宋浩然, 刘巨龙, 刘语萌, 等. 具有抗炎活性母乳源双歧杆菌的筛选及其冻干微胶囊的制备 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(4): 226−237. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020008
SONG Haoran, LIU Julong, LIU Yumeng, et al. Screening of Breast Milk-derived Bifidobacteria with Anti-inflammatory Activity and Preparation of Freeze-dried Microcapsules Thereof[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(4): 226−237. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020008

· 生物工程 ·

具有抗炎活性母乳源双歧杆菌的筛选及其冻干微胶囊的制备

宋浩然[1,2], 刘巨龙[3,+], 刘语萌[1,4], 马美红[1,2], 李　静[1,4], 邢文涛[1,2], 武俊瑞[1,3,4], 史玉东[5,*], 乌日娜[1,3,4,*]
（1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866;
2.辽宁省食品发酵技术工程研究中心, 辽宁沈阳 110866;;
3.蒙牛高科乳制品（北京）有限责任公司, 北京 102200;
4.沈阳市微生物发酵技术创新重点实验室, 辽宁沈阳 110866;
5.内蒙古蒙牛乳业集团股份有限公司, 内蒙古呼和浩特 011500）

摘　要: 本文从健康母乳样品中分离鉴定出 21 株双歧杆菌，通过脾淋巴细胞增殖试验、药敏性、溶血性、抑菌活性以及黏附能力评价，选定具有最佳活性的菌株。通过 16S rRNA 进行鉴定后，优化冻干技术并制备冻干微胶囊。结果表明，该菌为动物双歧杆菌乳亚种（*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*），将其命名为 BA-9。*B. lactis* BA-9 具有安全性，其疏水性为 36.24%，自凝集率为 77.4%，可显著（$P<0.05$）降低 RAW264.7 细胞中 NO 活性，具有体外抗炎潜力。海藻酸钠与卡拉胶以 1∶1 制备复合壁材，加入复合冻干剂（11.25% 脱脂乳粉、4.93% 低聚木糖和 2.74% 甘油）。冻干后添加冻干保护剂的 *B. lactis* BA-9 微胶囊，经过模拟胃肠液消化，活性仅下降 1.3 lg CFU/g。在 4 ℃ 下贮藏 28 d 存活率可达 90.03%，有效提升了储藏稳定性。本研究为筛选具有免疫抗炎调节活性的双歧杆菌及其冻干载体的开发和应用提供了研究基础。

关键词: 母乳, 双歧杆菌, 菌株筛选, 抗炎活性, 冻干微胶囊
中图分类号: Q939.99　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)04−0226−12
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020008　　本文网刊:

Screening of Breast Milk-derived Bifidobacteria with Anti-inflammatory Activity and Preparation of Freeze-dried Microcapsules Thereof

SONG Haoran[1,2], LIU Julong[3,+], LIU Yumeng[1,4], MA Meihong[1,2], LI Jing[1,4], XING Wentao[1,2], WU Junrui[1,3,4], SHI Yudong[5,*], WU Rina[1,3,4,*]
（1.College of Food Science and Technology, Shenyang Agricultural Univercity, Shenyang 110866, China;
2.Liaoning Food Fermentation Technology Engineering Research Centre Liaoning Province, Shenyang 110866, China;
3.Mengniu Gaoke Dairy Products (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102200, China;
4.Shenyang Key Laboratory of Microbial Fermentation Technology Innovation, Shenyang 110866, China;
5.Inner Mongolia Mengniu Dairy Group, Co., Ltd., Hohhot 011500, China）

Abstract: In this paper, 21 strains of *Bifidobacteria* were isolated and identified from healthy breast milk samples, and the

收稿日期: 2025−02−08　　+并列第一作者
基金项目: 国家自然科学基金资助项目（32172279, 01081021002）。
作者简介: 宋浩然（1999−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物技术, E-mail: songhaoran928@163.com。
刘巨龙（1978−）, 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 乳制品研发, E-mail: liujulong@mengniu.cn。
*** 通信作者:** 史玉东（1983−）, 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品科学, E-mail: shiyudong@mengniu.cn。
乌日娜（1979−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物发酵与生物智造, E-mail: wrn6956@163.com。

strain with the best activity was selected by spleen lymphocyte proliferation assay, drug sensitivity, haemolysis, bacteriostatic activity, and adhesion capacity evaluation. After identification by 16S rRNA, the lyophilisation technique was optimised and lyophilised microcapsules were prepared. The results showed that the bacterium was *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, named BA-9. *B. lactis* BA-9 was safe, with a hydrophobicity of 36.24%, a self-agglutination rate of 77.4%, and could significantly reduce NO activity in RAW264.7 cells, with *in vitro* Anti-inflammatory potential. Sodium alginate and carrageenan were prepared as a 1∶1 composite wall with the addition of a composite lyoprotectant (11.25% skimmed milk powder, 4.93% xylooligosaccharides and 2.74% glycerol). The activity of *B. lactis* BA-9 microcapsules with the addition of lyophilisation protectant after lyophilisation decreased by only 1.3 lg CFU/g after simulated gastrointestinal fluid digestion. The survival rate of *B. lactis* BA-9 microcapsules could reach up to 90.03% for 28 days of storage at 4 ℃, which effectively enhanced the stability of storage. This study provides a research basis for the screening of *Bifidobacterium bifidum* with immuno-anti-inflammatory regulatory activities and the development and application of its lyophilised carrier.

Key words: breast milk; *Bifidobacterium bifidum*; strain screening; anti-inflammatory activity; lyophilised microcapsules

母乳益生菌最早定植于婴儿肠道，这有助于保护婴儿的肠内环境，抵御有害细菌的侵害，并增强肠道的免疫力[1]。此外，母乳益生菌可以通过维持肠道内炎症细胞因子平衡，减少炎症因子所致慢性病的发生，发挥免疫调节作用[2]。

母乳喂养对婴幼儿肠道微生物群的建立有着深远的影响，特别是它与婴儿体内双歧杆菌的存在数量和种类有关。母乳中双歧杆菌的缺乏与生命最初几年的系统性炎症和免疫紊乱的发生有关，双歧杆菌能够抑制促炎因子或促进抗炎因子的分泌进行免疫调节[3−4]。Chiu 等[5] 从母乳中分离出的 *B. infantis* GB-1496 可通过使免疫反应偏向 Th1 极化来调节免疫系统。以从溃疡性结肠炎(UC)患者静脉血液中分离的外周血单个核细胞作为研究对象，紫外照射杀灭的 *L. acidophilus* 和 *B. lactis* 增加了促炎因子(干扰素-γ、TNF-α)和抗炎因子(IL-10)和转化生长因子(TGF-β)的水平，表明两种益生菌均可触发 UC 患者的免疫调节系统[6]。双歧杆菌菌株 *B. bifidum*、*B. longum* 和 *B. longum* subsp. *Infantis* 均可使 RAW 264.7 巨噬细胞分泌的 TNF-α 的水平降低，*B. bifidum* 还可以减少另一种促炎细胞因子 IL-1β 的分泌[7]。

目前，我国人源双歧杆菌的分离来源主要是人体肠道与粪便，对母乳中双歧杆菌的研究起步晚，母乳源双歧杆菌菌种资源匮乏。由于双歧杆菌为专性厌氧菌，所以维持双歧杆菌的活力和功能特性对提高双歧杆菌的应用至关重要。但诸多因素如 pH、溶解氧水平、储存时间和温度都会影响其活力。因此，双歧杆菌的应用面临的主要挑战是确保其在生产、加工、货架储存和胃肠道消化期间具有较高的存活率[8]。将双歧杆菌制成微胶囊是有效保持其活性的重要方式[9−10]。同时，应用冷冻干燥技术将湿微胶囊转化成固态微胶囊，可以在长期保藏与运输中更好地保持益生菌的活力，增加益生菌微胶囊的使用广泛性。但在益生菌微胶囊冻干的过程中，冰晶会对细胞造成机械损伤，使蛋白质失活，改变脂肪酸结构，进而降低益生菌包埋率和活菌数。在包埋过程中添加冻干保护剂可以减少益生菌损失。本研究从健康母乳样本中筛选具有免疫调节活性的双歧杆菌，利用冷冻干燥技术制备固态微胶囊，以提高益生菌微胶囊的贮藏稳定性和使用广泛性。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

母乳　均来源于身体健康，过去半年内未接受任何药物、抗生素或益生菌补充剂的女性捐赠者；结晶紫、卢戈碘液、脂多糖(LPS，细胞培养级)、丙三醇(分析纯)　国药集团化学试剂有限公司；牛肉膏、胰蛋白胨、酵母浸粉、莫匹罗星锂盐(超纯级)、水磷酸氢二钾、七水合硫酸镁、一水合硫酸锰、无水乙酸钠、葡萄糖、L-半胱氨酸盐酸盐无水物　分析纯，北京鼎国生物技术有限责任公司；琼脂粉、魔芋胶、瓜尔豆胶、卡拉胶、黄原胶、β-环糊精、地塞米松(DEX，细胞培养级)、通用引物 1492R 和 27F、胃蛋白酶(活力≥2500 U/mg 蛋白)、胰蛋白酶(活力≥10000 BAEE U/mg 蛋白)　北京索莱宝科技有限公司；NO 检测试剂盒　上海碧云天生物技术有限公司；RAW264.7 细胞　中国科学院上海细胞库；雌性 BALB/c 小鼠　5 只，体重为 20±2 g的 6~8 周龄(许可证号 SYXK(辽)2021-0010)，哈尔滨医科大学附属第二医院研究院实验动物中心。

