魏小晶, 安美玲, 李雪瑞, 等. 基于生物膜培育的复合益生菌微胶囊的制备及特性分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(14): 144−154. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050290
WEI Xiaojing, AN Meiling, LI Xuerui, et al. Preparation and Characterization of Composite Probiotic Microcapsules Based on Biofilm Cultivation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(14): 144−154. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050290

· 生物工程 ·

基于生物膜培育的复合益生菌微胶囊的制备及特性分析

魏小晶[1,2], 安美玲[2,3], 李雪瑞[1], 罗晓红[2,3], 张瑞瑞[4], 倪永清[1,2,4,*], 孙海龙[1,2,4,*]
（1.石河子大学食品学院, 新疆石河子 832003;
2.兵团乳制品产业创新研究院, 新疆天润生物科技股份有限公司, 新疆乌鲁木齐 830000;
3.新疆天润唐王城乳品有限公司, 新疆图木舒克 843999;
4.兵团特色乳加工技术创新中心, 新疆石河子花园乳业有限公司, 新疆石河子 832003）

摘　要: 为了将益生菌的天然生物膜与微胶囊技术进行协同整合，以构筑一种协同增效的新型益生菌保护策略。本研究从不同益生元培养基中筛选生长量及生物膜形成能力最优的菌株组合，并分别制备复合益生菌单层、双层、生物膜样单层及生物膜样双层微胶囊，探究冻干后复合益生菌微胶囊在模拟胃肠液及低温贮藏等胁迫条件下对益生菌的保护作用。结果表明，以 1∶1 接种的发酵乳杆菌 F7 和长双歧杆菌 B22 在 1.5% IMO 的培养基中共同培养时其生长量及生物膜形成能力最佳。四种微胶囊粒径范围均为 2.29~2.45 mm，活菌数介于 9.58~10.03 lg CFU/g，经胁迫实验发现生物膜样双层微胶囊对复合菌的保护性能最优，在冷冻干燥过程中此类微胶囊菌株存活率高于 93%。在−18 ℃ 和 4 ℃ 保存 7 周后，生物膜样双层微胶囊内活菌数量仍可维持在 10^8 CFU/g 以上。本研究为冻干生物膜样复合益生菌微胶囊的开发奠定了基础，同时也为益生菌在胁迫环境中提供了有效保护措施。

关键词: 生物膜, 复合益生菌, 微胶囊, 冻干, 生物膜样双层微胶囊
中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)14−0144−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050290　　本文网刊:

Preparation and Characterization of Composite Probiotic Microcapsules Based on Biofilm Cultivation

WEI Xiaojing[1,2], AN Meiling[2,3], LI Xuerui[1], LUO Xiaohong[2,3], ZHANG Ruirui[4], NI Yongqing[1,2,4,*], SUN Hailong[1,2,4,*]
（1.School of Food Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
2.Xinjiang Production and Construction Corps Dairy Industry Innovation Research Institute, Xinjiang Tianrun Biotechnology Co., Ltd., Urumqi 830000, China;
3.Xinjiang Tianrun Tangwangcheng Dairy Co., Ltd., Tumushuke 843999, China;
4.Xinjiang Production and Construction Corps Specialty Dairy Processing Technology Innovation Center, Xinjiang Shihezi Huayuan Dairy Co., Ltd., Shihezi 832003, China）

Abstract: In order to integrate the natural biofilm of probiotics with microencapsulation technology in a synergistic manner, so as to construct a novel and synergistic probiotic protection strategy. This study aimed to select the optimal combination of bacterial strains from various prebiotic culture media based on their growth rate and ability to form biofilms. The

收稿日期: 2025−05−28
基金项目: 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关项目（2024AB050, 2023AB050, 2022DB008）; 八师重点领域科技攻关项目（2024GY02）; 第七师-石河子大学科技创新专项（QS2023014）; 自治区天池英才计划项目; 石河子大学高层次人才科研启动项目（RCZK202352）。
作者简介: 魏小晶（1992−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品微生物与生物技术, E-mail: 1571292529@qq.com。
*** 通信作者:** 倪永清（1969−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: niyqlzu@sina.com。
孙海龙（1989−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物与生物技术, E-mail: sunhl610@shzu.edu.cn。

selected strains were then used to prepare single-layer, double-layer, biofilm-like single-layer, and biofilm-like double-layer microcapsules. The protective effects of the freeze-dried microcapsules containing the selected strains on the viability of the probiotics under simulated gastrointestinal conditions and conditions of low temperature storage were investigated. The results showed that the highest growth and biofilm formation was achieved when *Lactobacillus fermentum* F7 and *Bifidobacterium longum* B22 were co-cultured in a medium containing 1.5% IMO at a 1∶1 inoculation ratio. The particle size was determined to be in the range 2.29~2.45 mm for all four microcapsule types, and viable counts were recorded between 9.58~10.03 lg CFU/g. Stress tests showed that the biofilm-like bilayer microcapsules provided the strongest protection against the compound bacteria, with a survival rate of more than 93% after freeze-drying. Even after storage at −18 ℃ and 4 ℃ for 7 weeks, the viable counts were maintained above 10^8 CFU/g in the biofilm-like bilayer microcapsules. This study lays the foundation for the development of freeze-dried biofilm-like composite probiotic microcapsules and suggests an effective protective strategy for probiotics under stressful conditions.

Key words: biofilm; compound probiotics; microcapsule; freeze-drying; biofilm like double-layer microcapsules

细菌生物膜是指细菌生长繁殖过程中附着在其表面并由自身产生的胞外聚合物（如蛋白质、eDNA、脂质及多糖等）包裹形成的一种具有特定结构和功能的微生物聚集体[1−3]。目前，生物膜的研究大多集中在致病菌生物膜的防治和清除中[4]。然而，在有益微生物中，乳酸菌生物膜同样具有重要的研究价值。但由于活检取样受限及生物膜保存困难，目前对乳酸菌生物膜的研究仍鲜有报道[5]。然而，益生菌生物膜广泛存在于发酵食品和肠道中，生物膜的形成可促使益生菌菌体结构更加稳定，显著提高菌体抗逆性，有助于促进其在宿主粘膜中的长期持久和稳定性，且能防止病原菌的定殖，同时可以增强益生菌对温度变化、渗透压变化、胃酸、胆汁及抗生素等外界不利因素的影响[6]。

双歧杆菌和乳杆菌是目前研究最为广泛的益生菌，对人体产生诸多健康益处，包括调节人体肠道菌群平衡、改善胃肠道健康、确保消化系统正常运转、提高免疫力等[7−8]。生物膜的形成使益生菌能更好地粘附于人体胃肠道，并提高其对胃酸和胆盐等不良环境的耐受性，进而有效发挥益生作用[9−10]。低聚糖及植物多糖等益生元是肠道菌群的主要能量来源，在菌株共培养时，可降解多糖的菌株通过降解不可消化的低聚糖为单糖或二糖以供其他降解多糖能力较差的菌株利用，而后者产生的短链脂肪酸等物质又可促进前者的生长[11−12]。研究表明，多菌株混合培养不仅促进不同物种间的相互竞争或代谢合作，还会促进生物膜形成量的增加，增强其抗逆性[13]。益生菌微囊化被证实是提高益生菌存活率的有效方法之一，通过天然高分子材料包埋益生菌等微粒，阻隔不利环境对益生菌活性的侵害[14−15]。除了微囊化可以抵抗外部压力来提高益生菌的存活率外，增强生物体的内在应激耐受性同样可以提高益生菌的存活率。益生菌生物膜的形成是提高其内在应激耐受性的可行方法。大量研究证实部分益生菌在非生物表面具有形成生物膜的能力，且生物膜状态的细菌在热应力、冷冻干燥和胃肠消化时比游离细胞具有更高的存活能力[9,16−17]。因此，探究益生菌微囊化与益生菌生物膜相结合进而提高益生菌存活率的方法十分必要。

为了解决益生菌在食品及胃肠道活性较低的问题，微胶囊技术是目前研究中保护益生菌活性的有效方法。探究冻干胶囊的稳定性及耐受性，为开发保护效果更好的益生菌微胶囊产品提供思路和依据。本研究在不同益生元培养基中共培养乳杆菌属和双歧杆菌属，通过测定共培养菌株生长量和生物膜形成量，筛选到共生且形成生物膜较强的菌株组合发酵乳杆菌 F7 和长双歧杆菌 B22，对菌株组合进行共包埋，通过原位培养的方法使微囊化的菌株在单层微胶囊内生成生物膜，再利用壳聚糖进行二次包封，形成生物膜样双层微胶囊，并探究生物膜样微胶囊与非生物膜样微胶囊在冷冻干燥、模拟胃肠液及低温贮藏等不良条件下对益生菌的保护作用。通过将微胶囊与生物膜培养方法的结合来提高益生菌在不利环境中的耐受性和稳定性，为益生菌产品的开发和应用奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentium*（F1、F2、F3、F4、F5、F7、F8、F10、F17、F25）、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*（P1、P2、P3、P4、P5、P7、P10、P11、P12）、鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus*（R9、R10、R11、R12、R16、R18、R19、R20、R54）、长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum*（B11、B20、B21、B22、B29、B40、B79、B80、B94）、两歧双歧杆菌 *Bifidobacterium bifidum*（b19、b23、b46、b58、b59、b82、b108、b109、b112）　保藏于石河子大学食品微生物与生物技术研究中心；胃蛋白酶（3000 U/g）、胰蛋白酶（50000 U/g）、MRS 培养基、结晶紫　国药集团化学试剂有限公司；海藻酸钠（纯度≥98.0%）、黄原胶、角豆胶、结冷胶（纯度≥90%）、氯化钙　北京博奥拓达科技有限公司；低聚果糖（FOS）、低聚木糖（XOS）、低聚半乳糖（GOS）、低聚异麦芽糖（IMO）、抗性淀粉（RS）、黏蛋白（Mucin）、D-海藻糖（D-Trehalose）、菊粉（Inulin）、果胶（Pectin）纯度均≥90%，上海源叶生物技术有限公司。

