张新博, 郭宏磊, 张峥, 等. 枯草芽孢杆菌-纳米纤维素微胶囊的制备及体外性能研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 270−278. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120349
ZHANG Xinbo, GUO Honglei, ZHANG Zheng, et al. Preparation and *in Vitro* Performance Study of *Bacillus subtilis*-Nanocellulose Microcapsules[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 270−278. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120349

·工艺技术·

枯草芽孢杆菌-纳米纤维素微胶囊的制备及体外性能研究

张新博, 郭宏磊, 张　峥, 吕紫一, 马　宁*
（河北农业大学动物医学院, 河北保定 071000）

摘　要: 枯草芽孢杆菌是一种具有重要生理功能的益生菌，其活力在加工、储藏以及通过消化道等过程中会降低。为克服这些不利因素，提高枯草芽孢杆菌的胃肠道存活率和储藏稳定性，本研究将纳米纤维素和海藻酸钠结合，采用内源乳化法制备海藻酸钠微胶囊（Sodium Alginate Microcapsules，S-MC）和纳米纤维素海藻酸钠微胶囊（Nanocellulose Sodium Alginate Microcapsules，N-MC），对枯草芽孢杆菌进行包封。采用单因素实验和响应面法对微胶囊的制备工艺进行优化，并对两种微胶囊进行表征分析、模拟胃肠液及稳定性分析。结果表明，微胶囊在海藻酸钠质量分数为 2.0%、纳米纤维素质量分数为 1.4%、搅拌速度为 610 r/min，水油体积比为 1∶2.9 时，包埋率最高，此时 S-MC 和 N-MC 对枯草芽孢杆菌的包埋率分别为 80.20% 和 85.12%。通过对扫描电子显微镜、傅里叶变换红外光谱和 X 射线衍射结果分析，证实了 S-MC 的囊壁具有多孔结构，而 N-MC 中纳米纤维素、海藻酸钠与钙离子交联，形成了更加紧密的凝胶网络结构。通过模拟胃液实验发现，N-MC 中的活菌数下降了 1.48 log CFU/g，低于 S-MC 中下降的活菌数（2.06 log CFU/g）和游离组中下降的活菌数（3.09 log CFU/g）。在模拟肠液实验中 S-MC 在 60 min 时几乎就释放了全部的枯草芽孢杆菌，而 N-MC 在 270 min 时才将全部枯草芽孢杆菌释放，表现出更好的缓释性能。此外，通过储藏稳定性实验发现，N-MC 在 4 ℃ 下储藏 28 d 后，仍能释放 7.84 log CFU/g 的枯草芽孢杆菌。本研究制备了一种枯草芽孢杆菌微胶囊新产品，为枯草芽孢杆菌微囊化提供了理论依据。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 纳米纤维素, 微胶囊, 工艺优化, 稳定性
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0270−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120349　　本文网刊:

Preparation and *in Vitro* Performance Study of *Bacillus subtilis*-Nanocellulose Microcapsules

ZHANG Xinbo, GUO Honglei, ZHANG Zheng, LÜ Ziyi, MA Ning*
（College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China）

Abstract: *Bacillus subtilis* is a probiotic with important physiological functions, its activity will decrease during processing, storage and through the digestive tract. To overcome these unfavorable factors and improve the gastrointestinal survival rate and storage stability of *Bacillus subtilis*, this study combined nanocellulose with sodium alginate and prepared sodium alginate microcapsules (S-MC) and nanocellulose sodium alginate microcapsules (N-MC) using endogenous emulsification method to encapsulate *Bacillus subtilis*. The preparation process was optimized using single-factor experiments and response surface methodology. The resulting microcapsules were characterized, and their stability as well as performance in simulated gastrointestinal fluids were evaluated. The results showed that when the mass fraction of sodium alginate was 2.0%, the mass fraction of nano cellulose was 1.4%, the stirring speed was 610 r/min, and the volume ratio of water to oil was 1∶2.9, the embedding rate of S-MC and N-MC for *Bacillus subtilis* was 80.20% and 85.12%, respectively. By

收稿日期: 2024−12−26
基金项目: 河北省重点研发计划项目（22326619D）。
作者简介: 张新博（2001−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 兽药药理学, E-mail: 18831057156@163.com。
*** 通信作者:** 马宁（1990−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 兽医药理学, 代谢组学, E-mail: maning9618@163.com。

analyzing the results of scanning electron microscope, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction, it was proved that the capsule wall of S-MC had a porous structure, while nanocellulose and sodium alginate in N-MC were crosslinked with calcium ions to form a tighter gel network structure. The number of viable bacteria in N-MC decreased by 1.48 log CFU/g, which was lower than that in S-MC (2.06 log CFU/g) and free group (3.09 log CFU/g). In the simulated intestinal fluid test, S-MC released almost all *Bacillus subtilis* at 60 min, while N-MC released all *Bacillus subtilis* at 270 min, N-MC showed better slow-release performance. In addition, the storage stability test showed that N-MC could still release 7.84 log CFU/g *Bacillus subtilis* after 28 days of storage at 4 ℃. In this study, a new product of *Bacillus subtilis* microcapsule was prepared, which provided a theoretical basis for the microencapsulation of *Bacillus subtilis*.

Key words: *Bacillus subtilis*; nanocellulose; microcapsule; process optimization; stability

枯草芽孢杆菌是芽孢杆菌属的一种细菌，广泛分布在土壤及腐败的有机物中，因易在枯草浸汁中繁殖而得名。作为一种益生菌，其具有多种重要的生物学特性和广泛的应用价值，如抑制致病菌[1]、促进肠道健康、促进消化[2] 和维生素的合成[3]。然而，枯草芽孢杆菌在加工、储藏或通过消化道时，往往会受温度、氧气、pH 和消化酶等因素的影响，使其活性降低，从而无法发挥理想的益生作用[4]。

微胶囊技术作为一种在食品、医药等领域广泛应用的技术，涵盖挤压法、喷雾干燥法、乳化法等多种制备方法，该技术通过以天然或合成的高分子材料，如明胶、壳聚糖、海藻酸钠、聚乳酸等作为微囊壁材，将益生菌包裹在微小封闭的微胶囊内，从而有效抵御外界不利环境对益生菌的损害[5]。其中，内源乳化法在制备微胶囊方面具有操作简便、粒径可控、分布均匀、稳定性高并且容易放大到工业水平等优点[6]。Holkem 等[7] 将海藻酸钠（Sodium Alginate, SA）、碳酸钙和芯材以一定比例混匀，作为水相，再将其分散到含有乳化剂的油相中，然后加入有机酸，使碳酸钙释放钙离子，从而形成 SA 凝胶。SA 是一种天然多糖，具有良好的生物相容性、安全性和可降解性[8]，与钙离子发生反应后，形成海藻酸钙凝胶壳层，将芯材包裹在内。但这种单一的凝胶层具有多孔的结构，稳定性较低，仍然会有胃酸或其他有害物质渗透进微胶囊中，使益生菌失活，降低微胶囊的保护作用[9]。

