

逐层组装构建鼠李糖乳杆菌微胶囊 及其模拟消化稳定性

范炜平¹, 刘鸿科¹, 柳参², 郭新梅², 王远亮^{1*}

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128) (2. 锦乔生物科技有限公司, 江苏淮安 223005)

摘要: 为了提高鼠李糖乳杆菌的耐热性及其在消化过程中的稳定性。该文采用层层自组装 (Layer by Layer, LbL) 技术, 以玉米醇溶蛋白纳米颗粒 (Zein Nanoparticles, ZNP)、阿拉伯胶 (Gum Arabic, GA) 为壁材, 制备了四组不同层数微胶囊荷载鼠李糖乳杆菌, 将不同层数微胶囊分别命名为单层 (ZNP/GA)₁、双层 (ZNP/GA)₂、三层 (ZNP/GA)₃、四层 (ZNP/GA)₄。通过单因素实验、扫描电镜、体外模拟消化等检测方法, 分析其微胶囊结构、包埋率及胃肠耐受性。结果显示, 当玉米醇溶蛋白质量浓度 2 mg·mL⁻¹, 阿拉伯胶质量浓度 2 mg·mL⁻¹, pH 值等于 4 时微胶囊包埋效果最好, 此条件下四组微胶囊中, 包埋率顺序为: (ZNP/GA)₁>(ZNP/GA)₂>(ZNP/GA)₃>(ZNP/GA)₄, 其中 (ZNP/GA)₁ 组活菌数为 9.53 lg CFU/mL, (ZNP/GA)₄ 组活菌数仍然达到 9.18 lg CFU/mL。经体外模拟胃肠消化 6 h 后, 包埋两层的微胶囊保护性能最好, 微胶囊活菌数为 8.34 lg CFU/mL。综上, 充分说明通过层层包埋技术制备的两层 (ZNP/GA)₂ 微胶囊包埋效果良好, 能对鼠李糖乳杆菌的胃肠耐受性能起到较好的提升作用, 三层 (ZNP/GA)₃ 微胶囊对热处理有更好的耐受性。该实验为后续研究蛋白-多糖包埋益生菌提供了一定的参考价值。

关键词: 鼠李糖乳杆菌; 玉米醇溶蛋白; 阿拉伯胶; 层层组装; 体外消化

文章编号: 1673-9078(2026)2-239-246

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.2.1726

Lactobacillus rhamnosus Microcapsules: Layer-by-layer Assembly and Simulated Digestive Stability

FAN Weiping¹, LIU Hongke¹, LIU Shen², GUO Xinmei², WANG Yuanliang^{1*}

(1.College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2.Bioflag Group, Huaian 223005, China)

Abstract: This study aimed to improve the heat resistance of *Lactobacillus rhamnosus* and its stability during the digestion process. Using the layer-by-layer (LbL) assembly technique, with zein nanoparticles (ZNP) and gum arabic (GA) as wall materials, four groups of *L. rhamnosus*-containing microcapsules with varying layer numbers were prepared. The microcapsules were named as (ZNP/GA)₁ (one layer), (ZNP/GA)₂ (two layers), (ZNP/GA)₃ (three layers), and (ZNP/GA)₄ (four layers). Microcapsule structure, encapsulation efficiency, and gastrointestinal tolerance were analyzed via single-factor experiments, scanning electron microscopy, and *in vitro* simulated digestion. The results showed that the optimal microencapsulation effect was achieved with a zein concentration of 2 mg·mL⁻¹, a GA concentration of 2 mg·mL⁻¹, and a pH of 4. Under these conditions, the encapsulation efficiency

引文格式:

范炜平,刘鸿科,柳参,等.逐层组装构建鼠李糖乳杆菌微胶囊及其模拟消化稳定性[J].现代食品科技,2026,42(2):239-246.

FAN Weiping, LIU Hongke, LIU Shen, et al. *Lactobacillus rhamnosus* microcapsules: layer-by-layer assembly and simulated digestive stability [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(2): 239-246.

收稿日期: 2024-11-20; 修回日期: 2025-02-06; 接受日期: 2025-02-14

基金项目: 淮安市科技项目 (HA202310); 冷却肉解冻关键技术及产品开发 (2030); 湖南省生猪产业技术体系屠宰与加工岗位专家 (HARS-05)

作者简介: 范炜平 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 2402909865@qq.com

通讯作者: 王远亮 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: wangyuanliang@hunau.edu.cn

of the four groups of microcapsules was in the following order: $(ZNP/GA)_1 > (ZNP/GA)_2 > (ZNP/GA)_3 > (ZNP/GA)_4$. The number of viable bacteria was 9.53 lg colony-forming units [CFU]/mL in the $(ZNP/GA)_1$ group, and reached 9.18 lg CFU/mL even in the $(ZNP/GA)_4$ group. Following *in vitro* simulated gastrointestinal digestion for 6 h, the microcapsules with two layers of encapsulation demonstrated the best protection performance, with the number of viable bacteria being 8.34 lg CFU/mL. In conclusion, the present study demonstrated that two-layer $(ZNP/GA)_2$ microcapsules prepared using the LbL technique provided effective encapsulation, improving the gastrointestinal tolerance of *L. rhamnosus*, whereas the three-layer $(ZNP/GA)_3$ microcapsules showed better tolerance to heat treatment. The results of this study will facilitate subsequent research on protein-polysaccharide-encapsulated probiotics.

