

# 单分散液滴发生器 (MDDG) 结合静电 自组装制备益生菌微胶囊

罗丹阳, 韩凯宁, 杨晓泉

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本研究利用单分散液滴发生器 (MDDG), 以海藻酸钙凝胶 (-) 为基质, 壳聚糖 (+) 和阿拉伯胶 (-) 为涂层原料, 利用静电引导的逐层自组装法制备多层益生菌微胶囊。研究表明, 多层包埋的微胶囊具有更高的机械强度, 多层益生菌微胶囊在乳酸细菌培养基 (MRS) 中培养 9 h 后依然维持完整的球形结构, 包埋的益生菌数量也提高了 2.06 log cfu/g。此外, 多层包埋还延长了微胶囊在胃肠液中的崩解时间, 单层海藻酸钙微胶囊在模拟肠液中快速崩解, 消化 1 h 时益生菌的释放量已达到 8.23 log cfu/g。壳聚糖, 壳聚糖-阿拉伯胶涂层的益生菌微胶囊在消化 3 h 后才达到相应对数值, 分别为 8.42 log cfu/g 和 8.33 log cfu/g。此外, 相比于单层益生菌微胶囊, 多层益生菌微胶囊在 4 °C 和 25 °C 下均表现出更高的贮藏稳定性, 在 4 °C 下贮藏 12 d 后, 海藻酸钙-壳聚糖-阿拉伯胶三层胶囊内的活菌数仅由 8.90 log cfu/g 下降到 8.81 log cfu/g。实验表明, MDDG 结合静电引导的逐层自组装是高效制备均匀稳定的多层益生菌微胶囊, 实现益生菌肠道输送的有效手段。

**关键词:** 单分散液滴发生器 (MDDG); 静电自组装; 益生菌; 微胶囊; 输送

文章编号: 1673-9078(2020)12-227-233

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0107

## Monodisperse Droplet Generator (MDDG) Combined with Electrostatic Self-assembly to Produce Probiotic Microcapsules

LUO Dan-yang, HAN Kai-ning, YANG Xiao-quan

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, monodisperse droplet generator (MDDG) was utilized to produce multilayered probiotic microcapsules through using calcium alginate gel (-) (as the matrix), chitosan (+) and gum Arabic (-) (as the coating materials), and adopting a layer-by-layer approach based on electrostatic self-assembly. The results showed that the multilayered probiotic microcapsules had higher mechanical strength, and still maintained intact spherical structure after 9 h of culture in MRS liquid medium, with an increase (by 2.06 log cfu/g) in the number of probiotics contained in the microcapsules. In addition, multilayer structure prolonged the existence time of microcapsules prior to disintegration in the gastrointestinal juice. The single-layered calcium alginate microcapsules collapsed rapidly in the simulated intestinal fluid, with the amount of released probiotics reaching 8.23 log cfu/g after 1 h of digestion. Whereas, the probiotic microcapsules coated with chitosan, chitosan and gum arabic gum did not reach the corresponding logarithmic values (8.42 log cfu/g and 8.33 log cfu/g, respectively) until 3 h after digestion. Compared with the single-layer probiotics microcapsules, the multilayered microcapsules showed a higher storage stability at both 4 °C and 25 °C, with the number of viable cells in the three-layered microcapsules coated with calcium alginate-chitosan-gum arabic decreasing from 8.90 log cfu/g to 8.81 log cfu/g after a storage at 4 °C for 12 days. The experimental results showed that MDDG combined with electrostatic-guided layer-by-layer self-assembly was an effective method for efficient preparation of homogeneous and stable probiotic microcapsules to enable the delivery of probiotics into the intestines.

**Key words:** monodisperse droplet generator (MDDG); electrostatic self-assembly; probiotics; microcapsules; delivery

引文格式:

罗丹阳, 韩凯宁, 杨晓泉. 单分散液滴发生器 (MDDG) 结合静电自组装制备益生菌微胶囊[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 227-233

LUO Dan-yang, HAN Kai-ning, YANG Xiao-quan. Monodisperse droplet generator (MDDG) combined with electrostatic self-assembly to produce probiotic microcapsules [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 227-233

收稿日期: 2020-02-06

作者简介: 罗丹阳 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物蛋白工程; 通讯作者: 杨晓泉 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物蛋白开发与利用

人体肠道中栖息着大量微生物, 这些肠道微生物被认为是“忽略的器官”。它们在食物消化, 合成维生素和必需氨基酸, 代谢异生物质, 抵抗肠道病原菌和促进免疫系统发育等方面发挥着重要作用。此外, 肠道微生物与许多健康问题, 如昼夜节律失常、神经系统失调、恶性肿瘤和代谢疾病等存在密切联系<sup>[1]</sup>。研究表明补充益生菌在调节肠道菌群中发挥着重要作用, 对调节多种疾病症状效果显著<sup>[2]</sup>。

