

提高乳酸菌加工与胃肠耐受性的策略与新技术

许琼耀, 王娟, 廖宁, 刘冠闻, 李颖慧, 尚欣哲, 盖逸萱, 王聪聪, 师俊玲

Strategies and New Technologies for Improving the Tolerance of Lactic Acid Bacteria to Processing and Gastrointestinal Environments

XU Qiongyao, WANG Juan, LIAO Ning, LIU Guanwen, LI Yinghui, SHANG Xinzhe, GAI Yixuan, WANG Congcong, and SHI Junling

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030350>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

自然发酵泡菜中高体外抗氧化活性乳酸菌的筛选及其对模拟胃肠道环境的耐受性

Screening of High Antioxidant Activity Lactic Acid Bacteria in Traditional Fermented Pickles and Its Tolerance to Simulated Gastrointestinal Environments

食品工业科技. 2019, 40(22): 93-97,103 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.017>

牦牛曲拉源乳酸菌的耐受性与抑菌性能比较

Comparison of Tolerance and Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria from Yak Qula

食品工业科技. 2020, 41(7): 115-120,125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.07.020>

新疆酸马奶中乳酸菌的乙醇耐受性及蛋白酶性质研究

Study on ethanol tolerance and protease properties of lactic acid bacteria from koumiss in Xinjiang areas

食品工业科技. 2017(13): 136-139 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.13.025>

川西高原发酵牦牛乳中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选与耐受性研究

Screening and Tolerance of Degrading Nitrite-Lactant Bacteria in Fermented Yak Milk of Western Sichuan Plateau

食品工业科技. 2020, 41(9): 119-123,130 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.019>

四株乳酸菌的加工性能

Processability of four strains of lactic acid bacteria

食品工业科技. 2017(01): 152-155 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.01.021>

静电纺丝技术在食品领域应用的研究进展

Advances in the Application of Electrospinning Technology in Food Industry

食品工业科技. 2021, 42(2): 370-378 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020242>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

许琼耀, 王娟, 廖宁, 等. 提高乳酸菌加工与胃肠耐受性的策略与新技术 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(20): 1-10. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030350

XU Qiongyao, WANG Juan, LIAO Ning, et al. Strategies and New Technologies for Improving the Tolerance of Lactic Acid Bacteria to Processing and Gastrointestinal Environments[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(20): 1-10. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030350

· 青年编委专栏—益生菌与抗菌肽 (客座主编: 孙志宏、付才力) ·

提高乳酸菌加工与胃肠耐受性的策略与新技术

许琼耀, 王娟, 廖宁, 刘冠闻, 李颖慧, 尚欣哲, 盖逸萱, 王聪聪, 师俊玲*
(西北工业大学生命学院, 陕西西安 710072)

摘要: 活性乳酸菌产品因其良好的益生功效越来越受到人们的青睐, 市场需求量不断增大。然而, 受乳酸菌厌氧和热敏感性的限制, 以及加工中加热和氧气胁迫的影响, 产品中活性乳酸菌数量大幅度下降。进入体内的活性乳酸菌在胃液高酸性和肠道高胆汁酸等复杂环境的胁迫下进一步降低, 严重影响产品的益生功效。为此, 人们在提高乳酸菌对热、氧气、胃肠环境耐受性方面进行了大量研究, 并开发了系列新技术, 但缺乏彼此间的综合对比与分析。本文围绕如何提高乳酸菌的加工存活率, 以及胃肠耐受性和肠道递送问题, 对静电纺丝、静电喷雾、乳滴技术、多酚纳米盔甲、热诱导预处理等新技术的作用效果进行了总结与对比, 以期对相关研究和技术应用提供参考。

关键词: 乳酸菌, 热胁迫, 氧胁迫, 静电纺丝, 乳滴技术, 纳米盔甲

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)20-0001-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030350

本文网刊:



Strategies and New Technologies for Improving the Tolerance of Lactic Acid Bacteria to Processing and Gastrointestinal Environments

XU Qiongyao, WANG Juan, LIAO Ning, LIU Guanwen, LI Yinghui, SHANG Xinzhe, GAI Yixuan, WANG Congcong, SHI Junling*

(School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract: The market and demanding of lactic acid bacteria and their products keep increasingly in recent years. However, it is difficult to maintain the activity of lactic acid bacteria during the processing and storage periods due to the stress caused by heating and oxygen exposure conditions for these anaerobic and heat-sensitive bacteria. This also causes a significant reduction in the quantity of live lactic acid bacteria in the end products. The activity of lactic acid bacteria will further decrease under the high acid condition in stomach and the high bile content in gut tract, which greatly reduce the end probiotic efficacy of this kind of probiotic products. Until now, numerous efforts have been made to enhance the tolerance of lactic and bacteria against heat, oxygen and gastrointestinal conditions, resulting in the emergence of several novel technologies. However, it is still challenging to select the most suitable technologies for practical application, as the results from various studies have not been thoroughly summarized and compared. In this study, the currently developed techniques for improving the activity of lactic acid bacteria during processing, under gastrointestinal condition, and in intestinal delivery are comprehensively summarized. The results from different studies are well compared. The application of electrostatic spinning, electrostatic spray, emulsion droplet technology, polyphenol nano armor, and heat induction pretreatment in the process of live lactic acid bacteria is also introduced. The information presented in this study can provide useful guidance for further research and the application of the currently developed techniques.

Key words: lactic acid bacteria; heat stress; oxidative stress; electrospinning; emulsion droplet technology; nano armor

收稿日期: 2023-03-31

基金项目: 陕西省创新能力支撑计划 (2020TD-042)。

作者简介: 许琼耀 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 益生菌产品研发, E-mail: xuqiongyao@mail.nwpu.edu.cn。

* 通信作者: 师俊玲 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 肠道菌群与人体健康, E-mail: sjlshi2004@nwpu.edu.cn。

大量结果表明,乳酸菌与人和动物的健康息息相关^[1]。很多乳酸菌已经被批准用于食品加工。我国规定的《可用于食品的菌种名单》中(如表 1 所示)