Key words: *Lactobacillus rhamnosus*; zein; gum arabic; layer-by-layer assembly; *in vitro* digestion

益生菌被明确定义为能够在人体肠道和生殖系统中定植的活微生物,对宿主有积极的好处^[1]。研究表明,鼠李糖乳杆菌可以抑制胃肠道病原体的生长和繁殖,改善胃肠道功能^[2]。食品口服过程,鼠李糖乳杆菌需要通过口腔、胃液,最后在小肠定植才能充分发挥作用,然而人体复杂的胃肠道环境会使细菌失去活力^[3]。但各项研究均发现,微胶囊化对益生菌在食品加工过程及通过胃肠道过程中的存活起到一定的保护作用。

在微胶囊技术中,层层组装一般以静电作用和氢键为驱动力,指带电材料吸附到基材上,洗涤后,带相反电荷的材料被吸附在第一层的顶部的循环过程。这构成了一个厚度通常在纳米级的单双层,然后可以交替沉积,直到组装出最适合封装厚度的多层膜^[4]。如,Huang等^[5]制备了负载虾青素 LbL 微胶囊,提高了虾青素的生物可及性。Gao等^[6]通过 LbL 技术将木犀草素包埋,显著提高了木犀草素的热储存稳定性。鲜有研究来增强益生菌在食品生产、储存、运输和胃肠道消化过程中对不同环境压力的生存能力^[7]。

玉米醇溶蛋白是玉米中的主要储存蛋白,由于其独特的疏水性和自组装特性,玉米醇溶蛋白通常在水中以一定的搅拌速率形成均匀的球形纳米颗粒^[8]。本文引入反溶剂法制备玉米醇溶蛋白纳米颗粒后,再制备 LbL 微胶囊对鼠李糖乳杆菌进行包埋。然而玉米醇溶蛋白纳米颗粒在某些环境下不太稳定,相关研究指出酪蛋白酸钠^[9]、海藻酸盐、阿拉伯胶、果胶^[10]、壳聚糖、大豆多糖^[11]等可以作为稳定剂与玉米醇溶蛋白交联,以提高玉米醇溶蛋白纳米颗粒的稳定性^[12]。据报道,向玉米醇溶蛋白纳米颗粒中添加阿拉伯胶可显著提高其对 pH 值变化(2.0~8.0 范围内)的稳定性^[13]。本文选择玉米醇溶蛋白和阿拉伯胶作为 LbL 微胶囊组装材料,研究了不同条件下微胶囊的包埋率,通过考察热处理和模拟消化过程中 LbL 组装微胶囊中鼠李糖乳杆菌的存活率,评价玉米醇溶蛋白/阿拉伯胶层层包埋微胶囊在益生菌保护方面的潜力。以期制备具

有胃肠保护功能的益生菌微胶囊提供新思路,拓宽益生菌在食品领域的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鼠李糖乳杆菌 LK-A19,由湖南农业大学食品科学技术学院提供;玉米醇溶蛋白(Zein),北京索莱宝科技有限公司;阿拉伯胶,国药集团化学试剂有限公司;MRS 培养基,广东环凯微生物科技有限公司;胃黏膜胃蛋白酶、猪胰腺胰酶、猪胆盐,美国 sigma 化学公司。

1.2 仪器与设备

RE-52 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;LMQ.C 高压蒸汽灭菌锅,山东新华医疗器械有限公司;恒温培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;DZKW-S-8 电热恒温水浴锅,北京市永光明医疗仪器有限公司;TGL-20M 冷冻离心机,长沙英泰仪器有限公司;JSM-6380LV 扫描电子显微镜,日本电子株式会社;冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 鼠李糖乳杆菌活化

将一管 -80 °C 条件下保藏的鼠李糖乳杆菌菌种加入无菌 MRS 肉汤培养基中,再于 37 °C 培养箱中培养 24 h,并连续活化 2 次。菌液在 3 000 r·min⁻¹、4 °C 条件下离心 10 min,收集沉淀物,随后无菌生理盐水溶液清洗 2 次备用。最后将沉淀物用生理盐水按梯度稀释成菌落数约 10⁹ CFU/mL 菌液,置于 4 °C 冰箱保藏,用于微胶囊制作过程及后续对菌的活力进行检测。

1.3.2 微胶囊壁材单因素试验

考察了热处理过程中玉米醇溶蛋白纳米颗粒对鼠李糖乳杆菌活性的影响,进行单因素试验评估 ZNP 质量浓度、GA 质量浓度及 pH 值对微胶囊中鼠李糖乳杆菌活菌数的影响。

1.3.3 壁材溶液的制备

玉米醇溶蛋白纳米颗粒溶液的制备：参照 Campos 等^[14]描述的方法，稍作改动。400 mg 玉米醇溶蛋白溶于 20 mL 体积分数 75% 乙醇水溶液，室温下磁力搅拌器搅拌 30 min 后于 4 °C 条件下静置 24 h 得到玉米醇溶蛋白溶解液。然后将玉米醇溶蛋白溶解液加入 180 mL 去离子水中继续 500 r·min⁻¹ 搅拌 10 min。之后于 45 °C 旋蒸 30 min 除去乙醇，用超纯水补充至原体积进行定容。最终得到质量浓度为 2 mg·mL⁻¹ ZNP，置于 4 °C 冰箱保存备用。

阿拉伯胶溶液的制备：称取一定量的阿拉伯胶溶于 200 mL 超纯水中搅拌至完全溶解，80 °C 水浴 5 min 灭菌。

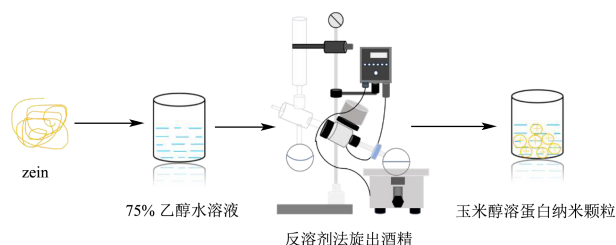


图 1 玉米醇溶蛋白纳米颗粒制备流程图

Fig.1 Flow chart of preparation of Zein nanoparticles

1.3.4 微胶囊制备流程

考虑到阿拉伯胶的 pKa 值和玉米醇溶蛋白的 pI 值，所有环节在 pH 值等于 4 的条件下进行，1 mL (约 9.85 lg CFU/mL) 细菌悬浮液与 9 mL ZNP 在室温下混合 15 min。然后将混合物 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，用超纯水洗涤两次以去除过量的 ZNP，并将样品命名为 (ZNP/GA)₁ 具有单涂层。之后，在室温下向沉淀物中加入 10 mL 阿拉伯胶溶液，混匀后静置 15 min，将混合物 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，用超纯水洗涤两次以除去过量的阿拉伯胶溶液，并将样品命名为 (ZNP/GA)₂ 具有双涂层。重复此过程，直到四层微胶囊准备好。无涂层的鼠李乳杆菌被命名为裸菌。将这些湿微胶囊 4 °C 储存用于进一步实验。

