

噬菌体赋形剂的种类、配方及包被技术研究进展

包红朵¹, 夏兴^{1,2}, 朱树娇¹, 仲召鑫³, 夏雨², 王冉^{*1}

1 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(南京), 江苏 南京 210014

2 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122

3 江苏省农业科学院沿海地区农业科学研究所, 江苏 盐城 224002

包红朵, 夏兴, 朱树娇, 仲召鑫, 夏雨, 王冉. 噬菌体赋形剂的种类、配方及包被技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1823-1831

Bao Hongduo, Xia Xing, Zhu Shujiao, Zhong Zhaoxin, Xia Yu, Wang Ran. Research progress of types, formulation and encapsulation technology of phage excipients[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1823-1831

摘要:噬菌体制剂的研究与应用受到医药领域、畜牧兽医领域及食品生产在内的各行业的重视。然而,噬菌体作为一种具有蛋白质外壳的活微生物,其在防治致病菌污染、感染及储存运输过程中,会遇到一些活性丧失、储存期短、液体状态运输不便等问题。因此,寻找合适的包被赋形剂,以减少噬菌体在使用、储存及运输过程中的活性损失,是噬菌体疗法亟须解决的问题。本文主要综述制备噬菌体制剂时使用的包被赋形剂种类、配方及包被技术等,及其对噬菌体抗逆性和储存稳定性的影响,并探讨了该领域最重要的研究成果,以期为固态噬菌体制剂寻找合适的包被赋形剂、配方和包被技术,为噬菌体的靶向治疗和控制释放奠定基础,有助于噬菌体治疗的更广泛的临床应用。

关键词:噬菌体; 赋形剂; 封装技术; 耐胃酸

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFE0101900); 江苏省农业科技自主创新资金(cx[20]3012)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFE0101900); Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund of Jiangsu Province (cx[20]3012)

*Corresponding author: E-mail: ranwang@jaas.ac.cn

Received: 2021-08-20; Accepted: 2021-10-13; Published online: 2022-02-07

Research progress of types, formulation and encapsulation technology of phage excipients

BAO Hongduo¹, XIA Xing^{1,2}, ZHU Shujiao¹, ZHONG Zhaoxin³, XIA Yu², WANG Ran^{*1}

1 Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base, Key Laboratory of Agro-Product Safety Risk Evaluation (Nanjing) of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Agricultural Product Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

2 School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Institute of Agricultural Sciences in the Coastal Area in Jiangsu, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Yancheng 224002, Jiangsu, China

Abstract: Phage research and applications have been booming in medicine, animal husbandry, veterinary medicine, and food production. However, as an alive microorganism with protein capsid, phage may encounter loss of activity, short storage, and inconvenient transportation in liquid state when being applied in the prevention and control of bacterial pollution and infection. Therefore, to find suitable excipients for phage encapsulation is an urgent problem to be solved for phage therapy. We reviewed the effects of the types, formulations, and encapsulation technologies of excipients used in phage preparations on the resistance and storage stability of phages, and summarized the major research achievements in this field. In this review, we hope to find suitable formulations and technologies of excipients for solid-state phage preparations, which will lay a foundation for the targeted delivery and release of phages and contribute to the clinical application of phage therapy.

Keywords: phage; excipients; encapsulation technology; gastric acid resistance

自 20 世纪 40 年代起, 抗生素成为临床上最普遍应用的药物。然而抗生素的大量使用及滥用, 加速了耐药菌的产生。细菌耐药性问题日趋严重^[1], 同时, 抗生素类药物研发周期漫长的现况, 已经严重威胁到人类的健康, 因此, 研究与开发新型抗菌产品已迫在眉睫。2020 年 7 月 1 日起, 我国全面禁止在饲料端添加促生长类抗生素, 养殖端“限抗、减抗”, 以期实现全球的最终目标“2027 年畜禽类绝对的无抗养殖”。随着后抗生素时代的到来, 噬菌体治疗又重新受到重视^[2]。噬菌体是一种“吃”细菌的纳米级微生物, 与抗生素相比, 噬菌体的突出优势在于^[3-4]: (1) 可以在细菌感染部位自我复制增殖, 靶向杀灭致病菌; (2) 其具有种属特异性, 专一性裂解目标菌, 不会引起机体

微生态失衡; (3) 噬菌体在自然界和动物体中广泛存在, 无毒副作用、无残留; (4) 噬菌体制剂的研制时间和成本远远低于新型抗生素药物的研发周期和成本, 噬菌体是最有潜力的抗生素替代品之一。

