

# 抗菌肽G-K脂质体的制备工艺优化及其抑菌性质

蒲传奋, 唐文婷\*

(青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109)

**摘要:** 采用薄膜-超声法制备抗菌肽G-K脂质体, 考察配方及工艺条件对平均粒径和包封率的影响, 分析其贮存稳定性及抑菌活性。结果表明, 胆固醇与磷脂质量比1:6、抗菌肽G-K与磷脂质量比1:4、磷脂用量7.5 mg/mL磷酸缓冲溶液、pH 7.2、超声功率300 W条件下, 制备得到的抗菌肽G-K脂质体为球形, 平均粒径为 $(128.27 \pm 2.69)$  nm, 包封率为62.83%, 抗菌肽G-K有效载量为5.08%。抗菌肽G-K脂质体在4 °C条件下的贮存稳定性高于25 °C。抑菌圈、生长曲线测定和碘化丙啶染色实验表明抗菌肽G-K脂质体对大肠杆菌具有明显缓释型抑菌作用。

**关键词:** 抗菌肽; 脂质体; 大肠杆菌; 粒径; 包封率

## Optimized Preparation and Properties of Antibacterial Peptide G-K Liposome

PU Chuanfen, TANG Wenting\*

(College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** Antibacterial peptide (AP) G-K liposomes were prepared by thin film evaporation-sonication method. The effects of formulated ingredients and processing conditions on the average particle diameter and encapsulation efficiency of liposomes were examined. The stability and antibacterial activity were analyzed as well. The results showed that spherical liposomes with average particle size of  $(128.27 \pm 2.69)$  nm, encapsulation efficiency of 62.83%, and effective loading of AP G-K of 5.08% were obtained when phospholipid at 7.5 mg/mL in PBS buffer was blended with cholesterol and AP G-K at a mass ratio of 6:1 and 4:1 separately with sonication at 300 W. The liposomes were more stable when stored at 4 °C than at 25 °C. Growth curve and propidium iodide staining experiments showed that AP G-K liposomes had a strong antibacterial effect on *Escherichia coli* in a slow-release way.

**Key words:** antibacterial peptide; liposome; *Escherichia coli*; particle size; encapsulation efficiency

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706036

中图分类号: R944.15

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 06-0229-07

引文格式:

蒲传奋, 唐文婷. 抗菌肽G-K脂质体的制备工艺优化及其抑菌性质[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 229-235. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706036. <http://www.spkx.net.cn>

PU Chuanfen, TANG Wenting. Optimized preparation and properties of antibacterial peptide G-K liposome[J]. Food Science, 2017, 38(6): 229-235. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706036. <http://www.spkx.net.cn>

脂质体是由磷脂及其类似物分散于水相, 自发形成的具有双分子层结构的封闭囊泡。这种囊泡制备方法相对简单, 并具有天然生物膜的结构、流动性和两侧不对称性, 被广泛用作活性物质的包埋基质<sup>[1-2]</sup>。根据制备工艺的不同, 脂质体的尺寸分布可从纳米变化至微米尺度, 结构也可分为单层、多层和多囊脂质体。脂质体构成磷脂具有两亲性, 使其可以同时包埋亲水和疏水性物质, 水分散性好; 类生物膜结构使其具有较好的生物相

容性, 无免疫抑制作用, 毒性小; 脂质体能提高被包埋物的稳定性, 保护其活性的发挥, 并可定向传输至某些器官或组织中, 提高被包埋物的有效作用浓度<sup>[3]</sup>。目前, 脂质体的制备技术日趋完善, 其在生命科学、药物缓释和材料科学等领域引起各国研究者的广泛关注, 在农业、食品行业也显示出巨大的应用前景<sup>[4-6]</sup>。

因合成食品防腐剂的潜在危害和细菌耐药性的不断增加, 一种新型抗菌剂——抗菌肽已引起研究者的广泛

收稿日期: 2016-06-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31501578); 山东省中青年科学家科研奖励基金项目(BS2015SW019); 山东省高等学校科技计划项目(J16LE22); 青岛农业大学高层次人才科研基金项目(6631115030)

作者简介: 蒲传奋(1980—), 男, 讲师, 硕士, 主要从事食品科学与工程研究。E-mail: pcf800320@163.com

\*通信作者: 唐文婷(1981—), 女, 副教授, 博士, 主要从事活性肽的制备及应用研究。E-mail: twtfly@126.com

关注。抗菌肽是具有广谱抗菌活性的小分子短肽,是天然存在的生物免疫防御系统的重要组成部分<sup>[7-8]</sup>。抗菌肽的杀菌机制有别于传统抗生素,不易产生交叉抗性和病原菌耐药性,且具有抗病毒、抗肿瘤、调节免疫和促进伤口愈合等多重生物活性<sup>[9]</sup>。此外,抗菌肽有较好的热稳定性和酸碱稳定性<sup>[10-11]</sup>,在实际应用中具有独特的使用特性,可用于医药、食品、饲料加工业等领域,具有开发应用前景<sup>[12-13]</sup>。抗菌肽GLSRLFTALK(以下简称抗菌肽G-K)是笔者前期从鳃鱼中提取出的一种阳离子抗菌肽,已证实该肽对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑菌作用<sup>[14]</sup>。