为了获得理想的改善效果, 益生菌摄入时的活菌数应大于  $10^6 \sim 10^7$  cfu/g (FAO/WHO, 2001)。然而, 摄食过程中益生菌暴露在低 pH 值, 消化酶和胆汁环境下, 到达肠道时的存活率极低<sup>[3]</sup>。为了保持菌体活性, 实现益生菌的肠道输送, 微胶囊化技术应运而生。常用的益生菌微胶囊技术有挤压法、乳化法和喷雾干燥法。然而, 乳化法成本较高, 产生的颗粒大小不均一, 同时乳化剂和表面活性剂的使用也不利于保持益生菌的活力。喷雾干燥过程中高温和脱水极易导致益生菌失活。相比较而言, 挤压法操作简单, 对益生菌的活性影响较小。但传统挤压法生产的微胶囊粒径较大; 且产量较低, 难以实现工业化大规模生产。因此, 探寻一种绿色高效的益生菌微胶囊化技术具有重要的意义。

目前, 关于制备益生菌微胶囊的仪器设备也有一些研究报道。Cui 等<sup>[4]</sup>利用 Turbotak 公司的空气雾化装置生产了  $5 \sim 200 \mu\text{m}$  大小的益生菌微胶囊, 然而胶囊大小存在较大的不均一性。Ye 等<sup>[5]</sup>采用 3D 打印的微流控喷嘴制备了海藻酸钙颗粒, 该喷嘴利用气流切割产生单个液滴, 无需额外添加表面活性剂, 被认为是一种极具潜力的益生菌微胶囊制备方法。单分散液滴发生器 (MDDG) 同样环保、高效, 它利用气体挤压获得微流体柱, 辅以压电陶瓷的规律振动产生均匀的单个液滴, 此方法可实现微胶囊的连续生产, 得到的微胶囊颗粒粒径均一, 大小可控。

本研究以海藻酸盐、壳聚糖和阿拉伯胶为原料, 利用 MDDG 结合静电引导的逐层自组装生产多层益生菌微胶囊, 以实现益生菌的高效肠道输送。

## 1 材料与方 法

### 1.1 原 料

鼠李糖乳杆菌 HN001, 保藏于本实验室; 海藻酸钠购于 Sigma-Aldrich 公司; 阿拉伯胶和壳聚糖 (脱乙酰度  $\geq 95\%$ , 粘度  $100 \sim 200 \text{ MPa}\cdot\text{s}$ ) 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; MRS 培养基购于广东环凯微生物科技有限公司; 其它化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪 器 与 设 备

BSA2245 分析天平, 德国 Sartorius 公司; Big-squid 磁力搅拌器, 德国 IKA 公司; Millipore 纯水机, 美国 Millipore 公司; 光学显微镜, 日本 Olympus 公司; 激光共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司; 场发射扫描电镜, 德国 Zeiss 公司; Mastersizer 3000 微米粒度仪, 英国 Malvern 公司; OCA20 视频光学接触角测量仪, 德国 Daraphysics 公司; DELTA 1-24 LSC 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司。

### 1.3 实 验 方 法

#### 1.3.1 乳酸菌培养及浓缩菌悬液的制备

鼠李糖乳杆菌 HN001 接种于灭菌的 MRS 液体培养基中,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  摇床培养 36 h,  $3000 \text{ r/min}$  离心 30 min 收集菌体, 菌体用无菌生理盐水 ( $0.9\% \text{ NaCl}$ ) 洗涤两次, 重悬后的菌悬液用于后续的包埋实验。

#### 1.3.2 不同涂层材料亲疏水性的测定

实验所需薄膜的制备方法如下, 将  $2.0 \times 2.0 \text{ cm}^2$  大小的层析纸浸入  $2\% (m/V)$   $\text{CaCl}_2$  溶液中, 1 min 后移入  $1.5\% (m/V)$  海藻酸钠溶液中, 静置 5 min, 再次转移到  $2\% (m/V)$   $\text{CaCl}_2$  溶液中, 室温下静置 2 h, 取出晾干, 即得到海藻酸钙薄膜。将制备的海藻酸钙薄膜浸入  $0.5\% (m/V)$  壳聚糖溶液中, 置于  $30 \text{ r/min}$  的摇床上分别吸附 30 min 和 60 min。取吸附 60 min 后的薄膜用去离子水洗涤, 转移到  $1\% (m/V)$  的阿拉伯胶溶液中, 分别吸附 30 min 和 60 min。吸附后的薄膜晾干后用于亲疏水性的测定。

通过接触角测量评价不同吸附材料薄膜的亲疏水性, 将制备的五种薄膜置于石英玻璃槽中, 通过注射单元形成  $5 \mu\text{L}$  的水溶液悬浮液滴, 利用 OCA20 视频光学接触角测量仪记录液滴在接触薄膜后的轮廓变化, 根据 Young-Laplace 方程对平衡 2 min 的液滴图像进行分析, 得到接触角大小。

#### 1.3.3 多层益生菌微胶囊的制备及短时培养

利用单分散液滴发生器 (MDDG) 制备多层益生菌微胶囊 (如图 1 所示)。MDDG 的工作原理如下: 压缩气体将海藻酸钠溶液从喷嘴中挤出; 在脉冲发生器产生的高频正弦波的驱动下, 喷嘴上的压电陶瓷收缩振动产生单个液滴; 液滴在分散风的作用下均匀分散, 落入  $\text{CaCl}_2$  溶液中固化定型。为了保证连续生产并获得较为理想的微胶囊尺寸, 调节系统载气压力为  $0.8 \text{ kg/cm}^2$ , 脉冲发生器频率为  $10 \text{ kHz}$ , 分散风流量为  $9 \text{ L/min}$ 。将菌悬液加入  $1.5\%$  海藻酸钠溶液中 ( $V/V=1:9$ ), 混合均匀, 通过  $150 \mu\text{m}$  的喷嘴形成单分

