活菌制剂保护剂的作用机制与应用前景

梁嘉倩[1,2,3,4]，章子颜[1]，安俊林[1]，周琳棚[1]，刘志佳[*1,2,3,4]，易俊洁[1,2,3,4]

（1. 昆明理工大学 食品科学与工程学院，云南 昆明 650500；2. 云南省高原特色食品预制化重点实验室，云南 昆明 650500；3. 云南省特色果蔬健康产品工程研究中心，云南 昆明 650500；4. 昆明市绿色食品加工国际科技研发中心，云南 昆明 650500）

摘要：活菌制剂因其独特的生物活性、稳定性以及便利性而被广泛应用于食品、化妆品、农业、环境治理以及医疗等多个领域。作者综述了菌种生理结构以及活菌制剂在生产加工及储藏过程中失活的影响因素，并分别列举了蛋白质、糖、脂质以及其他成分作为保护基质在活菌制剂中的作用机理，总结了不同属、不同生理状态的菌株对保护剂的不同需求，旨在为活菌制剂保护剂的开发和选择提供研究思路。

关键词：活菌制剂；细胞损伤；保护剂；作用机制；应用

中图分类号：TS 201　**文章编号：**1673-1689(2024)04-0035-11　**DOI：**10.12441/spyswjs.20231204006

Mechanism and Application Prospects of Protectants Applied in Viable Strain Formulation

LIANG Jiaqian[1,2,3,4]，*ZHANG Ziyan*[1]，*AN Junlin*[1]，*ZHOU Linpeng*[1]，*LIU Zhijia*[*1,2,3,4]，*YI Junjie*[1,2,3,4]

(1. Faculty of Food Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. Yunnan Key Laboratory for Food Advanced Manufacturing, Kunming 650500, China; 3. Yunan Engineering Research Center for Fruit and Vegetable Products, Kunming 650500, China; 4. International Green Food Processing Research and Development Center of Kunming City, Kunming 650500, China)

Abstract: Viable strain formulation is widely used in various fields including food, cosmetics, agriculture, environmental governance, and healthcare, due to their unique bioactivity, stability, and convenience. The author reviews the physiological structure of bacteria and the influencing factors leading to the inactivation of viable strain formulations during production, processing, and storage. It enumerates the mechanisms of proteins, sugars, lipids, and other components as protective matrices in viable strain formulation. Additionally, the different requirements of protectants for strains of different genera and physiological states were summarized, aiming to provide research insights for the development and selection of protectants related to viable strain formulation.

Keywords: viable strain formulation, cell damage, protectant, mechanism, application

收稿日期：2023-12-04　**修回日期：**2024-03-15

基金项目：云南省基础研究计划重点项目(202201BE070001-005)；云南省基础研究计划优秀青年基金项目(202301AW070015)；昆明理工大学“双一流”创建联合专项面上项目(202101BE070001-054)；云南省大学生创新创业训练计划项目(S202210674144)。

*通信作者：刘志佳(1989—)，女，博士，讲师，硕士研究生导师，主要从事应用微生物研究。E-mail: zhijia_liu@outlook.com

微生物作为全球数量最多、多样性最丰富、开发潜力最大的生物资源,是进行生产实践和科学研究的重要材料[1]。随着研究的深入,人们利用前沿的技术手段,通过筛选和改良野生型菌株来获得生产性能更好、综合能力更优越的基因工程菌,以满足工业生产的需求,并且不断丰富和扩充微生物资源总库[2-5]。菌种资源被广泛应用在食品、农业、化妆品及环境等领域[6-11],而活菌制剂(全文简称菌剂)是菌种资源的重要应用形式。

然而,微生物在应用的过程中容易出现不同程度的损伤,进而导致菌种活性降低和性能退化,最终影响菌种的工业价值和商用价值。在菌剂生产过程中,菌细胞在一定程度上会受到各种制剂技术的损伤,如喷雾干燥造成的热损伤、冷冻干燥带来的机械损伤和溶质损伤等。菌剂在储藏过程中也会受空气、温度以及湿度的影响,甚至可能诱发细胞的一系列应激反应,导致胞内遗传物质变异,发生菌种退化现象[12-15]。

具有独特性能的物质可以对微生物细胞起到保护作用,从而提高菌种的稳定性和活性。如采用蛋白质、多糖、油脂以及其他改性分子作为保护剂对菌株进行包埋,可以缓解制剂技术对菌细胞的损伤,并且起到隔绝外界不良环境的作用,减小各种应力对细胞的胁迫,以维持菌剂中细胞的活性。此外,益生菌还需要保护剂包埋递送,使其顺利穿过人体消化道的强酸环境,到达特定位置发挥作用。

因此,保护剂在菌剂的开发和应用中发挥着重要的作用。作者通过归纳菌株生理结构及生产和储藏过程中导致菌剂失活的各种不稳定的影响因素,阐述了不同保护基质在菌剂加工和储藏过程中对菌细胞的保护作用,同时也总结了不同属、不同生理状态的菌株对保护剂的不同需求,为菌剂保护剂的选择与应用提供研究思路。

1 菌种的结构特性

常见菌种资源主要有细菌和真菌,其生命活动基本上与细胞膜相关,菌细胞容易失活主要是因为细胞膜结构易被破坏和敏感蛋白质易变性。

细菌和真菌的细胞膜主要由磷脂双分子层和蛋白质构成,容易受外界因素的影响(见图 1)。Singh 等指出磷脂分子和蛋白质易在高温和氧气的作用下发生改变,膜脂过氧化生成的活性醛易与

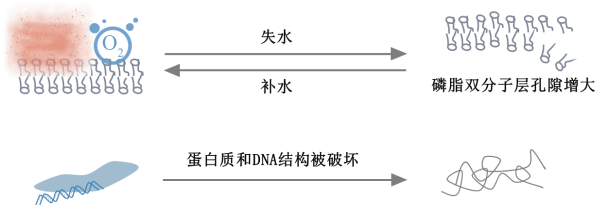


图 1 菌株细胞膜的不稳定性

Fig. 1 Instability of strain cell membrane

DNA、RNA 和蛋白质形成加合物,直接影响细胞的稳态和酶活,甚至造成 DNA 损伤和细胞死亡[16]。膜脂结构还易受干燥程度的影响。在失水和补水的情况下,磷脂分子在凝胶态和液晶态之间相互转变,在相变过程中产生孔隙,导致细胞膜通透性增大,造成胞内外物质无节制地双向交换以及细胞内容物泄漏,降低细胞活力[17]。细胞内含有较多与代谢和生命活动密切相关的酶和蛋白质,其空间构象及活性都有可能受到高温、低温和失水等因素的影响,可能导致 DNA 载体蛋白的变性,破坏 DNA 双螺旋结构的稳定性,造成菌细胞遗传物质损伤[18]。因此,采用合适的方法对细胞膜的成分、结构以及胞内敏感成分进行保护是维持细胞活性和稳定性的关键。

