

丁酸钠微胶囊的制备工艺优化、表征及抑菌特性分析

孙辉, 范俐*, 杜仲达, 杨浩林, 汤小玉

(武夷学院茶与食品学院, 福建武夷山 354300)

摘要: 为提高丁酸钠的包埋率和抑菌特性, 通过复凝聚法制备海藻酸钠/壳聚糖包埋丁酸钠的微胶囊, 运用响应面法优化关键工艺参数, 并探究其外观形态、结构特性和抑菌性能。结果表明: 丁酸钠微胶囊的最优制备配方参数为海藻酸钠 3.0% (*m/m*), 壳聚糖 1.75% (*m/m*), 丁酸钠 2.5% (*m/m*), 氯化钙 3.0% (*m/m*), 包埋时间 3 h, 包埋率为 95.12%, 且回归模型具有极显著差异 ($P<0.0001$), 失拟项不具备显著差异 ($P=0.35$), 模型拟合度较好 ($R^2=0.98$); 扫描电镜发现丁酸钠微胶囊外观呈带凸起的纺锤形; 傅里叶变换红外光谱分析发现丁酸钠特征峰全部削弱甚至消失表明海藻酸钠和壳聚糖形成微胶囊。丁酸钠微胶囊对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌率分别比丁酸钠升高 28.82% 和 25.25%, 且丁酸钠微胶囊 (质量浓度: 2.0 g/L) 对两种致病菌干预 24 h 后, 其总抑菌率均高于 99%。说明此优化工艺制备的丁酸钠微胶囊包埋率高、颗粒紧实牢固, 具有较好的抑菌性能, 能够为丁酸类绿色抗生素替代品的开发提供理论支撑。

关键词: 丁酸钠; 复合凝聚法; 响应面优化; 微胶囊; 抑菌性

文章编号: 1673-9078(2023)06-154-161

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0771

Preparation Process Optimization, Characterization and Antimicrobial Properties of Sodium Butyrate Microcapsules

SUN Hui, FAN Li*, DU Zhongda, YANG Haolin, TANG Xiaoyu

(College of Tea and Food Science, Wuyi University, Wuyishan 354300, China)

Abstract: In order to improve the encapsulation rate and antimicrobial properties of sodium butyrate, sodium alginate/chitosan microcapsules of sodium butyrate were prepared by the complex coacervation method, and the key process parameters were optimized by response surface methodology. The appearance, morphology, structural features and antimicrobial properties of the optimized butyrate microcapsules were also analyzed. The results showed that the optimal formulation parameters of butyrate microcapsules with an embedding rate of 95.12% were sodium alginate 3.0% (*m/m*), chitosan 1.75% (*m/m*), sodium butyrate 2.5% (*m/m*), calcium chloride 3.0% (*m/m*), and embedding time 3 h. The obtained regression model was highly significant ($P<0.0001$), with the lack of fit being insignificant ($P=0.35$), and the model fit being very good ($R^2=0.98$). Scanning electron microscopy (SEM) showed that the sodium butyrate microcapsules were spindle-shaped with nodules. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis showed that the characteristic peaks of sodium butyrate were all weakened or even disappeared, indicating that sodium alginate and chitosan formed microcapsules. The antibacterial rates of the sodium butyrate microcapsules against *S. aureus* and *E. coli* increased by 28.82% and 25.25%, respectively, compared with those of the sodium butyrate. After 24 h of intervention with sodium butyrate microcapsules (mass concentration: 2.0 g/L) against both bacteria, the total inhibition rate were higher than 99%. These results indicate that the sodium butyrate microcapsules prepared by the optimized process had a high embedding rate, compact and firm particles, and good antibacterial properties, which can provide a theoretical support for development of butyric acid-derived green antibiotic substitutes.

Key words: butyrate; complex coacervation; response surface methodology; microcapsules; antibacterial activity

引文格式:

孙辉, 范俐, 杜仲达, 等. 丁酸钠微胶囊的制备工艺优化、表征及抑菌特性分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(6): 154-161.

SUN Hui, FAN Li, DU Zhongda, et al. Preparation process optimization, characterization and antimicrobial properties of sodium butyrate microcapsules [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 154-161.

收稿日期: 2022-06-20

基金项目: 福建省科技厅自然科学基金项目 (2020J05215); 高层次引进人才项目 (YJ202004)

作者简介: 孙辉 (1986-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品化学与营养, E-mail: sun_hui_edu@163.com

通讯作者: 范俐 (1970-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品生物化学, E-mail: 278701912@qq.com

丁酸钠是重要的功能性短链脂肪酸盐,在动物营养、食品营养、生物医药等领域常作为酸味剂和能量调节剂使用^[1]。相关研究证明,丁酸钠的有效成分丁酸具有脂水两溶和穿透性强的特点,能够促进畜禽类动物肠上皮吸收,平衡胞内 pH 和微生态等^[2-4]。但由于丁酸钠有酸臭味、易挥发、口味差、易潮解和易被胃吸收^[5]等问题限制了它的应用范围。另外,丁酸钠在存储和加工过程中易受到环境影响发生降解,而微胶囊包埋的丁酸钠则更稳定^[6],且无不良气味和刺激性,利于强化其抗菌功效^[7]。赵鹏宽等^[8]采用喷雾干燥技术筛选合适丁酸钠的微胶囊颗粒包埋材料和工艺参数;刘金松等^[9]利用分步聚合法制备了肠溶性丁酸钠微胶囊;Shi 等^[10]采用植物脂肪作为包膜主材料,利用自主研发的智能微胶囊包膜技术(IM 技术)对丁酸钠进行双层包膜处理,得到粒径均匀和包封率较高的包埋短链脂肪酸产品。可见目前市面上的微胶囊丁酸钠具有良好的功能稳定性,但存在包材食用安全性偏低和包埋效率不足的问题^[9]。因此,利用微胶囊新技术提高丁酸钠的包埋率具有重要的现实意义。

