

内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的研究进展

赵萌, 蔡沙, 屈方宁, 方亚鹏*

(湖北工业大学菲利普斯亲水胶体研究中心, 湖北武汉 430068)

摘要:内源乳化法是近年来兴起的一种海藻酸盐微胶囊制备方法,在制备过程中使用的都是无毒试剂和溶剂,可在生物、食品、医药等行业中用于包埋生物活性物质。本文着重介绍了内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的原理,比较了内源乳化法与外源乳化法的异同,分析了制备过程中影响微胶囊性质的因素,归纳了近年来其在生物活性物质包埋中的应用,并展望了内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的发展前景。

关键词:内源乳化法,微胶囊,海藻酸盐,生物活性物质

Research progress in emulsification/internal gelation technology for the preparation of alginate microcapsules

ZHAO Meng, CAI Sha, QU Fang-ning, FANG Ya-peng*

(Glyn O. Phillips Hydrocolloids Research Centre at HUT, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: Emulsification/internal gelation is a newly developed method for encapsulation in recent years. As all reagents and solvents used during the microcapsule preparation are nontoxic, the emulsification/internal gelation method has been adapted to encapsulate sensitive bioactive substances in biotechnology, food and medicine industries. In this paper, it was described the encapsulation mechanism of emulsification/internal gelation, compared these differences between emulsification/internal gelation and emulsification/external gelation, discussed important formulation parameters during the process, and summarized its applications in different sensitive bioactive substances. Finally, the development of this technique in the future was prospected.

Key words: emulsification/internal gelation; microcapsule; alginate; bioactive substances

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)22-0392-05

海藻酸钠是一种天然的微胶囊壁材,具有免疫原性低、生物相容性好、可降解且产物无毒副作用、价格低廉等特性,是最常用的生物活性微胶囊制备材料。海藻酸盐微胶囊制备方法较多,如挤压法、电喷雾法、乳化法等,其中内源乳化法是近年来兴起的一种方法,已陆续成功地包埋乳酸菌^[1-5]、DNA^[6-9]、牛血清蛋白^[10]、血红蛋白^[11-12]、胰岛素^[13-14]、溶菌酶^[15]、葡萄糖氧化酶^[16]、卡介苗^[17]、胰岛细胞^[18-19]、苏云氏芽孢杆菌^[20]、厌氧菌^[21]等生物活性组分。由于制备过程中使用的都是无毒试剂和溶剂,因而内源乳化法可应用于生物、食品、医药等行业中包埋生物活性物质。本文着重介绍了内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的原理,比较了内源乳化法与外源乳化法的异同,分析了制备过程中影响微胶囊性质的因素,归纳了近年来其在生物活性物质包埋中的应用进展,并进一步指出了内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的利弊,为

进一步制备生物活性物质微胶囊提供参考。

1 内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊

1989年Lencki等首次提出了内源凝胶化(Internal gelation)的概念^[22]。在此基础上,Poncellet等建立了内源乳化法(Emulsification/internal gelation),设计了该法所需的反应器和搅拌桨,系统分析了内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的各项参数,成功地制备出小尺寸、表面光洁的球形海藻酸钙凝胶珠^[23]。

1.1 内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的过程及原理

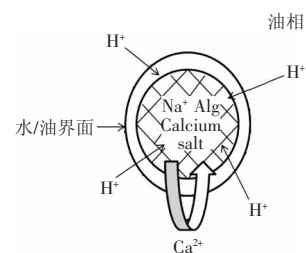


图1 内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的反应过程

Fig.1 Emulsification/internal gelation process for the preparation of alginate microcapsules

内源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的过程为:a.将

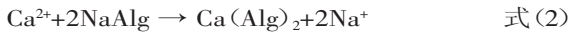
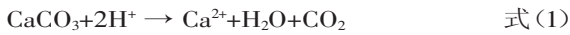
收稿日期:2013-06-07 * 通讯联系人