纳米纤维素（Nanocellulose, NC）是通过化学、物理、生物或几者结合的手段从天然纤维素纤维中分离得到的一种绿色、可降解的有机纳米材料[10]。其具有独特的生物性能，如生物相容性、高比表面积、良好的机械性能和可降解性[11]。此外，其表面存在着大量羟基，既可以通过物理作用吸附到 SA 分子链上，又可以和 SA 一起与钙离子发生交联反应，从而有效减小微胶囊壳层的孔径，同时提高其机械强度和稳定性[12]。然而，纳米纤维素的制备方法对其性能和应用有关键影响，传统制备方法存在诸多局限性，而低共熔溶剂（Deep Eutectic Solvents, DES）作为一种新型绿色溶剂，通常由氢键供体和氢键受体组成[13]，相较于其他制备 NC 的方法，DES 具有环境友好性、高效性、可再生性和制备过程简便等显著优点[14]，这使得 DES 在 NC 制备领域具有广阔的应用前景和重要的研究价值。

本研究首先使用 DES 结合超声波处理的方式制备了 NC，然后利用内源乳化法对枯草芽孢杆菌进行了包封，制备了海藻酸钠微胶囊（Sodium Alginate Microcapsules, S-MC）和纳米纤维素海藻酸钠微胶囊（Nanocellulose Sodium Alginate Microcapsules, N-MC）两种微胶囊新产品。通过单因素和响应面法对微胶囊制备工艺参数进行优化，并对微胶囊进行表征分析、模拟胃肠液及储藏稳定性研究。本研究为枯草芽孢杆菌微囊化提供一种新工艺，旨在通过微囊化的方法，提高枯草芽孢杆菌的稳定性，增强其对不良环境的耐受能力，为枯草芽孢杆菌微囊化提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

桉树漂白木浆（Eucalyptus Bleached Wood Pulp, EBP）　大连扬润贸易有限公司；无水柠檬酸　上海源叶生物有限公司；氯化胆碱、盐酸、氢氧化钠　上海麦克林生化科技有限公司；无水氯化钙、碳酸钙　福晨（天津）化学试剂有限公司；冰醋酸　天津市富宇精细化工有限公司；吐温−80、SA、胰蛋白酶（1∶250）、胃蛋白酶（1∶10000）、琼脂粉　北京索莱宝科技有限公司；LB 肉汤　青岛高科技工业园海博生物技术有限公司；枯草芽孢杆菌　由实验室从饲料添加剂中分离；试剂均为分析纯。

HJ-数显恒温磁力搅拌器　江苏金怡仪器科技有限公司；DF-101S 集热式磁力搅拌器、JJ-1S 数显电动搅拌机　鼎鑫宜实验设备有限公司；JY92-IIDN 超声波破碎仪　上海沪析实业有限公司；LC-CJ-1F 超净工作台　上海力辰仪器科技有限公司；THZ-98C 恒温振荡器　上海一恒科学仪器有限公司；SPX-280 型培养箱　宁波江南仪器厂；LDZX-50L 立式高压蒸汽灭菌器　上海申安医疗器械厂；BSA124S 电子天平　赛多利斯科学仪器有限公司；LG16-C 高速离心机　北京雷勃尔离心机有限公司；LGJ-18 冷冻干燥机　北京松源华兴科技发展公司；Tecnai G2 20 透射电子显微镜　美国 FEI 公司；Regulus8100 扫描电子显微镜　日本日立公司；Nicolet is5 傅里叶红外光谱仪　美国尼高立公司；D8 AdvanceX 射线衍射仪　德国布鲁克公司；TG 209 F3 热重分析仪　德国 NETZSCH。

1.2 实验方法

1.2.1 NC 的制备 根据 Shi 等[15] 的方法, 并略作修改, 按照质量比 3 ∶ 1 ∶ 1, 分别称取一定质量的无水柠檬酸、氯化胆碱和水于烧杯中, 80 ℃ 下加热搅拌直至形成澄清透明液体。将 4.0 g 的 EBP 加入到 100 mL 的 DES 中, 使用油浴锅加热混合物至 130 ℃, 冷凝回流反应 3 h。反应完成后, 过滤洗涤木浆, 直至滤液成中性。干燥后, 将 0.5 g 预处理后的木浆溶于 100 mL 水中, 使用超声波细胞粉碎机以 900 W 功率处理 30 min 后得到 NC。

1.2.2 枯草芽孢杆菌的培养 参照夏俊芳等[16] 的方法, 将冻存的菌种均匀涂布在 LB 固体培养基上, 倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中, 培养 12 h。根据菌落形态, 挑取合适的菌落到 5.0 mL 液体培养基中, 在 37 ℃, 220 r/min 的恒温培养箱中培养 12 h 后, 接种到灭菌的 LB 营养肉汤中, 接种量为 LB 营养肉汤体积的 2.0%, 继续恒温培养箱中培养 6 h。然后在 4 ℃, 8000 r/min 条件下离心 10 min, 除去上清液后, 用无菌生理盐水洗涤两遍, 最后重新悬浮于无菌生理盐水中, 得到菌悬液。

1.2.3 微胶囊的制备 根据 Wang 等[17] 和 Chen 等[18] 的方法, 将 2.0% SA 和 1.4% NC 溶液混合, 60 ℃ 下加热搅拌成均一的混合溶液, 作为壁材。将 30 mL 的壁材、15 mL 的芯材和一定质量的碳酸钙粉末混合均匀, 作为水相, 碳酸钙粉末与 SA 的质量比为 1∶3。将水相缓慢加入到含有 1% Tween 80 的大豆油中, 使用磁力搅拌器搅拌 15 min, 然后缓慢加入 200 μL 的冰醋酸, 30 min 后, 加入 300 mL, 0.05 mol/L 的氯化钙溶液, 缓慢搅拌 10 min, 待微胶囊沉降到底部后, 去除油相, 收集微胶囊, 使用生理盐水洗涤微胶囊, 直至没有大豆油残留, 最后将收集到的微胶囊保存在 4 ℃ 中备用。

1.2.4 微胶囊包埋率测定 根据 Zhao 等[19] 的方法, 略作修改, 将 1.0 g 枯草芽孢杆菌微胶囊加入到 9.0 mL, 0.1 mol/L 的柠檬酸钠溶液中, 置于 37 ℃ 摇床中以 220 r/min 振荡 1 h。待微胶囊全部溶解, 将其稀释到合适浓度后, 接种到 LB 固体培养基上, 在 37 ℃ 培养箱中培养 24 h 后计数。

$$包埋率(\%) = \frac{N_1}{N_0} \times 100$$

式中, N_1: 包埋后微胶囊中的活菌数, log CFU/g; N_0: 包埋前的总活菌数, log CFU/g。

1.2.5 单因素实验

1.2.5.1 SA 质量分数对微胶囊包埋率的影响 在 NC 质量分数为 1.4%, 水相油相体积比为 1∶3, 搅拌速度为 600 r/min, SA 质量分数为(1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)的条件下, 按照 1.2.3 中的方法制备微胶囊, 以微胶囊包埋率为测定指标, 探究 SA 质量分数对微胶囊包埋率的影响。