部分细菌和真菌能在特定情况下形成抵御极端条件的休眠体,如芽孢杆菌能形成芽孢,真菌子实体和霉菌能形成孢子。芽孢的多层次结构是抗逆的基础[19],而孢子具有较活跃的转录活性,能根据环境的不同而改变应答机制,从而使自身适应外界环境。因此,相比于营养细胞,休眠体对不良环境的耐受程度更高。但并非所有孢子都能抵御极端环境,部分孢子不是不良环境刺激的产物,对极端环境并未体现出较好的抗逆性。谢宝贵等曾在草菇厚垣孢子的相关研究中指出,草菇菌丝在营养缺乏的情况下几乎不能生成厚垣孢子,而在营养丰富的培养基中则能形成大量厚垣孢子,并且不耐低温和干旱[20]。因此,根据菌株的结构特性和生理状态来选择合适的保护基质和储藏条件对维持孢子的性能和萌发率是必要的。

2 菌剂失活的影响因素

微生物细胞结构的稳定性易受各种因素影响。制剂技术所带来的各种应力可能对菌细胞造成不同类型的损伤,如热损伤、冷冻损伤、干燥损伤以及氧化损伤等;而在菌剂保藏过程中,不良环境的胁

迫会降低菌株的活性,甚至致使菌株退化。了解菌株结构特性、受损机理以及保藏原理,降低制剂技术和环境胁迫对细胞的损害是提高菌剂储藏稳定性及保持其活性的关键。

2.1 制剂技术对细胞的损伤

常见微生物制剂技术包括乳化法、冷冻干燥法及喷雾干燥法等,这些方法均能较好保护菌细胞,但也无法避免对菌细胞造成一定损害(见图 2)。

2.1.1 机械损伤 乳化法是通过将乳化剂和菌细胞进行均质形成油包水(W/O)的乳状液再结合其他干燥技术来生产固体粉末制剂。在乳化过程中,搅拌均质在一定程度上会对细胞形成机械损伤,而后续的干燥技术则会对菌细胞造成二次伤害。如在冷冻干燥的预冻过程中,细胞内大冰晶的形成会导致细胞膜机械损伤。

2.1.2 溶质损伤 细胞内外液体中的溶质不同,凝固点和冻结速度也不同。因此,在预冻过程中,胞外比胞内先发生冻结,胞内外渗透压差造成胞内电解质过度浓缩,导致敏感的活性蛋白质变性,造成溶质损伤[21-22]。

2.1.3 干燥损伤 喷雾干燥对细胞的热损伤和干燥损伤主要来源于干燥塔的进口温度和出口温度。在菌液进入干燥塔时,较高温度使细胞表面形成高浓度缺水基质,迫使细胞内水分迅速向胞外流失,这种胁迫性的脱水机制直接导致细胞膜磷脂和胞内蛋白质受到损伤。除此之外,菌株在冻干过程中急速脱水可能会损伤胞内遗传物质,从而影响其遗传稳定性[22]。

2.1.4 高压电场冲击 电喷雾和静电纺丝等电流体动力学技术不需要施加高温,而是利用电场来降低菌剂的水分含量,具有包埋率高和粒径均匀的优点[23]。Moayyedi 等研究发现鼠李糖乳杆菌ATCC7469电喷雾制剂的细胞活性要低于冷冻干燥制剂的活性,高压电场可能导致了菌细胞损伤,且电喷雾过程中水分迅速蒸发带来的渗透冲击与高压电场相结合将进一步加重细胞的损伤[24-26]。

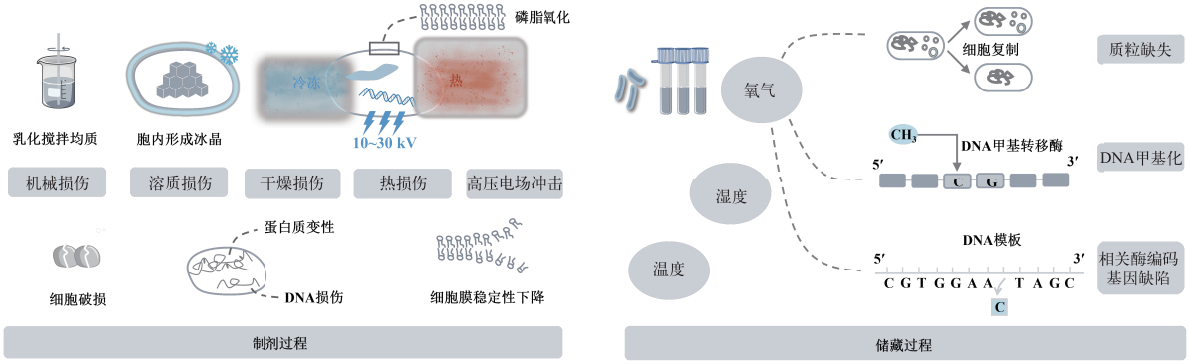


图 2 制剂过程和储藏过程中菌剂失活的影响因素

Fig. 2 Factors resulting in inactivation of viable strains formulation during production and storage

2.2 储藏环境对细胞的胁迫

部分制剂技术会影响菌细胞的活性和稳定性,储藏过程中不适宜的温度、湿度以及氧气等环境因素都可能降低菌剂的储存稳定性和菌细胞的活性。

2.2.1 温度 已有研究表明低温有利于菌剂的储藏[27],但温度过低并不适用于某些菌剂的保存。例如,乳清分离蛋白在-20 ℃的储藏条件下容易发生变性,导致菌剂中菌细胞存活率下降,对嗜酸乳杆菌 CSCC 24 的保护效果不如海藻酸钠[28]。