作者简介:赵萌(1983-),女,博士研究生,讲师,研究方向:食品功能因子的保护和增益。

基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(2012FFB00705)。

海藻酸钠溶液、水不溶性钙盐及包埋物共混；b.将此混合物分散到油相中形成W/O型乳化液；c.加入酸，引发钙盐中Ca²⁺的解离，促使Ca²⁺在乳液液滴内部与海藻酸钠作用生成海藻酸钙凝胶珠；d.加入缓冲溶液，水相、油相发生相分离，静置，收集海藻酸钙凝胶珠。因Ca²⁺来自海藻酸钠液滴内部的不溶性钙盐，钙离子与海藻酸钠在液滴内部原位形成凝胶，故称为内源乳化法，又称内源乳化凝胶法。其反应过程如图1所示。

当酸从水/油界面扩散通过后，会引发两个连续的反应：a.以碳酸钙为例，均匀分散的质子扩散到含水凝胶相与碳酸钙颗粒相遇，瞬间释放钙离子(式1)；b.海藻酸盐原位凝胶，形成均匀的凝胶网络(式2)^[24]。



1.2 内源乳化法与外源乳化法的比较

1983年, Nilsson等^[25]为了克服挤压法的缺点,发明了外源乳化法(Emulsification/external gelation)制备海藻酸盐微胶囊。其制备过程为：a.将海藻酸钠溶液和包埋物共混；b.此混合物分散到油相中形成W/O型乳化液；c.缓缓加入氯化钙溶液，促使Ca²⁺与乳液液滴中的海藻酸钠作用生成海藻酸钙凝胶珠；d.静置，收集海藻酸钙凝胶珠。因Ca²⁺来源于海藻酸钠液滴外的氯化钙溶液，钙离子从海藻酸钠液滴外侧扩散进入液滴而逐渐形成凝胶，故称为外源乳化法，又称外源乳化凝胶法，反应过程如图2所示。

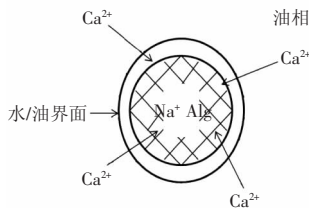


图2 外源乳化法制备海藻酸盐微胶囊的反应过程

Fig.2 Emulsification/external gelation process for the preparation of alginate microcapsules

与外源乳化法相比，内源乳化法采用难溶性钙盐作为钙源，克服了外源乳化法中氯化钙溶液加入引起的微胶囊成簇凝聚现象，使得微胶囊粒径易于控制，可形成粒径更小的微胶囊，且颗粒粒径比较均一^[23]。阳辉等^[2]采用外源乳化法和内源乳化法两种方法制备了嗜酸乳杆菌微胶囊，结果表明：两种方法均可用于乳酸菌微胶囊的制备，但相比较而言，外源乳化法包封率为61.3%，内源乳化法包封率可提高到72.5%，且内源乳化法微胶囊的粒径分布范围更窄、表面更光滑、呈球形更佳。Song等^[9]采用荧光标记-共聚焦激光扫描显微镜法，直观地显示出内源乳化法微胶囊的结构均一性和圆球度好于外源乳化法微胶囊。

2 内源乳化法过程中影响海藻酸盐微胶囊性质的因素

2.1 海藻酸盐组成与浓度

海藻酸盐是由 α -L-古罗糖醛酸(G)和 β -D-甘露

糖醛酸(M)两种单体通过(1 \rightarrow 4)键连接形成的线性嵌段共聚高分子，单体G和M在海藻酸盐主链上呈三种类型的嵌段分布：M和G交替嵌段(MGMGMGM...)、G嵌段(GGGGGGG...)及M嵌段(MMM-MMM...)^[26]。海藻酸盐在水中的溶解度依赖于pH及其阳离子形式，海藻酸钠是一种水溶性的化合物，并在Ca²⁺、Zn²⁺等二价阳离子的存在下形成凝胶。