微胶囊技术作为新兴的固定化方法,具有缓释、掩味、隔离活性成分和改良物质理化性质等特点,常被广泛应用在生物制药、食品工业和农牧业等多个领域^[11]。目前常用的工业化微胶囊制备方法有喷雾干燥法和化学交联法,其中喷雾干燥是简廉高效的物理法,但存在损耗大以及产品易褐变吸潮等问题^[12];交联法是一种加强物质性能稳定的化学法,但生物大分子原料的低生物相容性则限制其使用范围^[13];而复凝聚法是通过改变 pH 值使得异种电荷的水溶性高分子溶液形成的电解质复合物解离,从而分散在芯材周围沉积而形成微胶囊。该物化方法简便廉效、包封率高且具有良好的缓释性能。利用复凝聚技术制备微胶囊,保证包埋效率的关键是相反电荷的高分子材料和包埋物质间比例。壳聚糖是一种天然阳性多糖,其分子结构含大量带正电荷的伯氨基,而海藻酸钠是含有大量羧基的阴离子多糖材料,壳聚糖和海藻酸钠组合能够通过静电作用形成聚电解质膜,且水溶性好、利于基因堆积和结构修饰,适用于制备脂水两溶性物质的微胶囊^[14,15]。因此,针对丁酸高效利用的剂型局限性^[16]这一难题,本研究拟采用复凝聚微胶囊技术提升丁酸钠的包埋率,提升丁酸对条件致病菌的抑制效力,保证丁酸钠的绿色替代功效。囊材选用海藻酸钠、壳聚糖为主的植物源生物大分子材料,通过响应面法探索双层复凝聚法制备最高包埋率丁酸钠微胶囊的优化条件,并对其结构和体外抑菌活性进行表征测定。有望为丁酸钠的高值化利用和绿色代抗产品的开发提供

理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 实验试剂

丁酸钠购于西格玛奥德里奇公司;壳聚糖、海藻酸钠均为分析纯购于源叶生物科技有限公司;盐酸、碳酸钠、氯化钙、磷酸二氢钾、无水乙醇、氢氧化钠均为分析纯购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 菌种和培养基

病原菌:金黄色葡萄糖球菌 ATCC6538 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 ATCC25922 (*Escherichia coli*)由武夷学院微生物实验室提供;营养肉汤(NB)、琼脂(NA)购于上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.3 仪器设备

BSA224S 型分析天平,赛多利斯仪器有限公司;IKA RCT 型磁力搅拌器,广州艾卡仪器设备有限公司;H-1 型微型漩涡混合器,上海精科实业有限公司;DELTA 320 型精密 pH 计,上海雷磁有限公司;SDTQ600 型同步热分析仪,美国 TA 公司;Antaris II 型傅立叶红外光谱,美国赛默飞公司;VEGA3 SBH 扫描电镜,瑞士泰思肯公司。

1.2 试验方法

1.2.1 丁酸钠微胶囊的制备工艺

将一定量的海藻酸钠完全溶解于热的磷酸缓冲液(pH 值 3.0)中,自然降温至 25 °C 后加入适量丁酸钠;在混合液中以 2 mL/min 速度滴入氯化钙溶液,观察到液滴迅速凝聚成均匀颗粒胶后,完全反应后将混合溶液置于 4 °C 冰箱 12 h 使其硬化,将颗粒胶反复过滤清洗 5 次后,过滤至壳聚糖溶液中复膜 15 min,再次将颗粒胶过滤和清洗 2 次,最后将其在 80 °C 条件下干燥至水分含量低于 15% 时即为成品。

1.2.2 单因素和中心组合优化实验

单因素试验设计:根据 1.2.1 制备工艺,以微胶囊包埋率为指标摸索其制作工艺,分别对囊材质量分数(%):海藻酸钠(1.5、2.0、2.5、3.0、3.5)、氯化钙(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0)、壳聚糖(0.5、1.0、1.5、2.0、3.0);包埋时间(h):(1、2、3、4、5);芯材质量分数(%):丁酸钠(1.0、1.3、2.0、2.5、3.0)进行单因素试验。

中心组合试验设计:根据 IBM SPSS Statistics 26 的显著性分析筛选主要因素和水平,结合单因素试验

结果,进行丁酸微胶囊的包埋条件的中心组合优化实验设计。采用复凝聚反应过程,固定氯化钙质量分数3.0%,包埋时间3 h,研究3个因素(海藻酸钠、壳聚糖、丁酸钠质量分数)对响应值丁酸钠包埋率的影响,利用 Design Expert 8.0.6 设计三因素五水平试验,见表1。

表1 响应面优化的因素水平设计表

Table 1 Factors and coding levels of response surface analysis

| 因素 | 水平 | | | | |
|--------|--------|------|------|------|-------|
| 质量分数/% | -1.682 | -1 | 0 | 1 | 1.682 |
| 海藻酸钠 | 2.58 | 2.75 | 3.0 | 3.25 | 3.42 |
| 壳聚糖 | 1.33 | 1.5 | 1.75 | 2.0 | 2.17 |
| 丁酸钠 | 2.08 | 2.25 | 2.5 | 2.75 | 2.92 |

1.2.3 表征与测定

1.2.3.1 热重分析

取2 mg不同处理条件制备的丁酸钠微胶囊(Sodium Butyrate Microcapsules, SB-MCPs)和空载微胶囊(Bland Microcapsules, MCPs)分别加入到热重分析仪中,氮气环境中,升温程序:10 °C/min,测量SB-MCPs和MCPs在23~800 °C之间的失重情况,从而测定MCPs对丁酸钠的包封率和负载率^[17]。按公式(1)和(2)计算微胶囊对丁酸钠的负载率和包埋率:

$$C = \left(\frac{M_l - M_w}{M - M_w} - \frac{m_l - m_w}{m - m_w} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C —丁酸钠负载率, %;

