

内源乳化法制备青春双歧杆菌微胶囊

张智^{1*}, 周楠¹, 冯丽荣², 景仕豪¹, 张晓彤¹, 章圣龙², 蒋士龙³, 解庆刚³

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

(2. 黑龙江国宏节能环保有限公司, 黑龙江哈尔滨 150040)(3. 黑龙江飞鹤乳业有限公司, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 为提高青春双歧杆菌存活率及抵抗不利环境的能力, 以青春双歧杆菌为研究对象, 采用海藻酸钠与乳清蛋白为复合壁材, 通过内源乳化法制备微胶囊, 并对其进行模拟人工胃肠试验和贮藏稳定性试验。以包埋率为考察指标, 根据单因素试验探究海藻酸钠添加量、水相油相体积比、吐温 80 添加量、搅拌速度和乳化时间等因素对包埋率的影响。采用响应面分析法对海藻酸钠添加量、吐温 80 添加量、搅拌速度进行分析和优化。结果表明: 制备青春双歧杆菌微胶囊的最佳工艺条件为海藻酸钠添加量 2% (m/m), 吐温 80 添加量 0.6 mL, 搅拌速度 430 r/min, 包埋率为 83.05%。青春双歧杆菌微胶囊于模拟人工胃、肠液中放置 180 min, 菌体存活率分别为 59.89%、66.45%; 于 4 °C 环境下贮藏 42 d, 存活率为 56.83%。研究表明: 以内源乳化法制得的青春双歧杆菌微胶囊对模拟胃肠液环境具有良好的耐酸性及肠溶性, 在 4 °C 环境中具有良好的贮藏稳定性。

关键词: 青春双歧杆菌; 内源乳化法; 微胶囊; 包埋率

文章编号: 1673-9078(2023)06-171-179

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0813

Preparation of *Bifidobacterium adolescentis* Microcapsules by Endogenous Emulsification

ZHANG Zhi^{1*}, ZHOU Nan¹, FENG Lingrong², JING Shihao¹, ZHANG Xiaotong¹, ZHANG Shenglong²,
JIANG Shilong³, XIE Qinggang³

(1. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization, School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 151800, China) (2. Heilongjiang Guohong Energy Conservation and Environmental Protection Co. Ltd., Harbin 151800, China) (3. Heilongjiang Feihe Dairy Co. Ltd., Harbin 150040, China)

Abstract: To improve the survival rate of *Bifidobacterium adolescentis* and its resistance to unfavorable environments, *Bifidobacterium adolescentis* microcapsules were constructed via endogenous emulsification with sodium alginate and whey proteins as composite wall materials. Simulated artificial gastrointestinal tests and storage stability tests were performed, and, using efficiency as an evaluation index, the effects of sodium alginate addition, the water-to-oil volume ratio, Tween 80 addition, stirring speed, and emulsification time were investigated based on a single factor design. Analysis and optimization of sodium alginate addition, Tween 80 concentration, and stirring speed were performed using response surface methodology; the optimal conditions for the preparation of *Bifidobacterium adolescentis* microcapsules were 2% sodium alginate, 0.6 mL Tween 80, and a stirring speed of 430 r/min, under which an encapsulation rate of 83.05% was obtained. *Bifidobacterium adolescentis* microcapsules were then placed in simulated artificial gastric and intestinal juices for 180 minutes to investigate bacterial survival, under which rates of 59.89% and 66.45% were obtained, respectively. Storage was then investigated, and optimum results of 56.83% survival were obtained for microcapsules retained at 4 °C over 42 days. The results demonstrated good acid resistance and enteric solubility for *Bifidobacterium adolescentis* microcapsules produced by endogenous emulsification and indicated that capsules are stable when stored at 4 °C.

Key words: *Bifidobacterium adolescentis*; endogenous emulsification; microcapsules; encapsulation efficiency

引文格式:

张智,周楠,冯丽荣,等.内源乳化法制备青春双歧杆菌微胶囊[J].现代食品科技,2023,39(6):171-179.

ZHANG Zhi, ZHOU Nan, FENG Lingrong, et al. Preparation of *Bifidobacterium adolescentis* microcapsules by endogenous emulsification [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 171-179.

收稿日期: 2022-06-27

基金项目: 黑龙江省第一批“揭榜挂帅”科技攻关项目(2021ZXJ03B03); 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2020ZX07B01-3-2)

作者简介: 张智(1964-),女,博士,教授,研究方向:食品发酵、植物生物转化、功能食品, E-mail: Ldzhazhi@163.com

益生菌作为一种活性微生物,适当摄入后会对宿主产生积极影响。近些年来,益生菌在食品中的使用有所增加,已被用于各种益生菌菌株的商业开发,旨在增加食品的营养、保健等功能,因此市场对益生菌产品的需求也越来越大。据研究表明,益生菌具有维持肠道菌群平衡、提高机体免疫功能等重要作用^[1-3]。双歧杆菌是人体肠道内重要的严格厌氧益生菌,培养困难,氧气、pH 值等因素均会影响其生长繁殖,且在胃液环境下难以生存,导致其无法发挥其益生作用^[4]。