海藻酸盐凝胶珠的性质首先取决于海藻酸盐单体和金属离子组成。一方面，单体G含量和均聚物嵌段含量高的海藻酸盐与钙离子作用强，生成强度大、性质更为稳定的凝胶；另一方面，在乳化过程中，高G含量使得海藻酸盐过早凝胶化，从而形成多孔、大粒径而不均一的凝胶珠，而高M含量海藻酸盐形成的弱凝胶弹性更好，具有良好的冻融行为^[27]。另外，海藻酸盐中钠与钙的百分含量会强烈地影响海藻酸盐微胶囊的溶胀和愈合属性^[28]。

海藻酸盐凝胶珠的性质与制备过程中使用的海藻酸钠浓度密切相关。当其浓度低于1.0%时，很难形成球形颗粒；随着海藻酸钠浓度升高，溶液粘度增加，形成粒径较大、分布较宽的微胶囊^[29]。因而，海藻酸钠浓度的选择应考虑实际应用对微胶囊颗粒大小、形状和均一性的要求，如食品中微胶囊粒径大于200 μm 时口感会比较粗糙^[30]。

2.2 二价阳离子的类型、离子载体形式及浓度

海藻酸盐凝胶珠的性质与二价阳离子的类型及其载体形式密切相关。首先，海藻酸盐凝胶强度与阳离子类型的关系为： $\text{Mg}^{2+} \ll \text{Ca}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$ 。虽然有文献报道使用锌离子制备海藻酸盐凝胶珠^[31]，但由于钙离子的临床安全性、方便和经济，制备海藻酸盐凝胶珠大多还是使用钙离子。内源乳化法使用的钙离子载体取决于形成凝胶珠所需的起始及最终pH，在该起始pH下钙离子载体应几乎不解离钙离子，但在降低pH的过程中会迅速释放钙离子。对细胞固定化而言，pKa值落在6.5~7.5范围间的阴离子都是适用的钙离子载体，如草酸盐、酒石酸盐、磷酸盐、碳酸盐和柠檬酸盐^[32]。其中，碳酸钙是最为常用的钙离子载体，其凝胶珠球形好、性质稳定，通常能得到尺寸分布较窄的凝胶珠，同时碳酸钙与海藻酸钠的悬浮液可在较宽的pH范围内保持稳定^[32]。

另外，海藻酸盐凝胶珠的性质与钙离子浓度相关。当钙与海藻酸钠单体的比例为1:4时，即可确保凝胶珠的强度。继续增加钙浓度会导致凝胶珠中残留不溶性钙盐^[27]。

最后，海藻酸盐凝胶珠的性质与钙盐颗粒尺寸相关。钙盐粉末粒径越小，越容易进入微胶囊液滴，其溶解速度更快，所形成的凝胶珠球形更好，且更不易聚集。因而，可使用微米级、纳米级碳酸钙进行制备海藻酸盐微胶囊。另外，文献报道使用超声波分散碳酸盐颗粒可使得凝胶后的凝胶珠内没有残留碳酸钙颗粒^[6]。

2.3 pH

包埋过程使用的pH范围取决于钙离子载体形式、包埋物活性对pH的敏感程度等多个参数。中性

pH范围适合一般细胞的固定化,乳酸菌等耐酸性的菌体可使用较低pH,其终点pH可降低到5^[6]。另外,包埋蛋白质时,pH的选择必须考虑蛋白质等电点对其稳定性、溶解度等因素的影响^[10-13,16]。