M_l —SB-MCPs的质量, g;

M_w —SB-MCPs中水的质量, g;

M —SB-MCPs共损失的质量, g;

m —MCPs的质量, g;

m_l —MCPs共损失的质量, g;

m_w —MCPs中水的质量, g。

$$EE = \frac{M_l \times C}{M_B} \quad (2)$$

式中:

EE —丁酸钠包埋率, %;

M_l —SB-MCPs的质量, g;

C —丁酸钠负载率, %;

M_B —丁酸钠总添加量, g。

1.2.3.2 微胶囊形态特征测定

取适量SB-MCPs和MCPs样品干燥后分散于导电胶上,加速电压20.0 kV,喷金40 s,用VEGA3 SBH型电子显微镜进行微胶囊表面结构特征观察^[18]。

1.2.3.3 傅里叶红外光谱(FT-IR)测定

采用溴化钾压片法,采用FT-IR法分别测定海藻

酸钠(Sodium Alginate, SAA)、壳聚糖(Chitosan, CTS)、丁酸钠(Sodium Butyrate, SB)、MCPs和SB-MCPs。程序设置:400至4 000 cm^{-1} ,扫描分辨率是4 cm^{-1} ,扫描次数为16。

1.2.3.4 抑菌性能测定

选用感染性肠病的两种标志性典型致病菌:金黄色葡萄球菌和大肠杆菌^[19],采用菌落计数法测定丁酸钠微胶囊对沙门氏菌和大肠杆菌的抑菌性能^[20]。首先将SB、MCPs和SB-MCPs紫外灭菌,然后加入菌悬液(1×10^3 CFU/mL)中培养10 h,再于固体营养琼脂培养基上均匀接种20 μL 菌悬液,无菌放置0.5 h后于37 °C恒温条件下培养24 h,观察统计菌落总数,抑菌率的计算公式式(3)如下:

$$Y = \frac{W_b - W_e}{W_b} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

Y —抑菌率, %;

W_b —空白对照组细菌菌落的数量;

W_e —样本组细菌菌落的数量。

采用抑菌圈(牛津杯法)测试SB、MCPs和SB-MCPs的抑菌性能。在培养基中心区域等距离均匀安置4个牛津杯,无菌条件下接种50 μL 1×10^6 CFU/mL的病原菌悬液至培养基上,再分别滴入50 μL 丁酸钠、空载微胶囊和丁酸钠微胶囊样液、乙醇(阳性对照)、菌液(阴性对照)至牛津杯中,37 °C恒温条件下培养24 h,测定各个抑菌圈直径并按照抑菌圈 < 10 mm为无抑菌作用,10 mm $<$ 抑菌圈 < 15 mm的为中度抑菌和抑菌圈 > 15 mm为高度抑菌规律做评价。

1.2.4 数据统计分析

利用Excel 2016和Origin 9.1软件绘图报告结果,使用IBM SPSS Statistics 26软件进行多重比较显著性分析和因子分析,采用Design Expert 8.0.6软件对中心组合响应面试验数据建立回归方法和方差分析并绘制曲面三维图。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果与分析

不同复凝聚反应因子对微胶囊包埋率的影响如图1。从图1a~1c可以看出,随着海藻酸钠、氯化钙和丁酸钠质量分数增大,丁酸钠包埋率先增加后减小,波动变化显著,且在海藻酸钠、氯化钙和丁酸钠质量分数分别为3.0%、3.0%和2.5%时,丁酸钠包埋率达最大值(93.21%、92.01%、92.24%);从图1d可以看出,随着壳聚糖添加量增大,包埋率不断增加,原因在于

壳聚糖分子链中大量带正电荷的伯氨基易于暴露在弱酸溶液中,易于通过静电作用和海藻酸钠表面带负电的羧基形成复膜,从而提高丁酸钠包埋率^[21,22]。但当壳聚糖质量分数大于 2.0%时,会由于体系粘度过大出现微胶囊复膜难度加大、且均匀度下降。由图 1e 可见,复凝聚反应时间 3 h 时,包埋率达到峰值(91.55%),而后包埋时间越长包埋率反而减小,但变化不显著,说明在复凝聚过程中,虽然囊材和芯材间接触频率变大,但微胶囊的均匀度和牢固度不足则导致芯材逸出。