LAI-3 型厌氧操作台　海龙跃仪器设备有限公司；EQ610803 型 PCR 仪、U410 型超低温冰箱　德国 Eppendorf 有限公司；Eon 型酶标仪　美国 Biotek 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　母乳样品的采集　母乳样品采集时需戴一次性无菌手套，先擦拭乳头以及周围，丢弃最初的 3~5 滴母乳后收集 10 滴母乳于 50 mL 无菌样管或储存袋内。低温运输，保存于−80 ℃ 备用。

1.2.2　母乳中益生菌的分离筛选　将母乳样品稀释至原浓度 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}，分别涂布于 3 个添加莫匹罗星锂盐和 L-半胱氨酸盐酸盐无水物的改良 MRS 琼脂培养基，在 37 ℃ 厌氧条件下培养 72 h。挑取颜色、形态和大小具有差异的单菌落，划线纯化两次后

革兰氏染色镜检。

1.2.3 分子生物学鉴定 使用细菌 DNA 提取试剂盒提取目标菌株基因,将提取的菌株基因作为 PCR 的模板,使用通用引物 27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1492R(5′-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′)进行扩增[11−12]。在冰上配制反应体系,取 2X PCR 预混 Master Mix 12.5 μL,正反向引物(10 μmol/L)各 1 μL,模板 DNA(约 100 ng)1 μL,最后用无菌无核酸酶水补足至25 μL。所有反应组分应充分混匀并短暂离心。按照 PCR 扩增程序:预变性,95 ℃,持续 5 min;循环扩增(35 个循环):变性 95 ℃,60 s;退火 55 ℃,60 s;延伸 72 ℃,按 2 min/kb,扩增长约 1.5 kb 的 16S rRNA 基因片段,设置为 120 s;最终延伸 72 ℃,10 min,确保产物完整合成;保存 4 ℃ 暂时保存。PCR 反应结束后以含 1% 琼脂糖的凝胶进行核酸电泳(10 V/cm,2 h),将 PCR 产物送入上海生工公司测序,所得测序结果于美国 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,确认菌种。

1.2.4 具有免疫活性菌株的筛选

1.2.4.1 菌悬液的制备 试验菌株以 2% 的接种量接种至改良 MRS 液体培养基,37 ℃ 厌氧箱中培养 20 h 后,收集菌体(8000×g,15 min),PBS 洗涤两次,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液重悬菌体沉淀,4 ℃ 冷藏备用。

1.2.4.2 脾淋巴细胞增殖试验 动物实验经过沈阳农业大学伦理委员会批准(伦理号:2023102702)。小鼠脾淋巴细胞的制备参照万峰等[13]的方法。用 MTT 法测定淋巴细胞增殖活性。将小鼠淋巴细胞培养 24 h 后,用不同浓度的菌株上清液和无细胞提取液处理 24 h。用 MTT 溶液(0.2 mg/mL)处理小鼠淋巴细胞,并在37 ℃ 恒温培养箱中孵育 4 h。将通过 MTT 产生的甲瓒产物溶解在二甲基亚砜(150 μL)中,并使用酶标仪在 490 nm 测量 OD 值,以不添加菌株的 DMEM培养基为空白对照,每组设置 6 个重复。在无菌 96 孔板中每孔加入 180 μL 细胞悬液,试验组每孔再加入 20 μL 浓度为 10^6、10^7、10^8 CFU/mL 的双歧杆菌,在 450 nm 测量 OD 值(OD_1);双歧杆菌对照组为 180 μL 的细胞培养液加入 20 μL 上述不同浓度的菌悬液,在 450 nm 测量 OD 值(OD_2);阳性对照组加入 20 μL 浓度为 5 μg/mL 刀豆蛋白 A(ConA),在 450 nm 测量 OD 值(OD_3),计算淋巴细胞增殖指数。

$$\text{脾淋巴细胞增殖指数} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_3}$$

式中:OD_1 为试验组;OD_2 为双歧杆菌对照组;OD_3 为阳性对照组。

1.2.5 菌株安全性评价

1.2.5.1 药敏性试验 参照胡鹏钰[14]的方法,采用药敏纸片琼脂扩散法测定。吸取 0.1 mL 菌悬液(1×10^8~1×10^9 CFU/mL)涂布到 15 mL MRS 琼脂培养基表面,待吸收完全后,将药敏纸片贴放表面,培养 48 h,然后测量抑菌圈直径。

1.2.5.2 溶血性试验 参照周海欧等[15]的方法,将活化两代后的菌株划线接种于哥伦比亚血琼脂培养基中 37 ℃ 培养 48 h 后观察。

1.2.6 菌株抑菌活性测定 制备 1×10^7 CFU/mL 的双歧杆菌菌悬液,参照朱晓萍等[16]的方法。采用琼脂打孔法观察并测量抑菌圈直径,测定双歧杆菌的抑菌活性。

1.2.7 菌株黏附能力评价

1.2.7.1 表面疏水性的测定 参照刘雪等[17]的方法。将菌株培养至对数生长期后,8000 r/min 离心 15 min 收集菌体,PBS 洗涤两次后重悬,在 600 nm 测量 OD 值(A_0)。将 1 mL 二甲苯加入到 3 mL 细菌悬液中,涡旋混匀 2 min,37 ℃ 孵育 1 h,分离水相和二甲苯相,测量水相的吸光度(A_1),计算菌株疏水性。

$$\text{疏水性}(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$$

式中,A_1 为混合后吸光值;A_0 为菌液初始吸光值。

1.2.7.2 自凝集性的计算 参照郭志华等[18]的方法,计算菌株自凝集率。

$$\text{自凝集率}(\%) = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100$$

式中,A_t 为菌悬液分别在 0、4、8、12 和 18 h 的吸光值;A_0 为 0 h 的吸光值。

1.2.8 细胞的培养 RAW264.7 细胞的培养:在 DMEM 完全培养基(含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素)中生长,并在 37 ℃ 下在具有 5% CO_2 的培养箱内培养。

1.2.9 RAW264.7 炎症细胞中 NO 含量的测定 取生长状态良好的 RAW264.7 细胞,以 2×10^5 细胞/mL 接种于无菌 6 孔板中(100 μL/孔),置于 CO_2 细胞培养箱中 24 h,作为空白组;模型组中加入 1 μg/mL LPS;实验组中加入 100 μL 的双歧杆菌悬液预处理 1 h,然后加入 1 μg/mL LPS,置于培养箱中继续培养;阳性对照组加入 1 μg/mL LPS 后再加入 0.1 μg/mL DEX。每组试验设 3 组复孔。24 h 后收集 50 μL 上清于 96 孔酶标板中,按照试剂盒说明书步骤检测 NO 浓度。

1.2.10 系统发育树的构建 将通过 16S rRNA 测序获得的双歧杆菌序列提交至数据库(Gen Bank)中进行同源序列搜索(BLAST search),利用 Neighbor-joining 统计方法选择 Bootstrap method 法建发育树。

1.2.11 微胶囊的制备

1.2.11.1 制备工艺 将双歧杆菌 BA-9 在 37 ℃ 厌氧培养 24 h 后,收集菌泥(离心 5000 r/min,5 min),

用 PBS 洗涤后重悬至 10^9 CFU/mL。取一定量的菌液，加入冻干保护剂，与 2% 的海藻酸钠和 10% 的卡拉胶 1∶1∶1 混匀成菌悬液，搅拌 30 min。采用注射器逐滴加入 2% 的氯化钙中，静置 30 min，PBS 洗涤 3 次，得湿胶囊。将样品在−80 ℃ 中预冻 1 h 后，于冷冻干燥机中冻干 24 h，得冻干微胶囊。

1.2.11.2　第二壁材和复合壁材配比的选择　按照 1.2.11.1 的方法制备微胶囊。以海藻酸钠作为第一壁材，包埋率为评价指标。首先以第二壁材为单因素，比较魔芋胶、β-环糊精、卡拉胶、瓜尔豆胶和黄原胶作为第二壁材的包埋率，选择其一作为最优第二壁材；之后分别以不同的复合壁材配比为单因素，制备双歧杆菌微胶囊，确定包埋率最高的复合壁材配比。

1.2.11.3　冻干保护剂的优化　开展单因素实验：分别调整脱脂乳粉（添加量设置为 5%、10%、15%、20%、25%）、低聚木糖（2%、4%、6%、8%、10%）、甘油（1%、2%、3%、4%、5%）的用量，每次仅改变其中一种保护剂的添加量，另外两种固定为中间水平（即脱脂乳粉 15%、低聚木糖 6%、甘油 3%），通过对比不同组的活菌载率，确定每种保护剂的最适添加量。

