

## 乳铁蛋白与纳米脂质体的相互作用及对磷脂膜结构的影响

李日升, 唐文婷, 孙 玥, 蒲传奋\*

(青岛农业大学食品科学与工程学院 山东青岛 266109)

**摘要** 为探明纳米脂质体(N-lip)与食品蛋白的相互作用,采用薄膜分散法制备 N-lip。以乳铁蛋白(Lf)为模型蛋白,评价不同蛋白浓度和滴加方式下形成的纳米脂质体/乳铁蛋白(N-lip/Lf)复合物的粒径、Zeta-电位和多分散系数,并用隐形率(Fs)来估计 N-lip 与 Lf 的结合程度。利用透射电子显微镜比较乳铁蛋白作用前、后的形貌变化,采用光谱法和 X 射线衍射分析 Lf 与 N-lip 的相互作用。结果表明:在磷脂质量浓度为 10.0 mg/mL、磷脂与胆固醇质量比为 10:1、磷脂与 Tween-80 的质量比为 4:1、蛋白质量浓度为 0.1 mg/mL 时,形成的 N-lip/Lf 复合物平均粒径为(100.80±0.141) nm,电位为(-54.9±2.276) mV,具有较好的分散度。透射电子显微镜观察可见,Lf 在 N-lip 边缘形成浅色包裹层。Lf 与 N-lip 的相互作用促进了 Lf 中色氨酸和酪氨酸残基所处环境的疏水性增强,Lf 的  $\alpha$ -螺旋结构含量增加;Lf 可以通过氢键、范德华力和疏水作用与 N-lip 磷脂双分子层膜发生相互作用,吸附到磷脂膜表面。研究结果可为脂质体与食品蛋白的互作及脂质体在食品工业中的潜在应用提供理论依据。

**关键词** 纳米脂质体; 乳铁蛋白; 磷脂双分子层; 相互作用

**文章编号** 1009-7848(2023)01-0066-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.01.007

纳米脂质体(Nano-liposome, N-lip)是磷脂及其结构类似物在水相中自发形成的一种具有双分子层结构的超微球状粒子<sup>[1]</sup>。N-lip 结构中含有亲水核心和磷脂双分子层,可同时包埋疏水性和亲水性营养素,已被用于活性蛋白质<sup>[2]</sup>、维生素<sup>[3]</sup>、多酚<sup>[4]</sup>、黄酮<sup>[5]</sup>等食品营养因子的传输载体。此外,N-lip 双分子层结构与细胞膜结构相似,是一种生物相容性高、安全性能好的传输载体<sup>[6-7]</sup>。

N-lip 的递送特性取决于其与所处环境介质的相互作用。食品蛋白与 N-lip 的界面互作及其递送特性干预效应已有相关研究报道。如 Yi 等<sup>[8]</sup>发现乳清分离蛋白可插入脂质体双层膜,降低膜的流动性,提高脂质体对渗透压、胃消化的耐受性;Chen 等<sup>[9]</sup>发现大豆分离蛋白水解物不仅能抑制 N-lip 氧化产物的形成,而且能直接与 N-lip 双分子层相互作用,对 N-lip 的稳定性产生积极影响;Ragnhildur 等<sup>[10]</sup>研究表明,涂有冷水鱼皮明胶的 N-lip 在脱水过程中,可增加脂双层结构的物理稳定性。上述研究主要基于自组装原理,将蛋白

沉积于脂质体表面或采用蛋白/磷脂混合物共同构建稳定的疏水性双层微结构。对于 N-lip 与食品蛋白相互作用及对蛋白及磷脂双分子层的结构特性的影响仍缺乏系统性研究。明确 N-lip 与食品基质蛋白的相互作用对食品领域脂质体的合理设计及广泛应用至关重要。

乳铁蛋白(Lactoferrin, Lf)广泛分布于动物乳汁,分子质量约 80 ku,含有约 703 个氨基酸残基<sup>[11]</sup>,等电点约为 8.5,高于绝大多数的牛乳蛋白质(等电点约为 5),使其能够在较大 pH 范围内带正电荷<sup>[12]</sup>,可与带负电的脂质体产生静电相互作用。Lf 具有广谱抗菌能力,抗菌模式多样,被认为是一种新型的抗菌药物和极具开发潜力的食品添加剂<sup>[13-14]</sup>。