2.2.2 湿度 在温度和湿度较高的情况下,菌剂中的营养物质因细胞活跃的代谢活动而消耗较快,从而导致存储时间不长[29]。菌剂的水分活度较低有利于保持细胞活力和延长货架期,因此储存环境应该符合干燥的条件。但其水分活度并非越低越好,过度干燥可能去除了菌细胞中的自由水和结合水,从而对胞内蛋白质造成伤害。

2.2.3 氧气 菌剂在氧气中暴露会引发菌细胞的氧化应激反应。细胞内氧化系统和抗氧化系统的失衡可能会诱发菌株的变异退化,导致菌株生长特性改变和生产性能下降,对工业生产造成巨大损失。虽然不同菌株退化的诱因各异,但主要是源于菌株自身基因变异[30],包括质粒缺失、DNA 甲基化以及相关酶的基因缺陷。Cornillot 等在研究中发现丙酮丁醇梭菌 ATCC824 产丁醇和丙酮性能退化的原因

是形成产物的相关基因所在质粒发生了缺失[12]。在汪超等的研究中,野生型球孢白僵菌因DNA甲基化而发生退化,致使其生产性能下降和杀虫效果减弱[31-32]。还有研究表明退化现象与形成NADH基因的缺陷有关[14],如克鲁佛氏梭菌N1-4 ATCC13564在丙酮酸分解代谢途径中生成NADH酶的编码基因出现缺陷,导致目标产物丁醇的生成率下降[24]。

3 常见保护剂的分类

3.1 单一保护剂的种类

常见的保护剂主要分为蛋白质、多糖、脂质及其他成分(见表1)。蛋白质具有良好的乳化、胶凝和界面吸附等特性,具有稳定体系的作用。而多糖具有较好的持水性、增稠性和流变性,多用作体系质构的改善。脂质具有较好的热吸附性,含有不饱和脂肪酸的油脂具有良好的抗氧化性,对菌细胞有较好的抗热保护和抗氧化作用。其他成分主要包括甘油、甘露醇以及部分改性分子,通常具有经济效益好、易获得以及来源广泛的特点。

3.2 多组分保护剂复配

菌细胞活性是决定菌剂品质和效用价值的关键,如益生菌制剂的活菌数达到1×10^7 CFU/mL才能发挥益生作用[33]。保护剂的使用是维持菌剂在储藏期间细胞活性的关键。表2展示了部分研究中保护剂对菌剂的影响。

表1 常见菌剂保护剂及其分类

Table 1 Common protectants applied in viable strain formulation and their classification

常见保护剂类别	常见保护剂
蛋白质	酪蛋白、大豆分离蛋白、乳清分离蛋白、胶原蛋白、明胶
糖类	海藻糖、菊粉、蔗糖、麦芽糖、β-环糊精、淀粉、塔拉胶
油脂类	低熔点脂肪、芝麻油、椰子油、橄榄油
其他成分及改性分子	甘露醇、甘油、海藻酸盐、乳清蛋白、脱脂乳
	改性分子有酸性酪蛋白、羧甲基纤维素、甲基纤维素、羧甲基茯苓多糖、丙烯酸树脂

由于单一保护剂在结构特性和理化性能方面受到限制,往往很难满足生产加工的需求。单一成分的多糖或海藻酸盐等作为保护载体时,形成的微粒为多孔结构,对包埋物质的封闭性差,在储藏过程中容易受到环境湿度的胁迫[40],且海藻酸盐交联结构的完整性易受单价离子或者螯合剂的破坏[41],可以通过与其他材料复配来改善这一问题[42]。例如,玉米淀粉可以使海藻酸盐形成稳定的交联态,改善其多孔结构[43]。油脂可减轻高温对细胞的损伤,但其疏水性致使细胞难以均匀分散在油相中[44],而多糖具有稳定油相、提高体系亲水性能的作用[45],蛋白质能够进入油脂的酰基链,两者可形成连续的黏性界面层[46]。壳聚糖因出色的抗氧化性和成膜性而常与其他

表2 不同菌剂中保护剂的应用及其长期储藏后的活菌数

Table 2 Application of protectants in different viable preparations and the number of viable cells after long-term storage

菌种类型	保护剂成分	制剂工艺	储藏条件	活菌数	参考文献
植物乳杆菌 ATCC8014	乳清蛋白、海藻酸盐、果胶	乳化法	4 ℃储藏 180 d	$>1\times10^7$ CFU/mL	[34]
嗜黏蛋白阿克曼氏菌 DSM 22959	脱脂乳	喷雾干燥	4 ℃无氧储藏 28 d	1×10^7 CFU/g	[35]
动物双歧杆菌 BB-12	菊粉	喷雾干燥	4 ℃储藏 30 d	$>2\times10^8$ CFU/g	[29]
干酪乳杆菌 431	金枪鱼油、乳清分离蛋白、阿拉伯胶	喷雾干燥	5 ℃储藏 90 d	$>4\times10^7$ CFU/g	[36]
耐久肠球菌	乳糖	冷冻干燥	4 ℃储藏 92 d	$>1\times10^8$ CFU/mL	[37]
乳酸乳球菌 Gh1	半乳糖、海藻糖、蛋白胨	冷冻干燥	4 ℃储藏 120 d	6.66×10^9 CFU/mL	[38]
异常威克汉姆酵母 IAL 4533	脱脂乳、谷氨酸钠	冷冻干燥	室温储藏 365 d	$>1\times10^6$ CFU/mL	[39]
植物乳杆菌 IAL 4541	脱脂乳、谷氨酸钠	冷冻干燥	室温储藏 365 d	$>1\times10^8$ CFU/mL	

成分复合应用,起到修饰菌剂颗粒外壳结构的作用。

因此,通过将多种成分复合应用,可以从不同方面协同提高菌剂的活菌数量和菌剂的有效性。值得注意的是,多糖和蛋白质等成分的使用可以强化乳液体系的交联状态,并且增强体系的黏度和稳定性[45,47-48],但物料的黏度过高会影响喷雾干燥的效果,且对设备造成损害。因此,要控制好各成分使用的比例。