DG520 厌氧培养箱　英国 DWS；Leica M 16 SC

体式显微镜　Leica Microsystems, U.K; X7 酶标仪　美国 BioTek 有限公司; SU8010 场发射扫描电子显微镜　日立公司; YXQ-S 立式压力蒸汽灭菌锅　上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 5810R 冷冻离心机　德国 Eppendorf 仪器公司; SW-CJ-1 BU 超净工作台　上海沪净医疗器械有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　不同培养时间下菌株生长曲线及生物膜形成能力的测定　将保藏的菌株取出, 在 MRS 固体培养基上划线, 挑选单菌落于液体 MRS 培养基中 37 ℃ 厌氧培养 24 h, 将菌悬液以 4000 r/min 离心 10 min 后收集菌体, 用灭菌生理盐水离心洗涤 3 次后, 重悬菌体, 将菌悬液浓度调整一致($OD_{600\ nm}$ 值为 0.8±0.05)待用。以 2% 接种量接于液体 MRS 培养基中, 置于 37 ℃ 厌氧培养箱中, 每隔 6 h 测定菌液 $OD_{600\ nm}$ 值; 首先取预培养的生物膜样品经结晶紫染色、乙醇脱色后, 在 400~700 nm 范围内进行全波长扫描, 结果显示脱色液在 590 nm 处呈现最大吸收峰, 因此确定 590 nm 为最佳检测波长; 参考钟华晨等[2] 的方法, 通过结晶紫染色法测定不同培养时间菌株的生物膜形成量(测定菌株$OD_{590\ nm}$ 值), 即将菌悬液接种于 MRS 培养基中, 混匀后加入无菌 96 孔细胞培养板, 37 ℃ 厌氧静置培养至 24、36 和 48 h, 吸出上层发酵液, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞培养板 3 次。待培养板自然晾干后, 加入 200 μL 10%(v/v)的甲醇溶液固定细胞 10 min, 弃甲醇溶液; 待培养板再次晾干后加入 1%(w/v)结晶紫溶液染色 30 min, 弃染液, 用无菌水洗涤细胞培养板 3 次; 待板晾干后加入 95% 乙醇溶液脱色 20 min, 测定各实验菌株样品的吸光值。以不加菌的 MRS培养基为空白对照, 以吸光值反映菌株生物膜形成能力的强弱, 吸光值大于空白对照时表示该菌株具有生物膜形成能力, 吸光值小于等于空白对照时则表示该菌株无生物膜形成能力。

1.2.2　不同益生元培养基中单菌及复合菌株共培养的生长情况及生物膜的形成　将 FOS、XOS、GOS、IMO、RS、Mucin、D-Trehalose、Inulin、Pectin 按 1%(w/v)的比例分别添加至不含葡萄糖的 MRS 培养基中, 115 ℃ 高压灭菌 20 min。选择具有生物膜形成能力的菌株制备菌悬液(*Lactobacillus fermentium* 中 F7 和 F10, *Lactobacillus plantarum* 中 P7 和 P11, *Lactobacillus rhamnosus* 中 R11 和 R19, *Bifidobacteriumlongum* 中 B21 和 B22 及 *Bifidobacterium bifidum* 中 b82 和 b112), 以 1∶1 的接菌比例按 2% 接种量接种于不同益生元培养基中, 混匀后以每孔 200 μL 加入 96 孔细胞培养板中, 于 37 ℃ 厌氧静置培养后, 测定各菌液 $OD_{600\ nm}$ 值。以添加葡萄糖的 MRS 培养基作为阳性对照, 不添加碳源的 MRS 培养基为阴性对照。采用结晶紫染色法测定不同益生元培养基中菌株的生物膜形成能力, 测定菌株 $OD_{590\ nm}$ 值, 实验重复 3 次取平均值。

1.2.3　复合菌株共培养体系的优化

1.2.3.1　接菌比例的确定　将菌株活化并调节菌悬液 $OD_{600\ nm}$ 值为 0.6±0.05, 将筛选得到的菌株 F7 和 B22 按 2% 的总接菌量以 0∶2、0.5∶1.5、1∶1、1.5∶0.5、2∶0 的比例接入含 IMO 的培养基中, 37 ℃ 厌氧培养 36 h 后测定生长量及其生物膜的形成量, 确定最佳接菌比例。

1.2.3.2　益生元添加量的确定　改变培养基中 IMO 添加量分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2%、2.5%。测定菌株 F7 和 B22 在不同 IMO 含量的培养基中的菌浓度及生物膜形成量, 确定益生元的最佳添加量。

1.2.4　复合菌株共培养体系生物膜的形成情况

1.2.4.1　光学显微镜形态观察　参考夏晓凤[18] 的方法, 向 6 孔板的待测菌孔和空白对照孔中各放入 1 片盖玻片, 每孔加 5 mL 含益生元的 MRS 培养基; 以 2% 的接菌量分别接种两种单菌及复合菌株, 37 ℃ 静置培养 36 h 后, 取出盖玻片, 用灭菌的 PBS 多次冲洗以去除表面浮游细菌, 室温干燥, 用 1% 结晶紫染色 15 min, 蒸馏水冲洗 1~2 min 至液体为无色, 室温干燥后, 置于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.4.2　扫描电子显微镜形态观察　将生物膜静置培养结束后, 取出盖玻片, 用灭菌 PBS 多次冲洗以去除表面浮游细菌, −40 ℃ 预冻后, 真空冷冻干燥机进行冻干。利用导电胶将样品固定在样品台上, 进行喷金处理后, 通过场发射扫描电子显微镜进行形态观察。

1.2.5　基于生物膜培育的复合益生菌微胶囊的制备　壁材溶液: 将 0.5 g 角豆胶、2 g 海藻酸钠、0.5 g 果胶溶于 100 mL 蒸馏水中, 115 ℃ 灭菌 20 min。

壳聚糖溶液: 将 0.4 g 壳聚糖溶解于 90 mL 蒸馏水中, 加入 400 μL 冰乙酸, 用 NaOH 溶液调节 pH 为 5.5, 最后将溶液定容至 100 mL, 115 ℃ 灭菌 20 min。

将菌悬液与壁材溶液按 1∶5.5 的比例均匀混合, 注入无菌注射器中, 通过 0.45 mm 的无菌针头匀速滴入缓慢搅拌的 2% $CaCl_2$ 溶液中, 针头离液面高度约 5 cm, 滴速约 2 mL/min, 搅拌交联 30 min。用无菌蒸馏水洗涤三次, 筛网过滤, 得到单层微胶囊(MC1)。将单层微胶囊加入缓慢搅拌的壳聚糖溶液中, 收集微胶囊, 用无菌生理盐水洗涤微胶囊 2~3 次, 筛网过滤, 得到双层微胶囊(MC2)。将得到的单层微胶囊加入含 2% $CaCl_2$ 的低聚异麦芽糖培养基, 37 ℃ 下厌氧培养 24 h 后得到生物膜样单层微胶囊(MC3), 将生物膜样单层微胶囊加入缓慢搅拌的壳聚糖溶液处理后, 收集微胶囊, 用无菌生理盐水洗涤微胶囊 2~3 次, 筛网过滤, 得到生物膜样双层微胶囊(MC4)。

1.2.6　微胶囊的包埋率与活菌数测定　配制 3%(w/v)的柠檬酸钠溶液, 115 ℃ 灭菌 20 min 后作为解囊液。取 1 g 微胶囊加入 9 mL 解囊液中, 37 ℃ 下

均质化处理 15~20 min，待微胶囊完全裂解后，对溶液进行梯度稀释，利用选择性固体培养基对微胶囊中两种菌分别进行涂布计数，微胶囊包埋率计算公式如下[19]：

$$EE(\%) = \frac{N}{N_0} \times 100$$

式中，EE 代表包埋率(%)；N 代表从微胶囊中释放出的活菌数(lg CFU/g)；N_0 代表包埋前游离菌的活菌数(lg CFU/g)。

1.2.7　冻干复合益生菌微胶囊的特性分析

1.2.7.1　复合益生菌微胶囊冻干后的表面形态分析　利用导电胶将样品固定于扫描电子显微镜样品台上，喷金处理后用场发射扫描电镜观察其形态。

1.2.7.2　复合益生菌微胶囊对冷冻干燥的耐受性　将复合益生菌微胶囊与冻干保护剂(2% 甘油和 10% 海藻糖)按 1∶2.5 于无菌西林瓶中混合[20]，−80 ℃条件下预冻 12 h，取出置于真空冷冻干燥机中进行冷冻干燥 30 h，干燥真空度为 0 MPa。将冻干后的微胶囊利用无菌生理盐水复水后进行活菌计数。存活率计算公式如下[21]：

$$SR(\%) = \frac{N_1}{N_2} \times 100$$

式中，SR 代表菌株存活率(%)；N_1 代表经过特定条件(如冷冻干燥、热处理、模拟胃肠液消化后)的活菌数(lg CFU/g)；N_2 代表处理前游离菌的活菌数(lg CFU/mL)。