脂质体包埋能防止抗菌肽与其他食品成分相互作用而导致的抗菌性能下降,并能提高特定抗菌肽(如Nisin)的抗菌特性<sup>[15]</sup>。为提高抗菌肽的利用率,实现其长效、缓释型抑菌性能,本研究采用薄膜-超声法将鳃鱼抗菌肽G-K包裹在脂质体中,制备抗菌肽脂质体,分析制备条件对脂质体平均粒径及包封率的影响,确定最终制备工艺,并考察此条件下制备的抗菌肽脂质体的形态、大小、包封率、有效载量及在不同温度条件下的贮存稳定性。通过抑菌圈、生长曲线测定和碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色实验研究了抗菌肽G-K脂质体对大肠杆菌的抑制活性。研究结果为开发缓释型食品抑菌剂提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

卵磷脂 生工生物工程(上海)股份有限公司; 胆固醇 北京奥博星生物技术有限公司; 抗菌肽G-K 上海楚肽生物科技有限公司; LB培养基 青岛海博生物技术有限公司; 2%磷钨酸负染色液 上海君瑞生物技术有限公司; TritonX-100、PI 美国Sigma公司; 大肠杆菌*Escherichia coli* ATCC 25922由青岛农业大学食品学院提供。其他所用化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

R-1001-VN旋转蒸发仪 郑州长城科工贸有限公司; JY92-IIN超声波处理仪 宁波新芝生物技术有限公司; BSC-1500IIA2-X生物安全柜 山东博科生物产业有限公司; YXQ-LS-50S II全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅 上海博讯实业有限公司; HT7700透射电子显微镜 日本Hitachi公司; DM750M倒置荧光显微镜 德国Leica公司; LSM 710激光共聚焦显微镜 德国Carl Zeiss公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 脂质体的制备

采用薄膜-超声法制备,称取一定质量的卵磷脂、胆

固醇,置于圆底烧瓶中,加入50 mL甲醇溶解,经旋转蒸发除去有机溶剂,脂质在烧瓶内壁形成干膜,氮气吹干过夜。烧瓶内加入抗菌肽溶液(用0.05 mol/L的磷酸缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)溶解),水化后经冰浴超声处理5 min,即得抗菌肽G-K脂质体混悬液。

#### 1.3.2 制备条件对抗菌肽G-K脂质体平均粒径和包封率的影响

##### 1.3.2.1 单因素试验设计

研究单一因素的影响时,各因素固定水平为:胆固醇与磷脂质量比1:7、抗菌肽G-K与磷脂质量比1:3、磷脂用量5.0 mg/mL PBS、PBS pH 7.0、超声功率300 W。磷脂与胆固醇质量比分别设为1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5; 抗菌肽G-K与磷脂质量比分别设为1:6、1:5、1:4、1:3、1:2; 磷脂用量分别设为2.0、2.5、5.0、7.5、10.0 mg/mL PBS; PBS pH值分别设为6.4、6.8、7.0、7.2、7.4; 超声功率分别设为0、200、250、300、350、400 W。在上述各条件下制备抗菌肽G-K脂质体,测定其平均粒径及包封率。

##### 1.3.2.2 正交试验设计

根据单因素试验结果,在pH 7.2条件下,选择胆固醇与磷脂质量比(A)、抗菌肽G-K与磷脂质量比(B)、磷脂用量(C)、超声功率(D)进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验。

#### 1.3.3 脂质体的性质表征

##### 1.3.3.1 脂质体平均粒径的测定

采用PBS将脂质体适当稀释后,加至专用比色皿中,采用激光纳米粒度仪测定其平均粒径及多分散指数。

##### 1.3.3.2 脂质体形态观察

将抗菌肽G-K脂质体经PBS稀释至适当倍数后,取适量滴于铜网正面,采用滤纸吸干多余样品,再加2%磷钨酸溶液负染4 min,再用滤纸吸干多余染液,室温条件下干燥后采用透射电子显微镜观察脂质体形态。