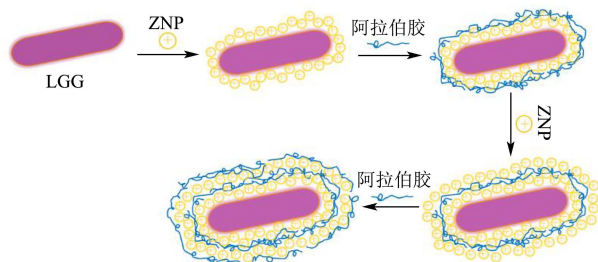


图 2 自组装微胶囊的形成过程

Fig.2 The formation process of layer-by-layer self-assembly microcapsules

1.3.5 封装效率

包埋效率使用先前报道的方法^[15]。将 1 mL 微胶囊与 9 mL 无菌 PBS (pH 值 7.2) 溶液混合，以 10 000 r·min⁻¹ 匀浆 1 min，然后在旋转振荡器中轻轻摇动 20 min 以完全释放微胶囊中的细菌。在生理盐水中连续稀释，37 °C 下 MRS 琼脂上培养 48 h，计算活菌数。微胶囊包埋率 (Encapsulation Efficiency, EE) 根据公式 (1) 计算。

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

式中：

B——微胶囊包埋率 (EE)，%；

N——微胶囊中释放的活菌数，CFU/mL；

N₀——微胶囊化前加入的活菌数，CFU/mL。

1.3.6 平均粒径及Zeta电位的测量

用纳米粒度仪在 25 °C 下测量鼠李糖乳杆菌及不同层数微胶囊的平均粒径和 Zeta 电位。每个样品测量三次，结果用平均值 ± 标准差表示。

1.3.7 微胶囊形态

通过扫描电子显微镜 (SEM) 观察冷冻干燥后样品的形态。将干燥的样品用导电胶固定在样品台上后喷金，并在 20 kV 的加速电压和放大倍数 (×5 000、×15 000) 下观察样品微观结构。

1.3.8 耐热性试验

为了测定鼠李糖乳杆菌微胶囊的耐热性能，根据 Xiao 等^[16]描述进行了热稳定性试验。在试管中加入包埋层数分别为 1、2、3、4 的冻干微胶囊或 1 mL 裸菌悬浮液，加入 10 mL 无菌水，分别在 65 °C 下水浴 10 min 和 30 min。水浴后放入冰水中快速冷却，然后用平板计数法对活菌进行计数。

1.3.9 模拟体外消化试验

体外消化实验是根据 Liu 等^[17]描述进行的，并进行了一定修改。模拟胃液由质量分数 0.32% 胃蛋白酶和质量分数 0.2% NaCl 组成，使用 1 mol·L⁻¹ HCl 将 pH 值调节至 2.0。模拟肠液由质量分数 0.1% 胰蛋白酶和质量分数 0.08% 胆盐在磷酸钠缓冲液 (0.2 mol·L⁻¹, pH 值 7.0) 中制备组成，使用 1 mol·L⁻¹ NaOH 调节至 pH 值 6.8。将封装好的细菌或游离细菌 (1 mL) 加入含有 9 mL 模拟胃液的试管中，在 37 °C 振荡培养箱中以 150 r·min⁻¹ 振动进行模拟胃消化，并分别在 0、60 和 120 min 取样。胃消化后，迅速加入 10 mL 模拟肠液，继续 37 °C 振荡培养箱中进行模拟小肠消化，分别在 60、120、180 和 240 min 取样。将消化后的样品以 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 以去除胃液或肠液。每个样品

用质量分数 0.9% 生理盐水稀释后, 在 37 °C 下 MRS 琼脂上培养 48 h 进行计数。

1.3.10 统计分析

所有实验重复 3 次, 以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示结果。采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计、方差分析 (ANOVA) 及显著性分析 ($P < 0.05$), 使用软件 Origin 2024 进行作图。

2 结果与分析

2.1 玉米醇溶蛋白基材料热处理对鼠李糖乳杆菌活性的影响

研究表明, 在许多食品加工过程中需要经历升温过程, 所以提高益生菌耐热性能至关重要^[18]。为了发挥益生功效, 口服益生菌的活菌数应大于 7 lg CFU/mL。蛋白基材料负载鼠李糖乳杆菌后在 80 °C 水浴孵育 300 s 过程中活菌数的变化情况如图 3 所示。60 s 后热处理后, 活菌数出现显著变化, 整体呈下降趋势。热处理 300 s 后, 载有玉米醇溶蛋白的鼠李糖乳杆菌活菌数数量最低为 5.20 lg CFU/mL; 而纯水组在热处理 300 s 后, 鼠李糖乳杆菌基本全部死亡。因此, 在短时间、高温的条件下, 负载玉米醇溶蛋白对鼠李糖乳杆菌有很好的保护作用。Qi 等^[19]通过内源乳化法对益生菌进行微胶囊化, 结果表明, 海藻酸钠的存在提高了益生菌在高温条件下的存活率。结果均表明壁材对益生菌热处理存活率具有提高效果。