4 常见保护剂的作用机制

不同保护剂的物理特性和保护机制不尽相同,图 3 显示了不同保护基质在制剂过程中对菌细胞的保护作用机理。

4.1 蛋白质类保护剂

蛋白质是一种天然的高分子聚合物,有良好的水合性、乳化性、溶解性、胶凝性、黏附性以及成膜性。蛋白质的黏附性使其能够较好地捕捉细胞并且吸附在细胞表层,形成隔热屏障[49]。蛋白质表面的极性基团能与周围水分子发生水合作用,因此黏附在细胞表面的蛋白质在一定程度上可以缓解干燥带来的损伤。低相对分子质量胶原蛋白对植物乳杆菌、乳酸乳球菌、粪肠球菌、双歧杆菌及嗜热链球菌等乳酸菌有着更好的冷冻保护作用[50]。乳清蛋白能形成保护膜包裹细胞,适用于冷冻干燥制剂。但也有研究指出,乳清蛋白所含的乳糖在高温条件下可能会与蛋白质发生美拉德反应[51],这对菌株在储藏期间所产生的影响还有待研究。相较而言,几乎不含乳糖的乳清分离蛋白可能有着更好的稳定性和保护性。

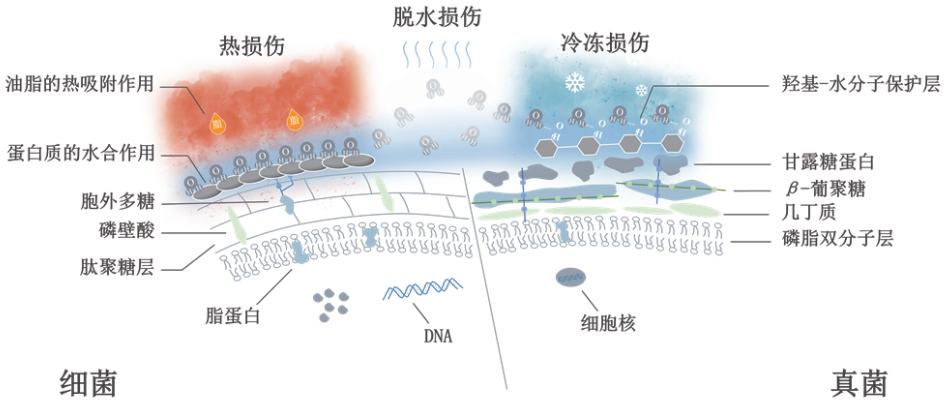


图 3 不同保护剂对细胞的作用机理

Fig. 3 Mechanism of different protectants on cells

4.2 糖类保护剂

多糖具有良好的持水性,能保护菌细胞免受剧烈脱水引起的损伤。其持水性体现在结构中的羟基与细胞膜、细胞器膜或蛋白质极性基团形成众多氢键,或是在蛋白质表面形成水化层,在细胞急剧脱水时进行置换,以维持细胞中蛋白质大分子和细胞膜的稳定性[52]。其中,海藻糖通过取代大分子结构中的极性氨基酸残基周围水分子的方式,对膜蛋白起到稳定的作用[53]。同时海藻糖分子的交联可提高体系中微粒的玻璃态转化温度[54],使其在高温下仍保持较好的稳定性,有效保护包埋在内层的菌细胞。菊粉是一种具有高玻璃态转化温度的益生多糖,在加热干燥时形成的玻璃态保护层能抑制菌剂的吸湿性[55],并且减弱细胞的氧化应激反应。

4.3 油脂类保护剂

油脂类基质能与细胞的疏水端结合,包裹在细胞表层,减轻细胞的热损伤和氧化损伤。Liu 等在研究中发现低熔点脂肪具有吸收热量的作用,能有效减少喷雾干燥对植物乳杆菌的热损伤,提高菌株制剂后的存活率[56]。Davachi 等研究表明液态油层能有效隔离菌细胞与外界环境,同时防止微粒吸湿,而不同类型的油对包埋效果无显著影响[57]。含较多不饱和脂肪酸的脂类具有较好的抗氧化性,保护细胞免受氧化应激的损伤[42]。然而,油脂的水不溶性使活菌细胞难以均匀分散在油相中,且在高温的条件下油脂易被氧化[36,58]产生不良气味,对产品的品质和感官有负面影响。如果采用单一油相作为保护基质,它对细胞所产生的保护作用较为有限。

4.4 其他成分类保护剂

甘露醇和甘油作为菌剂保护剂的原理类似于多糖,研究表明甘油可以防止细胞在液氮中胞内冰晶的形成[59],减少细胞溶质损伤[22],常被用作超低温冷冻菌种的保护剂。海藻酸盐具有良好的持水性,有助于调节冷冻干燥过程中冰晶的形成以及防止过度干燥对菌细胞造成损伤[24]。

相比传统材料,部分蛋白质和多糖经过特殊处理后具备新的物理特性,这些改性分子在菌剂中可能发挥更好的保护作用。研究表明,酸性酪蛋白作为保护剂时,因其凝胶结构和渗透性稳定,具有良好的保水性,使冷冻干燥后的植物乳杆菌在 4 ℃的条件下储存 120 d 后仍维持较高的存活率[60]。Duongthingoc 等通过酸化处理的方法使乳清蛋白在等电点附近发生絮凝,形成能够保护布拉氏酿酒酵母的空间网络结构,在喷雾干燥后仍维持较高的活菌数[61]。多糖具有黏性弱、流变性差的缺点,通过引入甲基、乙基或羧甲基等基团,使多糖具有高黏度、易成膜和化学性能稳定的特性[62],常见的改性多糖有羧甲基纤维素和甲基纤维素等[63-64]。邓紫玮等采用羧甲基茯苓多糖作为壁材,有效提高了植物乳杆菌在极端环境中的稳定性[65]。丙烯酸树脂是一种合成高分子聚合物,由甲基丙烯酸和甲基丙烯酸甲酯或乙酯通过一定的聚合比例形成,聚合比例决定其溶解性能。丙烯酸树脂成膜性较好,能有效隔绝外界的水分和氧气[55],有利于菌剂的储藏,但因其机械强度和可降解性较差而不宜广泛应用于菌剂的制备。

5 保护剂与菌种的匹配性

保护剂对细胞的作用机制存在一定的菌属对应性,相同的保护基质对不同的菌株产生的保护效用可能不同。图 4 为目前研究中常见菌剂的菌种类型及其所应用保护剂种类的关系网络图。