1.2.7.3　复合益生菌微胶囊冻干后对热处理的耐受性分析　将冻干后的微胶囊加入已预热至 37 ℃ 的无菌生理盐水中，50 ℃ 水浴 10 min。将热处理过的微胶囊进行复水后进行活菌计数。

1.2.7.4　复合益生菌微胶囊冻干后对连续模拟胃肠液消化的耐受性分析　将 0.1 g 冻干后的微胶囊加入 1 mL 已预热至 37 ℃ 的无菌模拟胃液(pH2.5)中，检测模拟消化液 pH 波动≤±0.2[22]。并在 37 ℃ 下恒温振荡模拟消化反应，分别在 30、60、90 和 120 min 取样，120 min 后弃胃液，收集微胶囊重悬于已预热至 37 ℃ 的无菌模拟肠液(pH7.4)中，并在 150、180、210 和 240 min 取样计数。

1.2.7.5　复合益生菌微胶囊冻干后在不同温度下的贮藏稳定性分析　模拟冷冻、冷藏及室温条件，将冻干后的游离菌与微胶囊置于−18、4 和 25 ℃ 温度条件下，每隔 7 d 进行活菌计数。

1.3　数据处理

结果使用平均值±标准差表示。通过 SPSS 26.0 统计软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA)，采用 Duncan 检验(P<0.05)对样本间均值进行显著性分析，利用 Origin Pro 软件绘制图表。

2　结果与分析

2.1　不同种水平菌株的生长曲线及生物膜形成分析

2.1.1　不同培养时间点菌株的生长浓度测定　益生菌的生长时间与营养条件、菌株本身的遗传和代谢特性等有关[23]。本实验测定各菌株在培养过程中的菌悬液 $OD_{600\ nm}$ 值，以反映菌株在培养过程中的生长情况，结果如图 1 所示。发酵乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌三种乳杆菌在培养 6~12 h 之间生长速度最快，培养 24 h 后各菌株的菌体密度趋于稳

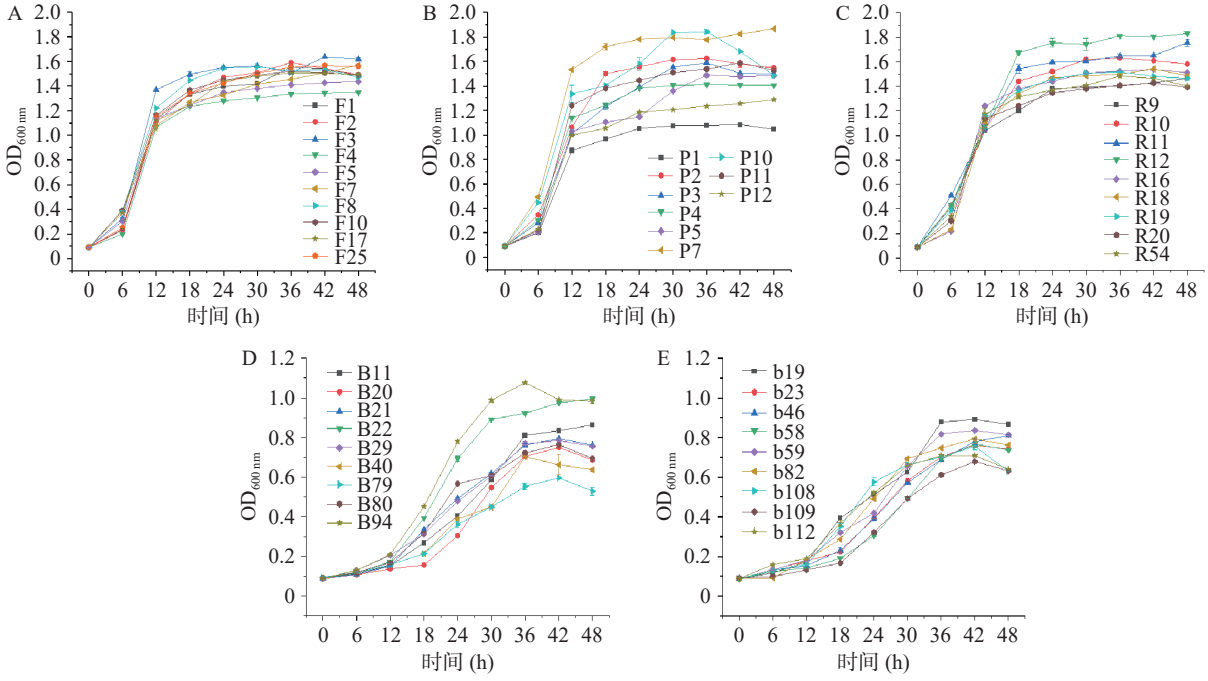


图 1　不同种水平菌株的生长曲线

Fig.1　Growth curves of different levels of bacterial strains

注：A~E 分别为发酵乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、长双歧杆菌、两歧双歧杆菌。

定; 与乳杆菌相比, 长双歧杆菌以及两歧双歧杆菌的生长速度均较慢, 在培养 24 h 时仍处于对数生长期, 菌体密度均较低, 36 h 时菌体密度接近或达到最高, 但进入平稳生长期的双歧杆菌菌体密度依然低于绝大多数的乳杆菌。这与前人研究的结果相似, 袁先铃等[24] 发现, 植物乳杆菌在 8 h 后进入对数期, 20 h 后进入稳定期, 类干酪乳杆菌在 8 h 后进入对数期, 24 h 后进入稳定期。丁伯乐等[25] 发现青春双歧杆菌和婴儿双歧杆菌的 $OD_{600\ nm}$ 值均在 30 h达到最大值; 辛跃强等[26] 研究发现, 长双歧杆菌在 28 h 达到稳定期。双歧杆菌到达生长稳定期的时间晚于乳杆菌, 这可能是由于两种菌的代谢特性不同, 且双歧杆菌对生长条件的要求更为苛刻的原因。

2.1.2　不同培养时间菌株生物膜形成能力的测定　生物膜的形成是一个动态的过程, 可分为浮游菌初始黏附、不可逆黏附、生物膜生长、生物膜成熟和生物膜分散五个阶段[27]。从每类菌株中挑选一株测定生物膜生成时的波长范围, 如图 2A 所示, 通过吸收光谱扫描, 确定在以结晶紫法测定生物膜形成量时, 最大吸收波长为 590 nm。在该波长下, 分别测定培养 24、36 和 48 h 后菌株的生物膜形成能力。如图 2B~图 2F 所示, 不同种益生菌生物膜形成能力具有菌株特异性, 其中具有生物膜形成能力的发酵乳杆菌有 7 株, 植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌各 8 株, 长双歧杆菌有 7 株, 两歧双歧杆菌 6 株。发酵乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌三种乳杆菌均在培养 24 h 后生物膜形成能力最强, 随着培养时间的延长, 生物膜形成量下降; 而双歧杆菌培养 36 h的生物膜形成量高于培养 24 和 48 h。乳杆菌和双歧杆菌的生物膜形成量超过一定时间后随着培养时间延长而降低的原因可能是生物膜达到成熟期后开始逐渐脱落, 进入了分散阶段[28]。综合考虑试验菌株在不同培养时间下的生长与生物膜形成情况, 选择以 36 h 作为后续研究中菌株共培养的时间。

2.2　不同益生元培养基中共生且高产生物膜的复合益生菌组合筛选

2.2.1　不同益生元培养基中复合菌株生长能力的测定　从图 2B~图 2F 中选择生物膜生成能力较强菌株: *Lactobacillus fermentium* 中 F7 和 F10, *Lactobacillus plantarum* 中 P7 和 P11, *Lactobacillus rhamnosus* 中 R11 和 R19, *Bifidobacterium longum* 中 B21 和 B22 及 *Bifidobacterium bifidum* 中 b82 和 b112。将 10 株益生菌置于不同益生元的培养基中, 通过对比复合菌株菌悬液与各单独菌株培养时的 $OD_{600\ nm}$ 值发现, 乳杆菌与双歧杆菌在不同益生元培养基中共培养时的菌体密度高于单菌培养。由表 1 可知, 所有菌株在 Glu、GOS、D-Trehalose 和 IMO 培养基中生长能力良好, 而在 XOS、RS、Pectin 培养基中生长能力较差, FOS、Inulin 和 Mucin 培养基中仅个别菌株生长。发酵乳杆菌 F7 与长双歧杆菌 B22 在不同益生元共培养时的生长量均明显高于单独培养, 尤其是