1.2.11.4　响应面试验　在保护剂的单因素实验的基础上，按表 1 进行响应面试验，以双歧杆菌最终活菌载率为考察指标，确定复配保护剂的最佳配比。

表 1　响应面试验因素水平设计

Table 1　Response surface test factor level design

水平	因素		
	A脱脂乳粉添加量(%)	B低聚木糖添加量(%)	C甘油添加量(%)
−1	5	2	1
0	10	4	2
1	15	6	3

1.2.11.5　微胶囊包埋率与最终活菌载率测定及得率的计算　取制备好的微胶囊置于解囊液中，37 ℃ 振荡 30 min，计算单位活菌数。

$$包埋率(\%)=\frac{N_1}{N_0}\times 100$$

$$最终活菌载率(\%)=\frac{N_2}{N_0}\times 100$$

式中：N_0 为菌悬液活菌数，CFU/mL；N_1 为湿微胶囊中总的活菌数，CFU/g；N_2 为冻干微胶囊中总的活菌数，CFU/g。

1.2.12　动物双歧杆菌 BA-9 微胶囊的特性评价

1.2.12.1　微胶囊体的外消化试验　参照张传伟等[19]的方法进行耐酸试验，和肠溶性试验。耐酸试验将 NaCl 和胃蛋白酶悬浮在浓 HCl 中，并用蒸馏水稀释至 1 L，配制模拟胃液的 pH 为 2.0。分别取 1 g 添加保护剂和未添加保护剂的微胶囊并加入 10 mL 的模拟胃液，于 37 ℃ 下振荡 2 h，分别在 0、30、60、90、120 min 取样离心（5000 r/min，5 min）收集微胶囊，并加入 10 mL 的无菌 PBS 缓冲液，于 37 ℃ 下振荡 1 h，使用倾注平板法进行计数，计算其存活率；肠溶性试验将 KH_2PO_4 和胰蛋白酶溶于适量的蒸馏水中，配制模拟肠液的 pH 为 7.5 后，稀释至 1 L 备用。分别取 1 g 添加及未添加冷冻保护剂的微胶囊加入 10 mL 的模拟肠液，于 37 ℃ 恒温振荡器中振荡培养 3 h，依次在 20、40、60、120、180 min 取样，使用倾注平板法进行精确计数，计算其释放率。

1.2.12.2　微胶囊贮藏稳定性　参照常诗晗等[20]的方法。将益生菌微胶囊分装于 2 mL 离心管中，在 4、25 ℃ 温度条件下保存 4 周。每周取 1 管，评价储存稳定性。

1.3　数据处理

以 3 次平行重复的测定结果为基础，使用 SPSS 23.0 软件统计数据，进行单因素方差分析和多重比较分析。$P<0.05$ 认为显著差异，并用 Origin 2018 生成图表。

2　结果与分析

2.1　菌株的分离及形态学鉴定结果

从不同地区采集的 41 份健康母乳中共分离出 159 株细菌。部分菌落和菌株形态观察结果如图 1 所示。菌株在改良 MRS 固体培养基中呈圆形，中心隆起，表面湿润光滑，革兰氏染色呈 G+，表现为多形性有 V 型、X 型或 Y 型。

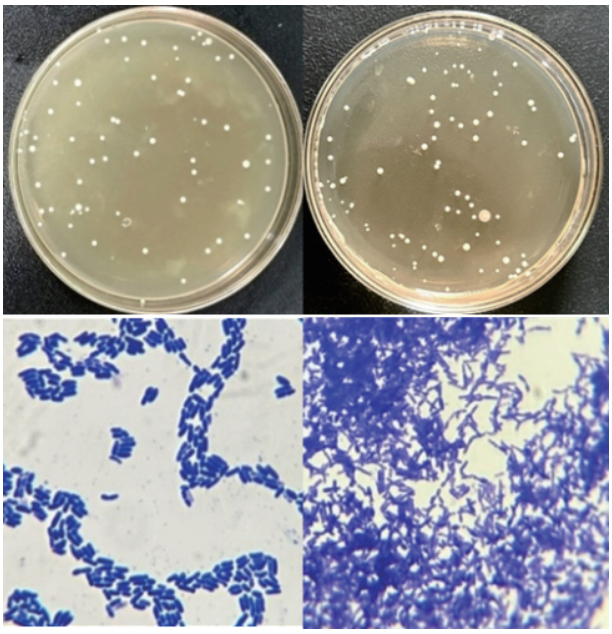


图 1　部分菌株的菌落与镜检形态（1000×）

Fig.1　Colony and microscopic morphology of some strains (1000×)

2.2　菌株的分子生物学鉴定

以菌株 DNA 为模板，经 PCR 扩增后进行凝胶电泳，电泳条带如图 2 所示。由图 2 可知，经琼脂糖凝胶电泳检测得到单一清晰明亮、无弥散现象的条带，与目标片段长度相符，可进行 16S rRNA 鉴定。

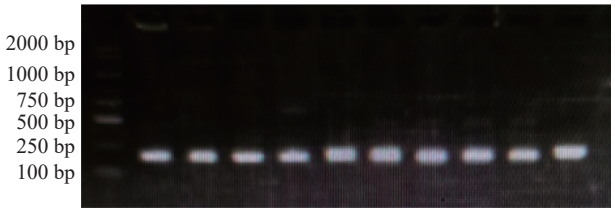


图 2 部分菌株 PCR 产物检测电泳图

Fig.2 PCR products detection electrophoregram of some strains

将测序结果与 GenBank 数据库 BLAST 比对，进行同源性分析。对比分析结果如表 2。从 41 份样品中共分离纯化出益生菌 25 株。其中双歧杆菌 21 株、鼠李糖乳杆菌 3 株、副干酪乳杆菌 1 株(见表 2)。

表 2 菌株编号及 16S rRNA 序列同源性对比结果

Table 2 Strain number and 16S rRNA sequence homology comparison results

菌株编号	鉴定结果	序列号	同源性(%)
SY-2-1	*Bifidobacterium bifidum* strain 2559	MT611590.1	99.43
SY-4-3	*Bifidobacterium longum* subsp. *suillm* strain 3056	MT613467.1	99.72
SY-5-9	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain CPS119	MN341167.1	100
SY-6-8	*Bifidobacterium longum* strain NPL922	MK908344.1	100
SY-6-G2	*Lacticaseibacillus rhamnosus* strain CPS82	MN341130.1	100
SY-6-G7	*Lacticaseibacillus rhamnosus* strain CPS96	MN341144.1	100
SY-17-Z4	*Lacticaseibacillus rhamnosus* strain 6577	MT463821.1	94.93
PJ-1-17	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain HTBS-007	KM096589.1	98.09
PJ-1-J8	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain CPS127	MN341175.1	100
LY-1-2	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain CPS121	MN341169.1	100
LY-1-Z8	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain 913	MT585582.1	100
LY-1-12	*Lactobacillus paracasei* strain NMCC-91	MN088853.1	100
DD-1-M6	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain 3296	MT613598.1	99.35
CY-2-3	*Bifidobacterium dentium* strain 4773	MT640279.1	100
CY-1-8	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain CPS127	MN341175.1	100
QD-1-C7	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain V1963	OR432267.1	100
GZ-1-5	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain 3296	MT613598.1	99.35
BJ-1-3	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain 3227	MT613564.1	100
HH-1-15	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain CPS124	MN341172.1	100
HH-1-16	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain 3227	MT613564.1	100
BA-9	*Bifidobacterium animalis* strain B01	CP138633.1	100
TL-1-G9	*Bifidobacterium longum* subsp. *suillum* strain 3056	MT613467.1	99.72
TL-1-3	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain CPS119	MN341167.1	100
TL-1-4-2	*Bifidobacterium animalis* strain Probio-M8	CP047190.1	99.81
JZ-1-3	*Bifidobacterium bifidum* strain VSI20	CP118071.1	99.43

2.3 菌株对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

菌株体外对小鼠脾淋巴细胞的增殖作用见图 3，在双歧杆菌与小鼠脾细胞以 1∶1 和 10∶1 的比例分别共孵育时，有 7 株菌株的脾淋巴细胞增殖指数均>1，具备增殖能力；其中菌株 BA-9、TL-1-4-2 等在细胞比 100∶1 时，增殖作用与阳性对照组无显著性差异(P>0.05)，免疫调节活性最优。淋巴细胞增殖试验是体外评估益生菌免疫调节能力的常用方法，李艾黎等[21]曾用该试验评估 7 种乳杆菌的免疫调节能力，验证了其在初筛潜在免疫调节乳酸菌株中的适用性；周瑜等[22]也通过该试验证实两歧双歧杆菌 FL-228.1 可增强细胞介导的免疫—这些研究也支撑了本试验的合理性。