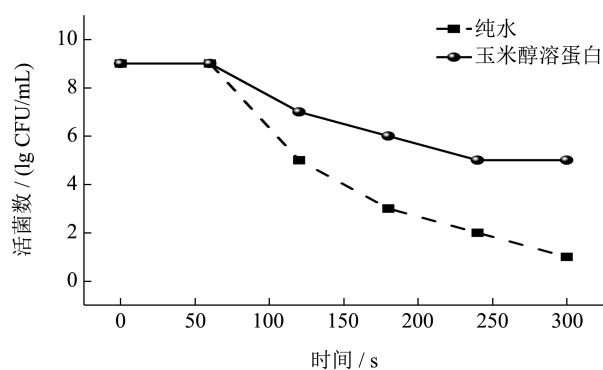


图 3 80 °C 热处理玉米醇溶蛋白和纯水对活菌数的影响

Fig.3 Effect of heat treatment of Zein and pure water at 80 °C on the number of viable bacteria

2.2 鼠李糖乳杆菌微胶囊壁材优化

2.2.1 蛋白质量浓度的确定

玉米醇溶蛋白形成纳米颗粒, 通过氢键和静电相互作用吸附在鼠李糖乳杆菌上对菌进行包埋^[20]。其中玉米醇溶蛋白溶液质量浓度的改变会影响静电相互作用强度, 从而影响微胶囊的包埋效果^[21]。如图 4a 所示,

当 Zein 质量浓度小于 2 mg·mL⁻¹ 时, 随着 Zein 质量浓度的增加, 益生菌的包埋率升高; 当 Zein 质量浓度到 2 mg·mL⁻¹ 时, 包埋率达到最大值为 86.06%, 分析可能是蛋白质和菌之间的静电引力作用增强, 菌的表面上吸附更多的蛋白分子, 进一步提高了微胶囊的保护能力; 而当 Zein 质量浓度大于 2 mg·mL⁻¹ 时, 包埋率开始随着质量浓度增高而降低, 可能是过多的蛋白质之间形成静电斥力, 破坏原有的蛋白与菌之间的静电引力, 导致微胶囊体系不稳定, 降低了微胶囊的保护能力。

2.2.2 多糖质量浓度的确定

许多研究结果证实, 添加阿拉伯胶通过沉积带负电荷的层可以显著降低玉米醇溶蛋白纳米颗粒的不稳定性现象^[22]。GA 带负电荷, ZNP 带正电荷, ZNP 和 GA 通过静电相互作用形成了稳定结构, 带负电荷的 GA 通过静电和空间排斥稳定了 ZNP, 阻止了 ZNP 的沉淀。如图 4b 所示, 在 pH 值等于 4 时, 阿拉伯胶质量浓度为 2 mg·mL⁻¹ 可以得到包埋率最高的微胶囊。在阿拉伯胶质量浓度较低时, Zeta 电位较高, 溶液稳定性非常低, ZNP 并不能吸附在菌的表面进行包埋; 而在阿拉伯胶质量浓度等于 2 mg·mL⁻¹ 时, 粒子表面电荷可能达到饱和, 形成稳定的静电排斥机制, 这使得菌能较好的被 ZNP 包覆在其中, 包埋率达到 89.77%; 当阿拉伯胶质量浓度继续增大时, 带负电荷的多糖分子增多, 多糖分子之间桥接作用会导致颗粒絮凝, 从而影响微胶囊的分散性, 使得检测包埋率时菌不能及时被释放, 从而包埋率随之降低。该研究结果与 Li 等^[23]对玉米醇溶蛋白纳米颗粒 - 阿拉伯胶相互作用力及质量比稳定性的研究一致。

2.2.3 pH 值的确定

研究表明, ZNP 受 pH 值影响较大, 在等电点附近容易絮凝形成沉淀, 同时 ZNP 与阿拉伯胶静电相互作用强度也受 pH 值的影响, 所以在微胶囊形成过程中控制 pH 值的大小尤为重要^[24]。因此研究了 pH 值变化过程对益生菌微胶囊的包埋率的影响, 结果如图 4c 所示。pH 值的变化对微胶囊包埋率具有显著影响, pH 值小于 4 时, pH 值的升高使得包埋率也随之上升, 分析是由于 pH 值过低不利于鼠李糖乳杆菌的存活^[25], 进行包埋的过程中细菌本身由于不耐受低 pH 值有部分已死亡, 导致包埋率低; 当 pH 值为 4 时, 包埋率达到最高点为 84.07%, pH 值大于 4 时, 包埋率随着 pH 值增大越来越小, 尤其 pH 值为 7 时, 包埋率低至 35.15%, 分析可能是因为玉米醇溶蛋白等电点为 6.2, 在 pH 值等于 7 时, 蛋白几乎全部絮凝沉淀与 Liu 等^[7]研究相符合, 菌无法被包裹住或包裹后无法释放。