本研究以 Lf 为模型蛋白,采用薄膜分散法制备 N-lip,在优化 N-lip 制备配方的基础上,测定不同蛋白浓度和滴加方式下形成的纳米脂质体/乳铁蛋白(N-lip/Lf)复合物的粒径、多分散系数和 Zeta-电位。采用隐形率(Fraction of stealthiness, Fs)为指标,估计 N-lip 与 Lf 的结合程度;利用透射电子显微镜观察 Lf 和 N-lip 作用前、后的尺度形貌;采用紫外光谱、荧光光谱、傅里叶变换红外光谱、X 射线衍射、圆二色谱,分析 Lf 与 N-lip 的相互作用及对蛋白和磷脂双分子层结构的影响。

**收稿日期:** 2022-01-02

**基金项目:** 山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MC212);  
山东省重点研发计划项目(2019GNC106051)

**第一作者:** 李日升,女,硕士生

**通信作者:** 蒲传奋 E-mail: pcf800320@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大豆卵磷脂 (>95%, CAS-号:800243-5)、Tween-80 (CAS-号:9005-65-6)、乳铁蛋白 (>95%, CAS-号:112163-33-4)、胆固醇 (CAS-号:57-88-5), 源叶生物技术有限公司(中国上海); 磷钨酸 (CAS-号:12067-99-1), 北京中镜科技有限公司; 所有其它试剂均为分析纯级。

### 1.2 仪器与设备

YRE-2000A 旋转蒸发仪, 中国巩义市巩义市雨花仪器有限公司; SM-150D 细胞破碎仪, 上海曙木技术有限公司; Nano-ZS90 动态光散射粒度分析仪, 美国马尔文仪器有限公司; JE M-2200FS 透射电子显微镜、F-27000 荧光分光光度计, 日本日立有限公司; UV-2600 紫外-可见分光光度计, 上海衡平技术有限公司; Vertex 70v 傅里叶变换红外光谱仪, 美国热电尼高力公司; AXS D8 ADVANCE X 射线衍射仪, 德国布鲁克 AXS 有限公司; Chirascan 圆二色光谱仪, 英国 Applied Photo-physics 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 N-lip 的制备及条件确定

1.3.1.1 N-lip 的制备 采用薄层分散法制备 N-lip<sup>[5]</sup>。按不同的质量比称取大豆卵磷脂、胆固醇和 Tween-80, 加入 20 mL 乙醇在超声波破碎条件下, 将混合物均匀混合溶于乙醇。将溶液转移到旋转蒸发瓶中, 在 40 °C 下对乙醇进行旋转蒸发, 直至形成均匀薄膜, 然后将干燥的脂质膜用 40 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.4, 0.01 mol/L) 水合。在冰浴 (将溶液温度控制在 10 °C 以下) 条件下使用细胞破碎仪在 50% 的振幅下 (工作 1 s, 停止 1 s) 进行超声波处理 15 min。最终磷脂在 PBS 中的质量浓度为 10 mg/mL。

#### 1.3.1.2 N-lip 制备条件的确定

1) 胆固醇含量对 N-lip 平均粒径和 Zeta-电位的影响 固定磷脂与 Tween-80 的质量比为 4:1, 磷脂与 PBS (pH = 7.4, 0.01 mol/L) 的油水比为 10.0 mg/mL, 磷脂与胆固醇质量比分别设为 8:1, 10:1, 12:1, 采用薄层分散法制备 N-lip, 用动态光散射激光粒度分析仪 (Dynamic light scattering laserparticle size analyzer, DLS) 测试 N-lip 的平均

粒径和 Zeta-电位。

2) Tween-80 含量对 N-lip 平均粒径和 Zeta-电位的影响 固定磷脂与胆固醇质量比例为 10:1, 磷脂与 PBS (pH = 7.4, 0.01 mol/L) 的油水比为 10.0 mg/mL, 再设磷脂与 Tween-80 的质量比分别为 4:1, 5:1, 6:1。采用薄层分散法制备脂质体, 用 DLS 测试 N-lip 的平均粒径、Zeta-电位和 PDI。