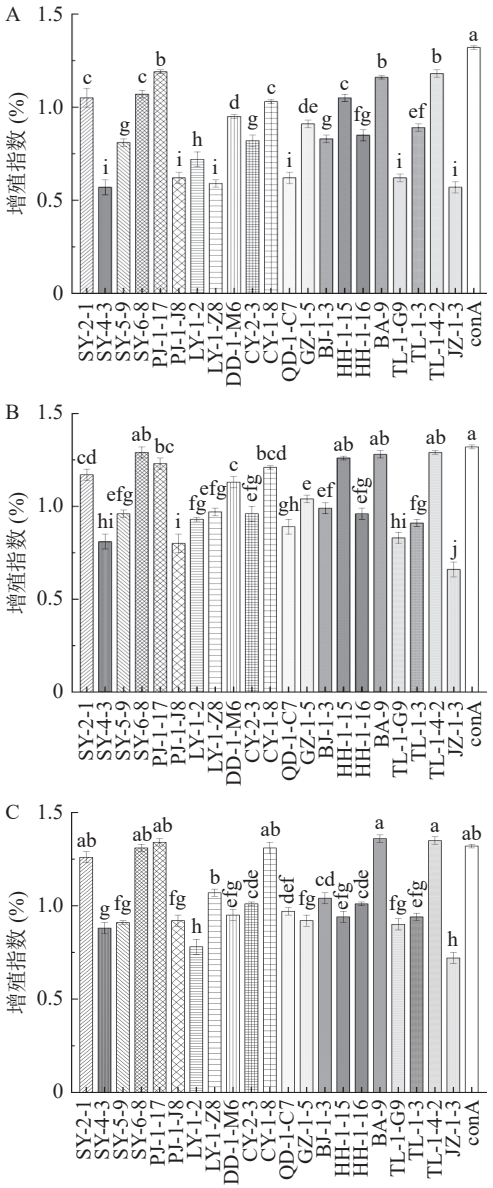


图 3 双歧杆菌对脾淋巴细胞增殖指数的影响

Fig.3 Effect of Bifidobacterium on spleen lymphocyte proliferation index

注：不同小写字母表示组间数据差异显著(P<0.05)，图 5、图 7 同；A、B、C 的菌数-细胞数比例依次为 1∶1、10∶1、100∶1。

根据图 3 中不同菌数-细胞数比例下各个益生菌的增殖指数，选择较好的七株菌株：SY-2-1、SY-6-8、

PJ-1-17、CY-1-8、HH-1-15、BA-9 和 TL-1-4-2 进行下一步益生评价试验。

2.4　安全性评价

2.4.1　菌株药敏试验　采用 10 种常用抗生素对候选菌株进行抗生素敏感试验，结果如表 3 所示。菌株对抗生素的敏感性是其在食品生产中选择和使用的重要因素[23]。由表 3 可知，7 株测试菌株对青霉素类（氨苄西林）、氨基糖苷类（庆大霉素、链霉素）与四环素类抗生素（四环素）更多地表现出耐药性，大多数测试菌株对 β-内酰胺酶抑制剂复合物（阿莫西林）、糖肽类（氯霉素、万古霉素）和大环内酯类抗生素（红霉素）有不同程度的敏感。这一发现对于评估其作为益生菌的潜力具有重要意义，因为它们在保持对多种抗菌药敏感的同时，只对少数抗菌药表现出耐药性。这种特性可能有助于减少益生菌使用过程中对抗菌药敏感性的影响，与之前益生菌相关研究报道结果相似[24]。

表 3　双歧杆菌抗生素敏感试验结果

Table 3　Bifidobacteria antibiotic sensitivity test results

菌株编号	抗生素									
	阿莫西林	氨苄西林	庆大霉素	链霉素	四环素	头孢霉素	氯霉素	万古霉素	阿卡米星	红霉素
SY-2-1	I	R	R	R	S	I	I	S	R	S
SY-6-8	S	R	R	R	I	R	S	S	R	S
PJ-1-17	I	R	I	R	I	S	S	S	R	S
CY-1-8	S	R	R	R	R	I	S	R	I	S
HH-1-15	S	R	R	I	R	S	S	S	I	S
BA-9	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S
TL-1-4-2	S	S	R	S	I	I	S	S	R	S

注：根据美国CLSI抗微生物药物敏感试验执行标准；R：耐药；I：中度敏感；S：敏感。

2.4.2　菌株溶血试验　本试验菌株溶血情况如表 4 所示。溶血性是评价益生菌安全性的重要指标，其中菌落周围无 γ-溶血区表明该生物是安全的。由表 4 可知，母乳中分离的双歧杆菌全部无溶血环出现，为 γ 溶血，具有安全性，与徐芳婷等[25]、李俊飞等[26] 的研究结果相似，符合食品安全要求。

表 4　双歧杆菌溶血特性

Table 4　Hemolytic characteristics of *Bifidobacterium*

序号	菌株编号	溶血性
1	SY-2-1	γ
2	SY-6-8	γ
3	PJ-1-17	γ
4	CY-1-8	γ
5	HH-1-15	γ
6	BA-9	γ
7	TL-1-4-2	γ

注：溶血分为：α溶血（部分溶血）、β溶血（完全溶血）、γ溶血（不溶血）。

2.5　菌株抑菌能力测定结果

菌株抑菌能力测定结果见表 5 所示。益生菌产生有机酸等物质，能够抑制致病菌的生长。以维持肠道微生物平衡，保护人体免疫系统[27]。结果如表 5 所示，其中 BA-9 综合抑菌能力最为突出，抑菌圈直径介于 18~26 mm 之间。对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌、大肠杆菌的抑菌效果显著优于张迪等[28] 筛选的 *Lactip-lantibacillus plantarum* HOM3201（16 mm≤金黄色葡萄球菌抑菌圈直径<23 mm，11 mm≤沙门氏菌抑菌圈直径 16 mm）和 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HOM1119（16 mm≤金黄色葡萄球菌抑菌圈直径<23 mm，16 mm≤沙门氏菌抑菌圈直径 23 mm），也优于王宵等[29] 筛选的植物乳杆菌 WX-1 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果（抑菌圈直径为 24.93±0.56 mm）。

表 5　双歧杆菌抑菌圈直径大小（mm）

Table 5　Bifidobacteria inhibition zone diameter size (mm)

菌种	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
SY-2-1	11.86±0.25^{cd}	17.40±0.08^{c}	17.30±0.56^{c}
SY-6-8	9.90±0.43^{e}	25.00±0.03^{a}	15.20±0.25^{c}
PJ-1-17	10.69±0.53^{de}	14.98±0.73^{de}	16.70±0.43^{c}
CY-1-8	20.16±0.25^{a}	23.21±0.35^{ab}	24.12±0.10^{a}
HH-1-15	13.05±0.12^{c}	14.17±0.32^{e}	22.75±0.09^{b}
BA-9	18.30±0.34^{b}	25.92±0.35^{a}	23.63±0.09^{a}
TL-1-4-2	20.30±0.05^{a}	17.71±0.16^{c}	21.42±0.08^{b}

注：不同小写字母表示组间数据差异显著（P<0.05），表6同。

2.6　菌株黏附能力测定结果

2.6.1　菌株表面疏水性测定结果　筛选菌株表面疏水性测定结果如表 6 所示。

表 6　双歧杆菌表面疏水性评价

Table 6　Evaluation of surface hydrophobicity of *Bifidobacterium*

菌种	疏水作用力（%）	疏水性
SY-2-1	15.02±0.43^{c}	弱疏水性
SY-6-8	7.92±1.89^{e}	弱疏水性
PJ-1-17	8.95±0.86^{de}	弱疏水性
CY-1-8	37.21±1.83^{a}	中疏水性
HH-1-15	10.15±1.07^{d}	弱疏水性
BA-9	36.24±1.20^{a}	中疏水性
TL-1-4-2	21.89±1.31^{b}	弱疏水性

注：疏水性判定标准为：71%~100%为强疏水性，36%~70%为中疏水性，低于35%为弱疏水性[30]。

益生菌的疏水性与附着于肠道上皮细胞的能力相关，菌株的疏水性越强，粘附在肠道的可能性越大。如表 6 所示，其中菌株 CY-1-8 和 BA-9 疏水性最高，显著高于其他菌株（P<0.05）。

2.6.2　菌株自凝集能力测定结果　筛选菌株自凝集能力测定结果如图 4 所示。具有高自凝集能力的菌株在竞争宿主结合位点时拥有优势，有助于在肠道内定植[31]。如图 4 所示，菌株 HH-1-15 和 BA-9 随着时间的推移，在 18 h 时自凝集率达到 70% 以上。乳酸菌 SQ0048 在 3 h 的自凝集率达到最高为 68.69%[32]；16 h 时，植物乳杆菌 YZH81 和 YZH81Δcps1 的自凝集率最高分别是 52.07%、68.90%。与之前的试验相比，菌株 HH-1-15 和 BA-9 属于高自凝集能力，具有较好的肠上皮细胞粘附能力[33]。

