

微滴喷射法制备植物乳杆菌微胶囊的试验研究

张宇琪, 彭 湑, 周新丽

(上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093)

摘要: 植物乳杆菌在维持人体健康方面起着重要的作用, 但在生产加工过程中以及在胃肠道内消化后, 活菌数降低, 严重影响益生效果。本研究采用微滴喷射系统装置制备植物乳杆菌微胶囊, 以微胶囊包埋率为评价指标, 确定海藻酸盐、低酯果胶和卵磷脂复合壁材的最佳浓度组合。结果表明, 海藻酸钠质量浓度 1% kg/L, 卵磷脂质量浓度 1% kg/L, 低酯果胶质量浓度 0.75% kg/L, 氯化钙浓度 0.4 mol/L 时, 微胶囊的包埋率达到最高 89.05%。微胶囊经模拟胃液处理 2 h 后菌体存活率为 62.3%, 活菌数为 4.38×10^9 cfu/mL; 经模拟肠液处理 2 h 后几乎完全释放, 活菌数达 7.14×10^9 cfu/mL。以海藻酸盐、低酯果胶和卵磷脂为复合壁材, 微滴喷射法制备植物乳杆菌微胶囊减少了菌体受环境的侵害, 提高了菌体在宿主体内的存活率。

关键词: 植物乳杆菌; 微胶囊; 低酯果胶; 卵磷脂; 微滴喷射

中图分类号: Q 93-336; Q 93-338 **文献标志码:** A

Experimental study on preparation of *Lactobacillus plantarum* microcapsules by micro-droplet spray

ZHANG Yuqi, PENG Tian, ZHOU Xinli

(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: *Lactobacillus plantarum* plays an important role in maintaining human health. However, during the production process and after digestion in the gastrointestinal tract, the reduction in the number of viable bacteria seriously affects the probiotic effect. In this study, the micro-droplet spray system was used to prepare *Lactobacillus plantarum* microcapsules. Alginate, low-ester pectin and lecithin were used as composite wall materials, and the optimal concentration combination of wall materials was determined based on the microcapsule embedding rate. The results show that when 1% kg/L sodium alginate, 1% kg/L lecithin, 0.75% kg/L low-ester pectin, and 0.4 mol/L calcium chloride are used as wall materials, the highest microcapsule embedding rate is 89.05%. After the microcapsules are treated with simulated gastric juice for 2 h, the survival rate of the bacteria is 62.3%, and the number of viable bacteria is 4.38×10^9 cfu/mL. After being treated with simulated intestinal juice, the microcapsules almost completely release after 2 h. The number of viable bacteria reaches 7.14×10^9 cfu/mL. Microencapsules of *Lactobacillus plantarum* by micro-droplet spray reduces the

收稿日期: 2021-11-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51376132)

第一作者: 张宇琪 (1998-), 女, 硕士研究生。研究方向: 微胶囊制备技术。E-mail: zzzhangyq@163.com

通信作者: 周新丽 (1979-), 女, 教授。研究方向: 微胶囊制备技术。E-mail: zjulily@163.com

damage of the bacteria by the environment and improves the survival rate of the bacteria in the host.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; microcapsule; low-ester pectin; lecithin; micro-droplet spray

益生菌具有促进营养物质消化吸收、提高机体免疫力、维持肠道菌群平衡等益生功能^[1]。植物乳杆菌作为益生菌的一种, 具有免疫调节、降低血液胆固醇水平和心血管疾病发病率等诸多益生功能^[2]。为了在宿主上发挥其益生功能, 在生产加工、储存和胃肠道消化期间应确保有足够数量的活细胞。但是, 在各阶段菌体的生存力受如底物浓度、环境 pH 等因素影响, 难以保证菌体的存活率, 大大减少了植物乳杆菌的益生效果^[3]。微胶囊技术是对益生菌细胞进行微囊化包封的一种有效保护方式^[4], 可以提高菌体对不利条件的抵抗力, 从而减少活性损失。