2.4 油型

海藻酸盐凝胶珠平均粒径与油脂粘度存在着相关性,Esquisabelr等研究了微胶囊粒径大小与油脂粘度间的关系,得到模拟公式 $\Phi(\mu\text{m})=76.6-0.628\eta(\text{mPa}\cdot\text{s})(R^2=0.943)$ ^[17],即粘度越大,微胶囊粒径越小,因而在一定程度上可通过油脂粘度来调控微胶囊粒径大小。另外,乳化过程中水相/油相比例会影响微胶囊的包埋率、粒径分布等性质。通常情况下,水相和油相的比例范围在1:2和1:5之间^[21],可根据不同的包埋物进行优化。

2.5 乳化剂的类型及浓度

内源乳化法的第一步是乳化过程,因而乳化剂的类型和浓度会影响微胶囊的性质。文献中内源乳化法制备微胶囊使用的乳化剂主要有span 80、span 85、tween 80、卵磷脂等。乳化剂在内源乳化法乳化过程中有两个功能:a.降低水相和油相之间的界面张力,使粘性海藻酸钠溶液更容易分散到油相中;b.使乳液稳定,防止乳液液滴聚集^[29]。

微胶囊制备过程中,乳化剂浓度十分重要。随着表面活性剂浓度从0.5%增加到2.0%时,海藻酸盐凝胶珠的粒径大小显著下降。表面活性剂吸附到分散的液滴相表面而形成一层薄膜来防止乳液液滴间的聚结,因而低浓度的表面活性剂不能完全覆盖分散相表面,从而引起液滴稳定性下降,聚结生成较大的液滴。另一方面,油溶性酸必须扩散通过油水界面而启动凝胶化反应,高的表面活性剂浓度可能会增大酸的传质阻力,延长凝胶化,导致微胶囊颗粒产量低,因而大于2.0%的乳化剂浓度不利于微胶囊制备^[29]。

2.6 酸的类型

内源乳化法过程中使用油溶性酸,这是因为油溶性酸添加到油相中,可使得有机酸立即分配到水相中,从而瞬间降低液滴pH,增加结晶钙的溶解性,触发快速凝胶化^[21]。油溶性酸种类很多,但通常选择的是乙酸、柠檬酸和乳酸,其中乙酸使用次数最多。酸的浓度必须精心计算,在促进钙的充分释放的同时不会剩余过多的酸,否则可能会破坏包埋物的活性。

3 内源乳化法在生物活性物质包埋中的应用

3.1 乳酸菌

乳酸菌的保护一直是食品科学领域的研究热点,但由于乳酸菌的高度热、机械、化学敏感性,其有效包埋方法的建立一直没有得到很好的解决。近年来,许多食品跨国公司和研究机构投入了大量精力和财力进行乳酸菌微胶囊化研究。Larisch等^[1]首次采用内源乳化法将乳酸乳球菌包埋在海藻酸盐微胶囊中,用于乳品工业中制造酸奶、发酵奶油、奶酪酱等。阳辉等^[2]系统研究了海藻酸盐-内源乳化法和海藻酸

盐-外源乳化法包埋嗜酸乳杆菌的工艺条件,结果表明海藻酸盐-内源乳化法制备的微胶囊包埋率较高、粒径分布范围更窄、表面更光滑、呈球形更佳。王艳等^[3]使用海藻酸钠及海藻酸钠&壳聚糖混合物两种壁材,以内源乳化法包埋了嗜热链球菌乳杆菌,其中壳聚糖/海藻酸盐微胶囊在模拟胃液保温3h后乳酸菌仍有发酵活力,放于冰箱中4℃保存2个月,菌体存活率保持在94.8%。Zou等^[4]以海藻酸钠为主要壁材,选取了淀粉、果胶、壳聚糖和多聚赖氨酸等四种多糖复配对海藻酸盐微胶囊进行改进,评价了不同强化手段对微胶囊特性和乳酸菌保护效果的影响,结果表明:各强化手段对海藻酸盐微胶囊乳酸菌包埋率影响不大,均在43%~50%;壳聚糖/海藻酸盐微胶囊对乳酸菌保护效果最好,在模拟胃肠液中壳聚糖/海藻酸盐微胶囊的乳酸菌存活数比海藻酸盐微胶囊高了1.0个对数值,经30d储藏后壳聚糖/海藻酸盐微胶囊的乳酸菌存活数最高。Song等^[5]采用内源乳化法和外源乳化法制备了壳聚糖/海藻酸盐乳酸菌微胶囊,两者包埋率均为80%左右,荧光标记-共聚焦激光扫描显微镜结果表明:内源乳化法微胶囊结构均一,圆球度好;外源乳化法微胶囊结构不均,呈现外硬内软的结构分布,圆球度差。