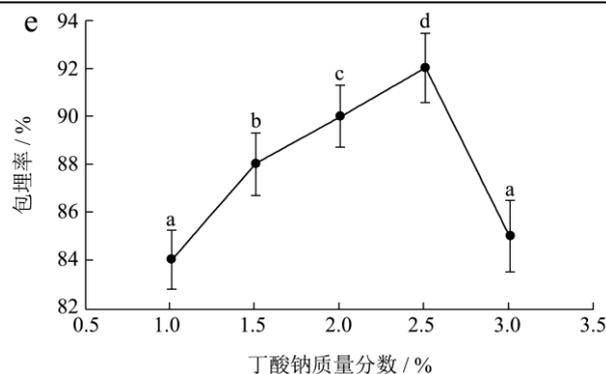
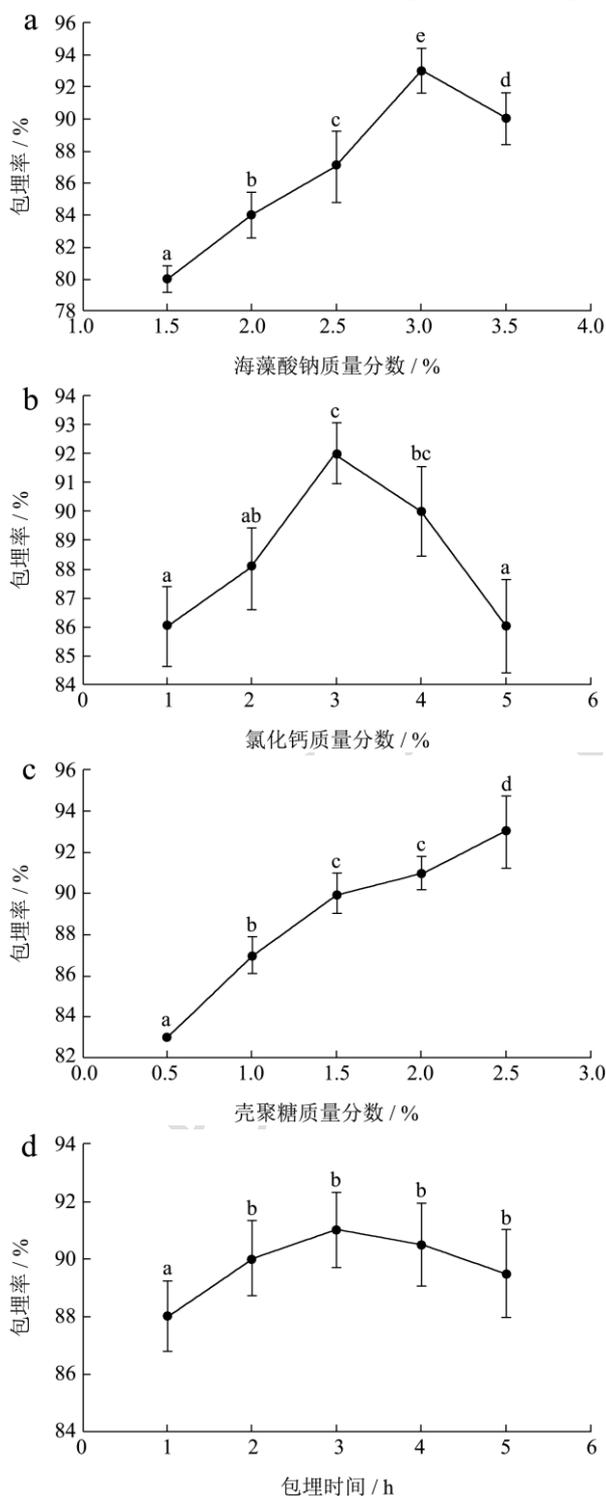


图 1 海藻酸钠(a)、氯化钙(b)、丁酸钠(c)、壳聚糖(d)质量分数和包埋时间(e)对微胶囊包埋率的影响

Fig.1 Effects of mass fraction of alginate sodium (a), chitosan (b), calcium chloride(c), butyrate (d), the embedding time (e) on the embedding rate of microcapsules

注: 图上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

通过 IBM SPSS Statistics 26 对微胶囊包埋率变化进行因子分析(见表 2), KMO 值为 0.55, 球形检验 P 值为 0.001, 说明因素间的相关性较强, 适合运用因子分析检验。根据总方差解释结果发现, 海藻酸钠和壳聚糖两个因子的累积贡献率达 93.28%, 且属于回归分析后的第一类和第二类公共因子, 丁酸钠为第三归总因子; 按照总方差结果和归总因子贡献水平可以看出, 各因子对微胶囊包埋率的由弱到强影响次序为包埋时间 < 氯化钙质量分数 < 壳聚糖质量分数 < 丁酸钠质量分数 < 海藻酸钠质量分数, 从而进一步确定对包埋率影响最大的 3 个因素(海藻酸钠质量分数、丁酸钠质量分数、壳聚糖质量分数)进行响应面试验设计。

表 2 总方差解释和成分得分系数矩阵

Table 2 Total variance explained and component matrix

| 因子 | 特征值 | | | 公共因子 | |
|------|------|-------|--------|------|-------|
| | 总计 | 方差百分比 | 累计率 | 1 | 2 |
| 海藻酸钠 | 3.64 | 72.98 | 72.98 | 0.82 | 0.52 |
| 壳聚糖 | 1.01 | 20.30 | 93.28 | 0.78 | 0.59 |
| 丁酸钠 | 0.23 | 4.59 | 97.87 | 0.91 | -0.29 |
| 氯化钙 | 0.08 | 1.75 | 99.62 | 0.83 | -0.52 |
| 包埋时间 | 0.02 | 0.37 | 100.00 | 0.89 | -0.21 |

注: 1: 第一公共因子; 2: 第二公共因子。KMO=0.55, $P=0.001$ 。

2.2 中心组合试验设计与分析

2.2.1 响应面结果及分析

单因子试验发现, 适宜的氯化钙质量分数为 3.0%, 包埋时间为 3 h, 当氯化钙质量分数高于 3.0% 时, 复凝聚反应产生过于致密的膜结构进而降低丁酸钠包埋率, 而其质量分数低于 3.0% 时则出现囊膜网络

结构不完整的现象。为了进一步优化最适物料参数，按照中心组合试验设计原理，利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 3 试验数据进行回归拟合分析，得到响应值包埋率 (Y) 与海藻酸钠质量分数 (X₁)、壳聚糖质量分数 (X₂) 和丁酸钠质量分数 (X₃) 关系的二次多项式回归方程如下： $Y = -1445.33246 + 584.29996X_1 + 204.92789X_2 + 360.2813X_3 + 73.632X_1X_2 - 39.624X_1X_3 - 49.712X_2X_3 - 101.11542X_1^2 - 83.92424X_2^2 - 28.27211X_3^2$ 。从回归模型的方差统计分析 (表 4) 发现，模型极显著 ($P < 0.0001$)，模型相关系数 ($R^2 = 0.98$) 代表所选变

量能够造成 98.21% 的响应值变化，且多项式方程中自变量的一次幂项、二次幂项、交互项以及模型均具有极显著差异 ($P < 0.01$)，而失拟项差异不显著 ($P = 0.35$)，模型拟合度较高 ($R^2_{Adj} = 0.97$)，说明与实际情况较一致，能够反映不同复凝聚反应过程中包埋率的变化，可用于实际预测制备丁酸钠微胶囊的配方参数。对比表 4 中各因素的一次项 P 值可知，各因子对微胶囊包埋率的影响顺序为 $X_3 > X_2 > X_1$ ； X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 交互作用的 P 值均 < 0.01 ，说明各个因素间对微胶囊包埋率存在极显著的交互影响效应。