散液滴,液滴在 2%  $\text{CaCl}_2$  溶液中固化 30 min, 过滤洗涤得到海藻酸钙凝胶微胶囊, 为方便实验表述, 将其命名为胶囊 A。壳聚糖溶液的制备参考 Krasaekoopt 等<sup>[6]</sup>的方法, 壳聚糖溶于 0.1 mol/L 乙酸溶液中, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 5.8。将胶囊 A 浸于 0.5% (*m/V*) 壳聚糖溶液中, 磁力搅拌 30 min 进行涂层, 得到海藻酸钙-壳聚糖双层胶囊 (胶囊 B)。进一步将胶囊 B 浸于 1% (*m/V*) 阿拉伯胶溶液中, 搅拌涂覆 30 min, 过滤回收得到海藻酸钙-壳聚糖-阿拉伯胶三层胶囊 (胶囊 C)。

为了评价微胶囊的机械强度, 提高胶囊内装载的益生菌数量, 将胶囊 A 与胶囊 C 分别置于 MRS 液体培养基中进一步培养 9 h, 每隔 3 h 取样进行细菌计数。

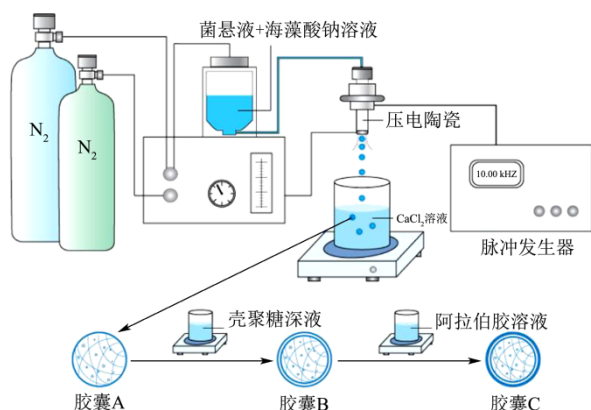


图1 单分散液滴发生器 (MDDG) 制备多层益生菌微胶囊示意图

Fig.1 Schematic diagram of preparation of multilayered probiotic microcapsules by monodisperse droplet generator (MDDG)

### 1.3.4 包埋率

微胶囊内的活细菌计数参考 Mokarram 等<sup>[7]</sup>的方法, 并稍作修改。利用 0.06 mol/L 柠檬酸钠和 0.2 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  混合溶液完成益生菌微胶囊的崩解释放, 梯度稀释后利用平板菌落计数法进行活菌计数。

包埋率 (EY) 计算公式为:  $EY = (N/N_0) \times 100\%$

式中: N 为包埋于胶囊内的活菌总数,  $N_0$  为制备微胶囊所用菌悬液中的活菌总数。

### 1.3.5 微胶囊粒径及形貌

通过 Mastersizer 3000 激光粒度仪测定微胶囊的粒径大小。利用光学显微镜观察微胶囊的形貌学特征, 扫描电镜观察冷冻干燥后的微胶囊的形貌学特征, 并采集微胶囊图像数据。壳聚糖和阿拉伯胶分别用 FITC 和 RBITC 标记, 利用激光共聚焦显微镜观察胶囊 C 的涂层吸附情况。

### 1.3.6 微胶囊内益生菌在模拟胃肠液中存活与释放的行为研究

在模拟消化环境条件下研究不同层数微胶囊内益

生菌的存活和释放特性。模拟消化液组成如下所示, 人工模拟胃液 (SGF): 9 g/L NaCl, 3 g/L 胃蛋白酶, pH 值 1.8; 人工模拟肠液 (SIF): 6.8 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g/L 胰蛋白酶, 1 g/L 胰凝乳蛋白酶, pH 值 6.5。

分别取三种微胶囊各 1 g, 或菌液 1 mL, 置于 30 mL SGF 中, 37 °C 消化 1 h 后从中分离微胶囊, 参照 1.3.4 的方法对胶囊内的益生菌进行活菌计数。消化 2 h 后, 将部分微胶囊转移至 37 °C 的 SIF 中, 在 1 h, 2 h 和 3 h 时分别取样对释放的益生菌进行平板菌落计数。

### 1.3.7 益生菌微胶囊的冻干保护

用生理盐水配置微胶囊冻干保护液, 冻干保护剂选择如下: (A) 2% 甘油、7.5% 脱脂奶粉 (B) 2% 甘油、7.5% 脱脂奶粉和 7.5% 蔗糖 (C) 2% 甘油、7.5% 脱脂奶粉和 7.5% 乳糖 (D) 2% 甘油、7.5% 脱脂奶粉和 7.5% 菊粉 (E) 生理盐水。将制备的益生菌微胶囊 (胶囊 C) 加入冻干保护剂, 真空冷冻干燥得到冻干样品。冻干益生菌微胶囊用无菌生理盐水复溶并按照 1.3.4 所述方法进行益生菌活菌计数。

### 1.3.8 冻干益生菌微胶囊的贮藏稳定性

分别在 4 °C 和 25 °C 环境条件下评价冻干益生菌微胶囊的贮藏稳定性, 在 0、2、9 和 12 天取样进行细菌计数, 计数方法见 1.3.4。

### 1.3.9 数据分析处理

所有样品测定均进行三次独立重复实验, 利用 SPSS 21.0 软件进行数据的方差分析 (ANOVA), 采用 Duncan 检验对多样本间进行显著性分析 ( $p < 0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同涂层材料的亲疏水性