表 1 可用于食品的菌种名单

Table 1 List of bacteria that can be used in food

菌种	拉丁学名
青春双歧杆菌	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
动物双歧杆菌动物亚种	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>
动物双歧杆菌乳亚种	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
两歧双歧杆菌	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
短双歧杆菌	<i>Bifidobacterium breve</i>
长双歧杆菌长亚种	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
长双歧杆菌婴儿亚种	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>
乳杆菌属	<i>Lactobacillus</i>
嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
卷曲乳杆菌	<i>Lactobacillus crispatus</i>
德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
德氏乳杆菌乳亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
格氏乳杆菌	<i>Lactobacillus gasseri</i>
瑞士乳杆菌	<i>Lactobacillus helveticus</i>
约氏乳杆菌	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
马乳酒样乳杆菌马乳酒样亚种	<i>Lactobacillus kefiranoformis</i> subsp. <i>kefiranoformis</i>
乳酪杆菌属	<i>Lactocaseibacillus</i>
干酪乳酪杆菌	<i>Lactocaseibacillus casei</i>
副干酪乳酪杆菌	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
鼠李糖乳酪杆菌	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>
粘液乳酪杆菌属	<i>Limosilactobacillus</i>
发酵粘液乳杆菌	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
罗伊氏粘液乳杆菌	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
乳植杆菌属	<i>Lactiplantibacillus</i>
植物乳植杆菌	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
联合乳杆菌属	<i>Ligilactobacillus</i>
唾液联合乳杆菌	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
广布乳杆菌属	<i>Latilactobacillus</i>
弯曲广布乳杆菌	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
清酒广布乳杆菌	<i>Latilactobacillus sakei</i>
链球菌属	<i>Streptococcus</i>
唾液链球菌嗜热亚种	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
乳球菌属	<i>Lactococcus</i>
乳酸乳球菌乳亚种	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
乳酸乳球菌乳亚种(双乙酰型)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
乳脂乳球菌	<i>Lactococcus cremoris</i>
丙酸杆菌属	<i>Propionibacterium</i>
费氏丙酸杆菌谢氏亚种	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>
丙酸菌属	<i>Acidipropionibacterium</i>
产丙酸丙酸菌	<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>
明串珠菌属	<i>Leuconostoc</i>
肠膜明串珠菌肠膜亚种	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
片球菌属	<i>Pediococcus</i>
乳酸片球菌	<i>Pediococcus acidilactici</i>
戊糖片球菌	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
魏茨曼氏菌属	<i>Weizmannia</i>
凝结魏茨曼氏菌	<i>Weizmannia coagulans</i>
动物球菌属	<i>Mammaliococcus</i>
小牛动物球菌	<i>Mammaliococcus vitulinus</i>
葡萄球菌属	<i>Staphylococcus</i>
木糖葡萄球菌	<i>Staphylococcus xylosus</i>
肉葡萄球菌	<i>Staphylococcus carnosus</i>
克鲁维酵母属	<i>Kluyveromyces</i>
马克斯克鲁维酵母	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

有双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)7种、乳杆菌属(*Lactobacillus*)8种、链球菌属(*Streptococcus*)1种、乳酪杆菌属(*Lactocaseibacillus*)3种、粘液乳酪杆菌属(*Limosilactobacillus*)2种、乳植杆菌属(*Lactiplantibacillus*)1种、联合乳杆菌属(*Ligilactobacillus*)1种、广布乳杆菌属(*Latilactobacillus*)2种、乳球菌属(*Lactococcus*)3种、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)1种、丙酸菌属(*Acidipropionibacterium*)1种、明串珠菌属(*Leuconostoc*)1种、片球菌属(*Pediococcus*)2种、魏茨曼氏菌属(*Weizmannia*)1种、动物球菌属(*Mammaliococcus*)1种、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)2种、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)1种。食品加工中常用乳酸菌有乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、明串珠菌(*Leuconostoc*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、片球菌属(*Pediococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)^[2]。

大量研究证明,摄入活性乳酸菌具有改善肠道微生态、提高食物利用率、缓解便秘、降低胆固醇水平、提高机体免疫力等多种功效^[3](如图 1 所示)。除了产生乳酸、乙酸等抗菌活性物质抑制和杀死过度繁殖的有害菌外,乳酸菌还能定殖在肠黏膜上,通过与致病菌竞争肠道上的黏附位点和营养物而抑制致病菌感染,调节肠道菌群^[4-5],并且通过产生多种酶类促进机体的营养消化和吸收^[6]。市场上的乳酸菌产品也越来越多地得到消费者的认可。

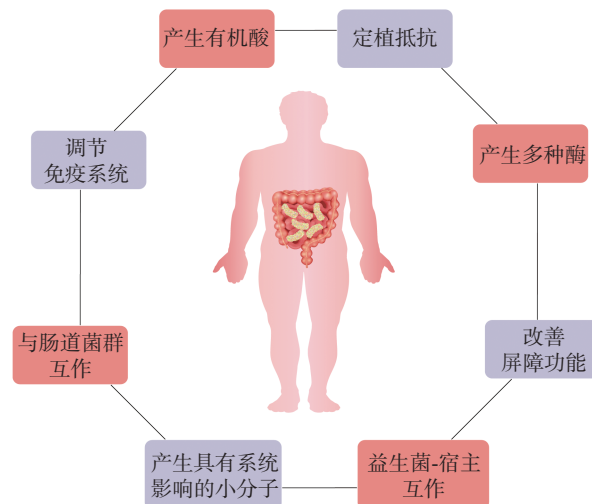


图 1 乳酸菌对人体的益生作用

Fig.1 Probiotic effects of lactic acid bacteria on human

然而,受菌种厌氧和热敏感性的影响,很多乳酸菌产品在经历加热和暴露于氧气等加工条件时,活性下降,导致产品中活菌数不足,进入体内后由于胃酸和小肠中胆汁的存在导致乳酸菌活性更低,严重影响产品功效。虽然人们已经在提高乳酸菌加工活性和体内活性方面进行了大量研究,并开发了一些新技术,但每种方法各有利弊和局限性,需要择优使用。然而,这些研究结果并未得到系统的总结和对比。为此,本文总结和对比了现有技术对乳酸菌耐热性、耐

氧性、肠道存活性等的影响和作用效果, 以期对相关研究和已有技术的选择与应用提供参考。

1 提高乳酸菌耐热性的策略与技术

温度是影响乳酸菌活性的重要因素之一。大多数乳酸菌的最适生长温度为 37~43 ℃^[7]。温度过高会抑制菌体生长和活性, 甚至导致菌体死亡。为了避免这种不利影响, 绝大多数市售活性乳酸菌产品均经冷冻干燥而成。虽然效果良好, 但时间长、能耗高、成本大。相比之下, 喷雾干燥法则有干燥速度快、时间短、过程简单、适于连续生产、节能高效等优点^[8], 但是存在菌体不耐高温和氧胁迫, 菌体死亡率高等问题。加热对乳酸菌活性的影响在两个方面: 一是导致菌体死亡; 二是导致细胞失水, 活性降低。提高菌体的耐热性, 可使乳酸菌产品的生产和储藏摆脱低温处理的限制, 为产品生产和贮藏提供了极大便利。

1.1 干燥时加入保护剂

虽然一些嗜酸乳杆菌能够在高达 45 ℃ 的温度下生长, 但是超过 45~50 ℃ 的加热处理并不利于细胞的存活^[9]。添加保护剂和缩短加热时间能够有效减少乳酸菌经喷雾干燥的活性损失^[10]。表 2 总结了目前已报道的乳酸菌喷雾干燥用保护剂, 主要有多糖、蛋白质、氨基酸及其盐类等三大类。其中, 多糖被认为是性能最佳的冻干保护剂, 能够通过取代水形成氢键, 或者使细胞形成玻璃态结构的方式减小细胞的冷冻损伤^[11]; 蛋白质类则通过作用于细胞膜而发挥冻干保护剂的作用^[12]; 氨基酸及其盐类是通过让细胞提前适应高渗透环境来减小冻干过程失水形成的高渗透压损失; 磷酸盐缓冲溶液还可以通过稳定 pH 来保护细胞免受冻干损伤^[13]。这些保护剂能够通过不同的作用机制减少乳酸菌在干燥过程中的活性损失, 在一定程度上提高终产品中菌体存活率。