表 3 中心组合设计表及试验结果

Table 3 Design matrix and results of the central composite design

| 试验序号 | 海藻酸钠 X ₁ /% | 壳聚糖 X ₂ /% | 丁酸钠 X ₃ /% | 包埋率 Y/% | 试验序号 | 海藻酸钠 X ₁ /% | 壳聚糖 X ₂ /% | 丁酸钠 X ₃ /% | 包埋率 Y/% |
|------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| 1 | 1 | -1 | -1 | 73.40 | 11 | -1 | -1 | 1 | 92.18 |
| 2 | -1 | -1 | -1 | 72.42 | 12 | 1 | 1 | 1 | 89.50 |
| 3 | 0 | 0 | -1.682 | 84.48 | 13 | 1 | 1 | -1 | 92.07 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 95.95 | 14 | 0 | 1.682 | 0 | 81.73 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 94.11 | 15 | 0 | -1.682 | 0 | 78.00 |
| 6 | -1.682 | 0 | 0 | 73.34 | 16 | 0 | 0 | 0 | 94.11 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 80.01 | 17 | 1 | -1 | 1 | 79.56 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 94.39 | 18 | -1 | 1 | -1 | 76.37 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 97.65 | 19 | 1.682 | 0 | 0 | 80.31 |
| 10 | 0 | 0 | 1.682 | 94.93 | 20 | 0 | 0 | 0 | 94.11 |

表 4 回归方程方差分析表

Table 4 ANOVA for response surface quadratic model

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|-------------------------------|---------|-----|--------|--------|---------|-----|
| Model | 1433.57 | 9 | 159.29 | 60.81 | <0.0001 | ** |
| X ₁ -海藻酸钠 | 46.78 | 1 | 46.78 | 17.86 | 0.0018 | ** |
| X ₂ -壳聚糖 | 52.05 | 1 | 52.05 | 19.87 | 0.0012 | ** |
| X ₃ -丁酸钠 | 145.42 | 1 | 145.42 | 55.52 | <0.0001 | ** |
| X ₁ X ₂ | 169.43 | 1 | 169.43 | 64.69 | <0.0001 | ** |
| X ₁ X ₃ | 49.06 | 1 | 49.06 | 18.73 | 0.0015 | ** |
| X ₂ X ₃ | 77.23 | 1 | 77.23 | 29.48 | 0.0003 | ** |
| X ₁ ² | 575.57 | 1 | 575.57 | 219.75 | <0.0001 | ** |
| X ₂ ² | 396.5 | 1 | 396.5 | 151.38 | <0.0001 | ** |
| X ₃ ² | 45 | 1 | 45 | 17.18 | 0.002 | ** |
| 残差 | 26.19 | 10 | 2.62 | | | |
| 失拟项 | 15.53 | 5 | 3.11 | 1.46 | 0.35 | NS |
| 纯误差 | 10.66 | 5 | 2.13 | | | |
| 总计 | 1459.76 | 19 | | | | |
| $R^2 = 0.98$ | | | | | | |
| $R^2_{Adj} = 0.97$ | | | | | | |

2.2.2 响应面分析和优化

各因素交互作用的响应面如图 2 所示。海藻酸钠和壳聚糖质量分数对丁酸钠包埋率的交互作用响应面

如图 2a 所示。二者之间的交互作用显著，当壳聚糖质量分数一定时，所选海藻酸钠添加范围内丁酸钠包埋率随海藻酸钠添加量的升高，出现前增后减的变化过

程,此现象与海藻酸钠与壳聚糖产生的静电聚集效应有关。当丁酸钠质量分数为 2.5% ($X_3=0$),壳聚糖质量分数为 1.6%~1.8%,海藻酸钠质量分数为 2.95%~3.15%时,丁酸钠包埋率较大。壳聚糖和丁酸钠质量分数对丁酸钠包埋率交互作用的响应面如图 2b 所示。曲面非常陡峭,说明二者间的交互作用显著,包埋率随丁酸钠和壳聚糖添加量的增加而增加。当海藻酸钠质量分数为 3.0% ($X_1=0$)、丁酸钠质量分数为 2.45%~2.75%、壳聚糖质量分数为 1.7%~2.0%时,丁酸钠微胶囊包埋率较大。所添加的海藻酸钠和丁酸钠交互效应曲面图(图 2c)。曲面倾斜程度非常大,能够直观的反应二者间交互效应极显著,随着海藻酸钠、丁酸钠添加量的增加,丁酸钠微胶囊包埋率呈先增加后下降的趋势。即各因子质量分数分别为壳聚糖 1.75% ($X_2=0$)、海藻酸钠 2.95%~3.15%、丁酸钠 2.45%~2.75%时,丁酸钠微胶囊包埋率较大。因此,3 个因子之间形成的自变量交互项影响微胶囊包埋率的顺序: $X_1X_2 > X_1X_3 > X_2X_3$ 。

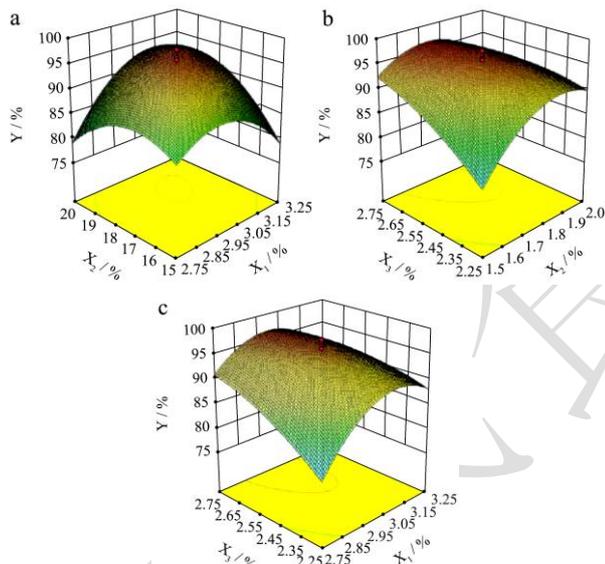


图 2 不同因素交互作用对微胶囊包埋率的影响

Fig.2 Effects of interaction of different factors on embedding rate of microcapsules

