http://pmse.scu.edu.cn

基于酪蛋白结构变换的核壳型抑菌纳米粒设计与构建

贺宝元[1]，张思冉[1]，李欣雨[2]，张 磊[2]，周 妍[2]，薛海燕[2]
（1.陕西科技大学 轻工科学与工程学院；2.陕西科技大学 生物与医药学院，陕西 西安 710021）

摘要：基于酪蛋白的活性物质递送体具有多种优良性能，为提高酪蛋白（CN）胶束对亲水性物质的负载率，在胶束纳米结构尺度研究了胶束扰动因素对溶菌酶（Ly）负载的影响，制备了具有核壳结构的抑菌纳米粒。粒径分布和Zeta电位表明，低浓度NaCl和乙二胺四乙酸（EDTA）有利于CN胶束的部分解离，使Ly负载率提高了8%；红外分析显示，不同胶束扰动因素下复合纳米粒中蛋白质的二级结构和氢键缔合发生了改变；扫描电镜表明CN-Ly纳米粒具有球形结构。低分子量壳聚糖包覆纳米粒后，对金黄色葡萄球菌（*S.aureus*）和大肠杆菌（*E.coli*）均具有较强的抑菌活性，且该复合纳米粒在pH5.4的酸环境中具有缓释性能，24 h释放率达到61.5%，活性保留率达到80%以上。该纳米粒在食品和医药工业有着潜在的应用前景。

关键词：酪蛋白胶束；结构变换；溶菌酶；壳聚糖；抑菌纳米粒
中图分类号：R318.08 **文献标识码：**A **文章编号：**1000-7555（2023）08-0032-09

酪蛋白（CN）是牛羊乳中最主要的蛋白质，占乳中蛋白质含量的80%以上。其良好的生物相容性、生物降解性及独特的物理化学特性已引起了人们的关注。牛乳CN的等电点(pI)为4.6，是两亲性磷酸蛋白，在溶液中以疏水性胶束结构存在，胶束直径在40~500 nm范围内，平均约为200 nm。胶束由α_s-CN与β-CN构成胶束内部骨架，这2种蛋白通过疏水相互作用力相结合，与胶体磷酸钙一起形成亚胶束，磷酸盐基团和丝氨酸酯化结合蛋白在胶束形成中起重要作用[1]，κ-CN和少量α_s-CN相结合位于胶束外部，使得胶束不会继续增长，起到空间稳定作用[2]。酪蛋白在pH值为6~7(>pI 4.6)时可溶，pH值的降低会导致其钙的聚集沉淀。

CN具有良好的吸水溶胀性、高分散性、黏附性、耐水性和生物相容性，使其成为多种生物活性物质负载的良好载体，因此在生物医用材料领域展现出优异的应用前景。它表面的羧基、氨基及磷酸基团使其在不同pH下，可与负载物基团之间通过化学键、疏水作用及离子交联等形成网络结构。目前研究多集中在疏水性活性小分子的负载，Bachar等[3]以塞来昔布为模型药物、以CN胶束为载体，载药量比大多数其他非酪蛋白药物制剂高100倍以上，且能有效自然释放。对活性小分子α-生育酚、EGCG、香芹酚等的负载也有报道[4, 5]。CN对大分子蛋白质的负载，常采用交联剂如戊二醛和京尼平，酶法如谷氨酰胺转氨酶[6]或多酚类化合物交联[7]，但交联后往往会丧失蛋白质活性，影响活性大分子的释放。溶菌酶（Ly）等电点在10.7左右，可与CN通过复凝聚结合且能保留生物活性，但负载率较低。

蛋白质结构在纳米尺度的改变将影响蛋白质基材料的结构和性质。研究表明，CN胶束结构具有解聚和自组装特性，pH、离子强度及乙二胺四乙酸（EDTA）等均会对CN胶束中胶态磷酸钙产生影响[8]，如在高pH值下，静电斥力增大会导致胶束松散。通过CN胶束结构调控，亲水分子可装载于动态胶束内部，能有效提高大分子蛋白质的负载，且装载后能实现活性释放。此外，活性物质的结合，亦将影响蛋白质的二级结构，而也有研究证明蛋白质展开在蛋白质

doi:10.16865/j.cnki.1000-7555.2023.0159
收稿日期：2022-10-08
基金项目：陕西省科技计划（2022GY-361，2022KXJ-011）；陕西省重点研发计划（2020ZDLNY02-09）；陕西科技大学博士科研启动基金项目（2023BJ-20）；西安市科技计划农业科技创新工程（20NYYF0016）
通讯联系人：贺宝元，主要从事生物高分子材料研究，E-mail: hebaoyuan@163.com

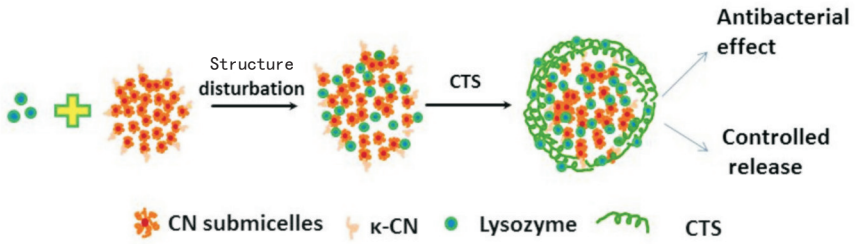


Fig. 1 Schematic illustration of lysozyme loaded core-shell nanoparticles based on casein and chitosan

基微纳米材料结构构建和力学方面起着关键作用[9]。

复凝聚方法具有简单、温和、活性保留率高等特点，但 CN 胶束表面负载量有限，胶束的部分解离与蛋白质二级结构变换可能有利于亲水物质的负载。本文在复凝聚法的基础上，利用 CN 大分子球形胶束结构变换，试图从 pH 等 CN 胶束结构扰动的角度重建 CN 胶束负载亲水性 Ly，以提高其负载能力。负载后的活性分子往往黏附在胶束表面，会造成药物的突释现象，因此，选择壳聚糖进行表面包覆，制备具有酸环境缓释的核壳结构的抑菌纳米粒。制备过程如 Fig.1 所示。

