

乳酸片球菌 HRQ-1 微胶囊的制备、优化及其体外评估

韩瑞琴^{1,2,3}, 徐松^{2,3*}, 王新元^{2,3,4}, 王敬敬^{2,3}, 张小霞^{2,3}, 杜丽平^{1*}, 黄志勇^{2,3}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300000

2 中国科学院天津工业生物技术研究所天津市工业生物系统与过程工程重点实验室, 天津 300000

3 国家合成生物学技术创新中心, 天津 300000

4 中国科学院大学, 北京 101408

韩瑞琴, 徐松, 王新元, 王敬敬, 张小霞, 杜丽平, 黄志勇. 乳酸片球菌 HRQ-1 微胶囊的制备、优化及其体外评估[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1415-1427.

HAN Ruiqin, XU Song, WANG Xinyuan, WANG Jingjing, ZHANG Xiaoxia, DU Liping, HUANG Zhiyong. Preparation, optimization, and *in vitro* evaluation of *Pediococcus acidilactici* HRQ-1 microcapsules[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1415-1427.

摘要: 为提高本课题组前期筛选得到的一株肠道益生菌——乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*) HRQ-1 的胃肠液耐受能力、运输储存稳定性以及缓慢释放性能, 本研究以乳酸片球菌为芯材, 海藻酸钠和壳聚糖为壁材, 采用挤压法制备乳酸片球菌微胶囊。通过单因素和正交试验确定乳酸片球菌微胶囊的最佳制备工艺条件, 并以包埋率、存活率、储存稳定性、肠胃液耐受性及释放速率为评定指标, 对乳酸片球菌微胶囊最佳配比进行研究。结果表明, 在乳酸片球菌微胶囊最佳包埋条件下, 包埋率达到(89.60±0.02)%; 在最佳的冻干保护剂配方条件下, 冻干存活率达到(76.42±0.13)%, 制得的微胶囊粒径平均值为(1.16±0.03) mm; 通过连续胃肠液模拟实验证实乳酸片球菌微胶囊活菌数得到保证且可在肠液中缓慢释放, 通过 4 °C 与室温储存过程活菌数量变化曲线可知制备该微胶囊可实现菌株有效活菌数的保障。本研究中乳酸片球菌微胶囊的制备配方与工艺为活菌药物制备提供技术支持。

关键词: 乳酸片球菌; 微胶囊; 配方工艺; 体外评估; 活菌药物

资助项目: 天津市科技计划(23YFYSHZ00050)

This work was supported by the Science and Technology Plan of Tianjin (23YFYSHZ00050).

*Corresponding authors. E-mail: DU Liping, dlp123@tust.edu.cn; XU Song, xu_s@tib.cas.cn

Received: 2024-07-23; Accepted: 2024-11-27; Published online: 2024-12-02

Preparation, optimization, and *in vitro* evaluation of *Pediococcus acidilactici* HRQ-1 microcapsules

HAN Ruiqin^{1,2,3}, XU Song^{2,3*}, WANG Xinyuan^{2,3,4}, WANG Jingjing^{2,3}, ZHANG Xiaoxia^{2,3}, DU Liping^{1*}, HUANG Zhiyong^{2,3}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300000, China

2 Tianjin Key Laboratory for Industrial Biosystems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300000, China

3 National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300000, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

Abstract: We have isolated an intestinal probiotic strain, *Pediococcus acidilactici* HRQ-1. To improve its gastrointestinal fluid tolerance, transportation and storage stability, and slow-release properties, we employed the extrusion method to prepare the microcapsules with *P. acidilactici* HRQ-1 as the core material and sodium alginate and chitosan as the wall material. The optimal conditions for preparing the microcapsules were determined by single factor and orthogonal tests, and the optimal ratio was determined by taking the embedding rate, survival rate, storage stability, gastrointestinal fluid tolerance, and release rate as the evaluation indexes. The results showed that under the optimal embedding conditions, the embedding rate reached $(89.60 \pm 0.02)\%$. Under the optimal formula of freeze-drying protective agent, the freeze-drying survival rate reached $(76.42 \pm 0.13)\%$, and the average size of the microcapsules produced was (1.16 ± 0.03) mm. The continuous gastrointestinal fluid simulation experiments confirmed that the microcapsules ensured the viable bacterial count and can slowly release bacteria in the intestinal fluid. The curve of the viable bacterial count during storage at 4 °C and room temperature indicated that the prepared microcapsules achieved strains' live number protection. The formula and preparation process of *P. acidilactici* microcapsules may provide a technological reserve for the preparation of more live bacterial drugs in the future.

Keywords: *Pediococcus acidilactici*; microcapsules; formula and process; *in vitro* evaluation; live bacterial drugs

肠道益生菌是一种足量给予时有益于宿主健康的活的微生物，主要定殖在人体的消化道中，特别是小肠和结肠中，能够保证肠道内微生态的平衡。口服给药因简单、成本低、效益高且消费者接受度更高，而成为益生菌控释给药的首选途径^[1]。益生菌的口服利用率较低，主要是受到肠道恶劣环境的影响，如温度、pH、胆汁盐、消化酶等^[2]。如何提高肠道益生菌的活菌数成为亟须解决的问题，为此科学家提出多种方法，其中微胶囊化技术是保护益生菌最

有效的方式之一^[3]。

微胶囊化技术是用合适的材料作为囊材，对囊心物质进行包埋和固定化的技术。将囊心物质包裹在里面以隔绝外界恶劣环境。利用微胶囊化技术制备的益生菌微胶囊可以将益生菌与肠道环境分隔开，具有耐酸、稳定性高、耐储存和携带方便等优点。且微胶囊的粒径通常从几 μm 到数百 μm 不等，微胶囊的粒径越大，载药量越大，比表面积越小，释放率越低^[4]。一般而言，益生菌的保质期较短，目前已有一

些有效的解决方法来延长益生菌保质期,如低温冷冻,这种方法能够保证益生菌存活数月^[5]。益生菌到达肠道时的细胞活力需要在 10^8 – 10^9 的范围内才可有效保证菌株的定殖^[6]。为有效保证益生菌的活力, Saarela 等^[7]采用冷冻干燥方法将益生菌转化为粉末,结果表明冻干粉在冷冻干燥后的存储时间以及在酸和胆汁盐暴露环境中的稳定性都有所提高。然而冷冻干燥会对生物体的细胞膜及其蛋白质造成严重损害,降低活菌数量,因此需要添加冷冻保护剂以减轻菌体损伤及失活^[8]。通常每种保护剂都有其自身的缺点,这些缺点可以由其他保护剂来弥补,因此可以根据一定的配方将几种保护剂混合在一起以获得更好的性能^[9]。