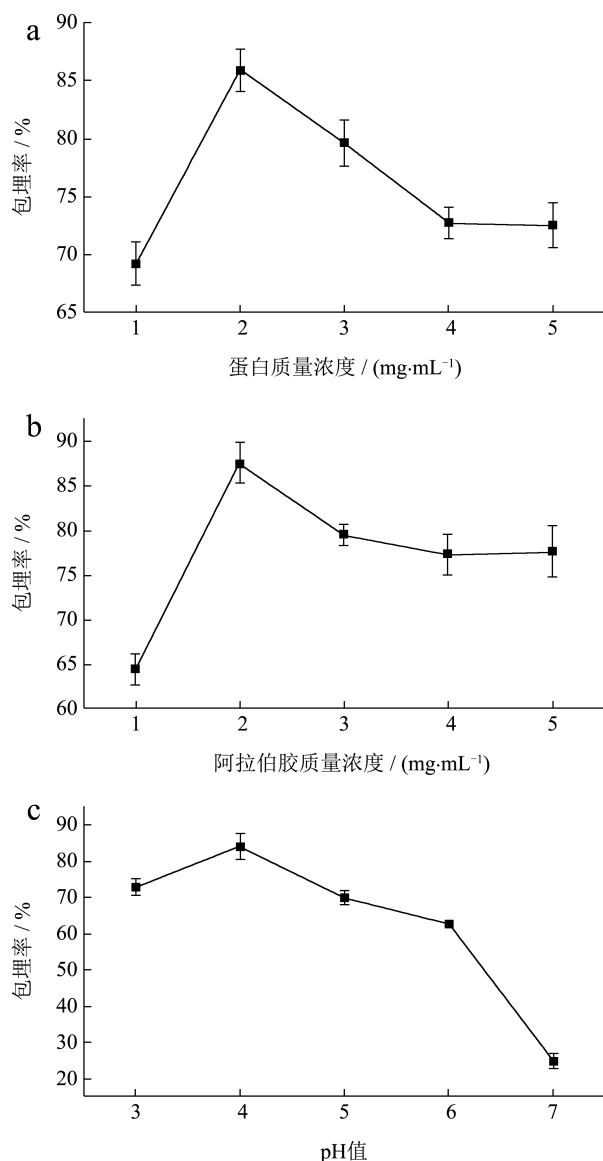


图4 各因素对微胶囊包埋率的影响

Fig.4 Effects of various factors on the encapsulation efficiency of microcapsules

2.3 Zeta电位及粒径

在LbL组装过程中,每一层的吸附都可以被表面电荷反转所描述,通常认为Zeta电位绝对值在30 mV附近粒子体系是稳定的^[26]。如图5a所示,在pH值等于4时,游离鼠李糖乳杆菌的Zeta电位为-15.1 mV,这可能归因于鼠李糖乳杆菌是一种革兰氏阳性细菌,细胞壁上含有磷壁酸基团。ZNP在细菌表面沉积后,(ZNP/GA)₁的Zeta电位变为29.9 mV,表明带负电荷的细菌和带正电荷的ZNP产生了静电相互作用。随着阿拉伯胶作为第二层壁材,继续在微胶囊表面沉积,(ZNP/GA)₂的Zeta电位变为-18.80 mV,这是因为阿拉伯胶作为阴离子多糖,在pH值为4时带负电荷,与微胶囊表面带正电荷的ZNP结合导致微胶

囊表面电荷发生转变。随后从3~4层沉积时Zeta电位正负发生转变表明ZNP和果胶成功层层吸附在细胞表面。在第四层时Zeta电位为-36.2 mV,说明整个微胶囊体系较为稳定。如图5b所示,利用反溶剂法去除乙醇后制备的ZNP粒径为92.68 nm,与Gali等^[12]制备的ZNP粒径大小一致,此情况下纳米粒子不会聚集沉淀,在整个微胶囊包埋过程能与细菌表面形成稳定的静电作用力,纳米粒子成功附着在细菌表面对细菌进行全面包裹。

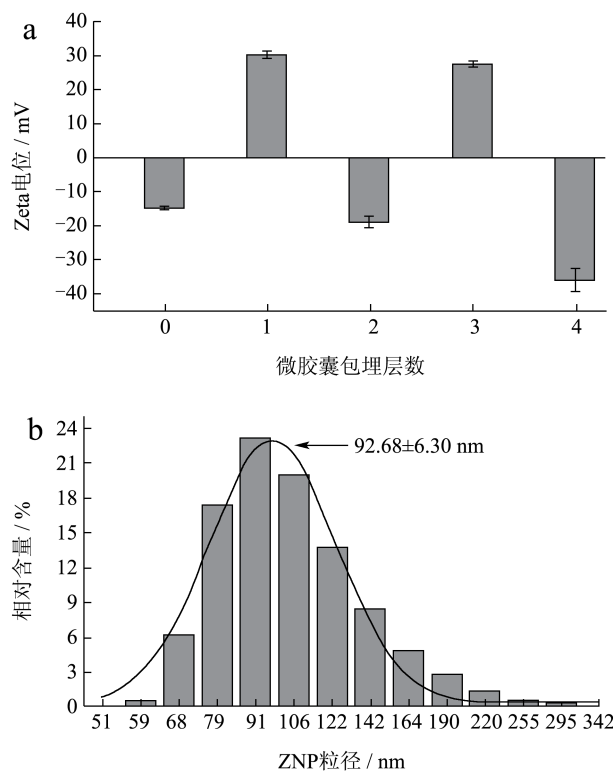


图5 益生菌微胶囊的Zeta电位变化及蛋白纳米颗粒粒径

Fig.5 Zeta potential changes of probiotic microcapsules and nanoparticles size of Zein

注:(a)Zeta电位变化;(b)纳米颗粒粒径。

2.4 微胶囊的形貌分析

利用扫描电子显微镜观察不同层LbL微胶囊形态,如图6所示。对于包埋一层的样品,表面布满了微小的球形颗粒,说明ZNP成功沉积在益生菌的表面,但能观察到有些微胶囊表面存在微小孔隙。阿拉伯胶作为第二层沉积以后,微胶囊表面变得致密较光滑,已经观察不到孔洞的存在,这可能是由于ZNP、阿拉伯胶和细菌之间存在竞争性静电相互作用,使得阿拉伯胶在ZNP之间起到了有效填充的作用,这有助于防止益生菌的泄漏和外界环境的侵害。随着包埋层数的增加,微胶囊粒径明显增大,变得更加致密,没有裂纹。这是由于玉米醇溶蛋白具有良好的成

膜特性，并与阿拉伯胶通过氢键结合促进了玉米醇溶蛋白纳米颗粒聚集成膜对益生菌进行完全包被^[27]。Poopan 等^[28]构建的乳清蛋白、麦芽糖糊精和玉米粉微胶囊具有类似的表面结构。4 组微胶囊表面上均观察不到游离细菌，这也说明益生菌被有效的包埋在了微胶囊内部。