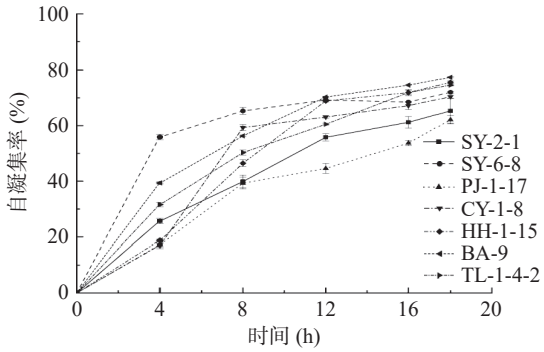


图 4 双歧杆菌自凝集能力

Fig.4 Self-agglomeration ability of *Bifidobacterium*

2.7 RAW264.7 炎症细胞中 NO 含量的测定结果

动物双歧杆菌 BA-9 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响测定结果如图 5 所示。

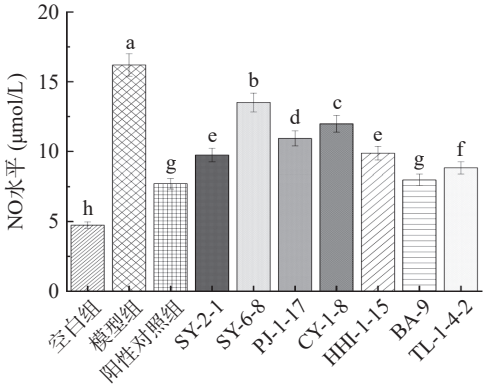


图 5 RAW264.7 细胞中 NO 活性测定结果

Fig.5 Results of NO activity assay in RAW264.7 cells

NO 作为一种重要的炎症介质，在控制宿主的炎症状态和免疫应答中起关键作用。在 RAW264.7 细胞中，NO 的过量产生表明细胞受到炎症刺激，其分泌量可直接反映炎症程度。如图 5 所示，与空白组相比，模型组 NO 的产生显著增加（P<0.05）。与模型组相比，7 株菌株 NO 含量都有不同程度的下降，其中菌株 BA-9 组效果最佳，与阳性对照组相比，无显著性差异（P>0.05）。结果表明，这 7 株动物双歧杆菌均能显著减少 LPS 刺激 RAW264.7 细胞模型中 NO 的产生，抑制炎症反应，其中 BA-9 作用效果最为明显。

综上所述，菌株 BA-9 具有优异的免疫调节活性、安全性、肠道适应性以及抗炎活性，因此选择菌株 BA-9 进行后续试验。

2.8 系统发育树构建

菌株 BA-9 的 16S rRNA 序列构建的系统发育树如图 6 所示。

结果显示，所分离菌 BA-9 鉴定为双歧杆菌，BLAST 检索发现其与典型菌株的相似性指数为 100%。菌株 BA-9 与动物双歧杆菌乳亚种 V4177 聚在一起，结合菌落形态鉴定为 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain。

2.9 复合壁材的筛选

双歧杆菌作为严格厌氧的益生菌，一旦遭遇氧气暴露或酸性环境等不利因素，存活率会显著下降[33]。将双歧杆菌进行包埋制成微胶囊，能够提高双歧杆菌在各种不利外界环境中的活性。

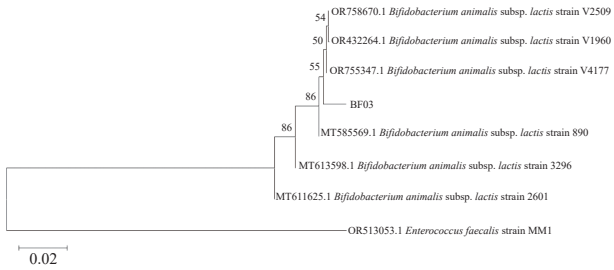


图 6 *B. lactis* BA-9 与相关菌株的系统发育树

Fig.6 *B. lactis* BA-9 and the phylogenetic tree of related strains

海藻酸钠是工业上制备微胶囊的常用壁材，但存在孔隙，在强酸、氧气条件下对双歧杆菌的保护效果并不理想[34]。因此，选择第二壁材与海藻酸钠复配使用，可以有效提高双歧杆菌的保护效果[35]。如图 7A 所示，以卡拉胶为第二壁材制备的微胶囊包埋率为 81.92%±1.45%，与其余壁材相比较有优势。因此，选择卡拉胶与海藻酸钠复合制备微胶囊。由图 7B 可知，海藻酸钠与卡拉胶质量比为 1∶1 时，动物双歧杆菌 BA-9 微胶囊的包埋率最高。这是由于卡拉胶浓度较低时，其硫酸基团所携带的负电荷较少，与溶液中其他物质所携带的正电荷结合不充分，导致微胶囊的密度不够[36]。当卡拉胶浓度持续增加时，黏度增大，会给微胶囊的挤出带来一定的困难。

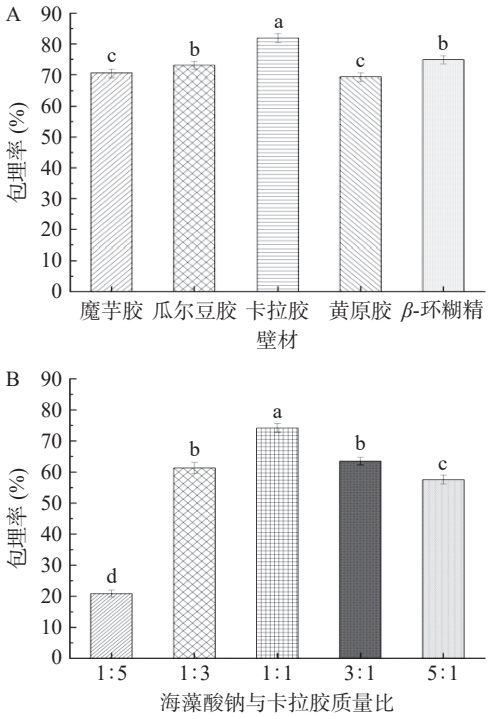


图 7 不同壁材以及不同的壁材质量比制备动物双歧杆菌 BA-9 微胶囊的包埋率

Fig.7 Encapsulation rate of *B. lactis* BA-9 microcapsules prepared with different wall materials and with different wall mass ratios

2.10　冻干保护剂的优化

2.10.1　不同保护剂对冻干微胶囊的活菌载率的影响

不同保护剂添加量对双歧杆菌冻干微胶囊的最终活菌载率的影响结果如图 8 所示。

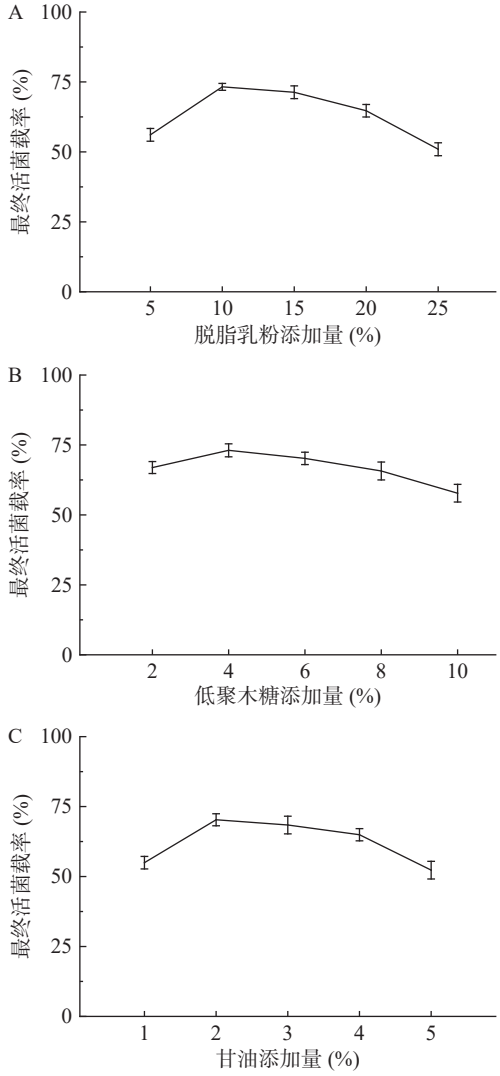


图 8　不同保护剂对双歧杆菌冻干微胶囊的最终活菌载率的影响

Fig.8　Effect of skim milk powder on the final viable cell loading rate of *Bifidobacterium* freeze-dried microcapsules

在包埋过程中添加冻干保护剂可以减少益生菌在冷冻干燥过程中的失活和死亡率[37]。如图 8 所示，脱脂乳粉、低聚木糖和甘油添加量分别为 10%、4% 和 2% 时，最终活菌载率达到最高点，选定为添加量。

2.10.2　模型建立与显著性分析　以脱脂乳粉、低聚木糖与甘油添加量三个因素进行响应面设计优化试验。以动物双歧杆菌 BA-9 冻干微胶囊的最终活菌载率(%)为响应值，对双歧杆菌微胶囊的复合冻干保护剂进行优化。

应用 Design-Expert 13 软件，进行数据拟合分析，结果见表 7。回归方程为：Y=75.54+2.80A+03.40B+2.55C+1.77AB+3.28AC+2.48BC−6.76A^2−4.76B^2−4.96C^2。模型的方差分析如表 8 所示，该试验模型 P<0.001，失拟项 P=0.5349>0.05，模型极显著，失拟项不显著，说明该模型可较好地反映各因素与微胶囊中双歧杆菌存活率的关系。本试验模型的决定系数 R^2=0.9745，影响最终活菌载率的主次顺序依次为 B>A>C，即低聚木糖添加量>脱脂乳粉添加量>甘油添加量，因素 A、B、C、A^2、B^2、C^2 和交互项 AC、BC 对微胶囊中双歧杆菌存活率影响显著(P<0.05)。