1　实验部分

1.1　试剂与设备

牛乳 CN：纯度>95%，Sigma-ALORICH(上海)贸易有限公司；溶菌酶（Ly）：酶活 20000 U/mg，北京博奥拓达科技有限公司；壳聚糖：脱乙酰度＞90%，相对分子质量＜3×10^5为 HCTS 和＜5×10^4为 LCTS，浙江金壳药业股份有限公司；金黄色葡萄球菌（ATCC6538）和大肠杆菌（ATCC8739）：本实验保藏；溶壁微球菌（AS 1.634）菌粉：上海源叶生物科技有限公司。其他试剂均为分析纯。

超声细胞粉碎仪：JY96-IIN，上海沪析实业有限公司；真空傅里叶红外光谱仪：VERTEX-70V，德国布鲁克公司；高速冷冻离心机：HC-3018R，安徽中科中佳科学仪器有限公司；pH 计：pHS-3C，上海仪电科学仪器股份有限公司；紫外可见分光光度计：UV1100，上海美谱达仪器有限公司；超净工作台：SW-CJ-1FD，苏州安泰空气技术有限公司；冷冻干燥机：CTFD-10S，青岛永合创信电子科技有限公司。

1.2　制备方法

1.2.1　CN 结构变换对纳米粒稳定性及负载的影响：称取 0.2 g CN 溶于 100 mL 0.1% NaOH 溶液中，用 0.1 mol/L HCl 调至一定 pH，用 0.1 mol/L pH7.0 磷酸缓冲液配制 1 mg/mL 溶菌酶储液。将 Ly 以不同质量比加入 CN 溶液中，固定总体积为 20 mL，200 W 超声 2 min，磁力搅拌器搅拌 1 h 使颗粒稳定后，14000×g 离心 30 min，回收制得 CN-Ly 纳米粒，取上清测游离 Ly 的量。

由于低温会使 CN 胶束中的 β-CN 聚集体释放，改变胶束本身蛋白质组成，而高温会导致酶蛋白失活，因此，改变 CN 溶液 pH、离子强度、加入 EDTA 等胶束结构扰动剂，测定复合物的粒径分布、Zeta 电位及负载率。

1.2.2　CN 负载 Ly 核壳型纳米粒的制备：壳聚糖与纳米粒可通过静电引力等相互作用力稳定形成壳型结构，实现 Ly 的缓释。采用 2%的乙酸配制 20 mL 质量分数 0.1%低分子量壳聚糖（LCTS）或高分子量壳聚糖（HCTS）溶液，加入一定体积的 CN-Ly 复合物溶液，30 ℃温育搅拌 30 min，搅拌转速 400 r/min，制得核壳型 CN-Ly-CTS 纳米粒，考察壳聚糖对复合纳米粒稳定性及抑菌性能的影响。

1.3　测试与表征

1.3.1　粒径测定及稳定性表征：取 5 mL 待测样本溶液，稀释 10 倍后，采用 Litesizer 500 Nano 粒度及 Zeta 电位仪（奥地利安东帕），在 25 ℃测定其粒径分布、多分散系数（PDI）及 Zeta 电位。良好的球形和分散性颗粒悬浮液有利于提供活性化合物的受控和平衡释放。

1.3.2　傅里叶变换红外光谱分析：在室温使用傅里叶变换红外光谱仪（FT-IR，德国布鲁克公司）在衰减全反射模式下（ATR）对冻干的粉末样品进行分析。取少量样品采用冷冻干燥仪冷冻干燥 24 h，溴化钾预先在 120 ℃干燥 4 h，冻干后的样品与溴化钾按照 1∶4 的质量比在研钵中研磨混合均匀，压制成均匀透光的压片，在 400~4000 cm^{-1}范围进行红外测试，分辨率为 2 cm^{-1}，累计扫描 64 次。

1.3.3　扫描电镜表征：待测样本冷冻干燥或取适量样品与 2%的戊二醛溶液按照 1:1 的比例混合，静置 2 h 固定纳米粒结构，取混合溶液 2 μL 滴至硅片上，风干后用超纯水洗涤 3 次，充分干燥后，用导电胶粘至样品台，经表面喷金处理后，使用高分辨扫描电镜 FEI Verios 460（美国 Thermo Fisher）观察其微观结构，加速电

压15 kV。

1.3.4 负载率及释放率检测：纳米粒中Ly的释放率采用蛋白质含量及溶菌酶相对活性2种方法检测。采用考马斯亮蓝法检测蛋白质含量，取5 mL纳米粒子溶液，在高速冷冻离心机上以14000×g的转速在4 ℃离心30 min，取上清液1.0 mL，测定游离蛋白质含量。CN-Ly纳米粒的负载率(*EE*)计算如式(1)所示

$$EE = \frac{\text{Total amount of Ly} - \text{Amount of free Ly}}{\text{Total amount of Ly}} \quad (1)$$

溶菌酶相对活性参照国标GB/T 30990-2014《溶菌酶活性检测方法》检测[10]。制备溶壁微球菌悬液，使菌液OD_{450}值在0.7，在室温，向2.5 mL细菌悬液中加入0.5 mL待测样品或缓冲液（空白对照），分别测定反应1 min和2 min时细菌悬液OD_{450}值，以菌液OD值变化计算酶活。溶菌酶效价定义为室温25 ℃、pH6.2时，在波长450 nm处，每分钟吸收值下降0.001为1个酶活力单位。采用式(2)计算Ly的相对活性

$$\text{Relativeactivity} = \frac{\text{Total enzymatic activity of samples}}{\text{Total enzymatic activity of control}} \quad (2)$$