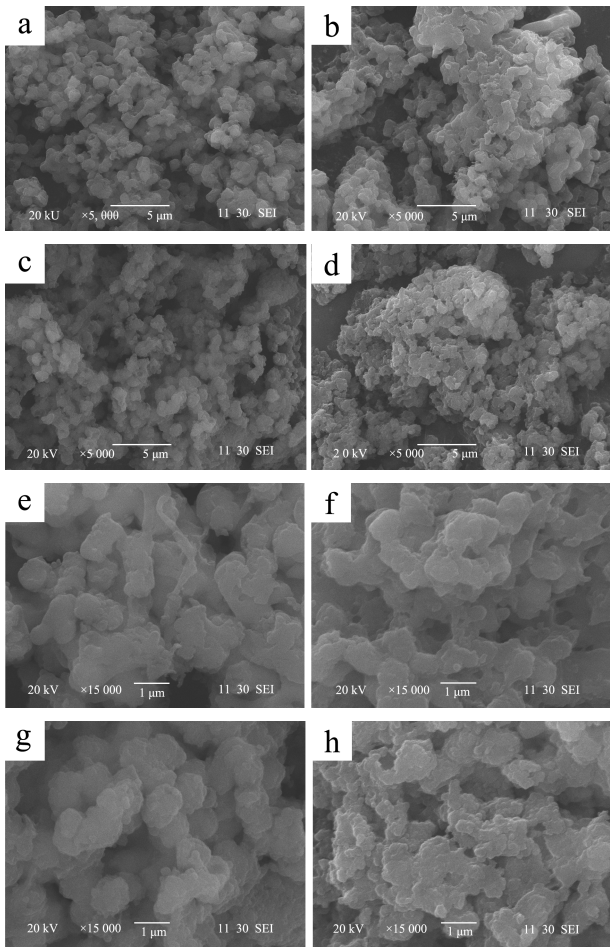


图 6 不同层数微胶囊扫描电子显微镜图像

Fig.6 SEM images of microcapsules with different layers

注：a 为 (ZNP/GA)₁*5K, b 为 (ZNP/GA)₂*5K, c 为 (ZNP/GA)₃*5K, d 为 (ZNP/GA)₄*5K, e 为 (ZNP/GA)₁*15K, f 为 (ZNP/GA)₂*15K, g 为 (ZNP/GA)₃*15K, h 为 (ZNP/GA)₄*15K。

表 1 层层自组装与冷冻干燥后益生菌微胶囊细菌活力 (lg CFU/mL)

样品	裸菌	(ZNP/GA) ₁	(ZNP/GA) ₂	(ZNP/GA) ₃	(ZNP/GA) ₄
包埋	9.77 ± 0.01 ^a	9.53 ± 0.05 ^b	9.31 ± 0.03 ^c	9.28 ± 0.01 ^c	9.18 ± 0.04 ^d
冻干	6.56 ± 0.05 ^e	8.97 ± 0.02 ^a	8.81 ± 0.03 ^b	8.59 ± 0.02 ^c	8.40 ± 0.01 ^d

注：表中不同字母表示组间差异显著性 ($P < 0.05$)。下表同。

表 2 热处理后不同层数LbL益生菌微胶囊活力损失 (lg CFU/mL)

热处理时间/min	裸菌	(ZNP/GA) ₁	(ZNP/GA) ₂	(ZNP/GA) ₃	(ZNP/GA) ₄
10	3.12 ± 0.02 ^a	0.73 ± 0.01 ^b	0.34 ± 0.03 ^c	0.40 ± 0.04 ^c	0.33 ± 0.05 ^c
30	4.10 ± 0.03 ^a	1.44 ± 0.02 ^b	1.09 ± 0.01 ^c	0.47 ± 0.02 ^d	1.05 ± 0.05 ^c

2.5 鼠李糖乳杆菌微胶囊包埋率及冻干存活率

冷冻干燥是保存微生物的常见手段之一。在冷冻干燥的过程中，细菌会面临许多不利的环境条件，如低温和低水分活度，干燥的过程中除去结合水会对细胞膜、表面蛋白质和细胞壁造成损害，导致细胞功能受到损害甚至丧失^[29]。如表 1 所示，游离细菌在冷冻干燥过程中损失了 3.21 lg CFU/mL 的细胞活力，层层自组装制备的不同层数的益生菌微胶囊在冷冻干燥后损失的活菌数量从 0.50 到 0.78 lg CFU/mL 不等，(ZNP/GA)₂ 效果最佳，(ZNP/GA)₁、(ZNP/GA)₃ 其次，分析是由于阿拉伯胶作为最外层时，结构更均匀，在脱水过程中更稳定，对鼠李糖乳杆菌能够起到更好的保护作用。该结果优于 Li 等^[30]制备的转谷氨酰胺酶交联大豆分离蛋白微胶囊对鼠李糖乳杆菌的保护性能。使用 LbL 对益生菌封装之后，阿拉伯胶和 ZNP 覆盖在细菌表面，在脱水过程中可以替代水分子保护细胞膜中成分，从而保持细胞活力。

2.6 鼠李糖乳杆菌微胶囊耐热性

高温不利于益生菌的存活，因此很难将益生菌直接添加进入需要加热的食物中。微胶囊化可以在一定程度上提高益生菌的耐热性能，因为微胶囊壁材的存在会延长温度传递到细胞内部的路径^[31]。表 2 显示了加热过程 (65 °C 10 min 和 30 min) 裸菌及 LbL 组装微胶囊中细菌的活力变化。如表 2 所示，裸菌在加热过程中损失了 4.10 lg CFU/mL 的细胞活力，因为高温环境会使细菌中的蛋白质变性，导致细菌中的酶活性丧失。使用 ZNP 和阿拉伯胶对鼠李糖乳杆菌进行包埋后，细菌活力得到显著改善，加热后损失的活菌数量从 0.47 到 1.44 lg CFU/mL 不等。这是由于对益生菌进行层层封装之后，ZNP 加强了细胞膜磷脂层的疏水相互作用，从而减缓了水蒸气进入细胞的速度。并且 ZNP 和阿拉伯胶覆盖在细菌表面，使得温度传递到细胞内部的路径增长。该结果优于 Hu 等^[32]制备的植物乳杆菌微胶囊耐热性能。

