

鼠李糖乳杆菌肠溶性微胶囊的制备研究

刘月静 闫 杨¹ 王帅珂¹ 丁 壮² 韩 军² 陈 芳¹

(1.聊城大学 药学院,山东 聊城 252059;2.聊城大学 生物制药研究院,山东 聊城 252059)

摘 要 益生菌在储存过程中对环境因素(热,氧和湿度)高度敏感,加之胃肠液的破坏作用,导致益生菌到达肠道后活菌数大大降低而不能很好地发挥益生效果.鼠李糖乳杆菌菌株 L427(*Lactobacillus rhamnosus* L427)是由本实验室分离保存的益生菌菌株,为提高鼠李糖乳杆菌菌株 L427 到达肠道后的存活率,采用微胶囊技术对鼠李糖乳杆菌菌株 L427 进行微囊化.以海藻酸钠和刺云实胶为壁材,采用挤压法制备鼠李糖乳杆菌菌株 L427 微胶囊,以活菌数和包埋产率为评价指标,探究其最佳制备工艺.结果表明:通过单因素正交试验确定了鼠李糖乳杆菌菌株 L427 微囊化最佳工艺条件为海藻酸钠浓度 2.0%,刺云实胶浓度 0.5%,氯化钙浓度 0.3 mol/L,菌液-壁材体积比 1:6;在此条件下进行验证试验,所得鼠李糖乳杆菌菌株 L427 微胶囊的活菌数达 4×10^8 CFU/g,包埋产率为 94.51%.经模拟胃液处理 1.0 h 后存活率为 54%,在模拟肠液中处理 1.5 h 后释放菌体完全,为 7.64 log(CFU/g),表明该微胶囊具有良好的胃酸环境耐受性和肠溶性.为该菌剂的工业化生产奠定理论基础.

关键词 鼠李糖乳杆菌菌株 L427;微胶囊;包埋产率;肠溶性;胃酸耐受性

中图分类号 Q939.9

文献标识码 A

0 引言

益生菌是一类当人和动物食用足够数量时可产生健康益处的活性微生物,它可以发挥调节肠道菌群、清除胆固醇、增强机体免疫力以及清除毒素的益生作用.由于积极的健康影响,近年来消费者对食品中功能性益生菌的需求迅速增加.但根据国际乳业联合会(IDF)规定,含有益生菌的产品在食用时活菌数量达到 10^6 (CFU/g)才能发挥益生效果^[1].然而,益生菌在储存过程中对环境因素(热,氧和湿度)高度敏感,加之胃肠液的破坏作用,导致益生菌到达肠道后活菌数大大降低而不能很好地发挥益生效果.因此,探究保护益生菌并使更多活菌输送到肠道中的方法具有重要意义.在这个意义上,微胶囊化被认为是最有效的方法之一,它已经被证明不仅可以提高微生物耐酸性,肠溶性,而且可以在其掺入食物基质期间保护微生物,同时在储存期间也具有隔离环境和保护的作用^[2].

海藻酸钠对益生菌具有较好的保护作用,因此成为当前最常选用的微胶囊壁材之一,然而越来越多的研究发现海藻酸钠胶体存在多孔的特征,因而其不能彻底有效地抵抗胃酸环境的破坏作用^[3].是以,选用海藻酸钠复合壁材制备微胶囊的研究越来越多. Babu^[4]等选用藻酸盐与淀粉联合制备副干酪乳酸菌微胶囊,结果表明该微囊具备良好的耐热性、抗酸碱性.戚薇等^[5]通过交联海藻酸钠和壳聚糖制备的双层微胶囊具有比海藻酸钠微胶囊更好的耐酸性,模拟胃液处理后的存活率为 75%.刺云实胶是一类高分子量多糖类物质,它由半乳糖甘露聚糖构成^[6],与刺槐豆胶具有很多相似的特性:良好的溶解性、稳定性、高粘性,与其它胶体有很好的协同作用,且与刺槐豆胶相比价格低廉来源广泛,因此现已作为新型食品添加剂增稠剂.

