

微囊化屎肠球菌活菌制剂的研究

王婷婷¹, 李爱科¹, 陶浩瀚¹, 易建明²

(1 国家粮食局科学研究院, 北京 100037; 2 华中农业大学 动物科技学院, 湖北 武汉 430070)

【摘要】 **【目的】** 研究制备新型微囊化屎肠球菌活菌制剂的方法。**【方法】** 采用发酵前包被工艺, 对屎肠球菌进行微囊化, 在加入适量氯化钙的 MRS 培养基中进行固化培养, 过滤收集微胶囊, 45 °C 干燥后得到微囊化屎肠球菌活菌制剂。采用平板菌落计数法评价其对 80 °C 高温、模拟胃肠液及常温贮藏条件的耐受能力。**【结果】** 采用发酵前包被工艺获得的微囊化屎肠球菌液态产品的活菌数较发酵后包被工艺提高了 2 lgCFU/mL。通过在发酵培养基中加入 2 g/L 氯化钙, 并在 45 °C 条件下烘干, 不仅可以得到球形度好、大小均匀的微囊化屎肠球菌固态产品, 而且其活菌数可以达到 11.57 lgCFU/g。与游离屎肠球菌固态产品相比, 微囊化屎肠球菌活菌制剂具有更强的耐受 80 °C 高温及模拟胃肠液的能力 ($P < 0.01$), 在常温条件下储存 2 个月, 活菌数基本没有变化。**【结论】** 微囊化屎肠球菌活菌制剂的发酵前包被制备工艺简单、产品形态较好、抗逆性强、稳定性高, 且具有较高的包埋率, 可以作为饲用高活性微生态制剂应用于生产实际。

【关键词】 微胶囊; 屎肠球菌; 活菌制剂; 生产工艺; 抗逆性能

【中图分类号】 S816.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0051-06

Study on the production technology and properties of microencapsulated *Enterococcus faecium*

WANG Ting-ting¹, LI Ai-ke¹, TAO Hao-han¹, YI Jian-ming²

(1 Academy of State Administration of Grain, Beijing, 100037, China;

2 College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, 430070, China)

Abstract: **【Objective】** The research prepared and studied probiotics of new microencapsulated *Enterococcus faecium*. **【Method】** In this paper, we microencapsulated *Enterococcus faecium* using coating technology before fermentation, collected them by filtration technology, cultured in MRS medium adding suitable concentration of anhydrous calcium chloride, dried under the condition of 45 °C and got solid microencapsulated *Enterococcus faecium* products. And their tolerance abilities to the 80 °C temperature and the artificial gastric and intestinal fluids were evaluated in viable plate counts. **【Result】** The viable bacteria counts of liquid microencapsulated *Enterococcus faecium* products using coating technology before fermentation increased by 2 lgCFU/mL, more than that after fermentation. We could not only get both moderate sizes and ideal morphology products, but also high viable bacteria counts of 11.57 lgCFU/g by culturing in MRS adding 2 g/L anhydrous calcium chloride and drying for 5 h under the condition of 45 °C in electric blastdrying oven. Studies on using 80 °C temperature and the artificial gastric and intestinal fluids showed that the solid microencapsulated *Enterococcus faecium* products could survive better than free *Enterococcus faecium* products ($P < 0.01$). The experiment of storage at room temperature showed that there was no no-

* [收稿日期] 2009-04-13

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD12B04); 财政部院所基本科研业务费课题(ZX0702)

[作者简介] 王婷婷(1985—), 女, 河南信阳人, 在读硕士, 主要从事饲用益生菌的微囊化前包被技术研究。

E-mail: xts225@163.com

[通信作者] 李爱科(1963—), 男, 湖南长沙人, 研究员, 博士, 主要从事饲料资源开发研究。E-mail: lak@chinagrains.org

table decline concerning the number of live bacteria. 【Conclusion】 Therefore, the simple technology and the products of ideal morphology, strong stress resistance, good stability and high yield would be beneficial for the development of new microbial ecological agents with high activity that can be used widely in feedstuffs.

