淀重悬，测定活菌数，记作 N_1 。根据公式（1）计算包埋率 EE。

1.3.4.5 稳定性

W/O 乳液及 W/O/W 乳液稳定性的测定参考 Sapei 等^[19]和张娉娉等^[20]的方法，并做相应修改。将制备的 W/O 乳液或 W/O/W 乳液装入离心管，置于常温（25 $^{\circ}\text{C}$ ）24 h，测量离心管中溶液总高度，记作 H_0 ，测量离心管下层非乳液部分高度，记作 H_t 。根据公式（2）计算乳液稳定性（Stability, S）。

$$S = \frac{H_0 - H_t}{H_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

S ——乳液稳定性，%；

H_0 ——离心管中溶液总高度，cm；

H_t ——下层非乳液部分高度，cm。

1.3.4.6 平均粒径

W/O 乳液及 W/O/W 乳液平均粒径 D_{4,3} 的测定：将乳液分散在含有去离子水的容器中，“Obscuration”水平在 10%~20% 之间，搅拌速度为 2 000 r/min，使用 Malvern Mastersizer 2000 激光粒度仪测量平均粒径 D_{4,3}。

1.3.4.7 耐热性

将包埋 LP330G43 和游离 LP330G43 分别于 50、70 和 90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴，每隔 10 min 取样并测定活菌数。

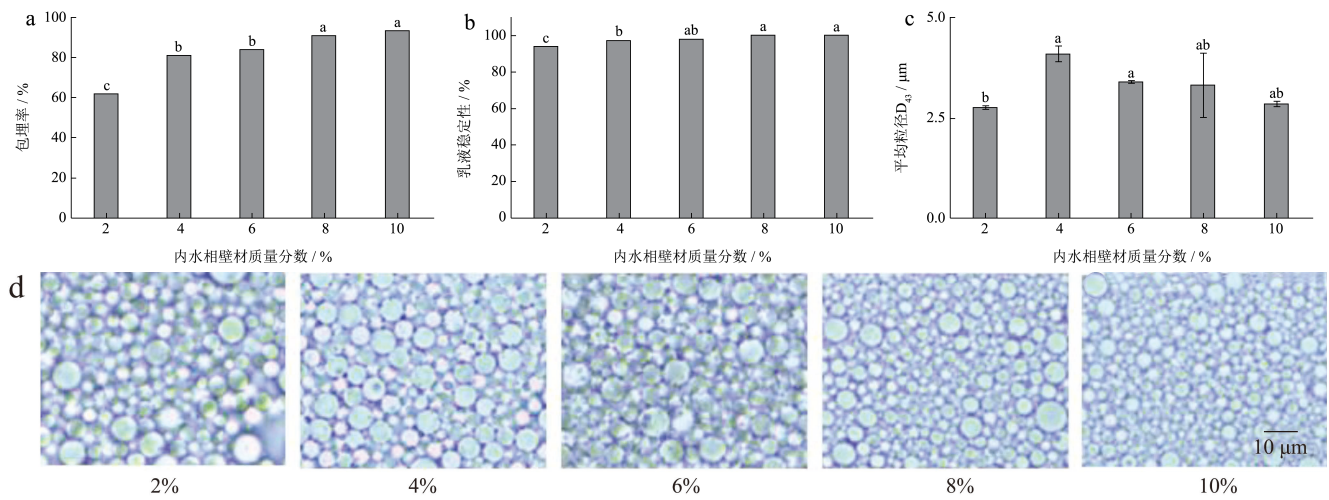


图 1 内水相壁材质量分数对 W/O 乳液的影响

Fig.1 Effect of internal aqueous phase material quality score on the properties of W/O emulsion

注:(a) 包埋率;(b) 乳液稳定性;(c) 平均粒径;(d) 光学显微镜下的形态。柱状图中不同字母表示差异显著 ($P \leq 0.05$)。
图 2~5、8~11 同。

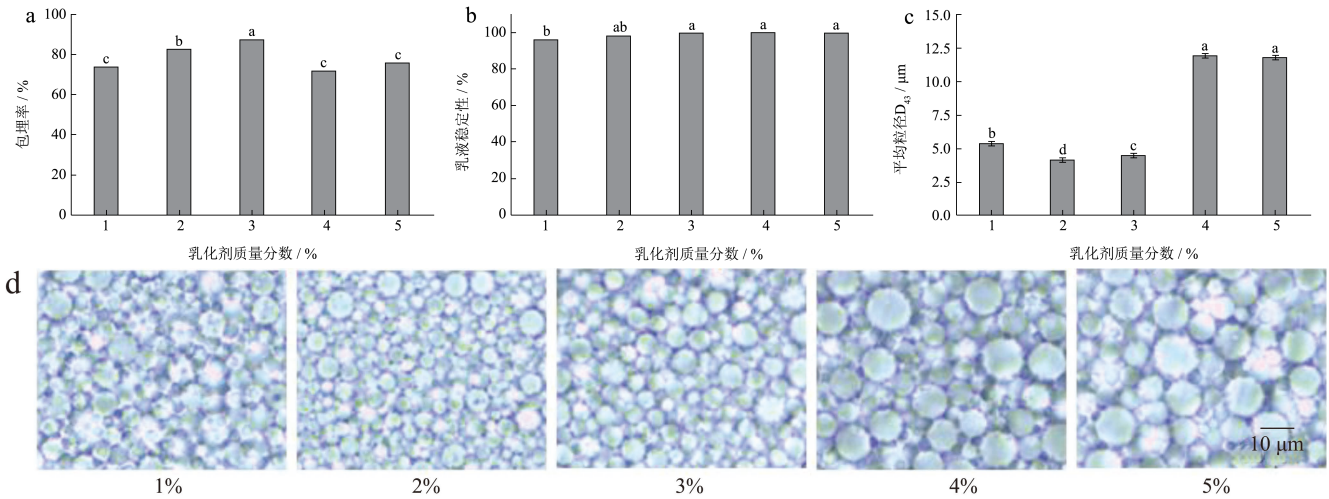


图 2 乳化剂质量分数对 W/O 乳液的影响

Fig.2 Effect of emulsifier quality fraction on the properties of W/O emulsion

1.3.4.8 贮存性

将包埋 LP330G43 和游离 LP330G43 分别置于 25 ℃, 从第 0 天开始, 每隔 5 d 取样并测定活菌数。

1.4 数据分析与处理

试验数据采用 SPSS 23 计算平均值及标准差, 在 0.05 水平上分析样品间的显著性, 用 a~g、A~D 表示; 采用 Origin 2019 绘图。响应面优化中, *** 表示 $P \leq 0.001$ 极显著, ** 表示 $P \leq 0.01$ 比较显著, * 表示 $P \leq 0.05$ 显著。

2 结果与讨论

2.1 W/O乳液制备条件

本研究将 LP330G4 菌株形成三层包埋结构, 内

层乳清蛋白为内水相壁材, 中间层菜籽油为油相壁材, 外层果胶为外水相壁材。聚甘油蓖麻醇酸酯为乳化剂。首先通过乳清蛋白、乳化剂、油相体积分数、功率、时间等单因素和响应面优化试验, 确定 W/O 乳液制备的最佳条件。

2.1.1 单因素试验结果

内水相壁材乳清蛋白质量分数对 W/O 乳液的影响结果如图 1 所示。从图中可以看出, 内水相壁材质量分数的变化对乳液包埋率有显著影响, 乳清蛋白质量分数从 2% 增加到 10% 时, W/O 乳液的包埋率从 62.05% 提高到 93.71%, 同时乳液稳定性也从 93.72% 升高到 100%。内水相壁材质量分数对乳液的平均粒径影响不大, 平均粒径始终在 2.78~4.09 μm 之间。显微表征显示, 通过超声处理后内水相和油相

形成了 W/O 乳液, 视野中可见大量液滴, 随着内水相壁材质量分数的增加, 液滴密度有所增加, 液滴大小没有显著变化。内水相乳清蛋白最佳质量分数选择为 8%。

乳化剂聚甘油蓖麻醇酸酯质量分数对 W/O 乳液特性的影响结果如图 2 所示。随着乳化剂质量分数的增加, 包埋率呈现先增大后降低的趋势, 乳化剂质量分数为 3% 时, 包埋率最高达到 87.46%; 乳液稳定性随着乳化剂质量分数的增加不断提高, 从 95.73% 显著提高到 99.56%; 平均粒径则随着乳化剂质量分数的增加呈先降后增趋势, 当乳化剂质量分数 $\leq 3\%$ 时, 平均粒径在 4.15~5.39 μm 之间, 之后平均粒径显著增大到 10 μm 以上。显微表征也显示, 乳化剂质量分数为 1% 时, 液滴大小不一, 未完全乳化; 当乳化剂质量分数为 2%、3% 时, 视野中的液滴大小适宜, 且更加均匀; 乳化剂质量分数继续增大时, 液滴明显增大。综上, 选取乳化剂质量分数 2%、3%、4% 进行响应面优化。