封装益生菌的壁材是提高益生菌存活率的关键因素之一。目前常用的益生菌封装壁材分为多糖、蛋白质和脂质三大类^[5]。海藻酸钠是最常用的微生物封装壁材之一, 但其多孔结构、在过量 Ca^{2+} 情况下凝胶易分解等特点干扰益生菌的保护和释放, 因此, 可将海藻酸钠与其他天然聚合物共混以改善微囊性质^[6]。刘仁杰等^[7]将大豆分离蛋白/乳清分离蛋白和海藻酸钠等制备成蛋白质-多糖复配壁材用于植物乳杆菌的包埋, 实现了植物乳杆菌的高效率封装。因胶凝原理近似, 海藻酸钠与低酯果胶复配体系水溶液在钙离子存在下具有协同胶凝特性, 有利于植物乳杆菌的高效封装^[8-9]。Chun 等^[10]以海藻酸钠和吉兰糖胶/阿拉伯胶为多糖-多糖复合壁材制备植物乳杆菌微胶囊, 包封率高于单一壁材。而脂质通常用作药物载体, 目前使用脂质作为益生菌微囊化壁材的研究较少^[5]。新型复合壁材研究是目前益生菌微胶囊研究值得探索的一个重要方向, 复合壁材的浓度配比也是影响益生菌包埋的重要因素, 有必要对其进行壁材优化, 从而获取最高的封装效率。

为了保护益生菌活细胞免受不利环境因素的影响并将其传递到肠道, 益生菌微胶囊化封装技术的选择尤为重要。挤压法常用于益生菌的封装^[11-12], 但挤压法制备的微胶囊粒径相对较大(2~5 mm 左右), 微胶囊化过程较缓慢, 不利于规模化生产。乳化法微囊化细胞生长快、细胞漏出少, 模拟胃肠道条件下的细胞存活率高, 但该方法不能

准确地控制微胶囊的尺寸范围和形状^[13]。微滴喷射法是将空气流和壁材-菌悬液构成共流, 利用气流将菌悬液快速吹打成微滴, 直接喷入交联剂中实现凝胶化。微滴喷射法能够减小微囊尺寸、增加微囊产量, 试验过程快速且温和, 可实现益生菌的高效封装。文献^[14]通过使用与空气压缩机相连的雾化喷头成功地将耐酸乳杆菌 La-14 封装在抗性淀粉、壳聚糖和藻酸盐中, 微胶囊的大小为 55~70 μm 。

本文以海藻酸盐、低酯果胶和卵磷脂为壁材原料, 利用微滴喷射系统制备植物乳杆菌微胶囊, 首先对微滴喷射的氮气流速进行优化, 其次通过单因素和正交试验确定复合壁材浓度, 最后对制备的植物乳杆菌微胶囊的耐酸性和肠溶性进行测试。微滴喷射法制备植物乳杆菌微胶囊为益生菌微胶囊的生产制备与壁材优化提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

植物乳杆菌, 杜邦中国集团有限公司上海分公司; 海藻酸钠、低酯果胶、卵磷脂、无水氯化钙、柠檬酸钠(分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 胃蛋白酶(酶活力 1:10000)、胰蛋白酶(酶活力 1:250), 生工生物工程(上海)股份有限公司。

二氧化碳培养箱(MCO18AC, 松下医疗器械有限公司, 日本)、高压灭菌锅(HRLM-80, 青岛海尔特种电器有限公司)、低温离心机(ST16r, 赛默飞技术(北京)有限公司)、光学显微镜(CFI60, 尼康, 日本)。

1.2 主要溶液的配制

乳酸细菌(MRS)培养基: 牛肉膏 10.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, 无水乙酸钠 5.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 柠檬酸二氢 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.58 g, KH_2PO_4 2.0 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 吐温 80 1.0 mL, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.5, 121℃ 灭菌 20 min。

模拟胃液: 0.2% kg/L 的 NaCl 溶液, 加入浓盐酸调至 pH 1.5, 加入胃蛋白酶(1g/100 mL, 酶活

力1:10000)充分溶解,过滤除菌,现配现用。

模拟肠液:6.8 g KH_2PO_4 , 500 mL 去离子水,加入0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调至 pH 7.4,加入 10 g 胰蛋白酶(酶活力 1:250),完全溶解后定容至 1000 mL,过滤除菌,现配现用。

1.3 微滴喷射微囊化装置搭建

图 1 为微滴喷射微囊化系统示意图。系统主要由氮气流输送装置、菌悬液注射装置、喷射喷嘴、收集装置等部分组成。氮气流输送装置由氮气瓶提供氮气流,通过流量计调节氮气流速,双表头减压器调节氮气出口压力。菌悬液注射装置由微注射泵按一定速度推动微注射器,匀速稳定地注射微生物细胞悬液,微注射器出口端选用内径为 0.16 mm 的平口针头,平口针头出口端连接内径 0.3 mm 的聚四氟乙烯软管,输送微生物细胞悬浮液^[15-16]。软管的另一端连接喷射喷嘴,该喷嘴由 200 μL 的移液器枪头和 25G 的尖口针头制作而成,如图 2 所示,将移液器枪头尖端切去 2 mm 后,用针头从距枪头尖端 2 cm 处侧面插入,直至针头露出枪头尖端 2 mm。接收装置采用的是 50 mL 的无菌离心管。