表 7　Box-Benhnken Design 试验结果

Table 7　Box-Benhnken design test results

实验号	A	B	C	最终活菌载率(%)
1	1	1	0	72.4
2	0	1	1	72.8
3	1	0	−1	60.8
4	0	0	0	76.8
5	0	0	0	76.5
6	0	0	0	76.4
7	0	0	0	76.8
8	−1	1	0	64.3
9	0	−1	1	62.9
10	0	−1	−1	63.8
11	1	−1	0	60.2
12	−1	0	1	60.3
13	0	0	0	76.2
14	1	0	1	73.5
15	−1	−1	0	59.2
16	0	1	−1	63.8
17	−1	0	−1	60.7

表 8　回归模型方差分析

Table 8　Variance analysis of regression model

因素	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	722.57	9	80.29	19.43	0.0004	***
A	62.72	1	62.72	15.18	0.0059	**
B	92.48	1	92.48	22.38	0.0021	**
C	52.02	1	52.02	12.59	0.0094	**
AB	12.60	1	12.60	3.05	0.1243	
AC	42.90	1	42.90	10.38	0.0146	*
BC	24.50	1	24.50	5.93	0.0451	*
A^2	192.27	1	192.27	46.53	0.0002	***
B^2	95.30	1	95.30	23.06	0.0020	**
C^2	103.48	1	103.48	25.04	0.0016	**
残差	28.93	7	4.13			
失拟项	11.26	3	3.75	0.8492	0.5349	
纯误差	17.67	4	4.42			
总和	751.5	16				

注：*显著(P<0.05)；**非常显著(P<0.01)；***极显著(P<0.001)。

2.10.3　响应面交互作用　图 9 是因素间显著/极显著交互项的响应曲面图，反映脱脂乳粉、低聚木糖、甘油添加量对双歧杆菌 BA-9 冻干微胶囊活菌载率的影响。响应面呈凸面时模型存在最大值点，曲面坡度越陡，两因素交互作用越强。从图 9 可看出：A(脱脂乳粉)与 C(甘油)、B(低聚木糖)与 C 的响应面坡度较陡，说明这两组因素的交互作用较强；但 A 与 B 的响应面坡度相对平缓，结合统计结果中这两组交

互项的 P 值(AC 的 P<0.05, BC 的 P<0.05), 说明这两组因素的交互作用显著; 但 A 与 B 对应的响应面坡度相对平缓, 底面等高线分布稀疏, 同时该组交互项的 P 值>0.05, 由此可明确 A 与 B 的交互作用并不显著。当固定其他因素为零水平时, 单独增加脱脂乳粉、低聚木糖或甘油的添加量, 双歧杆菌存活率会呈现“先升高后降低”的趋势——这说明在本次试验的因素参数范围内, 各单因素对应的活菌载率均存在极值, 因此可基于这些响应面结果, 预测双歧杆菌微胶囊化的最佳工艺条件。

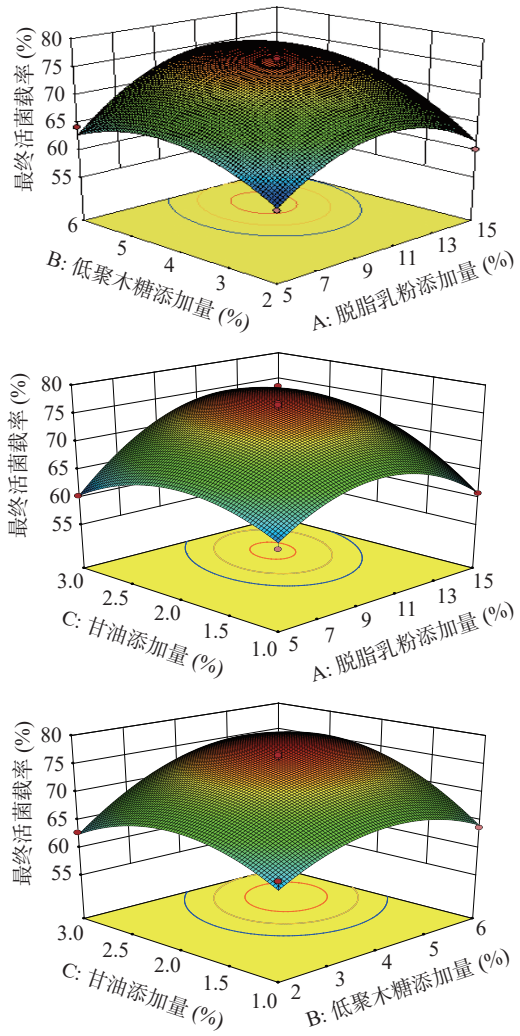


图 9 低聚木糖、脱脂乳粉和甘油交互作用对最终活菌载率影响的响应面

Fig.9 Response surface of the effect of interaction between xylo-xylooligosaccharides, skim milk powder and glycerol on the final viable bacterial load rate

2.10.4 最佳包埋条件的预测及验证实验 根据所建立的二次响应面回归方程, 预测各因子的添加量分别为: 脱脂乳粉添加量 11.25%, 低聚木糖添加量 4.93%, 甘油添加量 2.74%, 预测最大活菌载率为 77.20%。在该最优条件下进行验证试验, 双歧杆菌微胶囊在使用复合保护剂(脱脂乳粉添加量 11.25%、低聚木糖添加量 4.93%、甘油添加量 2.74%)冷冻干燥后, 最终活菌载率可达 77.03%±0.42%, 最佳工艺的稳定性较好。同时, 与数学模型预测的最终活菌载率基本相符, 说明得到的数学模型与试验数据拟合较好。

2.11 动物双歧杆菌 BA-9 微胶囊的消化特性

双歧杆菌菌粉与微胶囊模拟胃液后活菌数测定结果, 以及双歧杆菌冻干微胶囊在肠液中的释放性测定结果如图 10 所示。

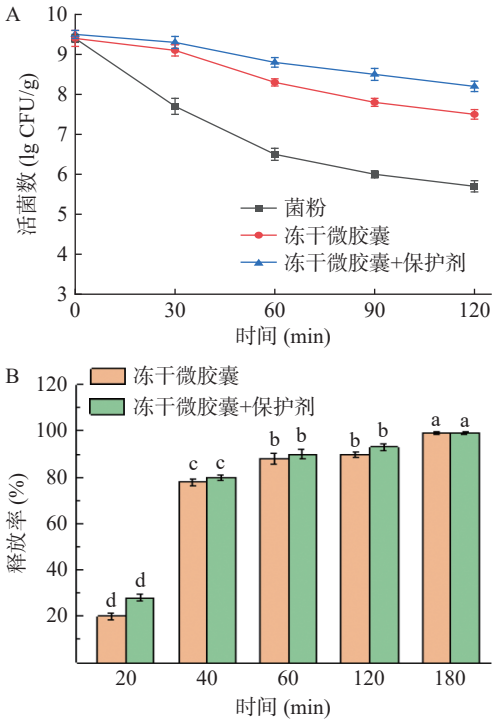


图 10 双歧杆菌菌粉与微胶囊模拟胃液后活菌数以及双歧杆菌冻干微胶囊在人工肠液中的释放率

Fig.10 Viable count and the release rate of freeze-dried *Bifidobacterium* microcapsules in artificial intestinal juice after simulating gastric juice with *Bifidobacterium* powder and microcapsules

注: 不同小写字母表示相同样品组不同时间数据差异显著, P<0.05。

由图 10 可知, 添加保护剂的双歧杆菌微胶囊在模拟胃液后活菌数仅下降 1.3 个对数值, 活菌数显著高于未添加保护剂冻干微胶囊组和菌粉组(P<0.05)。添加冻干保护剂后微胶囊的释放量略高于未添加组, 且在模拟肠液 60 min 后双歧杆菌基本全部释放, 具有良好的肠溶性。周莉等[37] 制备的沙棘益生菌微胶囊在模拟肠液 60 min 时, 益生菌被连续的释放出来, 与本研究结果一致。

2.12 微胶囊的贮藏稳定性

动物双歧杆菌微胶囊在 4 ℃ 和 25 ℃ 条件下的贮藏稳定性测定结果如图 11 所示。由图 11 可知, 微胶囊包埋后提高了贮藏期间双歧杆菌的存活率, 且添加冻干保护剂组的菌株存活率更高。4 ℃ 低温贮藏 28 d 后, 添加保护剂的双歧杆菌冻干微胶囊中菌株存活率为 90.03%, 较好的保持了双歧杆菌的稳定性。李宜春[10] 在双歧杆菌与嗜酸乳杆菌微胶囊冻干

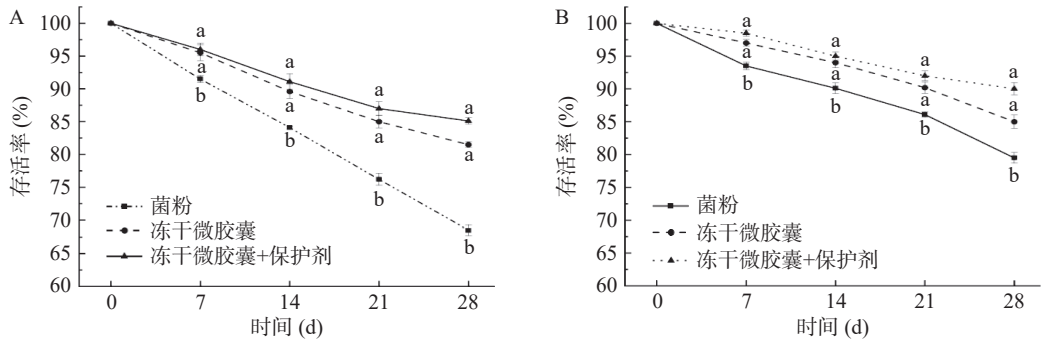


图 11　动物双歧杆菌微胶囊在不同温度下贮藏稳定性

Fig.11　Storage stability of *Bifidobacterium* animalis microcapsules at different temperatures