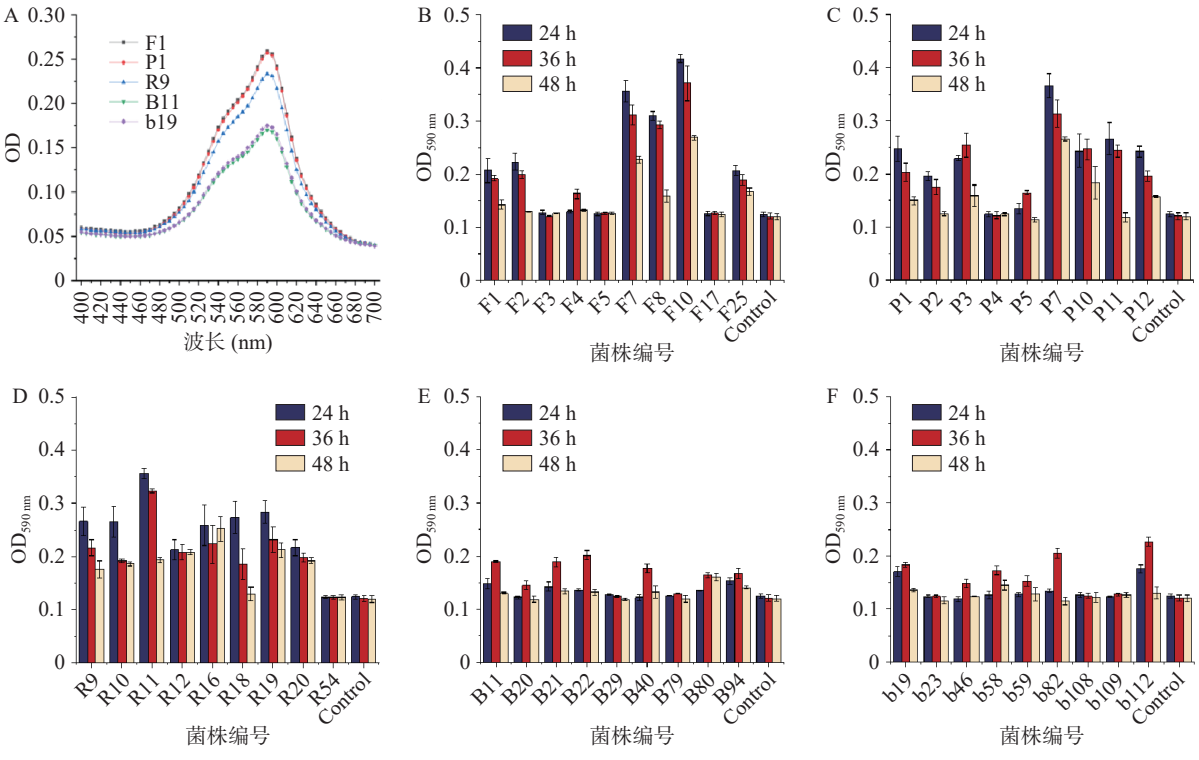


图 2　不同种水平菌株的生物膜形成情况

Fig.2　Formation of biofilm in different levels of bacterial strains

注: A 为不同波长下样品的吸光度值; B~F 分别为发酵乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、长双歧杆菌、两歧双歧杆菌的生物膜形成情况。

表 1　在不同益生元培养基中单独及共培养菌株的生长情况

Table 1　Growth of strains in monoculture and coculture under different prebiotic media

菌株	Glu	GOS	FOS	D-Trehalose	IMO	Inulin	XOS	RS	Pectin	Mucin
F7	1.204±0.004	0.785±0.023	/	1.191±0.002	0.530±0.07	0.509±0.043	0.173±0.059	0.317±0.137	0.303±0.023	/
F10	1.174±0.015	0.775±0.009	/	1.385±0.005	0.664±0.041	0.350±0.005	0.185±0.023	0.328±0.021	0.364±0.031	/
P7	1.148±0.018	0.861±0.058	0.736±0.053	1.164±0.023	0.841±0.077	/	0.192±0.005	0.414±0.02	0.520±0.007	0.144±0.019
P11	1.192±0.019	1.210±0.042	1.244±0.017	1.401±0.01	0.985±0.069	/	0.647±0.044	0.541±0.014	0.240±0.022	0.248±0.033
R11	1.210±0.025	0.850±0.023	/	1.346±0.005	0.624±0.072	/	0.282±0.015	0.416±0.01	0.290±0.006	0.238±0.009
R19	1.234±0.018	0.832±0.061	/	1.358±0.052	0.748±0.046	/	0.251±0.013	0.446±0.029	0.329±0.01	0.234±0.025
B21	1.115±0.022	0.671±0.051	/	0.074±0.005	0.346±0.068	0.368±0.032	0.069±0.014	0.039±0.003	0.110±0.017	/
B22	1.054±0.041	0.677±0.019	/	0.012±0.003	0.644±0.05	0.270±0.018	0.066±0.008	0.105±0.006	0.197±0.024	/
b82	0.554±0.019	0.303±0.032	0.487±0.007	0.026±0.007	0.434±0.031	/	0.046±0.025	0.085±0.016	0.088±0.03	0.487±0.007
b112	0.613±0.035	1.064±0.023	0.473±0.038	0.047±0.025	0.611±0.075	/	0.185±0.021	0.070±0.003	0.085±0.02	0.473±0.038
F7+B21	1.218±0.006	0.871±0.081	/	1.155±0.039	0.777±0.072	0.541±0.029	0.206±0.008	0.360±0.026	0.372±0.009	/
F7+B22	1.301±0.021	0.874±0.08	/	1.256±0.018	1.689±0.07	0.544±0.02	0.186±0.011	0.361±0.008	0.394±0.032	/
F7+b82	1.202±0.001	0.875±0.015	1.134±0.037	1.286±0.029	0.548±0.066	/	0.213±0.039	0.385±0.024	0.386±0.02	0.376±0.05
F7+b112	1.203±0.018	0.871±0.08	1.109±0.047	1.299±0.024	0.905±0.078	/	0.152±0.045	0.417±0.013	0.208±0.018	0.503±0.033
F10+B21	1.191±0.025	1.056±0.021	/	1.319±0.041	0.833±0.075	0.195±0.032	0.204±0.028	0.393±0.044	0.366±0.016	/
F10+B22	1.245±0.025	0.822±0.007	/	1.311±0.006	0.813±0.079	0.229±0.009	0.197±0.009	0.434±0.03	0.288±0.025	/
F10+b82	1.224±0.023	0.983±0.005	1.068±0.027	1.361±0.009	0.775±0.073	/	0.213±0.031	0.364±0.046	0.315±0.043	0.477±0.019
F10+b112	1.271±0.037	0.910±0.07	1.071±0.011	1.347±0.01	0.831±0.059	/	0.128±0.045	0.319±0.032	0.302±0.017	0.493±0.05
P7+B21	1.094±0.007	1.048±0.012	/	1.104±0.019	0.804±0.077	0.237±0.032	0.182±0.009	0.413±0.019	0.663±0.015	/
P7+B22	1.132±0.027	1.037±0.07	/	1.156±0.005	0.878±0.061	0.239±0.023	0.196±0.004	0.435±0.005	0.279±0.025	/
P7+b82	1.254±0.028	0.970±0.007	0.798±0.008	1.185±0.069	0.821±0.071	/	0.180±0.018	0.423±0.011	0.255±0.027	0.426±0.038
P7+b112	1.216±0.031	1.014±0.058	0.686±0.018	1.273±0.053	0.764±0.083	/	0.205±0.020	0.388±0.002	0.272±0.053	0.497±0.049
P11+B22	1.307±0.029	1.115±0.073	/	1.430±0.013	0.963±0.086	0.409±0.015	0.640±0.05	0.563±0.008	0.290±0.022	/
P11+b82	1.033±0.011	1.211±0.083	1.084±0.079	1.304±0.004	0.903±0.064	/	0.513±0.012	0.467±0.046	0.180±0.028	0.638±0.049
P11+b112	1.232±0.022	1.104±0.046	1.153±0.056	1.357±0.02	0.955±0.095	/	0.581±0.011	0.505±0.070	0.177±0.022	0.642±0.006
R11+B22	1.233±0.026	1.060±0.015	0.839±0.033	1.262±0.015	0.682±0.079	0.298±0.002	0.244±0.01	0.552±0.032	0.404±0.028	/
R11+b82	1.192±0.004	0.746±0.072	/	1.290±0.024	0.706±0.066	/	0.328±0.01	0.485±0.003	0.219±0.032	0.470±0.097
R11+b112	1.214±0.01	0.945±0.059	/	1.307±0.059	0.779±0.072	/	0.237±0.028	0.469±0.004	0.274±0.016	0.532±0.068
R19+B22	1.262±0.022	0.994±0.097	0.869±0.027	1.453±0.05	0.790±0.072	0.298±0.004	0.240±0.022	0.368±0.022	0.289±0.019	/
R19+b82	1.268±0.013	0.867±0.014	/	1.339±0.004	0.635±0.084	/	0.282±0.039	0.371±0.027	0.318±0.038	0.478±0.083
R19+b112	1.275±0.028	0.935±0.099	/	1.314±0.012	0.835±0.065	/	0.161±0.037	0.341±0.032	0.277±0.031	0.459±0.063

注：此表数值为不同益生元培养基中各菌株单独培养和共培养的菌悬液$OD_{600\ nm}$值。Glu、GOS、Mucin、FOS、D-Trehalose、IMO、Inulin、XOS、RS、Pectin分别表示葡萄糖、低聚半乳糖、黏蛋白、低聚果糖、D-海藻糖、低聚异麦芽糖、菊粉、低聚木糖、抗性淀粉、果胶；“/”表示不生长；表2同。

在 IMO 培养基中的明显高于其他菌株组合。IMO 的主要成分为葡萄糖分子间以 α-1,6 糖苷键结合的异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖以及聚合度高达 4 和 5 的系列低聚糖。乳杆菌通过细胞内酶优先代谢短链低聚糖，前 24 h 仅代谢异麦芽糖，并在发酵后期代谢三糖和四糖；而双歧杆菌通过细胞外支链淀粉酶水解 α-葡聚糖，并优先代谢低聚或多聚碳水化合物，在生长前 24 h 内代谢具有较高聚合度的寡糖并积累葡萄糖，24 h 后部分消耗异麦芽糖和异麦芽三糖[29]。这种互补的代谢机制可能是实验结果中发酵乳杆菌与长双歧杆菌、两歧双歧杆菌共培养时生长量提高的主要原因。