注:图中 X_1 为海藻酸钠添加量,%; X_2 为壳聚糖添加量,%; X_3 为丁酸钠添加量,%; Y 为包埋率, %。

2.2.3 模型优化和验证

通过对回归模型方程进行优化求解,计算得到极大响应值包埋率(Y)为 95.12%时对应的微胶囊最佳制备配方质量分数为:壁材-海藻酸钠(X_1)为 3.0%、壳聚糖(X_2)为 1.75%、芯材丁酸钠(X_3)为 2.5%。在此配方优化条件下,微胶囊 3 组平行验证试验的平均包埋率为 94.89%,结果与预测值的相对误差(0.23%)处于合理范围,可以看出,通过上述响应

面法优化参数能够有效提高丁酸钠微胶囊的包埋率。

2.3 扫描电镜观察微胶囊的形貌结构特征

干燥后微胶囊颗粒形貌的 SEM 观察结果如图 3 所示。空载微胶囊(图 3A)成球量少,表面光滑有凸起,且有粘连,这可能是因为壁材之间静电作用导致囊壳发生聚集造成的。丁酸钠微胶囊(图 3B)成球性能较好,颗粒近似圆球形,形态饱满,表面光滑,有部分形状不规则略粗糙,微胶囊之间粘连较少,粒径较大,但均在 500 μm 以下,内部结构紧密,囊壁结构相对完整致密,且没有明显孔洞和裂缝。很可能是源自海藻酸钠与丁酸钠和氯化钙分子间静电相互作用,以及壳聚糖二次复膜起到固化作用^[23,24],进而促进微胶囊外观形态的保持,说明丁酸钠发生了有效的微胶囊化包埋,有利于提高其功效稳定性。

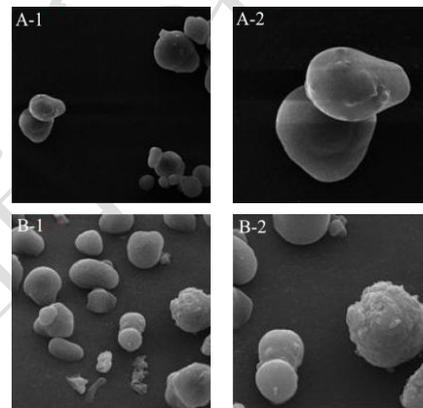


图 3 空载微胶囊(A)和丁酸钠微胶囊(B)的 SEM 图

Fig.3 SEM of MCPs (A) and SB-MCPs (B)

注:图 A-1、A-2 分别为 MCPs-1 的 2000 倍、5000 倍扫描电镜图,图 B-1、B-2 分别为 SB-MCPs-2 的 2000 倍、5000 倍扫描电镜图。

2.4 红外光谱分析

FT-IR 技术是有机化合物结构表征的常用方法,通过对比丁酸钠包埋前后在 IR 区的特征吸收峰的强度差异可以表征丁酸钠微胶囊形成与否,例如芯、壁材分子间范德华力、氢键、疏水相互作用力或静电相互作用等非共价键作用的键能减弱,或者相应特征基团的吸收峰削弱或消失都意味着包埋物的形成。从丁酸钠微胶囊、空载微胶囊、海藻酸钠、壳聚糖以及丁酸钠的 FT-IR 分析(图 4)可以看出,与海藻酸钠和壳聚糖的特征吸收峰相比,空载微胶囊的对称伸缩振动和氨基弯曲振动明显减弱,说明壁壳的复合凝聚物已形成;丁酸钠微胶囊的特征吸收规律与空载微胶囊的红外谱图非常相似,主要是丁酸钠在 2955~2822 cm^{-1} 范围内羧酸的宽吸收峰消失,1560~915 cm^{-1} 范围内的

特征吸收峰明显减弱, 980 cm^{-1} 和 915 cm^{-1} 为 C-H 面外的弯曲振动的强吸收峰被削弱, 621 cm^{-1} 处 C-O 伸缩振动的特殊吸收峰也消失了, 原因可能是壳聚糖的 $-\text{NH}_3^+$ 与海藻酸钠和丁酸钠的 $-\text{COO}^-$ 相互作用^[25-27], 从而使丁酸钠包埋在微胶囊内部, 有效限制了特征官能团的振动。丁酸钠的主要特征峰在丁酸钠微胶囊图谱上均有不同程度被隐藏或削弱, 可能是由于混合体系以静电物理相互作用所致, 与郭阳等^[28]研究结果一致。

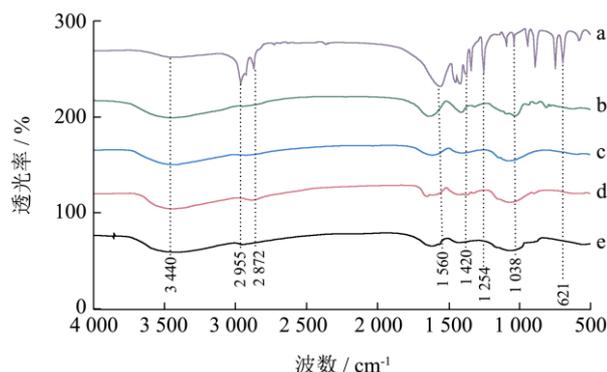


图4 丁酸钠(a)、海藻酸钠(b)、壳聚糖(c)、空载微胶囊(d)、丁酸钠微胶囊(e)的红外光谱图

Fig.4 FT-IR spectrum of SB (a), SAA (b), CS (c), MCPs (d) and SB-MCPs (e)