油相体积分数对 W/O 乳液特性的影响结果如图 3 所示。随着油相体积分数增加, 包埋率先增后降, 乳液稳定性也先增后降, 而平均粒径先降后增。油相体积分数由 40% 增加到 80% 时, 包埋率在 55.36%~89.82%, 油相体积分数为 60% 时包埋率最高。乳液稳定性在油相体积分数 50% 时达到最高 98.68%, 当油相体积分数继续增加至 80% 时, 稳定性不断下降至最低 94.10%。油相体积分数为 60% 时, 平均粒径为 3.84 μm , 油相体积分数持续增大时, 平均粒径显著增大, 这是由于体系中油相体积分数过大, 无法完全被乳化, W/O 乳液中含有大量油滴。显微表征可以看到, 乳液液滴先变小后显著变大,

油相体积分数为 80% 时液滴密度也显著降低。综上, 选取油相体积分数 50%、60%、70% 进行响应面优化。

功率对 W/O 乳液特性的影响结果如图 4 所示。随着超声功率的增加, 包埋率先增后减, 乳液稳定性没有显著变化。功率为 400 W 时, 包埋率最低为 70.98%, 平均粒径最小为 3.26 μm ; 功率为 500 W 时, 包埋率达到最高 87.68%; 功率达到 550 W 时, 包埋率开始下降, 平均粒径开始显著增大; 功率达到 600 W 时, 平均粒径达到最大 28.38 μm , 这可能是由于功率过大, 导致形成的 W/O 乳液液滴逐渐破裂。功率从 400 W 逐步增加到 600 W, 乳液稳定性始终稳定在 99.11%~100%。显微表征也可以看出, 功率为 400、450 和 500 W 时, 乳液液滴较小, 功率为 550 和 600 W 时, 视野中开始出现越来越多大液滴, 平均粒径显著增加。综上, 选取功率 450、500、550 W 进行响应面优化。

时间对 W/O 乳液特性的影响如图 5 所示。随着超声时间的增加, 包埋率和平均粒径均呈显著变化, 乳液稳定性始终稳定在 96.56%~98.18% 范围内, 没有明显变化。超声时间从 10 s 增加到 20 s 时, 包埋率从 68.30% 提高到 88.53% 再降低至 83.48%, 平均粒径从 20.97 μm 增大到 25.84 μm 然后减小至 19.26 μm ; 超声时间 25~30 s 时, 包埋率提高至 94.33%, 平均粒径降低至 2.68 μm 。这可能是由于随着时间的推进, 内水相与油相乳化程度不断增加, 形成较大液滴, 然后随着时间的增加, 继续乳化生成许多小液滴。显微表征也可以看见, 随着时间的变化, 视野中的液滴慢慢变大, 之后又明显变小且粒度更加均匀。综上, 选择时间 30 s 为最佳条件。

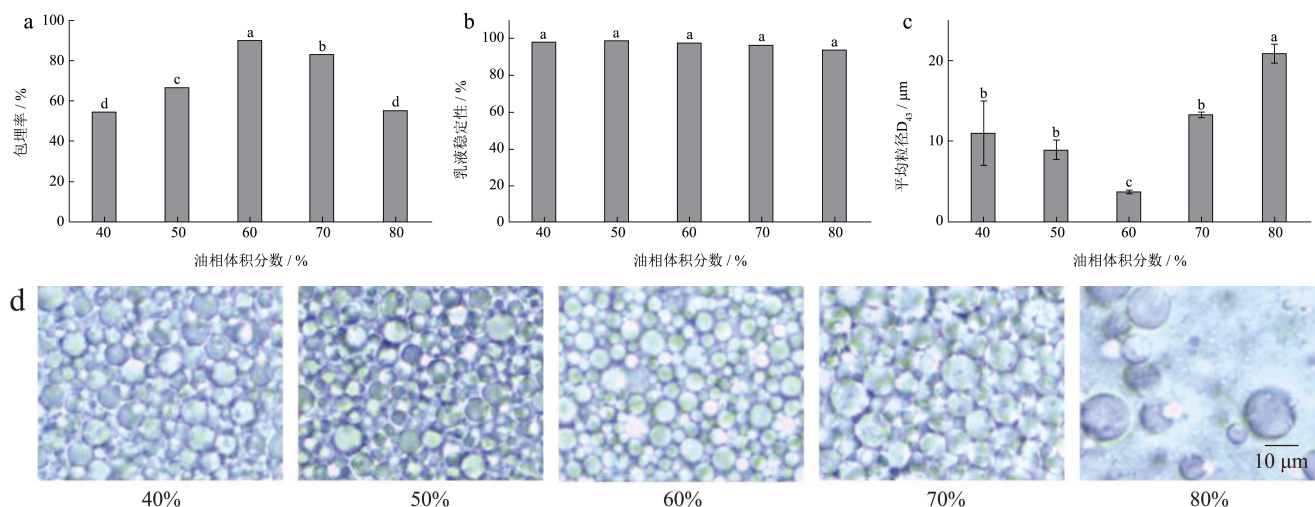


图 3 油相体积分数对 W/O 乳液的影响

Fig.3 Effect of oil phase volume fraction on the properties of W/O emulsion

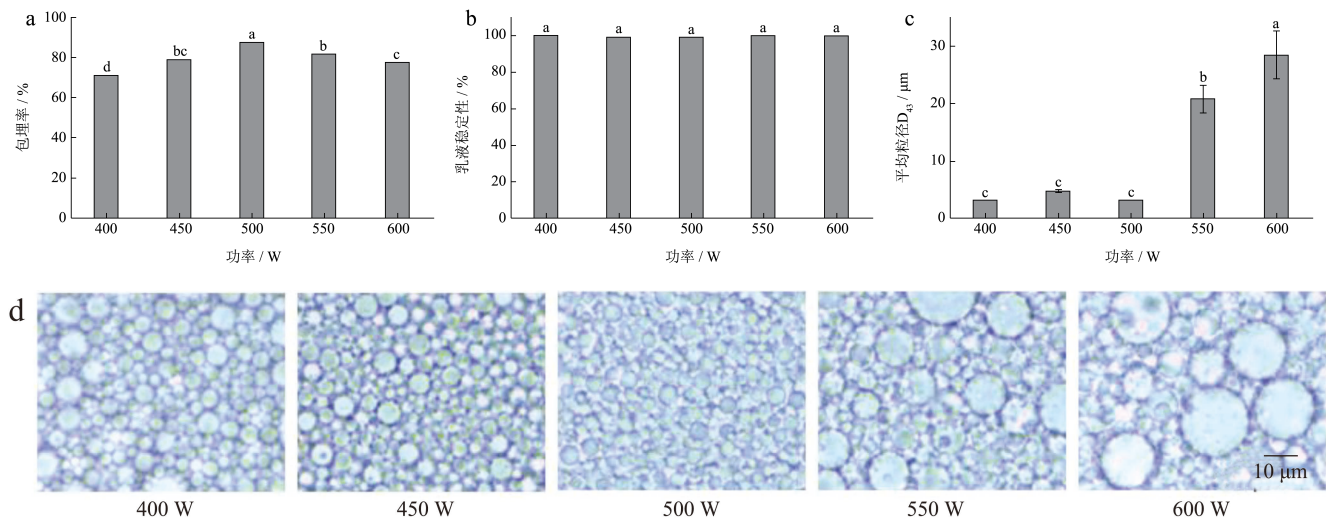


图4 功率对 W/O 乳液的影响

Fig.4 Effect of power on the properties of W/O emulsion

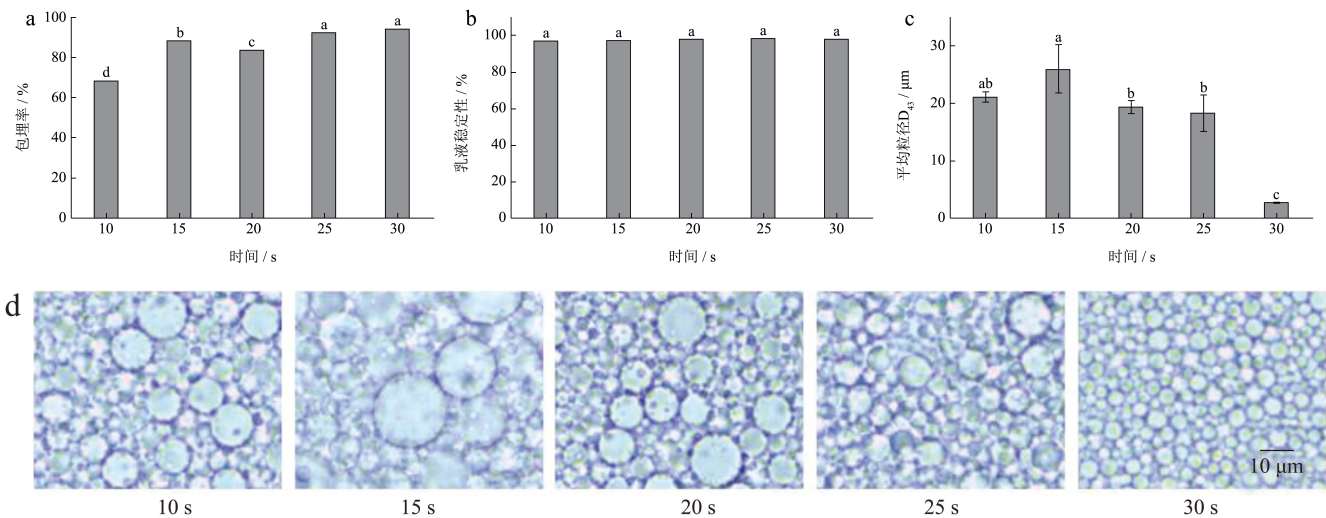


图5 时间对 W/O 乳液的影响

Fig.5 Effect of time on the properties of W/O emulsion

2.1.2 响应面优化试验结果

综合上述单因素试验结果,选择对 W/O 乳液制备过程影响比较大的 3 个因素:乳化剂质量分数 % (A)、油相体积分数 % (B)、和功率 (C),进行响应面优化。使用 Box-Behnken 设计试验,以包埋率 (Y) 为响应值,对模型进行方差分析与残差分析,并分析各因素之间的交互作用,验证响应面最优解。响应面试验结果如表 3 所示,方差分析如表 4 所示。