5.1 细菌保护剂的选择

研究表明,相同成分的保护剂对不同菌属的保护效果差异较大。Bircher 等研究甘油、蔗糖和菊粉对人体肠道严格厌氧益生菌的冷冻保护作用时发现,多形拟杆菌、普氏粪杆菌、肠道罗斯拜瑞氏菌、粪厌氧棒杆菌、霍式真杆菌和经黏液真杆菌在不加

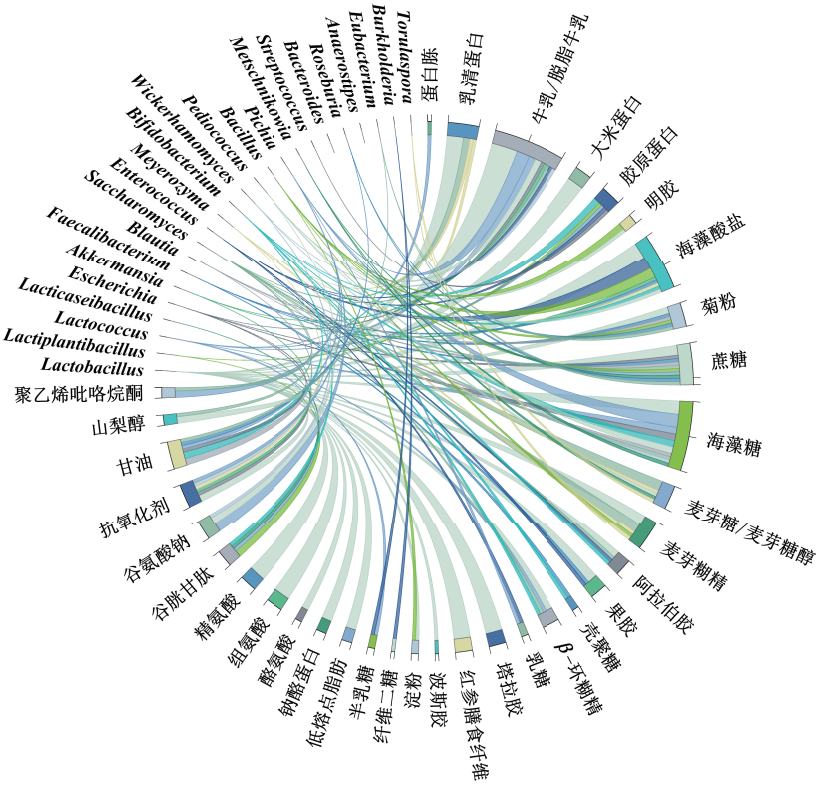


图 4 常见菌剂中菌种及其所用保护剂种类的关系网络图

Fig. 4 Network diagram of the relationship between the strains and the types of protectants used in the common microbial preparation

保护剂的情况下于-80 ℃超低温冷冻后,细胞存活率为11%~100%;而加入保护剂并冷冻干燥后在4 ℃的条件下储藏180 d,菌剂的细胞存活率为0.3%~60.0%[66]。其中,蔗糖和菊粉的羟基通过氢键与细胞膜表面的蛋白质或磷脂结合,对低温敏感型菌株的冷冻保护作用更为显著。因此,部分细菌可能因细胞膜组成不同而对低温的敏感程度不同,选择合适的保护剂能有效加强对菌株的保护。

保护剂对特定菌株的适用性还可能与菌株的状态有关。芽孢杆菌对极端环境的抵御能力更好,它们能够以休眠体的状态存活,因此在保护剂的选择以及储藏条件的确定上相对容易。苏云金芽孢杆菌Se13以麦芽糊精作为保护剂,喷雾干燥制剂后检测出芽孢数为8.1×10^{11} CFU/g;在室温下保藏9个月后芽孢数仍有7.3×10^{11} CFU/g[67]。由此可见,苏云金芽孢杆菌菌剂从生产到储藏期间具有较稳定的芽孢数,并且对储藏条件要求较低,常温储藏仍能维持较高的芽孢活性。

5.2 真菌保护剂的选择

相比于细菌,海藻糖的保护性能在酵母冻干制剂中更为突出。Stefanello等在研究中发现,室温避光条件下储藏一年后的异常威克汉姆酵母菌剂的细胞存活率为72%,而植物乳杆菌菌剂的细胞存活率为7%,表明海藻糖对于不同属菌株的保护作用有潜在差异性[39]。

对于真菌孢子,不同生理状态的孢子对环境的敏感程度不同,对保护剂的需求也不同。灵芝孢子细胞壁的主要成分为纤维素、木质素、几丁质、葡聚糖以及钙、磷等元素,对胞内物质有较好的保护作用,不易受极端环境影响[68],但也一定程度上阻碍着人体消化系统对灵芝孢子粉的营养吸收。目前已有体外实验证明了人体对破壁处理的灵芝孢子粉有更好的吸收率[69]。然而,失去细胞壁的孢子容易受到不良环境的影响,因此需要选择合适的保护基质对破壁后的孢子粉进行包埋制剂。银耳原胶含有钙、镁、钾等多种阳离子和多糖、蛋白质等物质[70],是一种弱酸性混合物,祝敏珉等采用银耳原胶和明胶复配作为保护剂对破壁灵芝孢子粉进行包封,模拟破壁灵芝孢子粉的细胞壁[71]。相比于未包埋的破壁灵芝孢子粉,包埋后的破壁灵芝孢子粉在加速氧化实验中表现出较好的氧化稳定性。

6 展 望

活菌制剂作为微生物资源保藏、运输和应用的一种方便形式,对其进一步的开发与研究是发展的必然方向。菌种自身的不稳定性及其在生产加工和储存过程中受到的环境胁迫影响着菌剂的活性,尤其是益生菌对不良环境极为敏感。通过研究不同菌种特性和细胞状态,了解不同菌种对保护剂的需求,并应用具有不同性能的天然或非天然化合物作为保护基质,可针对性地提高菌细胞在制剂过程中对各种胁迫的抗性,同时保证菌剂在储藏过程中能维持较好的活性。益生菌制剂保护基质的选择应该结合制剂技术、保护剂对人体的刺激性以及递送效果等方面进行考量。而对于不同属、不同特性以及不同生理状态的菌株,在保护剂的选择上也有所不同,未来应进一步探究特定保护剂对不同菌株作用效果的差异。