乳酸片球菌为高产乳酸的革兰氏阳性菌,细胞形态为球形,片球菌菌落的直径约为 1.5–2.5 mm,菌落表面平滑、呈圆形灰白色,常见于蔬菜和肉类食品中,对植物或动物不致病。乳酸片球菌具有独特的生理生化特性,如具有抑菌、肠炎治疗等多种功能^[10],是一种极具潜力的肠道益生菌,但是关于针对乳酸片球菌递送系统的研究并不多见,尤其是微胶囊的研发。

本研究针对乳酸片球菌,开发了一种高效包埋菌株并保持较高活性的微胶囊制备工艺,并通过单因素实验及正交实验对其制备工艺进行进一步优化。此外,还通过模拟胃肠液等实验评估了微胶囊储存稳定性及靶向递送性。本研究开发了一种高稳定性、高靶向性的乳酸片球菌微胶囊,为益生菌药物的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、无水乙酸钠(天津市大茂化学试剂厂);柠檬酸三铵(上海麦克林

生化科技有限公司);七水硫酸锰(天津市凯通化学试剂有限公司);七水硫酸镁(斯达威尔生物科技有限公司);葡萄糖、蔗糖(天津市风船化学试剂科技有限公司);牛肉膏、蛋白胨、酵母浸粉(北京奥博星生物技术有限责任公司);吐温 80(天津市博迪化工有限公司);海藻酸钠、壳聚糖(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);冰乙酸、胃蛋白酶、胰蛋白酶(上海麦克林生化科技股份有限公司);无水氯化钙(国药集团化学试剂有限公司);脱脂奶粉(上海源叶生物科技有限公司);甘油(天津西恩思生化科技有限公司);酪氨酸(北京普博欣生物科技有限责任公司);甘露醇(天津奥淇医药医药销售有限公司)。

菌株:乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*) HRQ-1,由中国科学院天津工业生物技术研究所应用微生物与微生态研究组从自然环境中筛选得到(保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,菌株保藏号:30585)。

MRS 液体培养基(1 L):磷酸氢二钾 2.0 g、柠檬酸三铵 2.0 g、无水乙酸钠 5.0 g、七水硫酸锰 0.25 g、七水硫酸镁 0.58 g、葡萄糖 20.0 g、蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 10.0 g、酵母浸膏 5.0 g、吐温 80 1 mL。调节 pH 为 6.2–6.4。配制固体培养基时需加入琼脂 20 g/L,115 °C 灭菌 30 min。

1.2 仪器与设备

电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);UV-1800 紫外分光光度计(岛津公司);高速冷冻离心机(热电公司);冷冻干燥机(Marin christ 公司);生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 乳酸片球菌生长曲线的测定

取乳酸片球菌在 MRS 培养基中进行复苏,调整培养基的初始 pH 值为 6.2,用无菌水洗涤

后以无菌操作按 5% (体积比)的接种量接种到 MRS 液体培养基中,置于 37 °C 恒温培养箱培养 72 h,以相应的空白培养基作为对照,每隔 6 h 用紫外分光光度计在 600 nm 下测定菌液的吸光度,并测定菌液的 pH。

1.3.2 乳酸片球菌微胶囊的制备

初始乳酸片球菌微胶囊制备工艺配方参考马航宇等^[11]的方法并略作调整。用 MRS 液体培养基发酵乳酸片球菌,发酵 24 h 后,8 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用无菌水等体积充分稀释;然后将稀释的菌体与 2% (质量体积比)海藻酸钠、冻干保护剂按照 2:2:1 的体积比充分搅拌,其中冻干保护剂的组成为 12% (质量体积比)脱脂奶粉、10% (体积比)甘油、13% (质量体积比)蔗糖、4% (质量体积比)甘露醇、0.8% (质量体积比)酪氨酸。由于壳聚糖在低 pH 下溶解,高 pH 下不溶解^[12],为使壳聚糖完全溶解,在制备 0.8% (质量体积比)壳聚糖溶液时加入 1% (质量体积比)的冰乙酸^[13]配制浓度为 3% (质量体积比)的 CaCl_2 溶液,将壳聚糖溶液与 CaCl_2 溶液按照 1:1 的体积比混匀制备成 CaCl_2 -壳聚糖混合溶液。将菌泥-海藻酸钠-保护剂混合液通过 1 mL 管状注射器(平头针头)匀速滴入 CaCl_2 -壳聚糖混合溶液中形成湿状态的微胶囊,然后静置固化 1.5 h。用灭菌的蒸馏水充分洗涤湿微胶囊 3-5 次,洗去湿胶囊表面多余的菌液、固化液和壳聚糖包衣。随即在 -80 °C 冰箱预冻过夜,在冷冻干燥机中冷冻干燥 48 h 得到乳酸片球菌微胶囊颗粒。

1.3.3 微胶囊包埋剂单因素优化试验

海藻酸钠浓度对微胶囊包埋率的影响:在壳聚糖浓度为 0.8%, CaCl_2 浓度为 3%,固化时间为 0.5 h,海藻酸钠浓度分别为 1%、2%、3%、4%、5%的条件下制备微胶囊,以微胶囊的包埋率为评定指标。

CaCl_2 浓度对微胶囊包埋率的影响:在海藻酸钠浓度为 2%,壳聚糖浓度为 0.8%,固化时间为 0.5 h, CaCl_2 浓度分别为 1%、2%、3%、4%、5%的条件下制备微胶囊,以微胶囊的包埋率为评定指标。

壳聚糖浓度对微胶囊包埋率的影响:在海藻酸钠浓度为 2%, CaCl_2 浓度为 3%,固化时间为 0.5 h,壳聚糖浓度分别为 0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%的条件下制备微胶囊,以微胶囊的包埋率为评定指标。

固定时间对微胶囊包埋率的影响:在海藻酸钠浓度为 2%,壳聚糖浓度为 0.8%, CaCl_2 浓度为 3%,固化时间分别为 0、0.25、0.5、0.75、1 h 的条件下制备微胶囊,以微胶囊的包埋率为评定指标。