1.2 微胶囊包埋

为了提高乳酸菌在喷雾干燥过程中的活性, 已

经开发了多项处理技术, 其中以微胶囊包埋技术的效果较佳, 但其作用效果与所用包埋剂有关。例如, 单独用甜乳清来包埋双歧杆菌 BB-12, 可使喷雾干燥后产品在 60 ℃ 高温处理 5 min 后仍然含有 8.31 lg CFU/g 的活性乳酸菌, 而未包埋处理的产品在相同条件下处理后, 活菌数仅有 7.55 lg CFU/g; 在甜乳清中混入菊粉用于菌体包埋, 能够进一步减少双歧杆菌喷雾干燥和后期热处理过程中的活性损失, 使得产品的活菌数与游离菌体相比分别增加了 0.49 和 0.97 lg CFU/g^[17]。Souza 等^[18] 用麦芽糊精和葡萄糖包埋鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌和植物乳植杆菌等三种益生菌, 再经喷雾干燥后, 产品中活细胞数量减少了 2 个对数单位, 但活菌数依然高于益生菌食品相关规定(10⁶ CFU/g)。对比上述结果, 可以发现用甜乳清或其与菊粉混合物为包埋剂, 比用麦芽糊精和葡萄糖作包埋剂对乳酸菌在喷雾干燥过程中的保护作用更佳, 并以用甜乳清和菊粉混合使用时的效果最佳。

1.3 菌体预处理

胁迫环境能诱导微生物中多种胁迫相关基因的表达, 提高菌体的环境适应能力^[19]。如图 2 所示, 高温胁迫会诱导乳酸菌产生热应激^[20], 通过产生短暂表达的热休克蛋白抵御外界环境的不利影响, 或者通过改变细胞组成和结构, 增强菌体对高温环境的适应能力^[21]。这些蛋白有分子伴侣 GroEL、DnaK、小热休克蛋白和 Clp ATP 酶(一种降解受损蛋白质的酶)等。它们能够帮助细胞内受损蛋白质的重新折叠, 维持细胞的正常活性^[22](如图 2 所示)。然而, 过高的温度会导致蛋白质变性和聚集, 改变细胞中 RNA 等生物大分子的稳定性和膜的流动性, 导致细胞死亡^[23]。

根据相关报道, 乳酸菌产生的热激蛋白主要有 DnaK、DnaJ、HrcA、GroES、GroEL、Hsp84、Hsp85、Hsp100、Clp、HtrA 和 FtsH 等^[24]。其中, 通过热诱导使乳酸菌产生 DnaK、DnaJ、HrcA 等热激蛋白已

表 2 乳酸菌喷雾干燥过程中常用的保护剂

Table 2 Protective agents commonly used in the spray drying process of lactic acid bacteria

常用保护剂类型	材料	参考文献
多糖	海藻糖、乳糖、山梨醇、甘露醇、蔗糖、麦芽糊精、阿拉伯胶、菊粉、异麦芽寡糖、低聚果糖	[14]
蛋白质	脱脂乳、酪蛋白、乳清蛋白、可溶性大豆蛋白、明胶、玉米醇溶蛋白	[15]
氨基酸及其盐类	赖氨酸、甘氨酸以及某些氨基酸盐, 如谷氨酸钠	[16]

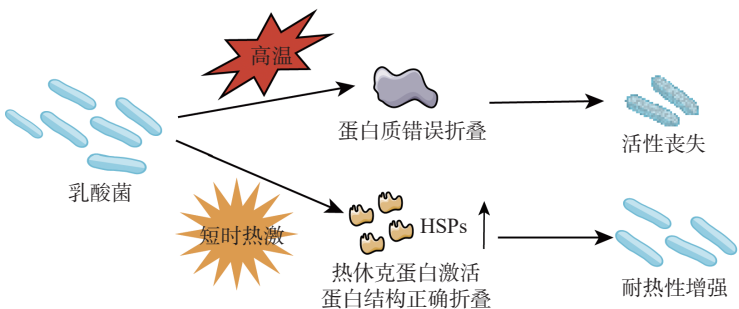


图 2 乳酸菌的热应激反应

Fig.2 Heat stress response of lactic acid bacteria

经被用于提高乳酸菌对高温环境的抵抗能力,从而提高产品中活菌数^[25]。Paéz 等^[26]研究发现,干燥前热处理(52 ℃,15 min)可以显著提高 *L. casei* Nad 和 *L. plantarum* 8329 在干燥过程和储存期的存活率。

研究表明,干燥前使用热适应处理能够显著提高乳酸菌的加工耐热性,降低乳酸菌的加工致死率,且其效果与预处理方法有关(表 3)。例如,Shin 等^[27]发现,在干燥前,先将屎肠球菌 HL7 在 52 ℃ 下处理 15 min,可以降低细胞膜中不饱和脂肪酸的比率,使得喷雾干燥后,菌体的存活率提高了 103~105 倍;Sonia 等^[28]研究发现,将嗜酸乳杆菌 NCFM 在 53 ℃ 下保持 20 min 后,可使菌体在 65 ℃ 下存活率从 0.003% 提高到 0.5%,提高了约 166 倍;Zhang 等^[29]研究发现,用 0.5 mmol/L 的 H₂O₂ 在 37 ℃ 下预处理 2 h 再进行喷雾干燥处理,可将鼠李糖乳杆菌 1301 的存活率从 3.7 logCFU/g 增加到 7.8 logCFU/g,提高了约 150 倍;Chen 等^[20]研究发现,将马乳酒样乳杆菌 M1 在 37 ℃ 下处理 1 h 后再进行喷雾干燥加工,可使菌体的存活率从 0.004% 提高到 0.21%,提高了 52.5 倍。单从存活率的提高倍数来看,以 Sonia 等^[28]提出的在 53 ℃ 下保持 20 min 的提高幅度最大(166 倍)。然而,需要说明的是,不同研究中所用菌种本身的耐热性,加工时的温度、时间,以及提高幅度的计算方法等都会影响对比结果。而且,每种处理条件可能还会有菌种适用性的问题。因此,不能简单地确定出究竟是哪种处理方法的效果最好。在实际应用过程中,需要综合考虑菌种特性,加工温度和时间等多种因素进行对比实验后再进行确定。

1.4 静电纺丝加工

静电纺丝是使用电场扭曲,将溶液从注射器中压出,产生长而薄的聚合物(如图 3 所示)。整个装置主要由高压电源、喷头(例如移液器吸头)和接地收集板(通常是金属筛或板)组成。使用时,利用高压源将一定极性的电荷注入聚合物溶液或熔体中,然后将其加速到相反极性的收集器中^[31]。电荷间强相互排斥力能够克服聚合物液体的表面张力,从而利于成丝^[32]。通过静电纺丝几乎可以将所有能够成膜的聚合物制备成纤维^[33]。