与化学组分相比,乳酸菌包埋的难度为:a个体较大,微米尺寸,不易包埋,文献报道内源乳化法最高包埋率为80%^[5],远低于分子尺寸化学组分;b乳酸菌具有生命活性,其包埋过程本身会对乳酸菌存活造成一定的伤害;c乳酸菌个体差异大,不同种、属、株来源的乳酸菌对环境的耐受性不同,很难进行数据重现实验,不同作者的数据可比性较差。

3.2 DNA

Quong等^[6-8]首次采用内源乳化法将DNA包埋到海藻酸盐微球中,考查了在核酸酶、水解酶存在下微胶囊对DNA的保护效果,结果表明小分子量壳聚糖和大分子聚赖氨酸包衣的海藻酸盐微球使核酸酶对DNA维持双链结构的时间大大延长。另外,Quong等^[9]以DNA为模型物,采用外源乳化法和内源乳化法制备的海藻酸盐微胶囊,比较了两种微胶囊的包埋率、结构及DNA的保护效果等参数,结果表明:内源乳化法包埋率80%,挤压法包埋率97%;内源乳化法形成内外较为均一的结构,外源乳化法形成内外非均匀结构;微胶囊在制备、保存和模拟胃肠条件下的微胶囊重量变化表明内源乳化法更有利于DNA保护。

3.3 蛋白质

目前,内源乳化法包埋的蛋白质有牛血清蛋白、血红蛋白、胰岛素、溶菌酶等。Vandenberg等^[10]分别用挤压法和内源乳化法制备了牛血清蛋白的海藻酸盐-壳聚糖微胶囊,比较了这两种微胶囊中的牛血清蛋白在凝胶化、冲洗等加工过程和模拟胃肠液中的扩散情况,结果表明内源乳化法的扩散现象较为严重、包埋率较低。Ribeiro等^[11]使用壳聚糖包衣成功降低了血红蛋白的扩散现象,同时使用DSC和FTIR来考察海藻酸钠和壳聚糖间的相互作用,结构表明海藻酸钠羧基和壳聚糖氨基间存在着静电相互作用。

Silva等^[12]系统研究了海藻酸钠-壳聚糖内源乳化法制备血红蛋白微胶囊的工艺流程,以微胶囊粒径、包埋率为指标,优化了钙胶比、油水比、搅拌速度、乳化剂含量等多个参数。在此基础上,Silva等^[13-14]又进一步以海藻酸钠为主的复合壁材研究内源乳化法制备胰岛素微胶囊的工艺流程,海藻酸钠与其他多糖的复合使用会影响到胰岛素的包埋率,其中硫酸葡聚糖或硫酸纤维素与海藻酸钠共混提高了胰岛素的包埋率,硫酸葡聚糖、硫酸纤维素或聚磷酸盐与海藻酸钠共混大大降低了其在模拟胃液中的释放率。刘若男等^[15]研究了壳聚糖-海藻酸钠内源乳化法制备溶菌酶微胶囊的工艺条件,得到了模拟胃液处理后溶菌酶仍保留90.0%活性的实验结果。Wang等^[16]用内源乳化法包埋了葡萄糖氧化酶,制备了平均粒径为26 μm 的壳聚糖/海藻酸盐微胶囊,在酶等电点附近的pH4.0下将酶与海藻酸钠共混得到的包埋酶活总量最高,储藏60d后,固定化酶可保持70.4%初始酶活,远高于自由酶残存酶活7.5%,该文献制备的壳聚糖/海藻酸盐葡萄糖氧化酶微胶囊可作为面粉改良剂而应用于实际生产中。