1.3.4 正交试验

在单因素试验的基础上,以海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、 CaCl_2 浓度、固化时间这 4 个因素为自变量,以包埋率为评价指标,采用正交试验优化制备微胶囊。

1.3.5 微胶囊冻干保护剂单因素优化试验

脱脂奶粉浓度对微胶囊存活率的影响:在甘油浓度为 10%,蔗糖浓度为 13%,甘露醇浓度为 4%,酪氨酸浓度为 0.8%,脱脂牛奶浓度分别为 10%、11%、12%、13%、14%的条件下制备微胶囊,以冻干后微胶囊存活率为评定指标。

甘油浓度对微胶囊存活率的影响:在脱脂奶粉浓度为 12%,蔗糖浓度为 13%,甘露醇浓度为 4%,酪氨酸浓度为 0.8%,甘油浓度分别为 8%、9%、10%、11%、12%、13%的条件下制备微胶囊,以冻干后微胶囊存活率为评定指标。

蔗糖浓度对微胶囊存活率的影响:在脱脂奶粉浓度为 12%,甘油浓度为 10%,甘露醇浓

度为 4%，酪氨酸浓度为 0.8%，蔗糖浓度分别为 11%、12%、13%、14%、15% 的条件下制备微胶囊，以冻干后微胶囊存活率为评定指标。

甘露醇浓度对微胶囊存活率的影响：在脱脂奶粉浓度为 12%，甘油浓度为 10%，蔗糖浓度为 13%，酪氨酸浓度为 0.8%，甘露醇浓度分别为 2%、3%、4%、5%、6% 的条件下制备微胶囊，以冻干后微胶囊存活率为评定指标。

酪氨酸浓度对微胶囊存活率的影响：在脱脂奶粉浓度为 12%，甘油浓度为 10%，蔗糖浓度为 13%，甘露醇浓度为 4%，酪氨酸浓度分别为 0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0% 的条件下制备微胶囊，以冻干后微胶囊存活率为评定指标。

1.3.6 微胶囊冻干保护剂正交试验

在单因素试验的基础上，以脱脂奶粉浓度、甘油浓度、蔗糖浓度、甘露醇浓度及酪氨酸浓度这 5 个因素为自变量，以存活率为评价指标，采用正交试验优化冻干保护剂制备微胶囊。

1.3.7 乳酸片球菌微胶囊粒径的测定

用游标卡尺随机选取 20 粒单菌株微胶囊，取平均值得到益生菌微胶囊的粒径分布情况。

1.3.8 乳酸片球菌微胶囊的表观特征

为进一步观察微胶囊表面特征及内部结构，使用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)对微胶囊进行表征。

1.3.9 微胶囊包埋率及存活率的测定

包埋率测定：以海藻酸钠为壁材的微胶囊可以在柠檬酸钠溶液中实现快速崩解^[14]。取 1 mL 菌泥制得的冻干前的微胶囊于 9 mL 3% 柠檬酸钠溶液中进行裂解，溶液置于 37 °C 水浴锅中水浴 30 min，然后在涡流振荡器上振荡 5 s，循环 2–3 次，直至完全裂解，取裂解液经适当稀释后进行平板活菌计数，计算公式如公式(1)所示：

$$\text{包埋率}(\%) = \frac{N}{M} \times 100 \quad (1)$$

其中：N 为冻干前微胶囊包埋的活菌数，单位为 CFU/mL；M 为初始菌泥的活菌数，单位为 CFU/mL。

存活率测定：同样的微胶囊在柠檬酸钠溶液中实现快速崩解，取 1 mL 菌泥制得的冻干后的微胶囊于 9 mL 3% 柠檬酸钠溶液中进行裂解，溶液置于 37 °C 水浴锅中水浴 30 min 然后在涡流振荡器上振荡 5 s，循环 3–5 次，直至完全裂解，取裂解液经适当稀释后进行平板活菌计数，计算公式如公式(2)所示：

$$\text{存活率}(\%) = \frac{S}{M} \times 100 \quad (2)$$

其中：S 为冻干后微胶囊的活菌数，单位为 CFU/mL；M 为初始菌泥的活菌数，单位为 CFU/mL。

1.3.10 体外模拟连续胃肠液释放实验

人工胃液、人工胰液及人工结肠液的配制参考 2020 版《中国药典》^[15]。微胶囊的制备参考任广钰^[16]的方法略作修改。取 1 mL 菌泥制成的微胶囊加入到 9 mL 胃液中，充分摇匀混合后置于 37 °C 摇床中，180 r/min 培养 2 h。每隔 1 h 吸取混合液经过适当的稀释后涂布在 MRS 固体培养基上，置于 37 °C 的恒温培养箱中厌氧培养 24 h 后进行活菌计数。收集胃液处理后的微胶囊加入 9 mL 肠液中，充分摇匀混合后置于 37 °C 摇床中，180 r/min 培养 4 h。每隔 2 h 吸取混合液，经过适当的稀释后涂布在 MRS 固体培养基上，置于 37 °C 的恒温培养箱中厌氧培养 24 h 后进行活菌计数。收集肠液处理后的微胶囊加入 9 mL 结肠液中，充分摇匀混合后置于 37 °C 摇床中 180 r/min 培养 18 h，每隔 3 h 吸取混合液，经过适当的稀释后涂布在 MRS 固体培养基上，置于 37 °C 的恒温培养箱中厌氧培养 24 h 后进行活菌计数。

1.3.11 储存稳定性

将冷冻干燥后微胶囊放置于离心管中, 将其分别置于 4 °C、25 °C 保藏 42 d。每隔 7 d 取出 1 mL 菌泥制成的冻干微胶囊颗粒加入 9 mL 3% 柠檬酸钠溶液中崩解进行活菌数测定。

2 结果与分析

2.1 乳酸片球菌培养过程中生长曲线及 pH 变化

为了解乳酸片球菌的生长变化, 在连续 72 h 中每隔 6 h 进行 OD_{600} 及 pH 测定。结合图 1 乳酸片球菌生长曲线的变化可知, 乳酸片球菌在 MRS 培养基中 37 °C 静置培养条件下, 42 h 时达到最大生长量。且由乳酸片球菌生长过程中 pH 曲线的变化可知, 菌株在生长过程中 pH 降低幅度较大, 推测乳酸片球菌生长过程中可产生大量酸性物质。