收稿日期:2018-12-30

基金项目:国家自然科学基金项目(31401799);山东省抗体制药协同创新中心开放课题(CIC-AD1816);泰山学者工程专项资金等资助

通讯作者:陈芳,女,汉族,博士,副教授,研究方向:微生物与生物制药,E-mail:chenfang20045@163.com.

鼠李糖乳杆菌是目前为止人类研究最广泛的益生菌之一^[7]。鼠李糖乳杆菌 GG(*Lactobacillus rhamnosus* GG)在人类免疫和健康方面起着重要作用,已被普遍用于各种益生菌剂的研发^[8]。美国康萃乐,一种儿童益生菌膳食补充剂,它的主要成分就是 *Lactobacillus rhamnosus* GG,已在市场上得到了广大消费者的认同。本实验室欲对新得到的一株鼠李糖乳杆菌为 L427 对象,通过挤压法对鼠李糖乳杆菌菌株 L427 进行微胶囊化,以活菌数和包埋产率为指标,考察了海藻酸钠、刺云实胶、氯化钙及菌液-壁材体积比对微胶囊的影响,得到最优工艺配方。然后以最优配方制备微胶囊,测定该微胶囊在模拟胃液中的耐受性和在模拟肠液中的释放特性。为该菌剂的工业化生产奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料. 鼠李糖乳杆菌菌株 L427(*Lactobacillus rhamnosus* L427):分离于干乳酪,由本实验室保存。

1.1.2 试剂. MRS 肉汤/琼脂培养基:杭州百思生物技术有限公司;胰蛋白酶(1:250)、胃蛋白酶(1:3000); 麦克林;猪胆盐(胆盐含量 $\geq 65\%$):MYM;海藻酸钠:山东优秀化工科技有限公司;刺云实胶:江苏青木生物科技有限公司;无水氯化钙:西陇科学股份有限公司。

1.2 仪器与设备

5PX-15085H-II 生化培养箱:上海新苗医疗器械制造有限公司;5804R 离心机:德国-EPPendorf 公司;752 型紫外可见分光光度计:上海舜宇恒平科学仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌器:德强仪器;SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台:江苏通净净化设备有限公司;BSD-TX270 台式恒温振荡器:上海博讯实业有限公司医疗设备厂;8S-1 型磁力搅拌器:江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 活菌计数. 采用平板菌落计数法^[9]。

1.3.2 包埋产率计算方法. 准确称取 1.0 g 微胶囊置于 9 mL 解囊液中,37 °C 180 r/min 振荡 1 h 以确保菌体完全释放。然后制备悬浮液的系列稀释液,取 100 μ L 涂布平板,倒置于 37 °C 恒温培养箱中厌氧培养 24 h,并计数菌落数,结果表示为每克微胶囊的活菌数(CFU/g)。所得结果乘以微胶囊的总重量记为 N_0 ,微胶囊化前的菌液壁材混合液中的活菌数记为 N 。包埋产率 x 按公式计算

$$x = N_0 / N \times 100\%.$$

1.3.3 主要溶液配制. 模拟胃液^[10]:配制 2 g/L NaCl 溶液,调 pH 至 2.5,121 °C 高压灭菌 15 min;取 3 g 胃蛋白酶,加入到 NaCl 溶液中溶解,然后用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。模拟肠液^[11]:称取 KH_2PO_4 6.8 g 加入 500 mL 蒸馏水溶解,然后调 pH 为 6.8,121 °C 灭菌 15 min;另称取胰蛋白酶 10 g,溶于适量的无菌水,然后与 KH_2PO_4 溶液混合均匀,定容至 1000 mL,最后用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。解囊液的配制:分别称取 NaH_2PO_4 和 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 14.2 g、9.6 g,加蒸馏水溶解定容至 1000 mL,然后调节 pH 为 7.5,121 °C 灭菌 15 min,备用。