微胶囊是指由天然或人工合成的高分子材料研制而成的具有聚合物壁壳的微型容器或包装物^[5]。微囊化技术是在小颗粒(称为芯材)周围形成连续薄膜(称为壁材),将小颗粒与外界环境隔离,从而保护敏感物质的活性。利用微胶囊技术,可以降低肠胃对益生菌的杀伤,提高其存活率^[6,7]。现阶段对益生菌群、香气物质、油脂类等物质的包封多以海藻酸钠为主要壁材^[8,9],其在溶解性、成膜性和凝胶性等方面都具有一定的优势且价格低廉,是迄今为止制作微胶囊的最佳壁材^[10]。海藻酸钠也是最常用作封装材料的聚合物之一,可形成一种高度通用、高生物相容性并可用于保护活性成分的无毒基质,尤其是对热、pH 等敏感益生菌的处理和储存^[11,12]。蔡赛波^[13]以海藻酸钠为壁材,采用内源乳化法制备唾液乳杆菌微胶囊,试验表明:包埋后的唾液乳杆菌微胶囊在 4 °C 下储存 5 周,菌体存活率仍保持较高水平。Holkem 等^[14]利用海藻酸钠进行包埋,微囊化后的双歧杆菌 *MBB-12* 在酸性条件下能够有效保护益生菌通过模拟胃肠液通道,这些颗粒能够在 -18 °C 的温度下储存 120 d,室温下储存 60 d。Krasaekoopt 等^[15]以海藻酸钠为壁材,将双歧乳杆菌与其混合均匀,注入 CaCl_2 固化液后得双歧杆菌微胶囊,结果表明制得的微胶囊各项指标均符合预期。

制备微胶囊的常用方法有内源乳化法^[16]、喷雾干燥法^[17]、挤压法^[18]、锐孔法^[19]和复凝聚法^[20]等,其中内源乳化法相较其他制备方法具有可控粒径、囊壁光滑以及操作简化等的优点^[21,22]。

虽然目前越来越多的企业开始采用内源乳化法制备微胶囊并进行工业化生产,但针对青春双歧杆菌作为芯材制备微胶囊的研究并不多见,多以凝胶微球包裹法、微胶囊造粒仪及工业化培养基的形式培养,且因青春双歧杆菌的特殊敏感性,导致其生产成本高并难以应用于普通生产。基于此,本试验将青春双歧杆菌以海藻酸钠与乳清蛋白作为复合壁材制备微胶囊,通过单因素结合响应面法优化工艺参数,并对优化后所得微胶囊进行贮藏稳定性测定及人工模拟胃肠道消化试验,旨在通过微胶囊化的方法,提高其稳定性,

从而增加对不利环境的抵御能力,为青春双歧杆菌微胶囊化的研究提供了理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与仪器

青春双歧杆菌,实验室保藏菌种;海藻酸钠,天津市光复精细化工研究所;乳清蛋白,美国邦嘉乳品有限公司;胃蛋白酶(1:3 000)、胰蛋白酶(1:250),上海源叶生物科技有限公司;碳酸钙,北京康普汇维科技有限公司;冰醋酸,北京漕港化学试剂有限公司;大豆油,黑龙江九三油脂有限责任公司;吐温 80,北京化学试剂有限公司;磷酸氢二钾,天津市天力化学试剂有限公司。

手持移液器,德国 Eppendorf 股份公司;MIK-PH160 pH 计,杭州美控自动化技术有限公司;TGL-16G 型高速离心机,上海中科华辰有限公司;LRH-150F 恒温生化培养箱,南京贝登生物科技有限公司;D-1 全自动高压蒸汽灭菌锅,上海乔跃电子有限公司;LG-1002-A 超净工作台,苏州真田洁净设备有限公司;0.22 μm 、0.45 μm Millipore 滤膜,天津因赛科技发展有限公司;HZ85-2 恒温磁力搅拌机,海司乐仪器有限公司;BS224S 赛多利斯分析天平,上海精密仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备

配制 TPY 液体培养基,接种体积分数为 2% 的青春双歧杆菌,于 37 °C 恒温条件下培养 20 h,经过 2~3 次传代活化后离心(4 000 r/min, 4 °C, 15 min),将收集到的菌体用质量分数 0.9% 无菌生理盐水洗涤 2 遍,离心后收集,以无菌生理盐水配制成一定浓度菌悬液备用。

1.2.2 内源乳化法制备微胶囊流程

微胶囊制备流程参考 Poncelet 等^[23]的方法并进行优化:取同等质量的海藻酸钠与乳清蛋白并将其分别配制成液体,各取 10 mL 后加入 10 mL 菌悬液,将碳酸钙粉末与两倍质量的海藻酸钠与其混合均匀得到混合液,再将其加入到含有一定量(0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL)吐温 80 的大豆油中搅拌一段时间,加入 200 μL 冰醋酸,30 min 后,加入醋酸盐溶液(pH 值 5.5)并缓慢搅拌,待凝胶成型的微胶囊沉降到溶液底部后吸去油相,收集微胶囊并洗涤 2 次,去除剩余油相和表面菌体,最后将收集到的微胶囊保存在 4 °C 生理盐水中备用。

1.2.3 微胶囊包埋率的测定

将 0.1 g 微胶囊放入到 20 mL 解囊液中, 在 37 ℃ 180 r/min 的条件下, 于恒温培养箱中解崩并吸取 1 mL 样品进行稀释并涂布, 经培养箱培养后计数, 测得微胶囊中包埋活菌数 (cfu/mL) [24]。

$$E = \frac{C_1}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

E ——微胶囊包埋率, %;

C_0 ——起始添加活菌数, cfu/mL;

C_1 ——微胶囊中包埋活菌数, cfu/mL。

1.2.4 单因素试验制备微胶囊

1.2.4.1 海藻酸钠浓度对微胶囊包埋率的影响

在水相油相体积比为 1:3, 吐温 80 添加量为 0.6 mL, 搅拌速度为 400 r/min, 乳化时间为 15 min, 海藻酸钠添加量为 1%、2%、3%、4%、5% (m/m) 的条件下, 参照 1.2.2 制备方法, 以微胶囊包埋率为测定指标, 探究海藻酸钠添加量对微胶囊包埋率的影响。