1.2.5.2 NC 质量分数对微胶囊包埋率的影响 在 SA 质量分数为 2.0%, 水相油相体积比为 1∶3, 搅拌速度为 600 r/min, NC 的质量分数为(0、0.7%、1.4%、2.1%、2.8%)的条件下, 按照 1.2.3 中的方法制备微胶囊, 以微胶囊包埋率为测定指标, 探究 NC 质量分数对微胶囊包埋率的影响。

1.2.5.3 搅拌速度对微胶囊包埋率的影响 在 SA 质量分数为 2.0%, NC 质量分数为 1.4%, 水相油相体积比为 1∶3, 搅拌速度为(200、400、600、800、1000 r/min)的条件下, 按照 1.2.3 中的方法制备微胶囊, 以微胶囊包埋率为测定指标, 探究搅拌速度对微胶囊包埋率的影响。

1.2.5.4 水油体积比对微胶囊包埋率的影响 在 SA 质量分数为 2.0%, NC 质量分数为 1.4%, 搅拌速度为 600 r/min, 水相油相体积比为(1∶1、1∶2、1∶3、1∶4、1∶5)的条件下, 按照 1.2.3 中的方法制备微胶囊, 以微胶囊包埋率为测定指标, 探究水油体积比对微胶囊包埋率的影响。

1.2.6 响应面试验 根据单因素实验结果, 筛选出 3 个对包埋率影响较大的因素(SA 质量分数、搅拌速度、水油体积比), 以包埋率为指标, 进行 Box-Behnken 响应面优化试验, 响应面试验因素水平表见表 1。

表 1 响应面试验因素水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

因素	水平		
	−1	0	1
A SA质量分数(%)	1.5	2	2.5
B 搅拌速度(r/min)	400	600	800
C 水油体积比(v/v)	1∶2	1∶3	1∶4

1.2.7 NC 与微胶囊表征

1.2.7.1 透射电镜分析 使用透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM)分析 NC 的形态特征。将 10 μL 的 NC 悬浮液(0.02%, w/v)滴加到 TEM 专用的铜网上, 用醋酸铀酰溶液(2.0%, w/v)染色 2 min, 干燥后在 120 kV 加速电压下观察样品。使用 Nano Measure 1.2 观察约 200 个 NC 的直径与长度[20]。

1.2.7.2 扫描电镜分析 使用扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)观察样品的微观形貌。对固体样品 EBP 和冷冻干燥样品 NC、S-MC 和 N-MC 表面进行喷金处理, 在 5 kV 加速电压下进行扫描观察[21]。

1.2.7.3 傅里叶变换红外光谱(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)分析 使用 FT-IR 分析样品的化学结构和官能团。将约 2 mg 样品与溴化钾混合研磨至粉末, 使用压片机进行压片后测试, 在 4000~400 cm^{-1} 的范围内, 以透射模式扫描 EBP、

NC、SA、N-MC、S-MC, 分辨率为 4 cm^{-1}(收集了 16 次扫描)[22]。

1.2.7.4　X 射线衍射(X-ray Diffraction, XRD)分析　使用 X 射线衍射仪在 2θ=5°~60°, 扫描速度为 2°/min 条件下对 EBP、NC、SA、N-MC、S-MC 进行扫描。

1.2.7.5　热重(Thermogravimetric, TG)分析　在氮气条件下从室温将 EBP、NC、SA、N-MC、S-MC 加热到 600 ℃, 升温速率为 10 ℃/min[23]。

1.2.8　微胶囊在模拟胃液中的耐受性　模拟胃液配制[24]: 取浓度为 1.0 mol/L 盐酸 1.64 mL, 加水约 80 mL 和胃蛋白酶 1.0 g, 加水定容至 100 mL, 并调节溶液 pH 为 2.0, 得到模拟胃液。

取 1.0 g 微胶囊置于 9.0 mL 人工模拟胃液中, 在 37 ℃, 220 r/min 的条件下振荡, 分别于 0、30、60、90、120 min 时取样, 加入到 0.1 mol/L 的柠檬酸钠中, 待菌完全释放后进行活菌计数, 以游离的枯草芽孢杆菌(Free Bacillus Subtilis, FB)菌悬液作为对照。

1.2.9　微胶囊在模拟肠液中的释放性　模拟肠液配制[25]: 取磷酸二氢钾 0.68 g, 加 50 mL 水溶解, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.8, 加入 1 g 胰酶, 加水定容至 100 mL, 得到模拟肠液。

取 1.0 g 微胶囊置于 9.0 mL 模拟肠液中, 在 37 ℃, 220 r/min 的条件下振荡, 分别于 0、30、60、120、180、270、360 min 时取上清液进行活菌计数。

1.2.10　微胶囊的储藏稳定性　将微胶囊置于 4 ℃条件下储藏 28 d, 每隔 7 d 取微胶囊进行活菌计数, 以 FB 菌悬液作为对照[26]。

1.3　数据处理

所有实验均进行了 3 次独立重复实验, 采用 SPSS 27 对数据进行单因素方差和显著性分析, P<0.05 视为显著, 采用 OriginPro 9.1 和 Design-Expert 13 对数据进行作图和分析。

2　结果与分析

2.1　单因素实验

2.1.1　SA 质量分数对微胶囊包埋率的影响　如图 1A 所示, SA 质量分数对微胶囊包埋率有显著影响(P<0.05), 随着 SA 质量分数的增加, 微胶囊的包埋率先增加后减小, 且当 SA 的质量分数为 2.0% 时, 微胶囊包埋率最高, 为 85.1%。当 SA 质量分数小于 2.0% 时, 随着 SA 质量分数的增加, 交联形成的凝胶网络结构更加紧密, 微胶囊外壁机械强度增加, 从而包裹更多益生菌, 使得包埋率增加; 当 SA 质量分数大于 2.0% 时, 随着 SA 质量分数增加, 溶液的黏度和密度增大, 影响成球效果[27]。同时, 形成的凝胶网络结构的空隙无法容纳更多益生菌, 导致微胶囊包埋率降低。因此将 SA 质量分数为 2.0% 作为微胶囊的最佳制备条件。