1.3.5 CN-Ly-CTS纳米粒的释放性能：取CN-Ly-CTS冻干样品1 g，在pH7.4和pH5.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中进行Ly的释放动力学研究。离心收集的纳米颗粒加入5 mL PBS，于37 ℃温育，一定时间内，取0.5 mL，14000×g离心15 min，测上清中Ly含量及相对活性，测定给定时间(t)的释放百分百(P_t)。向上清液中重新加入相同体积的PBS，与负载Ly的壳聚糖-CN酸盐纳米颗粒混合。在1 h，2 h，4 h，6 h，8 h，12 h，18 h，24 h，36 h，48 h时重复该程序。药物释放的累积百分比根据式(3)确定

$$\text{Cumulative release} = \frac{\text{Volume of sample withdraw(0.5 mL)}}{\text{Bath volume(5 mL)}} \times P_{(t-1)} + P_t \quad (3)$$

式中：P_t——时间t时的释放百分比；$P_{(t-1)}$——时间t之前的释放百分比。

1.3.6 复合物抑菌性能检测：采用滤纸片扩散法检测复合物的抑菌活性。金黄色葡萄球菌(*S.aureus*，G^+菌)或大肠杆菌(*E.coli*，G^-菌)活化后，用肉汤培养基在37 ℃，100 r/min下振荡培养至OD_{600nm}达到1.0，将菌液稀释100倍，此时细菌浓度约为1×10^7 cfu/mL，用于琼脂平板涂布。取50 μL菌液均匀涂抹在倒好的平板上，将已灭菌的直径0.9 mm的滤纸片在样品中充分浸泡后，置于平板上，将平板倒置于37 ℃恒温箱中培养18~24 h。每个样本做3组平行，观察滤纸片周围是否产生抑菌圈，并测量抑菌圈直径。

2 结果与讨论

2.1 酪蛋白胶束结构变换对CN-Ly复合纳米粒稳定性及负载率的影响

2.1.1 Ly添加量对纳米粒的影响：从Fig.2可见，不同质量比CN-Ly复合纳米粒粒径分布都较为均一，随着Ly添加量增加，体系平均粒径增大，粒径分布变窄，这是因为CN胶束可与Ly分子以静电引力结合，此外还可因氢键和局部疏水键相互作用，使复合纳米粒的结构更加致密。在质量比为3:10时，平均粒径达到879 nm，Ly质量再增加后，平均粒径达1000 nm以上，浊度明显增加。CN胶束的Zeta电位在−9.2 mV, 随着Ly（Zeta电位为+2.5 mV）加入，电荷中和导致Zeta电

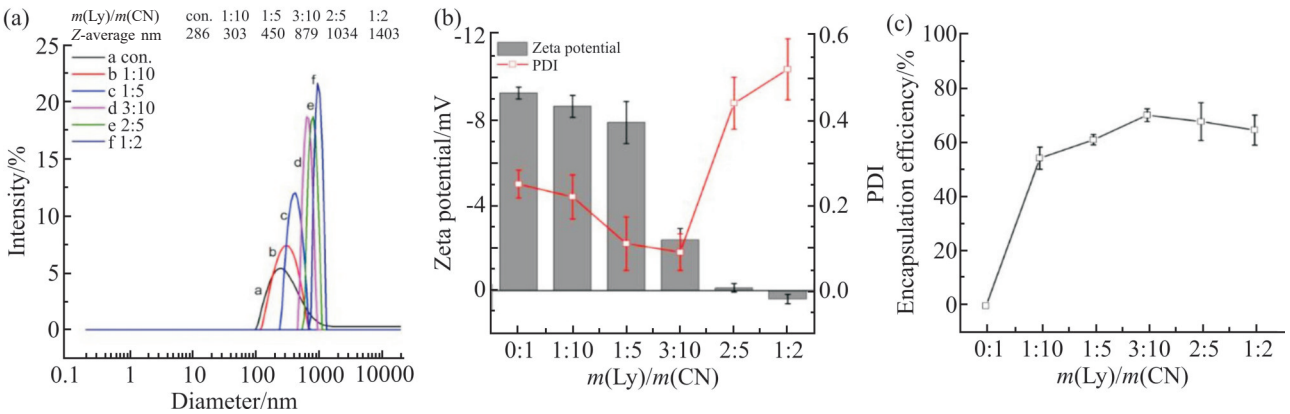


Fig. 2 Effect of *m*(Ly)/*m*(CN) on size distribution, Zeta potential, PDI and encapsulation of CN-Ly nanoparticles
(a): size distribution; (b): Zeta potential; (c): encapsulation efficiency

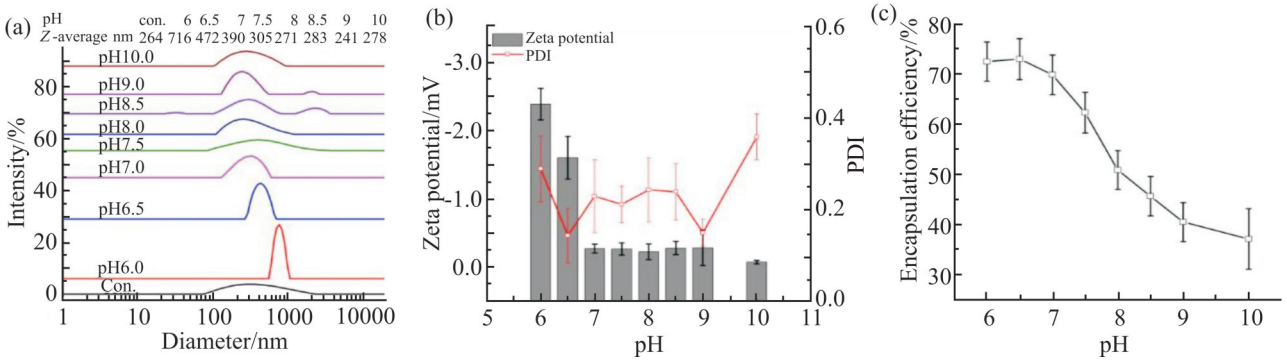


Fig. 3 Effect of pH on size distribution, Zeta potential, PDI and encapsulation of CN-Ly nanoparticles
(a): size distribution; (b): Zeta potential; (c): encapsulation efficiency