Key words: microencapsulation; *Enterococcus faecium*; live bacteria preparation; production technique; resisting performance

屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 是人和动物肠道中的正常菌群, 也是一种重要的乳酸菌, 具有较好的肠道粘附能力, 能产生乳酸及一些抗菌物质^[1-2], 抑制肠道腐败菌、致病菌的繁殖及肠道感染, 降低腹泻率, 促进营养物质的消化吸收, 增强免疫力等作用。但是, 大部分益生菌对饲料加工、尤其是制粒工艺中的高温、储存运输和胃肠液的胃酸及胆汁等的耐受性很差^[3-5], 能活着进入肠道的乳酸菌种类和数量不多, 目前市场上大部分产品都存在活菌数衰退的问题。微胶囊技术由于其独特的优势, 能更好地解决这一系列问题。

目前, 饲用益生菌的微胶囊制备在工艺上属于发酵后包被, 这需要在微胶囊制备材料中包被高浓度的微生物细胞, 因此非常不利于得到球形度好, 粒径大小均一的微胶囊成品。而粒径的大小、颗粒表面结构直接影响到产品的溶解性、流动性、分散性和稳定性, 同时微胶囊内细胞密度很难得到提高。发酵前包被是一种新的微囊化益生菌制备方法, 其在包埋后发酵大大减少了微囊化过程中菌体的用量, 避免了发酵后包埋过程中由于受菌体密度影响而造成的微囊化效率和产率较低的问题, 更易于得到形态和稳定性更好的微囊化产品。

目前, 高档益生菌制品的干燥方法主要采用的是冷冻干燥和喷雾干燥技术^[6]。冷冻干燥技术成本高, 而且微胶囊经过冷冻干燥后容易形成蜂窝状, 不能很好地发挥其微胶囊的优势。喷雾干燥技术进口温度较高, 对需烘干产品具有较高的要求, 大部分益生菌在喷雾干燥的高温、高压环境下不易存活^[7-8], 而且干燥器还有体积大、传热系数低、热效率低、动力消耗大等不足。

针对屎肠球菌挑战极端环境较弱的特点, 本文采取发酵前包被技术, 以海藻酸钠-氯化钙微胶囊体系进行屎肠球菌的固定化培养, 采用较为经济合理的干燥方式进行后处理, 考察其在高温、模拟胃肠液、常温贮藏条件下活菌存活率, 探索微胶囊化技术在改善和提高屎肠球菌存活性能方面的效果, 以期拓宽屎肠球菌的应用价值提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种 屎肠球菌 EF3-4, 由国家粮食局科学研究院中试基地分离鉴定。

1.1.2 试剂 1.5% 海藻酸钠 (Alg); 11.1 g/L CaCl₂ (广东省汕头市西陇化工厂有限公司产品); 0.1% CuSO₄ · 5H₂O (北京北化精细化学品有限公司产品); 0.3% ZnO (国药集团化学试剂北京有限公司产品); 破囊液^[9] pH 7.8~8.2; 模拟胃液^[10-11]: NaCl 125 mmol/L, KCl 7 mmol/L, NaHCO₃ 45 mmol/L, 胃蛋白酶 (Sigma P7000) 3 g/L, 用 HCl 将 pH 值调至 2, 0.22 μm 滤膜过滤除菌; 模拟肠液^[10-11]: 1 g/L 胰蛋白酶 (Sigma T4799), 1.5 g/L 猪胆盐 (北京奥博星生物技术有限公司产品), 用 5 mol/L NaOH 调 pH 值为 8.0, 0.22 μm 滤膜过滤除菌; MRS 培养基。

1.1.3 仪器 Eql 微胶囊发生器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); BCN-1360B 超净工作台 (瑞士 Nisco 公司); FE20 pH 计 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); DV-C 型粘度计 (Brookfield 公司)。

1.2 微胶囊的制备工艺

发酵前包被工艺: 屎肠球菌种子液 (1% 接种量, 37 °C、150 r/min 培养 8 h) → 离心 (5 000 r/min、10 min) → 菌体沉淀 + 1.5% 海藻酸钠 (经过 105 °C、15 min 灭菌) 混合 (菌胶质量比为 1:5) → 改进的 Eql 微胶囊发生器 → 滴入 CaCl₂ (11.1 g/L) 中 → 固化 30 min → 过滤收集微胶囊 → MRS 培养基中培养 10 h → 微囊化屎肠球菌液态产品。