1.3.4 菌种的活化与菌悬液的制备. 将冻存于 -20 °C 的菌株接种至 MRS 肉汤培养基中,37 °C 静置厌氧培养 24 h,连续活化三代后用于后续实验。取 2% 活化好的菌液于 MRS 肉汤培养基中 37 °C 培养 14 h 后,离心(4000 r/min, 4 °C, 10 min),弃去上清。用 PBS 缓冲液调整菌液浓度约 10^9 CFU/mL,精确活菌数采用平板菌落计数法^[9]测定。

1.3.5 微胶囊的制备. 将菌悬液与高温灭菌后的海藻酸钠-刺云实胶溶液混合均匀后,用无菌注射器(23G)将菌混悬液挤压入磁力搅拌的无菌 CaCl_2 溶液中,常温下固化 30 min,通过重力沉降从 CaCl_2 溶液中回收微胶囊,然后用滤纸过滤,三次水冲洗 3 次除去多余氯化钙和盐类,即得到湿微胶囊。

1.3.6 单因素实验. 以微胶囊活菌数(CFU/g)和包埋产率(%)为评价指标,测定海藻酸钠浓度、刺云实胶浓度、氯化钙浓度、菌液-壁材体积比四个因素对微胶囊形成的影响。固定刺云实胶浓度 0.4%,氯化钙浓度 0.2 M,菌液-壁材体积比 1:6 条件下,测定不同海藻酸钠浓度(1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)对微胶囊形成

的影响;固定海藻酸钠浓度 1.5%,氯化钙浓度 0.2 M,菌液-壁材体积比 1:6 条件下,测定不同刺云实胶浓度(0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%)对微胶囊形成的影响;固定海藻酸钠浓度 1.5%,刺云实胶浓度 0.4%,菌液-壁材体积比 1:6 条件下,测定不同氯化钙浓度(0.15 mol/L、0.2 mol/L、0.25 mol/L、0.3 mol/L)对微胶囊形成的影响;固定海藻酸钠浓度 1.5%,刺云实胶浓度 0.4%,氯化钙浓度 0.2 M 条件下,测定不同菌液-壁材体积比(1:2、1:4、1:6、1:8、1:10)对微胶囊形成的影响.重复三次.

1.3.7 正交实验.根据单因素实验结果,选取海藻酸钠浓度(A)、刺云实胶浓度(B)、氯化钙浓度(C)、菌液-壁材体积比(D)四个因素,以微胶囊活菌数(CFU/g)和包埋产率(%)为指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验,确定最佳工艺条件(表 1).重复三次.

表 1 正交实验因素水平表

水平因素	1	2	3
海藻酸钠浓度(A)/%	1.0	1.5	2.0
刺云实胶浓度(B)/%	0.4	0.5	0.6
CaCl ₂ 溶液浓度(C)/M	0.20	0.25	0.30
菌液壁材体积比(D)	1:4	1:6	1:8

1.3.8 微胶囊在模拟胃液中的耐受性.取 1.0 g 微胶囊和相当数量活菌数的菌悬液分别置于 9.0 mL 模拟胃液(pH 2.5)中,于 37℃下 150 r/min 处理 0.5 h 和 1.0 h 后,离心收集菌体,测定其存活率^[12].重复三次.

1.3.9 微胶囊的释放特性.取 1 g 微胶囊置于 9.0 mL 无菌模拟胃液(pH 2.5)中 1 h 后,取出 100 μ L 模拟胃液活菌计数,测定微胶囊菌体释放情况;然后离心收集微胶囊转入模拟肠液中,于 37℃处理 0.5、1.0、1.5、2、3 h 后取出 100 μ L 肠液活菌计数,测定微胶囊菌体释放情况.重复三次.