目前的研究主要集中在活菌制剂保护剂种类的开发和包埋性能的探究等方面,且部分研究停留在实验室阶段,尚未应用于生产实践。保护剂与制剂技术的适配性是活菌制剂扩大生产的关键因素。如蛋白质、糖类、脂类以及其他成分的添加一方面能对菌细胞起到保护作用,但另一方面也改变了体系的水分含量、粒径以及黏度,对制剂回收率产生一定的影响。如何提高活菌制剂的效益是当前的重点问题。对于益生菌制剂,未来研究应更加关注个体差异对益生菌制剂肠道递送、释放和代谢的不同影响,并通过更多临床试验探究保护剂在人体肠道中对益生菌的保护作用和递送机制,为提高益生菌制剂的群体适用性提供研究基础。

参考文献:

[1] 郭玲玲. 微生物菌种保藏方法及关键技术[J]. 微生物学杂志,2019,39(3):105-108.
GUO L L. Preservation method and preservation key technology of microbial strain seed[J]. **Journal of Microbiology**,2019,39(3):105-108.(in Chinese)
[2] SUN Y W,ZHANG S Y,LI H,et al. Assessments of probiotic potentials of *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from

Chinese traditional fermented food:phenotypic and genomic analysis[J]. **Frontiers in Microbiology**,2022,13:895132

[3] LI H,ZHU J,XIAO Y,et al. Biodiversity of lactic acid bacteria in traditional fermented foods in Yunnan Province,China,and comparative genomics of *Lactobacillus plantarum*[J]. **Fermentation-Basel**,2023,9(4):402.

[4] MAVROMMATI M,DASKALAKI A,PAPANIKOLAOU S,et al. Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology[J]. **Biotechnology Advances**,2022,54:107795.

[5] ZHU J,SUN Y W,ZHANG S Y,et al. Unraveling the genetic adaptations in cell surface composition and transporters of *Lactiplantibacillus plantarum* for enhanced acid tolerance[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2024,72(10):5368-5378.

[6] ZHANG S Y,SHANG Z X,LIU Z J,et al. Flavor production in fermented chayote inoculated with lactic acid bacteria strains:genomics and metabolomics based analysis[J]. **Food Research International**,2023,163:112224.

[7] XIAO Y,ZHANG S Y,LIU Z J,et al. Effect of inoculating *Pichia* spp. starters on flavor formation of fermented chili pepper:metabolomics and genomics approaches[J]. **Food Research International**,2023,173:113397.

[8] 李秋月,杨雪娇,谭春艳,等. 罗非鱼源肠道益生菌的分离鉴定及其体外益生特性分析[J]. 食品与生物技术学报,2023,42(12):1-9.
LI Q Y, YANG X J, TAN C Y, et al. Isolation and identification of intestinal probiotics from Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) and *in vitro* probiotic characteristic assessment[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2023,42(12):1-9.(in Chinese)

[9] 杨智晗,杨蕾,陈盈利,等.酪丁酸梭菌发酵废弃虾壳产新型单细胞蛋白饲料的研究[J].食品与生物技术学报,2023,42(2):25-30.
YANG Z H,YANG L,CHEN Y L,et al. Production of novel single cell protein feed using *Clostridium tyrobutyricum* fed on discarded shrimp shells[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2023,42(2):25-30.(in Chinese)

[10] CUI X,LI Y,HAN T T,et al. The fermented kelp by *Bacillus siamensis* has antioxidant,skin-repairing and anti-wrinkle effects[J]. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**,2022,66:102819.

[11] NIE H Y,CHEN L J,ZHANG Q,et al. Study on the bacteria consortium for treating tank cleaning oily sludge and its synergistic degradation mechanism[J]. **Journal of Environmental Chemical Engineering**,2023,11(5):110803.

[12] CORNILLOT E,NAIR R V,PAPOUTSAKIS E T,et al. The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain[J]. **Journal of Bacteriology**,1997,179(17):5442-5447.

[13] HAYASHIDA S,YOSHINO S. Degeneration of solventogenic clostridium caused by a defect in NADH generation [J]. **Agricultural and Biological Chemistry**,1990,54(2):427-435.

[14] KASHKET E R,CAO Z Y. Clostridial strain degeneration[J]. **FEMS Microbiology Reviews**,1995,17(3):307-315.

[15] LOU H W,LIN J F,GUO L Q,et al. Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2019,103(19):7835-7841.

[16] SINGH S,BROCKER C,KOPPAKA V,et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress[J]. **Free Radical Biology and Medicine**,2013,56:89-101.

[17] 刘开文,马雯,金刚. 真空冷冻干燥提高乳酸菌存活率及延长贮藏期的研究进展[J]. 食品科学,2024,45(2):325-333.
LIU K W,MA W,JIN G. Research progress on improving the survival rate and extending the storage period of lactic acid bacteria through vacuum freeze-drying[J]. **Food Science**,2024,45(2):325-333.(in Chinese)`

[18] GUERIN J,PETIT J,BURGAIN J,et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying:milk proteins clotting control to produce innovative matrices[J]. **Journal of Food Engineering**,2017,193:10-19.

[19] 张东春,张雅娟,孙颖,等. 细菌芽孢的形成、萌发及控制手段研究进展[J]. 食品工业科技,2023,44(15):463-473.
ZHANG D C,ZHANG Y J,SUN Y,et al. Research progress on formation,germination and control methods of bacterial spores [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2023,44(15):463-473.(in Chinese)

[20] 谢宝贵,江玉姬,刘文金,等. 草菇厚垣孢子研究[J]. 食用菌学报,1996,3(4):25-29.
XIE B G,JIANG Y J,LIU W J,et al. Studies on chlamydospore of *Volvariella volvacea*[J]. **Acta Edulis Fungi**,1996,3(4):25-29.(in Chinese)

[21] 朱琳,刘宁,张英华,等. 乳酸菌细胞膜的冻干损伤及保护[J]. 现代食品科技,2005,21(4):103-106.