美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)和美国农业部(United States Department of Agriculture, USDA)已经批准了几种基于噬菌体的制剂, 旨在克服最常见的病原菌污染, 如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、弯曲菌(*Campylobacter*)和李斯特菌(*Listeria*)。噬菌体制剂可作为即食食品(ready-to-eat, RTE)和肉类生产中的添加剂, 用于杀灭屠宰前的动物或动物饲料中的致病菌^[5-7]。在人类和动物体中使用噬菌体, 需要口服噬菌

体制剂或局部给药^[8]。然而, 噬菌体作为一种具有蛋白质外壳的活微生物^[9], 易受蛋白质变性因子的影响^[10]。因此, 噬菌体在使用过程中面临诸多挑战。例如, 在运输和储藏过程中, 噬菌体对“冷链”依赖极高, 通常需要在 2-8 °C 的低温下储存, 而且口服噬菌体在动物体胃肠道内易被胃酸、消化酶(胃蛋白酶、蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和胰蛋白酶)、胆汁酸盐、胰液等破坏^[11-12], 丧失杀菌活性, 难以发挥有效肠道抗菌及调节肠道微生态的功能^[13]。此外, 在食品加工过程中, 低温、高温或接触化学试剂均可损害噬菌体活性^[14-16]。将噬菌体封装到保护性微囊或者纳米颗粒中制备成固态噬菌体制剂是一种行之有效的方法, 以克服不利的储存、胃肠生理和食品加工环境, 延长保质期、提高其运输和储存过程的易操作性, 增加噬菌体的生物药效, 同时, 将噬菌体定向输送至感染部位(例如肺部、肠道), 提高其控制致病菌的能力^[14-16]。

1 赋形剂的种类、配方及包被技术

赋形剂的种类、配方及包被技术是制备长效固态噬菌体制剂及发挥高效生物有效性的关键步骤。目前, 常用于噬菌体包被的赋形剂有食品级聚合物、脂质体和 pH 响应性高分子材料, 如聚乳酸-羟基乙酸共聚[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA], 尤特奇(Eudragit[®])、聚乙烯醇^[15,17-18]。不同赋形剂对噬菌体的抗逆性及长期活性稳定性的保护效率是不同的, 本文综述了目前用于包被噬菌体的赋形剂种类、配方、包被技术及储存稳定性, 为噬菌体制剂的优化设计提供了研究基础。

1.1 食品级聚合物

常用的食品级聚合物有海藻酸钠、壳聚糖、卡拉胶、乳清蛋白、明胶、果胶、酪蛋白

等。以海藻酸钠为基础, 加入不同的赋形剂材料, 通过挤压法制成噬菌体水凝胶或者通过喷雾干燥法制成噬菌体粉末, 这些包被材料与技术是制备具有抗逆性和储存稳定的噬菌体制剂的有效手段^[15,17-18]。

海藻酸钠是一种阴离子线性多糖, 其分子由 β -D-甘露糖醛酸(β -D-mannuronic, M)和 α -L-古洛糖醛酸(α -L-guluronic, G)按(1 \rightarrow 4)键连接而成^[19]。海藻酸钠水凝胶是最常见、最简单的赋形剂, 其被广泛应用于包被各种形态的噬菌体^[20-27]。这种海藻酸钠水凝胶是通过挤压法将噬菌体和海藻酸钠混合成的亲水胶体以液滴形式加入氯化钙溶液, 此时古洛糖醛酸的羧酸盐阴离子和钙离子发生交联, 形成“egg-box”^[28]。尽管海藻酸钠水凝胶为噬菌体提供了基本的酸性保护, 但是海藻酸钠水凝胶在非凝胶阳离子(如 Na^+ 和 Mg^{2+})存在的情况下不稳定, 并且其凝胶孔隙容易被酸渗透, 导致其抗逆结构性能较差。为了克服这一缺陷, 常用的方法是在海藻酸钠水凝胶中加入各种聚合物, 例如壳聚糖、乳清蛋白、酪蛋白、卡拉胶、海藻糖、蔗糖等, 以增强凝胶结构的强度。研究表明, 海藻酸钠-壳聚糖包裹的噬菌体微囊可一定程度提高酸性条件下噬菌体制剂的稳定性。Ma 等^[20]将噬菌体 Felix O1 包被在海藻酸钠-壳聚糖微囊中, 可完全保护噬菌体免受胆盐的影响。然而, 在 pH 2.0 的模拟胃液(simulated gastric fluid, SGF)中, 凝胶对噬菌体只有部分保护作用, 并且在 pH 6.8 的模拟肠液(simulated intestinal fluid, SIF)中, 微囊化噬菌体的释放时间较慢, 完全释放需要 5 h。除此之外, El Haddad 等^[21]研究表明, 海藻酸钠凝胶的粒径大小会影响噬菌体包被率, 其中肌病毒科噬菌体 Team1 在 2 mm (大微球)中的包被率高于 0.5 mm (小微球)。为了保护噬菌体免受胃酸的影响, 在海藻酸钠凝