对表 3 中的结果进行分析,并建立数学模型,得到的回归方程为:

$$Y=91.9+5.52A+5.80B+2.53C-4.08AB-3.47AC-1.22BC-5.67A^2-5.73B^2-4.57C^2$$

由表 4 可知,建立的回归模型 F 值为 28.99, $P < 0.0001$,说明回归模型的差异极显著。失拟项的 $P > 0.05$,不显著,说明模型拟合良好。回归系数 $R^2 > 90\%$,说明回归方程拟合效果良好,可以用来描述乳化剂质量分数 % (A)、油相体积分数 % (B)、功率 W (C) 与包埋率 (Y) 之间的关系。校正系数 Adjusted R^2 为 0.9403,与回归系数 R^2 接近,说明回归方程拟合效果良好。

从表 4 可以得到, A、B 和 A^2 、 B^2 的 $P \leq 0.001$; C、AB 和 C^2 的 $P \leq 0.01$; AC 的 $P \leq 0.05$; BC 的 P 值大于 0.05。参照 F 值,可以得到三个因素对包埋率影响程度的排序为:油相体积分数 % (B) > 乳化剂质量分数 % (A) > 功率 W (C)。

表 3 响应面试验结果

Table 3 Response surface results

序号	Factor 1 A: 乳化剂 质量分数/%	Factor 2 B: 油相 体积分数/%	Factor 3 C: 功率 /W	Response Y: 包埋率 /%
1	2	50	500	63.59
2	4	50	500	83.77
3	2	70	500	83.98
4	4	70	500	87.83
5	2	60	450	69.99
6	4	60	450	87.00
7	2	60	550	81.83
8	4	60	550	84.97
9	3	50	450	71.58
10	3	70	450	85.00
11	3	50	550	79.24
12	3	70	550	87.76
13	3	60	500	93.49
14	3	60	500	89.54
15	3	60	500	90.27
16	3	60	500	94.29
17	3	60	500	88.36

表 4 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	1 088.25	9	120.92	28.99	<0.000 1	***
A	243.98	1	243.98	58.50	0.000 1	***
B	269.00	1	269.00	64.50	<0.000 1	***
C	51.16	1	51.16	12.27	0.010 0	**
AB	66.67	1	66.67	15.99	0.005 2	**
AC	48.09	1	48.09	11.53	0.011 5	*
BC	6.00	1	6.00	1.44	0.269 3	
A ²	135.48	1	135.48	32.49	0.000 7	***
B ²	138.00	1	138.00	33.09	0.000 7	***
C ²	87.94	1	87.94	21.09	0.002 5	**
残差	29.19	7	4.17			
失拟项	2.72	3	0.905 3	0.136 8	0.933 0	
纯误差	26.48	4	6.62			
总差	1 117.44	16				
R ²	0.973 9					
Adjusted R ²	0.940 3					
Predicted R ²	0.924 1					

注：* 表示 $P \leq 0.05$ 显著，** 表示 $P \leq 0.01$ 比较显著，*** 表示 $P \leq 0.001$ 极显著。

残差正态分布图、残差与预测值分布图、预测值与实际值分布图如图 6 所示。图 6a 可以看出，残差的正态概率基本分布在（2，-2）区间内，基本呈一条直线，符合正态分布，各点独立分布；图 6b 可以看出，残差与预测值基本分布在（2，-2）区间内，基本均匀分布于两侧，符合正态分布，且没有任何规律呈随机分布；图 6c 可以看出，预测值与实际值也基本呈一条直线分布，符合正态分布，且两者基本一致。说明此模型以及数据合理可靠。

响应面分析交互作用：通过响应面图及等高线图，分析乳化剂质量分数、油相体积分数和功率等的交互作用对包埋率的影响，结果如图 7 所示。从图中可以看出，乳化剂质量分数与油相体积分数的交互作用对包埋率影响最大，乳化剂质量分数与功率的交互作用对包埋率影响次之，油相体积分数与功率的交互作用对包埋率影响不显著。

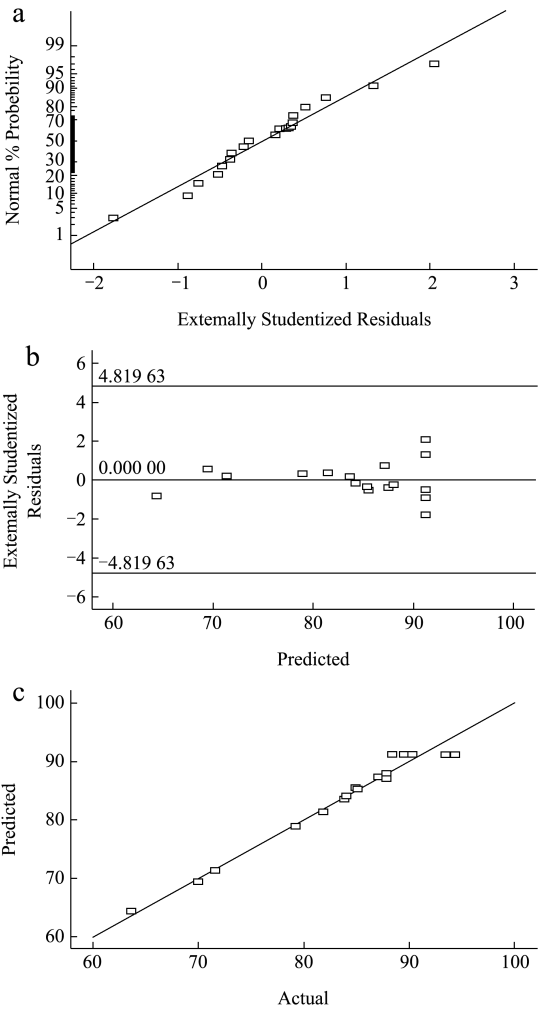


图 6 残差分析

Fig.6 Residual analysis

注：a) 残差正态分布；b) 残差与预测值；c) 预测值与实际值。

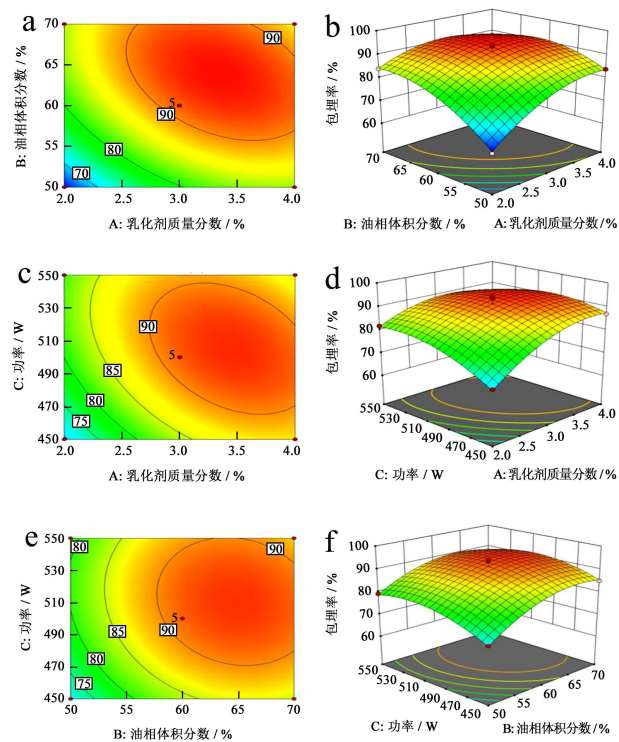


图 7 交互作用分析结果

Fig.7 Interaction analysis results

乳化剂质量分数与油相体积分数、乳化剂质量分数与功率、油相体积分数与功率对包埋率的交互作用如图 7 所示。

由图 7a、7b 可知，在功率不变的情况下，随着乳化剂质量分数和油相体积分数的提高，包埋率呈先升高后降低的趋势。响应面曲面比较陡峭，等高线呈椭圆形， $P<0.01$ ，说明乳化剂质量分数与油相体积分数的交互作用对包埋率影响比较显著。

由图 7c、7d 可知，在油相体积分数不变的情况下，随着乳化剂质量分数和功率的增加，包埋率呈先升高后降低的趋势。响应面曲面比较陡峭，等高线呈椭圆形， $P<0.05$ ，说明乳化剂质量分数与功率的交互作用对包埋率影响显著。

由图 7e、7f 可知，在乳化剂质量分数不变的情况下，随着油相体积分数和功率的增加，包埋率亦是先升高后降低的趋势。响应面曲面比较陡峭，但等高线较之前二者更接近圆形，且 $P>0.05$ ，说明油相体积分数与功率的交互作用对包埋率影响不显著。