将干燥或活性微生物,以及活性成分混合到聚乙烯醇或与其他材料(例如海藻酸盐)的混合液中,就可以使其嵌入聚合物纤维中,对菌体和活性成分起到一种包封作用。近年来,静电纺丝已经被用于鱼油、茶多酚和叶酸等一些生物活性物质的包封,制成纳米纤维。所得产品具有生物相容性好、生物可降解性、比表面积大、孔隙率高、产品稳定性好,适用于包埋热敏性物质等优点^[31]。

近年来,人们也开始尝试将静电纺丝技术用于乳酸菌加工。Amparo 等^[34]研究发现,以浓缩乳清和普鲁兰多糖为基质,通过静电纺丝技术制备成的动物双歧杆菌乳亚种 Bb12 制剂能够在 20 ℃ 以下存活 40 d,而且菌体的存活率是对照组的 2 倍,有效地提高了菌体在贮藏过程中耐热性或者热稳定性。同时,显微观察显示,菌体在这种体系中被丝状物所包封。Feng 等^[35]用聚乙烯醇/低聚果糖静电纺丝技术对植物乳杆菌进行了包封,发现未包封的菌体在 70 ℃ 水浴处理 30 min 后完全失活,而包封的产品在这种条

表 3 热适应处理对乳酸菌存活率的影响

Table 3 Effects of thermal adaptation treatment on the survival rate of lactic acid bacteria

加工条件	存活率(%)	预处理条件	改进后存活率(%)	菌株	参考文献
60 ℃; 40 min	5.19	pH5.0; 30 min	92.73	<i>E. faecium</i> HL7	[27]
65 ℃; 20 min	0.003	53 ℃; 20 min	0.5	<i>L. acidophilus</i> NCFM	[28]
60 ℃; 1 h	0.01	0.5 mmol/L H ₂ O ₂ 37 ℃; 2 h	66.29	<i>L. rhamnosus</i> hsryfm1301	[29]
52 ℃; 2 h	0.004	37 ℃; 1 h	0.21	<i>L. kefiranoferiens</i> M1	[20]

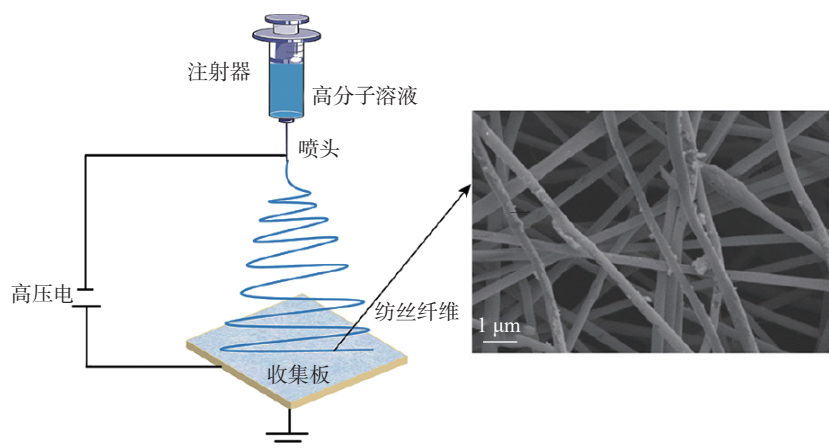


图 3 静电纺丝装置及纺丝纤维载菌示意图^[30]

Fig.3 Schematic diagram of electrostatic spinning device and spinning fiber carrying bacteria^[30]

件下的活菌数只降低了 0.04~2.71 CFU/mL, 有效地提高了菌体的耐热性。这些结果说明, 静电纺丝能够显著提升乳酸菌贮藏和加工过程中的热稳定性。此外, 可溶性膳食纤维也被用于制备嗜酸乳杆菌的静电纺丝。

此外, 乳清、普鲁兰多糖、聚乙烯醇/低聚果糖、可溶性膳食纤维等物质均可以形成良好的静电纺丝产品。一些新型的材料, 如农业废弃物的纳米纤维^[36]、多层 PLGA-普鲁兰-PLGA^[30] 也被用于益生菌的封装或者静电纺丝处理。

2 提高乳酸菌氧气耐受性的策略与技术

部分严格厌氧型乳酸菌, 如双歧杆菌在氧气存在时会在细菌胞内形成 O_2^- 、 $\cdot OH$ 等自由基或 H_2O_2 等强氧化性产物^[37], 但菌体本身缺少有效的活性氧清除机制, 从而导致 DNA 和蛋白质等分子的氧化损伤, 甚至导致细胞死亡^[38]。为此, 提高乳酸菌的耐氧性能是十分必要的。然而, 与菌体耐热性能提高策略研究相比, 有关乳酸菌耐氧性能提高技术的研究较少。目前已报道的方法主要有以下几种。

2.1 使用含羟基化合物

在理论上, 含羟基化合物上的羟基能够与乳清蛋白上的极性基团发生相互作用, 形成稳定结构, 减少菌体细胞在冷冻干燥过程中由冰晶形成导致的细胞膜破裂和氧化应激而损伤细胞的程度^[39]。Chen 等^[40] 发现, 在含有乳清蛋白的菌悬液中加入二糖和甘油等含羟基化合物能使微囊化乳酸菌的细胞存活率提高到 62.1%, 使得干燥产品中保加利亚乳杆菌的活细胞数达到约 8.6 lg CFU/g, 表现出很好的保护效果。这里使用的二糖和甘油都属于含羟基化合物。这一结果说明, 这些物质与乳清蛋白间的相互作用的确能够在一定程度上缓解冻干过程对乳酸菌的损伤。虽然其内在机理并不明晰, 但是这些显著的作用效果为高活性乳酸菌制剂的生产技术改良提供了实践依据。

2.2 使用氧气清除剂或厌氧雾化介质

在喷雾干燥法制备乳酸菌产品的过程中, 使用氧气清除剂或厌氧雾化介质可以在雾化和干燥过程中创造低氧环境, 从而缓解氧气对乳酸菌的损伤作用。Ghandi 等^[41] 通过研究发现, 在乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus. lactis* subsp. *cremoris*) ASCC930119 的菌悬液中加入抗坏血酸等除氧剂和/或厌氧雾化介质(如氮气), 以及改变喷雾条件等策略, 可以将喷雾干燥过程中的细菌存活率由 25.49% 提高到 48.97%, 提高了 23.48%。另外, 喷雾干燥过程中的雾化阶段是导致乳酸菌死亡的主要环节, 这一阶段的菌体死亡率可高达 93%。因此, 改善喷雾阶段的条件如使用氧气清除剂可以显著提高乳酸菌产品的细菌存活率, 从而改善产品的质量。