2.2.2　不同益生元培养基中复合菌株生物膜形成能力的测定　培养基的成分是影响菌株生物膜形成能力的重要因素之一，由于菌株的生长特性和代谢途径不同，益生菌在不同益生元培养基中的生物膜形成能力差异显著。孙亦心等[30] 发现，添加低聚果糖可促进青春双歧杆菌的数量及生物膜的形成；Lebeer 等[31] 发现，在 mTSB 培养基中添加黏蛋白可显著增加鼠李糖乳杆菌 LGG 的生物膜形成量，且长链菊粉也可促进该菌株生物膜的形成；Piotrowski 等[32] 发现不同益生元的种类及添加量对拟杆菌的生物膜形成能力影响均不相同。如表 2 所示，本实验发现多个复合菌株组合在不同益生元培养基中共培养时表现出更高的生物膜的形成能力。多种菌的混合培养会促进不同物种间的相互竞争和合作代谢，进而促使生物膜的形成量增加，抗逆性增强[33]。尤其是在 IMO 培养基中，发酵乳杆菌 F7 与长双歧杆菌 B22 单独培养及共培养时形成的生物膜形成能力再次证明了共培养更有利于菌株生物膜的形成。

2.2.3　复合菌株共培养体系的优化　为了优化复合菌株的共培养体系，提高菌株的生长能力，本实验进一步分析了菌株 F7 和 B22 的最佳接菌比例及益生元 IMO 的最佳添加量。结果表明，当总接菌量为 2% 时，将两株菌等量接入培养基，其生长量及生物膜形成能力均最高，即发酵乳杆菌 F7 与长双歧杆菌 B22 共培养体系中最佳接菌比例为 1∶1（图 3A）。不同 IMO 添加量下菌株的生长量及生物膜形成能力如图 3B 所示，IMO 添加量为 0.5% 时，单独培养的长双歧杆菌 B22 的生长量为 0.144±0.004，而与发酵乳杆菌 F7 共培养时 $OD_{600\ nm}$ 为 0.79±0.003。随着 IMO 含量的增加，菌株 F7 与 B22 生长量均逐渐增

表 2 不同益生元培养基中单独及共培养菌株生物膜形成能力的测定

Table 2 Measurement of biofilm formation capacity by strains in monoculture and coculture under different prebiotic media

菌株	Glu	GOS	FOS	D-Trehalose	IMO	Inulin	XOS	RS	Pectin	Mucin
F7	0.254±0.029	0.169±0.024	0.153±0.014	0.133±0.008	0.271±0.015	/	0.146±0.02	0.131±0.006	0.132±0.003	0.177±0.01
F10	0.239±0.027	0.291±0.039	0.166±0.007	0.160±0.007	0.318±0.031	/	0.143±0.018	0.131±0.005	0.128±0.006	0.208±0.023
P7	0.231±0.01	0.376±0.019	0.176±0.011	0.190±0.01	0.268±0.028	/	0.232±0.041	0.166±0.005	0.14±0.008	0.140±0.008
P11	0.231±0.003	0.258±0.04	0.171±0.009	0.161±0.011	0.245±0.022	/	0.141±0.02	0.131±0.004	0.145±0.006	0.145±0.006
R11	0.195±0.014	0.310±0.02	/	0.282±0.013	0.277±0.014	/	0.146±0.016	0.181±0.008	0.144±0.012	0.202±0.004
R19	0.214±0.025	0.209±0.005	/	0.224±0.01	0.330±0.016	/	0.145±0.02	0.177±0.013	0.162±0.019	0.190±0.014
B21	0.163±0.016	0.203±0.004	0.207±0.04	0.157±0.008	0.282±0.017	0.163±0.001	0.123±0.002	0.116±0.004	0.163±0.015	/
B22	0.164±0.014	0.217±0.012	0.149±0.01	0.180±0.018	0.226±0.024	0.162±0.002	0.127±0.002	0.116±0.006	0.143±0.003	/
b82	0.178±0.007	0.161±0.012	/	0.155±0.027	0.178±0.01	/	0.128±0.004	0.132±0.002	0.145±0.005	0.263±0.026
b112	0.174±0.015	0.195±0.006	/	0.151±0.008	0.199±0.007	/	0.126±0.003	0.126±0.006	0.139±0.007	0.276±0.015
F7+B21	0.200±0.013	0.405±0.041	/	0.176±0.005	0.462±0.022	0.158±0.009	0.179±0.011	0.138±0.012	0.158±0.006	/
F7+B22	0.199±0.006	0.143±0.029	/	0.160±0.003b	0.474±0.019	0.172±0.009	0.281±0.01	0.154±0.002	0.185±0.017	/
F7+b82	0.198±0.017	0.236±0.022	0.261±0.029	0.269±0.034	0.157±0.054	/	0.207±0.006	0.149±0.022	0.131±0.003	0.292±0.004
F7+b112	0.190±0.014	0.162±0.046	0.243±0.005	0.129±0.002	0.240±0.031	/	0.348±0.046	0.156±0.033	0.141±0.003	0.285±0.023
F10+B21	0.171±0.024	0.344±0.035	/	0.243±0.026	0.472±0.034	0.175±0.013	0.165±0.01	0.127±0.003	0.146±0.006	/
F10+B22	0.206±0.012	0.311±0.064	/	0.221±0.043	0.195±0.035	0.173±0.005	0.195±0.011	0.249±0.022	0.171±0.002	/
F10+b82	0.203±0.012	0.267±0.068	0.144±0.002	0.219±0.057	0.307±0.031	/	0.207±0.002	0.131±0.001	0.137±0.009	0.295±0.023
F10+b112	0.210±0.007	0.248±0.06	0.177±0.004	0.276±0.038	0.247±0.048	/	0.206±0.006	0.18±0.004	0.159±0.004	0.253±0.018
P7+B21	0.173±0.007	0.491±0.033	/	0.187±0.007	0.406±0.056	0.190±0.001	0.240±0.04b	0.134±0.002	0.140±0.003	/
P7+B22	0.173±0.007	0.491±0.033	/	0.454±0.029	0.244±0.075	0.234±0.004	0.336±0.015	0.156±0.007	0.139±0.008	/
P7+b82	0.202±0.013	0.320±0.043	0.243±0.007	0.318±0.029	0.291±0.029	/	0.306±0.057	0.137±0.011	0.136±0.009	0.358±0.031
P7+b112	0.195±0.021	0.257±0.012	0.234±0.031	0.338±0.045	0.437±0.04	/	0.311±0.049	0.152±0.017	0.132±0.003	0.350±0.026
P11+B22	0.158±0.035	0.236±0.038	/	0.217±0.045	0.300±0.078	0.174±0.01	0.174±0.002	0.151±0.017	0.202±0.009	/
P11+b82	0.192±0.021	0.219±0.036	0.361±0.004	0.239±0.028	0.264±0.029	/	0.208±0.002	0.185±0.023	0.150±0.008	0.332±0.024
P11+b112	0.186±0.021	0.209±0.026	0.327±0.066	0.228±0.03	0.241±0.057	/	0.243±0.021	0.193±0.026	0.159±0.017	0.308±0.016
R11+B22	0.186±0.009	0.339±0.024	0.354±0.022	0.266±0.007	0.446±0.077	0.183±0.016	0.196±0.005	0.163±0.003	0.249±0.026	/
R11+b82	0.238±0.012	0.303±0.054	/	0.217±0.026	0.363±0.072	/	0.168±0.006	0.146±0.016	0.288±0.01	0.276±0.015
R11+b112	0.218±0.008	0.265±0.056	/	0.390±0.01	0.419±0.061	/	0.203±0.011	0.187±0.003	0.272±0.009	0.303±0.025
R19+B22	0.187±0.011	0.265±0.037	0.371±0.024	0.357±0.061	0.456±0.038	0.174±0.006	0.155±0.007	0.173±0.006	0.219±0.009	/
R19+b82	0.234±0.007	0.198±0.012	/	0.407±0.031	0.326±0.028	/	0.190±0.012	0.159±0.019	0.194±0.01	0.246±0.034
R19+b112	0.226±0.009	0.224±0.061	/	0.402±0.031	0.477±0.036	/	0.195±0.006	0.144±0.007	0.258±0.053	0.210±0.009

注: 此表数值为不同益生元培养基中各菌株单独培养和共培养的菌悬液$OD_{590\ nm}$值。

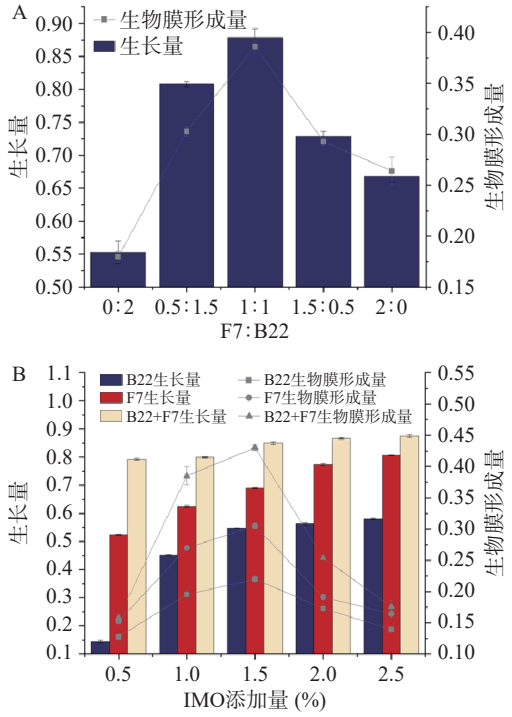


图 3 不同接菌比例及 IMO 添加量对菌株生长及生物膜形成的影响

Fig.3 Effects of inoculation ratio and IMO dosage on bacterial growth and biofilm formation