发酵后包被工艺: 屎肠球菌种子液 (1% 接种量, 37 °C、150 r/min 培养 8 h) → MRS 培养基中培养 (1% 接种量, 37 °C、150 r/min 培养 10 h) → 离心 (5 000 r/min、10 min) → 菌体沉淀 + 1.5% 海藻酸钠 (经过 105 °C、15 min 灭菌) 混合 (菌胶质量比为 1:5) → Eql 微胶囊发生器 → 滴入 CaCl₂ (11.1 g/L) 中 → 固化 30 min → 过滤收集微胶囊 → MRS 培养基 → 微囊化屎肠球菌液态产品。

游离尿肠球菌固态产品:尿肠球菌种子液(1%接种量,37 ℃、150 r/min 培养 8 h)→尿肠球菌发酵液(1%接种量,37 ℃、150 r/min 培养 10 h)→离心(5 000 r/min、10 min)→菌体沉淀+糠壳粉(121 ℃、30 min 灭菌)混合(每 200 mL 的菌体沉淀加 1 g 糠壳粉)→电热鼓风干燥箱干燥(45 ℃、2 h)→游离尿肠球菌固态产品。

微囊化尿肠球菌固态产品:采用发酵前包被工艺获得微胶囊→MRS 培养基(适量氯化钙)中培养 10 h→过滤收集微胶囊→电热鼓风干燥箱干燥(45 ℃、5 h)→微囊化尿肠球菌固态产品。

1.2.1 发酵前、后包被工艺对微囊化尿肠球菌液态产品活菌数的影响 分别取 1 mL 采用发酵前、后包被工艺获得的微囊化尿肠球菌液态产品,按 GB/T 4789.2-2003《食品卫生微生物学检验菌落总数测定》中的检测方法,采用平板计数法检测其活菌数。

1.2.2 氯化钙添加量的确定 将低温保存的尿肠球菌按 1%接种量接入到 MRS 培养基中培养 8 h 作为种子。按 1.2 介绍的方法制作微囊化尿肠球菌固态产品,分别将 5 mL 的菌胶混合液滴入到 100 mL 含有 0.5,0.75,1,2,3 和 4 g/L CaCl₂ 的 MRS 培养基中,于 37 ℃、150 r/min 条件下培养 10 h,分别从每 mL 湿胶囊的活菌数、烘干后产品的外观评价(颜色、粒径大小、烘干时间及胶囊间是否粘黏),及烘干后每 g 产品的活菌数等指标来确定氯化钙的最适添加量。活菌计数采用平板计数法,每处理 3 个重复。

1.3 微囊化尿肠球菌固态产品的性能评定

1.3.1 对高温的耐受性 取适量微囊化尿肠球菌固态产品,在 80 ℃的条件下分别水浴 0,2,4,6,8 和 10 min,流水冷却,以相同处理条件下的游离尿肠球

菌固态产品为对照,每个处理 3 个重复。采用平板计数法计算每 g 产品的活菌数,通过比较,判断其对温度的耐受性。

1.3.2 对模拟胃肠液的耐受性 取适量微囊化尿肠球菌固态产品,加入到 5 mL 的模拟胃液中培养,分别在 0,1,2,3,4 h 取样,以相同处理条件下的游离尿肠球菌固态产品为对照,每个处理 3 个重复。采用平板计数法计算每 g 产品的活菌数,据此判断其对模拟胃液的耐受性。模拟肠液试验同模拟胃液试验。

1.3.3 对常温贮藏条件的耐受性 取适量微囊化尿肠球菌固态产品在常温条件下贮藏,分别在贮藏的 0,10,20,30,40,50 及 60 d 取样,以相同处理条件下的游离尿肠球菌固态产品为对照,每个处理 3 个重复。采用平板计数法计算每 g 产品的活菌数,据此判断其对常温贮藏条件的耐受性。

1.4 统计分析

试验数据经 Microsoft Excel 初步整理后,利用 Originpro7.5 进行方差分析和多重比较,均用“平均数±标准差”表示,以 $P < 0.01$ (差异极显著)和 $P < 0.05$ (差异显著)作为差异显著性的判断标准。

2 结果与分析

2.1 微胶囊制备工艺的确定

2.1.1 发酵前后包被工艺对微囊化尿肠球菌液态产品活菌数的影响 由表 1 可知,采用发酵前包被工艺生产的微囊化尿肠球菌液态产品的活菌数达到 9.20 lgCFU/mL,而采用发酵后包被工艺生产的微囊化尿肠球菌液态产品的活菌数只有 7.20 lgCFU/mL。可见,利用发酵前包被工艺更适合于微囊化尿肠球菌液态产品的制备。

表 1 发酵前后包被工艺对微囊化尿肠球菌液态产品活菌数的影响

Table 1 Viable bacteria count of liquid encapsulated *E. faecium* products before and after fermentation

处理 Treatment	活菌数 Viable bacteria count			平均值 Average
	1	2	3	
发酵前包被 Coating technology before fermentation	9.25	9.15	9.19	9.20
发酵后包被 Coating technology after fermentation	7.62	7.58	7.62	7.20

注:1,2,3 表示重复次数。

Notes:1,2,3 mean repeat times.