2.3 使用特定培养基

Zhang 等^[21] 研究发现, 使用不含蛋白胨的 MRS 培养基可以增强鼠李糖乳杆菌 *hsryfm* 1301 的氧化

应激耐受性, 使喷雾干燥后的菌体存活率从 30% 提高至 75%, 所得干菌粉在模拟胃肠液中的存活良好。但是, 在无胰蛋白胨 MRS 中补充苯丙氨酸、异亮氨酸、谷氨酸、缬氨酸、组氨酸或色氨酸后, 鼠李糖乳杆菌的氧化应激耐受性急剧下降。由此说明, 减少氨基酸的摄入是提高鼠李糖乳杆菌氧化应激耐受性的主要原因。研究发现, 在遇到热应激或氧化应激时, 乳酸菌可以通过下调氨基酸或 ABC 转运蛋白、氨基酸代谢和肽酶相关基因, 降低细胞内氨基酸浓度, 从而提高菌体的热应激和氧化应激耐受性。这些研究结果说明, 下调体内氨基酸代谢和转运是适应热和氧冲击的自我适应机制; 培养基中过高的氨基酸会抑制这种作用, 不利于菌体对热和氧的适应性调节。这也说明在提高菌体环境适应性的研究中, 应该考虑和清楚菌体的适应性代谢特点和内在机制, 才能开发出有针对性的有效措施。

3 乳酸菌的胃肠道耐受性提高技术

通常认为, 胃部的高酸性和肠道中胆汁酸是威胁乳酸菌活性的重要因素, 并以胃酸的损伤作用最为严重。因此, 人们围绕着如何提高乳酸菌的酸耐受性进行了大量研究, 其中以微胶囊包埋法最为多见, 并开发了一些新技术。下文将重点介绍近年来开发的撞击气溶胶法、乳滴法、静电喷雾法。

3.1 撞击气溶胶法

撞击气溶胶法的操作过程如图 4 所示。用这种方法以海藻酸钠包埋的乳酸菌, 具有连续生产、产量高、产品粒径小等特点^[42], 生产直径小于 40 μm 的微珠^[43]。Sohail 等^[42] 将这种方法用于制备嗜酸乳杆菌 NCFM 和鼠李糖乳杆菌 GG 的海藻酸钠微珠, 所得产品的粒径为 10~40 μm , 其中的乳酸菌在酸和胆汁中的存活率提高了 1.11 倍; 而且, 该方法对嗜酸乳杆菌 NCFM 酸和胆汁耐受性的提升作用强于鼠李糖乳杆菌 GG; 同时乳酸菌产品的感官特性也有显著提升。

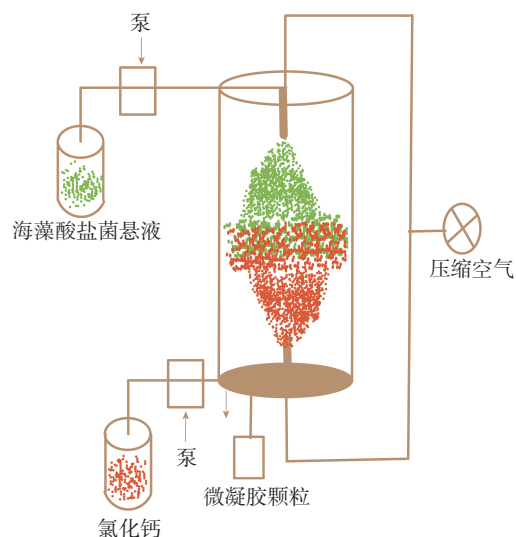


图 4 撞击气溶胶技术示意图

Fig.4 Schematic diagram of impact aerosol technology

此外,用撞击气溶胶法封装的乳酸菌存在酸化问题,即菌体在发酵过程中会代谢产生各种有机酸,导致培养基中水解后的小分子物质进一步降解,从而提高了该阶段废水的可生化性^[44]。这可能是因为培养基中的糖分会通过聚合物涂层材料扩散至微胶囊内的乳酸菌,进一步被代谢成有机酸^[43]。在高酸和胆盐条件下,用撞击气溶胶法制备的多孔状乳酸菌海藻酸钠大微胶囊(直径约 2 mm)和小微胶囊(10~40 μm)的作用效果相近^[43]。因此,粒径大小不是影响用这种方法所得产品中乳酸菌活性的主要因素,从而为加工工艺的变通和控制提供了便利。

3.2 乳滴法

乳滴是通过将一种液体分散到另一种不混溶的液体中形成的^[45]。乳滴法用于菌体加工的原理是,基于不连续相和连续相之间的相互作用,在分散的液体中加入益生菌细胞使其封装^[46]。操作时,先将细胞分散在少量的水基聚合物悬浮液(分散相)中,随后将其添加到大量的油/有机相(连续相)中,借助表面活性剂对混合物进行机械均质化后形成油包水乳液。在这种方法中,当水溶性生物聚合物不溶时,就会在油相中形成凝胶珠,通过过滤或离心可得^[47-48]。

在制药和食品工业领域,乳滴技术可以被用于提高目标化合物的溶解度、生理活性和稳定性^[49];常用包封材料有,阿拉伯胶、刺槐豆胶、海藻酸盐、 κ -角叉菜胶、醋酸邻苯二甲酸纤维素、羧甲基纤维素钠、壳聚糖、麦芽糖糊精、乳清蛋白、鹰嘴豆蛋白、明胶、改性淀粉和脱脂奶粉(SMP)凝乳酶等^[50]。

将乳滴法用于包封乳酸菌时,考虑到细菌细胞的亲水特性,可用亲水性胶体包封菌体^[51]。在这种情况下,水胶体材料会在固化剂的作用下形成封装剂。即将含有微生物细胞和非离子化固化剂的水胶体溶液加入油包水乳液(W/O)的油连续相中,所用固化剂可将分散相液滴与连续相分离^[52];pH 变化导致固化剂电离,形成能够从乳液连续相中分离的颗粒^[53]。如果分散相是水相,则称为油包水(W/O)乳剂,而相反的乳剂称为水包油(O/W)乳剂或反相^[54]。

Shu 等^[55]以黄原胶和瓜尔豆胶为水相,以葵花籽油为脂相包封植物乳杆菌,显著提高了菌体在酸奶中的存活率,表现为耐酸性提高。Huerta-Vera 等^[56]用 MRS 肉汤、葡萄油和乳清蛋白浓缩物三种以 $W_1/O/W_2$ 形式包封鼠李糖乳杆菌 LC705,所得产品是在蔗糖高渗溶液中保持较高的存活率($>8 \lg \text{CFU/mL}$)。Wang 等^[51]则用海藻酸钠(W_1)、大豆油(O)和纤维素溶液(W_2)包封嗜酸乳杆菌 AS 1.2686,显著提高了菌体的 14 d 内存活率,并在模拟胃肠道条件下保持 84% 的存活率;而游离菌体的活性则在相同条件下则会快速下降,30 min 内由 $8 \lg \text{CFU/mL}$ 降至 $2 \lg \text{CFU/mL}$,至 120 min 时完全死亡,尤其是在酸性条件(pH1.5)的对比效果更为明显。此外,用海藻酸盐和碳酸钙分别作为包封剂和固化剂包封双