加, 而菌株共培养时的生长量则变化不明显。当 IMO 添加量为 1.5% 时, 共培养的菌株生长量与 2% 和 2.5% 时接近, 而此时的生物膜形成量最高。因此, 发酵乳杆菌 F7 与长双歧杆菌 B22 共培养体系中 IMO 的最佳添加量为 1.5%。

2.2.4 复合菌株共培养体系中生物膜形态观察 进一步表征复合菌株共培养时生物膜的形成情况, 利用光学显微镜(图像放大倍数为 200 倍)及场发射扫描电镜对 B22 和 F7 在 IMO中单独培养及共培养时所

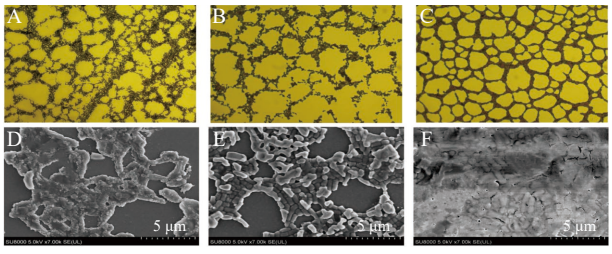


图 4 显微镜及扫描电镜下单菌培养及复合菌株共培养的生物膜形态观察

Fig.4 Morphological observation of biofilms in pure and co-cultures using microscopy and scanning electron microscopy

注: A~C 分别为显微镜下 B22、F7 单独培养及 B22 与 F7 共培养时形成的生物膜; D~F 分别为扫描电镜下 B22、F7 单独培养及 B22 与 F7 共培养时形成的生物膜(5 μm)。

形成的生物膜进行了观察。在光学显微镜下两株菌单独培养时所形成的结构较松散，一些菌体的形态依旧可见；而共培养时，菌体完全被其所分泌的胞外多糖包裹，生物膜结构明显较单独培养时更紧密（图 4A~图 4C）。扫描电镜结果（图 4D~图 4F）进一步证实了两株菌单独培养形成的生物膜在视野内呈网络状分布；而共培养时，生物膜中菌体紧密聚集并被胞外聚合物紧密包裹，形成连续厚层，并平铺整个视野。

2.3　复合益生菌微胶囊的粒径、活菌数及包埋率分析

复合益生菌微胶囊通过蛋白质、多糖等天然高分子物质包埋益生菌等微粒，以保护这些物质不受外界环境影响，并达到延缓或控制其释放速度来发挥益生功效[34]。本研究以角豆胶、海藻酸钠及果胶为壁材，对所筛选得到的高产生物膜的复合菌株 F7 和 B22 通过挤压法包埋，形成单层微胶囊（左）和双层微胶囊（右），其基本外观图如图 5 所示。采用原位培养法形成生物膜样微胶囊，最后利用壳聚糖进行复合包埋。通过对复合益生菌微胶囊的粒径、活菌数以及包埋率进行表征。结果如表 3 所示，四种微胶囊的平均粒径范围在 2.29~2.45 mm，活菌数范围为 9.58~10.03 lg CFU/g。原位培养使单位质量单层微胶囊内的活菌数增加，而双层包埋过程使微胶囊中的活菌数有所损失，包埋率降低，这可能与利用壳聚糖二次包埋时，部分菌体从微胶囊中逸散到了壳聚糖溶液里有关。

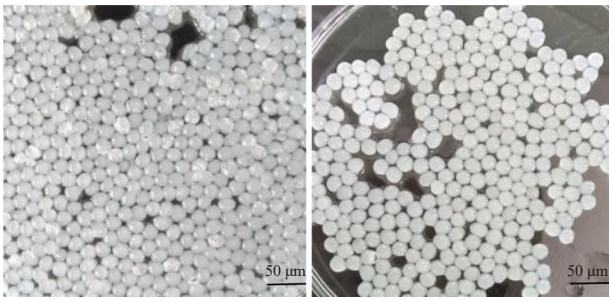


图 5　微胶囊的外观图

Fig.5　Appearance of microcapsules

表 3　复合益生菌微胶囊的粒径、活菌数以及包埋率

Table 3　Particle size, viable bacteria count and embedding rate of composite probiotic microcapsules

微胶囊	粒径（mm）	活菌数（lg CFU/g）	包埋率（%）
单层微胶囊（MC1）	2.29±0.02^{c}	9.71±0.02^{c}	93.07±0.08^{c}
双层微胶囊（MC2）	2.43±0.02^{ab}	9.58±0.06^{d}	91.87±0.68^{d}
生物膜样单层微胶囊（MC3）	2.39±0.02^{b}	10.03±0.03^{a}	96.1±0.14^{a}
生物膜样双层微胶囊（MC4）	2.45±0.01^{a}	9.92±0.03^{b}	95.13±0.33^{b}

注：同列不同字母代表差异显著（P<0.05）。

2.4　冻干复合益生菌微胶囊的特性分析

2.4.1　复合益生菌微胶囊冻干后的表面形态　利用扫描电镜对冷冻干燥后的四种复合益生菌微胶囊进行观察，结果如图 6 所示。冻干后的微胶囊均表现出皱缩现象，其中未经壳聚糖涂层的单层微胶囊和生物膜样单层微胶囊皱缩现象严重，形状扁塌且不规则，这可能是壁材物质形成的凝胶在潮湿状态下会膨胀，冷冻干燥使其失水皱缩（图 6A、图 6E）。相比之下，有壳聚糖二次涂层的双层微胶囊其表面褶皱减少，形状更规则（图 6C、图 6G）。将微胶囊表面局部放大来看，未经壳聚糖涂膜的单层微胶囊和生物膜样单层微胶囊表面明显可见复合益生菌的杆状菌体形态。单层微胶囊中（图 6B）被包裹的菌体均处于游离状态，而生物膜样微胶囊中（图 6F）中可以观察到菌株生长聚集现象，这表明微胶囊中生物膜的形成。经过壳聚糖二次涂层的微胶囊表面菌体不如单层微胶囊清晰（图 6D），而仍可观察到生物膜样双层微胶囊（图 6H）中细菌聚集情况，这与目前已有的一些相关研究结果类似[35]。

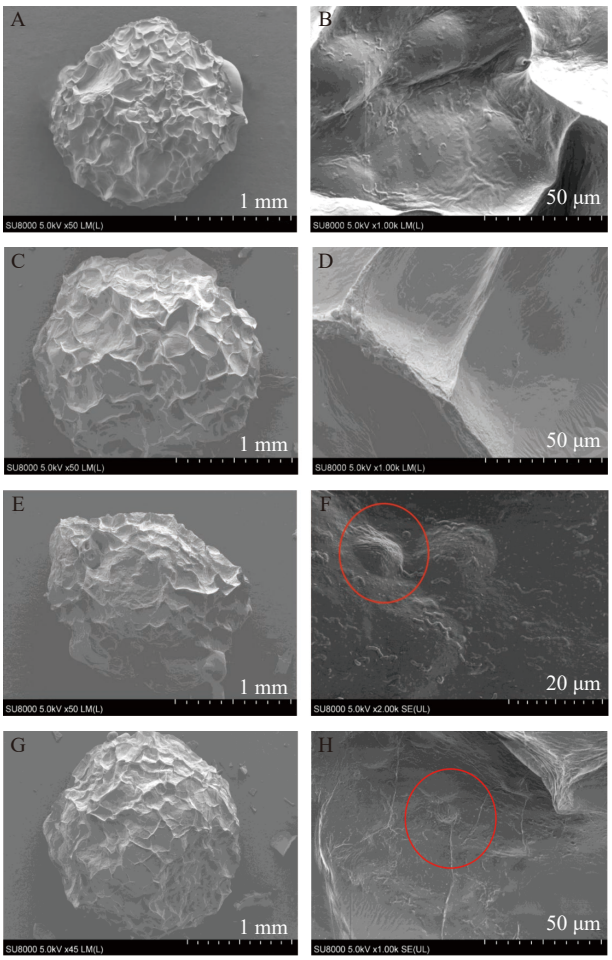


图 6　复合益生菌微胶囊冻干后的表面形态

Fig.6　Surface morphology of complex probiotic microcapsules after lyophilization

注：A、B 为单层微胶囊的表面形态图；C、D 为双层微胶囊的表面形态图；E、F 为生物膜样单层微胶囊的表面形态；G、H 为生物膜样双层微胶囊的表面形态图；红圈标记处可清晰观察到菌株生长聚集现象。