胶中加入 CaCO_3 ，发现包被后的噬菌体对 SGF 的耐酸性增强；然而，在 SIF 中释放率没有改善^[22-24]。这是由于 CaCO_3 的加入发挥了一种缓冲作用，防止氢离子渗透到微胶囊内部，同时溶解的钙离子也可能与海藻酸分子上的羧基相互作用，从而进一步增强 SGF 中的钙-海藻酸凝胶网络。当培养基从 SGF 变为 SIF 时，从 CaCO_3 解离的游离 Ca^{2+} 仍然存在于凝胶网络中，会抑制海藻酸钠凝胶的膨胀，导致其释放速度变慢。为了解决这一问题，Tang 等^[25]将乳清蛋白(一种廉价奶酪的副产品)与海藻酸钠凝胶进行结合来封装噬菌体 Felix O1。由于乳清蛋白水凝胶在 pH 值高于其等电点(pI 5.1)时容易膨胀，并可被 SIF 中的胰酶降解，因此添加乳清蛋白将显著加速噬菌体微球释放到 SIF 中。同时，由于变性乳清蛋白具有大量的疏水表面，可以阻止酸与噬菌体的直接接触，并且在 pH 2.0 的 SGF 中，封装的噬菌体可存活长达 2 h。Tang 等^[26]再次证实乳清蛋白-海藻酸钠微胶囊对噬菌体 K 具有良好的保护性和释放性，这表明海藻酸盐/乳清蛋白组合可以成为各种形态噬菌体口服给药的潜在候选配方。Abdelsattar 等^[27]将大肠杆菌噬菌体 ZSEC5 的壳聚糖-海藻酸钠凝胶外层再用蜂蜜和明胶进一步包被，发现噬菌体凝胶在水中形态完整，但在 37 °C SIF 中 4-5 h 溶解后可完全释放出噬菌体。Silva Batalha 等^[29]首次使用海藻酸钠-卡拉胶包被噬菌体，研究表明，海藻酸钠水凝胶包被的噬菌体 UFV-AREG1 对脱水敏感，需要加入保护剂保护其活性稳定。Kim 等^[30]将麦芽糖(双糖)等添加到配方中，防止微囊干燥过程中噬菌体活性损失，以提高微囊化噬菌体储存稳定性。

海藻酸钠配方不仅可以用来制备水凝胶保护噬菌体，而且可以作为冷冻干燥或者喷雾干燥的赋形剂保护噬菌体。Petsong 等^[14]通过冷

冻干燥法将乳清蛋白和海藻糖以 3:1 (质量比)包被的噬菌体制成粉剂，包被率最高达 91.9%；包被噬菌体粉剂在 pH 值为 1.5、3.5、5.5、7.5 和 9.5 的环境中 5 h 后的存活力均 >90%；此外，在 10 °C 和 30 °C 下，包被噬菌体粉剂可以有效杀灭肠炎沙门氏菌(*Salmonella* Enteritidis) 和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella* Typhimurium)。Acar Soykut 等^[11]使用 1.33% (质量体积分数)海藻酸钠包被不同种类的噬菌体并进行喷雾干燥发现，制备的噬菌体粉剂提高了噬菌体耐胃酸和胆盐的能力；在 SGF 中 2 h 后，枯草芽孢杆菌噬菌体(*Bacillus subtilis* phage)、肠炎沙门氏菌噬菌体(*Salmonella* Enteritidis phage)、鼠伤寒沙门氏菌噬菌体(*Salmonella* Typhimurium phage)效价分别下降 0.60 lg、2.29 lg、1.71 lg，而游离噬菌体在 SGF 中仅能存活 15 min。