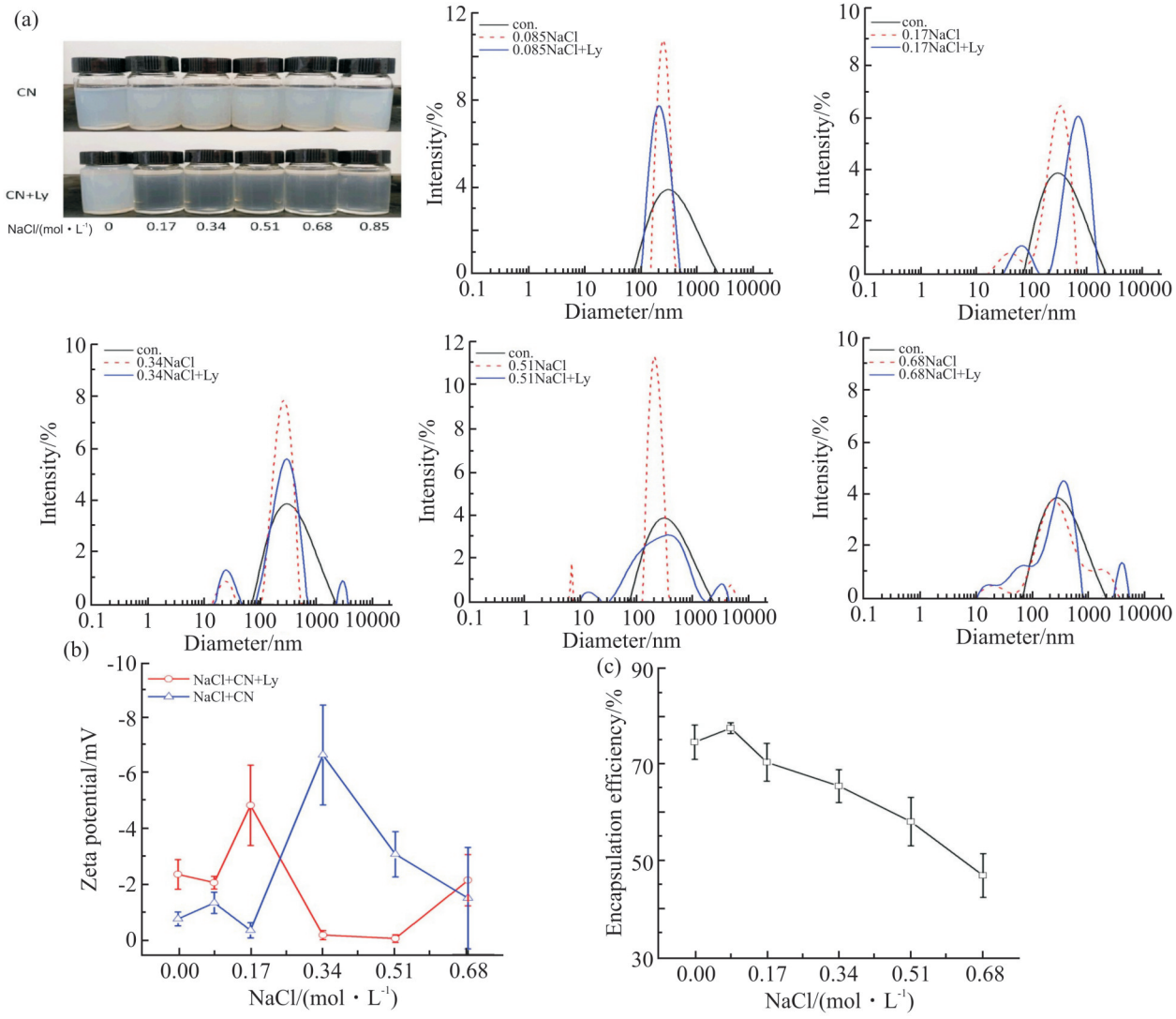


Fig. 4 Effect of NaCl concentration on size distribution, Zeta potential, PDI and encapsulation of CN-Ly nanoparticles
(a): size distribution; (b): Zeta potential; (c): encapsulation efficiency

位升高，由于CN胶束相对分子质量约为2.5×10^{8}[11]，远大于Ly的14.3×10^{3}，且本身结构松散，Ly可能进入胶束内部导致电荷中和效应而被遮蔽。随着Ly加入量增至3:10, 复合粒子Zeta电位显著升高，继续增大，Zeta电位绝对值均较小，纳米粒子易发生聚集。而体系PDI在3:10时最小，因此，此时CN-Ly体系最为稳定均一。随质量比增加，负载率先增大，在质量比3:10达到饱和，最高负载率70.5%。

2.1.2 pH对CN胶束负载Ly的影响：CN胶束结构以及CN和Ly复凝聚均具有较强的pH依赖性，因此研究pH变换对CN-Ly纳米粒形成稳定性及Ly负载率的影响。如Fig.3所示，在pH6~7.0时，形成的纳米粒子粒径分布呈较尖锐的单峰，PDI小于0.3，说明此时CN-Ly复合纳米粒粒径分布均一。pH7.5~9时，粒径分布范围变宽，体系Zeta电位较小，PDI较高，这与CN所带净负电荷增加，导致CN胶束及蛋白质构象的改变，可能包埋了部分负电荷基团，反而表观净电荷降低有关[12]。也有研究报道此时CN与Ly所带电荷几乎相等[13]，溶液用于稳定体系的电荷较少，2种因素共同导致体系Zeta电位较低，复合纳米粒不稳定。在pH10时，因接近Ly等电点，PDI增大至0.36，Zeta电位降低，体系不稳定。体系大于pH6.5后，负载率逐渐降低。在pH在6.5时，粒径分布呈较尖锐窄峰，平均粒径472 nm，PDI较小为0.14，同时Zeta电位较高，对Ly负载率较高为72.9%。