2.1.2 氯化钙添加量的确定 由表 2 可知,氯化钙添加量为 0.5~0.75 g/L 时,产品出现较为严重的粘黏现象,烘干时间较长,为 6.1~7.0 h,产品颜色

较深,粒径较大,为 340~347 μm,总体效果较差。随着氯化钙添加量的增加,产品的总体效果有所提升。当 CaCl₂ 的添加量为 4 g/L 时,产品已无粘黏

现象,烘干时间较短,为 4.3 h,粒径降为 320 μm ,颜色为浅黄色。

由图 1 可以看出,氯化钙添加量为 0.5~0.75 g/L 时,湿胶囊的活菌数呈缓慢上升趋势,0.75 g/L 的添加量可使湿胶囊的活菌数达到最大值,为 9.14 lgCFU/mL;但是随着氯化钙添加量的增加,湿胶囊的活菌数呈缓慢下降趋势;当 CaCl_2 添加量为 4 g/L

时,湿胶囊的活菌数下降为 8.88 lgCFU/mL。微囊化屎肠球菌烘干后活菌数的变化趋势与湿胶囊相一致;当 CaCl_2 添加量为 0.75 g/L 时,活菌数达到最大值,为 11.71 lgCFU/g, CaCl_2 添加量为 4 g/L 时,活菌数降为 11.52 lgCFU/g,但仍然保持在一个数量级。

表 2 微囊化屎肠球菌固态产品的外观评价

Table 2 Ocular estimate of solid encapsulated *E. faecium* products

$\text{CaCl}_2/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	颜色 Products colour	烘干时间/h Drying time	粒径/ μm Products size	颗粒间是否粘黏 Whether adhesion between particles
0.5	深黄 Deep yellow	7.0	347	是 Yes
0.75	深黄 Deep yellow	6.1	340	是 Yes
1	黄 Yellow	5.5	331	否 No
2	黄 Yellow	5.2	329	否 No
3	浅黄 Light yellow	4.5	323	否 No
4	浅黄 Light yellow	4.3	320	否 No

2.2 微囊化屎肠球菌固态产品的性能评定

2.2.1 对高温的耐受性 由图 2 可知,游离屎肠球菌固态产品在 80 $^{\circ}\text{C}$ 高温下处理的 10 min 内,活菌数持续迅速下降,而微囊化屎肠球菌固态产品的活菌数下降十分缓慢,且基本保持在同一数量级。在 80 $^{\circ}\text{C}$ 高温下处理 10 min,游离屎肠球菌固态产品的

活菌数从 11.30 lgCFU/g 下降到 9.29 lgCFU/g,活菌数下降了 2.01 lgCFU/g,而同样条件下微囊化屎肠球菌固态产品的活菌数只从 11.68 lgCFU/g 下降到 11.41 lgCFU/g,活菌数仅下降了 0.27 lgCFU/g,两者差异达极显著水平($P < 0.01$)。

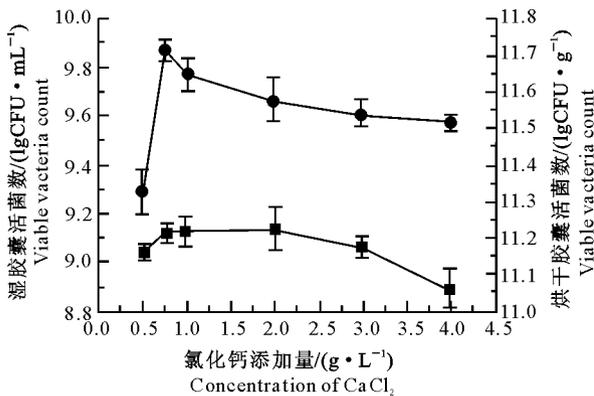


图 1 氯化钙添加量对湿胶囊及烘干胶囊活菌数的影响

—■—. 湿胶囊; —●—. 烘干胶囊

Fig. 1 Effect of anhydrous calcium chloride addition on viable bacteria counts of wet capsules and solid products