##### 1.3.3.3 包封率及有效载量的测定

采用离心法分离未包埋抗菌肽和脂质体,4℃条件下8 000 r/min离心2次,每次20 min。离心所得沉淀分散于去离子水中,定容至10 mL。向分散液中加入等体积的2% TritonX-100,以释放抗菌肽。采用高效液相色谱法定量抗菌肽。精确称取抗菌肽G-K 5.0 mg,采用10%乙腈溶液配制100 μg/mL的标准母液,梯度稀释成5、10、20、25、50 μg/mL系列质量浓度的标准溶液,用于标准曲线的测定。色谱分析条件为:Waters symmetry C<sub>18</sub>型色谱柱(250 mm×4.6 mm); 检测器波长215 nm; 进样量10 μL; 柱温30℃; 流动相流速1.0 mL/min; 二元流动相,溶剂A为0.1%(V/V)三氟乙酸溶液,溶剂B为100%乙腈; 洗脱程序:线性梯度洗脱,0~26 min内,溶剂B体积分数由10%增加至80%。

包封率及有效载量按式(1)、(2)计算:

$$\text{包封率}/\% = \frac{\text{包埋抗菌肽质量}}{\text{总抗菌肽质量}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{有效载量}/\% = \frac{\text{包埋抗菌肽质量}}{\text{脂质质量}} \times 100 \quad (2)$$

### 1.3.4 抗菌肽G-K脂质体贮存稳定性

将抗菌肽G-K脂质体贮存于4、25、37℃条件下,分别于0、10、20、30 d取样并分析脂质体的粒径、多分散指数、泄漏率。泄漏率的计算如式(3)所示:

$$\text{泄漏率}/\% = \frac{\text{贮存前包封抗菌肽G-K质量} - \text{贮存后包封抗菌肽G-K质量}}{\text{贮存前包封抗菌肽G-K质量}} \times 100 \quad (3)$$

### 1.3.5 抗菌肽G-K脂质体的抑菌活性

抗菌肽G-K脂质体对大肠杆菌生长曲线的影响及抑菌圈测定分别按文献[16]和[17]方法进行。同时采用激光共聚焦显微镜观察抗菌肽G-K脂质体的抑菌作用。将大肠杆菌于液体培养基中培养至对数期,采用PBS洗涤并重悬制成 $10^5$  CFU/mL菌悬液。取100 μL菌液与100 μL抗菌肽G-K脂质体混合于灭菌96孔板中,以等体积灭菌生理盐水为对照,37℃条件下分别孵育2、4 h,在载玻片上滴加等体积的菌体样品溶液和PI染色液(终质量浓度为50 μg/mL),混合均匀后避光静置5 min,激光共聚焦显微镜观察样品。

### 1.4 数据处理

所有实验测定重复3次处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 18.0软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗菌肽G-K脂质体制作工艺优化结果

#### 2.1.1 胆固醇与磷脂质量比对脂质体平均粒径和包封率的影响

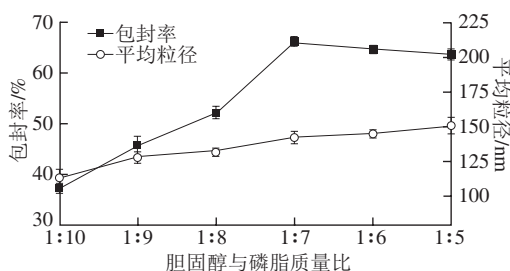


图1 胆固醇与磷脂质量比对脂质体平均粒径和包封率的影响

Fig. 1 Effects of mass ratio of cholesterol to phospholipid on particle size and encapsulation efficiency of liposomes

胆固醇可调节磷脂双分子层膜的流动性,影响膜的通透性并增加脂质体的稳定性<sup>[18]</sup>。如图1所示,随着胆固醇用量的增加,脂质体包封率先显著增大后缓慢减小,在胆固醇与磷脂质量比为1:7时包封率最大。这是因为一

定量的胆固醇可降低磷脂双分子层的流动性和亲水性、增加膜的致密程度和刚性,同时可增大双分子层的总表面积,因而能提高抗菌肽G-K的包封率。但因胆固醇自身不能形成双分子层,进一步增加胆固醇的用量,磷脂双分子层的刚性反而下降,抗菌肽更容易从囊泡中释放出来,使得包封率下降。抗菌肽G-K脂质体的平均粒径随胆固醇用量的增加而增大,这是由于更多的胆固醇嵌入磷脂双分子层导致的。因此选择胆固醇与磷脂质量比为1:7制备抗菌肽G-K脂质体。

#### 2.1.2 抗菌肽G-K与磷脂质量比对脂质体平均粒径和包封率的影响

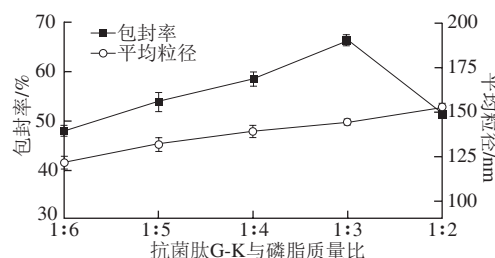


图2 抗菌肽G-K与磷脂质量比对脂质体平均粒径和包封率的影响

Fig. 2 Effects of mass ratio of AP G-K to phospholipid on particle size and encapsulation efficiency of liposomes