3.4 其他细胞

因微胶囊包埋可以避免个体对细胞移植的免疫排斥作用,细胞微胶囊逐渐引起了众多医学界研究者的兴趣。Esquisabelr等^[17]首次将内源乳化法应用于包埋卡介苗,获得了粒径尺寸40 μm 左右的微胶囊。Hoesli等^[18-19]采用内源乳化法包埋小鼠胰岛细胞,细胞存活率高达90%以上,采用5%海藻酸钠浓度时未见免疫排斥,2d后即可大大降低血液中的葡萄糖含量,且可在细胞移植10d后胰岛素表达量提高(67 \pm 32)倍,十分适用于原发性胰腺外分泌细胞移植。Garcia-Gutierrez等^[20]用内源乳化法制备了苏云金芽孢杆菌的芽孢-晶体蛋白聚合体的海藻酸钠微胶囊,平均粒径在10 μm 以下,可有效提高芽孢-晶体蛋白聚合体对紫外线照射的抗性,在236J中波长紫外线照射下,芽孢存活率、晶体蛋白活性可分别保持60%、40%,极大地改善了芽孢-晶体蛋白聚合体对环境中的恶劣因素的敏感性。Borner等^[21]用内源乳化法包埋了厌氧菌梭状芽孢杆菌,优化了微胶囊制备条件,在100r/min、以甲酯化的油菜籽油为油相条件下,制备的微胶囊中94%的球体仅包埋一个菌体细胞,此单细胞微胶囊在有氧条件下培养可形成微菌落,这一报道拓展了海藻酸钠微胶囊在厌氧菌培养领域中的应用。

4 内源乳化法制备生物活性微胶囊的发展前景

随着食品医药产业越来越重视生物活性成分在人体效能的发挥,功能性食品组分的微胶囊及新颖释药剂型的开发逐渐成为研究热点。内源乳化法是近年来兴起的一种海藻酸盐微胶囊制备方法,与外源乳化法相比,内源乳化法具有粒径可控、工艺容易放大、微胶囊不易聚集等优点,是研究微胶囊对生物活性物质保护机理的有利工具。其制备过程安全无毒,可用来包埋生物活性物质,从而广泛应用于生物、食品、医药等行业中。

但内源乳化凝胶法还存在一些不足之处,其制备过程繁琐,需要添加油脂做分散相,提高了工艺成本,因而,目前对内源乳化凝胶法的研究多停留在实验室阶段,还未应用于工业生产中。但内源乳化法可控制微胶囊粒径大小、可使用较高的海藻酸钠浓度,对生物活性物质的保护和可控释放相当有利,随着医药、保健品行业中对细胞微胶囊、高生物活性物质微胶囊等高附加值产品的开发,内源乳化法包埋生物活性物质必将获得长足发展。