1.2.4.2 水相油相体积比对微胶囊包埋率的影响

在海藻酸钠添加量为 2% (m/m), 吐温 80 添加量为 0.6 mL, 搅拌速度为 400 r/min, 乳化时间为 15 min, 水相油相体积比为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 的条件下制备微胶囊, 探究水相油相体积比对微胶囊包埋率的影响。

1.2.4.3 吐温 80 添加量对微胶囊包埋率的影响

在海藻酸钠添加量为 2% (m/m), 水相油相体积比为 1:3, 搅拌速度为 400 r/min, 乳化时间为 15 min, 吐温 80 添加量为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的条件下制备微胶囊, 探究吐温 80 添加量对微胶囊包埋率的影响。

1.2.4.4 搅拌速度对微胶囊包埋率的影响

在海藻酸钠添加量为 2% (m/m), 水相油相体积比为 1:3, 吐温 80 添加量为 0.6 mL, 乳化时间为 15 min, 搅拌速度为 200、400、600、800、1 000 r/min 的条件下制备微胶囊, 探究搅拌速度对微胶囊包埋率的影响。

1.2.4.5 乳化时间对微胶囊包埋率的影响

在海藻酸钠添加量为 2% (m/m), 水相油相体积比为 1:3, 吐温 80 添加量为 0.6 mL, 搅拌速度为 400 r/min, 乳化时间为 5、10、15、20、25 min 的条件下制备微胶囊, 探究乳化时间对微胶囊包埋率的影响。

1.2.5 响应面试验设计

在单因素试验的基础上, 对影响微胶囊包埋率的 3 个主要因素 (藻酸钠添加量、吐温 80 和搅拌速度) 进行了 Box-Behnken 响应面优化试验。Box-Behnken 试验设计与结果见表 1, 采用 Design-Expert 软件进行回归模型分析。

表 1 青春双歧杆菌微胶囊制备工艺响应面试验因素水平表

Table 1 *Bifidobacterium adolescentis* preparation of microcapsules factor level table

因素	水平		
	-1	0	1
海藻酸钠添加量/(%, m/m)	2	3	4
吐温 80 添加/mL	0.4	0.6	0.8
搅拌速度/(r/min)	200	400	600

1.2.6 微胶囊耐酸性试验

模拟人工胃液^[25]的配制: 准确配制浓度为 1 mol/L 稀盐酸溶液, 取稀盐酸 16.4 mL, 加入适量的无菌去离子水稀释, 使 pH 值达到 2.5, 再加入胃蛋白酶 10 g, 加适量的去离子无菌水搅拌均匀后加水至 1 L, 将制备好的溶液通过 0.22 μm 微孔滤膜, 进行过滤除菌, 备用。

称取 1.0 g 微胶囊置于 9 mL 人工胃液中, 于 37 ℃ 100 r/min 水浴摇床中震荡温育, 在 0、30、60、90 和 120 min 时分别离心收集取样, 活菌计数, 同时以 1 mL 未微胶囊化的青春双歧杆菌菌悬液作对照实验^[26]。

1.2.7 微胶囊肠溶性试验

模拟人工肠液^[25]的配制: 准确称取 KH_2PO_4 6.8 g, 加入适量的去离子无菌水充分溶解, 加入 NaOH 调节 pH 值 6.8, 再加入胰蛋白酶 10 g, 加水至 1 L, 将制备好的溶液过 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤除菌, 备用。

称取 1.0 g 微胶囊置于 9 mL 人工肠液中, 水浴摇床中震荡温 (37 ℃, 100 r/min), 分别于 0、30、60、90、120 min 时采用涂布平板法进行活菌计数^[27]。

1.2.8 微胶囊在 4 ℃ 的贮藏稳定性试验

于 4 ℃ 下将微胶囊置于瓶中贮藏, 每隔 7 d 取样并对微胶囊活菌数进行计数, 以检测微胶囊稳定性, 同时以未包埋的青春双歧杆菌作对照试验。

1.2.9 数据处理

所有数据均为 3 次独立重复试验的结果, 利用 Excel 和 Design Expert 8.0.6 软件进行试验数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 海藻酸钠添加量对微胶囊包埋率的影响

如图 1 所示, 当海藻酸钠添加量小于 2% (m/m) 时, 微胶囊包埋率呈逐渐上升趋势, 当海藻酸钠添加量为 2% (m/m) 时包埋率达到最高为 80.77%, 继续增加海藻酸钠添加量, 包埋率显著降低, 添加量为 4% (m/m) 时微胶囊包埋率与添加量为 1% (m/m) 时无显著差异 ($P > 0.05$), 添加量为 5% 时包埋率显著低于

其他处理 ($P < 0.05$), 说明海藻酸钠添加量为 2% (m/m) 时效果最好。这与董阳等^[27]对高吸附铅乳酸菌微胶囊化的研究结果相似: 当海藻酸钠添加量处在一个较低范围时, 随着海藻酸钠的质量分数越来越高, 交联形成的凝胶网络结构越来越紧密, 从而使更多的芯材被包裹, 体现为包埋率的显著升高; 当海藻酸钠添加量继续增加时, 凝胶网络结构的空隙无法容纳更多芯材, 反而给试验操作带来困难, 混合液粘度变高, 磁力搅拌效果变差导致乳化过程无法进行或变差, 体现为包埋率的显著降低。因此, 单因素试验确定海藻酸钠添加量为 2% (m/m)。