响应面最优解验证：通过 Design-expert 11 软件得到的最佳制备条件为：乳化剂质量分数 3.32%，油相体积分数 63.38%，功率 505.29 W，此时预测包埋率为 96.80%。考虑实际条件，以乳化剂质量

分数 3.30%，油相体积分数 64%，功率 500 W 进行 3 次重复试验，包埋率分别为 93.62%、94.24%、94.86%，与预测值基本相符。

综上，通过单因素和响应面优化，W/O 乳液制备的最佳条件为：内水相壁材乳清蛋白质量分数 8%、油相体积分数 64%、乳化剂聚甘油蓖麻醇酸酯质量分数 3.30%、功率 505 W、时间 30 s。

2.2 W/O/W乳液制备条件

W/O 乳液制备的最佳条件确定后，以果胶为外水相壁材，通过单因素和响应面优化试验确定 W/O/W 乳液制备的最佳条件。

2.2.1 单因素试验结果

外水相壁材果胶质量分数对 W/O/W 乳液特性的影响结果如图 8 所示。随着外水相壁材质量分数的增加，乳液包埋率发生显著变化，在 0.25% 时包埋率最高为 87.55%；乳液稳定性随着外水相壁材质量分数的增加显著提高，壁材质量分数为 0.10% 时，乳液稳定性仅为 60.08%，当质量分数 $\geq 0.25\%$ 时，乳液稳定性保持在 97% 左右；平均粒径随着外水相壁材质量分数的增加，基本呈递减趋势，壁材质量分数为 0.15%~0.25% 时，平均粒径稳定在 13 μm 左右，壁材质量分数继续增加至 0.30% 时，平均粒径为 7.95 μm ，可能是由于质量分数增大使得外水相粘稠度增加，不利于乳液的制备。从光学显微镜表征图中可以看见液滴包液滴形态的 W/O/W 乳液液滴，壁材质量分数为 0.10% 时，液滴密度最大。因此，选择外水相壁材果胶质量分数为 0.25%。

W/O 乳液体积分数对 W/O/W 乳液特性的影响结果如图 9 所示。W/O 乳液体积分数从 5% 增加至 25%，乳液包埋率呈先升后降趋势，在 15% 时包埋率达到最高 86.72%；乳液稳定性随着 W/O 乳液体积分数的增加则没有发生显著变化，始终稳定在 90% 左右；平均粒径随着 W/O 乳液体积分数的增加也呈现先升后降趋势，W/O 乳液体积分数为 15% 时，平均粒径为 16.20 μm 。从光学显微镜表征图可以看出，随着 W/O 乳液体积分数的增加，视野中的液滴密度越来越高，W/O 乳液体积分数为 10% 及以上时，视野中可以清晰看到液滴包液滴形态，W/O 乳液体积分数为 25% 时，视野中可见所有液滴密集排列在一起。综上，选取 W/O 乳液体积分数 10%、15%、20% 进行响应面优化。