如图2所示,抗菌肽G-K与磷脂质量比在1:6~1:3,包封率由47.90%增至67.08%;当抗菌肽G-K载量继续增加至质量比为1:2时,脂质体包封率降至51.37%,脂质体平均粒径在此范围内缓慢增大。一定范围内抗菌肽G-K质量浓度的增大导致囊泡与其接触机会增多,对其捕捉更容易,因而包封率增大。但特定量磷脂形成的双分子层的包封体积是固定的,当其包封能力增加至饱和时,无法再容纳更多的抗菌肽分子,因此过高的抗菌肽G-K质量浓度反而导致包封率降低。故抗菌肽G-K与磷脂质量比宜选择1:3。

#### 2.1.3 磷脂用量对脂质体平均粒径和包封率的影响

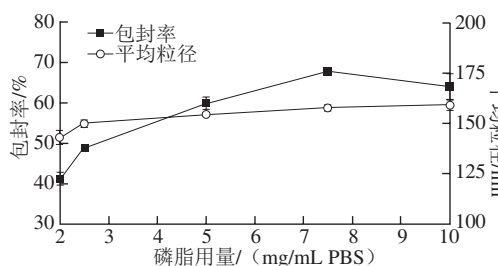


图3 磷脂用量对脂质体平均粒径和包封率的影响

Fig. 3 Effects of phospholipid concentration in PBS buffer on particle size and encapsulation efficiency of liposomes

如图3所示,包封率随磷脂用量的增加先增加后减小,而平均粒径则不断增加。磷脂质量浓度的增加



促进了自组装行为,但过高的质量浓度会引起磷脂的聚集,甚至会有微量沉淀。为制备平均粒径较小、包封率较高的抗菌肽G-K脂质体,磷脂用量宜控制在7.5 mg/mL PBS。

2.1.4 pH值对脂质体平均粒径和包封率的影响

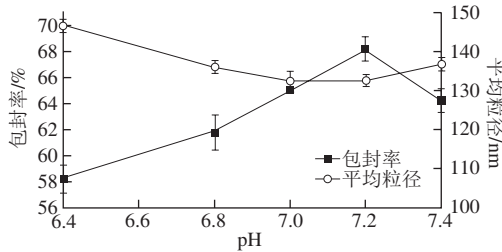


图4 PBS pH值对脂质体平均粒径和包封率的影响

Fig. 4 Effect of PBS buffer pH on particle size and encapsulation efficiency of liposomes

如图4所示, pH 7.2时, 抗菌肽G-K包封率最高、平均粒径最小。pH值会改变脂质体的表面电荷, 进而会改变磷脂的自组装、聚集行为以及脂质体膜的通透性。此外, 磷脂和PBS的H<sup>+</sup>会相互竞争水分子, PBS在低pH值时H<sup>+</sup>浓度较高, 竞争到更多水分子, 干扰了磷脂水化过程, 导致形成的囊泡减少, 包封率降低<sup>[19]</sup>。因此选择pH 7.2作为后续制备条件。

2.1.5 超声功率对脂质体平均粒径和包封率的影响

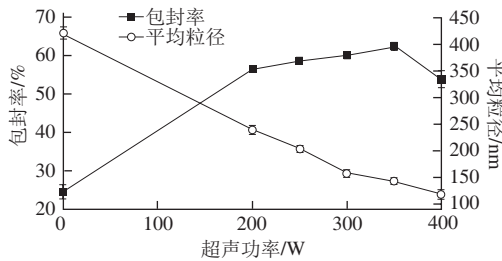


图5 超声功率对脂质体平均粒径和包封率的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic power on particle size and encapsulation efficiency of liposomes

如图5所示, 与未经超声处理的脂质体相比, 经超声处理的脂质体包封率增大, 平均粒径减小。当超声功率在350 W以下时, 脂质体的包封率随功率增大缓慢增加; 当增至400 W时, 包封率又呈下降趋势; 而平均粒径则随超声功率的增加缓慢减小。这是因为超声作用可将多层脂质体分散为单层脂质体。但超声强度增加到一定程度后, 局部产生的大量热量, 导致磷脂发生相变, 液态、液晶态和晶态三态共存, 相分离现象使双分子层破坏, 膜通透性增加, 导致部分抗菌肽G-K从囊泡中释放出来, 因此包封率反而下降<sup>[20]</sup>。故选择超声功率350 W制备脂质体。