2.1.3 离子强度对Ly负载的影响：CN胶束内的疏水作用受到离子强度影响，因此会影响复合纳米粒形成及Ly负载。由Fig.4可知，NaCl使水相中离子强度增加，降低了CN胶束内部及表面的静电斥力，CN胶束发生解离，CN体系先是小粒径胶束增加，随离子强度升高，胶束重组导致出现大粒径胶束。在CN-Ly体系中，低浓度的中性盐使复合物粒径分布变窄，体系粒径更加均一，少量的中性盐增加了CN和Ly表面所带的电荷，也增加了和水分子的作用，加强了二者之间的相互作用，溶液稳定性也有所增加[14]。NaCl浓度大于0.17 mol/L后，盐离子和带相反电荷的蛋白质基团相互作用，表面电荷减少，CN与Ly难以复凝聚，加之CN胶束的解离重聚，粒径分布范围变宽。CN-Ly纳米粒Zeta电位的变化与胶束的解离重组以及NaCl在蛋白质表面的吸附有关。NaCl浓度为0.085 mol/L时，CN-Ly复合纳米粒平均粒径为221.9 nm，Zeta电位绝对值较高，同时Ly负载率明显提高，达到77.5%，有助于形成稳定纳米粒。

2.1.4 EDTA对CN负载Ly的影响：胶态磷酸钙与不同CN间的结合是CN胶束稳定的重要因素。EDTA与Ca^{2+}的络合会打乱原有胶束结构，对是否有利于Ly的负载进行了探讨，如Fig.5所示。EDTA含量增加，CN-Ly粒径先降低后增加，加入0.1%的EDTA时，体系的平均粒径最小，小于对照组平均粒径。这是因为EDTA能够络合水相中的Ca^{2+}，破坏了胶束表面的磷酸丝氨酸钙键，导致CN胶束中胶态磷酸钙的释放[15]，降低了水相中CN胶束粒径。CN-Ly纳米粒Zeta电位绝对值先增加后降低，少量EDTA使Ca^{2+}被络合，胶束表面负电荷丝氨酸磷酸的暴露，体系稳定性增强。而大量的EDTA会导致胶束解离和重聚，因此复合纳米粒粒径增加，Zeta电位绝对值下降，发生聚沉。在EDTA加入量0.5%时，CN胶束粒径变小，表面积增加，Ly负载率增加至78.2%，适当大小的胶束和表面电荷与Ly复合，形成了稳定胶体体系。

2.2 CN+Ly+CTS复合物的壳层结构构建

CN与Ly均为蛋白质，通过对CN胶束结构进行调节后，提高了Ly的负载量，但由于结合于表面的Ly在释放时容易出现突释现象，进一步采用壳聚糖表面修饰，形成颗粒-凝聚物，提升缓释性能。2种不同相对

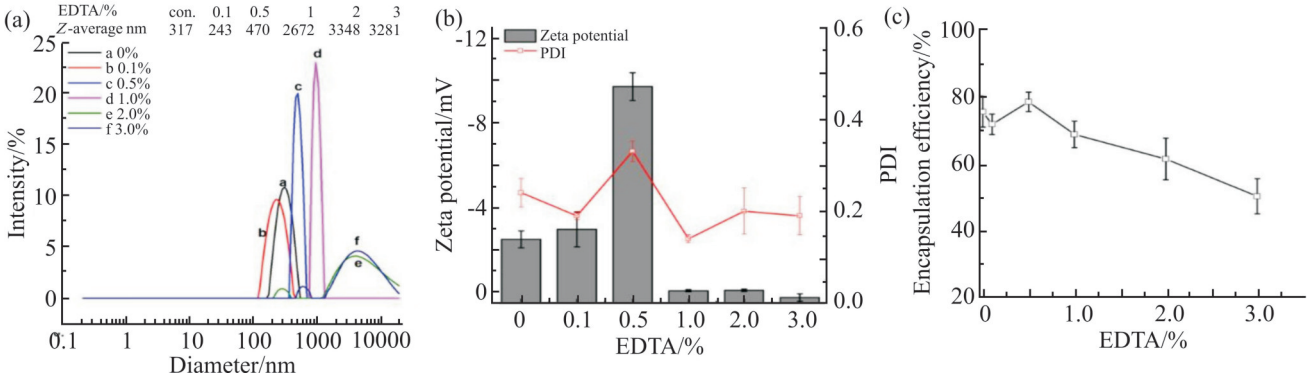


Fig. 5 Effect of EDTA on size distribution, Zeta potential, PDI and encapsulation of CN-Ly nanoparticles

(a): size distribution; (b): Zeta potential; (c): encapsulation efficiency

Tab. 1　Effect of molecular weight of CTS on size distribution and stability of CN-Ly-CTS nanoparticles

Type of CTS	*V*(CN-Ly)∶*V*(CTS)	Average diameter/nm	PDI	Zeta potential/mV
LCTS	1:0	481.91±10.68	0.23±0.051	−3.59±0.804
	1:10	418.82±27.15	0.48±0.048	−3.53±0.104
	1:5	699.29±21.87	0.22±0.031	−10.77±1.148
	1:2	300.39±31.31	0.63±0.12	−6.12±1.237
HCTS	1:20	2190.68±55.16	0.25±0.13	−5.28±1.179
	1:10	3959.58±36.27	0.55±0.15	−3.91±1.180
	1:5	2510.19±42.88	0.56±0.14	−1.19±1.016

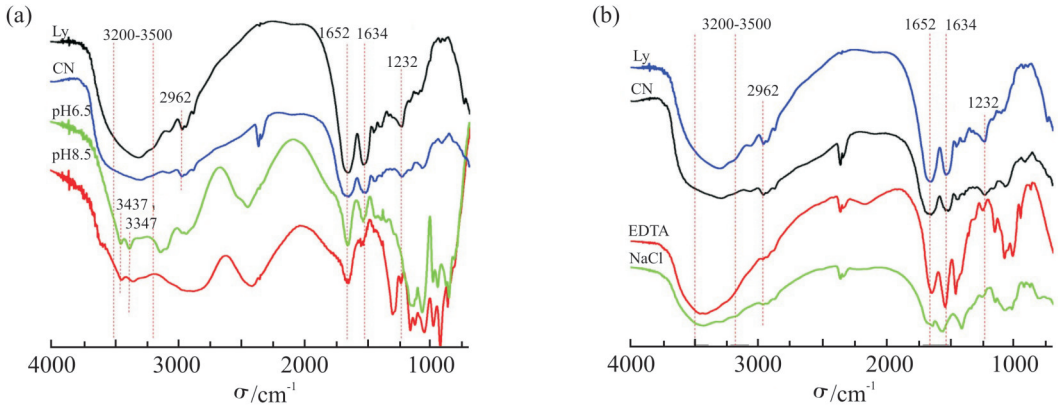


Fig. 6　FT-IR spectra of Ly, CN and CN-Ly nanoparticles
(a): different pH; (b): micellar structure disturbance