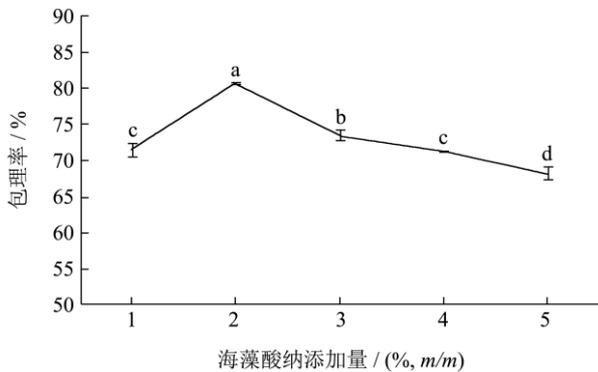


图1 海藻酸钠浓度对微胶囊包埋率的影响

Fig.1 Effect of alginate concentration on microencapsulation rate

注: 不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$),

下同。

2.1.2 水相油相体积比对微胶囊包埋率的影响

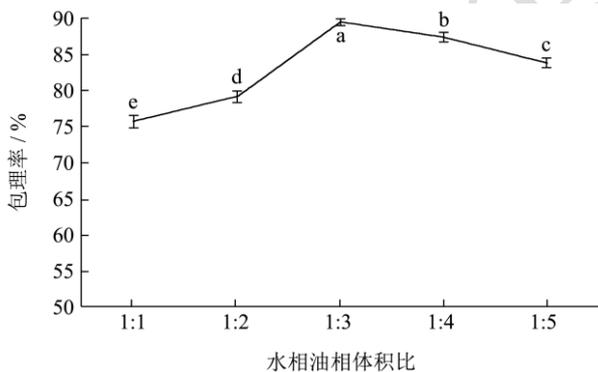


图2 水相油相体积比对微胶囊包埋率的影响

Fig.2 Effect of volume ratio of water phase to oil phase on embedding rate of microcapsules

如图2所示, 微胶囊包埋率随水油体积比的减小而呈现先增后降的趋势。水相油相体积比在 1:1~1:3 范围时, 随着油相的占比越来越大, 包埋率显著升高 ($P < 0.05$); 当水相油相体积比达到 1:3 时, 包埋率达到最大值为 89.52%; 当油相占比继续增大时, 包埋率反而降低。这与李宜春^[28]、张国芳^[29]对内源乳化法制备益生菌及双干酪乳杆菌微胶囊的研究结果相似:

当油相占比较低时, 单位体积豆油中含海藻酸钠量少, 空间中的海藻酸钠较为分散, 在经过充分搅拌乳化后更易形成较小的分散液滴, 体现为制得的微胶囊粒径小, 这就使得部分菌体裸露在结构外, 导致微胶囊的包埋率低, 随着油相的占比升高, 更多的菌体被包裹进来, 包埋率显著上升; 但当油相占比继续升高, 单位体积豆油中含海藻酸钠过高, 过多的菌体进入囊结构中导致囊壁变薄, 在后续的搅拌过程中容易致使结构破裂从而体现为包埋率的显著下降。因此, 单因素试验确定水相油相体积比为 1:3。

2.1.3 吐温 80 添加量对微胶囊包埋率的影响

如图3所示, 随着吐温 80 的添加量逐渐增加, 微胶囊包埋率呈现先升高后降低的趋势。当吐温 80 添加量在 0.2~0.6 mL 时, 微胶囊包埋率由 69.86% 增至 85.10%, 此后随着吐温 80 添加量逐渐增多, 包埋率呈现显著降低趋势 ($P < 0.05$)。出现这种现象的原因主要是: 吐温 80 通过降低水相油相界面张力, 使得海藻酸钠和乳清蛋白体系更好的分散在豆油中。当其处于较低范围内时, 随着吐温 80 添加量的逐渐增加, 体系中界面张力逐渐减小, 体现为微胶囊呈球形好且粒径适中; 但当吐温 80 添加量继续增加, 体系界面张力不再受其添加量影响, 反而导致溶液中水相油相空间被挤压, 导致微胶囊结构被压缩, 体现为包埋率的显著降低。这与王庆卫^[30]的研究结果相似。因此, 单因素试验确定吐温 80 添加量为 0.6 mL。

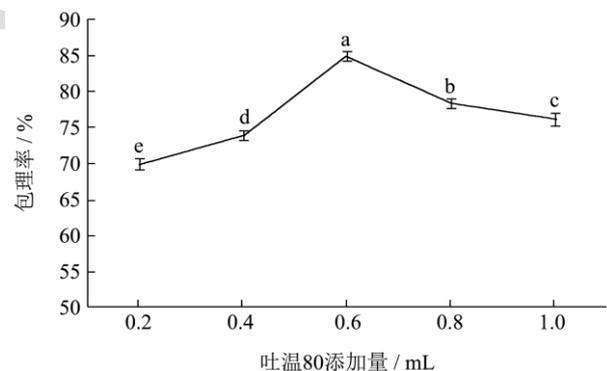


图3 吐温 80 添加量对微胶囊包埋率的影响

Fig.3 Effect of Tween 80 addition on microcapsule embedding rate

2.1.4 搅拌速度对微胶囊包埋率的影响

如图4所示, 搅拌速度为 400 r/min 时微胶囊包埋率最高为 84.74%。当搅拌速度小于 400 r/min 时, 随着搅拌速度的升高, 包埋率呈现增大趋势; 当搅拌速度为 400 r/min 时, 包埋率达到最大, 但随着搅拌速度继续升高, 包埋率反而显著降低 ($P < 0.05$)。这与 Silva 等^[31]的研究结果一致: 过低的搅拌速度使得乳化过程不够充分, 因而产生絮状物沉淀, 导致成囊