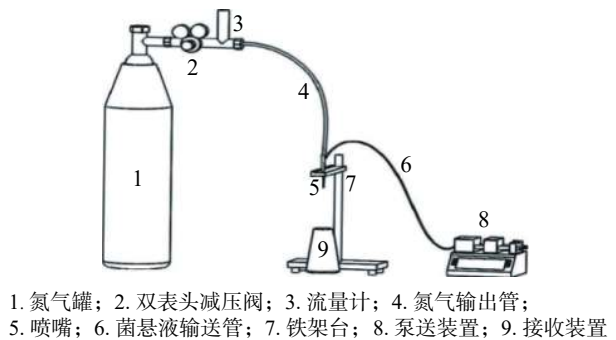


图 1 微滴喷射装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of micro-droplet spray device

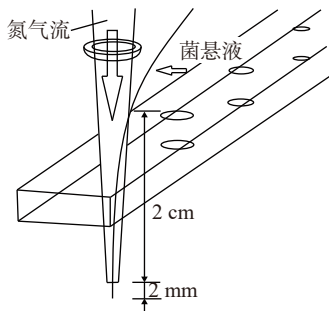


图 2 形成微滴的共流原理图

Fig.2 Cocurrent schematic diagram of droplet formation

微滴喷射系统的工作原理是:由氮气流和壁材-菌悬液构成共流,在氮气流剪切作用下将含

有益菌微生物细胞的菌悬液吹打成微滴,产生的微滴直接喷入下方盛有氯化钙的收集装置中。因产生的微滴体积足够小,凝胶速率会明显提升,微滴与氯化钙直接接触易实现凝胶固化。进行喷射实验时,由氮气流和含有益生菌的菌悬液构成共流,在菌悬液的分子挤压及氮气流剪切的机械力作用下,于喷嘴处形成微液滴。

1.4 植物乳杆菌微胶囊的制备

植物乳杆菌培养及菌悬液制备:将菌粉溶解并接种至已灭菌冷却的 MRS 固体培养基上 37℃ 恒温传代培养 2~3 次,完全活化后挑取单个菌落接种到 MRS 液体培养基中壮大,在 4℃ 条件下经 6000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用无菌生理盐水洗涤 2 次后离心并等体积重悬于生理盐水中。

壁材配制:按一定浓度配制海藻酸钠-低酯果胶-卵磷脂复合壁材溶液,并将收集得到的菌体加入到复合壁材溶液中,按菌:壁材为 1:4 的比例混合均匀。用无菌注射器吸取适量混合液,固定在微滴喷射系统的泵送装置上,泵送速度设置为 200 $\mu\text{L}/\text{min}$,氮气速度设置为 3 L/min,将菌和壁材的混合液喷入氯化钙溶液中进行凝胶反应,静置 30 min,4 000 r/min 离心 5 min 后去上清液收集微胶囊,并用无菌生理盐水洗涤 2 次,再次离心收集植物乳杆菌微胶囊。

1.5 微胶囊的性能测定

粒径大小:随机抽取微滴喷射制备的植物乳杆菌微胶囊若干,置于显微镜下拍照获取放大 40 倍的微胶囊照片,每组样本选取 3 个视野,设置 3 次平行实验。拍摄的照片用 Image-Pro Plus 处理软件对微胶囊粒径大小进行测量统计。

包埋率:取 1 mL 植物乳杆菌微胶囊,加入 9 mL 浓度为 0.06 mol/L 的无菌柠檬酸钠解囊液,放置在恒温摇床中 37℃,180 r/min 振荡使其完全崩解后,梯度稀释平板点样法进行菌落计数(cfu/mL)。包埋率计算公式为

$$E = (a/b) \times 100\% \tag{1}$$

式中: E 为包埋率; a 为微胶囊包埋菌落数; b 为初始菌液菌落数。

1.6 壁材优化试验设计

a. 单因素试验。

海藻酸钠质量浓度:低酯果胶质量浓度 0.75% kg/L,卵磷脂质量浓度 0.75% kg/L,氯化钙浓度 0.4 mol/L,海藻酸钠浓度分别为 0.5%, 1%,