一般而言, 水滴在材料表面形成的接触角小于 20° 时, 材料的亲水性较强, 而典型的疏水性材料的接触角通常大于 70°<sup>[8]</sup>。益生菌微胶囊不同涂层材料接触角的实验结果如图 2 所示, 海藻酸钙薄膜呈现出较小的接触角 (15.55°), 证明了海藻酸钙薄膜具有较强的亲水性。壳聚糖吸附 30 min 和 60 min 后, 薄膜接触角分别为 49.27°, 69.20°, 表明壳聚糖吸附后薄膜疏水性显著提高 ( $p < 0.05$ )。随着阿拉伯胶的进一步吸附, 薄膜接触角逐渐减小, 表明阿拉伯胶涂层增加了薄膜的亲水性。益生菌的肠道输送与包载材料的性质紧密相关。海藻酸钙凝胶的多孔结构会导致消化液进入微胶囊内部, 造成益生菌的活力损失<sup>[9]</sup>。

壳聚糖作为一种阳离子多糖, 常用作海藻酸钙凝胶微胶囊的涂层材料以提高益生菌在胃液中的存活率。粘液层广泛分布于人体消化道内, 黏蛋白是黏液层的

主要组成成分。已有研究表明,壳聚糖和黏蛋白之间有很强的相互作用<sup>[10]</sup>。Mirtič 等<sup>[11]</sup>就曾利用此黏附特性,制备了以壳聚糖为涂层的海藻酸钙益生菌胶囊,通过延长胶囊在口腔中的停留时间来治疗牙周病。因此,为了实现益生菌的肠道远端输送,本实验在壳聚糖涂层外吸附阿拉伯胶,旨在降低壳聚糖涂层益生菌微胶囊的生物黏附。此外,具有更强亲水性的阿拉伯胶或更利于益生菌的肠道输送。

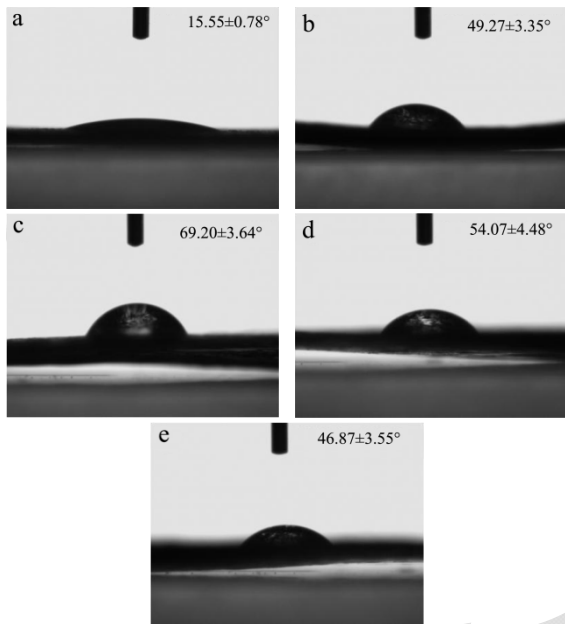


图2 不同涂层材料薄膜的接触角图像

Fig.2 Contact angle of films with different coating materials

注: (a) 海藻酸钙薄膜; (b) 30 min 壳聚糖吸附薄膜; (c) 60 min 壳聚糖吸附薄膜; (d) 30 min 阿拉伯胶吸附薄膜; (e) 60 min 阿拉伯胶吸附薄膜。

### 2.2 包埋率及微胶囊的短时培养

实验制备的益生菌微胶囊包埋率 (EY) 为  $26.1\% \pm 1.2\%$ , 与 Ainsley 等<sup>[12]</sup>利用  $Ca^{2+}$  诱导的乳清蛋白冷凝胶挤出技术制备的益生菌胶囊包埋率 (22%) 相似。为了进一步提高益生菌的包埋率, 实验对益生菌微胶囊进行了短时培养。Bosneaz 等<sup>[13]</sup>也曾对乳清分离蛋白/阿拉伯胶涂层的海藻酸钙胶囊进行过培养研究, 培养 24 h 后胶囊内益生菌增长约  $2.66 \log \text{ cfu/g}$ , 48 h 后增长约  $4.67 \log \text{ cfu/g}$ , 结果表明, 胶囊是一个开放结构, 包封后的益生菌仍能继续繁殖。本研究中, 胶囊 A 在培养 3 h 内结构已完全崩解。而胶囊 C 的培养结果如图 3 所示, 在培养 9 h 后, 其球形结构依然完整, 表明涂层赋予了益生菌胶囊更高的机械强度。同时, 培养 6 h 后, 胶囊 C 内的菌落数从  $7.65 \log \text{ cfu/g}$  增加到  $9.50 \log \text{ cfu/g}$  ( $p < 0.05$ ), 培养 9 h 后达到  $9.71 \log \text{ cfu/g}$ 。培养 6 h 和 9 h 后的益生菌数量无显著性差异,