歧杆菌 BB-12,提高了所得产品中菌体在模拟胃液和模拟肠液中存活率(未包封的双歧杆菌在同样条件下的死亡数量是包封菌的 7.05 倍),以及 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 60 d 时活菌数($7.88 \lg \text{CFU/mL}$)^[57];用果胶、菊粉和米糠的混合物通过乳滴法包封嗜酸乳杆菌 LA-5,包封率达到 90%,所得产品在模拟胃肠液中菌体存活率和 25 $^{\circ}\text{C}$ 下储存 120 d 时存活率均得到显著提高(分别提高了 3.18 倍和 2.38 倍)。同时发现,使用混合材料可以增加产品的粒径^[58]。但是,使用海藻酸盐和乳清蛋白分离物的混合物包封嗜酸乳杆菌 PTCC 1643,所得产品粒径更小(33~180 μm),适用于食品加工,并且将菌体在模拟胃肠液中的存活率提高了 2.66 倍^[59]。由此可见,通过使用乳滴法,可以用食品材料包封乳酸菌,提高菌体在模拟胃肠液中的存活率。

3.3 静电喷雾法

静电喷雾是一种液体雾化的方法,也称为电流体动力雾化。其原理是,施加到毛细管中液滴上的电场能够使液滴的界面变形,电荷在液滴内部产生静电力,该静电力与液滴的表面张力竞争,形成泰勒锥;通过在毛细管上使用高压产生的静电力克服液滴的表面张力,将纳米级的较小带电液滴从初级液滴中喷射出来^[60]。由于电荷的库仑排斥力,液滴分散良好,在飞向收集器的过程中不会聚结,并以单锥形喷射模式最为理想。总体来讲,静电喷雾具有稳定性和可重复性好、方便快捷、经济高效、条件温和、适应性强等优点^[61]。静电喷雾用设备如图 5 所示。

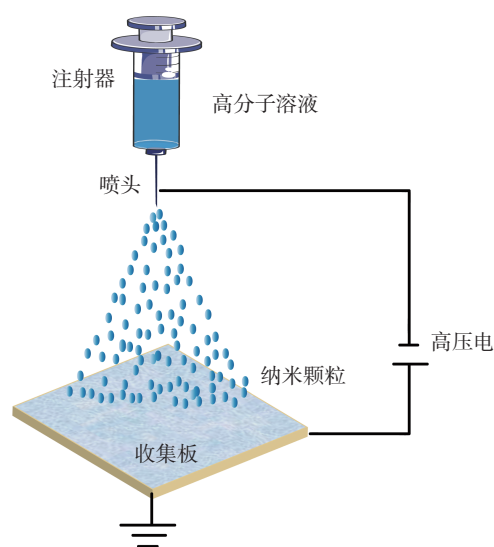


图 5 静电喷雾装置原理图

Fig.5 Schematic diagram of electrostatic spray device

Chaline 等^[62]通过静电喷雾技术,以海藻酸钠或海藻酸钠-柠檬酸果胶基质为封装剂,制备了植物乳植杆菌 BL011 微胶囊;所得产品中植物乳植杆菌 BL011 在口服递送和冷藏条件下的存活率均显著高于游离菌体,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下保持活力超过 6 个月,在天然橙汁和模拟胃液和肠液中孵育 120 min 时的菌体存活率也有

显著提高(从 4.5 lg CFU/mL 提升到 9 lg CFU/mL),使在不用冷链运输的食品或饮料中加入植物乳植杆菌成为可能。

综上所述,已经开发了一些能够有效提高乳酸菌胃肠耐受性的新技术。然而,值得一提的是,这些研究结果多为体外评价结果,未见体内应用效果的实用价值评价。这一点还需要深入研究。此外,不同研究所用菌种和评价指标并不相同,难以进行直接对比。

3.4 植物多酚盔甲法

植物多酚是一类来源于植物的天然大分子化合物,结构中含有两个以上酚羟基和芳香环^[63],具有很好的抗氧化活性,主要用于食品行业,防止食物氧化,提高食品品质^[64-65]。最近研究发现,这些多酚类物质能够在菌体表面形成一层多孔状纳米盔甲(图 6),有效提高菌体的生物活性^[66],以及与抗生素之间通过多重作用,吸附益生菌周围的抗生素,提高益生菌的抗生素耐受性^[67]。值得一提的是,多酚类物质这种保护作用能够在益生菌分裂并突破这层保护壳后继续发挥作用,可使冻干后盔甲化益生菌能够在适当条件下快速复苏。

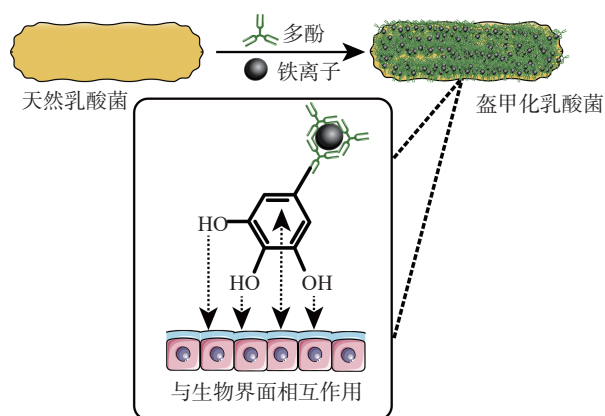


图 6 乳酸菌的多酚纳米盔甲

Fig.6 Polyphenol nano armor of lactic acid bacteria

Luo 等^[68]通过单宁酸和三价铁离子的配位作用,在大肠杆菌 Nissel 1917 表面形成一个多酚涂层,通过邻苯三酚和儿茶酚等粘附性基团促使菌体在组织表面的有效定殖,使得菌体在小鼠肠道定殖量增加了近 40 倍。将这种技术应用于制备乳酸菌肠溶胶囊,使得即使在持续使用抗生素的情况下,乳酸菌仍能成功定殖于腹泻大鼠的肠道,而且肠道定殖率也提高了 45 倍;同时,这种多酚涂层还能发挥抗炎、抗氧化的协同作用效应^[69],表现出很好的应用前景。如前所述,使用多酚类物质还能有效提高乳酸菌在加工过程中的氧气耐受力,提高产品中活菌数^[70]。综上,通过在菌体表面加载多酚涂层,不仅能够提高乳酸菌在肠道中的定殖能力,还能发挥多酚本身功能的协同作用,并能通过抗氧化作用提高菌体对氧气的耐受性。这种技术在制备乳酸菌肠溶胶囊和提高产品中活菌数方面表现出很好的应用潜力,并在功能食品和药品设计方面有着很好的应用前景。

4 结论与展望

随着人们对乳酸菌益生功效认识的不断提升,乳酸菌产品的市场需求量不断增大。为了进一步提高产品中活菌数,保护剂、微胶囊、预处理、静电纺丝等方法已经被开发出来以提高菌体的热加工耐热性;通过使用含羟基化合物、氧气清除剂或厌氧雾化介质,以及减少培养基中氨基酸含量,提高了乳酸菌加工过程的氧气耐受性。上述方法有效地提高了乳酸菌在加工过程中的存活率,产品中活菌数,以及菌体在产品贮存过程中的存活率。但是,大多数研究结果是基于体外评价效果而得,尚需通过体内实验进一步验证。