2 结果与分析

2.1 海藻酸钠浓度对鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊活菌数和包埋产率的影响

由图 1 可知,随着海藻酸钠浓度升高,所制备微胶囊的活菌数和包埋产率都是先升高然后又下降.海藻酸钠浓度为 1.0%时,活菌数和包埋产率最低;海藻酸钠浓度为 2.0%时,活菌数和包埋产率均最高,分别为 1.81×10^8 CFU/g 和 57.92%;当海藻酸钠浓度小于 2.0%时,活菌数和包埋产率呈升高趋势,而当海藻酸钠浓度大于 2.0%时,活菌数和包埋产率却下降.分析其原因,可能是海藻酸钠浓度太低时,形成的微胶囊囊壁薄,强度较小,搅拌过程中对微胶囊机械损伤大,使菌体不能很好地被包埋起来,导致活菌数和包埋率较低;随着海藻酸钠浓度升高,形成的微胶囊囊壁变厚,强度变大,搅拌过程中机械损伤变小,因此活菌数和包埋产率升高;但当海藻酸钠浓度太高时,壁材溶液的黏度变大,因此在制备微胶囊时混合液出现粘连现象,且菌液与壁材溶液不易混合,导致微胶囊制备难度变大,制得的微胶囊粒径过大且活菌数和包埋率下降.

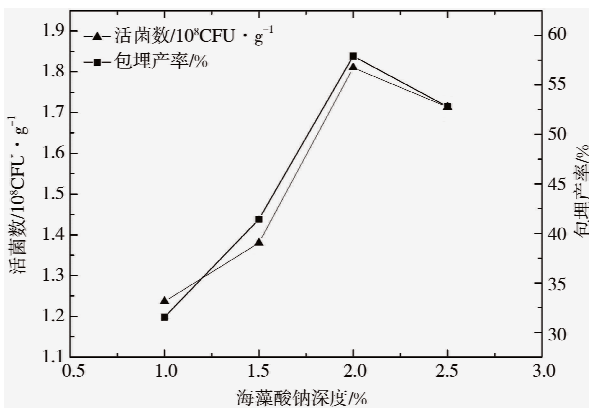


图 1 海藻酸钠浓度对鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊活菌数和包埋产率的影响

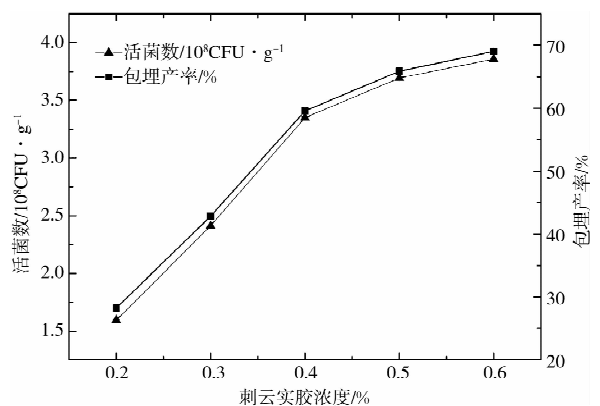


图 2 刺云实胶浓度对鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊活菌数和包埋产率的影响

2.2 刺云实胶浓度对鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊活菌数和包埋产率的影响

由图 2 可知,随着刺云实胶浓度升高,所制备微胶囊的活菌数和包埋产率都是逐渐升高.刺云实胶浓度为 0.6% 时,活菌数和包埋产率均最高,分别为 3.86×10^8 CFU/g 和 69.01%.刺云实胶溶解性好,可以在低浓度时获得高黏度溶液^[13],添加剂量范围一般为 0.1%~1%.而在实际实验过程中,刺云实胶浓度 0.7% 时,壁材溶液黏度已不适合微胶囊的制备.因此选择刺云实胶实验浓度范围为 0.2%~0.6%.分析实验结果原因,可能是当刺云实胶浓度低时,形成的微胶囊囊壁厚,强度较小,搅拌过程中对微胶囊有破坏作用,导致活菌泄漏,随着刺云实胶浓度升高,形成的微胶囊囊壁厚,强度变大,破坏作用变小,因此活菌数和包埋产率变高.