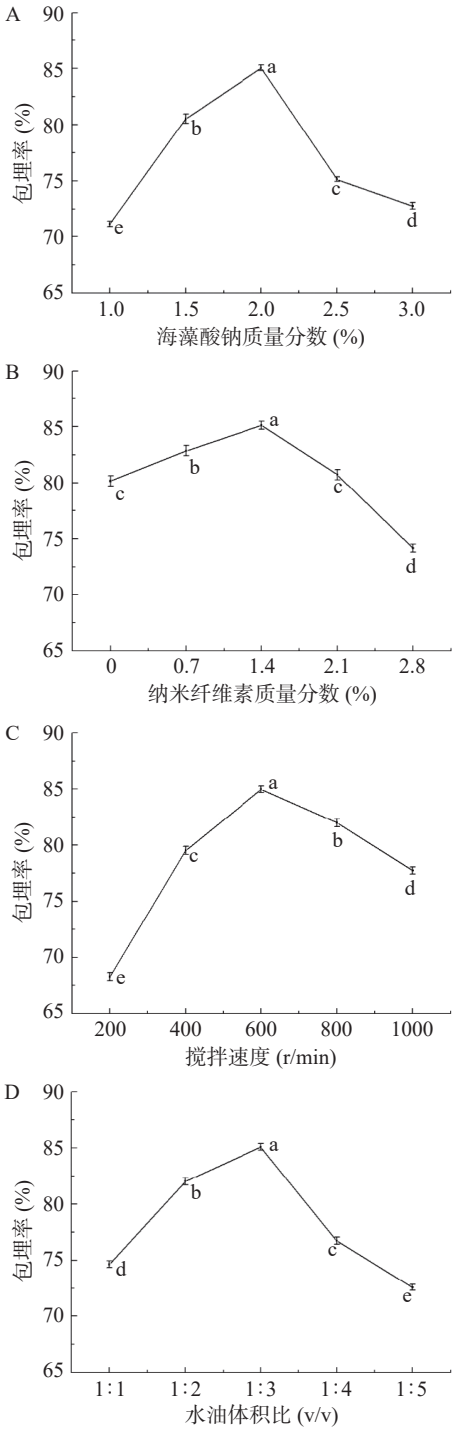


图 1　不同因素对微胶囊包埋率的影响

Fig.1　Influence of different factors on the embedding rate of microcapsules

注: A: 海藻酸钠质量分数; B: 纳米纤维素质量分数; C: 搅拌速度; D: 水油体积比; 不同的小写字母表示数据有显著差异(P<0.05)。

2.1.2　NC 质量分数对微胶囊包埋率的影响　如图 1B 所示, NC 质量分数对微胶囊包埋率有显著影响(P<0.05), 随着 NC 质量分数增加, 微胶囊包埋率先增加, 后减小, 且 NC 质量分数为 1.4% 时, 微胶囊包埋率最高。当 NC 质量分数为 0, 其他单因素为最佳制备条件时, S-MC 的包埋率为 80.20%, 将其作为 S-MC 的最高包埋率。少量的 NC 既可以通过物

理作用吸附到 SA 分子链上，同时又可以与 SA 一起与钙离子发生交联反应，使得微胶囊结构更加紧密，提高了微胶囊外壁机械强度，从而使微胶囊包埋率提高[28]；过量的 NC 与 SA 混合时，使得溶液黏度增加，不利于微胶囊的形成，导致微胶囊包埋率降低。因此将 NC 质量分数为 1.4% 作为微胶囊的最佳制备条件。

2.1.3 搅拌速度对微胶囊包埋率的影响 如图 1C 所示，搅拌速度对微胶囊包埋率有显著影响（$P<0.05$），随着搅拌速度的增加，微胶囊包埋率先增加，后减小，且当搅拌速度为 600 r/min 时，微胶囊包埋率最高。当搅拌速度较低时，乳化效果较差，所得到的微胶囊球形较差、粒径较大，出现粘连现象，导致包埋率较低；当搅拌速度过高时，过高的剪切力可能对微胶囊造成物理上的损伤，使得囊壁破损，导致微胶囊包埋率降低[29]。因此将搅拌速度为 600 r/min 作为微胶囊的最佳制备条件。

2.1.4 水油体积比对微胶囊包埋率的影响 如图 1D 所示，水油体积比对微胶囊包埋率有显著影响（$P<0.05$），随着水油体积比减小，微胶囊包埋率先增加，后减小，且当水油体积比为 1∶3 时，微胶囊包埋率最高。当水相体积过高时，单位体积的油相中分散的海藻酸钠量较少，经搅拌乳化后，介质中会产生较小的分散液滴，使形成的微胶囊粒径变小，不利于枯草芽孢杆菌的包封，导致微胶囊包埋率降低[30]；当油相体积过高时，单位体积的油相中分散的海藻酸钠量过高，过多的枯草芽孢杆菌进入微胶囊内，使形成的微胶囊囊壁变薄，导致微胶囊对枯草芽孢杆菌的保护作用减弱，微胶囊包埋率降低[31]。因此将水油体积比为 1∶3 作为微胶囊的最佳制备条件。

2.2 响应面优化结果分析

根据单因素实验结果，选取对枯草芽孢杆菌微胶囊包埋率影响较大的三个因素：SA 质量分数（A）、搅拌速度（B）和水油体积比（C），运用 Design-Expert 13 软件进行响应面的试验设计，以表 1 的因素水平设计得到 17 组试验。响应面试验数据见表 2。

通过数据分析得到响应值包埋率（Y）对 SA 质量分数（A）、搅拌速度（B）、水油体积比（C）的二次多项式回归模型：

$$Y=85.16-0.8250A-0.6875B-0.6625C+0.2000AB-0.3500AC-0.1250BC-4.62A^2-6.99B^2-4.34C^2$$

由表 3 中的 P 值可知，该回归模型极显著（$P<0.001$），失拟项不显著（$P>0.05$），本实验模型相关系数 $R^2=0.9987$，校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.9969$，表明拟合度佳，且该模型能较为合理地解释响应值变化，模型较为可靠。

从方差分析的显著性可知，一次项（A、B、C）和二次项（A^2、B^2、C^2）极显著（$P<0.01$），交互项 AC 显著（$P<0.05$），AB、BC 不显著（$P>0.05$）。通过 F 值可以看出各个试验因素对包埋率的影响程度：SA 质量分数>搅拌速度>水油体积比。

表 2 响应面试验方案及结果

Table 2 Design and results of response surface experiments

试验号	A SA质量分数	B 搅拌速度	C 水油体积比	包埋率(%)
1	−1	−1	0	73.9
2	1	−1	0	72.0
3	−1	1	0	74.7
4	1	1	0	73.6
5	−1	0	−1	77.5
6	1	0	−1	76.4
7	−1	0	1	76.7
8	1	0	1	74.2
9	0	−1	−1	73.5
10	0	1	−1	75.3
11	0	−1	1	72.6
12	0	1	1	73.9
13	0	0	0	85.3
14	0	0	0	84.8
15	0	0	0	85.2
16	0	0	0	85.6
17	0	0	0	84.9