—■—. Wet capsules; —●—. Dry capsules

2.2.2 对模拟胃肠液的耐受性 微囊化屎肠球菌固态产品对模拟胃肠液的耐受性试验结果如图 3 所示。由图 3 可知,游离屎肠球菌固态产品在模拟胃液中 4 h,其活菌数呈持续快速的下降趋势,从最初的 11.30 lgCFU/g 下降到最终的 9.77 lgCFU/g,活

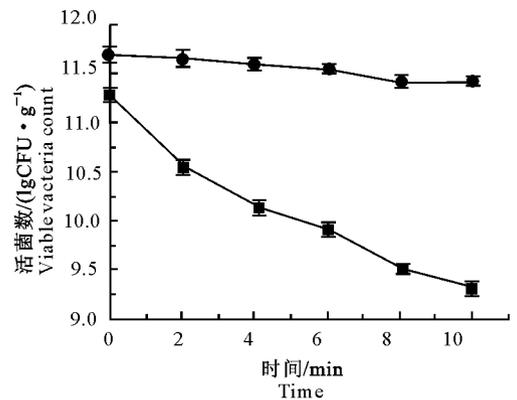


图 2 固态及游离微囊化屎肠球菌固态产品对 80 $^{\circ}\text{C}$ 高温的耐受性

—■—. 游离屎肠球菌固态产品; —●—. 微囊化屎肠球菌固态产品

Fig. 2 Tolerance of solid *E. faecium* products to 80 $^{\circ}\text{C}$ temperature in free and microencapsulated culture

—■—. Solid *E. faecium* products in free culture;

—●—. Solid *E. faecium* products in microencapsulated

菌数下降了 1.53 lgCFU/g;而微囊化屎肠球菌固态产品在同样条件下 4 h,活菌数下降趋势缓慢,从最初的 11.68 lgCFU/g 下降到 11.54 lgCFU/g,活菌数仅下降了 0.14 lgCFU/g,两者差异达极显著水平($P < 0.01$)。游离屎肠球菌固态产品在模拟肠液中

处理 1 h,其活菌数从 11.30 lgCFU/g 先迅速下降到 9.31 lgCFU/g,之后又表现出较为缓慢的下降趋势,4 h 后,活菌数下降到 8.38 lgCFU/g,总共下降了 2.92 lgCFU/g。而微囊化屎肠球菌固态产品在

模拟肠液 4 h 的处理过程中,活菌数一直处于缓慢下降趋势,从 11.68 lgCFU/g 下降到 11.17 lgCFU/g,活菌数总共下降了 0.51 lgCFU/g,两者差异达到极显著水平($P < 0.01$)。

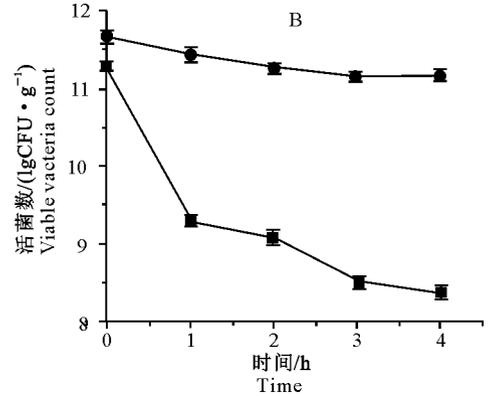
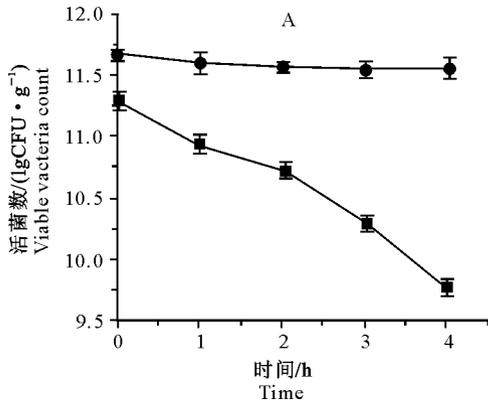


图 3 游离及微囊化屎肠球菌固态产品对模拟胃(A)肠(B)液的耐受性

—■—, 游离屎肠球菌固态产品;—●—, 微囊化屎肠球菌固态产品

Fig. 3 Tolerance of solid *E. faecium* products to the artificial gastric fluids(A) and artificial intestinal fluids(B) in free and microencapsulated culture