1.5%, 2%, 2.5% kg/L。

低酯果胶质量浓度：海藻酸钠质量浓度 1.5% kg/L，卵磷脂质量浓度 0.75% kg/L，氯化钙浓度 0.4 mol/L，低酯果胶质量浓度分别为 0.25%，0.5%，0.75%，1%，1.25% kg/L。

卵磷脂质量浓度：海藻酸钠质量浓度 1.5% kg/L，低酯果胶质量浓度 0.75% kg/L，氯化钙浓度 0.4 mol/L，卵磷脂质量浓度分别为 0.25%，0.5%，0.75%，1%，1.25% kg/L。

氯化钙浓度：海藻酸钠质量浓度 1.5% kg/L，低酯果胶质量浓度 0.75% kg/L，卵磷脂质量浓度为 1% kg/L，氯化钙浓度分别为 0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 mol/L。

用微滴喷射法制备植物乳杆菌微胶囊，测定微胶囊的粒径和包埋率。结合微胶囊的形态，分析海藻酸钠、低酯果胶、卵磷脂以及氯化钙对植物乳杆菌微胶囊粒径和包埋率的影响。

b. 正交试验。

结合单因素试验结果，以植物乳杆菌微胶囊包埋率为评价指标，对海藻酸钠、低酯果胶、卵磷脂的质量浓度（% (kg/L)）以及氯化钙浓度（mol/L）选择相对适宜的水平进行正交试验（L9(3⁴）），探索复合壁材的最佳浓度组合。

1.7 微胶囊在模拟消化道中的性能研究

微胶囊胃液耐受性试验：将益生菌微胶囊置于 37 ℃，pH 1.5 的模拟胃液中，混合均匀后放置在 37 ℃，200 r/min 的恒温摇床温育，分别在 0，30，60，90，120 min 时取样，用无菌生理盐水洗净后，加入柠檬酸钠溶液释放菌体，并用平板计数法测定活菌数。每组样品重复 3 次平行试验。

微胶囊胃肠道释放试验：将益生菌微胶囊置于 37 ℃ 模拟肠液中，混合均匀后放置在 37 ℃，200 r/min 的恒温摇床温育，分别在 0，30，60，90，120 min 时取样，稀释至合适的梯度，用平板计数法测定活菌数。每组样品重复 3 次平行试验。

2 结果与讨论

2.1 微滴喷射法制备植物乳杆菌微胶囊

壁材浓度分别为低酯果胶 0.75% kg/L，卵磷脂 0.75% kg/L，氯化钙 0.4 mol/L，海藻酸钠 1.5% kg/L，菌悬液注射速度 200 μL/min，氮气速度为 1 L/min 和 2 L/min 时，流速较慢，生成微胶囊粒径

大且不均匀；氮气流速为 4 L/min，对液面造成的压力过大，形成漩涡影响液滴凝胶的过程，从而导致微胶囊球形度较差。当氮气速度 3 L/min 时，植物乳杆菌微胶囊如图 3 所示，粒径大小分布图如图 4 所示。从图 4 中可以看出，微胶囊的粒径分布较为集中，微胶囊球形度较好，微胶囊的粒径变异系数为 4.94%，粒径均匀且可控。刘欢^[17]使用喷雾干燥法对乳酸菌进行包封，制备所得的微胶囊粒径为 15~20 μm，但其形状普遍呈不规则状，且制备过程中涉及高温，易至植物乳杆菌失活。对比挤压法、喷雾干燥等传统工艺，微滴喷射法可对微胶囊的形态及粒径大小精准控制，制备过程温和且迅速。



图 3 植物乳杆菌微胶囊
Fig.3 Lactobacillus plantarum microcapsules

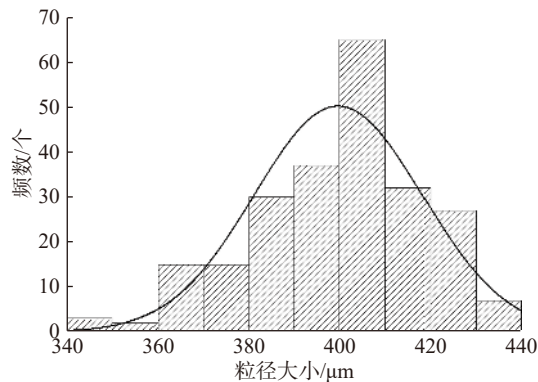


图 4 微胶囊粒径正态分布图
Fig.4 Normal distribution of microcapsule size

2.2 植物乳杆菌微胶囊制备单因素试验

使用不同浓度的壁材制备的植物乳杆菌微胶囊的粒径和包埋率如图 5 所示。

微胶囊的粒径随海藻酸钠质量浓度的增加而增加。由于海藻酸钠质量浓度过低时，微胶囊机械强度较低，从而影响包埋效果；质量浓度过高时，微滴喷射过程中导致微胶囊形状粒径分布不