2.4.2　复合益生菌微胶囊对冷冻干燥及热处理的耐受性分析　益生菌在真空冷冻干燥过程中会受到干燥和冷冻作用的伤害，导致存活率降低[36]。复合益生

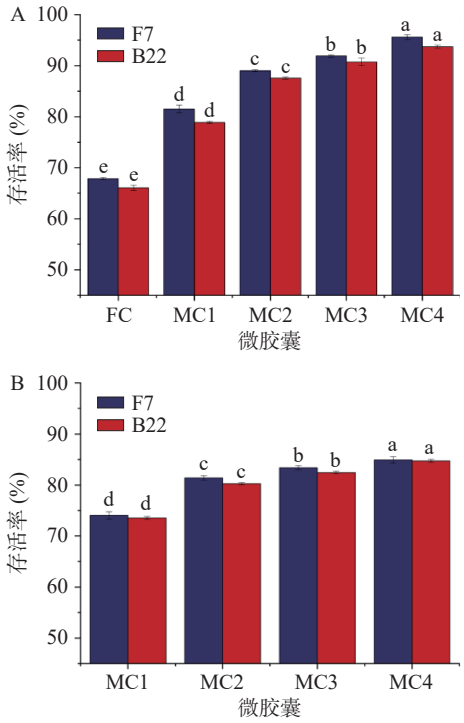


图 7　复合益生菌微胶囊冷冻干燥后菌株的存活率及耐热性分析

Fig.7　Survival rate and heat resistance analysis of microencapsulated probiotic strains after freeze-drying

注: A 为冷冻干燥后微胶囊中菌株的存活率; B 为冻干微胶囊在 50 ℃ 热处理 10 min 后菌株的存活率; FC 代表游离菌、MC1 代表单层微胶囊、MC2 代表双层微胶囊、MC3 代表生物膜样单层微胶囊、MC4 代表生物膜样双层微胶囊; 不同小写字母表示数据差异显著, $P<0.05$。

菌微胶囊冷冻干燥后的存活率变化如图 7A 所示。四种微胶囊在冷冻干燥过程中有效提高了菌株的存活率。其中, 生物膜样双层微胶囊菌株存活率最高, F7 和 B22 的存活率分别为 95.64% 和 93.74%, 而游离菌中 F7 和 B22 的存活率最低。此外, 冻干后的微胶囊在 50 ℃ 热处理 10 min 后的菌株存活率如图 7B 所示, 生物膜样双层微胶囊中菌株的存活率均显著 ($P<0.05$)高于其他三种微胶囊。

2.4.3　冻干复合益生菌微胶囊对连续模拟胃肠液的耐受性分析　将冻干后的微胶囊置于模拟胃液中进行消化反应, 120 min 后转移至模拟肠液中继续反应 120 min。微胶囊中菌株存活率如表 4 所示, 经 240 min 的模拟消化反应, 冻干生物膜样双层微胶囊的菌株存活率均高于其他三种微胶囊。

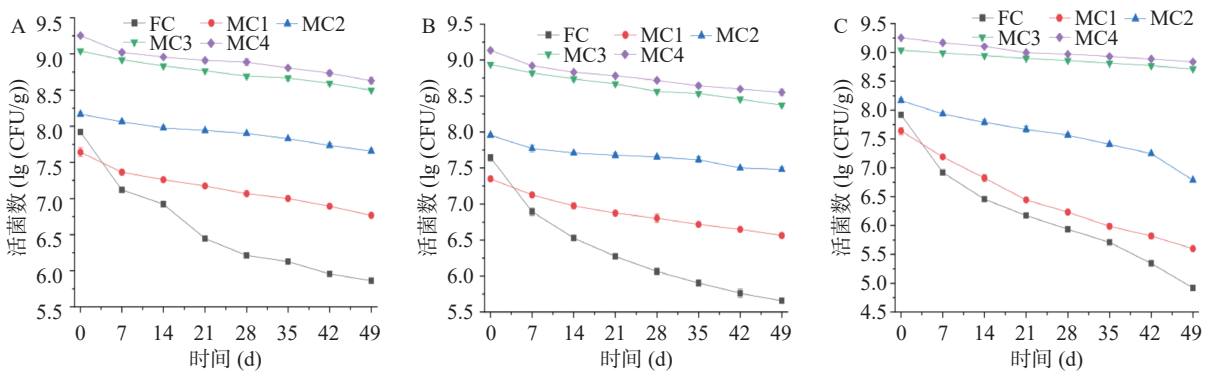
2.4.4　冻干复合益生菌微胶囊在不同温度下的贮藏稳定性　分别测定游离菌和四种微胶囊在−18 ℃(模拟冷冻条件)、4 ℃(模拟冷藏环境)及 25 ℃(模拟室温条件)下贮存的活菌数变化。结果如图 8 所示, 在−18 ℃ 贮藏时, 与游离菌相比, 生物膜样单层微胶囊和生物膜样双层微胶囊中活菌数下降趋势均不明显, 单层微胶囊中活菌数下降趋势明显, 其中单层微胶囊中两菌株活菌数分别下降 0.84 和 0.79 lg CFU/g, 而其他三种微胶囊中的活菌数下降值均在 0.6 lg CFU/g 左右。在 4 ℃贮藏时, 未形成生物膜的两种微胶囊活菌数下降趋势明显, 而生物膜样微胶囊的稳定性较−18 ℃ 贮藏时有所提高, 活菌数下降值约为 0.5 lg CFU/g, 在−18 ℃ 和 4 ℃ 保存 49 d 后, 生物膜样双层微胶囊内活菌数量仍可维持在 10^8 CFU/g 以上。在 25 ℃贮藏时, 游离菌及四种微胶囊的活菌数均明显下降。游离菌活菌数下降值超过 3 lg CFU/g。三种贮藏温度下, 四种微胶囊均能有效提高菌株的存活能力, 且壳聚糖二次涂层及原位培养形成生物膜都促使微胶囊的贮藏稳定性得到提高。

表 4　冻干复合益生菌微胶囊在连续模拟胃肠液中处理后的菌株存活率

Table 4　Survival rate of bacterial strains in lyophilized composite probiotic microcapsules after sequential exposure to simulated gastrointestinal fluids

菌株	模拟胃液耐受性				模拟肠液耐受性			
	MC1	MC2	MC3	MC4	MC1	MC2	MC3	MC4
F7	72.78±0.56^{c}	79.79±0.42^{b}	83.66±0.58^{ab}	85.21±0.13^{a}	50.82±0.42^{c}	65.47±0.11^{b}	71.18±0.09^{ab}	75.53±0.54^{a}
B22	70.82±0.25^{c}	76.00±0.14^{b}	80.26±0.32^{ab}	85.32±0.45^{a}	47.75±0.17^{d}	63.24±0.12^{c}	69.94±0.28^{b}	73.68±0.57^{a}

注: 同行不同小写字母表示相同模拟环境下, 不同处理方式的数据差异显著($P<0.05$); MC1代表单层微胶囊、MC2代表双层微胶囊、MC3代表生物膜样单层微胶囊、MC4代表生物膜样双层微胶囊。



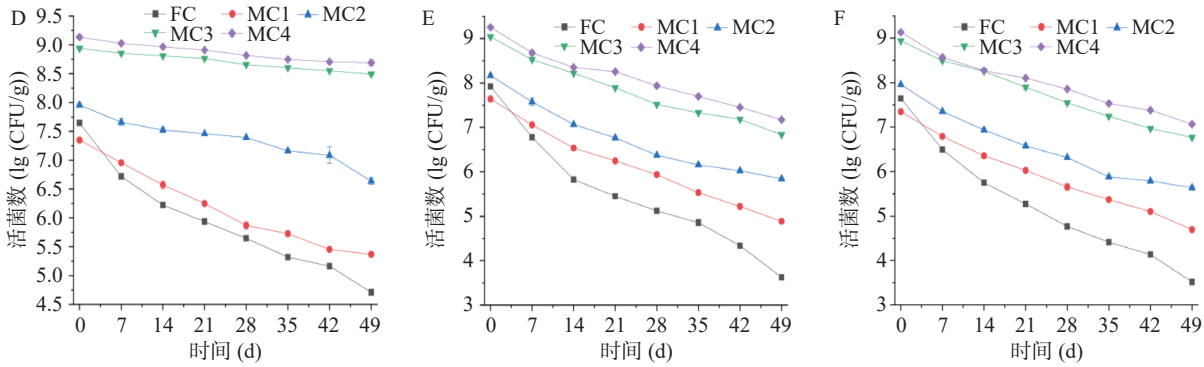


图 8　冻干复合益生菌微胶囊在不同贮藏温度下的稳定性分析

Fig.8　Stability analysis of freeze-dried composite probiotic microcapsules at different storage temperatures

注：A、B 分别为−18 ℃ 贮藏期间 F7 和 B22 的活菌数；C、D 分别为 4 ℃ 贮藏期间微胶囊中 F7 和 B22 的活菌数；E、F 分别为 25 ℃ 贮藏期间微胶囊中 F7 和 B22 的活菌数；FC 代表游离菌、MC1 代表单层微胶囊、MC2 代表双层微胶囊、MC3 代表生物膜样单层微胶囊、MC4 代表生物膜样双层微胶囊。

3　结论

本研究通过培养法和结晶紫染色法，测定益生菌在不同益生元培养基中的菌株生长量和生物膜形成能力，确定并优化了发酵乳杆菌 F7 与长双歧杆菌 B22 组合在 IMO 中共培养时最佳接种比例为 1∶1，IMO 的最佳添加量为 1.5%。同时，以传统多糖物质为微胶囊壁材，采用挤压法和原位培养的方法，将 F7 和 B22 复合菌进行包埋制备四种不同类型的复合益生菌微胶囊，并探讨冻干后复合益生菌微胶囊的特性。冷冻干燥后，生物膜样双层微胶囊中菌株存活率仍达到 93% 以上，有效降低了冻干过程对菌株的伤害。冻干微胶囊的低温贮藏结果表明，在−18 ℃ 和 4 ℃ 下贮藏 49 d 后，生物膜样微胶囊的活菌数仍可保持在 10^8 CFU/g 以上。生物膜的形成显著提高了微胶囊对菌株的保护作用，本研究为功能性益生菌微胶囊的进一步开发利用奠定了基础，并有利于冻干益生菌微胶囊化生产及其在食品工业中的应用。

© 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] JUAN SEBASTIÁN. RAMÍREZ-LARROTA, ECKHARD U. An introduction to bacterial biofilms and their proteases, and their roles in host infection and immune evasion[J]. Biomolecules, 2022, 12(2): 345−360.