2.2 乳酸片球菌微胶囊包埋剂单因素优化实验结果

为明确海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、 $CaCl_2$ 浓度以及固化时间对微胶囊包埋率的影响, 进行了单因素实验。由图 2A 可知, 当海藻酸钠浓度小于 3% 时, 乳酸片球菌微胶囊的包埋率随

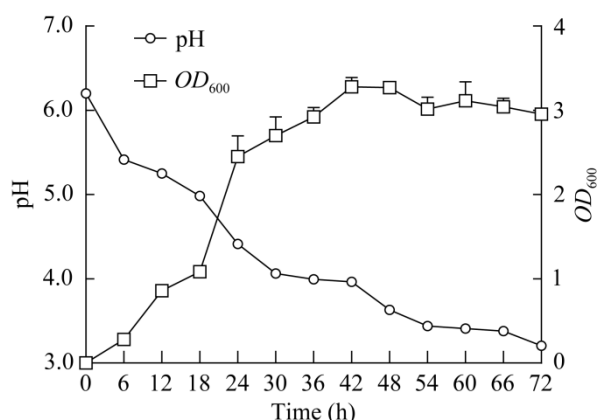


图 1 乳酸片球菌生长曲线及 pH 变化

Figure 1 Growth curves and pH changes of *Pediococcus acidilactici*.

着海藻酸钠浓度的增加而升高, 当海藻酸钠的浓度达到 3% 时, 乳酸片球菌的包埋率达到最高, 为 85.10%; 由图 2B 可知, 当壳聚糖的浓度小于 0.8% 时, 乳酸片球菌微胶囊的包埋率随着壳聚糖浓度的增加而升高, 当壳聚糖的浓度达到 0.8% 时, 乳酸片球菌的包埋率达到最高, 为 86.74%, 之后随着壳聚糖浓度的增加包埋率反而逐渐降低; 由图 2C 可知, 当 $CaCl_2$ 浓度小于 3% 时, 乳酸片球菌微胶囊的包埋率随着 $CaCl_2$ 浓度的增加而升高, 当 $CaCl_2$ 的浓度达到 3% 时, 乳酸片球菌的包埋率达到最高, 为 90.28%, 之后随着 $CaCl_2$ 浓度的增加包埋率逐渐降低; 由图 2D 可知, 当固化时间为 0.5 h 时, 乳酸片球菌的包埋率达到最高, 为 87.43%, 之后随着固化时间的增加包埋率逐渐降低。根据影响乳酸片球菌微胶囊包埋率的单因素实验, 得到乳酸片球菌微胶囊的最佳包埋条件为海藻酸钠浓度为 3%、壳聚糖浓度为 0.8%, $CaCl_2$ 浓度为 3%, 固化时间为 0.5 h, 将其作为后续正交实验的条件。

2.3 乳酸片球菌微胶囊包埋剂正交试验结果

以单因素试验中得到的以包埋率为指标, 制备微胶囊最佳条件进行正交试验(表 1), 采用四因素三水平正交分析法探究海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、 $CaCl_2$ 浓度、固化时间对乳酸片球菌微胶囊包埋率的影响, 以确定微胶囊制备的最佳条件。

由表 2 可知, 极差的大小顺序为 $A > D > B > C$, 即海藻酸钠浓度对微胶囊的包埋率的影响最大, 其次依次是固化时间、壳聚糖浓度、 $CaCl_2$ 浓度, K_1 、 K_2 、 K_3 中数值最大的为相应的水平中的最佳值, 因此 $A_2B_3C_1D_3$ 组合为制备乳酸片球菌微胶囊包埋的最佳条件, 即海藻酸钠浓度为 3%, 壳聚糖浓度为 1%, $CaCl_2$ 浓度为 2%, 固化时间为 0.75 h。经验证该条件下包埋率达

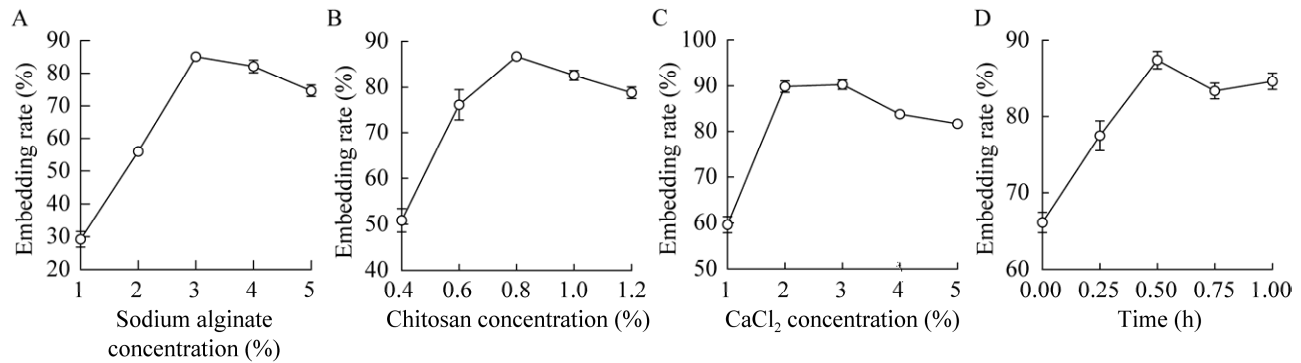


图 2 单因素对微胶囊包埋率的影响 A：海藻酸钠浓度对微胶囊包埋率的影响；B：壳聚糖浓度对微胶囊包埋率的影响；C：CaCl₂ 浓度对微胶囊包埋率的影响；D：固化时间对微胶囊包埋率的影响。

Figure 2 Effect of single factor on microcapsule embedding efficiency. A: Effect of sodium alginate concentration on microcapsule encapsulation efficiency; B: Effect of chitosan concentration on microcapsule encapsulation efficiency; C: Effect of CaCl₂ concentration on microcapsule encapsulation efficiency; D: Effect of curing time on microcapsule encapsulation efficiency.