2.3 氯化钙浓度对鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊活菌数和包埋产率的影响

由图 3 可知,随着氯化钙浓度升高,所制备微胶囊的活菌数和包埋产率都是先升高然后基本维持不变.氯化钙浓度为 0.25 mol/L 时,活菌数和包埋产率分别为 2.65×10^8 CFU/g 和 68.47%,氯化钙浓度为 0.3 mol/L 时,活菌数和包埋产率分别为 2.67×10^8 CFU/g 和 68.81%,活菌数和包埋产率基本保持不变.分析其原因,可能是当氯化钙浓度小于 0.25 mol/L 时,溶液中可与海藻酸钠结合的 Ca^{2+} 含量随着氯化钙浓度的增加而增加,因此形成的微胶囊强度越大,活菌数和包埋产率越高;而当氯化钙浓度大于 0.25 mol/L 时,活菌数和包埋产率基本保持不变,可能是因为海藻酸钠与 Ca^{2+} 的结合已达到饱和,没有多余的空间提供给 Ca^{2+} ^[14].

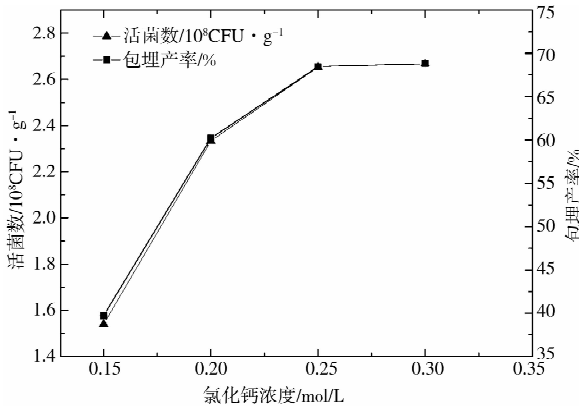


图 3 氯化钙浓度对鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊活菌数和包埋产率的影响

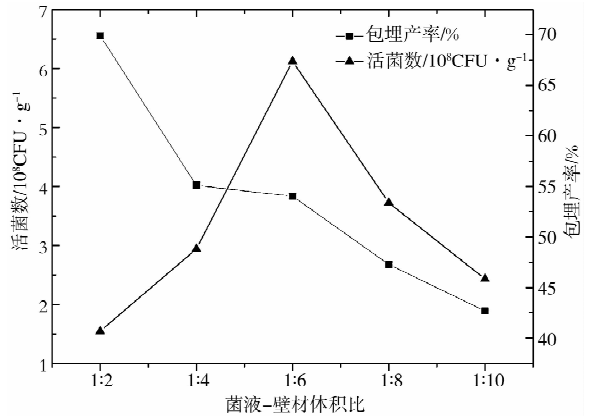


图 4 菌液-壁材体积比对鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊活菌数和包埋产率的影响

2.4 菌液-壁材体积比对鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊活菌数和包埋产率的影响

由图 4 可知,随着菌液-壁材体积比增大,所制备微胶囊的活菌数逐渐下降,包埋产率先升高然后大幅下降.分析其原因,可能是当菌液-壁材比为 1:2 时,加入的原始菌体较多,故测得活菌数(CFU/g)多,但菌液-壁材体积比太低,制备的微胶囊囊壁厚,强度小,导致包埋产率低;随着菌液-壁材体积比增大,加入的原始活菌减少,故测得活菌数(CFU/g)呈下降趋势,而制备的微胶囊囊壁变厚,强度变大,包埋产率故升高;而当菌液-壁材体积比过大时,菌液与壁材溶液出现混合不均现象,导致包埋产率下降.综合考虑活菌数和包埋产率结果,选取菌液-壁材体积比 1:6 为最优水平,活菌数和包埋产率分别为 4.02×10^8 CFU/g 和 67.38%.