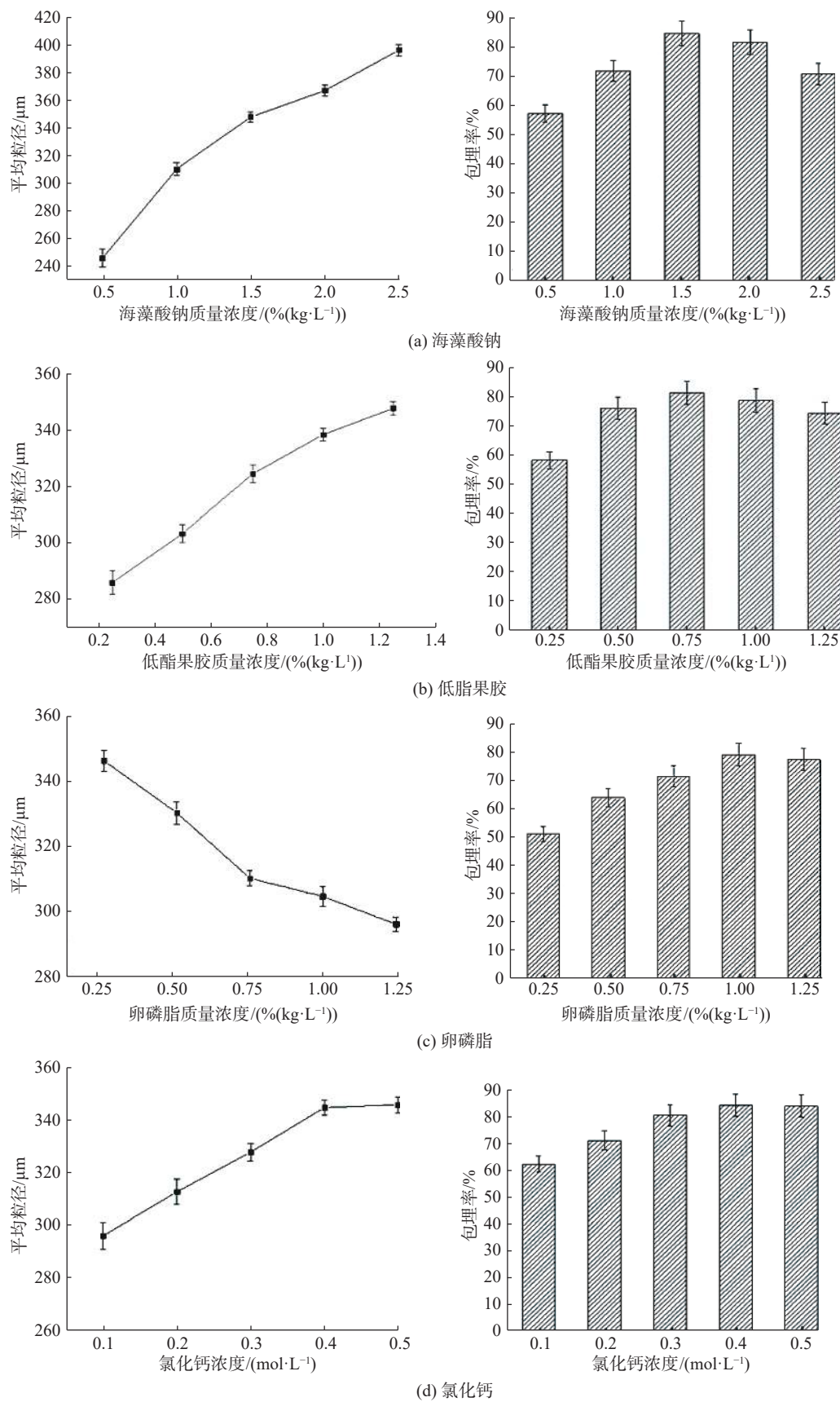


图 5 不同壁材浓度下植物乳杆菌微胶囊粒径和包埋率

Fig.5 Microcapsule size and embedding rate of *Lactobacillus plantarum* under different concentrations of biological materials