近年来,撞击气溶胶法、乳滴法、静电喷雾法、植物多酚盔甲法等一些新技术在提高乳酸菌的胃肠环境耐受性和肠道定殖数量等方面表现出很好的应用潜力。由于不同研究用菌种、处理环境、结果计算方式等方面的差异性,并不能准确地判断出哪种方法最优;同理,某篇文章中所得最优方法也不一定适用于其它菌种和实验中没有考虑到的条件。实际应用中仍需补充实验进行对比选择,而不宜不加判别地直接采用。近年来的研究结果和新技术有效地拓展了未来的研究思路和研究方向。相信随着研究的不断深入、旧技术的不断改进,乳酸菌的加工耐热性、贮藏稳定性、胃肠中的活性都会不断地提升和改进,从而促进高质量、高活性乳酸菌制剂的加工与生产。

参考文献

- [1] 王立芳. 乳酸菌的益生特性及应用研究进展[J]. *农产品加工*, 2019(11): 86-88. [WANG Lifang. Research progress on probiotic properties and application of lactic acid bacteria[J]. *Agricultural Products Processing*, 2019(11): 86-88.]
- [2] 杜兰威, 单蕊, 赵蕾, 等. 乳酸菌的功能及其在食品工业中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(13): 221-224. [DU Lanwei, SHAN Rui, ZHAO Lei, et al. Function of lactic acid bacteria and their application in food industry[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(13): 221-224.]
- [3] SHEHATA A A, YALÇIN S, LATORRE J D, et al. Probiotics, prebiotics, and phytochemical substances for optimizing gut health in poultry[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 395.
- [4] MERENSTEIN D, POT B, LEYER G, et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2185034.
- [5] BODKE H, JOGDAND S. Role of probiotics in human health[J]. *Cureus*, 2022, 14(11): e31313.
- [6] 杭锋, 陈卫. 益生乳酸菌的生理特性研究及其在发酵果蔬饮料中的应用[J]. *食品科学技术学报*, 2017, 35(4): 33-41. [HANG Feng, CHEN Wei. Study on physiological characteristics of probiotic lactic acid bacteria and their application in fermented fruit and vegetable beverages[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 35(4): 33-41.]
- [7] ABESINGHE A M N L, PRIYASHANTHA H, PRASANNA P H P, et al. Inclusion of probiotics into fermented buffalo (*Bubalus bubalis*) milk: An overview of challenges and opportunities[J]. *Fermentation*, 2020, 6(4): 121.
- [8] PEIGHAMBARDUST S H, TAFTI A G, HESARI J. Appli-

- cation of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2011, 22(5): 215–224.
- [9] HADINIA N, EDALATIAN DOVOM M R, YAVARMA-NESH M. The effect of fermentation conditions (temperature, salt concentration, and pH) with *Lactobacillus* strains for producing short chain fatty acids[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 165: 113709.
- [10] CHEN B, WANG X, LI P, et al. Exploring the protective effects of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* under optimized cryoprotectants formulation[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 173: 114295.
- [11] JAWAN R, ABBASILIASI S, TAN J S, et al. Influence of type and concentration of lyoprotectants, storage temperature and storage duration on cell viability and antibacterial activity of freeze-dried lactic acid bacterium, *Lactococcus lactis* Gh1 [J]. *Drying Technology*, 2022, 40(9): 1774–1790.
- [12] GWAK H J, LEE J H, KIM T W, et al. Protective effect of soy powder and microencapsulation on freeze-dried *Lactobacillus brevis* WK12 and *Lactococcus lactis* WK11 during storage[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(6): 2155–2160.
- [13] WANG G Q, PU J, YU X Q, et al. Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(4): 3066–3075.
- [14] PERDANA J, FOX M B, SIWEI C, et al. Interactions between formulation and spray drying conditions related to survival of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 [J]. *Food Research International*, 2014, 56: 9–17.
- [15] KHEM S, BANSAL V, SMALL D M, et al. Comparative influence of pH and heat on whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum* A17 during spray drying[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 54: 162–169.
- [16] SUNNY-ROBERTS E O, KNORR D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders[J]. *International Dairy Journal*, 2008, 19(4): 209–214.
- [17] PINTO S S, VERRUCK S, VIEIRA C R W, et al. Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium*-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 64(2): 1004–1009.
- [18] SOUZA M, MESQUITA A, VERÍSSIMO C, et al. Microencapsulation by spray drying of a functional product with mixed juice of acerola and ciriguela fruits containing three probiotic *lactobacilli* [J]. *Drying Technology*, 2020, 40(6): 1185–1195.
- [19] WAKAI T, KANO C, KARSENS H, et al. Functional role of surface layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* L-92 in stress tolerance and binding to host cell proteins[J]. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2021, 40(1): 33–42.
- [20] CHEN M J, TANG H Y, CHIANG M L. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefirano-faciens* M1 [J]. *Food Microbiology*, 2017, 66: 20–27.
- [21] ZHANG C, HAN Y, GUI Y, et al. Influence of nitrogen sources on the tolerance of *Lactocaseibacillus rhamnosus* to heat stress and oxidative stress[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2022, 49(5): kuac020.
- [22] VALERIANO V D, PARUNGAO-BALOLONG M M, KANG D K. *In vitro* evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(2): 485–497.
- [23] LIU B, FU N, WOO M W, et al. Heat stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its cellular membrane during droplet drying and heat treatment[J]. *Food Research International*, 2018, 112: 56–65.
- [24] SERRAZANETTI D I, GUERZONI M E, CORSETTI A, et al. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli[J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(7): 700–711.
- [25] GAO X, KONG J, ZHU H, et al. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Lactococcus* response to environmental stress: Mechanisms and application of cross-protection to improve resistance against freeze-drying[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(2): 802–821.
- [26] PAÉZ R, LAVARI L, VINDEROLA G, et al. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion[J]. *Food Research International*, 2012, 48(2): 748–754.
- [27] SHIN Y, KANG C H, KIM W, et al. Heat adaptation improved cell viability of probiotic *Enterococcus faecium* HL7 upon various environmental stresses[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2019, 11(2): 618–626.
- [28] SONIA K, F H S, SHALAKA S, et al. Adaptation of *Lactobacillus acidophilus* to thermal stress yields a thermotolerant variant which also exhibits improved survival at pH 2[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 10(4): 717–727.
- [29] ZHANG C, LU J, YANG D, et al. Stress influenced the aerotolerance of *Lactobacillus rhamnosus* hsrlyfm 1301 [J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(4): 729–735.
- [30] AJALLOUEIAN F, GUERRA P R, BAHL M I, et al. Multi-layer PLGA-pullulan-PLGA electrospun nanofibers for probiotic delivery[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 123: 107112.
- [31] SHAHRIAR S M S, MONDAL J, HASAN M N, et al. Electrospinning nanofibers for therapeutics delivery[J]. *Nanomaterials*, 2019, 9(4): 532.
- [32] CHEW S Y, WEN Y, DZENIS Y, et al. The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2006, 12(36): 4751–4770.
- [33] HUANG Z M, ZHANG Y Z, KOTAKI M, et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites[J]. *Composites Science and Technology*, 2003, 63(15): 2223–2253.
- [34] AMPARO L R, ESTER S, YOLANDA S, et al. Encapsulation of living bifidobacteria in ultrathin PVOH electrospun fibers[J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(10): 2823–2829.
- [35] FENG K, ZHAI M Y, ZHANG Y, et al. Improved viability and thermal stability of the probiotics encapsulated in a novel electrospun fiber mat[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(41): 10890–10897.
- [36] FUNG W Y, YUEN K H, LIONG M T. Agrowaste-based nanofibers as a probiotic encapsulant: Fabrication and characterization[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(15): 8140–8147.