ZHU L,LIU N,ZHANG Y H,et al. Damage by freeze-drying and protection of membrane in lactic acid bacteria[J]. **Modern Food Science and Technology**,2005,21(4):103-106.(in Chinese)

[22] 张光磊,张新创,翟雷. 活菌制剂冻干保护剂的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2015,43(4):80-85.
ZHANG G L,ZHANG C X,ZHAI L. Advances on cryoprotectants of live bacteria preparations[J]. **Progress in Microbiology and Immunology**,2015,43(4):80-85.(in Chinese)

[23] 刘凯龙,姚国强,张和平. 基于电流体加工技术对益生菌包封作用研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(7):24-31.
LIU K L,YAO G Q,ZHANG H P. Research progress in encapsulation of probiotics based on electrofluid processing technology [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2022,41(7):24-31.(in Chinese)

[24] MOAYYEDI M,ESKANDARI M H,RAD A H E,et al. Effect of drying methods (electrospraying,freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469[J]. **Journal of Functional Foods**, 2018,40:391-399.

[25] GOMEZ-MASCARAQUE L G,AMBROSIO-MARTIN J,PEREZ-MASIA R,et al. Impact of acetic acid on the survival of *L. plantarum* upon microencapsulation by coaxial electrospraying[J]. **Journal of Healthcare Engineering**,2017,2017:4698079.

[26] SKRLEC K,ZUPANCIC S,MIHEVC S P,et al. Development of electrospun nanofibers that enable high loading and long-term viability of probiotics[J]. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**,2019,136:108-119.

[27] JALALI M,ABEDI D,VARSHOSAZ J,et al. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerance* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules[J]. **Research in Pharmaceutical Sciences**,2012,7(1):31-36.

[28] VESTERLUND S,SALMINEN K,SALMINEN S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered:a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2012,157(2):319-321.

[29] DIAS C O,DEALMEIDA J D S O,PINTO S S,et al. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice:a functional non-dairy product for probiotic delivery[J]. **Food Bioscience**,2018,24:26-36.

[30] JIAO S Y,ZHANG Y,WAN C X,et al. Transcriptional analysis of degenerate strain *Clostridium beijerinckii* DG-8052 reveals a pleiotropic response to $CaCO_3$ associated recovery of solvent production[J]. **Scientific Reports**,2016,6:38818.

[31] 汪超,谢翎,黄勃. 球孢白僵菌 DNA 甲基转移酶基因 *Dim*-2 的克隆及其表达分析[J]. 中国生物防治学报,2014,30(6):736-742.
WANG C,XIE L,HUANG B. Cloning and expression analysis of DNA methyltransferases encoding gene *Dim*-2 from *Beauveria bassiana*[J]. **Chinese Journal of Biological Control**,2014,30(6):736-742.(in Chinese)

[32] 汪超. 球孢白僵菌的退化与 DNA 甲基化关系的初步研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2016.

[33] 刘艳霞,管军军,崔耀明.耐热型植物乳杆菌微胶囊粉剂[J].食品与机械,2023,39(10):184-191.
LIU Y X,GUAN J J,CUI Y M. Study on heat-resistant powder of *Lactobacillus plantarum* microcapsule[J]. **Food & Machinery**, 2023,39(10):184-191.(in Chinese)

[34] ECKERT C,AGNOL W D,DALLE D,et al. Development of alginate-pectin microparticles with dairy whey using vibration technology:effects of matrix composition on the protection of *Lactobacillus* spp. from adverse conditions[J]. **Food Research International**,2018,113:65-73.

[35] BARBOSA J C,ALMEIDA D,MACHADO D,et al. Spray-drying encapsulation of the live biotherapeutic candidate *Akkermansia muciniphila* DSM 22959 to survive aerobic storage[J]. **Pharmaceuticals**,2022,15(5):628.

[36] ERATTE D,WANG B,DOWLING K,et al. Survival and fermentation activity of probiotic bacteria and oxidative stability of omega-3 oil in co-microcapsules during storage[J]. **Journal of Functional Foods**,2016,23:485-496.

[37] ESTILARTE M L,TYMCZYSZYN E E,SERRADELL M D,et al. Freeze-drying of *Enterococcus durans*:effect on their probiotics and biopreservative properties[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2021,137:110496.

[38] 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.

[39] STEFANELLO R F,NABESHIMA E H,IAMANAKA B T,et al. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents[J]. **Food Research International**,