注：A. 4 ℃；B. 25 ℃；不同小写字母表示同一时间数据差异显著（P<0.05）。

过程中添加保护剂，混菌的存活率提高了 5.9%，与本研究相似。

3　讨论与结论

通过广泛的试验研究，大量的双歧杆菌菌株已经显示出了其作为益生菌的明确潜力。但在进食后，胃内的 pH 可上升至 3.5，同时，由于肠道内包含胆盐等抑菌性物质，能否在胃肠道的酸性环境和高胆盐水平下存活，是其在肠道内定植并发挥作用的先决条件[38]。益生菌黏附能力与其表面疏水性有直接联系，较好的粘附能力是发挥益生作用的基础，这有助于双歧杆菌在肠道中稳定存在，阻挡病原菌对肠道的侵袭，并且它们还需要以充足的数量聚集以充分发挥其益生作用。随着广谱抗生素在医疗保健行业使用日益增加，导致病原菌对抗生素的抗性不断增强，进一步引发了人体肠道微生物群的不平衡[39]。因此，评估益生菌对抗生素的敏感也是其应用于食品工业的必要条件。

本文从不同地区母乳样品分离得到 21 株双歧杆菌，筛选得到 7 株具有体外抗炎潜力以及安全性的菌株，4 株菌株自凝集率大于 80%。其中菌株 BA-9 具有最优的肠道适应性优于 Damaceno 等[39] 从母乳中筛选出的短双歧杆菌，同时具有较好的体外抗炎活性。巨噬细胞在非特异性免疫应答中发挥重要作用。在炎症过程中，巨噬细胞会响应趋化信号向受损组织迁移，并通过吞噬作用消除侵入宿主体内的细菌、异物和受损细胞。同时，它们将处理后的抗原信息展示给 T 细胞，触发进一步的免疫反应。双歧杆菌对免疫和炎症机制的调节有关键作用。Noh 等[40] 研究表明，热灭活 *Lactiplantibacillus plantarum* CKDB008 对 RAW264.7 细胞具有免疫调节作用。这些效应由巨噬细胞活化引起，表现为活化的吞噬作用以及对 NO 和促炎细胞因子的调节。万峰等[13] 发现，腹腔巨噬细胞的能量代谢水平与 *B. animalis lactis* H15-2 的菌体浓度之间表现出剂量依赖性，这暗示了其能够调节巨噬细胞的活性。

在产品加工过程中，益生菌活性的维持至关重要，通过胶囊化封装益生菌可以提高其在功能性食品加工中的活力，并保持其在食用前后的代谢活性[41]。Huang 等[41] 将双歧杆菌封装在果胶微胶囊中，显著提高了模拟婴儿胃肠消化过程中双歧杆菌的活力。另一项研究中，通过乳化法制备动物双歧杆菌 F1-7 微胶囊，使其在模拟胃肠液和储存过程中的活力得到提高[40]。此外，冷冻干燥可以更好地保持益生菌微胶囊的活力、提高货架期稳定性以及扩大应用范围。添加冷冻保护剂可以防止冷冻阶段益生菌的细胞损伤以及机械应力，从而降低益生菌的损伤。Zhou 等[42] 以海藻糖作为冷冻保护剂，将 *Streptococcus thermophilus* IFFI6038 与藻酸盐混合，通过挤压法制备微胶囊，冻干后的微胶囊在贮藏期以及胃酸环境中的稳定性均得到改善。

微胶囊化保护在双歧杆菌生产和胃肠道转运过程中的成功实例已有报道。Faued 等[43] 应用藻酸盐和树胶琼脂包埋双歧杆菌，并在其中添加菊粉，显著提高双歧杆菌在酸奶中的存活能力。Mao 等[44] 以大豆分离蛋白-卡拉胶复合物制备长双歧杆菌微胶囊，可以显著提高双歧杆菌在模拟消化液和巴氏灭菌过程中的活力。本研究以微胶囊包埋率为指标，通过挤压法制备动物双歧杆菌 BA-9 微胶囊，将海藻酸钠和卡拉胶 1∶1 作为最优复合壁材比例，并添加冻干保护剂。通过优化后得到的冷冻干燥保护剂配比为：脱脂乳粉添加量 11.25%，低聚木糖添加量 4.93%，甘油添加量 2.74%。在该条件下进行试验验证，最终活菌载率可达到 77.03%，具有良好耐受胃液能力和肠溶性，且在 4 ℃ 和常温条件下贮藏稳定性显著提高。本研究提供了一株具有优良生物活性以及抗炎活性的双歧杆菌及冻干微胶囊制备技术，为双歧杆菌的生产、储存和应用做出理论探索。

© 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] OJO-OKUNOLA A, NICOL M, DU TOIT E, et al. Human breast milk bacteriome in health and disease[J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1643.

[2] 周叶，陈慧娟，赵建新，等. 母乳微生物及其对婴幼儿健康影

响的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2024, 36(2): 218−224,229. [ZHOU Ye, CHENG Huijuan, ZHAO Jianxin, et al. Advances in the study of breast milk microbiology and its effects on infant and young child health[J]. Chinese Journal of Microecology, 2024, 36(2): 218−224,229.]
[3] MELEKOGLUMARTIN R, LANGA S, REVIRIEGO C, et al. Human milk is a source of Lactic acid bacteria for the infant gut[J]. The Journal of Pediatrics, 2003, 143(6): 754−8.
[4] ASTRID TUXPAN-PÉREZ, IBARRA-VALENCIA M A, ESTRADA B E, et al. Antimicrobial and immunomodulatory effects of selected chemokine and antimicrobial peptide on cytokine profile during[J]. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2022, 11(5): 607.
[5] CHIU Y H, TSAI J J, LIN S L, et al. Characterisation of Bifidobacteria with immunomodulatory properties isolated from human breast milk[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 700−708.
[6] SHEIKHI A, SHAKERIAN M, GITI H, et al. Probiotic yogurt culture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 modulate the cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from patients with ulcerative colitis[J]. Drug Research, 2016, 66(6): 300−305.
[7] RODES, LAETITIA. Effect of probiotics Lactobacillus and Bifidobacterium on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: An *in vitro* study using a human colonic microbiota model[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 23(4): 518−526.
[8] 吕锡斌, 何腊平, 张汝娇, 等. 双歧杆菌生理功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 353−358. [LÜ Xibin, HE Laping, ZHAGN Rujiao, et al. Progress in the study of physiological functions of Bifidobacterium bifidum[J]. Food Industry Science and Technology, 2013, 34(16): 353−358.]
[9] 李康宁, 邢会霞, 焦志军, 等. 双歧杆菌 NQ1501 双层微胶囊制备及其特性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(11): 1246−1248. [LI Kangning, XING Huixia, JIAO Zhijun, et al. Preparation and characterisation of *Bifidobacterium bifidum* NQ1501 bilayer microcapsules[J]. Chinese Journal of Microecology, 2016, 28(11): 1246−1248.]
[10] 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 characterisation of lyophilised probiotic microencapsulated powder by endogenous emulsification method[D]. Yantai: Yantai University, 2018.]
[11] 郑慧娟, 白晓晔, 高旭, 等. 双歧杆菌属特异性测序引物筛选及优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(7): 1736−1747. [ZHENG Huijuan, BAI Xiaoye, GAO Xu, et al. Screening and optimisation of genus-specific sequencing primers for Bifidobacterium spp[J]. Microbiology Bulletin, 2019, 46(7): 1736−1747.]
[12] MENG Z, ZHANG L, XIN L, et al. Technological characterization of Lactobacillus in semihard artisanal goat cheeses from different mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria[J]. Dairy Sci, 2018, 101(4): 2887−2896.
[13] 万峰, 孙思睿, 侯雨佳, 等. 婴儿源动物双歧杆菌消化道胁迫抗性及体外对免疫细胞活性影响的比较[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 118−125. [WAN Feng, SUN Sirui, HOU Yujia, et al. Comparison of resistance to digestive tract stress and *in vitro* effects on immune cell activity of Bifidobacterium infantis originating from animals[J]. Food Science, 40(22): 118−125.]
[14] 胡鹏钰. 母婴来源乳酸菌的筛选及对发酵乳品质影响的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2021. [HU Pengyu. Screening of Lactic Acid Bacteria from Maternal and Infant Sources and the Effect on the Quality of Fermented Milk[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.]
[15] 周海欧, 李兆龙, 李翠婷, 等. 牦牛源肠道芽孢杆菌的分离、鉴定及生物学特性研究[J]. 中国草食动物科学, 2024, 44(2): 32−38. [ZHOU Haiou, LI Zhaolong, LI Cuiting, et al. Isolation, identification and biological characterisation of yak-derived enterobacteriaceae[J]. Herbivore Science in China, 2024, 44(2): 32−38.]
[16] 朱晓萍, 庄智威, 叶泽铭, 等. 黄连等中草药对常见病原菌体外抑菌效果的研究[J]. 饲料研究, 2021, 44(7): 98−101. [ZHU Xiaoping, ZHUAGN Zhiwei, YE Zeming, et al. Studies on the in vitro bacteriostatic effect of Chinese herbs such as Rhizoma Coptidis on common pathogenic bacteria[J]. Feed Research, 2021, 44(7): 98−101.]
[17] 刘雪, 董新燕, 陈静, 等. 嗜黏蛋白阿克曼菌益生菌潜力的初步评估[J]. 现代预防医学, 2021, 48(18): 3395−9. [LIU Xue, DONG Xinyan, CHENG Jing, et al. Preliminary assessment of the probiotic potential of mucinophilic Acromegalic bacteria[J]. Modern Preventive Medicine, 2021, 48(18): 3395−9.]
[18] 郭志华, 王聪, 陈红玲. 红茶菌中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选、鉴定及其功能特性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(8): 309−316. [GUO Zhihua, WANG Cong, CHENG Hongling. Screening and identification of nitrite-degrading lactic acid bacteria from black tea bacteria and their functional properties[J]. China Food Journal, 2021, 21(8): 309−316.]
[19] 张传伟, 朱慧霞, 柴佳太, 等. 低聚木糖复配冻干保护剂的优化及其对双歧杆菌微胶囊性能的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 245−251. [ZHANG Chuanwei, ZHU Huixia, CHAI Jiatai, et al. Optimisation of a lyophilised protective agent for oligo-xylulose compounding and its effect on the performance of bifidobacterial microcapsules[J]. Food Industry Science and Technology, 2022, 43(21): 245−251.]
[20] 常诗晗, 乌日娜, 方海田, 等. 负载 2 种益生菌的多核微胶囊制备方法及特性研究[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(6): 127−138. [CHANG Shihan, WU Rina, FANG Haitian, et al. Preparation and characterisation of multinucleated microcapsules loaded with 2 probiotic bacteria[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(6): 127−138.]
[21] 李艾黎, 马冬雪, 孟祥晨, 等. 乳杆菌对小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 253−256. [LI Aili, MA Dongxue, MENG Xiangcheng, et al. Effect of Lactobacillus on the proliferation of mouse spleen lymphocytes[J]. Food Science, 2010, 31(15): 253−256.]
[22] 周瑜, 田晓英, 崔庆宇, 等. 两歧双歧杆菌 FL-228.1 增强小鼠先天免疫功能研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 335−41. [ZHOU Yu, TIAN Xiaoying, CUI Qingyu, et al. Study on the enhancement of innate immune function in mice by *Bifidobacterium bifidum* FL-228.1[J]. Food Industry Science and Technology, 2023, 44(22): 335−41.]
[23] 于微, 缪宇思, 李亚楠, 等. 抑制致病菌益生乳杆菌的胁迫耐受性及免疫活性[J]. 中国食品学报, 2023, 23(3): 60−69. [YU Wei, MIU Siyu, LI Yanan, et al. Inhibition of stress tolerance and immune activity of the pathogenic bacterium *Lactobacillus probioticus*[J]. China Food Journal, 2023, 23(3): 60−69.]
[24] CAMPEDELLI I, MATHUR H, SALVETTI E, et al. Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp[J]. Appl Environ Microbiol, 2019, 85(1): e01738-18.
[25] 徐芳婷, 黎绍基. 益生菌对食源性致病菌的作用研究[J].