考虑到时间成本和对胶囊结构强度的影响, 实验选择对多层益生菌微胶囊进行 6 h 的培养以提高益生菌的包埋率。

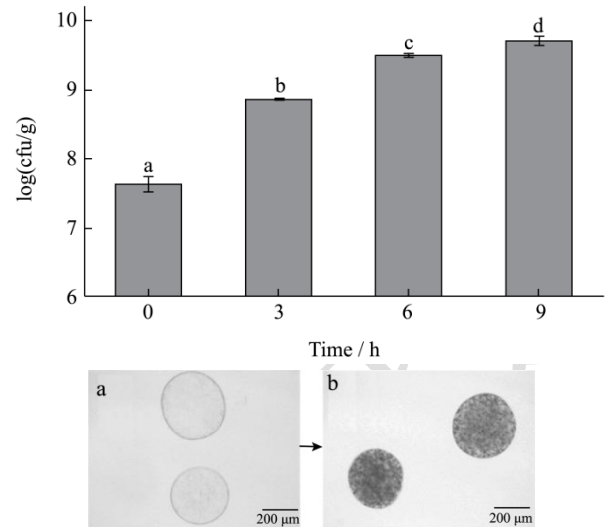


图3 多层益生菌微胶囊 (胶囊 C) 的短时培养计数结果; 光学显微镜图像 (图 a) 未经短时培养的胶囊 C (图 b) 培养 9 h 后的胶囊 C

Fig.3 Short time cultivation of multilayered probiotic microcapsules (microcapsule C); Optical microscope images (a) microcapsules C (b) microcapsules C after 9 h of cultivation

### 2.3 微胶囊粒径分布及形貌

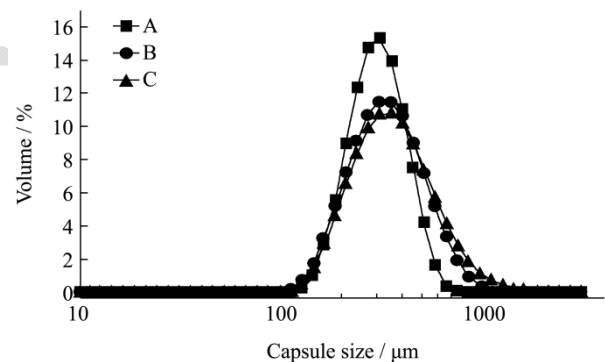


图4 胶囊 A、B 和 C 的粒径分布

Fig.4 Size distribution of probiotic microcapsules A, B and C

利用 MDDG 生产的益生菌微胶囊尺寸主要受气体压力、喷嘴尺寸和正弦波频率的影响。在本研究所选的生产条件下, 制备得到的益生菌胶囊 A、B 和 C 的尺寸分别为  $336 \mu\text{m}$ 、 $387 \mu\text{m}$  和  $434 \mu\text{m}$ , 表明随着包封层数的增加, 微胶囊的尺寸逐渐增大, 粒径的分布范围也更广 (图 4)。细菌细胞的大小通常为  $1\text{--}4 \mu\text{m}$ , 合适的微胶囊尺寸对于益生菌的包埋和输送效果至关重要。Hansen 等<sup>[14]</sup>发现小于  $100 \mu\text{m}$  的胶囊对益生菌没有明显的保护作用。此外胶囊尺寸太大, 可能会影响其感官特性。Doherty 等<sup>[15]</sup>制备了直径为  $200 \mu\text{m}$  的



益生菌胶囊，该尺寸的胶囊具有较好的感官特性的同时也具有比较理想的益生菌保护效果。Kailasapathy<sup>[16]</sup>发现尺寸大小在 300 μm 左右的益生菌胶囊能显著提高酸奶口感的平滑度。传统挤压法所得胶囊多大于 1 mm，相比之下，本研究制备得到的益生菌胶囊处在较为理想的尺寸范围内。

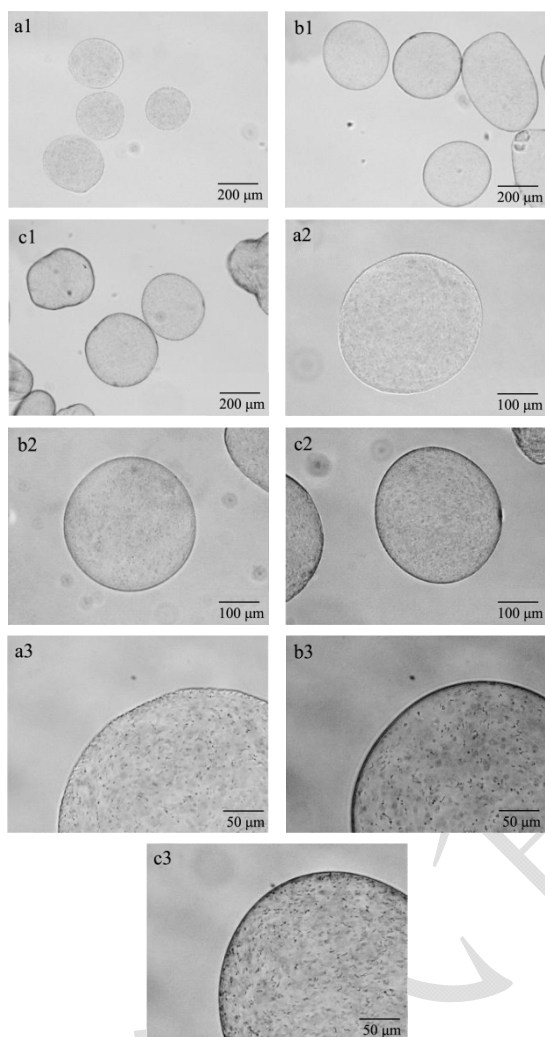


图5 益生菌胶囊 A (a1、a2、a3)、B (b1、b2、b3) 和 C (c1、c2、c3) 的光学显微镜图像

Fig.5 Optical microscope images of probiotic microcapsules A (a1, a2, a3), B (b1, b2, b3) and C (c1, c2, c3)