1.2 脂质体

脂质体是由脂质双层包围的球形纳米颗粒，具有高度生物相容性，是一种定向药物载体。利用脂质体包被噬菌体方法，又称为“特洛伊木马”法^[31]，该方法可以提高噬菌体的抗逆性，延长其储存期，改变被包被噬菌体在动物体内的分布。由于阳离子脂质体与带负电荷细菌的相互作用^[32]，脂质体包裹的噬菌体可以黏附并扩散到含有致病菌的病灶部位或者黏膜内，并且延长噬菌体在感染部位的滞留时间，从而提高噬菌体治疗指数，尤其适用于呼吸道、局部伤口和胃肠道感染^[33-39]。

张劼等^[33]的研究表明，脂质体包被的噬菌体 AB3 通过滴鼻进入小鼠体内，在肺组织中的存留时间可延长至 300 min，与未包被噬菌体相比，第 7 天产生更低效价的中和抗体，第 14 天中和抗体效价降为 0。Colom 等^[34]将噬菌体 UAB_Phi20、UAB_Phi78 和 UAB_Phi87 封装在脂质体中，并研究它们在减少禽沙门氏菌

方面的功效; 包裹的噬菌体脂质体粒径为 309–326 nm, 带正电荷(+31.6–+35.1 mV), 包被率为 47%–49%, 在 4 °C 下至少可以储存 3 个月, 并可添加到动物饮水和饲料中; 研究发现在 SGF (pH 2.8) 中, 未包被噬菌体的效价降低了 5.7–7.8 lg, 而包被噬菌体的稳定性显著提高, 仅降低 3.7–5.4 lg。除此之外, 脂质体包被也提高了噬菌体在鸡肠道中的滞留率(72 h 后, 脂质体包被组 38.1%, 非包被噬菌体 9.5%)。同样的, Singla 等^[35]开发了一种噬菌体脂质体递送系统, 可以确保噬菌体在感染部位的高效递送和感染部位滞留; 采用不同比例的胆固醇、脂质和表面活性剂及不同电荷包被噬菌体, 结果表明, 阳离子脂质体噬菌体的最大包被率为 92%; 利用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)技术证实噬菌体被均匀包被在脂质体中; 脂质体包被法可延长噬菌体在动物器官中的保留时间, 即在血液中可保留 4 d, 在肝、肺和肾中可保留 6 d, 在脾脏中可保留 14 d, 而在血液和肺中以及在所有其他器官中, 第 36 h 时仍未检测到游离噬菌体。Cui 等^[36]将壳聚糖膜包被的噬菌体再用脂质体包被, 包被率为 57.66%±0.12%, 此包被法对 *Escherichia coli* O157:H7 具有很高的抗菌活性, 但对牛肉的感官品质没有影响。因此, 通过脂质体/壳聚糖膜包被的噬菌体有望成为牛肉保鲜的抗菌包装材料。Chadha 等^[37]在 BALB/c 小鼠中建立了肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) B5055 烧伤创面感染模型, 用脂质体包被的噬菌体鸡尾酒处理小鼠, 发现小鼠血液和主要器官中的细菌载量大幅下降; 脂质体增加了噬菌体在体内的滞留时间, 从而增强了疗效; 即使延迟 24 h 治疗, 脂质体噬菌体制剂也能够保护所有试验动物免于死亡。Chhibber 等^[38]使用一种脂质体包被 2 株金黄色葡萄球菌裂解性噬菌体

(*Staphylococcus aureus* phage) MR-5 和 MR-10, 体内外稳定性和噬菌体动态分布结果发现, 脂质体包被的噬菌体混合物可使噬菌体在糖尿病引发的伤口部位具有更好的有效性和持久性。Loh 等^[39]基于微流控技术, 通过脂质体对 2 种不同大小形态的噬菌体 *Eshcherichia coli* T3 短尾病毒科(大小约 65 nm)和肌病毒科 *Staphylococcus aureus* phage K (衣壳头部约 80 nm, 噬菌体尾部约 200 nm)进行了封装, 平均粒径为 100–300 nm, T3 噬菌体的包被率为 10⁹ PFU/mL, 噬菌体 K 的包被率仅为 10⁵ PFU/mL; 研究发现 *Staphylococcus aureus* phage K 与脂质双层相互作用, 导致大量噬菌体结合在脂质体的外部, 而不是被包裹在脂质体内部。脂质体外部的噬菌体极易在胃酸中失活, 这样仅部分噬菌体被输送到胃肠道下游感染部位。先前发表的关于脂质体包被噬菌体的研究可能高估了有尾噬菌体的包被率。