—■—, Solid *E. faecium* products in free culture;—●—, Solid *E. faecium* products in microencapsulated

2.2.3 对常温贮藏条件的耐受性 微囊化屎肠球菌固态产品对常温贮藏条件的耐受性试验结果如图 4 所示。

菌数从 11.68 lgCFU/g 下降到 11.56 lgCFU/g,下降了 0.12 lgCFU/g,两者差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 微胶囊的制备工艺

微胶囊固定化菌体细胞,以其能获得高密度菌体细胞、重复利用、高产率及低污染的优势,已成为生物工程领域研究的一个热点^[12]。在本试验中,发酵前包被工艺获得的液态微囊化屎肠球菌产品的活菌数较发酵后包被工艺提高了 2 lgCFU/mL,其原因可能与微胶囊在发酵过程中为菌体提供了相对稳定的生长环境,以及后包被工艺造成的菌体损失有关。

微囊化屎肠球菌在 MRS 培养基培养过程中,随着细菌的大量繁殖,微胶囊体积增大,壁材变薄,然后出现小裂痕,内部海藻酸钠渗出,导致直接在鼓风机干燥箱干燥得到的产品粘黏严重,利用鼓风机干燥箱干燥难以得到形态较好的产品。本文采取在 MRS 培养基中加入适量的无水氯化钙,使其在培养过程中进一步固化,以期获得常规干燥时不易粘黏的胶囊。试验结果表明,在 MRS 培养基中添加 2 g/L 的氯化钙,不仅可以提高其活菌数,而且可以改善其固态产品的形态,使干燥方式更为经济、方便,且适宜于大规模生产。

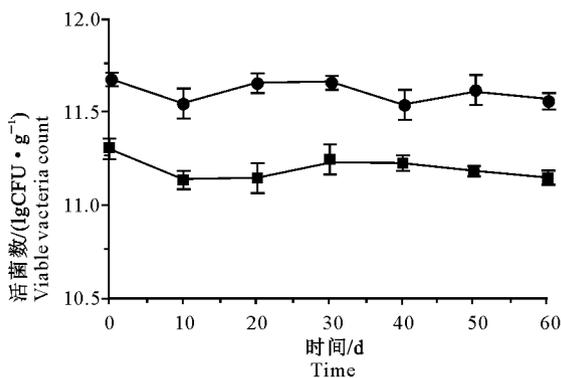


图 4 游离及微囊化屎肠球菌固态产品对常温贮藏条件的耐受性

—■—, 游离屎肠球菌固态产品;—●—, 微囊化屎肠球菌固态产品

Fig. 4 Tolerance of solid *E. faecium* products to the storage at room temperature in free and microencapsulated culture

—■—, Solid *E. faecium* products in free culture;

—●—, Solid *E. faecium* products in microencapsulated

由图 4 可见,微囊化屎肠球菌固态产品在常温条件下贮藏 2 个月,其活菌数均无明显下降,只是在一定范围内稍有波动。游离屎肠球菌固态产品在常温下贮藏的 2 个月内,活菌数由 11.30 lgCFU/g 下降到 11.15 lgCFU/g,下降了 0.15 lgCFU/g;微囊化屎肠球菌固态产品在常温条件下贮藏 2 个月,活

3.2 微囊化屎肠球菌固态产品的性能

益生菌制剂作用的决定因素是微生物的活力。蔡辉益等^[13]指出,益生菌的活菌量一般要求 3×10^8 CFU/g,每天要达到 $10^8 \sim 10^9$ 个菌体的菌量才能有效。一般来说,添加剂活菌数含量大约为 10^{10} CFU/g,预混料活菌数含量大约为 10^8 CFU/g,饲料、膳食及片剂活菌数含量大约为 10^6 CFU/g^[14]。在本研究中,通过发酵前包被工艺制备的微囊化屎肠球菌活菌含量可达 $11.30 \lg\text{CFU/g}$,即 1.99×10^{11} CFU/g,完全能够满足活菌数含量要求。