#### 1.3.2 N-lip/Lf 复合物的形成条件对其平均粒径和 Zeta-电位的影响

1.3.2.1 Lf 浓度对 N-lip/Lf 复合物平均粒径和 Zeta-电位的影响 称取一定质量的 Lf 溶解到 PBS (pH = 7.4, 0.01 mol/L) 中, 按 1:1 (N-lip:Lf) 的体积比, 按 30 滴/min 的速度将质量浓度为 10 mg/mL 的 N-lip 分别滴加到 0.1, 0.5, 2, 10, 20, 50, 100 mg/mL 的 Lf 溶液中, 形成 N-lip/Lf 复合物, 用 DLS 测试 N-lip/Lf 复合物的平均粒径和 Zeta-电位。

#### 1.3.2.2 滴加方式对 N-lip/Lf 复合物形成的影响

其它条件不变, N-lip 的质量浓度为 1 mg/mL, Lf 的质量浓度为 0.1 mg/mL。分别采用 N-lip 滴加至 Lf 和 Lf 滴加至 N-lip 两种方式形成 N-lip/Lf 复合物, 采用 DLS 测定复合物的平均粒径和 Zeta-电位。

## 1.4 N-lip/Lf 复合物的性质表征

1.4.1 Zeta-电位、平均粒径分析 使用 DLS 在散射角为 90°, 温度为 25 °C 时, 测量粒度、Zeta-电位和分散度。检测前, 将 N-lip/Lf 复合物用 PBS (pH = 7.4, 0.01 mol/L) 稀释 100 倍, 加至专用比色皿或电位皿中测试。每次测试重复 3 遍<sup>[6]</sup>。

1.4.2 透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 将 N-lip/Lf 复合物经 PBS (pH = 7.4, 0.01 mol/L) 稀释至适当倍数后, 将样品滴加在铜网正面直至干燥完全, 再滴加 2% 磷钨酸溶液负染再干燥, 采用 TEM 观察 N-lip、N-lip/Lf 复合物的形态。用 NanoMeasure 软件 TEM 图进行分析。

1.4.3 紫外可见分光光度计 (Ultraviolet-visible spectrophotometry, UV) 按 30 滴/min 的速度分别将 1, 2, 4, 5, 8 mg/mL 的 N-lip 分散液 10 mL 按 1:1 的体积比, 滴加到 0.1 mg/mL 的 Lf 溶液中, 形成 N-lip:Lf 质量比为 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 8:1 的 N-lip/Lf 复合物。以 PBS 为空白背景, 采用紫外分光

光度计测定紫外光谱,测试波长范围为190~300 nm<sup>[17]</sup>。

1.4.4 荧光光谱 用PBS作对照,在激发波长285 nm,发射光谱波长范围为300~450 nm,激发狭缝和发射狭缝均为5.0 nm,扫描速度为300 nm/min下,通过荧光分光光度计在25℃下对样品进行测量<sup>[18]</sup>。

1.4.5 衰减全反射-傅立叶变换红外光谱(Attenuated total reflectance Fourier transform infrared, ATR-FTIR) 红外光谱是通过配备了(SMART iTR)ATR附件的傅显叶变换红外光谱仪而获得。将冻干的N-lip/Lf复合物样品涂抹到ATR附件上,将波长范围设为4000~400 cm<sup>-1</sup>,分辨率为4 cm<sup>-1</sup>,扫描次数为64次,用空气做背景进行FTIR测试<sup>[19]</sup>。

根据蛋白质红外图谱分析方法,使用PeakFit Version 4.12软件对Lf酰胺I带(1700~1600 cm<sup>-1</sup>)特征峰的图谱进行分析。确定各子峰与各个二级结构的对应关系后,根据其积分面积计算各二级结构的相对百分含量<sup>[20]</sup>。