表 3 回归模型方差分析结果

Table 3 Results of the variance analysis for the regression model

来源	平方和	自由度	均值	F值	P值	显著性
模型	429.62	9	47.74	576.62	<0.0001	**
A	5.44	1	5.44	65.77	<0.0001	**
B	3.78	1	3.78	45.68	0.0003	**
C	3.51	1	3.51	42.41	0.0003	**
AB	0.1600	1	0.1600	1.93	0.2071	
AC	0.4900	1	0.4900	5.92	0.0452	*
BC	0.0625	1	0.0625	0.7550	0.4137	
A^2	89.77	1	89.77	1084.41	<0.0001	**
B^2	205.87	1	205.87	2486.83	<0.0001	**
C^2	79.40	1	79.40	959.09	<0.0001	**
残差	0.5795	7	0.0828			
失拟项	0.1675	3	0.0558	0.5421	0.6789	
纯误差	0.4120	4	0.1030			
总误差	430.20	16				

注：*表示差异显著，$P<0.05$；**表示差异极显著，$P<0.01$。

为了直观地展现两个因素对微胶囊包埋率的效应，利用回归方程构建了相应的三维响应面图，具体结果如图 2 所示。响应面的倾斜程度若较为陡峭，则意味着这两个因素的交互作用对包埋率有着更为显著的影响；相反，则表明这种交互作用对包埋率的影响并不明显[32]。由图可知 SA 质量分数相较于搅拌速度、水油体积比曲线更加陡峭，说明 SA 质量分数对微胶囊包埋率影响更显著；当 SA 质量分数固定时，搅拌速度曲线较水油体积比曲线更加陡峭。再次说明对微胶囊包埋率影响最大的因素为 SA 质量分数，其次是搅拌速度，最小的是水油体积比。

根据响应面模型预测的最佳工艺条件为：SA 质量分数为 1.95%，搅拌速度为 609.66 r/min，水油体积比为 1∶2.93，在此条件下期望包埋率为 85.24%。考虑到实际的可操作性，将验证实验的操作条件设

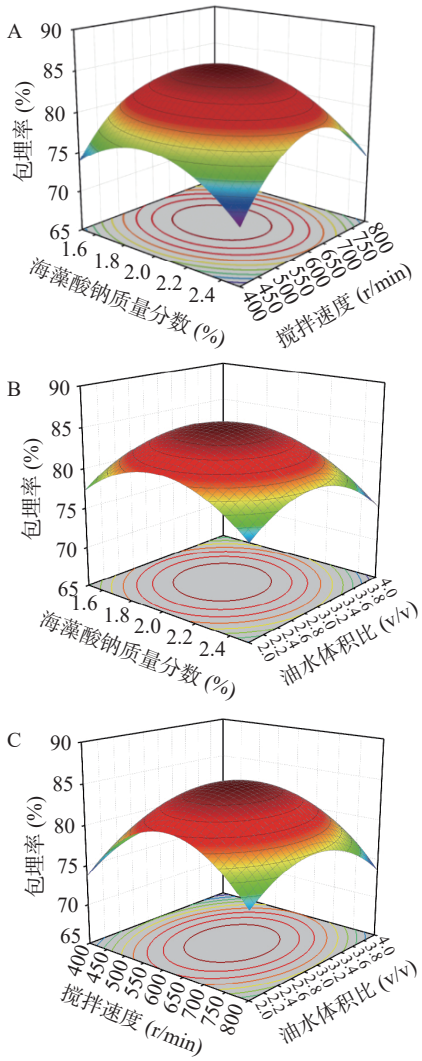


图 2　各因素交互作用对包埋率影响的响应面图

Fig.2　Response surface diagrams of the interaction of two factors

置为：SA 质量分数为 2.0%，搅拌速度为 610 r/min，水油体积比为 1∶2.9。进行三次验证实验，微胶囊平均包埋率为 85.12%，与模型预测结果基本符合，说明所建立模型合理、可行。

2.3　NC 和微胶囊的表征分析

2.3.1　NC 的 TEM 图像和 SEM 图像分析　从 TEM 图像（图 3A 和 B）可以看出纤维素为相互交织的针状纤维，长度在 200~1000 nm 范围内，直径在 10~20 nm 范围内，有着均匀的尺寸分布和良好的分散性，证明成功制得 NC。从 SEM 图像可以看出，未经处理的纤维素样品表面呈现完整封闭结构（图 3C），经一系列处理后，纤维素表面出现孔洞，结构被破坏，呈现出疏松的状态（图 3D），表明木质素、半纤维素和果胶等保护物质被去除[33]。

2.3.2　微胶囊 SEM 图像分析　由于冷冻干燥，微胶囊颗粒变小，并出现了不同程度的褶皱（图 4A 和 C），这主要是因为在冻干的过程中，冰晶的快速升华，使得微胶囊没有时间进行规则的收缩[34]。N-MC 较 S-MC 表现出更好的球形度，这可能因为

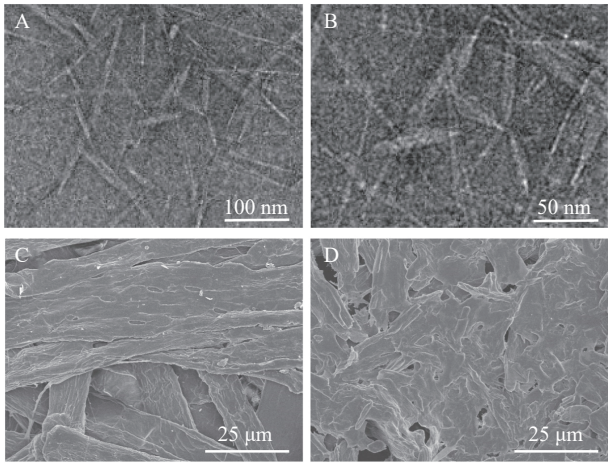


图 3　NC 的 TEM 图像和 SEM 图像

Fig.3　TEM and SEM images of NC

注：A、B：NC 的 TEM 图像；C：EBP 的 SEM 图像（1000×）；D：NC 的 SEM 图像（1000×）。

NC 的加入使得微胶囊的机械强度增加，结构更加稳定[35]。此外，S-MC 表面粗糙多孔且出现一些破损（图 4B），加入 NC 后，N-MC 结构更加紧密，表面光滑完整（图 4D）。