温度、胃酸、胆汁等是益生菌制剂失活,功效降低的主要影响因素,这也成了目前应用微生物饲料添加剂最棘手的问题之一。很多研究结果表明,益生菌采用微胶囊技术不仅能提高其在加工和储藏过程及胃肠液中的存活率^[15-17],并且能提高其对高温的耐受性^[18]。本研究发现,在 80°C 高温下处理 10 min,游离屎肠球菌固态产品的活菌数下降了 $2.01 \lg\text{CFU/g}$,而微胶囊屎肠球菌固态产品的活菌数只下降了 $0.27 \lg\text{CFU/g}$,两者差异达极显著水平 ($P < 0.01$),这说明微胶囊技术可以显著提高其对 80°C 高温的耐受性,这与前人的研究结果一致^[18]。其原因是微胶囊对菌体包被后,增加了热传导的阻力,从而起到了保护菌体耐受高温的作用。

本研究在模拟胃、肠液试验中发现,经过 4 h 的模拟胃、肠液处理后,游离屎肠球菌固态产品的活菌数下降了 1.53 及 2.92 $\lg\text{CFU/g}$,而微胶囊屎肠球菌固态产品的活菌数只下降了 0.14 及 0.51 $\lg\text{CFU/g}$,两者差异均达极显著水平 ($P < 0.01$),表明微胶囊可以保护菌体,显著提高其对胃、肠液的耐受性。

微胶囊屎肠球菌固态产品在常温贮藏条件下的稳定性是其作为饲用微生态制剂的又一重要保证。本研究结果表明,在常温贮藏试验中,游离及微胶囊屎肠球菌固态产品的活菌数均未大幅度的下降,这可能是由于产品的水分比较低(水分含量平均为 10%),细菌处于休眠状态,从而保证了其活性的稳定。

4 结 论

以海藻酸钠-氯化钙微胶囊体系,采用前包被工艺进行屎肠球菌的固定化培养,采用 1.5% 的海藻酸钠,11.1 g/L CaCl_2 和 30 min 固化时间,所制得液态微胶囊形态好,粒径大小合适,颗粒均匀;通过在培养基中加入 2 g/L 氯化钙,在电热鼓风干燥

箱于 45°C 条件下干燥 5.2 h,可以得到色泽良好、平均粒径为 $329 \mu\text{m}$ 、颗粒大小较均匀的微胶囊颗粒。对微囊化屎肠球菌固态产品特性进行的研究表明,与游离屎肠球菌固态产品相比,微胶囊屎肠球菌固态产品具有更好的耐受 80°C 高温及模拟胃肠液的能力 ($P < 0.01$),且在常温贮藏条件下具有很好的稳定性和较长的货架期,这为今后微胶囊化屎肠球菌的工业化生产及推广应用提供了依据。

[参考文献]

- [1] Maia O B, Duarte R, Silva A M, et al. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium [J]. *Vet Microbiol*, 2001, 79(2): 183-189.
- [2] 王婷婷, 蔡文涛, 易建明, 等. 益生肠球菌应用于断奶仔猪的研究进展 [J]. *家畜生态学报*, 2009, 30(1): 95-99.
Wang T T, Qi W T, Yi J M, et al. Research progress of the probiotic enterococci application in the field of weaned piglets [J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2009, 30(1): 95-99. (in Chinese)
- [3] Shah N P, Jelen P. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions [J]. *J Food Sci*, 1990, 55: 506-509.
- [4] Shah N P. Probiotic bacteria, selective enumeration and survival in dairy foods [J]. *J Dairy Sci*, 2000, 83(4): 894-907.
- [5] Gardiner G E, O'Sullivan E, Kelly J, et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(6): 2605-2612.
- [6] Holzapfel W H, Haberer P, Geisen R, et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition [J]. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73(3): 365-373.
- [7] Selmer-Olsen E, Sorhaug T, Birkeland S E, et al. Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, 23(2): 79-85.
- [8] Teixeira A. Conduction-heating considerations in thermal processing of canned foods [J]. *Mechanical Engineering*, 1979, 101: 96.
- [9] 薛伟明, 于炜婷, 刘袖洞, 等. 载细胞海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的化学破囊方法研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2004, 25(7): 1342-1346.
Xue W M, Yu W T, Liu X D, et al. Chemical method of breaking the Cell-loaded Sodium Alginate/Chitosan Microcapsules [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2004, 25(7): 1342-1346. (in Chinese)
- [10] Fernandez M F, Boris S, Barbes C, et al. Probiotic properties of human *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract [J]. *J Appl Microbiol*, 2003, 24(9): 449-455.