2.7 鼠李糖乳杆菌微胶囊体外消化存活率

采用体外模拟胃和小肠消化,评价不同层数微胶囊对益生菌的保护作用。鼠李糖乳杆菌不同包埋层数在胃肠道消化过程中存活率如图7所示。在模拟胃液处理120 min后,未包埋的活菌数减少至5.53 lg CFU/mL,对细菌进行包埋后,所有微胶囊中活菌数均显著增加,并且在 $(\text{ZNP/GA})_2$ 样品中存活率最高,模拟胃液处理120 min后,活菌数为8.94 lg CFU/mL,只有0.70 lg CFU/mL的细菌损失,这是由于在包封到第二层时,阿拉伯胶和ZNP之间形成的氢键作用力增强了涂层结构的稳定性和致密性。包埋组 $(\text{ZNP/GA})_3$ 、 $(\text{ZNP/GA})_4$ 存活率反而比 $(\text{ZNP/GA})_2$ 低,这可能是因为ZNP作为第三层附着时,消化液最先瓦解ZNP时,消化液渗入ZNP之间裂缝后,使ZNP裂解并迅速带走一部分阿拉伯胶,这会破坏掉一二层包埋壁材之间结合的相互作用力,使微胶囊内部较快地暴露在胃液中^[33]。而在 $(\text{ZNP/GA})_4$ 组中,由于微胶囊被包覆了4层壁材,这可能在层层包埋过程中,各层壁材之间都发生了桥连作用并互相挤压,导致细菌没有被很好被包覆其中,影响细菌的生理状态及存活率。或由于包覆材料过厚,在体外消化过程中细菌无法被完全释放,致使最后测得细菌存活率降低^[34]。该实验与Wang等^[35]报道的植物乳杆菌微胶囊在体外消化过程中的释放特性一致。在模拟体外消化(模拟胃液120 min,模拟肠液240 min)后,未包埋的活菌数减少至5.22 lg CFU/mL,所有包埋组经历体外消化后的活菌数都大于6 lg CFU/mL,达到了联合国粮农组织和世界卫生组织对益生菌食品中活菌数的最低要求。

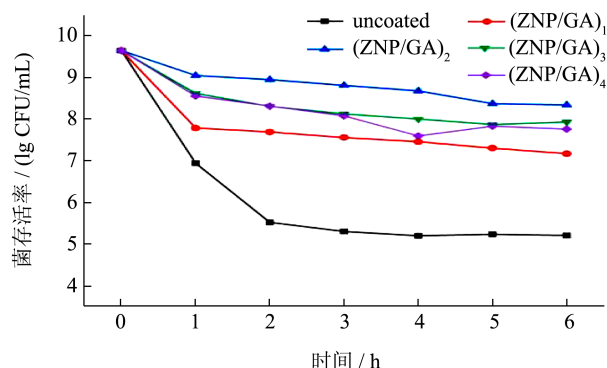


图7 封装在不同层数LbL微胶囊中的鼠李糖乳杆菌在模拟胃液和肠液溶液中的存活率

Fig.7 Survival of *Lactobacillus rhamnosus* encapsulated in LbL microcapsules with different layers during simulated gastric and intestinal digestions

3 结论

本研究以玉米醇溶蛋白和阿拉伯胶为壁材,通过LbL技术制备多层微胶囊,将益生菌封装在微胶囊中,以提高鼠李糖乳杆菌的耐热性及胃肠道消化过程耐受力。扫描电镜图像显示鼠李糖乳杆菌均被微胶囊完全包被;4个包埋组中, $(\text{ZNP/GA})_4$ 样品中的活菌数最低仍高达9.18 lg CFU/mL,这体现出了微胶囊的高负载率。研究结果显示,4组包埋样品中冻干、体外消化过程 $(\text{ZNP/GA})_2$ 效果最好,热处理过程 $(\text{ZNP/GA})_3$ 效果更好,均表明玉米醇溶蛋白和阿拉伯胶通过静电相互作用和氢键结合力结合形成致密的包衣层,可有效的维持益生菌在冷冻干燥、热处理及胃肠道消化过程中的活力;因此本研究为玉米醇溶蛋白纳米颗粒对益生菌的LbL包埋提供了理论指导,本试验制备的微胶囊具有良好的耐干燥及耐消化能力,为将来探讨壁材、制备条件对益生菌微胶囊性能的各项影响,提高微胶囊的稳定性和释放特性奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] TANG C, KONG L, SHAN M, et al. Protective and ameliorating effects of probiotics against diet-induced obesity: A review [J]. Food Research International, 2021, 147: 110490.
- [2] YUAN Y, JIANG X, LI W, et al. A protectant for *Lactobacillus rhamnosus* based on whey protein isolate and isomalt: Stress resistance and underlying mechanisms [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280: 135712.
- [3] HAN S, LU Y, XIE J, et al. Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 609722.
- [4] KRAMER R K, GUIMARÃES F E G, CARVALHO A J F. Wood pulp fiber modification by layer-by-layer (LBL) self-assembly of chitosan/carboxymethyl cellulose complex: Confocal microscopy characterization [J]. Journal of Molecular Liquids, 2019, 273: 368-373.
- [5] HUANG J, ZHANG S, LIU D, et al. Preparation and characterization of astaxanthin-loaded microcapsules stabilized by lecithin-chitosan-alginate interfaces with layer-by-layer assembly method [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 268: 131909.
- [6] GAO X, LIU Z, CHEN J, et al. Encapsulation of luteolin by self-assembled Rha/SSPS/SPI nano complexes: Characterization, stability, and gastrointestinal digestion *in vitro* [J]. Food Research International, 2024, 188: 114532.
- [7] LIU B, HU J, YAO H, et al. Improved viability of probiotics encapsulated by layer-by-layer assembly using zein nanoparticles and pectin [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 143: 108899.
- [8] CHEN G, FU Y, NIU F, et al. Evaluation of the colloidal/chemical performance of core-shell nanoparticle formed by zein and gum