通过光学显微镜观察发现，MDDG 生产的益生菌微胶囊呈圆球形，无拖尾。相比于胶囊 A，胶囊 B 和 C 略有皱缩，但边缘更为光滑（图 5）。益生菌微胶囊的激光共聚焦图像如图 6 所示，FITC 标记的壳聚糖激发产生的荧光（绿色）和 RBITC 标记的阿拉伯胶激发产生的荧光（红色）环绕在微胶囊表面，表明壳聚糖和阿拉伯胶依次吸附于益生菌微胶囊的表面。从冻干微胶囊的扫描电子显微镜图像（图 7）可以看出，单层海藻酸钙微胶囊（胶囊 A）在冻干后直接塌缩成片状结构，而多层微胶囊（胶囊 B、C）仍维持一定的

立体结构，然而由于未添加冻干保护剂，其球形结构破裂，结构不再完整。

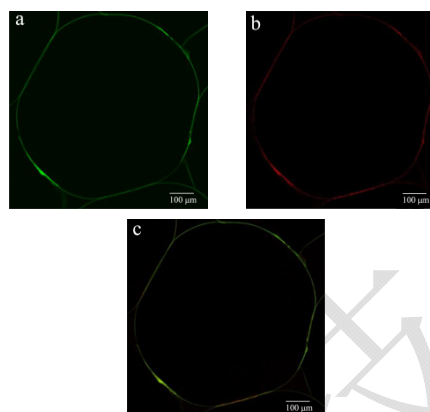


图6 益生菌胶囊 C 的激光共聚焦显微镜 (CLSM) 图像

Fig.6 Laser scanning confocal microscope (CLSM) images of probiotic capsule C

注：图中绿色代表壳聚糖荧光，红色代表阿拉伯胶荧光。

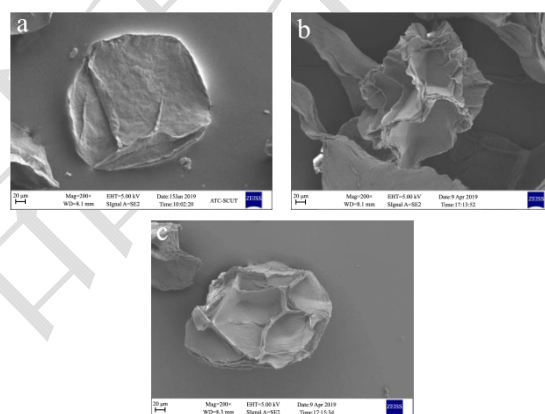


图7 冻干益生菌胶囊 A (a)、B (b) 和 C (c) 的扫描电子显微镜 (SEM) 图像

Fig.7 Scanning electron microscope (SEM) images of lyophilized probiotic microcapsules A (a), B (b) and C (c)

## 2.4 益生菌在模拟胃肠液中的存活与释放

益生菌在模拟胃液中的存活和在模拟肠液中的释放情况如图 8 所示。经模拟胃液消化 2 h 后，菌悬液组的菌落数下降了 3.86 log cfu/mL。然而在 1 h 内，不同涂层益生菌微胶囊内的益生菌数量均无显著下降，表明胶囊化为益生菌提供了较好的保护；2 h 后，胶囊 A、B 和 C 内的益生菌数分别从 8.82 log cfu/g 下降到 8.35 log cfu/g ( $p < 0.05$ )，8.93 log cfu/g 下降到 8.53 log cfu/g ( $p < 0.05$ )，8.79 log cfu/g 变化为 8.46 log cfu/g，表明多层包埋可提升益生菌在低 pH 值模拟胃液中的存活率。Cook 等<sup>[17]</sup>制备了壳聚糖-海藻酸盐交互涂层的益生菌微胶囊，发现当涂层数大于 3 时，胃液中益生菌的存活率反而开始下降，这可能是由于吸附涂层时，长时间在水溶液中浸泡溶胀，涂层多糖与海藻酸

钙基质中的钙离子结合使得微胶囊凝胶强度降低所致。在本实验中，单层益生菌微胶囊与多层微胶囊益生菌存活率无显著性差异，也可归因于胶囊的持续溶胀和交联密度降低。

模拟肠液中益生菌的释放情况与先前的研究结果<sup>[18]</sup>一致，多层包埋显著延长了益生菌在肠液中的释放时间 ( $p < 0.05$ )。海藻酸钙微胶囊在低 pH 值环境下维持稳定的结构，随着 pH 值的升高，海藻酸钙微胶囊的结构稳定性逐渐降低<sup>[19]</sup>，故胶囊 A 在移入肠液后快速崩解，消化 1 h 后，肠液中活菌数已达到 8.23 log cfu/g，且在之后的消化时间内趋于稳定。而胶囊 B 和 C 的多糖涂层延缓了胶囊的崩解时间，使得胶囊中益生菌在肠道内缓慢释放，3 h 后才达到同一数量级，分别为 8.42 log cfu/g 和 8.33 log cfu/g。这些实验结果表明多层包埋有助于胶囊中益生菌到达肠道远端，发挥其益生作用。