2019,115:90-94.
[40] MARTIN M J,LARA-VILLOSLADA F,ADOLFINA R M,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.
[41] 刘仁杰,李哲,毛思凝,等. 乳酸菌微胶囊包埋技术与常用壁材的研究进展[J]. 食品与机械,2019,35(9):211-215.
LIU R J,LI Z,MAO S N,et al. Research progress of lactic acid bacteria microcapsule encapsulation technology and common wall materials[J]. **Food & Machinery**,2019,35(9):211-215.(in Chinese)
[42] JIANG J,MA C,SONG X,et al. Spray drying co-encapsulation of lactic acid bacteria and lipids:a review[J]. **Trends in Food Science and Technology**,2022,129:134-143.
[43] KRASAEKOOPT W,BHANDARI B,DEETH H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt [J]. **International Dairy Journal**,2003,13(1):3-13.
[44] KAILASAPATHY K. Microencapsulation of probiotic bacteria:technology and potential applications [J]. **Current Issues in Intestinal Microbiology**,2002,3(2):39-48.
[45] BASCUAS S,HERNANDO I,MORAGA G,et al. Structure and stability of edible oleogels prepared with different unsaturated oils and hydrocolloids[J]. **International Journal of Food Science and Technology**,2020,55(4):1458-1467.
[46] LU Y,MAO L K,HOU Z Q,et al. Development of emulsion gels for the delivery of functional food ingredients:from structure to functionality[J]. **Food Engineering Reviews**,2019,11(4):245-258.
[47] HERRERO A M,CARMONA P,PINTADO T,et al. Infrared spectroscopic analysis of structural features and interactions in olive oil-in-water emulsions stabilized with soy protein[J]. **Food Research International**,2011,44(1):360-366.
[48] LIANG Y C,MATIA-MERINO L,PATEL H,et al. Effect of sugar type and concentration on the heat coagulation of oil-in-water emulsions stabilized by milk-protein-concentrate[J]. **Food Hydrocolloids**,2014,41:332-342.
[49] AGUDELO J,CANO A,GONZALEZ-MARTINEZ C,et al. Disaccharide incorporation to improve survival during storage of spray dried *Lactobacillus rhamnosus* in whey protein-maltodextrin carriers[J]. **Journal of Functional Foods**,2017,37:416-423.
[50] KIM S I,KIM J W,KIM K T,et al. Survivability of collagen-peptide microencapsulated lactic acid bacteria during storage and simulated gastrointestinal conditions[J]. **Fermentation–Basel**,2021,7(3):177.
[51] HUANG S,VIGNOLLES M L,CHEN X D,et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria:a review[J]. **Trends in Food Science and Technology**,2017,63:1-17.
[52] 杨友馨,王瑞雪,王俊国. 海藻糖对乳酸菌保护机制的研究进展[J]. 乳业科学与技术,2021,44(6):45-50.
YANG Y X,WANG R X,WANG J G. Progress in research on the protective mechanism of trehalose on lactic acid bacteria[J]. **Journal of Dairy Science and Technology**,2021,44(6):45-50.(in Chinese)
[53] CROWE J H,CROWE L M,CHAPMAN D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms:the role of trehalose [J]. **Science**,1984,223(4637):701-703.
[54] CONRAD P B,MILLER D P,CIELENSKI P R,et al. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices[J]. **Cryobiology**,2000,41(1):17-24.
[55] 陶萄,侯丹平,尹肖寒,等. 喷雾干燥技术在益生菌微胶囊制品中的应用研究进展[J]. 食品工业,2019,40(4):271-275.
TAO T,HOU D P,YIN X H,et al. Advances in application of spray drying technology in microencapsulation of probiotics[J]. **The Food Industry**,2019,40(4):271-275.(in Chinese)
[56] LIU H,GONG J,CHABOT D,et al. Protection of heat-sensitive probiotic bacteria during spray-drying by sodium caseinate stabilized fat particles[J]. **Food Hydrocolloids**,2015,51:459-467.
[57] DAVACHI S M,DOGAN B,KHAZDOOZ L,et al. Long-term *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG storage at ambient temperature in vegetable oil:viability and functional assessments[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2022,70(30):9399-9411.
[58] VAZIRI A S,ALEMZADEH I,VOSSOUGHI M. Survivability and oxidative stability of co-microencapsulated *L. Plantarum* PTCC 1058 and DHA as a juice carrier[J]. **Food Bioscience**,2019,32:100460.
[59] FONSECA F,MARIN M,MORRIS G J. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions:freezing kinetics and storage temperature effects[J]. **Applied Environmental Microbiology**,2006,72(10):6474-6482.

[60] ÜCOK G,SERT D. Trial productions of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* culture using dairy by-products as cryoprotectants: viability and characterization of cultures[J]. **Food Bioscience**,2022,46:101541.

[61] DUONGTHINGOC D,GEORGE P,KATOPO L,et al. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*[J]. **Food Chemistry**,2013,141(3):1782-1788.

[62] ZAEIM D,SARABI-JAMAB M,GHORANI B,et al. Microencapsulation of probiotics in multi-polysaccharide microcapsules by electro-hydrodynamic atomization and incorporation into ice-cream formulation[J]. **Food Structure**,2020,25:100147.

[63] 忻晨,周锐丽,龚方圆. 改良剂对冷冻面团品质影响的研究进展[J]. 食品与机械,2023,39(3):217-225.
XIN C,ZHOU R L,GONG F Y. Research progress on the effect of different improvers on the quality of frozen dough[J]. **Food & Machinery**,2023,39(3):217-225. (in Chinese)

[64] 张淑瑜,陈春秀,李国英. 胶原/氧化羟丙基甲基纤维素复合膜的制备与表征[J]. 现代食品科技,2022,38(1):248-255.
ZHANG S Y,CHEN C X,LI G Y. Preparation and characterization of collagen/dialdehyde hydroxypropyl methylcellulose composite films[J]. **Modern Food Science and Technology**,2022,38(1):248-255. (in Chinese)

[65] 邓紫玮,丁一,侯欣尧,等. 基于孢粉素微胶囊的共包埋、保护及递送益生菌和乳糖酶的体系[J]. 食品科学,2022,43(14):183-192.
DENG Z Y,DING Y,HOU X Y,et al. Sporopollenin microcapsule-based system for co-encapsulation,protection and delivery of probiotics and β-galactosidase[J]. **Food Science**,2022,43(14):183-192.(in Chinese)

[66] BIRCHER L,GEIRNAERT A,HAMMES F,et al. Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes[J]. **Microbial Biotechnology**,2018,11(4):721-733.

[67] ESKI A,DEMIRBAG Z,DEMIR I. Microencapsulation of an indigenous isolate of *Bacillus thuringiensis* by spray drying[J]. **Journal of Microencapsulation**,2019,36(1):1-9.

[68] 潘少香,赵岑,闫新焕,等. 不同品种灵芝子实体及孢子粉元素成分分析及重金属安全性评价[J]. 现代食品科技,2023,39(2):319-324.
PAN S X,ZHAO C,YAN X H,et al. Element composition analysis and heavy metal safety evaluation of different varieties of *Ganoderma lucidum* fruit bodies and their spore powders[J]. **Modern Food Science and Technology**,2023,39(2):319-324. (in Chinese)

[69] CAI M,MU H,XING H Y,et al. *In vitro* gastrointestinal digestion and fermentation properties of *Ganoderma lucidum* spore powders and their extracts[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2021,135:110235.

[70] 董传志,龙慧,李明洁,等. 不同浓度银耳多糖的体外模拟消化特性比较[J]. 现代食品科技,2023,39(5):183-189.
DONG C Z,LONG H,LI M J,et al. Comparison of *in vitro* simulated digestive properties of *Tremella* polysaccharides at different concentrations[J]. **Modern Food Science and Technology**,2023,39(5):183-189. (in Chinese)

[71] 祝敏珉,雷俊,陈俊滔,等. 灵芝孢子粉微胶囊的制备及其氧化稳定性研究[J]. 食品与发酵工业,2023,49(9):207-211.
ZHU M M,LEI J,CHEN J T,et al. Preparation and oxidative stability of *Ganoderma lucidum* spore microcapsules[J]. **Food and Fermentation Industries**,2023,49(9):207-211.(in Chinese)