分子质量的壳聚糖颗粒-复凝聚物的平均粒径和Zeta电位如Tab.1所示。将CN-Ly复合纳米粒加入HCTS溶液中，由于壳聚糖相对分子质量较大，2000 r/min离心20 min后可获得沉淀物，平均粒径可达3.9 μm，且随着CN-Ly添加量增加，壳聚糖电荷被中和，因此体系Zeta降低。而不同体积比加入LCTS中均能形成较稳定的胶体体系，当体积比为1:5时，平均粒径和Zeta电位达到最大值，体系PDI较小，随着CN-Ly添加量增加，平均粒径和Zeta电位减小，体系PDI增加，在CN-Ly添加量较小时，壳聚糖NH^{3+}与CN表面负电荷结合，其表面形成较稳定的壳聚糖壳层，当二者的电荷中和达到一定程度时，形成的纳米粒粒径最大达到699.29 nm，随CN-Ly量的进一步增加，形成更多的小粒径纳米粒，PDI增加。因此，LCTS更适用于形成CN-Ly-CTS三元体系复合纳米粒。

2.3　复合物纳米粒结构表征

2.3.1　*CN与Ly的相互作用力*：蛋白质的吸收峰主要出现在酰胺I（1560~1700 cm^{-1}）、酰胺II（1510~1570 cm^{-1}）、酰胺III（1200~1335 cm^{-1}）和O=P—O拉伸（1060~1100 cm^{-1}）处。从Fig.6可见，CN和Ly均在以上范围内出现吸收。CN在3292 cm^{-1}，1652 cm^{-1}，1232 cm^{-1}附近有明显吸收峰，分别对应—N—H键的伸缩振动吸收峰、—C=O键（CN分子骨架中—CO—NH—键的特征峰）和—C—N—键的伸缩振动峰。在2361 cm^{-1}和2343 cm^{-1}附近出现的双峰是空气中的CO_2引起[16]。Ly在1300~1700 cm^{-1}的范围内主要有4个吸收峰，分别在1452 cm^{-1}，1534 cm^{-1}和1657 cm^{-1}处。1452 cm^{-1}的吸收峰是$—CH_3$不对称变角振动，1534 cm^{-1}的吸收峰是Ly酰胺II带的吸收峰，1657 cm^{-1}的吸收峰为Ly酰胺I带的吸收峰。

酰胺I带主要为—C=O键的伸展振动，可用此吸收峰分析蛋白质的特定二级结构信息，Fig.6中不同pH或胶束扰动剂下，CN-Ly复合物的酰胺I带1657 cm^{-1}峰得到保留，但峰形发生变化，表明蛋白质二级结构发生变化。酰胺II带主要来自面内NH弯曲和CN的伸缩振动，二者复合后峰值变小且发生红移，表明CN与Ly发

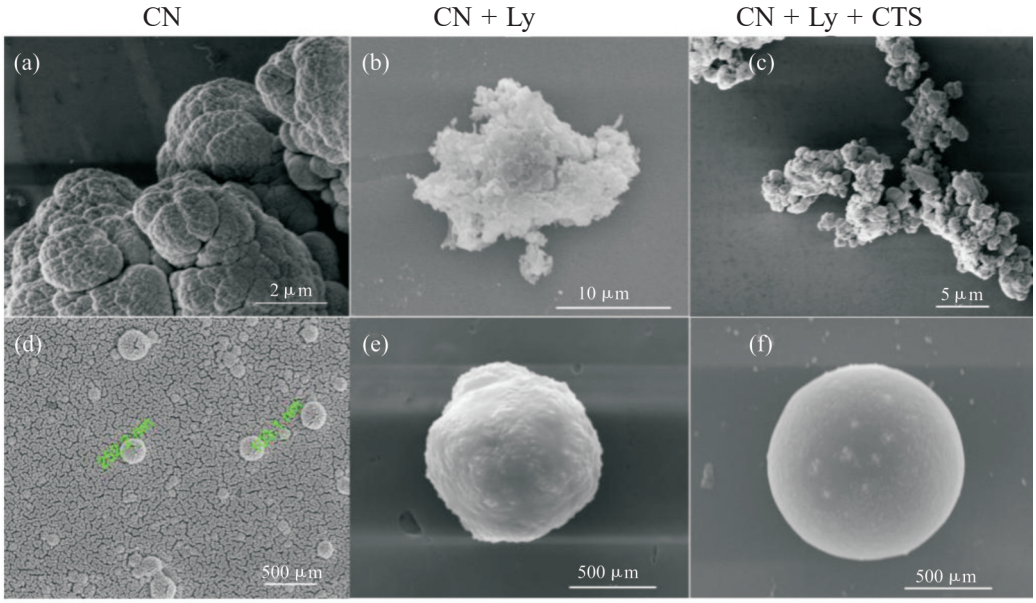


Fig. 7 SEM photographs of CN micelles, CN-Ly and CN-Ly-CTS
(a~c): lyophilization; (d~f): glutaraldehyde-fixed after dilution

Tab. 2 Inhibitory zone diameter of CN-ly-CTS nanoparticles

Samples	Con.	CN+Ly	CN+Ly+LCTS	CN+Ly+HCTS
S.aureus /mm	0	13.52±0.5	12.47±0.75	12.89±0.96
E.coli /mm	0	0.16±0.15	6.33±0.86	1.67±0.57

生了结合；螯合羟基的伸缩振动2500~3200 cm^{-1}出现宽峰，分子间氢键缔和在3230~3550 cm^{-1}出宽峰，分子内氢键在3400~3590 cm^{-1}出窄峰，结合后，3300 cm^{-1}左右的宽峰发生变化，表明二者间存在氢键相互作用；有此可见，二者复合后分子间和分子内氢键作用方式发生显著变化。低于1000 cm^{-1}的指纹频率区可见，复合纳米粒与原始蛋白质结构具有完全不同的特征。