性差、球间粘连严重；搅拌速度过高时微胶囊中混入的空气过多，致使菌的存活率降低，体现为微胶囊包埋率的显著降低。因此，单因素试验确定搅拌速度为400 r/min。

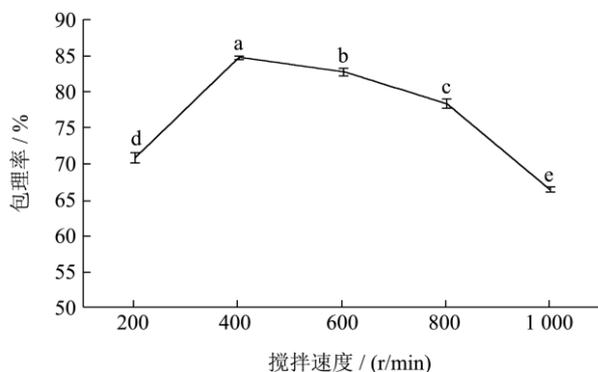


图4 搅拌速度对微胶囊包埋率的影响

Fig.4 Effect of the stirring speed on encapsulation rate of microcapsules

2.1.5 乳化时间对微胶囊包埋率的影响

如图5所示，随着乳化时间的延长，微胶囊包埋率呈现先增长后降低的趋势。当乳化时间为5~15 min时，微胶囊包埋率呈现增高趋势，乳化时间为15 min时包埋率达到最高值为84.43%；随着乳化时间的不断增加，包埋率不增反降，5 min后的包埋率下降至74.21%，降低了10.22%；其原因是当乳化时间逐渐增加，囊壁机械强度逐渐增强，体现为包埋率的逐渐上升；但当乳化时间过长则会导致破乳现象的发生，从而降低包埋率，这与阳晖等^[32]的研究结果相似。因此，单因素试验确定制备青春双歧杆菌微胶囊的乳化时间为15 min。

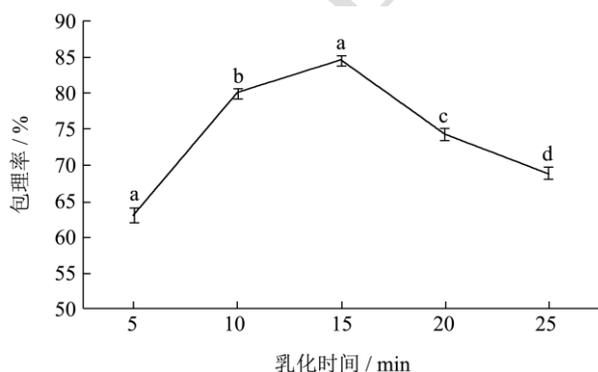


图5 乳化时间对微胶囊包埋率的影响

Fig.5 Effect of emulsification time on encapsulation rate of microcapsules

2.2 响应面实验

2.2.1 回归方程的建立及方差分析

根据单因素试验结果，对影响包埋率的3个主要

因素（海藻酸钠添加量、吐温80添加量和搅拌速度）进行响应面优化，试验设计与结果见表2。通过数据分析得到响应值包埋率（Y）对海藻酸钠添加量（A）、吐温80添加量（B）和搅拌速度（C）的二次多项式回归模型：

$$Y=83.12-0.98A-0.79B+0.96C-0.37AB-0.11AC+0.34BC-4.69A^2-3.54B^2-3.27C^2$$

表2 响应面实验设计及结果

Table 2 Experiment design and results of response surface

编号	海藻酸钠添加量/(%, m/m)	吐温80添加体积/mL	搅拌速度/(r/min)	包埋率/%
1	0	-1	1	77.17
2	1	1	0	72.43
3	1	0	-1	73.11
4	1	0	1	75.23
5	0	0	0	84.41
6	0	0	0	82.59
7	0	0	0	83.04
8	-1	0	-1	74.86
9	1	-1	0	75.39
10	-1	0	1	77.43
11	0	-1	-1	76.38
12	-1	1	0	75.12
13	0	1	-1	74.75
14	0	0	0	82.55
15	0	1	1	76.91
16	0	0	0	83.01
17	-1	-1	0	76.61

由表3可知，该模型表现为极显著（ $P<0.0001$ ），失拟项不显著， $R^2=0.9853$ ， $R^2_{Adj}=0.9663$ ，表明拟合度佳，可用于本试验预测。在回归模型中，一次项（A、B、C）对包埋率有显著影响，二次项（ A^2 、 B^2 、 C^2 ）对包埋率有极显著影响，对包埋率大小的影响为：海藻酸钠添加量>搅拌速度>吐温80添加量。

2.2.2 响应面及等高线分析结果

图6所示为海藻酸钠添加量与吐温80添加量对青春双歧杆菌微胶囊包埋率的影响以及二者之间的交互作用，当海藻酸钠添加量一定时，包埋率随着吐温80添加量增加呈先升后降的趋势；当吐温80添加量一定时，包埋率随着海藻酸钠添加量增加呈先升后降的趋势，海藻酸钠添加量的上升明显比吐温80添加量的上升陡峭，说明海藻酸钠添加量比吐温80添加量对微胶囊包埋率的影响大。

表 3 以青春双歧杆菌包埋率为响应值的回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis for the established regression mode for encapsulation rate of *Bifidobacterium adolescentis*

方差分析	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	233.29	9	25.92	52.05	<0.000 1	**
海藻酸钠添加量 A	7.72	1	7.72	15.51	0.005 6	*
吐温 80 添加量 B	5.02	1	5.02	10.09	0.015 6	*
搅拌速度 C	7.30	1	7.30	14.65	0.006 5	*
AB	0.54	1	0.54	1.08	0.332 3	
AC	0.051	1	0.051	0.1	0.759 2	
BC	0.47	1	0.47	0.94	0.364 1	
A ²	92.57	1	92.57	185.86	<0.000 1	**
B ²	52.88	1	52.88	106.17	<0.000 1	**
C ²	45.13	1	45.13	90.61	<0.000 1	**
残差	3.49	1	0.50			
失拟项	1.20	1	0.40	0.70	0.600 3	不显著
纯误差	2.29	1	0.57			
总和	236.78	16				