2.5 正交实验

由表 2 可知,极差大小顺序为菌液-壁材体积比(D)>海藻酸钠浓度(A)>刺云实胶浓度(B)>氯化钙浓度(C).因此,菌液-壁材体积比对实验结果影响最大,其次是海藻酸钠浓度和他拉胶浓度,氯化钙浓度影响最小.由平均数可知,A 因素以 A_3 为最优水平,B 因素以 B_2 为最优水平,C 因素以 C_3 为最优水平,D 因素以 D_2 为最优水平.综合考虑最优水平组合为 $A_3B_2C_3D_2$,即海藻酸钠浓度 2%,刺云实胶浓度 0.5%,氯化钙浓度 0.3 mol/L,菌液-壁材体积比 1:6.在此条件下进行 3 次平行试验,所得鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊的活

菌数和包埋产率分别为 4×10^8 CFU/g 和 94.51 %。

表 2 正交实验设计与结果

试验号	A	B	C	D	活菌数($\times 10^8$ CFU/g)	包埋产率/%
1	1	1	1	1	4.78	64.25
2	1	2	2	2	4.83	90.64
3	1	3	3	3	3.86	84.50
4	2	1	2	3	2.39	63.82
5	2	2	3	1	4.08	65.92
6	2	3	1	2	3.68	78.70
7	3	1	3	2	4.01	89.42
8	3	2	1	3	3.53	82.56
9	3	3	2	1	4.45	71.85
K1	239.39	217.49	225.51	202.02		
K2	208.44	239.12	226.31	258.76		
K3	243.83	235.05	239.84	230.88		
k1	79.79	72.49	75.17	67.34		
k2	69.48	79.71	75.44	86.25		
k3	81.28	78.35	79.95	79.96		
R	11.80	7.21	4.78	18.91		

2.6 微胶囊在模拟胃液中的耐受性

胃酸环境对益生菌有酸破坏作用,导致活菌数大大降低,因此,制备的益生菌微胶囊必须具有保护益生菌抵制胃酸破坏的能力.由图 5 可知,未包埋的菌悬液经胃液处理 0.5 h 后,活菌存活率急速降低,表明这个时间段胃酸环境对菌体产生强大破坏作用;处理 1.0 h 后,活菌存活率降至 31 %。微胶囊经胃液处理 0.5 h 后,活菌数也急速降低,而 0.5-1.0 h 时间段内活菌数几乎没有减少,存活率维持在 54 %。朱永明^[15]等研究鼠李糖乳杆菌微胶囊在模拟胃液中的活性,结果表明微胶囊经胃液处理前 1.0 h 内活菌数大量降低,而 1.0 h 后维持稳定.这与本研究结果类似.分析微胶囊 1.0 h 内存活率的变化趋势,0.5 h 内存活率急速降低可能是因为微胶囊表面吸附了大量菌体,在短时间内分散到了胃液中,因而遭到了胃酸环境的破坏;而 0.5 h 后微胶囊活菌存活率几乎未变,表明胃酸环境对包埋在微胶囊内的菌体不能发挥破坏作用,只能对暴露在胃液中菌体起到破坏作用,微胶囊对菌体起到了保护作用。