2.1.6 抗菌肽G-K脂质体制备正交试验结果

以胆固醇与磷脂质量比、抗菌肽G-K与磷脂质量比、磷脂用量、超声功率为因素, 按L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)进行正交试验, 以脂质体平均粒径和包封率为评价标准, 优化出抗菌肽G-K脂质体制备的最优工艺, 得出正交试验结果, 见表1。

表1 正交试验设计及结果  
Table 1 Orthogonal array design matrix with experimental results

试验号	A胆固醇与磷脂质量比	B抗菌肽G-K与磷脂质量比	C磷脂用量/(mg/mL PBS)	D超声功率/W	平均粒径/nm	包封率/%
1	1 (1:8)	1 (1:4)	1 (5.0)	1 (300)	138.7	58.8
2	1	2 (1:3)	2 (7.5)	2 (350)	137.2	60.2
3	1	3 (1:2)	3 (10.0)	3 (400)	153.7	58.8
4	2 (1:7)	1	2	3	143.6	68.5
5	2	2	3	1	158.3	67.7
6	2	3	1	2	155.9	56.8
7	3 (1:6)	1	3	2	140.7	63.7
8	3	2	1	3	136.8	62.7
9	3	3	2	1	149.6	68.5
平均粒径	k <sub>1</sub>	143.200	141.000	143.800	148.867	
	k <sub>2</sub>	152.600	144.100	143.467	144.600	
	k <sub>3</sub>	142.367	153.067	150.900	144.700	
	R	10.233	12.067	7.433	4.267	
包封率	k <sub>1</sub>	59.267	63.667	59.433	65.000	
	k <sub>2</sub>	64.333	63.533	65.733	60.233	
	k <sub>3</sub>	64.967	61.367	63.400	63.333	
	R	5.700	2.300	6.300	4.767	

正交试验结果表明, 4个因素对抗菌肽G-K脂质体平均粒径的影响大小依次为: 抗菌肽G-K与磷脂质量比(B) > 胆固醇与磷脂质量比(A) > 磷脂用量(C) > 超声功率(D); 其对抗菌肽G-K脂质体包封率的影响大小依次为磷脂用量(C) > 胆固醇与磷脂质量比(A) > 超声功率(D) > 抗菌肽G-K与磷脂质量比(B)。以平均粒径为指标优化得到抗菌肽G-K脂质体制备的最优条件为A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, 以包封率为指标优化得到的条件为A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>。考虑到节能和成本, 选择超声功率为300 W, 即最终制备条件为A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>, 胆固醇与磷脂质量比1:6、抗菌肽G-K与磷脂质量比1:4、磷脂用量7.5 mg/mL PBS、超声功率300 W。

2.2 抗菌肽G-K脂质体平均粒径及分布

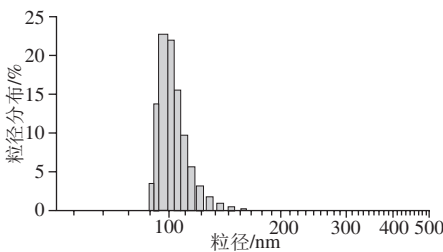


图6 抗菌肽G-K脂质体的粒径分布

Fig. 6 Particle size distribution of AP G-K liposomes

在上述最适条件下制备抗菌肽G-K脂质体,经PBS适当稀释后,采用马尔文激光粒度仪于25℃测量其粒径分布,结果如图6所示。抗菌肽脂质体的平均粒径为 $(128.27 \pm 2.69)$  nm,多分散性指数为0.289,表明脂质体的粒径分布较集中,均一性较好。通过液相色谱法测得脂质体中抗菌肽的封装率为62.83%,抗菌肽的有效载量为5.08%。