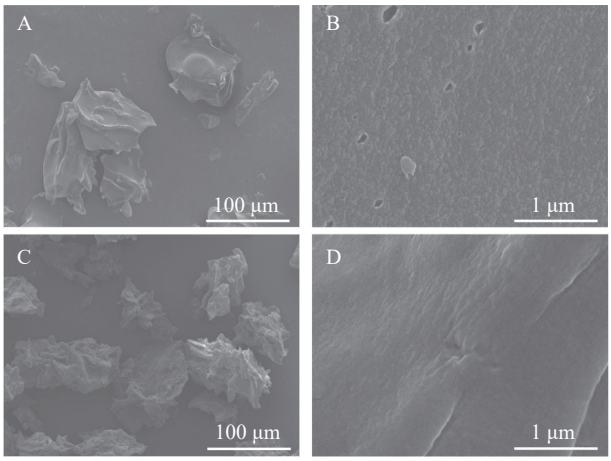


图 4　微胶囊的 SEM 图像

Fig.4　SEM images of microcapsules

注：A：S-MC 的 SEM 图像（500×）；B：S-MC 的 SEM 图像（20000×）；C：N-MC 的 SEM 图像（500×）；D：N-MC 的 SEM 图像（20000×）。

2.3.3　FT-IR 分析　如图 5 所示，EBP 经 DES 处理后，在 1722.6 cm^{-1} 和 1421.2 cm^{-1} 处出现吸收峰，此处的吸收峰属于-COOH 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动[36]，这表明 EBP 经 DES 处理后引入了-COOH；SA 在 3273.1、2916.9、1592.8 和 1405.3 cm^{-1} 处的吸收峰分别属于-OH 的伸缩振动、-CH 的伸缩振动、COO-的不对称伸缩振动和对称伸缩振动[37]；两种微胶囊在 1742.8 cm^{-1} 处出现吸收峰，这与-COOH 的 C-O 伸缩振动有关，表明 Ca^{2+}与-COOH 之间发生了络合作用，且 N-MC 组的作用更强[38]。同时，在 2921.2 cm^{-1} 和 2854.8 cm^{-1} 处的吸收峰属于-CH 和-CH_2 的不对称拉伸，这与枯草芽孢杆菌细胞壁的脂质膜有关，证明其被封装到了微胶囊中[39]。

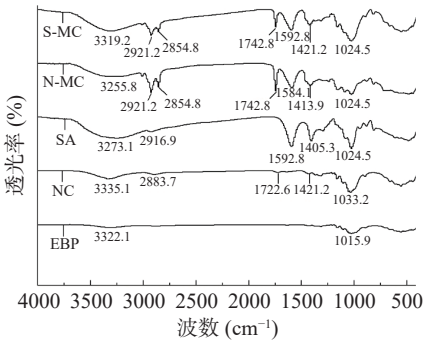


图 5 NC 和微胶囊的 FT-IR 光谱

Fig.5 FT-IR spectra of NC and microcapsule

注: EBP: 桉树漂白木浆; NC: 纳米纤维素; SA: 海藻酸钠; S-MC: 海藻酸钠微胶囊; N-MC: 纳米纤维素海藻酸钠微胶囊; 图 6~图 10 同。

2.3.4 XRD 分析 如图 6 所示, EBP 处理前后在 2θ=15.8°、22.6°和 34.6°处出现特征峰, 说明 DES 处理并未影响纤维素的晶型; SA 在 2θ=13.5°和 20°~30°出现较宽的特征峰, 呈无定型状态; N-MC 在 2θ=22.6°出现的峰, 属于 EBP 的特征峰, 这表明 N-MC 中含有 NC, 而 S-MC 并未出现明显的特征峰。

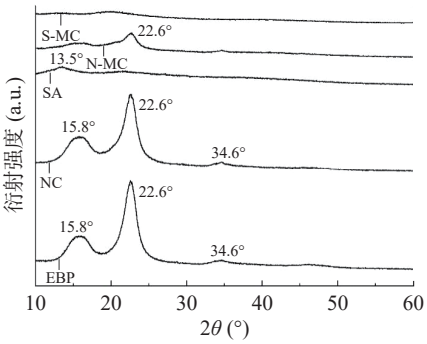


图 6 NC 和微胶囊的 XRD 光谱

Fig.6 XRD spectra of NC and microcapsule

2.3.5 TG 分析 如图 7 所示, 所有样品的质量都随着温度的升高不断降低, 0~200 ℃ 之间质量损失主要是由样品中残留的水分蒸发所造成的, NC 和 EBP 在 200~350 ℃ 之间质量损失主要是半纤维素的降解和纤维素的糖苷键的分解[40], 在 350~600 ℃, 两者的纤维素结构进一步降解。在温度小于 350 ℃ 时, NC 相较 SA 具有更好的热稳定性, N-MC 相较于 S-MC 在小于 350 ℃ 时, 质量损失更小, 热稳定性更好。

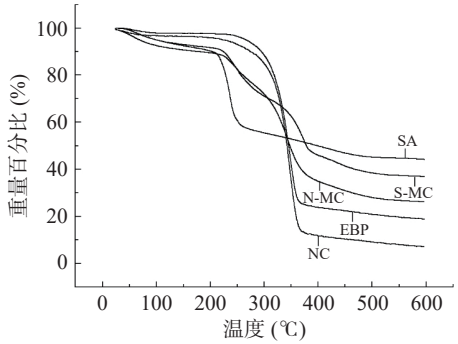


图 7 NC 和微胶囊的 TG 图像

Fig.7 TG images of NC and microcapsules

2.3.6 枯草芽孢杆菌微胶囊在模拟胃液中的活菌数

如图 8 所示, 在 120 min 的模拟胃液实验中, FB 和微囊化菌中的活菌数量都有所减少。FB 在模拟胃液中处理 120 min 后活菌数从 9.36 log CFU/g 下降到 6.27 log CFU/g, 在相同条件下, 单纯 S-MC 封装的枯草芽孢杆菌活菌数从 9.17 log CFU/g 下降到 7.11 log CFU/g, 而添加 NC 的 N-MC 封装的枯草芽孢杆菌活菌数从 9.23 log CFU/g 下降到 7.75 log CFU/g。虽然 S-MC 封装的枯草芽孢杆菌相较于 FB 在模拟胃液中的存活率升高, 但单纯 SA 所制得的微胶囊表面存在多孔结构, 容易受到模拟胃液的侵蚀, 并不能提供很好的保护作用[41]。通过 NC 与 SA 结合的方式, 所制得的 N-MC 结构更加紧密, 对枯草芽孢杆菌的保护作用增强, 微囊化中的活菌数高于不含 NC 中的活菌数。

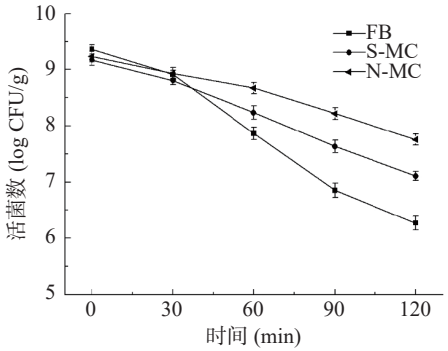


图 8 游离的和包封的枯草芽孢杆菌在模拟胃液中的活菌数

Fig.8 Bacterial count of free and encapsulated *Bacillus subtilis* in simulated gastric juice