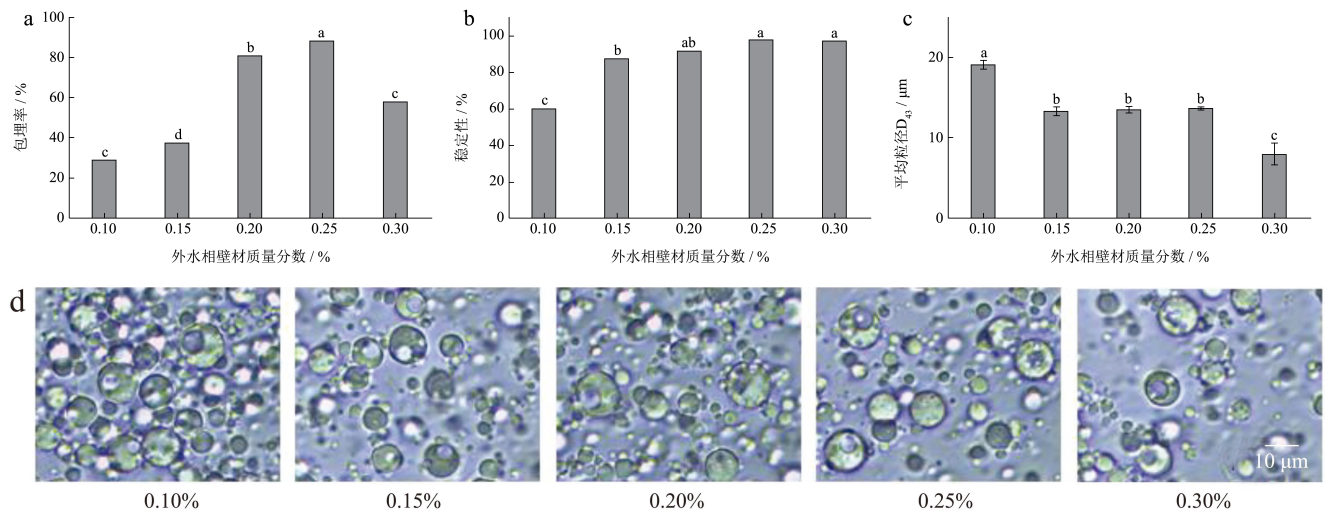


图 8 外水相壁材质量分数对 W/O/W 乳液特性的影响

Fig.8 Effect of water phase quality fraction on the properties of W/O/W emulsion

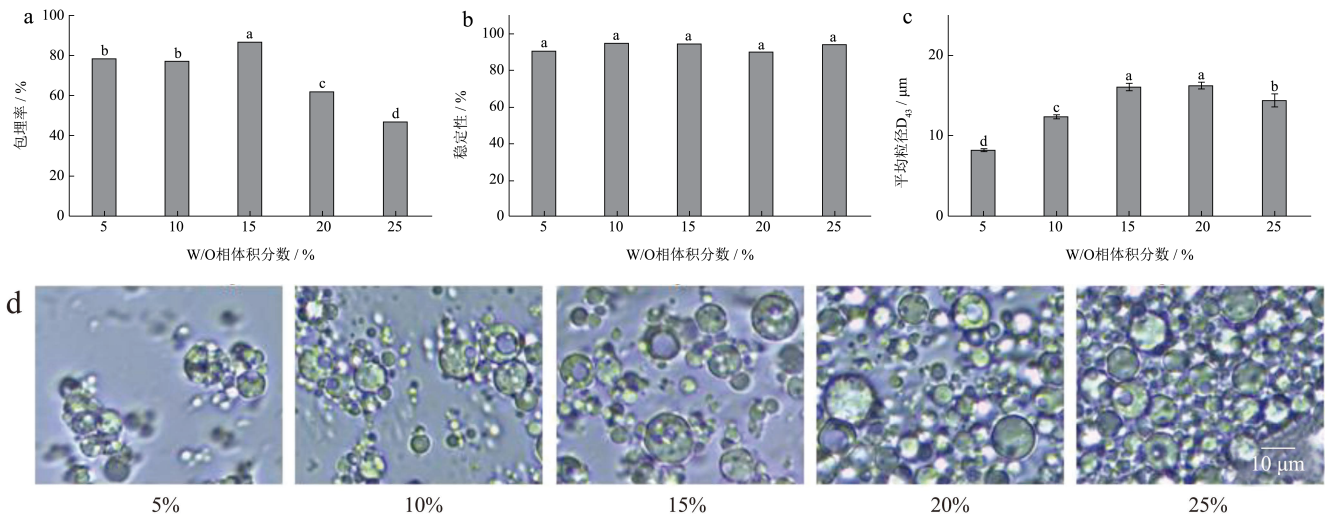


图 9 W/O 乳液体积分数对 W/O/W 乳液特性的影响

Fig.9 Effect of W/O emulsion volume fraction on the properties of W/O/W emulsion

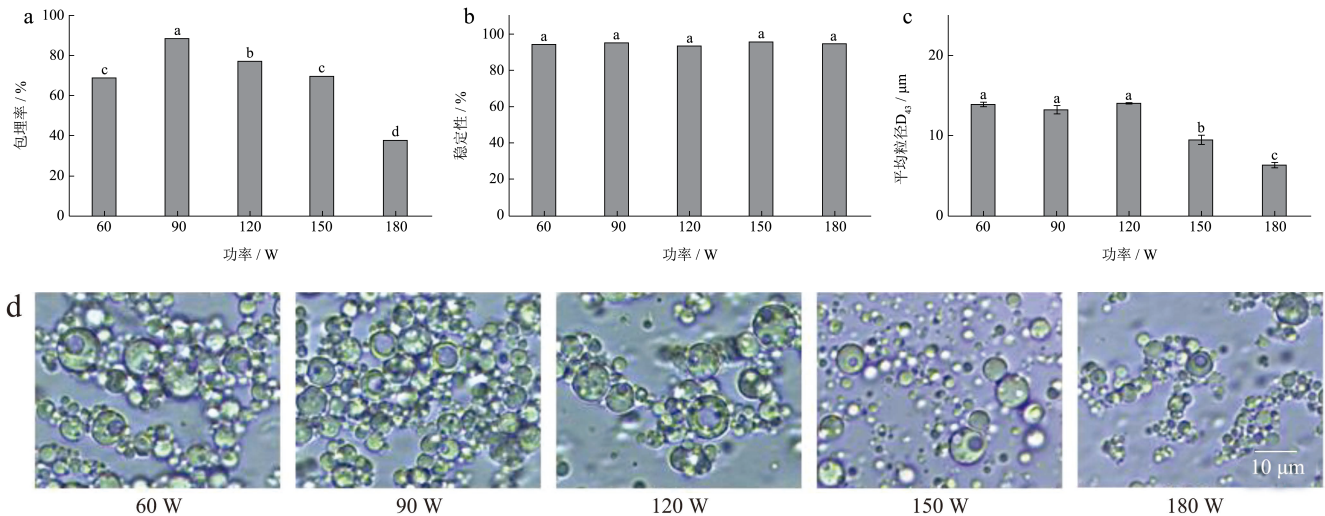


图 10 功率对 W/O/W 乳液特性的影响

Fig.10 Effect of power on the properties of W/O/W emulsion

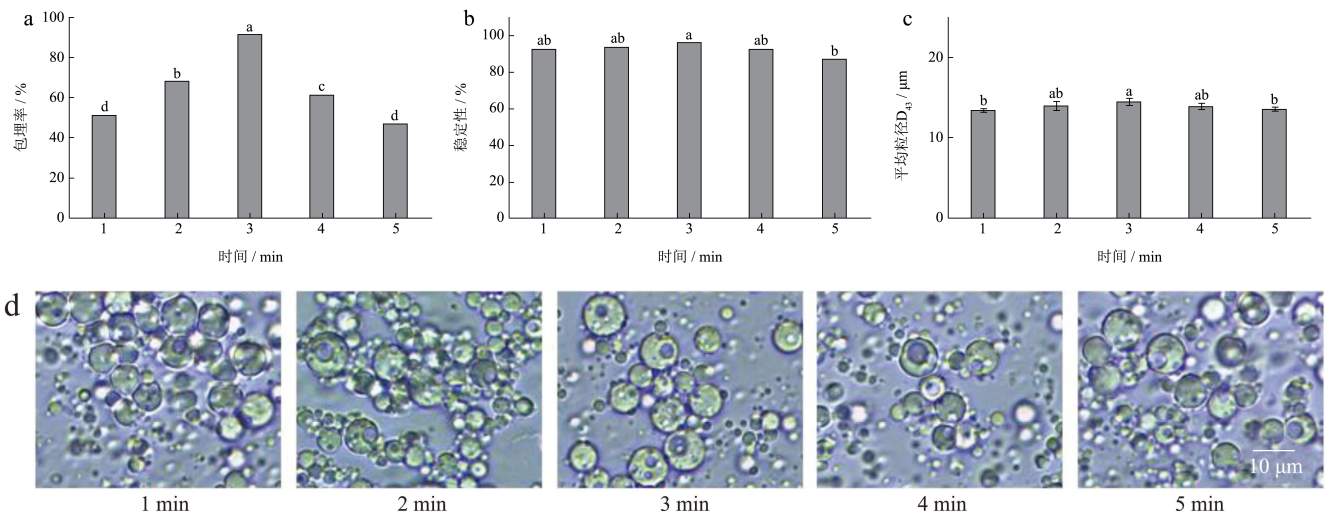


图 11 时间对 W/O/W 乳液特性的影响

Fig.11 Effect of time on the properties of W/O/W emulsion

功率对 W/O/W 乳液特性的影响结果如图 10 所示。随着功率不断增大，包埋率呈现先增后降趋势，功率为 90 W 时，包埋率最高为 88.42%，功率不断增大至 180 W 时，包埋率降低至 38.29%；功率的增大对乳液稳定性的影响并不显著，功率从 60 W 不断增大，乳液稳定性始终保持在 94% 左右；功率从 60 W 增大到 120 W 时，平均粒径并未发生显著变化，保持在 13 μm 左右，功率继续增大至 180 W 时，平均粒径仅为 6.47 μm。光学显微镜表征图中可以看出，60、90、120 W 时可以明显看到液滴包液滴形态，随着功率持续增大，液滴最终不断变小，液滴包液滴形态在视野中不断减少。综上，选取功率 60、90、120 W 进行响应面优化。

时间对 W/O/W 乳液特性的影响如图 11 所示。超声时间从 1 min 不断增加至 5 min 的过程中，乳液包埋率先增大后减小，当超声时间为 3 min 时，包埋率最高可至 91.45%，时间继续增加至 5 min 时，包埋率已降至 46.90%；同时，乳液稳定性也随着超声时间的增加呈现先增后减的趋势，超声时间为 3 min 时，稳定性最大可至 96.01%，时间继续增加至 5 min 时，稳定性已降至 87%；平均粒径随着时间的增加，呈现先增大后减小的趋势，从总体上来看，平均粒径始终在 13~15 μm 范围内。从光学显微镜表征图来看，5 个样品视野中的液滴大小没有显著变化，且均可明显看到液滴包液滴形态。综上，选取时间 2、3、4 min 进行响应面优化。

2.2.2 响应面优化试验结果

综合上述单因素试验结果，选择对 W/O/W 乳

液制备过程影响比较大的 3 个因素，W/O 相体积分数 % (A)、功率 W (B)、和时间 min (C)，进行响应面优化。使用 Box-Behnken 设计试验，以包埋率为响应值，对模型进行方差分析与残差分析，并分析各因素之间的交互作用，验证响应面最优解。响应面试验结果如表 5 所示，方差分析如表 6 所示。

表 5 响应面试验结果				
Table 5 Response surface results				
序号	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response
	A: W/O 相体积分数/%	B: 功率 /W	C: 时间 /min	Y: 包埋率 /%
1	10	60	3	69.00
2	20	60	3	86.02
3	10	120	3	72.75
4	20	120	3	65.70
5	10	90	2	60.25
6	20	90	2	76.37
7	10	90	4	70.00
8	20	90	4	75.82
9	15	60	2	73.70
10	15	120	2	69.20
11	15	60	4	84.14
12	15	120	4	70.69
13	15	90	3	92.70
14	15	90	3	89.70
15	15	90	3	89.52
16	15	90	3	86.85
17	15	90	3	93.00

对表 5 中的结果进行分析，并建立数学模型，得到的回归方程为：

$$Y=90.35+3.99A-4.31B+2.64C-6.02AB-2.58AC-2.24BC-10.40A^2-6.58B^2-9.34C^2$$

表 6 回归模型方差分析

Table 6 Regression model analysis of variance						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	1 641.72	9	182.41	28.38	0.000 1	***
A	127.28	1	127.28	19.81	0.003 0	**
B	148.95	1	148.95	23.18	0.001 9	**
C	55.81	1	55.81	8.68	0.021 5	*
AB	144.84	1	144.84	22.54	0.002 1	**
AC	26.52	1	26.52	4.13	0.081 7	
BC	20.03	1	20.03	3.12	0.120 9	
A ²	455.80	1	455.80	70.92	<0.000 1	***
B ²	182.41	1	182.41	28.38	0.001 1	**
C ²	367.27	1	367.27	57.15	0.000 1	***
残差	44.99	7	6.43			
失拟项	19.08	3	6.36	0.982 0	0.485 2	
纯误差	25.91	4	6.48			
总差	1 686.70	16				
R ²	0.973 3					
Adjusted R ²	0.939 0					
Predicted R ²	0.795 0					

注：* 表示 ($P\leq0.05$) 显著，** 表示 ($P\leq0.01$) 比较显著，*** 表示 ($P\leq0.001$) 极显著。

由表 6 可知，建立的回归模型 F 值为 28.38， $P=0.000\ 1$ ，说明回归模型的差异极显著。失拟项的 $P>0.05$ ，不显著，说明模型拟合良好。回归系数 $R^2>90\%$ ，说明回归方程拟合效果良好，可以用来描述 W/O 相体积分数 % (A)、功率 W (B)、时间 min (C) 与包埋率 % (Y) 之间的关系。校正系数 Adjusted R^2 为 0.939 0，与 R^2 接近，说明回归方程拟合效果良好。

从表 6 可以得到， A^2 、 C^2 的 $P\leq 0.001$ ；A、B、AB 以及 B^2 的 $P\leq0.01$ ；C 的 $P\leq0.05$ ；AC、BC 的 P 值大于 0.05。参照 F 值，可以得到三个因素对包埋率影响程度的排序为：功率 W (B)>W/O 相体积分数 % (A)>时间 min (C)。

残差正态分布图、残差与预测值分布图、预测值与实际值分布图如图 12 所示。图 12a 可以看

出，残差的正态概率基本分布在 (2, -2) 区间内，基本呈一条直线，符合正态分布，各点独立分布；图 12b 可以看出，残差与预测值基本分布在 (2, -2) 区间内，基本均匀分布于两侧，符合正态分布，且没有任何规律呈随机分布；图 12c 可以看出，预测值与实际值也基本呈一条直线分布，符合正态分布，且两者基本一致。说明此模型以及数据合理可靠。