表 1 正交试验优化制备微胶囊包埋剂因素水平

Table 1 Orthogonal experiments optimize the level of factors for the preparation of microcapsules				
Level	A	B	C	D
	Sodium alginate concentration (%)	Chitosan concentration (%)	CaCl ₂ concentration (%)	Curing time (h)
1	2	0.6	2	0.25
2	3	0.8	3	0.50
3	4	1.0	4	0.75

表 2 微胶囊包埋剂正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test of microcapsule embedding agent					
Experimental number	A	B	C	D	Survival rate (%)
1	1	1	1	1	29.69
2	1	2	2	2	35.22
3	1	3	3	3	44.63
4	2	1	2	3	86.29
5	2	2	3	1	78.05
6	2	3	1	2	85.27
7	3	1	3	2	70.27
8	3	2	1	3	86.55
9	3	3	2	1	79.34
K ₁	109.54	186.25	201.51	187.08	
K ₂	249.61	199.82	200.85	190.76	
K ₃	236.16	209.24	192.95	217.47	
k ₁	36.51	62.08	67.17	62.36	
k ₂	83.20	66.61	66.95	63.60	
k ₃	78.72	69.75	64.32	72.49	
R	46.69	7.66	2.85	10.13	
Best level	A ₂	B ₃	C ₁	D ₃	

到(89.60±0.02)%, 明显高于其他组合, 因此选择该条件作为后续存活率实验的前提。

2.4 乳酸片球菌微胶囊冻干保护剂单因素优化试验结果

从图 3A 中可知, 随着脱脂奶粉浓度的增加, 微胶囊的冻干存活率逐渐升高, 当脱脂奶粉浓度为 13% 时, 此时冻干存活率最高达到 75.91%, 随后即使脱脂奶粉浓度升高, 冻干存活率也并未继续提高; 图 3B 显示随着甘油浓度的增加, 微胶囊的冻干存活率逐渐升高, 当甘油浓度为 11% 时, 此时冻干存活率最高达到 71.03%, 之后随着甘油浓度的增加, 微胶囊的冻干存活率反而下降; 图 3C 表明, 随着蔗糖浓度的增加, 微胶囊的冻干存活率逐渐升高, 当蔗糖浓度为 14% 时, 此时冻干存活率最高达到 75.25%, 之后随着蔗糖浓度的增加, 微胶囊的冻干存活率反而下降; 由图 3D 可知, 随着甘露醇浓度的增加, 微胶囊

的冻干存活率逐渐升高, 当甘露醇浓度为 4% 时, 此时冻干存活率最高达到 70.33%, 之后随着甘露醇浓度的增加, 微胶囊的冻干存活率反而下降; 由图 3E 可以看出, 随着酪氨酸浓度的增加, 微胶囊的冻干存活率逐渐升高, 当酪氨酸浓度为 0.9% 时, 此时冻干存活率最高达到 61.55%, 之后随着甘油浓度的增加, 微胶囊的冻干存活率反而下降。根据影响乳酸片球菌微胶囊冻干存活率的单因素实验, 得到乳酸片球菌微胶囊的最佳冻干保护剂条件为 12% 脱脂奶粉、11% 甘油、14% 蔗糖、4% 甘露醇、0.9% 酪氨酸。

2.5 乳酸片球菌微胶囊冻干保护剂正交试验结果

为了进一步探究多保护剂复配条件下保护剂的最佳配比, 在单因素实验的结果基础上进行了正交实验, 正交试验因素表见表 3, 实验结果见表 4。

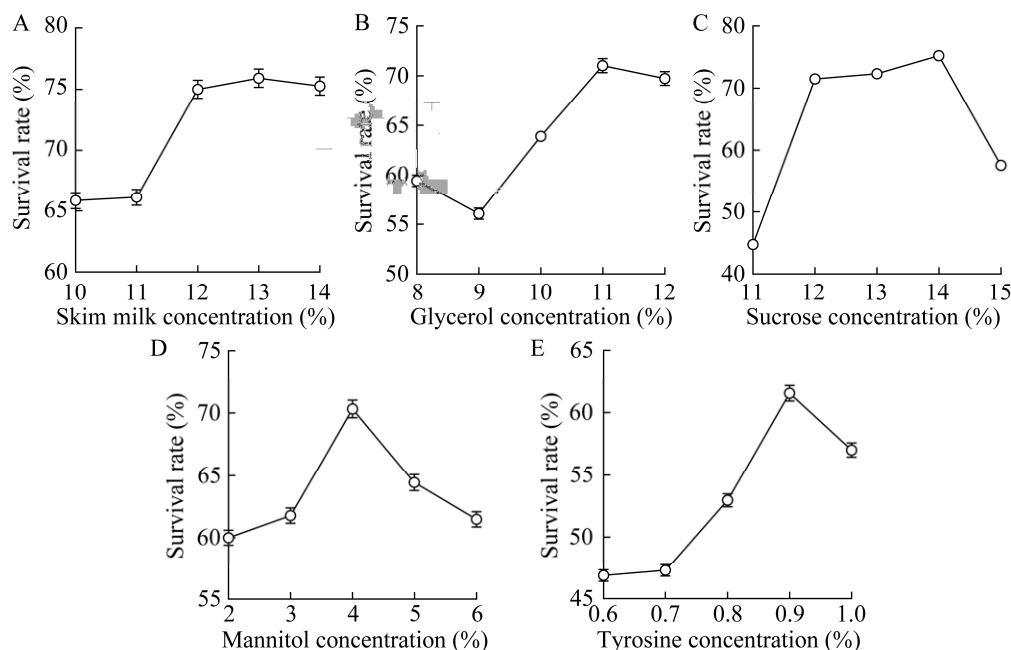


图 3 单因素对微胶囊存活率的影响 A: 脱脂奶粉浓度对微胶囊存活率的影响; B: 甘油浓度对微胶囊存活率的影响; C: 蔗糖浓度对微胶囊存活率的影响; D: 甘露醇浓度对微胶囊存活率的影响; E: 酪氨酸浓度对微胶囊存活率的影响。

Figure 3 Effect of single factor on the survival rate of microcapsules. A: Effect of skim milk powder concentration on microcapsule viability; B: Effect of glycerol concentration on microcapsule viability; C: Effect of sucrose concentration on microcapsule viability; D: Effect of mannitol concentration on microcapsule viability; E: Effect of tyrosine concentration on microcapsule viability.