2.3.7 枯草芽孢杆菌微胶囊在模拟肠液中的活菌数

如图 9 所示, 在 360 min 的模拟肠液试验中, S-MC 和 N-MC 包封的 90% 以上的枯草芽孢杆菌都释放到模拟肠液中。S-MC 组在 60 min 时, 枯草芽孢杆菌几乎已经释放完毕, 此后释放的活菌数几乎没有变化, 而 N-MC 在 270 min 时, 才将包封的大部分枯草芽孢杆菌释放, 表明 NC 可以调控微囊化的枯草芽孢杆菌在模拟肠液中的释放时间和速率[42]。这可

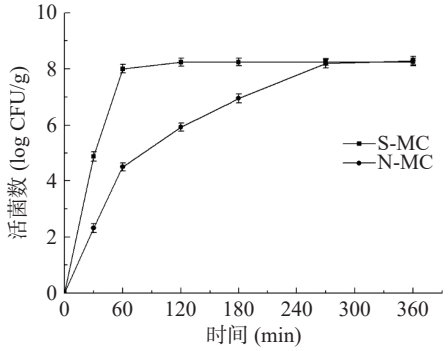


图 9 包封的枯草芽孢杆菌在模拟肠液中的活菌数

Fig.9 Bacterial count of encapsulated *Bacillus subtilis* in simulated intestinal fluid

能是因为 NC、SA 和钙离子发生交联作用，形成了更紧密的网络结构，提高了微胶囊的稳定性。

2.3.8　枯草芽孢杆菌微胶囊的储藏稳定性　储藏稳定性是评价益生菌产品的一个重要标准。如图 10 所示，不同样品在 4 ℃ 下储藏 7、14、21、28 d 后活菌数都有所降低。FB 和 S-MC 中的活菌数在 28 d 时分别下降到了 4.86 log CFU/g 和 5.74 log CFU/g，而 N-MC 中的活菌数仅下降到了 7.84 log CFU/g，显著高于另外两组样品（P<0.05）。这表明 N-MC 在储藏过程中可以为枯草芽孢杆菌提供更好的保护作用，这得益于 NC、SA 和钙离子发生交联作用形成的更加紧密的凝胶网络结构，同时也有可能是 NC 为枯草芽孢杆菌提供了营养基础[43]，提高了微胶囊的储藏稳定性。

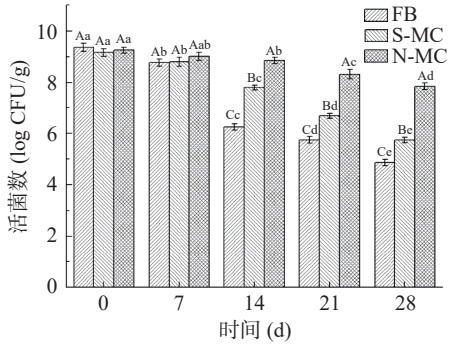


图 10　游离的和包封的枯草芽孢杆菌在 4 ℃ 下 28 d 内的储藏稳定性

Fig.10　Storage stability of free and encapsulated *Bacillus subtilis* at 4 ℃ within 28 days

注：不同大写字母表示不同微胶囊之间有显著差异（P<0.05），不同小写字母表示不同储藏时间之间有显著差异（P<0.05）。

3　结论

本研究使用内源乳化法制备了枯草芽孢杆菌-纳米纤维素微胶囊，通过单因素和响应面法优化了微胶囊的制备条件，在 SA 质量分数为 2.0%，NC 质量分数为 1.4%，搅拌速度为 610 r/min，水油体积比为 1∶2.9 的条件下包埋率最高，微胶囊的平均包埋率为 85.12%。通过对 FTIR 光谱和 XRD 图像分析证实了 NC 加入到微胶囊中，相较于只使用 SA 作为壁材的微胶囊，以 NC 和 SA 作为壁材的微胶囊在温度小于 350 ℃、模拟胃肠液和 4 ℃ 储藏中，表现出更好的保护性和稳定性。综上，将 NC 和 SA 作为微胶囊壁材能够提高枯草芽孢杆菌的存活率，也为枯草芽孢杆菌微囊化提供了一种新工艺。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] WANG Jian, ISHFAQ M, MIAO Yusong, et al. Dietary administration of *Bacillus subtilis* KC1 improves growth performance, immune response, heat stress tolerance, and disease resistance of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2022, 101(3): 101693.

[2] JÚNIOR D T V, de AMORIM RODRIGUES G, SOARES M H, et al. Supplementation of *Bacillus subtilis* DSM 32540 improves performance and intestinal health of weaned pigs fed diets containing different fiber sources[J]. Livestock Science, 2023, 270: 105202.

[3] 付雪, 张启航, 刘周靓, 等. 枯草芽孢杆菌在动物生产中的应用与作用机制[J]. 饲料研究, 2024, 47(8): 150−155. [FU Xue, ZHANG Qihang, LIU Zhouliang, et al. Application and mechanism of *Bacillus subtilis* in animal production[J]. Feed Research, 2024, 47(8): 150−155.]

[4] BU Wenyan, MCCLEMENTS D J, ZHANG Zipei, et al. Encapsulation method of probiotic embedded delivery system and its application in food[J]. Food Hydrocolloids, 2025, 159: 110625.

[5] RAZAVI S, JANFAZA S, TASNIM N, et al. Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 120: 106882.

[6] RADDATZ G C, POLETTO G, de DEUS C, 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: 108902.

[7] HOLKEM A T, RADDATZ G C, BARIN J S, et al. Production of microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by emulsification/internal gelation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 76: 216−221.

[8] FRENT O D, VICAS L G, DUTEANU N, et al. Sodium alginate: Natural microencapsulation material of polymeric microparticles[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(20): 12108.

[9] GEDIK O, KARAHAN A G. Properties and stability of *Lactiplantibacillus plantarum* AB6-25 and *Saccharomyces boulardii* T8-3C single and double-layered microcapsules containing Na-alginate and/or demineralized whey powder with lactobionic acid[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 271: 132406.

[10] 贾丽佳, 王汉琛, 黄彪, 等. 纳米纤维素的制备及功能应用[J]. 生物质化学工程, 2024, 58(4): 43−56. [JIA Lijia, WANG Hanchen, HUANG Biao, et al. Preparation and functional application of nanocellulose[J]. Biomass Chemical Engineering, 2024, 58(4): 43−56.]

[11] YU Sujie, SUN Jianzhong, SHI Yifei, et al. Nanocellulose from various biomass wastes: Its preparation and potential usages towards the high value-added products[J]. Environmental Science and Ecotechnology, 2021, 5: 100077.

[12] LI Yanfei, ZHANG Huan, ZHAO Yan, et al. Encapsulation and characterization of proanthocyanidin microcapsules by sodium alginate and carboxymethyl cellulose[J]. Foods, 2024, 13(5): 740.