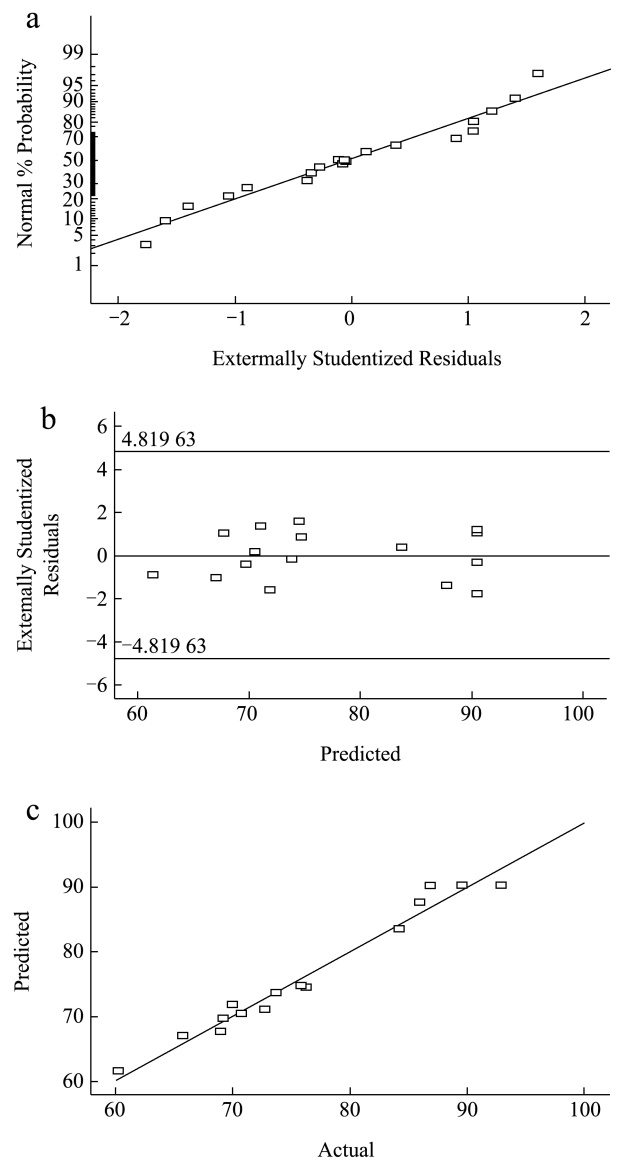


图 12 残差分析

Fig.12 Residual analysis

注：a) 残差正态分布；b) 残差与预测值；c) 预测值与实际值。

响应面分析交互作用：通过响应面图及等高线图，分析 W/O 相体积分数、功率和时间等的交互作用对包埋率的影响，结果如图 13 所示。从图中可

以看出, W/O 相体积分数与功率的交互作用对包埋率有显著影响, W/O 相体积分数与时间的交互作用、功率与时间的交互作用对包埋率均没有显著影响。

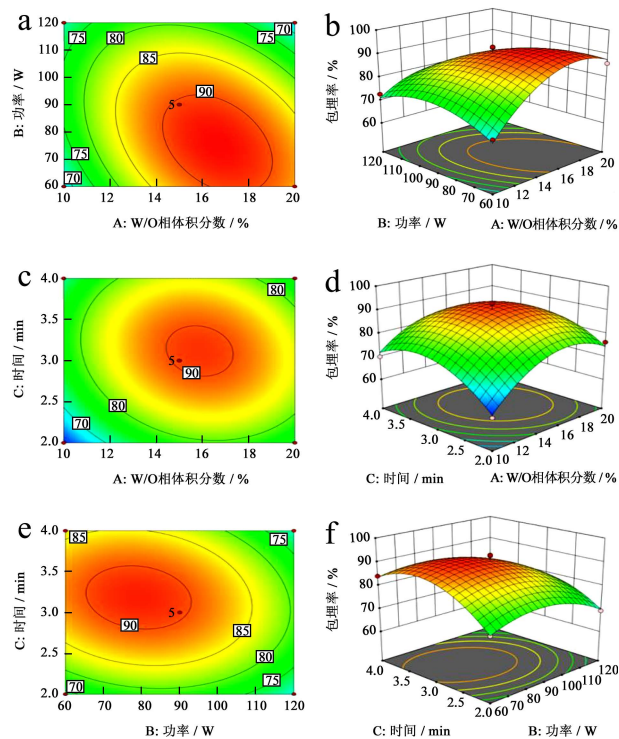


图 13 交互作用分析结果

Fig.13 Interaction analysis results

由图 13a、13b 可知, 在时间不变的情况下, 随着 W/O 相体积分数和功率的提高, 包埋率呈先升高后降低的趋势。响应面曲面比较陡, 而且等高线呈椭圆形, 平面图中心在椭圆圈内, $P<0.01$, 说明 W/O 相体积分数与功率的交互作用对包埋率影响比较显著。

由图 13c、13d 可知, 在功率不变的情况下, 随着 W/O 相体积分数和时间的增加, 包埋率呈先升高后降低的趋势。响应面曲面比较陡峭, 平面图中心在圆圈内, 但等高线较之前者接近圆形, 且 $P>0.05$, 说明 W/O 相体积分数与时间的交互作用对包埋率影响不显著。

由图 13e、13f 可知, 在 W/O 相体积分数不变的情况下, 随着功率和时间的增加, 包埋率亦是先升高后降低的趋势。响应面曲面与前者相比较缓, 平面图中心在圆圈内, 等高线较之前者接近圆形, 且 $P>0.05$, 说明功率与时间的交互作用对包埋率影响不显著。

响应面最优解验证: 通过 Design-expert 11 软件得到的最佳制备条件为: W/O 相体积分数 16.58%, 功率 75.02 W, 时间 3.16 min, 此时预测包埋率

为 92.27%。考虑实际条件, 以 W/O 相体积分数 16.60%, 功率 75 W, 时间 3 min 进行 3 次重复试验, 包埋率分别为 94.38%、92.69%、91.26%, 与预测值基本相符。

综上, 通过单因素和响应面优化, W/O/W 乳液制备的最佳条件为: 外水相壁材果胶质量分数 0.25%、W/O 相体积分数 16.60%、功率 75 W、时间 3 min。

通过确定的 W/O 和 W/O/W 乳液最佳制备条件对 LP330G4 进行包埋, 得到了稳定的 W/O/W 乳液, 即被三层包埋的 LP330G4 乳液, 其活菌数、包埋率、稳定性、平均粒径分别为 10.34 lg CFU/mL、92.82%、99.06%、10.53 μm 。而 Liang 等^[21]制备的鼠李糖乳杆菌 W/O/W 乳液活菌数为 9 lg CFU/mL, 包埋率最高为 78.49%。

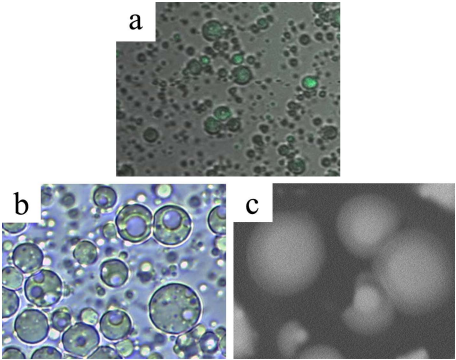


图 14 包埋 LP330G4 的显微特征

Fig.14 Microscopic characterization of microencapsulated LP330G4

注: (a) W/O 乳液在激光共聚焦显微镜下的形态; (b) W/O/W 乳液在光学显微镜下的形态; (c) W/O/W 乳液冻干样品在扫描电子显微镜下的形态。

包埋 LP330G4 的显微表征如图 14 所示, 图 14a 为 W/O 乳液在激光共聚焦显微镜下的表征图, 菌体经荧光染色后在视野中发出绿色荧光, 可以看见绿色荧光多聚集于 W/O 乳液液滴中, 说明菌体被包埋在 W/O 乳液中; 图 14b 为 W/O/W 乳液在光学显微镜下的表征图, 可以看到明显的液滴包液滴形态, 显示出三层结构, 表明制备的 W/O 乳液液滴包埋于外水相中, Xiao 等^[22]对 W/O/W 乳液显微表征结果显示菌体被包埋在乳液的微囊里; 图 14c 为 W/O/W 乳液在扫描电子显微镜下的表征图, 可见样品表面光滑, 呈圆形或椭圆形颗粒。表明双乳化法对益生菌有很好的包埋作用。

本试验研究制备的 W/O/W 乳液中被包埋的益

生菌 LP330G4 微囊为三层结构, 内层内水相为乳清蛋白菌悬液, 中间层为菜籽油乳化液, 外层外水相为果胶。益生菌在人体内发挥作用的前提是, 益生菌通过消化道后, 在宿主结肠中靶向释放量大于 $6 \lg \text{CFU/mL}$ 或 $\text{g}^{[23]}$ 。通常益生菌经过胃肠液消化后活菌数下降较快, 如一些商业益生菌在模拟胃液中仅 5 min, 活菌数下降到 $6 \lg \text{CFU/mL}$ 以下^[24]。而通过菌体外面包裹对胃肠液有耐受性的壁材, 提高其耐受性, 是提高益生菌活性的有效途径^[25]。试验中选用的内水相乳清蛋白 (Whey Protein, WP) 是从牛乳中提取的一种优质全价动物蛋白, 具有营养性、功能性、成膜性、脂肪乳化性、起泡性, 且气味温和^[26]。在活性物质定向释放到宿主体内之前, 从保护和逆转活性物质结合等方面具有广阔的应用前景^[23]。此外, 将乳清蛋白应用于乳状液体系时, 能够减少对 pH 值敏感的油滴粒子发生各种不利的生物学变化^[27]。试验中选用的外水相果胶 (Pectin, PEC) 是一种阴离子多糖, 是植物细胞壁的组成部分^[28], 果胶分子中含有大量的羟基和羧基, 使其具有良好的水溶性和电荷修饰性能, 其中羟基可以与水分子形成氢键, 从而保证果胶在水中的溶胀特性, 增加乳液体系黏度, 减缓乳液分层^[29]。将 *Lactobacillus rhamnosus* 包埋在果胶水凝胶中, 冷冻干燥后在室温下保存一个月以上, 与游离菌体相比, 保质期更长; 在胃液中 2 h 后活菌数减少了 $2.00 \lg \text{CFU/mL}$, 而游离菌减少了 $7.50 \lg \text{CFU/mL}$, 表明果胶可以提供物理屏障, 保护益生菌免受环境胁迫, 耐受性更强^[30]。此外, 果胶是结肠靶向递送口服益生菌的最有潜力的载体之一^[31]。选用的油相通过中间油层将益生菌与其它水溶性成分分离, 而且油相可以限制颗粒对湿度的吸收, 从而有助于益生菌在储存过程中保持活力^[6]。