由表 4 可知, 极差的大小顺序为 B>A>C>D=E, 即甘油浓度对微胶囊冻干存活率影响最大然后依次是脱脂奶粉浓度、蔗糖浓度、甘露醇浓度和酪氨酸浓度, k_1 、 k_2 、 k_3 中数值最大的为相应水平中的最优解, 因此 $A_2B_3C_2D_1E_1$ 组合为最佳的冻干保护剂配方, 即脱脂奶粉浓度为 13%、甘油浓度为 12%、蔗糖浓度为 14%、甘露醇浓度为 3%和酪氨酸浓度为 0.8%时微胶囊的冻干存活率最高, 经验证, 在该条件下, 微胶囊的冻干存活率达到 $(76.42\pm0.13)\%$ 。

表 3 正交试验优化制备微胶囊冻干保护剂因素水平
 Table 3 Orthogonal experiments optimize the factor levels of lyophilized protective agents for the preparation of microcapsules

Level	A Skim milk concentration (%)	B Glycerol concentration (%)	C Sucrose concentration (%)	D Mannitol concentration (%)	E Tyrosine concentration (%)
1	11	10	13	3	0.8
2	12	11	14	4	0.9
3	13	12	15	5	1.0

表 4 微胶囊冻干保护剂正交试验结果
 Table 4 Results of orthogonal test of microcapsule lyophilized protectants

Experimental number	A	B	C	D	E	Survival rate (%)
1	1	1	1	1	1	63.08
2	1	2	2	2	2	68.34
3	1	3	3	3	3	66.63
4	2	1	1	2	2	68.07
5	2	2	2	3	3	68.35
6	2	3	3	1	1	71.32
7	3	1	2	1	3	64.98
8	3	2	3	1	1	63.28
9	3	3	1	2	2	61.73
10	1	1	3	3	2	60.21
11	1	2	1	3	3	68.99
12	1	3	2	1	1	66.70
13	2	1	2	2	1	65.44
14	2	2	3	3	2	63.18
15	2	3	1	1	3	69.07
16	3	1	3	2	3	60.68
17	3	2	1	3	1	68.97
18	3	3	2	1	2	68.53
K ₁	196.97	191.23	199.96	200.04	199.40	
K ₂	202.72	200.56	201.17	198.07	195.03	
K ₃	194.09	201.99	192.65	195.67	199.35	
k ₁	65.66	63.74	66.65	66.68	66.47	
k ₂	67.57	66.85	67.06	66.02	65.01	
k ₃	64.69	67.33	64.22	65.22	66.45	
R	2.88	3.59	2.84	1.46	1.46	
Best level	A ₂	B ₃	C ₂	D ₁	E ₁	

2.6 乳酸片球菌微胶囊的粒径

用游标卡尺随机选择 20 粒益生菌微胶囊, 测量其粒径, 求得微胶囊粒径平均值为 (1.16 ± 0.03) mm。

2.7 乳酸片球菌微胶囊的表观特征

为了更好地认识微胶囊的表观和内部结构, 通过透射电镜进行观察, 通过图 4A 可以看出经过冻干后的微胶囊表面较为光滑, 切开后剖面图 4B 显示微胶囊内部由于冻干脱水, 内部疏松多孔。由此可知, 经过包埋和冻干优化, 益生菌能够很好地被芯材保护, 从而为其顺利通过胃肠道恶劣环境提供支撑。

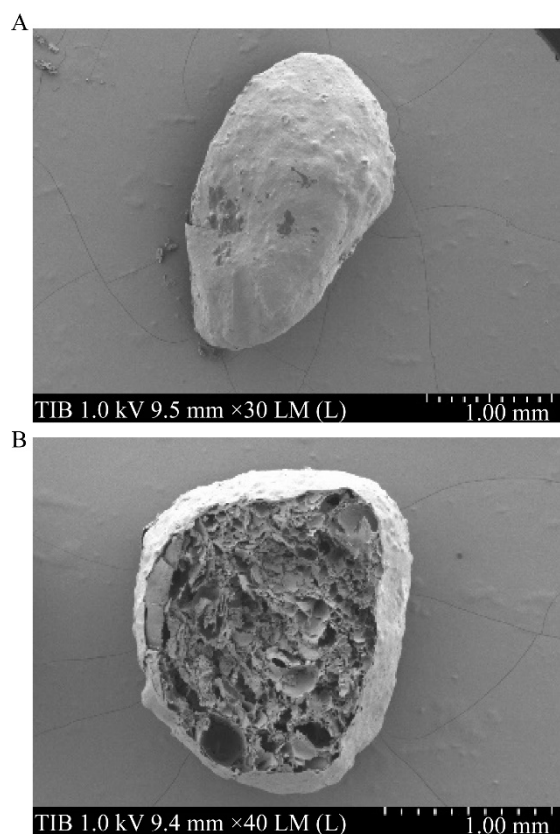


图 4 微胶囊的表观特征 A: 微胶囊表面图; B: 微胶囊剖面图。

Figure 4 Apparent characteristics of microcapsule. A: Macroscopic image of microcapsules; B: Surface image of microcapsules.

2.8 乳酸片球菌微胶囊的体外模拟耐受实验

模拟胃肠液耐受实验结果表明(图 5), 在实验中包埋的活菌数为 $11.20 \lg \text{CFU/mL}$ 的情况下, 在模拟胃液中 2 h 后, 益生菌仅释放出来 $2.45 \lg \text{CFU/mL}$, 在肠液中 4 h 后释放出的活菌数达到 $6.00 \lg \text{CFU/mL}$ 左右, 随着高 pH 条件下时间的延长, 益生菌释放的数量更多, 在结肠液中作用 18 h 后活菌释放量达到约 $10.00 \lg \text{CFU/mL}$ 。

从结果中可以看出, 由于海藻酸钠在低 pH 的条件下黏度较高, 内部结合得比较紧密, 益生菌不容易释放出来, 说明益生菌微胶囊中的大多数益生菌能够顺利通过胃部, 由于海藻酸钠在 pH 6–9 的较高条件下黏度较低, 内部结构比较疏松, 益生菌更容易释放出来, 在结肠液中 18 h 释放出的活菌数, 与在肠液中相比提高了约 4 个数量级。由此得出, 制备的这种益生菌微胶囊能够很好地满足靶向递送活菌药物的要求。