1.3 pH 响应性聚合物

pH 响应性聚合物也为噬菌体包被提供了许多可用的赋形剂材料, 包括脂肪族聚酯、聚酰胺、聚碳酸酯和聚氨基酸^[40–42]。其独特的性质是只在特定的 pH 值下溶解, 并使所需的药物释放在适当的位置或在所需的时间内释放药物。

Eudragit[®]是一种 pH 响应性聚甲基丙烯酸酯聚合物家族, 广泛应用于制药行业, 已成功用于包被结肠给药的药物^[43]。Eudragit[®]L100 在 pH 6.0 时溶解, Eudragit[®]S100 在 pH 7.0 时溶解^[44]。这些聚合物可在市场上买到, 并广泛用于噬菌体纳米纤维的包被中。在喷雾干燥过程中暴露在高温下会降低噬菌体活性, 然而, 同时加入 pH 响应性聚合物和多糖类物质可大大提高噬菌体存活率, 并且降低工艺成本, 促使大规模工业化生产噬菌体制剂成为可能。Vinner

等^[45]用市场上销售的 Eudragit[®]S100 来封装沙门氏菌噬菌体(*Salmonella* phage) Felix O1, 制成口服片剂; 在喷雾干燥过程中, 如果单纯使用 Eudragit[®]S100 并不能有效保护噬菌体, 而在赋形剂中同时添加海藻糖可以有效保护噬菌体免受喷雾干燥过程中的热应力和脱水应力; 聚合物配方中海藻糖比例越高, 产生的噬菌体滴度越高。Stanford 等^[46]使用聚甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物配方及可伸缩膜乳化技术将大肠杆菌噬菌体(*Escherichia coli* phage)封装在 3 种不同的 pH 响应性聚合物配方中, 制备了 100 μm 的微胶囊, 在 pH 1.5 时噬菌体保持活性, 而在 pH 5.5、6.0 和 7.0 下控制噬菌体释放。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (polylactic-co-glycolic acid, PLGA) 也是一种 pH 响应性聚合物家族, 由聚乳酸 (poly-lactic acid, PLA) 和聚乙醇酸 (poly-glycolic acid, PGA) 组成, 具有良好的生物相容性和生物可降解性, 其已被广泛用于输送小分子、蛋白质和核酸, 目前, 也有研究将其用于包被噬菌体^[47]。Puapermpoonsiri 等^[48]通过改进的水包油包水 (water/oil/water, w/o/w) 双乳液溶剂萃取方案将 2 株噬菌体封装到 PLGA (PGA:PLA 为 50:50) 中, 但是, 7 d 后包被噬菌体丧失活性, 这提示在使用该材料包被噬菌体时需要预防有机试剂引起的噬菌体蛋白变性, 但这项工作证明了 PLGA 作为噬菌体包被的配方和控制释放的概念。在另一项研究中, Agarwal 等^[49]通过加入多孔碳酸氢铵优化了 PLGA 配方, 增大噬菌体吸附到 PLGA 的表面积, 并且含乳糖的噬菌体负载颗粒在室温下储存 16 d 效价无损失; 当然, 也可用超临界 CO_2 、或典型的亲水性和冷冻保护剂代替有机溶剂来延长 PLGA 包被噬菌体制剂的保质期; 在应用此类赋形剂过程中, 噬菌体与聚合物接触的相互作用方式和方向是保持噬菌体活性的关键; 这

项工作为噬菌体的靶向治疗和控制释放开辟了道路, 有助于噬菌体治疗更广泛地临床应用。

1.4 其他

除上述类别外, 还有其他赋形剂在噬菌体包被配方中发挥特殊功能。除此之外, 研究人员对表面活性剂也进行了研究。Chang 等^[50]实验证明普鲁尼克 F68 (pluronic F68) 对干粉制剂中 3 种受试噬菌体的稳定性影响不大。类似地, Matinkhoo 等^[51]在海藻糖/亮氨酸赋形剂中添加 pluronic F68 时, 发现其不影响噬菌体的稳定性。在该研究中, 另一种表面活性剂泰洛沙泊 (tyloxapol) 在加入海藻糖/亮氨酸制剂时导致噬菌体效价降低。然而, 表面活性剂在噬菌体制剂稳定性中的作用机制, 还须进一步研究。