均, 包埋率下降。选取 1.5% kg/L 海藻酸钠作为适宜组分。

低酯果胶质量浓度为 0.75% kg/L 时包埋率达到最高 82.1%, 当低酯果胶质量浓度继续增大时, 微胶囊的包埋率下降。加入低酯果胶使海藻酸钙凝胶表面的多孔结构改善, 减少微滴喷射包菌过程中菌体的损失, 从而提高微胶囊的包埋率, 但质量浓度过高时, 益生菌菌体不易分散。选取 0.75% kg/L 低酯果胶作为适宜组分。

由于卵磷脂的两亲性特质, 其质量浓度的增加使得微胶囊的球形度得到了一定程度的改善。卵磷脂质量浓度增加, 粒径逐渐减小, 质量浓度为 1% kg/L 时达到最高包埋率 80.0%。选取 1% kg/L 卵磷脂作为适宜组分。

氯化钙浓度持续增大时, 微胶囊的包埋率下降。由于钙离子含量的增加, 使得海藻酸钙凝胶网络结构更致密, 微滴喷射包菌过程中菌体损失较少; 钙离子含量过高时, 结合位点少, 包埋率变化较小。选取 0.4 mol/L 为包埋植物乳杆菌的最佳氯化钙浓度。

2.3 植物乳杆菌微胶囊制备条件正交试验

在上述单因素试验结果的基础上, 以植物乳杆菌微胶囊包埋率为评价指标, 对海藻酸钠、低酯果胶、卵磷脂的浓度 (%(kg/L)) 以及氯化钙浓度 (mol/L) 选择相对适宜的水平进行正交试验 (L9(3⁴)), 确定复合壁材的最佳浓度组合。具体正交因素水平值设置如表 1 所示, 对应试验结果如表 2 所示。

表 1 正交因素水平表				
Tab.1 Level table of orthogonal factors				
水平	A海藻酸钠/ (%(kg·L ⁻¹))	B低酯果胶/ (%(kg·L ⁻¹))	C卵磷脂/ (%(kg·L ⁻¹))	D氯化钙/ (mol·L ⁻¹)
1	1	0.5	0.75	0.3
2	1.50	0.75	1.00	0.40
3	2	1	1.25	0.5

由极差分析可知, 各因素对益生菌微胶囊包埋率影响的主次顺序为: A(海藻酸钠)>D(氯化钙)>C(卵磷脂)>B(低酯果胶)。因此, 微胶囊复合壁材最佳配方为 A₁D₂C₂B₂, 即壁材浓度在海藻酸钠 1% kg/L, 氯化钙 0.4 mol/L, 卵磷脂 1% kg/L, 低酯果胶 0.75% kg/L 时的保护效果最好, 可使微胶囊的包埋率达到最高 89.05%, 显著高于其他组别。相较于姚泽晨等^[18] 以阿拉伯木聚糖与海藻酸

表 2 正交试验结果					
Tab.2 Orthogonal experimental results					
实验号	A	B	C	D	菌体包封率/%
1	1	1	1	1	80.68
2	1	2	2	2	89.05
3	1	3	3	3	84.41
4	2	1	2	3	87.89
5	2	2	3	1	86.09
6	2	3	1	2	87.29
7	3	1	3	2	81.69
8	3	2	1	3	77.45
9	3	3	2	1	78.95
K ₁	254.14	250.26	245.42	245.72	
K ₂	261.27	252.59	255.89	258.03	
K ₃	238.09	250.65	252.19	249.75	
极差R	7.73	0.78	3.49	4.10	
主次顺序	A > D > C > B				
优水平	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	