2.9 乳酸片球菌微胶囊的储存稳定性分析

为了评估益生菌微胶囊的储存稳定性, 将益生菌微胶囊分别在 4°C 和 25°C 的条件下储存 42 d, 每隔 7 d 进行 1 次活菌计数, 计数结果如图 6 所示。益生菌微胶囊在 4°C 下表现出

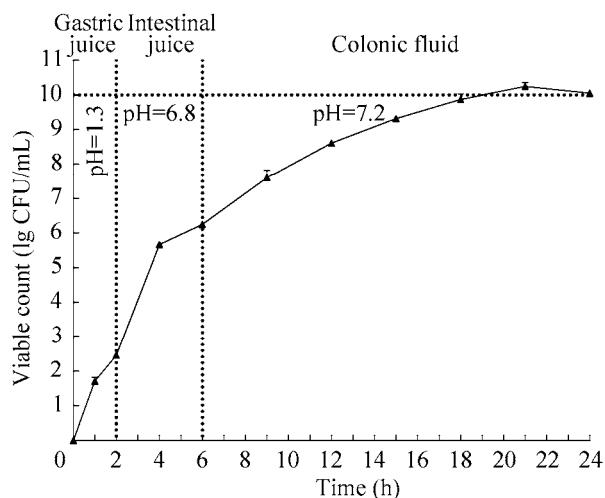


图 5 微胶囊模拟胃肠液耐受

Figure 5 Microcapsule simulated gastrointestinal fluid tolerance.

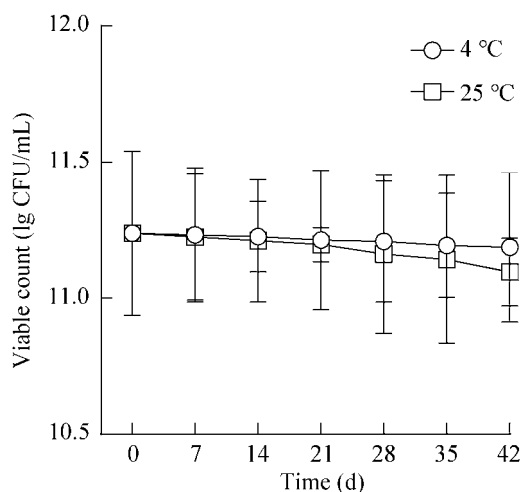


图6 乳酸片球菌微胶囊在4 °C和25 °C下的储存活菌数量变化

Figure 6 Storage stability of microcapsules at 4 °C and 25 °C.

最佳储存稳定性,随着储存时间的延长,微胶囊中的活菌数开始减少,在25 °C下储存的微胶囊的活菌数比4 °C下储存下降得快。

3 讨论与结论

本研究在关于微胶囊包埋剂的优化过程中发现,当海藻酸钠浓度过低时与CaCl₂形成的交联结构疏松、包埋率较低,浓度过高时由于溶液过于黏稠,不利于Ca²⁺移动与海藻酸钠结合,膜结构疏松,致密性较差,包埋率反而降低^[17];壳聚糖的存在可以提高海藻酸钠微胶囊的稳定性和耐受程度,壳聚糖的浓度能够影响成膜的厚度,浓度越大形成的膜结构越紧密,过多壳聚糖的存在增加了藻酸盐-壳聚糖键的形成,反而导致藻酸盐-CaCl₂壁孔隙率随着壳聚糖浓度的增加而降低^[18],这一结果与项郑昊等^[19]的研究结果相似。当交联剂浓度太低时,交联度不够,包埋不完全,内容物易流失,而交联剂浓度太高时,大量的Ca²⁺会竞争性争夺结合位点且多余的Ca²⁺会附着在胶囊表面进一

步阻碍壳聚糖与海藻酸钠的结合^[17],所以形成的空间网状结构疏松,包埋率下降;当固化时间过短时,交联反应还没有进行完全,交联结构还没有完全形成,交联结构疏松,包埋率较低,当固化反应进行完全时,此时再增加固化时间对交联结构也没有太大影响,反而交联时间延长使更多的Ca²⁺扩散到微胶囊中取代药物,从而减少了药物包封率^[20]。

关于乳酸片球菌冻干保护剂的优化选择时,Abadias等^[21]的研究结果表明,脱脂牛奶可以作为一种保护剂和再水化介质,通过提供适当的保护和再水化环境,在冻干过程中起到了保护细胞的作用,并且在再水化过程中有助于细胞的恢复,对冻干的细胞的存活率有积极的影响,且脱脂牛奶和蔗糖的结合使用可以使念珠菌清酒细胞的保存效果最佳。甘油也是一种良好的保护材料,Huang等^[22]进行的Plackett-Burman设计表明,蔗糖、甘油、山梨糖醇和脱脂牛奶是保加利亚乳杆菌LB14最有效的冻干保护剂,脱脂牛奶浓度的增加显著提高了冻干乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgricus*) LB14在测试浓度范围内的细胞活力;在较高的脱脂牛奶浓度下,增加甘油浓度会导致细胞活力显著增加。因此,脱脂牛奶和甘油之间的相互作用非常显著。同时N'Guessan等^[8]的研究发现蔗糖是使用得最好的冻干保护剂,在Huang等^[22]的研究中,随着山梨糖醇浓度的增加,冻干乳杆菌LB14的细胞活力在低脱脂牛奶浓度时下降,但在脱脂乳浓度较高时细胞活力急剧增加;山梨糖醇和脱脂牛奶的相互作用效应($P < 0.0001$)是造成这种现象的原因。甘露醇作为一种填充剂,能够保证微胶囊在冻干过程中较好的外观^[23],甘露醇对冻干存活率也存在一定的影响,较低浓度的甘露醇可以促进细菌的生长,较高浓度的甘露醇反而对细菌有害^[24]。

此外,本研究在对乳酸片球菌微胶囊的储存实验过程中发现,4℃保存效果要比25℃好,即低温更有利于微胶囊的保存^[25]。但是,在大规模生产、储存、销售过程中可根据实际生产情况 and 经济条件综合考虑,可以综合选择在4℃或室温条件下保存。

综上,本研究针对一株肠道益生菌——乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*) HRQ-1,通过单因素和正交试验确定乳酸片球菌微胶囊最佳制备工艺条件。结果确定了乳酸片球菌微胶囊包埋剂与冻干保护剂最佳配方,通过连续胃液模拟实验储存过程活菌数量变化证实该工艺可行性,为将来活菌药物制备提供了技术支持。