食品安全导刊，2024(28)：135−140. ［XU Fangting, LI Shaoji. Studies on the effect of probiotics on foodborne pathogenic bacteria[J]. Food Safety Guide, 2024(28)：135−140.］
［26］ 李俊飞，宋智泉，何晓锐，等. 长双歧杆菌婴儿亚种 CICC 6069T 的益生特性研究及分子鉴定方法开发[J]. 食品与发酵工业，2025, 51（14）：273−282. ［LI Junfei, SONG Zhiquan, HE Xiaorui, et al. Probiotic characterisation of *Bifidobacterium longum infantis subspecies* CICC 6069T and development of molecular identification methods[J]. Food and Fermentation Industry, 2025, 51(14)：273−282.］
［27］ WANG J P, DARREN R. K, NICHOLAS H. L, et al. Entrapment, survival and release of Bifidobacterium adolescentis within chickpea proteinbased microcapsules[J]. Food Research International, 2014, 55：20−27.
［28］ 张迪，王婷婷，张晶晶，等. 2 株益生菌体外特性及对糖尿病大鼠血糖影响[J]. 中国乳品工业，2024, 52(11)：31−37. ［ZHANG Di, WANG Tingting, ZHANG Jingjing, et al. *In vitro* characterisation of two strains of probiotics and their effect on blood glucose in diabetic rats[J]. China Dairy Industry, 2024, 52(11)：31−37.］
［29］ 王宵，胡云龙，徐伟慧，等. 植物乳杆菌 WX-1 的全基因组测序及益生菌评价[J/OL]. 食品与发酵工业，2025, 1−15. doi：10.13995/j.cnki.11-1802/ts.041953 ［WANG Xiao, HU Yunlong, XU Weihui, et al. Whole genome sequencing and probiotic evaluation of *Lactobacillus plantarum* WX-1[J/OL]. Food and fermentation industry, 2025, 1−15. doi:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.041953.］
［30］ 白慧慧. 母乳婴儿源益生菌筛选鉴定及其潜在益生特性研究[D]. 兰州：兰州理工大学，2022. ［BAI Huihui. Screening and identification of probiotics from breast milk and infant sources and their potential probiotic properties[D]. Lanzhou：Lanzhou University of Science and Technology, 2022.］
［31］ R D C S RANADHEERA, S K BAINES, M C ADAMS. Importance of food in probiotic efficacy[J]. Food Research International, 2010, 43(1)：1−7.
［32］ 牛春宇. 乳酸菌 SQ0048 菌株黏附作用及其机制的研究[D]. 内蒙古：内蒙古农业大学，2021. ［NIU Chunyu. Studies on the adhesion of *Lactobacillus casei* strain SQ0048 and its mechanism[D]. Inner Mongolia：Inner Mongolia Agricultural University, 2021.］
［33］ 赵芳，黄璐，宦海琳，等. 植物乳植杆菌 YZH81 胞外多糖基因簇的功能鉴定[J]. 食品工业科技，2023, 44(23)：118−126. ［ZHAO Fang, HUANG Lu, HUAN Hailing, et al. Functional characterisation of the extracellular polysaccharide gene cluster of *Lactobacillus plantarum* YZH81[J]. Food Industry Science and Technology, 2023, 44(23)：118−126.］
［34］ AUGUSTO T H, GREICE C RA, GRACIELE 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.
［35］ DURANTI S, LUGLI G A, MANCABELLI L, et al. Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission[J]. Microbiome, 2017, 5(1)：66.
［36］ 陈颜红，王修俊，张二康，等. 植物乳杆菌 *LP-7501S* 冻干保护剂优化研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版)，2021, 42(2)：99−104. ［CHENG Yanhong, WANG Xiujun, ZHANG Erkang, et al. Optimisation of *Lactobacillus plantarum* LP-7501S freeze-dried protectant[J]. Journal of Yangzhou University (Agriculture and Life Sciences)，2021, 42(2)：99−104.］
［37］ 周莉，朱海华，谭静，等. 沙棘益生菌微胶囊的制备及性能研究[J]. 食品安全质量检测学报，2022(16)：5171−5177. ［ZHOU Li, ZHU Haihua, TAN Jing, et al. Preparation and properties of sea buckthorn probiotic microcapsule[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2022(16)：5171−5177.］
［38］ REUBEN R C, ROY P C, SARKAR S L, et al. Characterization and evaluation of Lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 103(2)：1223−1237.
［39］ DAMACENO Q S, GALLOTTI B, REIS I M M, et al. Isolation and identification of potential probiotic bacteria from human milk[J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2021, 15：491−501.
［40］ NOH H J, PARK J M, KWON Y J, et al. Immunostimulatory effect of heat-killed probiotics on RAW264.7 macrophages[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 32(5)：638−644.
［41］ HUANG X, LIU R, WANG J, et al. Preparation and synbiotic interaction mechanism of microcapsules of *Bifidobacterium animalis* F1–7 and human milk xylooligosaccharides (HMO)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259：129−152.
［42］ ZHOU H B, CHEN J, LI S, et al. Preparation of acid-resistant microcapsules with shell-matrix structure to enhance stability of *Streptococcus thermophilus* IFFI 6038[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(8)：1978−1984.
［43］ FAUED B, EL-SAYED H S, ABOOD A, et al. The application of multi-particulate microcapsule containing probiotic bacteria and inulin nanoparticles in enhancing the probiotic survivability in yoghurt[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 22：101391.
［44］ MAO L, PAN Q Y, HOU Z Q, et al. Development of soy protein isolate-carrageenan conjugates through maillard reaction for the microencapsulation of *Bifidobacterium longum*[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84：489−497.