参考文献

- [1] Larisch BC, Poncelet D, Champagne CP, et al. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [J]. Journal of Microencapsulation, 1994(11):189-195.
- [2] 阳辉. 肠溶性嗜酸乳杆菌微胶囊制备方法及其特性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2006.
- [3] 王艳. 内源乳化凝胶法制备嗜热链球菌微胶囊及其性质的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2008.
- [4] Zou Q, Zhao J, Liu X, et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(8):1672-1678.
- [5] Song H, Yu W, Gao M, et al. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96:181-189.
- [6] Quong D, O'Neil IK, Poncelet D, et al. Gastrointestinal protection of cellular component DNA within an artificial cell system for environment carcinogen biomonitoring[M]. Amsterdam: Elsevier Science B V, 1996:814-820.
- [7] Quong D, Neufeld RJ. DNA Protection from extracapsular nucleases, within chitosan-or poly-L-lysine-coated alginate beads[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 60:124-134.
- [8] Quong D, Yeo JN, Neufeld RJ. Stability of chitosan and poly-L-lysine membranes coatings DNA-alginate beads when exposed to hydrolytic enzymes[J]. Journal of Microencapsulation, 1999, 16:73-82.
- [9] Quong D, Neufeld RJ, Skjak-Braek G, et al. External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 57:438-446.
- [10] Vandenberg GW, Noue JDL. Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation[J]. Journal of Microencapsulation, 2001, 18:433-441.
- [11] Ribeiro AJ, Silva CM, Figueiredo M, et al. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, 25:31-40.
- [12] Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo M, et al. Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification internal gelation[J]. The AAPS Journal, 2006a, 7(4):E903-E913.

- [13] Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo M, *et al.* Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 311(1-2): 1-10.
- [14] Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo M, *et al.* Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 29(2): 148-159.
- [15] 刘若男, 李俊华, 杨严俊. 内源乳白法制备溶菌酶微胶囊的研究[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(8): 318-324.
- [16] Wang X, Zhu KX, Zhou HM. Immobilization of glucose oxidase in alginate-chitosan microcapsules[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12: 3042-3054.
- [17] Esquisabel A, Hernández M, Igartua M, *et al.* Production of BCG alginate-PLL microcapsules by emulsification internal gelation[J]. *Journal of Microencapsulation*, 1997, 14(5): 627-638.
- [18] Hoesli CA, Raghuram K, Kiang RLJ, *et al.* Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(2): 424-434.
- [19] Hoesli CA, Kiang RLJ, Mocinecová D, *et al.* Reversal of diabetes by β TC3 cells encapsulated in alginate beads generated by emulsion and internal gelation[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2012, 100B(4): 1017-1028.
- [20] Garcia-Gutierrez K, Poggio-Varaldo HM, Esparza-Garcia F, *et al.* Small microcapsules of crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis* by an emulsification/internal gelation method[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34(6): 701-708.
- [21] Borner RA, Aliaga MTA, Mattiasson B. Microcultivation of anaerobic bacteria single cells entrapped in alginate microbeads[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(3): 397-405.
- [22] Lencki RWJ, Neufeld RJ, Spinney T. Method of producing microspheres: US, 4822534 [P]. 1989.
- [23] Poncelet D, Lencki R, Beaulieu C, *et al.* Production of alginate beads by emulsification/internal gelation I methodology[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 38: 39-45.
- [24] Liu XD, Yu WY, Zhang Y, *et al.* Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources[J]. *Journal of Microencapsulation*, 2002, 19: 775-782.
- [25] Nilsson K, Birnbaum S, Flygare S, *et al.* A general method for the immobilisation of cells with preserved viability[J]. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1983, 17: 319-326.
- [26] Gacesa P. Alginates[J]. *Carbohydrate Polymer*, 1988(8): 161-182.
- [27] Poncelet D. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001, 944: 74-82.
- [28] Sartori C, Finch DS, Ralph AB. Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy[J]. *Polymer* 1996, 38: 43-51.
- [29] Liu X, Ma Z, Xing J, *et al.* Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004, 270: 1-6.
- [30] Burgain J, Gaiani C, Linder M, *et al.* Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications[J]. *Journal of Food Engineering*, 2011, 104(4): 467-483.
- [31] Gursoy A, Karakus D, Okar I. Comparative study on different polymers for sustained release formulations of dipyrindamole-alginate microspheres and tabletted microspheres[J]. *Journal of Microencapsulation*, 1999, 16: 439-452.
- [32] Poncelet D, Smet BPD, Beaulieu C, *et al.* Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 1995, 43: 644-650.

全国中文核心期刊

轻工行业优秀期刊