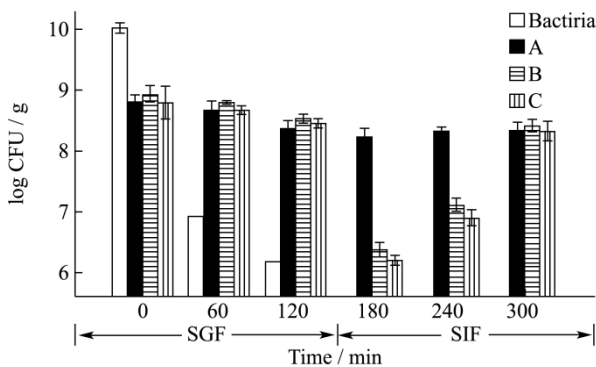


图8 微胶囊中益生菌在模拟胃肠液中的存活与释放

Fig.8 Viability and release of probiotics in microcapsules in simulated gastrointestinal fluid

### 2.5 益生菌微胶囊的冻干保护

冻干可以提高益生菌的贮藏稳定性，保持益生菌活力。然而，直接冻干会破坏益生菌胶囊结构，胶囊内的益生菌容易因失去胶囊层的支撑保护而失去活力。此外，冰晶生长和水分流失均可能导致益生菌脂肪膜结构的改变，从而使益生菌失活。加入冻干保护剂可以减少益生菌的活性损失，常用的冻干保护剂有糖、甘油和脱脂乳粉<sup>[20]</sup>。本研究比较了不同种类糖（蔗糖、乳糖和菊粉）的冻干保护效果，实验选择 7.5%脱脂奶粉，2.5%甘油和 7.5%的不同种类的糖做为保护剂，冻干后的益生菌存活情况如图 9 所示，添加复合冻干保护剂组的益生菌的存活量为生理盐水组的 1.3 倍 ( $p < 0.05$ )，表明添加冻干保护剂对益生菌具有较好的保护作用。添加不同种类糖对益生菌的存活量没有显著影响。但添加菊粉组呈现最高的益生菌的存活率，为 94.19%。同时鉴于菊粉的肠道益生效果，实验选取

菊粉作为冻干保护剂中的糖组分。

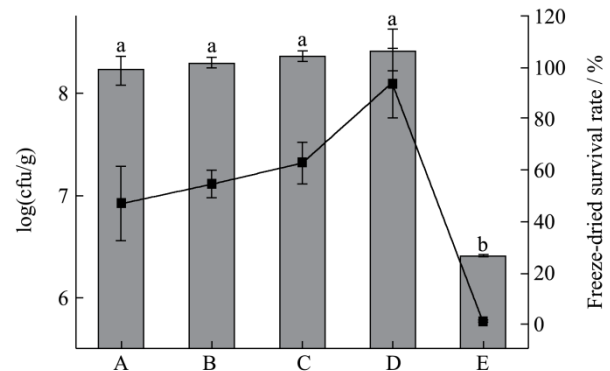


图9 不同冻干保护剂对菌体冻干后活力的影响

Fig.9 Evaluation of the viability of probiotics after lyophilized with different freeze-dried protective agents

注：(A) 2%甘油、7.5%脱脂奶粉；(B) 2%甘油、7.5%脱脂奶粉和 7.5%蔗糖；(C) 2%甘油、7.5%脱脂奶粉和 7.5%乳糖；(D) 2%甘油、7.5%脱脂奶粉和 7.5%菊粉；(E) 生理盐水。

### 2.6 冻干益生菌微胶囊的贮藏稳定性

表1 微胶囊中益生菌在 25 °C的贮藏稳定性

Table 1 Storage stability of probiotics in microcapsules at 25 °C

贮藏天数/d	鼠李糖乳杆菌 HN001 存活数量/(log cfu/g)			
	菌粉	胶囊 A	胶囊 B	胶囊 C
0	9.94±0.16 <sup>a</sup>	9.08±0.03 <sup>a</sup>	8.86±0.12 <sup>a</sup>	8.78±0.27 <sup>a</sup>
2	9.74±0.02 <sup>a</sup>	8.81±0.04 <sup>b</sup>	8.84±0.03 <sup>a</sup>	8.67±0.02 <sup>a</sup>
9	8.49±0.04 <sup>b</sup>	7.84±0.02 <sup>c</sup>	6.99±0.01 <sup>b</sup>	7.90±0.06 <sup>ab</sup>
12	6.42±0.02 <sup>c</sup>	7.43±0.01 <sup>d</sup>	6.25±0.03 <sup>c</sup>	7.70±0.70 <sup>b</sup>