注: $R^2=0.985\ 3$, $R^2_{Adj}=0.966\ 3$; *表示影响显著 ($P<0.05$); **表示影响极显著 ($P<0.01$)。

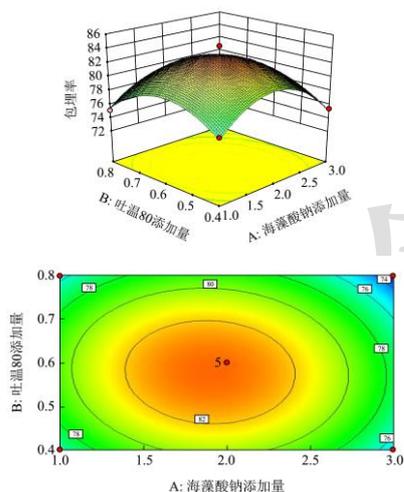


图 6 海藻酸钠添加量和吐温 80 添加量对微胶囊包埋率的影响

Fig.6 Effect of alginate concentration and Tween 80 addition on the encapsulation rate of microcapsules

图 7 所示为海藻酸钠添加量与搅拌速度对青春双歧杆菌微胶囊包埋率的影响以及二者之间的交互作用,当海藻酸钠添加量一定时,包埋率随着搅拌速度增加呈先升后降的趋势;当搅拌速度一定时,包埋率随着海藻酸钠添加量增加呈先升后降的趋势,海藻酸钠添加量的上升明显比搅拌速度的上升陡峭,说明海藻酸钠添加量比搅拌速度对微胶囊包埋率的影响大。

图 8 所示为吐温 80 添加量与搅拌速度对青春双歧杆菌微胶囊包埋率的影响以及二者之间的交互作用,当吐温 80 添加量一定时,包埋率随着搅拌速度增加呈先升后降的趋势;当搅拌速度一定时,包埋率随着吐温 80 添加量增加呈先升后降的趋势,搅拌速度的上升

明显比吐温 80 的上升陡峭,说明搅拌速度比吐温 80 添加量对微胶囊包埋率的影响大。

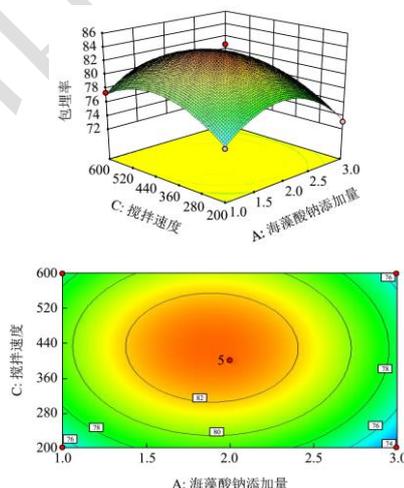


图 7 海藻酸钠添加量和搅拌速度对微胶囊包埋率的影响

Fig.7 Effect of alginate concentration and stirring speed on the encapsulation rate of microcapsules

根据 Design-Expert 分析得到的最优工艺条件为:海藻酸钠添加量为 1.90% (m/m),吐温 80 添加量为 0.58 mL,搅拌速度为 428.47 r/min,此条件下期望包埋率为 83.28%。为确定最佳工艺条件,运用响应面对回归方程进行最优解分析,得到最佳工艺参数为:海藻酸钠添加量为 1.90% (m/m),吐温 80 添加量为 0.58 mL,搅拌速度为 428.47 r/min,此条件下,期望包埋率为 83.28%。考虑到实际可操作性,将工艺参数修正为海藻酸钠添加量为 2.0% (m/m),吐温 80 添加量为 0.6 mL,搅拌速度为 430 r/min。进行 3 次验证

试验后,微胶囊包埋率平均值为 83.05%。与预测结果基本吻合,表明所建模型准确、可行。

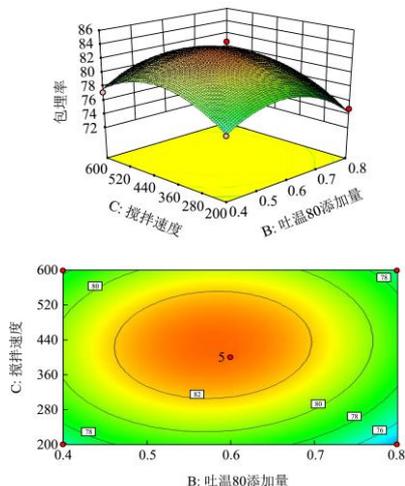


图 8 吐温 80 添加量和搅拌速度对微胶囊包埋率的影响

Fig.8 Effect of Tween 80 addition and stirring speed on the encapsulation rate of microcapsules

2.3 微胶囊在模拟人工胃液的耐受性

从图 9 中可以看出随着时间的增长,未包埋和包埋后的菌体存活率都呈现下降的趋势,未包埋的青春双歧杆菌下降速度较快,当 120 min 后,下降至 30.28%,而包埋后的青春双歧杆菌下降速度较平缓,当 120 min 后,下降至 69.07%。当在胃液停留时长达 180 min 后,未包埋的青春双歧杆菌存活率为 16.05%,而包埋后的青春双歧杆菌的存活率为 59.89%。元博^[33]通过对制备嗜酸乳杆菌及双歧杆菌微胶囊的研究发现:在胃酸环境下,包埋后的微胶囊菌体存活率更高,达到 70% 以上。这与本试验结果基本相同,试验表明:青春双歧杆菌微胶囊在 pH 值较低的人工模拟胃酸环境中具有较高的抵抗能力且能够维持有效菌的存活率,说明微胶囊对其有较好的保护作用。