#### 1.4.6 X射线衍射(Diffraction of X-rays, XRD)

在室温下采用Cu K $\alpha$ 靶作为放射源( $\lambda=1.5458$  Å)进行X射线衍射测试。测试前,将样品置于样品槽中,并将其表面刮平。操作电压为40 kV,测试电流为40 mA,在5°~60°(2 $\theta$ )之间记录样品的XRD光谱,步速为0.1006 s/step。

1.4.7 圆二色光谱(Circular dichroism, CD) 将N-lip/Lf复合物(蛋白质量浓度0.1 mg/mL)样品注射到直径0.1 cm体积200  $\mu$ L的石英试管中,样品在远紫外扫描范围260~180 nm下进行CD光谱测试,重复扫描3次,PBS做空白对照。使用CDNN软件对Lf的二级结构进行分析<sup>[21]</sup>。

## 1.5 数据处理与分析

所有试验至少重复3次,结果用“平均值 $\pm$ 标准差”表示。数据采用SPSS软件(IBM SPSS Statistics 26)进行单因素方差分析(ANOVA),处理方法采用后邓肯多元方差检验进行比较, $P<0.05$ 为显著。使用Origin 9.0软件对数据进行作图并分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 N-lip 制备条件的选择

2.1.1 胆固醇与磷脂质量比不同对N-lip的平均粒径、Zeta-电位和PDI的影响 不同胆磷脂/胆固醇的质量比对N-lip的平均粒径、Zeta-电位和PDI的影响如表1所示,随着磷脂/胆固醇的质量比从8:1增加12:1,N-lip平均粒径从95.69 nm减小到了85.97 nm(图1),可能是胆固醇插入磷脂中使脂质体粒径减小。郭润发等<sup>[22]</sup>也研究发现在脂质体制备过程中,胆固醇比例的增加有利于增大磷脂膜的刚性和减小N-lip的粒径,使卵磷脂双分子层结构更稳固。随着磷脂/胆固醇的质量比

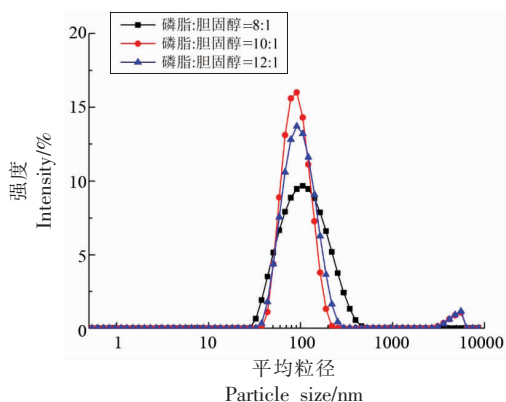


图1 不同磷脂/胆固醇质量比的纳米脂质体粒径分布图  
Fig.1 Size distribution plots of Nano-liposomes with different mass ratios of phospholipids/ cholesterol

表1 不同磷脂/胆固醇质量比对纳米脂质体的Zeta-电位、平均粒径和PDI的影响

Table 1 The effects of different phospholipid/ cholesterol mass ratios on the Zeta-potential, average particle size and PDI of nanoliposomes

磷脂:胆固醇(质量比)	Zeta-电位/mV	平均粒径/nm	PDI
8:1	-26.9 $\pm$ 2.00 <sup>b</sup>	95.69 $\pm$ 0.308 <sup>b</sup>	0.228 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>
10:1	-42.3 $\pm$ 5.528 <sup>a</sup>	87.90 $\pm$ 0.356 <sup>a</sup>	0.216 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>
12:1	-21.5 $\pm$ 2.532 <sup>b</sup>	85.97 $\pm$ 1.672 <sup>a</sup>	0.263 $\pm$ 0.031 <sup>a</sup>

注:同列不同的肩标字母表示有显著性差异( $P<0.05$ )。

从 8:1 增加到 12:1, N-lip 的 Zeta-电位绝对值从 26.9 mV 增加到了 42.3 mV, 之后减小到了 21.5 mV。一般认为 Zeta-电位绝对值越大, 纳米粒子间静电斥力越大, 脂质小泡不容易聚集, 该体系就稳定<sup>[23]</sup>。PDI 先从 0.228 减小到 0.216 后增大到 0.263 且均小于 0.3, 说明在这一范围内 N-lip 的分散度较好<sup>[24]</sup>。从表中可以看出磷脂/胆固醇比值为 10:1 时, 制备的 N-lip 平均粒径相对较小, Zeta-电位绝对值最大, PDI 最小, 证明当磷脂和胆固醇的质量比为 10:1 时, 制备的 N-lip 最稳定。