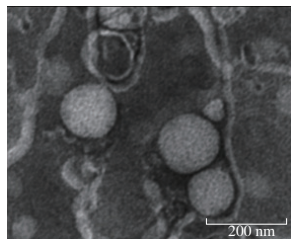


图7 抗菌肽G-K脂质体的透射电镜图

Fig. 7 Transmission electron micrograph of AP G-K liposomes

由图7可知,抗菌肽脂质体呈球形,结构完整,且大小较为均一,粒径大小与马尔文激光粒度仪所测结果的数量级一致。

### 2.3 抗菌肽G-K脂质体的稳定性

表2 抗菌肽G-K脂质体贮存稳定性指标变化

Table 2 Changes in storage stability indices of AP G-K liposomes

时间/d	粒径/nm			多分散指数			泄漏率/%		
	4℃	25℃	37℃	4℃	25℃	37℃	4℃	25℃	37℃
0	128.36±1.85 <sup>a</sup>	128.39±2.03 <sup>a</sup>	127.88±1.25 <sup>a</sup>	0.24±0.04 <sup>a</sup>	0.25±0.03 <sup>a</sup>	0.23±0.02 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
10	133.51±2.01 <sup>a</sup>	149.40±1.71 <sup>b</sup>	152.17±1.29 <sup>b</sup>	0.29±0.03 <sup>b</sup>	0.35±0.05 <sup>b</sup>	0.38±0.02 <sup>b</sup>	0.12±0.03 <sup>b</sup>	0.19±0.05 <sup>b</sup>	0.35±0.05 <sup>b</sup>
20	139.31±1.59 <sup>ab</sup>	163.29±1.58 <sup>c</sup>	165.19±0.87 <sup>c</sup>	0.38±0.02 <sup>c</sup>	0.44±0.02 <sup>c</sup>	0.46±0.03 <sup>c</sup>	0.21±0.02 <sup>c</sup>	0.40±0.02 <sup>c</sup>	0.59±0.01 <sup>c</sup>
30	147.27±2.47 <sup>b</sup>	188.15±1.39 <sup>d</sup>	191.09±1.05 <sup>d</sup>	0.40±0.05 <sup>d</sup>	0.52±0.06 <sup>d</sup>	0.55±0.01 <sup>d</sup>	0.32±0.03 <sup>d</sup>	0.65±0.04 <sup>d</sup>	0.76±0.03 <sup>d</sup>

注:同列肩标字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

因脂质体在存放过程中会发生失稳性变化,如沉淀、聚集、分解等,进而导致被包埋物的外泄<sup>[21-22]</sup>。将上述实验条件下制得的脂质体于4、25、37℃避光保存不同时间,监测其粒径、多分散指数和泄漏率的变化。由表2可见,随着贮存时间的延长,抗菌肽G-K脂质体的粒径、多分散指数和泄漏率均显著增大( $P < 0.05$ ),表明长时间贮存会引起脂质体的聚集和磷脂双分子层的破坏。抗菌肽G-K脂质体在低温条件下的稳定性高于高温,表现为4℃时3个指标的增加速率小于25、37℃时的增加速率,其粒径在4℃贮存30 d后增加了18.91 nm,而在25、37℃贮存相同时间后则分别增加了59.76、63.21 nm。该结果表明脂质体在冷藏条件下的贮存稳定性较高。

### 2.4 抗菌肽G-K脂质体的抑菌活性

在上述实验条件下制备抗菌肽G-K脂质体,采用大肠杆菌为指示菌,经抑菌圈、生长曲线测定和PI染色实验考察抗菌肽G-K脂质体的抑菌活性。

由图8可见,浸渍于灭菌缓冲液和空白脂质体的滤纸

片周围无抑菌圈出现,而浸渍于抗菌肽G-K及其脂质体溶液的滤纸片周围出现明显抑菌圈,说明未包埋抗菌肽G-K能抑制大肠杆菌的生长,抗菌肽G-K经脂质体包埋后的抑菌活性并未削弱,仍对大肠杆菌具有明显抑菌作用。