钠为壁材, 通过锐孔凝固浴法制备植物乳杆菌微胶囊的包埋率 73.60%, 使用海藻酸钠、低酯果胶与卵磷脂的复合壁材实现了较高的包埋率, 且微胶囊粒径可控。

2.4 植物乳杆菌微胶囊在模拟胃肠液中的存活试验结果

2.4.1 微胶囊在模拟胃液中的耐受性

按照前面所述的方法进行耐受性实验研究, 植物乳杆菌微胶囊及菌悬液在模拟胃液中的存活率如图 6(a) 所示。菌悬液在模拟胃液中的存活率随时间的增加急剧下降, 2 h 后降至 11.03%。包封的植物乳杆菌的存活率下降较为缓慢, 2 h 后存活率为 62.3%, 活菌数为 4.38×10⁹ cfu/mL。与植物乳杆菌菌悬液对比, 植物乳杆菌微胶囊能有效抵抗模拟胃液酸性环境的侵害。文献 [19] 在研究中发现, 由于海藻酸钠的多孔结构, 单独使用时无法有效对抗胃肠道的恶劣环境, 导致益生菌生存力下降。本研究中添加低酯果胶和卵磷脂后有助于填充海藻酸钠的孔隙, 从而在胃液环境中保护植物乳杆菌, 提高其存活率。李哲^[20] 以乳清分离蛋白、海藻酸钠、丙三醇为复合壁材, 制备了植物乳杆菌微胶囊, 菌体包埋率高达 95.31%, 并有效提高了胃胁迫存活率。

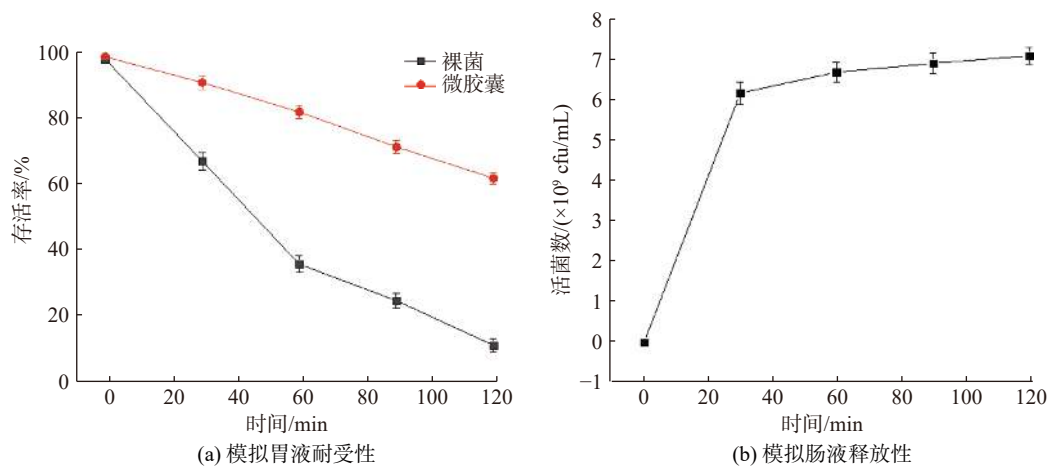


图 6 植物乳杆菌微胶囊在模拟胃肠道中的性能

Fig.6 Property of *Lactobacillus plantarum* microcapsules in simulated gastrointestinal tract

2.4.2 微胶囊在模拟肠液中的释放性

将植物乳杆菌微胶囊加入模拟肠液 (pH 6.8, 37 ℃) 中培养, 按照前面所述的方法进行肠溶性试验研究, 植物乳杆菌微胶囊在模拟肠液中的活菌数变化如图 6(b) 所示。前 0.5 h 植物乳杆菌快速释放, 之后呈缓慢趋势, 2 h 后完全释放, 活菌数达 7.14×10^9 cfu/mL。海藻酸钠、低酯果胶、卵磷脂复合壁材制备的植物乳杆菌微胶囊具有良好的肠溶性, 为菌体靶向肠道发挥益生效果奠定了基础。脂质具有良好的阻水性和阻气性, 是用于亲水性生物活性物质封装、保护和释放的良好材料。文献 [21] 使用明胶和阿拉伯树胶包裹负载益生菌的脂质微球, 研究发现脂质可在消化过程中保护益生菌, 并将其释放到肠道中, 从而确保它们的功能性。复合壁材制备的微胶囊是一种有效的益生菌保护结构, 具有较强的技术潜力。

3 总结与展望

本研究使用海藻酸盐、低酯果胶和卵磷脂为壁材原料, 采用微滴喷射法制备植物乳杆菌微胶囊, 结果证实, 复合壁材和微滴喷射法的使用使得该微胶囊具有均匀的形态和良好的肠溶性与耐酸性, 有利于后续定殖于肠道发挥其益生作用。微滴喷射法更是实现了植物乳杆菌的温和高效封装, 微胶囊的包埋率高达 89.05%。本研究为提高益生菌的存活率与耐受性, 以及包封益生菌微胶囊新型复合壁材和制备方法研究提供了新思路。本研究仅对多糖-脂质型的复合壁材浓度进行探讨, 可选取蜂蜡、硬脂酸等其他脂质进一步优化

壁材配方, 也可探寻其他天然的生物性壁材, 以实现更好的益生菌微囊化。微滴喷射法虽然可以实现植物乳杆菌的高效制备, 但过程中可能会产生细小飞沫造成菌体损失, 后续可探索如微流控等更高效稳定的微胶囊制备方法。

参考文献:

[1] FAO, WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria[R]. Córdoba, Argentina: WHO, 2001.