Fig.6(a)中不同pH下，酰胺II带和酰胺III显著不同，这与CN与Ly的结合基团变化有关，而胶束扰动剂EDTA和NaCl则使复合物的酰胺II带酰胺III带发生显著红移(Fig.6(b))，则胶束扰动剂促使CN与Ly的结合方式发生改变，这与2种蛋白质间的疏水作用力可能有关[17]。

2.3.2 CN-Ly-CTS复合纳米粒的显微结构：由Fig.7(a~c)可见，样品冷冻干燥后，蛋白质纳米颗粒发生了聚集，无法直接观察到球形纳米粒结构，样品稀释后采用2.5%戊二醛固定后SEM观察(Fig.7(d~f))，CN胶束在pH7.0溶液中以球形颗粒结构存在，表面有明显胶束聚集簇状结构，平均粒径较小，蛋白质纳米粒负载Ly后，由于静电凝聚作用，颗粒粒径增大，微球表面仍能观察到突刺状结构，进一步与壳聚糖复合后，球形结构更为规则，表面较为光滑。

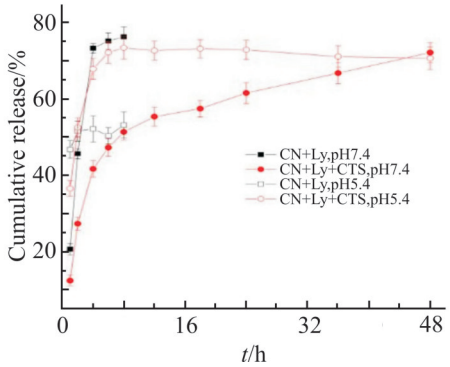


Fig. 9 Cumulative lysozyme release from CN-Ly and CN-Ly-CTS nanoparticles

2.4 CN-Ly-CTS纳米粒的抑菌性能

Ly主要对革兰氏阳性菌(G^+)具有溶菌作用，壳聚糖具有较广谱的抑菌效果，2种相对分子质量壳聚糖壳体纳米粒的抑菌效果如Fig.8所示，平均抑菌圈直径如Tab.2所示。CN负载Ly后对金黄色葡萄球菌(G^+)

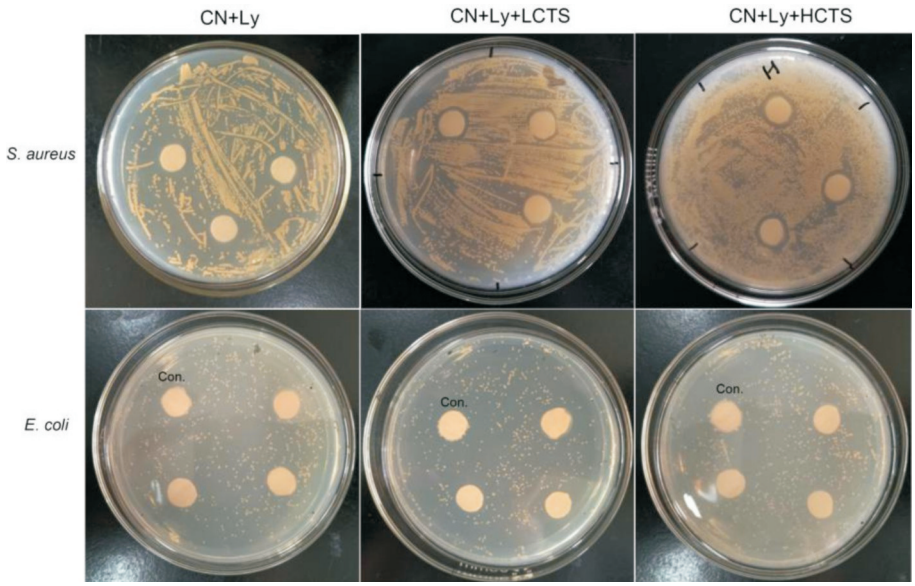


Fig. 8 Antibacterial effect of CN-ly-CTS nanoparticles on *S. aureus* (G^+) and *E.coli* (G^-)

具有较好的抑菌效果，抑菌圈直径达13.52 mm。2种相对分子质量壳聚糖壳体纳米粒均对金黄色葡萄球菌具有良好的抑制效果，培养24 h时抑菌圈直径达到12 mm以上，而低分子量（$<5\times10^4$）的复合纳米粒（CN-Ly-LCTS）对革兰氏阴性菌（G^-）菌大肠杆菌具有更强的抑制作用，表明低分子量（$<5\times10^4$）壳聚糖与Ly的G^+抑菌作用互补，赋予复合纳米粒更广谱抑菌性能。

2.5　核壳型纳米粒的缓释性能

所制备的CN-Ly和CN-Ly-LCTS纳米粒在pH7.4的PBS中进行Ly的释放研究如Fig.9所示。CTS显著增强了纳米粒的缓释效应，在释放前2 h，CN-Ly累积蛋白释放率达到45.6%，而具有核壳结构的CN-Ly-LCTS纳米粒累积蛋白释放率仅为27.3%。在4 h后，CN-Ly累积释放率达到73.2%，而核壳结构的CN-Ly-LCTS则表现缓释效应，在24 h时释放率达到61.5%。核壳结构的复合纳米粒中，Ly位于壳聚糖外壳内部，分散在CN胶束内部和表面，最初释放的主要是胶束表面的Ly，而CN胶束内部Ly需要达到扩散平衡才能透过壳聚糖外壳释放。在pH5.4酸性释放条件下，CN-Ly间的静电平衡被破坏，Ly大量解离，部分被保留在CN胶束内部，不能被释放。而CN-Ly-LCTS由于壳聚糖的氨基被质子化，溶解度增加，纳米粒溶胀，Ly可以快速释放达到药物浓度，同时由于CN与Ly间的相互作用，具有一定缓释效应。2种释放条件下，Ly相对活性保持在80%以上，均具有较高的保留率。