W/O 和 W/O/W 乳液制备的单因素试验条件选择主要依据包埋颗粒平均粒径、乳液稳定性和包埋率, 一般粒径越大, 包埋率越高, 但稳定性变低; 反之粒径越小, 包埋率越低, 但稳定性变高^[1,22,23,25]。因此, 应选择包埋率高、稳定性好、包埋颗粒粒径适中的 W/O 和 W/O/W 乳液制备条件。试验结果表明, 与已有研究相比^[15,17,19,21], 包埋率提高 14.3%, 为 92.82%, 稳定性达到 99.06%。表明研究设计的超声波辅助双乳化法包埋益生菌的方法简便、包埋率高、稳定性好、条件温和、包埋材料广泛易得, 是提高益生菌活性的一条实用有效途径。

2.3 包埋LP330G4对胁迫条件的耐受性

2.3.1 对消化液的耐受性

包埋 LP330G4 对消化液的耐受性如图 15 所示。包埋和未包埋菌体的初始活菌数为 10.32 、 $10.41 \lg \text{CFU/mL}$, 在模拟唾液中消化 2 min 后, 活菌数均无显著变化, 仍保持在 $10 \lg \text{CFU/mL}$, 主要由于样品在模拟唾液中消化时间短且整个体系为中性环境。接着, 在胃液中消化 2 h, 活菌数分别下降了 0.74 、 $4.46 \lg \text{CFU/mL}$ 。Liang 等^[21]制备的鼠李糖乳杆菌 W/O/W 乳液在胃液中 2 h 后活菌数下降了 $0.96 \lg \text{CFU/mL}$, 表明包埋益生菌在模拟胃液中的存活能力更强。主要因 W/O/W 乳液中的外水相果胶不易消化, 可以抵抗胃酸。然后, 样品在肠液中继续模拟消化 2 h, 活菌数持续下降至 8.95 、 $3.65 \lg \text{CFU/mL}$ 。肠液中的胆盐和胰酶是影响益生菌活性的主要物质, 包埋有助于提高益生菌在模拟肠液中的活性^[32]。最后, 样品在模拟结肠液中消化 2 h, 活菌数分别为 8.70 、 $1.36 \lg \text{CFU/mL}$, 包埋的活菌数显著高于未包埋的活菌数。表明乳清蛋白可以提高益生菌对胃肠液的抗性^[23]。在经过模拟消化后, 包埋和未包埋活菌数分别为 8.70 、 $1.36 \lg \text{CFU/mL}$ 。

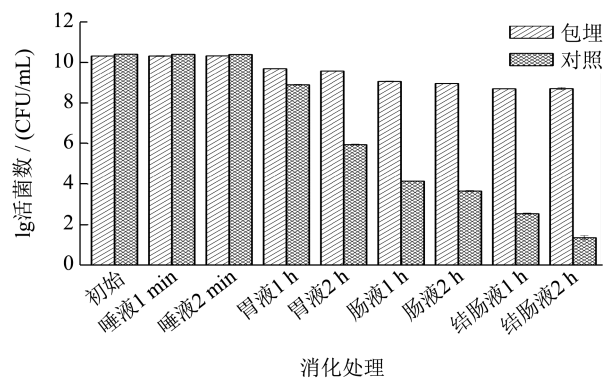


图 15 包埋 LP330G4 对消化液的耐受性

Fig.15 Tolerance of microencapsulated LP330G4 to digestive solutions

模拟消化过程中, 分别在唾液、胃液、肠液及结肠液模拟消化阶段结束时取样并在光学显微镜下观察结果如图 16 所示。在模拟唾液消化过程中基本保持其原始形态, 模拟胃液消化过程中液滴开始发生形变, 可以看到有些液滴仍能保持液滴包液滴形态, 待到模拟肠液消化时, 可以看到视野中几乎没有液滴包液滴形态, 变为单个液滴, 最终在模拟结肠液消化时, 全部为游离益生菌。可见, 制备的

W/O/W 乳液，在通过一系列模拟消化后，从外至内逐渐被消化，最终在结肠液中全部释放，之后可以定殖、增殖发挥其益生作用。

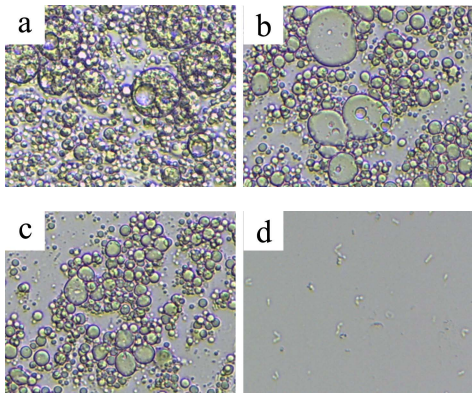


图 16 包埋 LP330G4 在消化过程中的形态变化
Fig.16 Morphology of microencapsulated LP330G4 during digestion

注：a~d 分别为样品在模拟唾液、胃液、肠液、结肠液中消化时的形态图。

2.3.2 耐热性

包埋 LP330G4 的耐热试验结果如图 17 所示。50 ℃ 时包埋和未包埋的起始活菌数分别为 10.14、10.34 lg CFU/mL，30 min 后活菌数分别为 9.57、5.40 lg CFU/mL；70 ℃ 时起始活菌数分别为 10.15、10.33 lg CFU/mL，30 min 后活菌数分别为 7.73、4.53 lg CFU/mL；90 ℃ 时起始活菌数分别为 10.19、10.38 lg CFU/mL，30 min 后活菌数分别为 5.94、1.36 lg CFU/mL。可见，包埋的耐热性更强，其活菌数显著高于未包埋 ($P<0.05$)。Beldarrain-Iznaga 等^[15]在 50、70 ℃ 以及 90 ℃ 下热处理 20 min 后，用双乳化法制备的干酪乳杆菌活菌数均从 9 lg CFU/mL 降至 6 lg CFU/mL 以下，但 9.71 lg CFU/mL 的游离菌全部失活。表明双乳化法包埋菌体后，菌的耐热性显著提高。

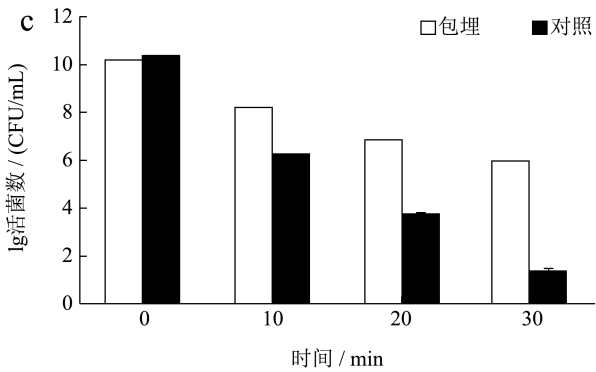
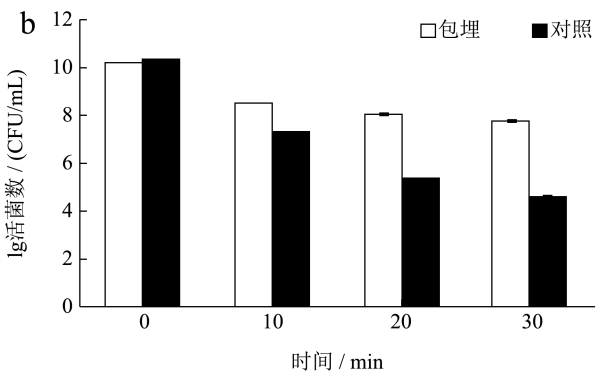
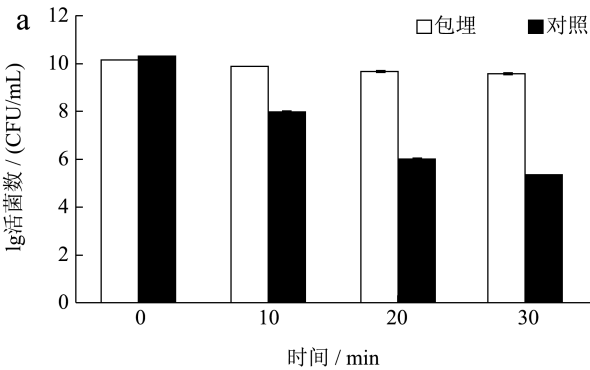