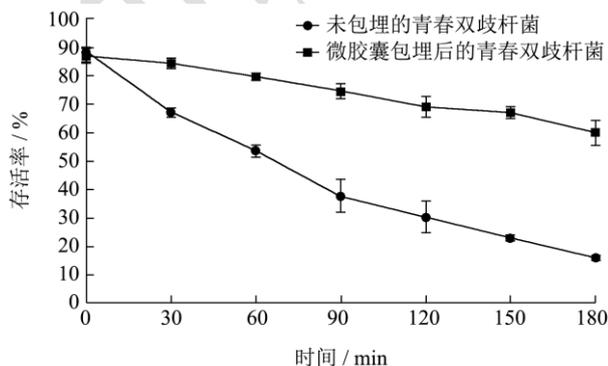


图 9 青春双歧杆菌微胶囊在模拟胃液中的活菌数变化

Fig.9 Survivability curves of encapsulated and non-encapsulated *Bifidobacterium adolescentis* in simulated gastric juice

2.4 微胶囊在模拟人工肠液的耐受性

从图 10 中可以看出,经过包埋后的青春双歧杆菌微胶囊在 30 min 后进入崩解,且菌体存活率始终维持在较高水平,说明青春双歧杆菌微胶囊具有良好的肠溶性且对青春双歧杆菌具有保护作用;未包埋青春双歧杆菌在肠液环境下 180 min 后菌体存活率为 24.24%,远低于经过包埋处理的青春双歧杆菌微胶囊,这与 Meng 等^[34]的研究结果相一致:经微胶囊化的菌体在模拟人工肠液中能够保持较高的数量级。

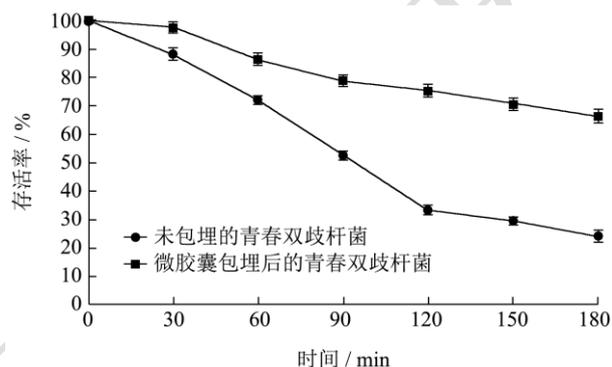


图 10 青春双歧杆菌微胶囊在模拟肠液中的活菌数变化

Fig.10 Dissolution of encapsulated *Bifidobacterium adolescentis* in simulated intestinal fluid

2.5 微胶囊贮藏稳定性试验

由图 11 可知,随着储藏时间的延长,未微胶囊化的青春双歧杆菌和胶囊化的青春双歧杆菌两种样品中的存活率都呈现下降趋势。未微胶囊化的青春双歧杆菌在 4 °C 下贮藏 42 d 后存活率下降到 43.63%;而经过微胶囊技术包埋的青春双歧杆菌在储存了 42 d 后存活率可达 56.83%,充分说明微胶囊化能够有效减少内部青春双歧杆菌受氧气以及其他外界不利环境等的影响,稳定其有效活菌数量,充分保留了菌体功能性^[35]。

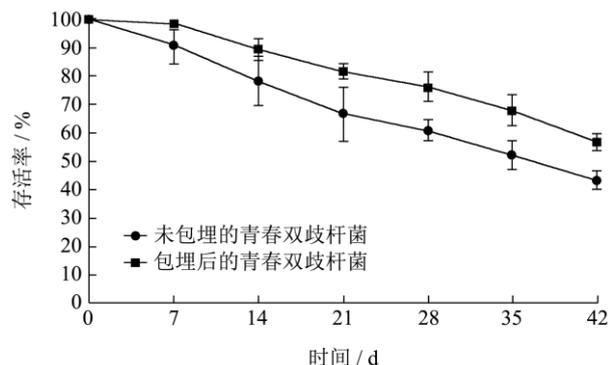


图 11 未包埋与包埋的青春双歧杆菌微胶囊在 4 °C 下的储藏稳定性

Fig.11 Storage life of encapsulated and non-encapsulated *Bifidobacterium adolescentis* at 4 °C

3 结论

本研究采用内源乳化法, 确定制备青春双歧杆菌微胶囊的最佳条件为: 海藻酸钠质量分数 2%, 吐温 80 添加量 0.6 mL, 搅拌速度 430 r/min, 制得微胶囊包埋率为 83.05%。试验表明通过内源乳化法包埋青春双歧杆菌可制备出粒径均一、包埋率高的微胶囊。

本试验制得的青春双歧杆菌微胶囊在人工胃液环境中存放 180 min 后仍有 59.89% 的存活率; 在人工肠液环境下 30 min 后崩解且存活率始终维持在较高水平; 在 4 °C 下贮藏 42 d 后, 微胶囊化青春双歧杆菌相较未包埋处理的菌体存活率提高 13.20%。因此, 通过内源乳化法制备的微胶囊可显著提高青春双歧杆菌的耐酸性与肠溶性, 且具有良好的贮藏稳定性。

本试验通过对青春双歧杆菌进行微胶囊化, 充分保留了菌种在酸性环境及外部复杂环境下的存活率, 保证了菌种的功能性, 为日后开展青春双歧杆菌体外功能性研究提供了思路。