2.5 抑菌活性

表5 1 g/L 丁酸钠、丁酸钠微胶囊、空载微胶囊、乙醇对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性能

Table 5 Antibacterial activity of SB, MPs, SB-MPs, ethanol (1 g/L) against *E. coli* and *S. aureus*

| 指标 | 致病菌 | 丁酸钠微胶囊 | 丁酸钠 | 空载微胶囊 | 阳性对照组 | 阴性对照组 |
|----------|------------------|------------|------------|------------|-----------|-------|
| 抑菌圈直径/mm | <i>E. coli</i> | 25.29±0.52 | 17.80±0.34 | 13.80±0.31 | 7.50±0.34 | - |
| | <i>S. aureus</i> | 23.00±0.37 | 16.18±0.21 | 11.83±0.26 | 6.81±0.57 | - |
| 抑菌率/% | <i>E. coli</i> | 73.38±4.83 | 43.56±5.13 | 34.65±6.54 | - | - |
| | <i>S. aureus</i> | 65.61±5.99 | 40.36±6.42 | 35.19±5.39 | - | - |

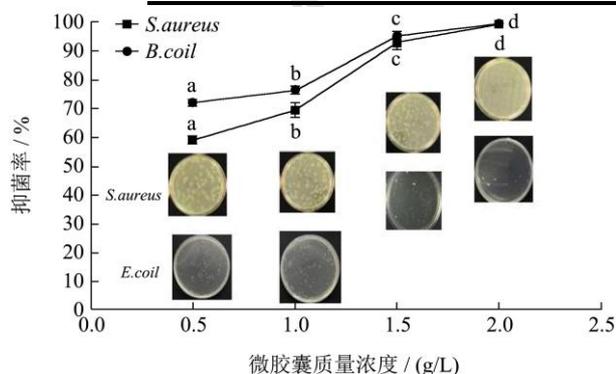


图5 不同质量浓度丁酸钠微胶囊的抑菌性能

Fig.5 Antibacterial activity of butyrate microcapsules with different mass concentrations

3 结论

固定氯化钙质量分数 3.0%, 包埋时间为 3 h 条件

通过测定抑菌圈直径评价丁酸钠微胶囊的抑菌性能如表 5 所示。根据牛津杯抑菌实验特征, 各样品抑菌圈从表面向四周扩展, 因此各样品浓度与离杯距离成反比。从结果可以看出, 丁酸钠微胶囊对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌性均优于空载微胶囊、丁酸钠和乙醇, 且抑菌活性的强弱顺序为丁酸钠微胶囊 > 丁酸钠 > 空载微胶囊 > 乙醇, 说明丁酸钠微胶囊具备更好的致病菌抑制效果, 与韩乾杰等^[26]的前期研究结果相似。另外, 24 h 的抑制试验结束后, 与空载微胶囊相比, 丁酸钠微胶囊对金黄色葡萄球菌抑制率提高 38.73%, 对大肠杆菌抑制率提高 30.42%, 说明丁酸钠可以协同壳聚糖-海藻酸钠组合壁材发挥更好的抑菌功效。原因可能是在共同稳定物系中, 各种有效成份有序定时地释放, 从而提高其抑菌性能。丁酸钠微胶囊的质量浓度-抑菌性能曲线如图 5 所示。从图 5 可以看出, 当微胶囊质量浓度越大, 对金黄色葡萄球菌和大肠菌群的生长的影响越大, 且影响趋势相似, 0.5 g/L 的丁酸钠微胶囊即能遏制一半以上致病菌的生长, 2.0 g/L 的丁酸钠微胶囊的抑制作用高达 99%。其中, 丁酸钠微胶囊抑制金黄色葡萄球菌生长特性的能力高于大肠杆菌, 可能由于大肠杆菌的酸敏特性, 更容易受到丁酸的酸性渗透和诱导, 破坏细胞电解质平衡, 导致细胞死亡^[29-31]。

下, 通过三因素五水平响应面优化确定壁材质量浓度分别是海藻酸钠 3.0%、壳聚糖 1.75%、芯材丁酸钠 2.5% 时丁酸钠微胶囊包埋率为 95.12%, 模型拟合分析表明这一参数制备微胶囊预测性良好, 且包埋效果稳定。

SEM 分析发现, 丁酸钠微胶囊外观大部分呈球形, 外表面不光滑; 对比 FT-IR 的各个样品结构表征分析, 丁酸钠微胶囊图谱与空载微胶囊图谱极其相似, 丁酸的特征吸收峰均消失, 证实了丁酸钠结构中特征基团羧基已经被包埋到壁材高分子材料内部形成新的复合物, 但未有新化学键产生, 说明未发生其他化学反应, 分子间作用力应该多是以静电相互作用和氢键为主, 进而证明上述工艺技术能够有效减少丁酸损失, 最终保证丁酸的生物活性。通过丁酸钠微胶囊的抑菌试验分析发现, 与丁酸钠相比, 丁酸钠微胶囊对金黄色葡萄球菌的抑制率提高 28.82%、对大肠杆菌的抑菌