注：数值后不同字母表示显著差异 ( $p < 0.05$ )。下表同。

表2 微胶囊中益生菌在 4 °C的贮藏稳定性

Table 2 Storage stability of probiotics in microcapsules at 4 °C

贮藏天数/d	鼠李糖乳杆菌 HN001 存活数量/(log cfu/g)			
	菌粉	胶囊 A	胶囊 B	胶囊 C
0	9.82±0.02 <sup>a</sup>	9.10±0.01 <sup>a</sup>	8.78±0.11 <sup>ab</sup>	8.99±0.10 <sup>a</sup>
2	9.72±0.01 <sup>b</sup>	9.05±0.17 <sup>b</sup>	8.82±0.17 <sup>a</sup>	8.85±0.01 <sup>b</sup>
9	9.70±0.01 <sup>bc</sup>	9.01±0.01 <sup>bc</sup>	8.61±0.39 <sup>ab</sup>	8.89±0.01 <sup>ab</sup>
12	9.69±0.01 <sup>c</sup>	8.97±0.03 <sup>c</sup>	8.52±0.03 <sup>b</sup>	8.81±0.01 <sup>b</sup>

微胶囊中益生菌在贮藏过程中的存活率主要受包埋材料和贮藏温度的影响。考虑到生产、运输和贮藏过程中的实际温度，实验选取 4 °C和 25 °C环境条件，通过 12 d 的贮藏实验进一步评价益生菌微胶囊的贮藏稳定性。不同微胶囊中益生菌在 25 °C贮藏条件的存活情况如表 1 所示，未经包埋的冻干菌粉在贮藏 12 d 后，活菌数量下降了 3.52 log cfu/g，而胶囊 C 内的活菌只下降了 1.08 log cfu/g，失活率最低，这可能是由于涂层提供了致密的外层半透膜，加强了对氧气的隔绝作用，使得多层胶囊在贮藏期内保持较高的活

菌数。不同微胶囊中益生菌在 4 °C 贮藏条件下的存活情况如表 2 所示, 在 4 °C 下贮藏 12 d 后, 胶囊 C 内的活菌数仅由 8.90 log cfu/g 下降到 8.81 log cfu/g, 表明 4 °C 的贮藏条件可以有效保持益生菌的活力。

### 3 结论

利用单分散液滴发生器 (MDDG) 可以实现益生菌微胶囊的高效制备, 所得到的胶囊粒径均一、大小可控。相比于传统的胶囊化技术, MDDG 对益生菌的活性影响较小, 生产过程中无需额外添加乳化剂和表面活性剂, 满足绿色生产的发展趋势。益生菌微胶囊的短时培养提高了益生菌的包埋率, 同时证明了多层包埋可增强微胶囊的结构强度。此外, 多层包埋还延缓了胶囊在肠液中的崩解时间, 提高了微胶囊中益生菌的贮藏稳定性, 有助于胶囊中的益生菌到达肠道远端, 发挥其益生作用。综上所述, 单分散液滴发生器 (MDDG) 结合静电自组装制备多层益生菌胶囊可实现益生菌的肠道输送, 是一种极具潜力的益生菌微胶囊化技术。

### 参考文献

- [1] Spanogiannopoulos P, Bess E N, Carmody R N, et al. The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(5): 273-287
- [2] Sánchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, et al. Probiotics, gut microbiota and their influence on host health and disease [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 61(1): 1600240
- [3] Tripathi M K, Giri S K, Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 9: 225-241
- [4] Cui J H, Goh J S, Park S Y, et al. Preparation and physical characterization of alginate microparticles using air atomization method [J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2001, 27(4): 309-319
- [5] Ye B, Xu H, Bao B, et al. 3D-printed air-blast microfluidic nozzles for preparing calcium alginate microparticles [J]. *RSC Advances*, 2017, 7(77): 48826-48834
- [6] Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria [J]. *International Dairy Journal*, 2004, 14(8): 737-743
- [7] Mokarram R R, Mortazavi S A, HabibiNajafi M B, et al. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice [J]. *Food Research International*, 2009, 42(8): 1040-1045
- [8] Carneiro-Da-Cunha M G, Cerqueira M A, Souza B WS, et al. Physical and thermal properties of a chitosan/alginate nanolayered PET film [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82(1): 153-159
- [9] 邹强, 梁华忠, 龚春雪, 等. 海藻酸钠和乳清蛋白作为益生菌包埋壁材的比较 [J]. *食品科学*, 2014, 35(15): 207-211  
ZOU Qiang, LIANG Hua-zhong, GONG Chun-xue, et al. Comparison of alginate and whey protein as two different coating materials used for probiotic microencapsulation [J]. *Food Science*, 2014, 35(15): 207-211
- [10] Menchicchi B, Fuenzalida J P, Bobbili K B, et al. Structure of chitosan determines its interactions with mucin [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(10): 3550-3558
- [11] Mirtič J, Rijavec T, Zupančič Š, et al. Development of probiotic-loaded microcapsules for local delivery: physical properties, cell release and growth [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 121: 178-187
- [12] Reid A A, Vuilleumard J C, Britten M, et al. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca<sup>2+</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model [J]. *Journal of Microencapsulation*, 2005, 22(6): 603-619
- [13] Bosnea L A, Moschakis T, Nigam P S, et al. Growth adaptation of probiotics in biopolymer-based coacervate structures to enhance cell viability [J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2016, 77: 282-289
- [14] Hansen L T, Allan-Wojtas P M, Jin Y L, et al. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions [J]. *Food Microbiology*, 2002, 19(1): 35-45
- [15] Doherty S B, Gee V L, Ross R P, et al. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(6): 1604-1617
- [16] Kailasapathy K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2006, 39(10): 1221-1227
- [17] Cook M T, Tzortzis G, Khutoryanskiy V V, et al. Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2013, 1: 52-60 (下转第 251 页)