目前, 只有少数研究将盐作为赋形剂添加到噬菌体固体制剂中。Dini 等^[52]研究发现, 添加磷酸盐缓冲液不仅不能提高冷冻干燥法以脱脂乳、海藻糖或蔗糖为赋形剂包被的噬菌体的稳定性, 而且还会损害蔗糖制剂中噬菌体的储存稳定性; 与之相反, 噬菌体保存液 (SM 缓冲液) 可以提高冷冻干燥产生的噬菌体的稳定性。

酪蛋白是乳蛋白的主要蛋白质, 约占总蛋白量的 80%。酪蛋白是典型的含磷蛋白, 不是单一蛋白质, 而是由 α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白组成, 在体内外均有广泛应用。Matinkhoo 等^[51]的研究表明, 在海藻糖和亮氨酸作为赋形剂的喷雾干燥产生的肌病毒科噬菌体制剂中加入 2% 的酪蛋白钠盐, 可将噬菌体效价提高 5 倍。

选取有效的赋形剂进行冻干噬菌体, 也是噬菌体应用和长期储存的有效手段。Manohar 等^[53]使用 6 种不同的赋形剂: 葡萄糖、蔗糖、明胶、甘露醇、聚乙二醇和山梨醇对 3 种裂解性噬菌体——大肠杆菌噬菌体 ECP311、克雷伯菌噬菌体 KPP235 和肠杆菌噬菌体 ELP140 进行冷冻干燥; 结果表明, 使用蔗糖、明胶及

其组合有利于保持冻干后噬菌体的活力; 当冻干噬菌体在 4 °C 下储存时, 可保持 20 个月活性不降, 但在 37 °C 下, 10 个月后活性降低。

2 展望

噬菌体在抗生素耐药性细菌感染的治疗中作为防治手段确实有很大的潜力; 但是噬菌体疗法如何有效地应用到临床实践中, 仍然存在一些局限性。最关键的问题之一是如何保持临床应用与储存过程中的噬菌体活性。本文阐述了噬菌体制剂使用的各类包被赋形剂的种类、配方及包被技术等, 并总结了它们在加工和长期储存期间对噬菌体稳定和活性的影响。

寻找合适的噬菌体赋形剂, 可参照疫苗或者益生菌的包被配方, 或使用高通量统计分析方法和先进的分析工具, 如核磁共振和冷冻电镜, 用更智能、简化的方法来筛选多种赋形剂、配方及封装方法。在噬菌体制剂和包被领域迫切需要进一步的研究, 以确保所选用的赋形剂、配方和加工条件适合所选用的噬菌体, 以确保制备出高活性、高抗逆性和长期储存稳定性的噬菌体。

REFERENCES

- [1] Gong JS, Wang CM, Shi SR, Bao HD, Zhu CH, Kelly P, Zhuang LL, Lu GW, Dou XH, Wang R, et al. Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Indiana clinical isolates recovered from broilers and poultry workers with diarrhea in China[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(3): 1943-1947
- [2] Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 32(2): e00066-18
- [3] Royer S, Morais AP, Da Fonseca Batistão DW. Phage therapy as strategy to face post-antibiotic era: a guide to beginners and experts[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(4): 1271-1279
- [4] Knezevic P, Hoyle NS, Matsuzaki S, Gorski A. Editorial: advances in phage therapy: present challenges and future perspectives[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 701898
- [5] Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross RP, McAuliffe O, Coffey A. Phage therapy in the food industry[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2014, 5: 327-349
- [6] Food and Drug Administration. FDA approval of *Listeria*-specific bacteriophage preparation on ready-to-eat (RTE) meat and poultry products[J]. Washington, DC: FDA, 2006
- [7] Bao HD, Zhang PY, Zhang H, Zhou Y, Zhang LL, Wang R. Bio-control of *Salmonella enteritidis* in foods using bacteriophages[J]. *Viruses*, 2015, 7(8): 4836-4853
- [8] Bao HD, Pang MD, Olaniran A, Zhang XH, Zhang H, Zhou Y, Sun LC, Schmidt S, Wang R. Alterations in the diversity and composition of mice gut microbiota by lytic or temperate gut phage treatment[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(23): 10219-10230
- [9] Bao HD, Zhou Y, Shahin K, Zhang H, Cao FL, Pang MD, Zhang XH, Zhu SJ, Olaniran A, Schmidt S, et al. The complete genome of lytic *Salmonella* phage vB_SenM-PA13076 and therapeutic potency in the treatment of lethal *Salmonella* Enteritidis infections in mice[J]. *Microbiological Research*, 2020, 237: 126471
- [10] Knezevic P, Obreht D, Curcin S, Petrusic M, Aleksic V, Kostanjsek R, Petrovic O. Phages of *Pseudomonas aeruginosa*: response to environmental factors and *in vitro* ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(1): 245-254
- [11] Acar Soykut E, Tayyarcan EK, Evran Ş, Boyacı İH, Çakır İ, Khaaladi M, Fattouch S. Microencapsulation of phages to analyze their demeanor in physiological conditions[J]. *Folia Microbiologica*, 2019, 64(6): 751-763
- [12] Kering KK, Zhang XX, Nyaruaba R, Yu JP, Wei HP. Application of adaptive evolution to improve the stability of bacteriophages during storage[J]. *Viruses*, 2020, 12(4): 423
- [13] Dąbrowska K. Phage therapy: what factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2019, 39(5): 2000-2025
- [14] Petsong K, Benjakul S, Vongkamjan K. Optimization of wall material for phage encapsulation via freeze-drying and antimicrobial efficacy of microencapsulated phage against *Salmonella*[J].

- Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(5): 1937-1946
- [15] Choińska-Pulit A, Mituła P, Śliwka P, Łaba W, Skaradzińska A. Bacteriophage encapsulation: trends and potential applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 45(2): 212-221
- [16] Hussain MA, Liu H, Wang Q, Zhong F, Guo Q, Balamurugan S. Use of encapsulated bacteriophages to enhance farm to fork food safety[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(13): 2801-2810
- [17] Jyothi NVN, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency[J]. Journal of Microencapsulation, 2010, 27(3): 187-197
- [18] Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, Mancuso F, Cinquerrui S, Vladislavjevic GT, Clokie MRJ, Garton NJ, Stapley AGF, Kirpichnikova A. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2017, 249: 100-133
- [19] Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 104(4): 467-483
- [20] Ma YS, Pacan JC, Wang Q, Xu YP, Huang XQ, Korenevsky A, Sabour PM. Microencapsulation of bacteriophage felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4799-4805
- [21] El Haddad L, Lemay MJ, Khalil GE, Moineau S, Champagne CP. Microencapsulation of a *Staphylococcus* phage for concentration and long-term storage[J]. Food Microbiology, 2018, 76: 304-309
- [22] Ma YS, Pacan JC, Wang Q, Sabour PM, Huang XQ, Xu YP. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 26(2): 434-440
- [23] 马永生. 口服微囊化噬菌体的制备及其在胃肠环境中的稳定性, 释放行为和抗菌活性研究[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2011
- Ma YS. Preparation of microencapsulated bacteriophages for oral delivery and evaluation of their stabilities, release behaviors and antimicrobial activities in the gastrointestinal environment[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2011. (in Chinese)
- [24] Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Arriñez-Soriano J, Cortés P, Maspoch D, Llagostera M. Microencapsulation with alginate/CaCO₃: a strategy for improved phage therapy[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41441
- [25] Tang ZX, Huang XQ, Baxi S, Chambers JR, Sabour PM, Wang Q. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres[J]. Food Research International, 2013, 52(2): 460-466
- [26] Tang ZX, Huang XQ, Sabour PM, Chambers JR, Wang Q. Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 263-270
- [27] Abdelsattar AS, Abdelrahman F, Dawoud A, Connerton IF, El-Shibiny A. Encapsulation of *E. coli* phage ZCEC5 in chitosan-alginate beads as a delivery system in phage therapy[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 87
- [28] Lee KY, Heo TR. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 869-873
- [29] Silva Batalha L, Pardini Gontijo MT, Vianna Novaes De Carvalho Teixeira A, Meireles Gouvêa Boggione D, Soto Lopez ME, Renon Eller M, Santos Mendonça RC. Encapsulation in alginate-polymers improves stability and allows controlled release of the UFV-AREG1 bacteriophage[J]. Food Research International: Ottawa, Ont, 2021, 139: 109947
- [30] Kim S, Jo A, Ahn J. Application of chitosan-alginate microspheres for the sustained release of bacteriophage in simulated gastrointestinal conditions[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(4): 913-918
- [31] Donnelly R, Shaikh R, Raj Singh T, Garland M, Woolfson A. Mucoadhesive drug delivery systems[J]. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2011, 3(1): 89
- [32] 吴婷, 吴江, 金书欣, 席晔斌, 钮晓音, 陈广洁. 阳离子脂质体 Lipofectamine 3000 对贴壁细胞、悬浮细胞和原代细胞转染效率比较的研究[J]. 现代免疫学, 2018, 38(2): 89-94
- Wu T, Wu J, Jin SX, Xi YB, Niu XY, Chen GJ. The study on the transfection efficiency of cationic liposome lipofectamine 3000 in adhesive cells, suspension cells and primary cells[J]. Current Immunology, 2018, 38(2): 89-94 (in Chinese)
- [33] 张劼, 罗永艾, 周丽蓉. 噬菌体 AB3 及其脂质体包被