- Arabic [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2019, 560: 130-135.
- [9] LIU J, ZHANG Y, HE S, et al. Microbial transglutaminase-induced cross-linking of sodium caseinate as the coating stabilizer of zein nanoparticles [J]. Lwt, 2021, 138: 110624.
- [10] KHAN M A, ZHOU C, ZHENG P, et al. Improving physicochemical stability of quercetin-loaded hollow zein particles with chitosan/pectin complex coating [J]. Antioxidants, 2021, 10(9): 1476.
- [11] YUAN Y, MA M, XU Y, et al. Surface coating of zein nanoparticles to improve the application of bioactive compounds: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 120: 1-15.
- [12] GALI L, BEDJOU F, FERRARI G, et al. Formulation and characterization of zein/gum arabic nanoparticles for the encapsulation of a rutin-rich extract from *Ruta chalepensis* L [J]. Food Chemistry, 2022, 367: 129982.
- [13] YANG Y, JIA Y, ZHANG M, et al. Synthesis, characterization, antioxidant and bacteriostasis in preservation of isoorientin loaded Zein/GA nanoparticles [J]. Food Chemistry: X, 2024, 23: 101604.
- [14] DE ALMEIDA CAMPOS L A, NETO A F S, NORONHA M C S, et al. Zein nanoparticles for drug delivery: Preparation methods and biological applications [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2023, 635: 122754.
- [15] WANG K, SUN H, CUI Z, et al. Synergistic effects of microbial transglutaminase and apple pectin on the gelation properties of pea protein isolate and its application to probiotic encapsulation [J]. Food Chemistry, 2024, 439: 138232.
- [16] XIAO Y, HAN C, YANG H, et al. Layer (whey protein isolate)-by-layer (xanthan gum) microencapsulation enhances survivability of *L. bulgaricus* and *L. paracasei* under simulated gastrointestinal juice and thermal conditions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148: 238-247.
- [17] LIU H, GONG J, CHABOT D, et al. Improved survival of *Lactobacillus zeae* LB1 in a spray dried alginate-protein matrix [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 78: 100-108.
- [18] CHEN Y, WANG W, ZHANG W, et al. Co-encapsulation of probiotics with acylglycerols in gelatin-gum arabic complex coacervates: Stability evaluation under adverse conditions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242: 124913.
- [19] QI W, LIANG X, YUN T, et al. Growth and survival of microencapsulated probiotics prepared by emulsion and internal gelation [J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56: 1398-1404.
- [20] CHENG C, SUN M, WANG L, et al. Zein and soy polysaccharide encapsulation enhances probiotic viability and modulates gut microbiota [J]. LWT, 2024, 210: 116827.
- [21] GU X, LI W, JIANG X, et al. Pectin-coated whey protein isolate/zein self-aggregated nanoparticles as curcumin delivery vehicles: Effects of heating, pH, and adding sequence [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 258: 128892.
- [22] LI J, XU X, CHEN Z, et al. Zein/gum Arabic nanoparticle-stabilized Pickering emulsion with thymol as an antibacterial delivery system [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 200: 416-426.
- [23] LI J, XU X, CHEN Z, et al. Biological macromolecule delivery system fabricated using zein and gum arabic to control the release rate of encapsulated tocopherol during *in vitro* digestion [J]. Food Research International, 2018, 114: 251-257.
- [24] SPASOJEVIĆ L, BUČKO S, KOVAČEVIĆ D, et al. Interactions of zein and zein/rosin nanoparticles with natural polyanion gum Arabic [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 196: 111289.
- [25] YUAN Y, JIANG X, LI W, et al. A protectant for *Lactobacillus rhamnosus* based on whey protein isolate and isomalt: Stress resistance and underlying mechanisms [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280: 135712.
- [26] 张珊珊, 冯武, 熊芸, 等. 乳液模板-层层自组合法制备百里香精油微胶囊[J]. 食品工业, 2018, 39(8): 87-92.
- [27] DAI L, SUN C, WEI Y, et al. Characterization of Pickering emulsion gels stabilized by zein/gum arabic complex colloidal nanoparticles [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 74: 239-248.
- [28] POOPAN B, KASORN A, PUTTARAT N, et al. Freeze drying microencapsulation using whey protein, maltodextrin and corn powder improved survivability of probiotics during storage [J]. Food Science and Biotechnology, 2025, 34: 959-970.
- [29] WANG R, SUN R, YANG Y, et al. Calcium ions enhanced freeze-drying and spray-drying resistance of *Lactiplantibacillus plantarum* LIP-1 by regulation of cell wall surface proteins and related enzymes expression [J]. LWT, 2023, 189: 115460.
- [30] LI C, WANG C L, SUN Y, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG by transglutaminase cross-linked soy protein isolate to improve survival in simulated gastrointestinal conditions and yoghurt [J]. Journal of Food Science, 2016, 81(7): M1726-M1734.
- [31] DEVARAJAN A, MUDGIL P, ALDHAHERI F, et al. Camel milk-derived probiotic strains encapsulated in camel casein and gelatin complex microcapsules: Stability against thermal challenge and simulated gastrointestinal digestion conditions [J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(3): 1862-1877.
- [32] HU R, DONG D, HU J, et al. Improved viability of probiotics encapsulated in soybean protein isolate matrix microcapsules by coacervation and cross-linking modification [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 138: 108457.
- [33] RAD Z P, MOKHTARI J, ABBASI M. Calendula officinalis extract/PCL/Zein/Gum arabic nanofibrous bio-composite scaffolds via suspension, two-nozzle and multilayer electrospinning for skin tissue engineering [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 530-543.
- [34] HUANG X, GE X, WANG Y. Single-layer and double-layer zein-gum arabic nanoencapsulations: Preparation, structural characterization, thermal properties, and controlled release in the gastrointestinal tract [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(10): 4580-4595.
- [35] WANG L, ZHONG X, LI S, et al. Probiotics encapsulated by gelatin and hyaluronic acid via layer-by-layer assembly technology for enhanced viability [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 153: 109967.