- [37] SCHÖPPING M, ZEIDAN AHMAD A, FRANZÉN CARL J. Stress response in *Bifidobacteria*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2022, 86(4): e00170–21.
- [38] 杨森, 宋馨, 刘欣欣, 等. 提高双歧杆菌耐氧性研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2021, 57(2): 129–133. [YANG Miao, SONG Xin, LIU Xinxin, et al. Research progress on improving oxygen tolerance of *Bifidobacterium*[J]. *Food and Fermentation Science and Technology*, 2021, 57(2): 129–133.]
- [39] OLUWATOSIN S O, TAI S L, FAGAN-ENDRES M A. Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic-towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic[J]. *Biotechnology Reports*, 2022, 33: e00696.
- [40] CHEN H Y, LI X Y, LIU B J, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 29: 248–255.
- [41] GHANDI A, POWELL I B, HOWES T, et al. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: A laboratory and pilot scale study[J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 113(2): 194–200.
- [42] SOHAIL A, TURNER M S, COOMBES A, et al. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1): 162–168.
- [43] MISRA S, PANDEY P, DALBHAGAT C G, et al. Emerging technologies and coating materials for improved probiotication in food products: A review[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2022, 15(5): 998–1039.
- [44] WANG H C, CHENG H Y, WANG S S, et al. Efficient treatment of azo dye containing wastewater in a hybrid acidogenic bioreactor stimulated by biocatalyzed electrolysis[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2016, 39: 198–207.
- [45] ALE E C, ROJAS M F, REINHEIMER J A, et al. *Lactobacillus fermentum*: Could EPS production ability be responsible for functional properties?[J]. *Food Microbiology*, 2020, 90: 103465.
- [46] FRAKOLAKI G, GIANNOU V, KEKOS D, et al. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(9): 1515–1536.
- [47] HEIDEBACH T, FÖRST P, KULOZIK U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2012, 52(4): 291–311.
- [48] AREPALLY D, REDDY R S, GOSWAMI T K, et al. A review on probiotic microencapsulation and recent advances of their application in bakery products[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2022, 15(8): 1677–1699.
- [49] ALEMZADEH I, HAJIABBAS M, PAKZAD H, et al. Encapsulation of food components and bioactive ingredients and targeted release[J]. *International Journal of Engineering, Transactions A: Basics*, 2020, 33(1): 1–11.
- [50] SAIFULLAH M, SHISHIR M R I, FERDOWSI R, et al. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2019, 86: 230–251.
- [51] WANG L, SONG M, ZHAO Z, et al. *Lactobacillus acidophilus* loaded pickering double emulsion with enhanced viability and colon-adhesion efficiency[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 121: 108928.
- [52] ZHANG Y, LIN J, ZHONG Q. S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 804–810.
- [53] ZHANG R, ZHOU L, LI J, et al. Microencapsulation of anthocyanins extracted from grape skin by emulsification/internal gelation followed by spray/freeze-drying techniques: Characterization, stability and bioaccessibility[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 123: 109097.
- [54] GOIBIER L, PILLEMENT C, MONTEIL J, et al. Preparation of multiple water-in-oil-in-water emulsions without any added oil-soluble surfactant[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2020, 590: 124492.
- [55] SHU G, HE Y, CHEN L, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* by xanthan-chitosan and its stability in yoghurt[J]. *Polymers*, 2017, 9(12): 733.
- [56] HUERTA-VERA K, FLORES-ANDRADE E, PÉREZ-SATO J A, et al. Enrichment of banana with *Lactobacillus rhamnosus* using double emulsion and osmotic dehydration[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2017, 10(6): 1053–1062.
- [57] HOLKEM A T, RADDATZ G C, NUNES G L, et al. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 71: 302–308.
- [58] RADDATZ G C, DE SOUZA DA FONSECA B, POLETTO G, et al. Influence of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the viability of pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal gelation/emulsification[J]. *Powder Technology*, 2020, 362: 409–415.
- [59] DEHKORDI S S, ALEMZADEH I, VAZIRI A S, et al. Optimization of alginate-whey protein isolate microcapsules for survivability and release behavior of probiotic bacteria[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 190(1): 182–196.
- [60] BOCK N, DARGAVILLE T R, WOODRUFF M A. Electro-spraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art[J]. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37(11): 1510–1551.
- [61] KRÖMMELBEIN C, XIE X, SEIFERT J, et al. Electron beam treated injectable agarose/alginate beads prepared by electro-spraying[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 298: 120024.
- [62] COGHETTO C C, BRINQUES G B, SIQUEIRA N M, et al. Electro-spraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 24: 316–326.
- [63] TAPIERO H, TEW K D, BA G N, et al. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2002, 56(4): 200–207.
- [64] PRETI R, TAROLA A M. Study of polyphenols, antioxidant capacity and minerals for the valorisation of ancient apple cultivars from Northeast Italy[J]. *European Food Research and Technology*, 2021, 247(1): 273–283.
- [65] 王梦丽. 植物多酚结构、生物学活性研究及其保鲜应用

- [D]. 厦门: 厦门大学, 2019. [WANG Mengli. Study on the structure, biological activity of plant polyphenols and their application of freshness[D]. Xiamen: Xiamen University, 2019.]
- [66] ANTONIO J E, OVE D L, BAHRAM D, et al. *In vitro* antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats[J]. [Journal of Agricultural and Food Chemistry](#), 2003, 51(18): 5540–5545.
- [67] GUO J, TARDY B L, CHRISTOFFERSON A J, et al. Modular assembly of superstructures from polyphenol-functionalized building blocks[J]. [Nature Nanotechnology](#), 2016, 11(12): 1105–1111.
- [68] LUO H, WU F, WANG X, et al. Encoding bacterial colonization and therapeutic modality by wrapping with an adhesive drug-loadable nanocoating[J]. [Materials Today](#), 2023, 62: 98–110.
- [69] PAN J, GONG G, WANG Q, et al. A single-cell nanocoating of probiotics for enhanced amelioration of antibiotic-associated diarrhea[J]. [Nature Communications](#), 2022, 13(1): 2117.
- [70] PENA F L, SOUZA M C, VALLE M C P R, et al. Probiotic fermented milk with high content of polyphenols: Study of viability and bioaccessibility after simulated digestion[J]. [International Journal of Dairy Technology](#), 2021, 74(1): 170–180.