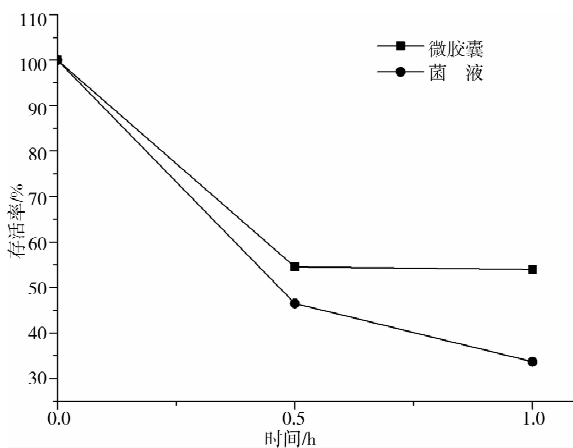


图 5 微胶囊在模拟胃液中的耐受性

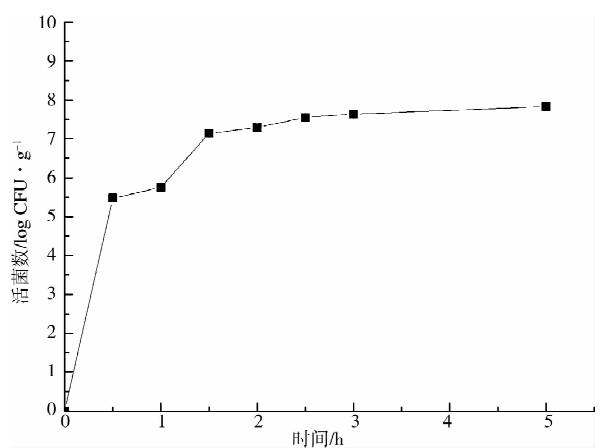


图 6 微胶囊的释放性

2.7 微胶囊的释放特性

肠溶性微胶囊不仅要求微胶囊能抵抗胃酸环境的破坏,也要能在肠道顺利释放菌体.因此研究微胶囊的胃肠释放特征是必然的.先将微胶囊置于模拟胃液 1.0 h,然后将微胶囊转移至模拟肠液中处理 4.0 h.这模拟了微胶囊被人体摄取时所经历的胃肠道运输环境,从而考察微胶囊在人体胃肠道运输过程中的释放特性。

由图6可知,微胶囊在胃液中处理0.5 h时,迅速释放活菌数 $5.47 \log(\text{CFU/g})$,1.0 h时释放活菌数只略微增加.这与微胶囊在模拟胃液中活菌存活率变化趋势相对应.微胶囊转入肠液处理0.5 h后,迅速释放活菌达 $7.14 \log(\text{CFU/g})$,处理1.5 h后释放活菌数基本稳定在 $7.64 \log(\text{CFU/g})$,表明微胶囊具有较好的肠溶性. Gebara C^[16]研究以果胶与乳清蛋白为壁材的嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* La5微胶囊在模拟肠道中释放时间为5.0 h; Shi L E^[17]等研究藻酸盐-牛奶包埋的保加利亚乳杆菌在模拟肠道中的释放特性,结果表明包埋菌体完全释放时间为1.0 h,而本研究微胶囊在肠道中释放时间为1.5 h,表明不同包埋材料及实验方法得到的微胶囊肠溶性不同,本研究所制备微胶囊肠溶性好.

3 结论

本研究采用挤压法制备鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊,确定了微囊化最佳包埋工艺条件为海藻酸钠浓度2%,刺云实胶浓度0.5%,氯化钙浓度0.3 mol/L,菌液-壁材体积比1:6时;在此条件下进行验证试验,所得鼠李糖乳杆菌 L427 微胶囊的活菌数和包埋产率分别 $4 \times 10^8 \text{ CFU/g}$ 和94.51%.然后测定该微胶囊的胃酸耐受性和肠溶性,经模拟胃液处理0.5 h后,菌体存活率迅速下降且之后存活率几乎维持不变,1.0 h后存活率仍为54%;在模拟肠液中处理1.5 h后释放菌体维持稳定,约 $7.64 \log(\text{CFU/g})$ 左右,表明该微胶囊具有良好的胃酸环境耐受性和肠溶性.虽然该实验最终得到的微胶囊具有较高的包埋产率以及良好的胃酸环境耐受性和肠溶性,但仍有许多需要优化的方面.微胶囊粒径和储存稳定性也是制备最佳微胶囊的重要影响因素,因此下一步可考虑在本研究基础上对微胶囊进行冻干或喷雾干燥,从而延长微胶囊储存期以及对微胶囊粒径进行优化,以期得到性能更佳的微胶囊.