REFERENCES

- [1] WILKINS T, SEQUOIA J. Probiotics for gastrointestinal conditions: a summary of the evidence[J]. American Family Physician, 2017, 96(3): 170-178.
- [2] WANG KY, NI JL, LI HL, TIAN XY, TAN MQ, SU WT. Survivability of probiotics encapsulated in kelp nanocellulose/alginate microcapsules on microfluidic device[J]. Food Research International, 2022, 160: 111723.
- [3] MOHAMADZADEH M, FAZELI A, SHOJAOSADATI SA. Polysaccharides and proteins-based bionanocomposites for microencapsulation of probiotics to improve stability and viability in the gastrointestinal tract: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259: 129287.
- [4] DONG JW, HE YH, ZHANG JF, WU ZS. Tuning alginate-bentonite microcapsule size and structure for the regulated release of *P. putida* Rs-198[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2022, 48: 12-20.
- [5] TANG HW, ABBASILIASI S, MURUGAN P, TAM YJ, NG HS, TAN JS. Influence of freeze-drying and spray-drying preservation methods on survivability rate of different types of protectants encapsulated *Lactobacillus acidophilus* FTDC 3081[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2020, 84(9): 1913-1920.
- [6] OLIVEIRA RPS, FLORENCE ACR, SILVA RC, PEREGO P, CONVERTI A, GIOIELLI LA, OLIVEIRA MN. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 128(3): 467-472.
- [7] SAARELA M, VIRKAJÄRVI I, ALAKOMI HL, MATTILA-SANDHOLM T, VAARI A, SUOMALAINEN T, MÄTTÖ J. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(6): 1330-1339.
- [8] N'GUESSAN FK, COULIBALY HW, ALLOUE-BORAUD MWA, COT M, DJÈ KM. Production of freeze-dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo[J]. Food Science & Nutrition, 2015, 4(1): 34-41.
- [9] CHEN H, TIAN MQ, CHEN L, CUI XX, MENG JP, SHU GW. Optimization of composite cryoprotectant for freeze-drying *Bifidobacterium bifidum* BB01 by response surface methodology[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2019, 47(1): 1559-1569.
- [10] 杜东晓, 赵龙妹, 李旺, 李元晓, 丁轲, 何万领, 曹平华. 具有优良抑菌特性乳酸菌的筛选鉴定及活性物质检测[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3165-3178.
- [11] DU DX, ZHAO LM, LI W, LI YX, DING K, HE WL, CAO PH. Screening and identification of lactic acid bacteria with excellent antibacterial properties and detection of active substances[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3165-3178 (in Chinese).
- [12] 马航宇, 张士凯, 吴澎. 复配益生元微胶囊的制备及其消化耐受性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(3): 152-161.
- [13] MA HY, ZHANG SK, WU P. Preparation and digestive tolerance of compound prebiotic microcapsules[J]. Food Research and Development, 2023, 44(3): 152-161 (in Chinese).
- [14] GEORGE M, ABRAHAM TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan: a review[J]. Journal of Controlled Release, 2006, 114(1): 1-14.
- [15] 杨俊杰, 胡广敏, 相恒学, 毛宇辰, 张君妍, 朱美芳. 壳聚糖的溶解行为及其纤维研究进展[J]. 中国材料进展, 2014, 33(11): 641-648.
- [16] YANG JJ, HU GM, XIANG HX, MAO YC, ZHANG JY, ZHU MF. Progress in the research of chitosan dissolution behavior and its fibers[J]. Materials China, 2014, 33(11): 641-648 (in Chinese).
- [17] DONATI I, CHRISTENSEN BE. Alginate-metal cation interactions: macromolecular approach[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 321: 121280.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 129-130.
- [19] Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part IV[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 129-130.
- [20] 任广钰. 益生菌双菌微胶囊的制备及其对细菌性肠炎缓解作用机制研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2022.
- [21] REN GY. Preparation of probiotics dural-bacteria microcapsules and its mechanism of alleviating bacterial enteritis[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [22] 史同瑞, 崔宇超, 王丽坤, 张莹, 高俊峰. 壳聚糖: 海藻酸钠微囊成囊及包封率的影响因素[J]. 畜牧兽医学杂志, 2019, 38(2): 52-55.

- SHI TR, CUI YC, WANG LK, ZHANG Y, GAO JF. Effecting factors of the formation and encapsulation efficiency of chitosan: alginate sodium microencapsules[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2019, 38(2): 52-55 (in Chinese).
- [18] TAN PY, TAN TB, CHANG HW, MWANGI WW, TEY BT, CHAN ES, LAI OM, LIU Y, WANG Y, TAN CP. Pickering emulsion-templated ionotropic gelation of tocotrienol microcapsules: effects of alginate and chitosan concentrations and gelation process parameters[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(14): 5963-5971.
- [19] 项郑昊, 周化岚, 张建国. 海藻酸钠微胶囊制备及其在微生物包埋中的应用[J]. 工业微生物, 2021, 51(1): 43-49.
- XIANG ZH, ZHOU HL, ZHANG JG. Preparation of alginate microcapsules and its application in industrial microbiology[J]. Industrial Microbiology, 2021, 51(1): 43-49 (in Chinese).
- [20] RAHMAN Z, KOHLI K, KHAR RK, ALI M, CHAROO NA, SHAMSHER AA. Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery[J]. AAPS PharmSciTech, 2006, 7(2): E47.
- [21] ABADIAS M, TEIXIDÓ N, USALL J, BENABARRE A, VIÑAS I. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media[J]. Journal of Food Protection, 2001, 64(6): 856-861.
- [22] HUANG LJ, LU ZX, YUAN YJ, LÜ FX, BIE XM. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33(1): 55-61.
- [23] HORN J, SCHANDA J, FRIESS W. Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2018, 127: 342-354.
- [24] CHEN H, HUANG J, SHI XY, LI YC, LIU Y. Effects of six substances on the growth and freeze-drying of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2017, 16(4): 403-412.
- [25] 高洪霞. 益生菌递送体系的构建及其胃肠环境保护[D]. 江西: 南昌大学, 2023.
- GAO HX. Construction and gastrointestinal environmental protection of probiotics delivery system[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023 (in Chinese).