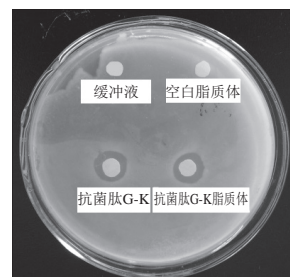


图8 抗菌肽G-K脂质体作用于大肠杆菌的抑菌圈

Fig. 8 Inhibition zone of AP G-K liposomes against *E. coli*

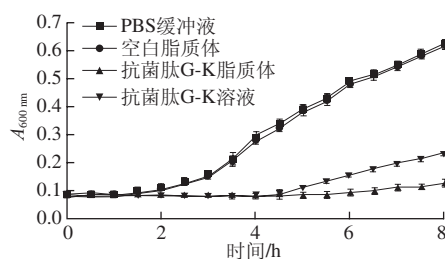


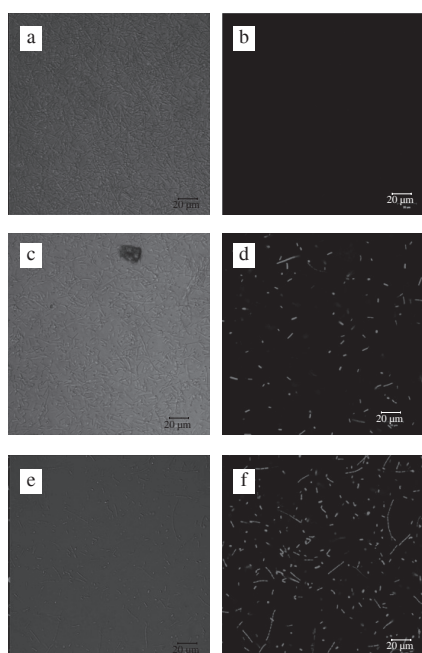
图9 不同处理对大肠杆菌生长曲线的影响

Fig. 9 Effect of different treatments on the growth curve of *E. coli*

图9显示抗菌肽G-K及其脂质体对大肠杆菌生长的影响。PBS处理组在培养至1 h之前,菌液吸光度( $A_{600 \text{ nm}}$ )值基本不变,在1~2.5 h之间缓慢上升,2.5 h之后迅速增大。空白脂质体处理组与PBS处理组的结果类似,仅在3.5 h之后其 $A_{600 \text{ nm}}$ 值略小于PBS处理组,这可能是因为脂质体的构成成分具有一定抑制细菌生长的作用。一些中碳链脂肪酸已被报道具有抑制病原性微生物的作用<sup>[23-24]</sup>,加入抗菌肽G-K及其脂质体后,菌悬液 $A_{600 \text{ nm}}$ 在4.5 h内均无明显增加,表明大肠杆菌的生长受到了一定程度的抑制。4.5 h后抗菌肽G-K处理组的 $A_{600 \text{ nm}}$ 持续缓慢升高,其8 h内 $A_{600 \text{ nm}}$ 变化值为0.045。而抗菌肽G-K脂质体处理组在此时间内维持较低水平,对应 $A_{600 \text{ nm}}$ 变化值为0.153,表明麝香草酚脂质体具有一定的持续抑菌性能,可能源于脂质体的缓释效果<sup>[25-26]</sup>。

核酸染料PI不具通透性,仅能穿透破损的细胞膜对DNA染色,而不能穿透活细胞完整的细胞膜。当与胞内DNA碱基对结合时,在激发波长488 nm、发射波长650 nm条件下,PI会发射红色荧光,因此PI染色可以反映细胞膜的完整性<sup>[27-28]</sup>。通过比较大肠杆菌在抗菌肽脂质体处理前后的PI染色荧光显微图片,可揭示抗菌肽脂质体对细菌的影响。图10中对照明场可见杆状大肠杆菌,而荧光场并无明显可见红色荧光,说明活菌细胞膜完

整, PI并未进入胞内与DNA结合; 抗菌肽G-K作用后样品的明场和对照类似, 视野内可见杆状细菌, 而荧光场呈现红色荧光物质, 表明抗菌肽G-K脂质体作用能够破坏细菌细胞膜, PI进入胞内, 嵌入双链DNA后发出红色荧光; 随着作用时间由2 h延长至4 h, 红色荧光增加, 表明脂质体的缓释作用使得更多的抗菌肽泄露并作用于细菌细胞膜。脂质体的缓释作用在之前其他学者的研究中也证实, 如脂质体包埋对叶绿素亚铁和蜂胶黄酮萃取物的缓慢释放<sup>[26,29-30]</sup>。



a. PBS处理组明场; b. PBS处理组荧光场; c. 抗菌肽G-K脂质体处理2 h组明场; d. 抗菌肽G-K脂质体处理2 h组荧光场; e. 抗菌肽G-K脂质体处理4 h组明场; f. 抗菌肽G-K脂质体处理4 h组荧光场。

图10 不同处理大肠杆菌的激光共聚焦图片

Fig. 10 Laser scanning confocal microscope images of *E. coli* with different treatments

### 3 结论

采用薄膜-超声法制得鳃鱼抗菌肽抗菌肽G-K脂质体, 其包封率为62.83%, 抗菌肽G-K有效载量为5.08%, 平均粒径为 $(128.27 \pm 2.69)$  nm, 多分散性指数为0.289。抗菌肽G-K脂质体外观为球形。抗菌肽G-K脂质体在4 °C条件下的贮存稳定性高于其在25 °C条件下的稳定性。抗菌肽G-K脂质体对大肠杆菌具有明显抑菌作用。激光共聚焦显微镜结合PI染色实验表明抗菌肽G-K脂质体能破坏细菌细胞膜, 脂质体的包裹能实现抗菌肽的缓释作用。表明抗菌肽G-K脂质体可用作新型长效抑菌剂的开发。后续可对抗菌肽G-K脂质体的抑菌作用机制进一步展开深入研究。