3　结论

本文针对CN胶束对亲水性多肽或蛋白质负载率低的问题，采用了胶束扰动因素来提升其负载能力的方法。结果表明，pH变换、离子强度及EDTA等均能使CN胶束解离重聚，蛋白质二级结构发生变换，而Ly通过静电引力、疏水作用及氢键与CN结合，促进了胶束的重聚，成功制备了高负载率的CN-Ly纳米粒，进一步选择低分子量（$<5\times10^4$）壳聚糖形成的核壳型纳米粒具有广谱抑菌性及酸环境缓释性能。通过蛋白质纳米尺度结构重建，为亲水性多肽或蛋白质有效负载提供了参考。CN-Ly-CTS纳米粒可用于食品保鲜及抑菌材料表面吸附处理。

参考文献：

[1] Rehan F, Ahemad N, Gupta M. Casein nanomicelle as an emerging biomaterial-a comprehensive review [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 179: 280-292.

[2] Broyard C, Gaucheron F. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge [J]. Dairy Science & Technology, 2015, 95: 831-862.

[3] Bachar M, Mandelbaum A, Portnaya I, *et al*. Development and characterization of a novel drug nanocarrier for oral delivery, based on self- assembled beta- casein micelles [J]. Journal of Controlled Release, 2012, 160: 164-171.

[4] Malekhosseini P, Alami M, Khomeiri M, *et al*. Development of casein- based nanoencapsulation systems for delivery of epigallocatechin gallate and folic acid [J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7: 519-527.

[5] 郑华明, 王江丽, 田宇航, 等. pH驱动法负载香芹酚纳米颗粒的制备及其性能 [J]. 高分子材料科学与工程, 2022, 38(8): 177-184.

Zheng H M, Wang J L, Tian Y H, *et al*. Properties of carvacrol-loaded nanoparticles prepared by pH-driven method[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2022, 38(8): 177-184.

[6] Khodaverdi E, Maftouhian S, Aliabadi A, *et al*. Casein-based hydrogel carrying insulin: preparation, in vitro evaluation and in vivo assessment [J]. Journal of Pharmaceutical Investigation, 2018, 49: 635-641.

[7] Wang Y, Xue Y, Bi Q, *et al*. Enhanced antibacterial activity of eugenol-entrapped casein nanoparticles amended with lysozyme against gram-positive pathogens [J]. Food Chemistry, 2021, 360: 130036.

[8] Liao M, Chen F, Hu X, *et al*. Controlled gastrointestinal digestion of micellar casein loaded anthocyanins: the chelating and complexing effect of dextran sulfate [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 132: 107863.

[9] Hughes M D G, Hanson B S, Cussons S, *et al*. Control of nanoscale in situ protein unfolding defines network architecture and mechanics of protein hydrogels [J]. ACS Nano, 2021, 15: 11296-11308.

[10] 全国生化检测标准化技术委员会. GB/T 30990-2014, 溶菌酶活性检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.

[11] Antonov Y A, Moldenaers P, Cardinaels R. Complexation of lysozyme with sodium caseinate and micellar casein in aqueous buffered solutions [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 62: 102-118.

[12] Liu D Z, Weeks M G, Dunstan D E, *et al*. Temperature-dependent dynamics of bovine casein micelles in the range 10-40 degrees C [J]. Food Chemistry, 2013, 141: 4081-4086.

[13] 潘晓赟. 基于酪蛋白的纳米粒子制备及其应用的研究 [D]. 上海, 复旦大学, 2008.
Pan X Y. Study on preparation and application of casein-based nanoparticles [D]. Shanghai: Fudan University, 2008.

[14] Dickinson E, Semenova M G, Belyakova L E, *et al*. Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: relationship to emulsion flocculation [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2001, 239: 87-97.

[15] Thybo C D, Lillevang S K, Skibsted L H, *et al*. Calcium balance during direct acidification of milk for Mozzarella cheese production [J]. LWT, 2020, 131: 109677.

[16] 刘大松. 基于pH调控的脱钙处理对酪蛋白胶束结构及浓缩乳蛋白功能性的影响 [D]. 无锡: 江南大学, 2017.
Liu D S. Effect of pH shifting-based de-calcification on th structure of casein micelle and the functionality of milk protein concentrate[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.

[17] Wang J, Sun J, Sun P, *et al*. Formation of lysozyme-caseinate heteroprotein complexes for encapsulation of lysozyme by spray-drying: effect of mass ratio and temperature [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 215: 312-320.

Design and Construction of Core-Shell Bacteriostatic Nanoparticles Based on Structure Transformation of Casein Micelles

Baoyuan He[1], Siran Zhang[1], Xinyu Li[2], Lei Zhang[2], Yan Zhou[2], Haiyan Xue[2]
(*1. College of Bioresources Chemical & Materials Engineering, Shaanxi University of Science & Technology; 2. School of Biological and Pharmaceutical Sciences, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China*)

ABSTRACT: Casein-based active substance deliverers have a variety of excellent properties. In order to improve the encapsulation efficiency of hydrophilic substances on casein (CN) micelles, the effect of micelle disturbance factors on lysozyme (Ly) loading efficiency was studied at the nanoscale of CN micelles, and the bacteriostatic nanoparticles with core-shell structure were prepared. The particle size distribution and Zeta potential indicate that low concentrations of NaCl and EDTA favor the partial dissociation of CN micelles and increase the encapsulation efficiency of Ly by 8%. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) results show that the protein's secondary structure and hydrogen bond association of composite nanoparticles change under different micellar disturbance factors, and SEM images show that CN-Ly nanoparticles display spherical structure. The nanoparticles coated with the low molecular weight chitosan have a high inhibitory activity against both *S.aureus* and *E.coli*. In addition, the CN-Ly-CTS composite nanoparticles show controlled release performance in acid environment of pH5.4 with a 24 h-release rate of 61.5%, and the enzyme activity retention rate remains more than 80%. The nanoparticles have potential applications in food and pharmaceutical industries.

Keywords: casein micelles; structure transformation; lysozyme; chitosan; bacteriostatic nanoparticles