[2] 钟华晨, 张悦, 顾悦, 等. 高产生物膜乳酸菌的筛选, 鉴定及胞外多糖分泌条件的研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 76−86. [ZHONG H C, ZHANG Y, GU Y, et al. Screening and identification of high-producing biofilm lactic acid bacteria and studies on the conditions of extracellular polysaccharide secretion[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 76−86.]

[3] BERRÍOS P, FUENTES J A, SALAS D, et al. Inhibitory effect of biofilm-forming *Lactobacillus kunkeei* strains against virulent *Pseudomonas aeruginosa in vitro* and in honeycomb moth (*Galleria mellonella*) infection model[J]. Beneficial Microbes, 2018, 9(2): 257−268.

[4] 熊雨, 霍然, 曲春波, 等. 益生菌清除食源性致病菌生物膜研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(22): 229−235. [XIONG Y, HUO R, QU C B, et al. Research progress on the removal of foodborne pathogen biofilms by probiotics[J]. Journal of Food Safety and Quality Detection, 2024, 15(22): 229−235.]

[5] BOLLINGER R R, BARBAS A S, BUSH E L, et al. Biofilms in the normal human large bowel: Fact rather than fiction[J]. Gut, 2007, 56(10): 1481−1482.

[6] 赵佳伟, 敖晓琳, 赵珂. 金属离子对乳酸菌生物膜形成的影响及其机制研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 341−346. [ZHAO Jiawei, AO Xiaolin, ZHAO Ke. Progress in understanding the effect and mechanism of metal ions on biofilm formation of lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2019, 40(9): 341−346.]

[7] MORELLI L. Probiotics: Definition and taxonomy 10 years after the FAO/WHO guidelines[M]. Probiotic Bacteria and Their Effect on Human Health and Well-Being, 2013, 107: 1−8.

[8] CHANDRASEKARAN P, WEISKIRCHEN S, WEISKIRCHEN R. Effects of probiotics on gut microbiota: An overview[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(11): 6022−6042.

[9] SALAS-JARA M J, ILABACA A, VEGA M, et al. Biofilm forming *Lactobacillus*: New challenges for the development of probiotics[J]. Microorganisms, 2016, 4(3): 35.

[10] MA N, GUO P T, CHEN J Y, et al. Poly-*β*-hydroxybutyrate alleviated diarrhea and colitis via *Lactobacillus johnsonii* biofilm-mediated maturation of sulfomucin[J]. Science Chian Life Sciences, 2023, 66(7): 1569−1588.

[11] 刘学云, 于新, 何嘉敏, 等. 九种益生菌之间的相互作用及协同共生机理[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 65−70. [LIU Xueyun, YU Xin, HE Jiamin, et al. Interactions between nine probiotics and mechanisms of cooperative symbiosis[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(13): 65−70.]

[12] LUO Yanhong, XIAO Yue, ZHAO Jianxin, et al. The role of mucin and oligosaccharides via cross-feeding activities by *Bifidobacterium*: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 1329−1337.

[13] BURMØLLE M, REN Dawei, BJARNSHOLT T, et al. Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter?[J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(2): 84−91.

[14] LIU Huan, XIE Mingyong, NIE Shaoping. Recent trends and

applications of polysaccharides for microencapsulation of probiotics[J]. Food Frontiers, 2020, 1(1): 45−59.
[15] 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.
[16] AMBALAM P, KONDEPUDI K K, BALUSUPATI P, et al. Prebiotic preferences of human lactobacilli strains in co-culture with bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(6): 1672−1682.
[17] 张国丽, 杨陈文, 余茜, 等. 生物膜形成对植物乳杆菌 PG3-1 耐受性及功能基因表达的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(4): 29−34. [ZHANG G L, YANG C W, YU Q, et al. The effection of *Lactobacillus plantarum* PG3-1 biofilm on the tolerance and gene expression[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(4): 29−34.]
[18] 夏晓风. 常用低聚糖对四种肠道菌生长及成膜效应的影响[D]. 南昌: 江西农业大学, 2015. [XIA Xiaofeng. The effect of the common oligosaccharides on the growth and biofilm formation of four intestinal bacteria[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2015.]
[19] 何云侠. 干酪乳杆菌微胶囊的制备及应用[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019. [HE Yunxia. Preparation and application of *Lactobacillus casei* microcapsules[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2019.]
[20] 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. Optimization of cryoprotectants complexed with xylooligosaccharides and its effects on the properties of *Bifidobacterium* microcapsules[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 245−251.]
[21] 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. [MA Hangyu, ZHANG Shikai, WU Peng. Preparation and digestive tolerance of compound prebiotic microcapsules[J]. Food Research and Development, 2023, 44(3): 152−161.]
[22] 陈秉彦, 林晓姿, 李维新, 等. 海藻酸钠-纳米纤维素胶粒对乳酸菌胃肠液耐受性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 179−185. [CHEN Bingyan, LIN Xiaozi, LI Weixin, et al. Effects of sodium alginate-nanocellulose beads on the viability of lactic acid bacteria in simulated gastrointestinal fluid[J]. Food Science, 2021, 42(3): 179−185.]
[23] 徐显睿, 李翠凤, 张宗博, 等. 嗜酸乳杆菌和双歧杆菌遗传性对其益生特性及货架期菌数的影响[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(4): 21−25. [XU Xianrui, LI Cuifeng, ZHANG Zongbo, et al. Effect of genetic characteristic on probiotic property and shelf-life viable count for *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*[J]. China Dairy Industry, 2022, 50(4): 21−25.]
[24] 袁先铃, 周莺茹, 郑连强, 等. 酸菜中乳酸菌生长曲线、产酸性能及抑菌性能探究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(14): 199−203. [YUAN Xianling, ZHOU Yingru, ZHENG Lianqiang, et al. Investigation into the growth curve, acid-production ability, and bacterial inhibition of lactic acid bacteria in sauerkraut[J]. Food Research and Development, 2022, 43(14): 199−203.]
[25] 丁伯乐, 蔡为荣, 闻志莹, 等. 山药低聚糖制备分离及对五种益生菌的增殖作用[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 74−79. [DING Bole, CAI Weirong, WEN Zhiying, et al. Preparation and isolation of yam oligosaccharides and its proliferation effect on five probiotics strains[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 74−79.]
[26] 辛跃强, 梁荣荣, 王瑞明. 低聚半乳糖对肠道益生菌产胞外多糖作用的研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(6): 144−150. [XIN Yueqiang, LIANG Rongrong, WANG Ruiming. Effects of galactooligosaccharide on exopolysaccharide produced by intestinal probiotics[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(6): 144−150.]
[27] LECCESE TERRAF M C, JUÁREZ TOMÁS M S, Nader-MACÍAS M E F, et al. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal *Lactobacilli* and influence of culture media components[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(6): 1517−1529.
[28] 朱如意, 杭锋, 张灏, 等. 双歧杆菌生物膜形成规律及其表面性质相关性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(11): 38−45. [ZHU Ruyi, HANG Feng, ZHANG Hao, et al. Biofilm-forming ability of *Bifidobacterium* and the correlation with cell surface characteristics[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(11): 38−45.]
[29] HU Y, KETABI A, BUCHKO A, et al. Metabolism of isomalto-oligosaccharides by *Lactobacillus reuteri* and bifidobacteria[J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 57(2): 108−114.
[30] 孙亦心, 李蕊, 刘铭珠, 等. 低聚果糖对青春双歧杆菌生物膜形成的影响[J]. 黑龙江医药科学, 2017, 40(1): 42−43. [SUN Yixin, LI Rui, LIU Mingzhu, et al. Effect of fructooligosaccharides on biofilm formation of *Bifidobacterium adolescentis*[J]. Heilongjiang Medicine and Pharmacy, 2017, 40(1): 42−43.]
[31] LEBEER S, VERHOEVEN T L A, PEREA VÉLEZ M, et al. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6768−6775.
[32] PIOTROWSKI M, WULTAŃSKA D, PITUCH H. Effect of prebiotics on *Bacteroides* sp. adhesion and biofilm formation and synbiotic effect on *Clostridioides difficile*[J]. Future Microbiology, 2022, 17(5): 363−375.
[33] GUARNER F, KHAN A G, GARISCH J, et al. World gastroenterology organisation practice guideline: Probiotics and prebiotics-May 2008[J]. South African Gastroenterology Review, 2008, 6(2): 14−25.
[34] 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. Study on preparation method and characteristics of multi-core microcapsules loaded with two probiotics[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(6): 127−138.]
[35] HE Caian, SAMPERS I, van de WALLE D, et al. Encapsulation of *Lactobacillus* in low-methoxyl pectin-based microcapsules stimulates biofilm formation: Enhanced resistances to heat shock and simulated gastrointestinal digestion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(22): 6281−6290.
[36] 石月. 复合乳杆菌微胶囊的研制及质量评价[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2015. [SHI Y. Preparation and quality evaluation of composite *Lactobacillus* microcapsules[D]. Harbin: Heilongjiang University, 2015.]