### 参考文献:

- [1] 刘玮琳, 魏富强, 韩剑众. 脂质体在食品中的应用及体外消化研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 295-300. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201523054.
- [2] 杨鹏波, 张华. 脂质体的研究新进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2013(7): 936-939. DOI:10.3969/j.issn.1005-5509.2013.07.036.
- [3] 郑会娟. 羧甲基壳聚糖包覆的中链脂肪酸纳米脂质体的制备及其性质研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
- [4] 徐贤柱, 魏允, 饶华, 等. 绿原酸纳米脂质体制备与抑菌性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(20): 62-66. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201420013.
- [5] 白春清. 功能性油脂微纳米胶囊的制备及其性能评价[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [6] TONIAZZO T, BERBEL I F, CHO S, et al.  $\beta$ -Carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59(2): 1265-1273. DOI:10.1016/j.lwt.2014.05.021.
- [7] DOYEN A, SAUCIER L, BEAULIEU L, et al. Electro separation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes[J]. Food Chemistry, 2012, 132(3): 1177-1184. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.11.059.
- [8] 成希飞, 李子超, 向明霞, 等. 响应面法优化水牛乳酪蛋白源抗菌肽制备条件[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 215-218.
- [9] REDDY K, YEDERY R, ARANHA C. Antimicrobial peptides: premises and promises[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2004, 24(6): 536-547. DOI:10.1002/0471684228.egp00756.
- [10] TAN Z, LUO J, LIU F, et al. Advances in applied biotechnology[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2015: 305-312.
- [11] SILA A, HEDHILI K, PRZYBYLSKI R, et al. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 11: 322-329. DOI:10.1016/j.jff.2014.10.006.
- [12] PARISIEN A, ALLAIN B, ZHANG J, et al. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(1): 1-13. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03498.x.
- [13] FACCONI D, VELIZ O, CORSO A, et al. Antimicrobial activity of *de novo* designed cationic peptides against multi-resistant clinical isolates[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 71(3): 31-35. DOI:10.1016/j.ejmech.2013.10.065.
- [14] TANG W T, ZHANG H, WANG L, et al. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 115-123. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.07.027.
- [15] WERE L M, BRUCE B, DAVIDSON P M, et al. Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Food Protection®, 2004, 67(5): 922-927.
- [16] 李莉蓉. 以DNA为靶标的抗菌肽设计及抑菌机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [17] 陈林林, 米强, 辛嘉英. 柑橘皮精油成分分析及抑菌活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 25-28.
- [18] SULKOWSKI W W, PENTAK D, NOWAK K, et al. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability[J]. Journal of Molecular Structure, 2005, 744: 737-747. DOI:10.1016/j.molstruc.2004.11.075.

- [19] FAN M, XU S, XIA S, et al. Effect of different preparation methods on physicochemical properties of salidroside liposomes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(8): 3089-3095. DOI:10.1021/jf062935q.
- [20] 杨水兵, 刘成梅, 刘伟, 等. VC脂质体的制备与稳定性测定[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 230-234.
- [21] PENTAK D. Physicochemical properties of liposomes as potential anticancer drugs carriers. Interaction of etoposide and cytarabine with the membrane: spectroscopic studies[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2014, 122: 451-460. DOI:10.1016/j.saa.2013.11.061.
- [22] LIU Y J, LIU D D, ZHU L, et al. Temperature-dependent structure stability and *in vitro* release of chitosan-coated curcumin liposome[J]. Food Research International, 2015, 74: 97-105. DOI:10.1016/j.foodres.2015.04.024.
- [23] KIM S A, RHEE M S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol,  $\beta$ -resorcylic acid, *trans*-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Control, 2016, 60: 447-454. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.08.022.
- [24] BENHABILES M S, SALAH R, LOUNICI H, et al. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(1): 48-56. DOI:10.1016/j.foodhyd.2012.02.013.
- [25] 单良, 汤志勇, 刘元法, 等. 蜂胶黄酮萃取物脂质体制备工艺的优化及体外缓释特性[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 232-237. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.08.048.
- [26] PENG H, LI W, NING F, et al. Amphiphilic chitosan derivatives-based liposomes: synthesis, development, and properties as a carrier for sustained release of salidroside[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(3): 626-633. DOI:10.1021/jf4039925.
- [27] ANANTA E, HEINZ V, KNORR D. Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry[J]. Food Microbiology, 2004, 21(5): 567-577. DOI:10.1016/j.fm.2003.11.008.
- [28] YANG Xiaojun, XIAO Qianqian, NIU Caixia, et al. Multifunctional core-shell upconversion nanoparticles for targeted tumor cells induced by near-infrared light[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2013, 1(21): 2757-2763. DOI:10.1039/c3tb00575e.
- [29] 孟庆廷, 韩玲利, 张建国. 叶绿素亚铁脂质体的制备及缓释性能研究[J]. 食品科技, 2011, 36(3): 233-236. DOI:10.3969/j.issn.1005-9989.2008.10.046.
- [30] ZOU J, SOOD R, ZHANG Y, et al. Pathway and morphological transformation of liposome nanocarriers after release from a novel sustained inner-ear delivery system[J]. Nanomedicine, 2014, 9(14): 2143-2155. DOI:10.2217/nnm.13.181.