参 考 文 献

- [1] Ouwehand A C, Salminen S J. The health effects of cultured milk products with viable and nonviable bacteria [J]. International Dairy Journal, 1998, 8(9): 749-758.
- [2] Martin M J, Lara-Villoslada F, Ruiz M A, et al. Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 27: 15-25.
- [3] 邹强,袁鹏,刘小鸣,等.不同蛋白质包埋壁材对益生菌在人体模拟胃液中的保护效果[J].食品工业科技,2012,33(13):60-63.
- [4] Babu R, Sabikhi L, Thompkinson D K. Microencapsulation for enhancing the survival of probiotic *Lactobacillus paracasei* S233 [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2009, 46(4): 325-330.
- [5] 戚薇,杨泽宇,杜连祥.双歧杆菌微胶囊的制备和稳定性研究[J].现代食品科技,2005,21(4):35-40.
- [6] 尹胜利,陈艳燕,孙瑾,等.新型食品添加剂增稠剂-刺云实胶的特性及其在食品中的应用[J].中国食品添加剂,2007(4):108-109.
- [7] Ewaschuk J B, Naylor J M, Chirino-Trejo M, et al. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves [J]. Canadian Journal of Veterinary Research-revue Canadienne De Recherche Veterinaire, 2004, 68(4): 249-253.
- [8] Sunny Roberts E O, Knorr D. Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress [J]. Food Microbiology, 2008, 25(1): 183-189.
- [9] 黄序,戚薇,王建玲,等.肠溶性双歧杆菌微胶囊的初步研究[J].药物生物技术,2002,9(2):105-109.
- [10] Bao Y. Studies on fermentation characteristic and hypolipidemic effects of *Lactobacillus plantarum* P8 [D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2011.
- [11] Huang C H, Qiao S Y, Li D, et al. Effects of *Lactobacilli* on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs [J]. Asian-Australian Journal of Animal Sciences, 2004, 17(3): 401-409.
- [12] Li X Y, Chen X G, Sun Z W, et al. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393 [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83: (4): 1479-1485.
- [13] 尹胜利,陈艳燕,孙瑾,等.新型食品添加剂增稠剂-刺云实胶的特性及其在食品中的应用[J].中国食品添加剂,2007(4):108-110.
- [14] Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, et al. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(1): 27-35.

- [15] 朱永明,杜玲玲,李晓东,等. 胶囊化鼠李糖乳杆菌在模拟胃肠道中活性的研究 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(12): 23-29.
- [16] Gebara C, Chaves K S, Maria Cecilia E Ribeiro, et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions [J]. Food Research International, 2013, 51(2): 872-878.
- [17] Shi L E, Li Z H, Li D T, et al. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117(1): 99-104.

Preparation of Enteric Microcapsulated of *Lactobacillus Rhamnosus*

LIU Yue-jing¹ YAN Yang¹ WANG Shuai-ke¹ ZHANG Yue-peng¹

DING Zhuang² HAN Jun² CHEN Fang¹

(1. School of pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. Biopharmaceutical Research Institute,

Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract The number of viable bacteria was greatly reduced and the probiotic effect was not well exerted after the probiotics reached the intestine, it was caused that probiotics were highly sensitive to environmental factors (heat, oxygen and humidity) during storage and the damaging effects of gastrointestinal fluids. *Lactobacillus rhamnosus* strain L427 isolated and preserved in our laboratory microcapsules was microencapsulated in order to improve the survival rate in the intestine. The *Lactobacillus rhamnosus* strain L427 were prepared by extrusion method and the sodium alginate and thorn cloud glue were used as the wall material. The viable cell count and embedding yield were used as evaluation indexes to explore the optimal preparation process. The results showed that The optimal conditions for microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* strain L427 were determined by single factor orthogonal test to be sodium alginate concentration 2%, thorn cloud solid glue concentration 0.5%, calcium chloride concentration 0.3 mol/L, and bacterial liquid-wall material volume ratio 1:6. The viable cell count and embedding yield of the *Lactobacillus rhamnosus* L427 microcapsules prepared by this method were 4×10^8 CFU/g and 94.51%. The survival rate of microcapsules treated with simulated gastric juice for 1.0 h was 54%, and 7.64 log (CFU/g) of cells were completely released treated with simulated intestinal juice for 1.5 h, indicating that the microcapsules have good gastric acid tolerance and enteric solubility, which Laid the theoretical foundation for the industrial production of the microbial agent.

Key words *Lactobacillus rhamnosus* L427; microcapsules; embedding yield; enteric solubility; gastric acid tolerance