图 17 包埋 LP330G4 的耐热性
Fig.17 Heat resistance of microencapsulated LP330G4
注：(a) 50 ℃；(b) 70 ℃；(c) 90 ℃。

2.3.3 耐贮存性

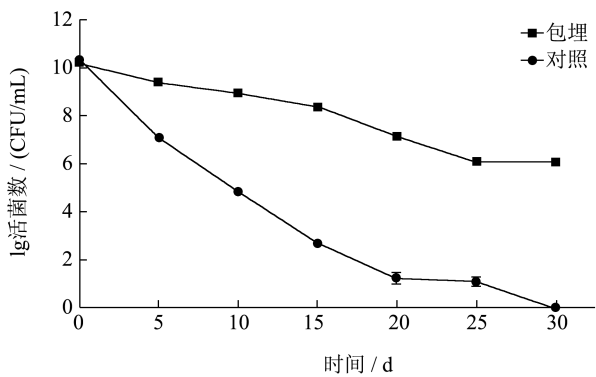


图 18 包埋 LP330G4 的贮存性
Fig.18 Storage of microencapsulated LP330G4

包埋 LP330G4 耐贮存结果如图 18 所示。包埋和未包埋起始活菌数均在 10 lg CFU/mL 以上，在 25 ℃ 贮存 30 d 试验中，随着时间变化活菌数不断下降，未包埋活菌数下降更快。第 10 天时，包埋和未包埋活菌数分别为 8.91、4.85 lg CFU/mL，未包埋活菌数已低于益生菌发挥功效的最低菌浓。第 30 天时，活菌数分别为 6.05、0 lg CFU/mL，未包埋已检测不出活菌。Liang 等^[21]在 4 ℃ 贮存 28 d

后,鼠李糖乳杆菌 W/O/W 乳液活菌数分别下降了 1.85 lg CFU/mL,对照组下降了 3.08 lg CFU/mL。表明双乳化法包埋菌体后可显著提高菌体的耐贮存性。主要由于外水相果胶和油相为包埋益生菌提供了物理屏障,将益生菌与外部不利环境隔离^[33];同时,多糖可以通过取代微生物细胞膜附近的水分子发挥保护作用,乳清蛋白在贮存过程中可以为益生菌提供营养和保护^[34]。

3 结论

益生菌活性是评价益生菌制品质量优劣的重要指标,采用超声波辅助双乳化法包埋益生菌 LP330G4 菌株,包埋体系中的内水相壁材、油相、外水相壁材均可采用食品级原料乳清蛋白、菜籽油和果胶;在内水相壁材质量分数 8%、油相体积分数 64%、乳化剂质量分数 3.30%、超声波功率 500 W、时间 30 s 的条件下,可制得稳定的 LP330G4 菌株 W/O 乳液;在外水相壁材质量分数 0.25%、W/O 相体积分数 16.60%、超声波功率 75 W、时间 3 min 的条件下,可制得 LP330G4 菌株 W/O/W 乳液,且菌体被三层包埋,效果良好;包埋 LP330G4 的活菌数达到 10.34 lg CFU/mL,包埋率达到 92.82%;与未包埋菌体相比,包埋 LP330G4 对消化液的耐受性、耐热性、贮存性均显著提高。表明超声波辅助双乳化法包埋益生菌,简便易行,活菌数高,包埋体系采用的材料均为食品级原料,可广泛应用于食品与药品领域。研究结果可为其它益生菌的包埋和提高其活性提供参考,也可为开发研制新型高活性益生菌产品提供新途径。

参考文献

- [1] MISRA S, PANDEY P, MISHRA H N. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109: 340-351.
- [2] 赵玉萍,王煨捷,杨莉.新型凹土基益生菌乳化液制备研究[J].食品与机械,2015,31(3):16-19.
- [3] 梁新晓,负婷婷,田科雄,等.内源乳化凝胶化法制备海藻酸钙微胶珠的工艺优化[J].食品科学,2014,35(12):35-40.
- [4] 常柳依,庄晶云,孟菲,等.海洋寡糖益生菌微胶囊的制备和体外评估及其对动物肠道菌群的调节作用[J].食品科学,2019,40(24):142-150.
- [5] PANDEY P, METTU S, MISHRA H N, et al. Multilayer co-encapsulation of probiotics and γ -amino butyric acid (GABA) using ultrasound for functional food applications [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2021, 146: 111432.
- [6] HU M, LIU G N, ZHANG W, et al. Co-encapsulation of (-)-epigallocatechin-3-gallate and quercetin in double emulsion hydrogel beads: Microstructures, functional properties, and digestion behaviors [J]. Food Chemistry, 2022, 373(14): 131427.
- [7] 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.
- [8] 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,2021.
- [9] LEONG T S H, MARTIN G J O, ASHOKKUMAR M. Ultrasonic encapsulation-a review [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 35: 605-614.
- [10] LEONG T S H, ZHOU M, ZHOU D, et al. The formation of double emulsions in skim milk using minimal food-grade emulsifiers-a comparison between ultrasonic and high pressure homogenisation efficiencies [J]. Journal of Food Engineering, 2018, 219: 81-92.
- [11] 谢建华,张巧芬,张桂云,等.超声对魔芋葡甘聚糖与大豆蛋白复配体系粒径与流变性的影响[J].中国粮油学报, 2021,36(4):45-50.
- [12] DELLA PORTA G, CASTALDO F, SCOGNAMIGLIO M, et al. Bacteria microencapsulation in PLGA microdevices by supercritical emulsion extraction [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2012, 63: 1-7.
- [13] 钱存柔,黄仪秀.微生物学实验教程[M].北京:北京大学出版社,2008:20-21.
- [14] GB 4789.35-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].
- [15] BELDARRAIN-IZNAGA T, VILLALOBOS-CARVAJAL R, LEIVA-VEGA J, et al. Influence of multilayer microencapsulation on the viability of *Lactobacillus casei* using a combined double emulsion and ionic gelation approach [J]. Food and Bioprocess Processing, 2020, 124: 57-71.
- [16] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:三部[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [17] JIANG Z, TIAN J, BAI X, et al. Improving probiotic survival using water-in-oil-in-water (W1/O/W2) emulsions: Role of fish oil in inner phase and sodium alginate in outer phase [J]. Food Chemistry, 2023, 417: 135889.
- [18] ZHANG Y, LIN J, ZHONG Q. The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers [J]. Food Research International, 2015, 71: 9-15.
- [19] SAPEI L, NAQVI M A, ROUSSEAU D. Stability

- and release properties of double emulsions for food applications [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27(2): 316-323.
- [20] 张婷婷,童群义.普鲁兰在喷雾干燥法制备姜油树脂微胶囊中的作用研究[J].食品工业科技,2011,1:133-136.
- [21] LIANG Z, CHU H, HOU Z, et al. W/O/W emulsions stabilized with whey protein concentrate and pectin: Effects on storage, pasteurization, and gastrointestinal viability of *Lactocaseibacillus rhamnosus* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 232: 123477.
- [22] XIAO J, LU X, HUANG Q. Double emulsion derived from kafirin nanoparticles stabilized pickering emulsion: Fabrication, microstructure, stability and *in vitro* digestion profile [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 62: 230-238.
- [23] MISRA S, PANDEY P, DALBHAGAT C G, et al. Emerging technologies and coating materials for improved probiotic in food products: A review [J]. Food and Bioprocess Technology, 2022, 15(5): 998-1039.
- [24] DODOO C C, WANG J, BASIT A W, et al. Targeted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonisation [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 530(1-2): 224-229.
- [25] YAO M, XIE J, DU H, et al. Progress in microencapsulation of probiotics: A review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(2): 857-874.
- [26] 李倩文,梁影,王晓楠,等.乳清蛋白-低聚木糖复合脂肪替代品的制备及其于再制干酪中的应用[J].食品科学, 2023,44(20):53-61.
- [27] 梁婉诗,刘欣桐,吴苇桐,等.乳清蛋白制备可食用膜的研究进展[J].中国乳品工业,2023,51(6):40-44.
- [28] PAGLIARO M, CIRIMINNA R, FIDALGO A, et al. Pectin production and global market [J]. Agro Food Industry Hi Tech, 2016, 27(5): 17-20.
- [29] 武利春,孙禹凡,康梦雪,等.苹果果胶对不同来源油体乳液稳定性和脂肪酸利用率的影响[J].中国食品学报, 2023,23(4):76-85.
- [30] LI R, ZHANG Y, POLK D B, et al. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG *in vitro* and *in vivo* by a new encapsulation system [J]. Journal of Controlled Release, 2016, 230: 79-87.
- [31] 刘健,李坚斌,韦巧艳,等.果胶基口服结肠靶向给药系统的研究进展[J].现代化工,2011,31(2):25-28.
- [32] FRAKOLAKI G, KATSOULI M, GIANNOU V, et al. Novel encapsulation approach for *Bifidobacterium* subsp. lactis (BB-12) viability enhancement through its incorporation into a double emulsion prior to the extrusion process [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2020, 130: 109671.
- [33] AL-FURAIH L Y, ABABUTAIN I M, ABD-EL-KHALEK A B, et al. Effect of different microencapsulation materials on stability of *Lactobacillus plantarum* DSM 20174 [J]. African Journal of Biotechnology, 2016, 15(24): 1207-1216.
- [34] 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): 1193-1201.