参考文献

- [1] Greice Carine Raddatz, Gabriela Poletto, Cassandra de Deus, et al. Use of prebiotic sources to increase probiotic viability in pectin microparticles obtained by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying [J]. Food Research International, 2020, 130: 1-8.
- [2] XU Shujie, WANG Qi, WANG Fei, et al. Improved immune function of Chinese soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*) through oral probiotics via the TLR signaling pathway [J]. Aquaculture, 2022, 555: 1-9.
- [3] Ranjha Muhammad Modassar Ali Nawaz, Shafique Bakhtawar, Batool Maria, et al. Nutritional and health potential of probiotics: a review [J]. Applied Sciences, 2021, 11(23): 1-21.
- [4] Maria Mc, Cinzia C, Maria Cv, et al. Functional foods as carriers for synbio, a probiotic bacteria combination [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 167: 346-352.
- [5] 蔡涛,王丹,宋志祥,等.微胶囊的制备技术及其国内应用进展[J].化学推进剂与高分子材料,2010,8(2):20-26.
- [6] LIN Derong, XIAO Lijuan, LI Suqing, et al. Effects of fructooligosaccharide and soybean protein isolate in the microencapsulation of walnut oil [J]. Industrial Crops & Products, 2022, 177: 1-11.
- [7] 田文静,孙玉清,刘小飞,等.益生菌微胶囊技术及其在食品中的应用研究进展[J].食品工业科技,2019,40(16):354-362.
- [8] Zhou W, Zhang H, Liu Y, et al. Preparation of calcium alginate/polyethylene glycol acrylate double network fiber with excellent properties by dynamic molding method [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 226: 1-10.
- [9] Fioramontis A, Stepanic E M, Tibaldo A M, et al. Spray dried flaxseed oil powdered microcapsules obtained using milk whey proteins-alginate double layer emulsions [J]. Food Research International, 2019, 119: 931-940.
- [10] 袁晓露,李宝霞,黄雅燕,等.海藻酸钠微囊的制备及应用进展[J].化工进展,2022,41(6):3103-3112.
- [11] Liu Z, Chen X, Guo H. Preparation and properties of a novel sodium alginate microcapsule [J]. Journal of Physics: Conference Series, 2021, 1893(1): 1-9.
- [12] Pasin B L, Azón C G, Garriga A M. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones [J]. Revista Venezolana de Cienciay Tecnología de Alimentos, 2012, 3(1): 130-151.
- [13] 蔡赛波.唾液乳杆菌微胶囊制备工艺的研究[D].昆明:昆明理工大学,2021.
- [14] Holkem A T, Raddatz G C, Nunes G L, et al. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium BB-12* produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 71: 302-308.
- [15] Krasaekoopt W, Bhandari D, Deeth H. Evaluation of encapsulate on techniques of probiotics for yoghurt [J]. International Dairy Journal, 2003, 13(1): 3-13.
- [16] Yu Huang, Xiaole Xiang, Xiaoying Luo, et al. Study on the emulsification and oxidative stability of ovalbumin-pectin-pumpkin seed oil emulsions using ovalbumin solution prepared by ultrasound [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 78: 1350-4177.
- [17] Sibeles Santos Fernandes, Leonardo Greque, Maria de Fatima C, et al. Effect of the spray drying conditions on the physicochemical and structural characteristics and the stability of chia oil microparticles [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2021, 138(39): 1-14.
- [18] Witczak T, A Stpień, Gumul D, et al. The influence of the extrusion process on the nutritional composition, physical properties and storage stability of black chokeberry pomaces [J]. Food Chemistry, 2020, 334: 1-10.
- [19] 吴玲玲,张慤,刘亚萍.锐孔法制备谷氨酸钠微胶囊及其缓释性的研究[J].食品与生物技术学报,2019,38(8):104-111.
- [20] 李芳,陈艳君,高雷雷,等.灵芝孢子油微囊的制备工艺研究[J].广州化工,2021,49(15):104-107.

- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Poncelet D. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001, 944: 74-82.
- [24] Ozdemir N, Bayrak A, Tat T, et al. Microencapsulation of basil essential oil: utilization of gum arabic/whey protein isolate/maltodextrin combinations for encapsulation efficiency and *in vitro* release [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021, 15(2): 1865-1876.
- [25] Bermúdez-Quiñones G, Ochoa-Martínez L A, Gallegos-Infante J A, et al. Synbiotic microcapsules using agavins and inulin as wall materials for *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve*: viability, physicochemical properties, and resistance to *in vitro* oro-gastrointestinal transit [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(12): 1-11.
- [26] 刘月静,闫杨,王帅珂,等.鼠李糖乳杆菌肠溶性微胶囊的制备研究[J].聊城大学学报(自然科学版),2019,32(4):34-40.
- [27] 董阳,贺佳鑫,顾悦,等.高吸附铅乳酸菌的微胶囊化及特性[J].中国食品学报,2021,21(3):173-182.
- [28] 李宜春.内源乳化法益生菌微胶囊冻干菌粉的制备及其特性研究[D].烟台:烟台大学,2018.
- [29] 张国芳,王婷婷,刘丽波,等.内源乳化法制备干酪乳杆菌微胶囊[J].中国乳品工业,2017,45(3):15-20.
- [30] 王庆卫.内源乳化法制备双歧杆菌微胶囊的研究[D].无锡:江南大学,2014.
- [31] Silva C M, Ribeiro A J, Figueiredo M, et al. Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation [J]. Aaps Journal, 2006, 7(4): E903-E913.
- [32] 阳晖,蒋爱民.内源乳化法制备肠溶性嗜酸乳杆菌微胶囊的研究[J].食品研究与开发,2008,6:57-61.
- [33] 元博.高存活率益生菌微胶囊的制备及特性研究[D].烟台:烟台大学,2019.
- [34] Meng Z, Qu F, Sha C, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686: correlation between bacteria survivability and physical properties of microcapsules [J]. Food Biophysics, 2015, 10(3): 292-299.
- [35] Mille Yannick, Obert Jean-Philippe, Beney Laurent, et al. New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 88(1): 71-76.