活性提高 25.25%；与空载微胶囊相比，则分别提高 38.73% 和 30.42%，说明丁酸钠微胶囊包埋效果良好且抑菌功效得到显著提高。

参考文献

- [1] 朱文秀,柳红莉,高静竹,等.丁酸钠对副溶血性弧菌毒性的影响及机制研究[J].食品安全质量检测学报,2021,12(17): 6887-6893.
- [2] Nazanin A K S, Mohammad M M, Jamshid H, et al. Sodium butyrate as a histone deacetylase inhibitor affects toll-like receptor 4 expression in colorectal cancer cell lines [J]. Immunol Invest, 2019, 48(7): 1-11.
- [3] Sun W, Sun J, Li M, et al. The effects of dietary sodium butyrate supplementation on the growth performance, carcass traits and intestinal microbiota of growing-finishing pigs [J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128: 1613-1623.
- [4] Rdaca B, Alra A, Vsp A, et al. Sodium butyrate inhibits planktonic cells and biofilms of *Trichosporon* spp. [J]. Microb Pathogenesis, 2019, 130: 219-225.
- [5] Dahiya R, Berwal R S, Sihag S, et al. The effect of dietary supplementation of salts of organic acid on production performance of laying hens [J]. Veterinary World, 2016, 9(12): 1478-1484.
- [6] 罗丹,李蛟龙,邢通,等.低聚木糖和包膜丁酸钠对肉鸡肠道发育、肠黏膜免疫功能和盲肠微生物组成的影响[J].南京农业大学学报,2022,45(1):131-140.
- [7] Fernandez R C, Ordonez C, Abad G J, et al. Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella enteritidis* infection [J]. Poultry Science, 2009, 88(5): 943-948.
- [8] 赵朋宽,雷蕾,徐光科,等.一种微囊包被丁酸钠及其制备方法,CN 106561998A[P].2017.
- [9] 刘金松,孔随飞,董泽涵,等.一种丁酸钠合成及微囊二次包被制备方法,CN 114468137A[P].2022.
- [10] Shi X, Monaco M H, Donovan S M, et al. Encapsulation of tributyrin by gamma-cyclodextrin: Complexation, spray drying, and *in vitro* fermentation [J]. J Food Sci, 2020, 85(10): 2986-2993.
- [11] 王飞俊,陆方妹,邵自强.静电喷雾法制备羧甲基纤维素/壳聚糖液芯微胶囊[J].高分子材料科学与工程,2014,30(9): 117-121.
- [12] Madene A, Jacquot M, Scher J, et al. Flavour encapsulation and controlled release-a review [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2006, 41(1): 1-21.
- [13] Dias M I, Ferreira I C F R, Barreiro M F. Microencapsulation of bioactives for food applications [J]. Food and Function, 2015, 6(4): 1035-1052.
- [14] 刘婷,但卫华,但年华,等.微胶囊的制备及其表征方法[J].材料导报,2013,27(21):81-84.
- [15] Dong D, Qi Z L, Hua Y F, et al. Microencapsulation of flaxseed oil by soya proteins-gum Arabic complex coacervation [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(8): 1787-1791.
- [16] 邹杨,杨在宾,杨维仁,等.不同剂型丁酸钠与抗生素对肉仔鸡生产性能、肠道 pH 及挥发性脂肪酸含量的影响[J].动物营养学报,2010,22(3):675-681.
- [17] 彭志刚,刘高峰,冯茜,等.氨基磺酸乙基纤维素微胶囊的制备及缓释性能[J].现代化工,2019,39(1):119-122,124.
- [18] 蓝蔚青,胡潇予,阮东娜,等.傅里叶红外结合拉曼分析卡拉胶寡糖对南美白对虾蛋白结构影响[J].光谱学与光谱分析, 2019,39(8):2507-2514.
- [19] Gubspun J, Gires P Y, Loubens C D, et al. Characterization of the mechanical properties of cross-linked serum albumin microcapsules: effect of size and protein concentration [J]. Colloid and Polymer Science, 2016, 294(8): 1381-1389.
- [20] Zhang R S, Lei L, Song Q Q, et al. Calcium ion cross-linking alginate/dexamethasone sodium phosphate hybrid hydrogel for extended drug release [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 175: 569-575.
- [21] Hill M, Twigg M, Sheridan E A, et al. Alginate/Chitosan particle-based drug delivery systems for pulmonary applications [J]. Pharmaceutics, 2019, 11(8): 379-390.
- [22] 陈福泉,陈会景,洪清林,等.辛烯基琥珀酸酯化琼脂对海藻酸钠微胶囊包埋效果的改善作用[J].现代食品科技,2021, 37(5):130-138.
- [23] 孟庆廷,陈万东.壳聚糖-海藻酸钠叶绿素亚铁微胶囊的制备及缓释性能研究[J].食品科学,2010,31(20):137-140.
- [24] 孙伟艳,宿志伟,张芳,等.壳聚糖/磺丁基-β-环糊精纳米粒子的制备及其对海藻酸钠膜物理性能的影响[J].食品科学, 2021,42(21):161-167.
- [25] 谭睿,申瑾,董文江,等.复合凝聚法制备绿咖啡油微胶囊及其性能[J].食品科学,2020,41(23):144-152.
- [26] Gratzandia O, Lasa A, Pedraz J L, et al. Preparation and characterization of resveratrol loaded pectin/alginate blend gastro-resistant microparticles [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2018, 23(8): 1886-1895.
- [27] 卢晓霆,许中畅,王田田,等.玉米多孔淀粉-海藻酸钠-壳聚糖-葡萄糖多酚缓释微胶囊的制备及表征[J].中草药,2016,47 (13):2252-2259.
- [28] 郭阳,包怡红,赵楠.复凝聚法制备松籽油微胶囊工艺优化及其氧化稳定性分析[J].食品科学,2017,38(18):229-236.
- [29] 韩乾杰,张玲玲,陈敏,等.植物精油与丁酸钠的体外协同抑菌效果研究[J].动物营养学报,2017,29(2):712-718.
- [30] 王继凤,陈耀星,王子旭,等.丁酸钠对断奶仔猪小肠黏膜形态结构的影响[J].中国兽医科学,2005,35(4):298-301.
- [31] 陈茹茹,施冬健,储鸿.仿生黏附性聚多巴胺丁香酚抑菌微胶囊的制备[J].精细化工,2021,38(8):1650-1659.