[13] BI Xuerong, GUO Jiansheng, WEN Jin, et al. Mechanistic analysis of nanocellulose formation tuned by deep eutectic solvents[J]. Cellulose, 2023, 30(15): 9349−9364.

[14] LIU Shan, TIAN Zhongjian, JI Xingxiang, et al. Preparation and modification of nanocellulose using deep eutectic solvents and their applications[J]. Cellulose, 2024, 31(4): 2175−2205.

[15] SHI Xiaochao, WANG Zengbin, LIU Siyuan, et al. Scalable production of carboxylated cellulose nanofibres using a green and recyclable solvent[J]. Nature Sustainability, 2024, 7(3): 315−325.

[16] 夏俊芳, 郑素慧, 翟少华, 等. 一株拮抗酿酒葡萄灰霉病的枯草芽孢杆菌 T3 筛选、鉴定及抑菌分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 99−105,113. [XIA Junfang, ZHENG Suhui, ZHAI Shaohua, et al. Screening and identification of antagonistic *Bacillus subtilis* T3 against wine grape gray mold and analysis of its antimicro-

bial activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(23): 99−105,113.]
[17] WANG Kuiyou, NI Jialu, LI Hongliang, et al. Survivability of probiotics encapsulated in kelp nanocellulose/alginate microcapsules on microfluidic device[J]. Food Research International, 2022, 160: 111723.
[18] CHEN Liang, QIAN Wenwen, ZHOU Shaobo, et al. Fabrication of whey protein/pectin double layer microcapsules for improving survival of *Lacticaseibacillus rhamnosus* ZFM231[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242: 125030.
[19] ZHAO Mengna, MU Longkai, GUO Zhengtao, et al. Double-layer microcapsules based on shellac for enhancing probiotic survival during freeze drying, storage, and simulated gastrointestinal digestion[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 267: 131483.
[20] SAMSALEE N, MEERASRI J, SOTHORNVIT R. Rice husk nanocellulose: Extraction by high-pressure homogenization, chemical treatments and characterization[J]. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2023, 6: 100353.
[21] LIU Ran, CI Xiaoman, LIU Linlin, et al. Chitosan entrapping of sodium alginate/*Lycium barbarum* polysaccharide gels for the encapsulation, protection and delivery of *Lactiplantibacillus plantarum* with enhanced viability[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 260: 129615.
[22] WANG Leran, ZHONG Xinyi, LI Shiqi, et al. Probiotics encapsulated by gelatin and hyaluronic acid via layer-by-layer assembly technology for enhanced viability[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 153: 109967.
[23] MIDHUN DOMINIC C D, RAJ V, NEENU K V, et al. Chlorine-free extraction and structural characterization of cellulose nanofibers from waste husk of millet (*Pennisetum glaucum*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 206: 92−104.
[24] 周莉, 王晓瑞, 平洋, 等. 保加利亚乳杆菌微胶囊的制备及特性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 188−193. [ZHOU Li, WANG Xiaorui, PING Yang, et al. Preparation and characterization of microcapsule *Lactobacillus bulgaricus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 188−193.]
[25] 杨丽霞. 微囊化植物乳杆菌-香菇多糖合生元的制备及其对肉鸡生长性能的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023. [YANG L X. Preparation of microencapsulated Lactobacillus plantarum-lentinan synbiotics and its effect on growth performance of Broilers[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2023.]
[26] HUANG Rumeng, FENG Kun, LI Shufang, et al. Enhanced survival of probiotics in the electrosprayed microcapsule by addition of fish oil[J]. Journal of Food Engineering, 2021, 307: 110650.
[27] 郜鑫. 青春双歧杆菌微胶囊的制备及特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023. [GAO X. Preparation and characteristics of *Bifidobacterium adolescentis* microcapsules[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023.]
[28] PARK M, LEE D, HYUN J. Nanocellulose-alginate hydrogel for cell encapsulation[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 116: 223−228.
[29] 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. [DONG Yang, HE Jiaxin, GU Yue, et al. Microencapsulation and its characteristic of lactic acid bacteria with highly adsorbed ability of lead[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 173−182.]
[30] 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. [LI Yichun. Preparation and characterization of endogenous emulsification probiotics microcapsule freeze-dried bacteria powder[D]. Yantai: Yantai University, 2018.]
[31] 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 Z, ZHOU N, FENG L R, et al. Preparation of Bifidobacterium adolescentis microcapsules by endogenous emulsification[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 171−179.]
[32] NING Jingxian, YUE Shuli. Optimization of preparation conditions of *Eucalyptus* essential oil microcapsules by response surface methodology[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43(11): e14188.
[33] MA Guangrui, YIN Wenqi, SHI Zhijun, et al. Direct carboxymethylation of cellulose fibers by ternary reactive deep eutectic solvents for the preparation of high-yield cellulose nanofibrils[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, 12(15): 5871−5883.
[34] WANG Mingming, MU Hongyu, PENG Lei, et al. Effect and application of spray drying and freeze drying on characterization of walnut oil microcapsules[J]. Journal of Food Engineering, 2024, 376: 112083.
[35] DENG Wangfang, TANG Yanjun, MAO Jiangchun, et al. Cellulose nanofibril as a crosslinker to reinforce the sodium alginate/chitosan hydrogels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 189: 890−899.
[36] WU Wanying, HE Hong, DONG Qingfei, et al. Structural and rheological properties of nanocellulose with different polymorphs, nanocelluloses I and II, prepared by natural deep eutectic solvents from sugarcane bagasse[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 220: 892−900.
[37] HAN Chenlu, XIAO Yanju, LIU Enchao, et al. Preparation of Ca-alginate-whey protein isolate microcapsules for protection and delivery of *L. bulgaricus* and *L. paracasei*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163: 1361−1368.
[38] GUO Ting, PEI Ying, TANG Keyong, et al. Mechanical and drug release properties of alginate beads reinforced with cellulose[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2017, 134(8): 44495.
[39] FENG Kun, HUANG Rumeng, WU Ruiqing, et al. A novel route for double-layered encapsulation of probiotics with improved viability under adverse conditions[J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125977.
[40] SHU Feng, GUO Yingjie, HUANG Lu, et al. Production of lignin-containing nanocellulose from poplar using ternary deep eutectic solvents pretreatment[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 177: 114404.
[41] ZHANG Zipei, GU Min, YOU Xiaomeng, et al. Encapsulation of *Bifidobacterium* in alginate microgels improves viability and targeted gut release[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 116: 106634.
[42] YUAN Haibin, LI Wei, CHEN Chen, et al. Novel cinnamon essential oil-bacterial cellulose microcapsules for enhanced preservation of prefabricated meat[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282: 136851.
[43] FAREEZ I M, LIM S M, ZULKEFLI N A A, et al. Cellulose derivatives enhanced stability of alginate-based beads loaded with *Lactobacillus* plantarum LAB12 against low pH, high temperature and prolonged storage[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2018, 10(3): 543−557.