- 液应用于耐碳青霉烯类鲍氏不动杆菌感染的实验研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(9): 543-548
- Zhang J, Luo YA, Zhou LR. Experimental research on application of bacteriophage AB3 and its liposome coating solution in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2012, 31(9): 543-548 (in Chinese)
- [34] Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Cortés P, Maspocho D, Llagostera M. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(14): 4841-4849
- [35] Singla S, Harjai K, Raza K, Wadhwa S, Katare OP, Chhibber S. Phospholipid vesicles encapsulated bacteriophage: a novel approach to enhance phage biodistribution[J]. Journal of Virological Methods, 2016, 236: 68-76
- [36] Cui HY, Yuan L, Lin L. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 177: 156-164
- [37] Chadha P, Katare OP, Chhibber S. Liposome loaded phage cocktail: enhanced therapeutic potential in resolving *Klebsiella pneumoniae* mediated burn wound infections[J]. Burns, 2017, 43(7): 1532-1543
- [38] Chhibber S, Kaur J, Kaur S. Liposome entrapment of bacteriophages improves wound healing in a diabetic mouse MRSA infection[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 561
- [39] Loh B, Gondil VS, Manohar P, Khan FM, Yang H, Leptihn S. Encapsulation and delivery of therapeutic phages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 87(5): e01979-20
- [40] Korehei R, Kadla J. Incorporation of T4 bacteriophage in electrospun fibres[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(5): 1425-1434
- [41] Lee SW, Belcher AM. Virus-based fabrication of micro- and nanofibers using electrospinning[J]. Nano Letters, 2004, 4(3): 387-390
- [42] Korehei R, Kadla JF. Encapsulation of T4 bacteriophage in electrospun poly (ethylene oxide)/cellulose diacetate fibers[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 100: 150-157
- [43] De Arce Velasquez A, Ferreira LM, Stangarlin MFL, Silva CB, Rolim CMB, Cruz L. Novel Pullulan-Eudragit®S100 blend microparticles for oral delivery of risedronate: Formulation, *in vitro* evaluation and tableting of blend microparticles[J]. Materials Science and Engineering: C, 2014, 38: 212-217
- [44] Chawla A, Sharma P, Pawar P. Eudragit S-100 coated sodium alginate microspheres of naproxen sodium: formulation, optimization and *in vitro* evaluation[J]. Acta Pharmaceutica: Zagreb, Croatia, 2012, 62(4): 529-545
- [45] Vinner GK, Rezaie-Yazdi Z, Leppanen M, Stapley AGF, Leaper MC, Malik DJ. Microencapsulation of *Salmonella*-specific bacteriophage Felix O1 using spray-drying in a pH-responsive formulation and direct compression tableting of powders into a solid oral dosage form[J]. Pharmaceuticals, 2019, 12(1): 43
- [46] Stanford K, McAllister TA, Niu YD, Stephens TP, Mazzocco A, Waddell TE, Johnson RP. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(7): 1304-1312
- [47] Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier[J]. Polymers, 2011, 3(3): 1377-1397
- [48] Puapermpoonsiri U, Ford SJ, Van Der Walle CF. Stabilization of bacteriophage during freeze drying[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2010, 389(1/2): 168-175
- [49] Agarwal R, Johnson CT, Imhoff BR, Donlan RM, McCarty NA, Garcia AJ. Inhaled bacteriophage-loaded polymeric microparticles ameliorate acute lung infections[J]. Nature Biomedical Engineering, 2018, 2(11): 841-849
- [50] Chang RY, Wong J, Mathai A, Morales S, Kutter E, Britton W, Li J, Chan HK. Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2017, 121: 1-13
- [51] Matinkhoo S, Lynch KH, Dennis JJ, Finlay WH, Vehring R. Spray-dried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100(12): 5197-5205
- [52] Dini C, De Urraza PJ. Effect of buffer systems and disaccharides concentration on Podoviridae coliphage stability during freeze drying and storage[J]. Cryobiology, 2013, 66(3): 339-342
- [53] Manohar P, Ramesh N. Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 15242