[2] 曲冬梅, 刘小杰. 植物乳杆菌及其在食品工业中的应用 [J]. 中国食品添加剂, 2008(S1): 219–222.

[3] DIANAWATI D, MISHRA V, SHAH N P. Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(10): 1685–1716.

[4] 宋健, 陈磊, 李效军. 微胶囊化技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.

[5] DE LA CRUZ PECH-CANUL A, ORTEGA D, GARCÍA-TRIANA A, et al. A brief review of edible coating materials for the microencapsulation of probiotics[J]. *Coatings*, 2020, 10(3): 197.

[6] RODRIGUES F J, CEDRAN M F, BICAS J L, et al. Encapsulated probiotic cells: relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications—A narrative review[J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109682.

[7] 刘仁杰, 李哲, 毛思凝, 等. 复配及多层包埋植物乳杆菌微胶囊的制备及表征 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 12–16.

[8] 徐鹏翔, 吴彩娥, 范龚健, 等. 银杏蛋白-海藻酸钠制备包埋植物乳杆菌微胶囊及其性能研究 [J]. 林业工程学报,

2019, 4(5): 70–77.

[9] 郭文丽. 海藻酸钠/果胶复配体系理化性质对其结肠药物载体性能的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2015.

[10] CHUN H, KIM C H, CHO Y H. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using external ionic gelation method[J]. *Food Science of Animal Resources*, 2014, 34(5): 692–699.

[11] LI W, LIU L M, TIAN H F, et al. Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* in cellulose based microgel with controlled release behavior and increased long-term storage stability[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 223: 115065.

[12] VAZIRI A S, ALEMZADEH I, VOSSOUGH M, et al. Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 199: 266–275.

[13] SONG H Y, YU W T, GAO M, et al. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 96(1): 181–189.

[14] DE ARAÚJO ETCHEPARE M, RADDATZ G C, DE MORAES FLORES É M, et al. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 65: 511–517.

[15] 彭湑, 张宵敏, 周新丽. 微滴喷射玻璃化的过程损伤分析及保护剂优化 [J]. *制冷学报*, 2020, 41(2): 152–158.

[16] 喻梓瑄, 张宵敏, 周新丽. 微滴喷射高通量玻璃化细胞保存的实验研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2019, 36(5): 850–855,861.

[17] 刘欢. 喷雾干燥法乳酸菌微胶囊的制备及其在仔猪体内的应用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2016.

[18] 姚泽晨, 张根义. 植物乳杆菌微胶囊包载效果、物化性质及其胃肠道性能 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(14): 112–117,133.

[19] DE ARAÚJO ETCHEPARE M, BARIN J S, CICHOSKI A J, et al. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate[J]. *Ciência Rural*, 2015, 45(7): 1319–1326.

[20] 李哲. 植物乳杆菌的微胶囊固定化研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.

[21] SILVA M P, TULINI F L, MATOS-JR F E, et al. Application of spray chilling and electrostatic interaction to produce lipid microparticles loaded with probiotics as an alternative to improve resistance under stress conditions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83: 109–117.

(编辑：石 瑛)

[上接第 10 页]

[33] LU W H, WANG Z, HE Y Q, et al. Breast cancer detection based on merging four modes MRI using convolutional neural networks[C]//Proceedings of IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP). Brighton: IEEE, 2019: 1035–1039.

[34] AMIT G, HADAD O, ALPERT S, et al. Hybrid mass detection in breast MRI combining unsupervised saliency analysis and deep learning[C]//20th International Conference on Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention. Quebec City: Springer, 2017: 594–602.

[35] MAICAS G, SNAAUW G, BRADLEY A P, et al. Model agnostic saliency for weakly supervised lesion detection from breast DCE-MRI[C]//Proceedings of the 16th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging. Venice: IEEE, 2019: 1057–1060.

[36] HWANG S, KIM H E. Self-transfer learning for weakly supervised lesion localization[C]//Proceedings of 19th International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention. Athens: Springer, 2016: 239–246.

(编辑：董 伟)