2.1.2 Tween 80 与磷脂质量比不同对 N-lip 的平均粒径、Zeta-电位和 PDI 的影响 不同磷脂/Tween 80 的质量比对 N-lip 的平均粒径、Zeta-电位和 PDI 的影响如表 2 所示, 随着磷脂/Tween 80 的质量比从 4:1 到 6:1, N-lip 平均粒径从 94.93 nm 增加到了 109.33 nm(图 2), N-lip 的 Zeta-电位的绝对值先从 39.33 mV 先减小至 34.97 mV, 之后增加到了 46.43 mV, PDI 均小于 0.3。在磷脂/Tween 80 比值为 4:1 时, N-lip 的粒径最小, 囊泡

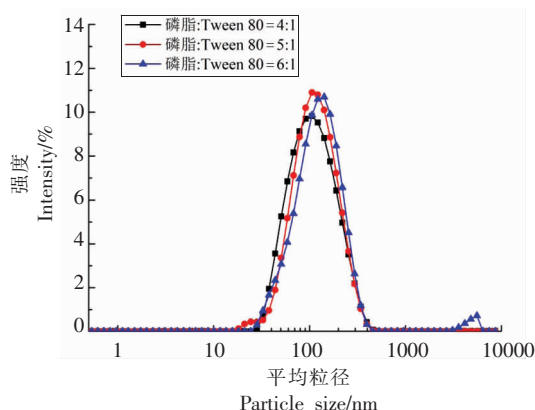


图 2 不同磷脂/Tween 80 质量比的纳米脂质体粒径分布图

Fig.2 Size distribution plots of Nano-liposomes with different mass ratios of phospholipids/ Tween 80

的布朗运动速率与其粒径呈负相关, 小粒径的脂质体表现出较快的布朗运动, 可抵御重力沉降作用<sup>[25]</sup>。上述结果表明当磷脂和 Tween 80 的质量比值为 4:1 时, 制备的脂质体较为稳定。

表 2 不同磷脂/Tween 80 质量比对 N-lip 的 Zeta-电位、平均粒径和 PDI 的影响

Table 2 The effect of different phospholipid/ Tween 80 mass ratios on the Zeta-potential, average particle size and PDI of N-lip

磷脂:Tween 80(质量比)	Zeta-电位/mV	平均粒径/nm	PDI
4:1	-39.33 ± 1.563 <sup>b</sup>	94.93 ± 0.989 <sup>a</sup>	0.211 ± 0.007 <sup>ab</sup>
5:1	-34.97 ± 0.287 <sup>c</sup>	100.98 ± 1.121 <sup>b</sup>	0.204 ± 0.009 <sup>a</sup>
6:1	-46.43 ± 0.613 <sup>a</sup>	109.33 ± 0.694 <sup>c</sup>	0.236 ± 0.012 <sup>b</sup>

注:同列不同的肩标字母表示有显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 2.2 N-lip/Lf 复合物的形成

2.2.1 Lf 质量浓度对 N-lip/Lf 复合物的平均粒径、Zeta-电位和 PDI 的影响 N-lip/Lf 复合物的形成以及 Lf 的吸附对 N-lip 的尺度和电荷特性的影响, 见表 3。使用 DLS 对 Lf 质量浓度不同的 N-lip/Lf 复合物的平均粒径、Zeta-电位和 PDI 进行测量, 观察到当 Lf 质量浓度变化时, N-lip/Lf 复合物的平均粒径先从 100.80 nm 减小到 95.16 nm, 之后增加到 114.70 nm(图 3)。为估计 N-lip 与 Lf 的结合程度, 依据文献[26]引入了参数隐形率(Fraction of stealthiness, Fs), 其计算公式如下:

$$Fs = Dh(N-lip)/Dh(N-lip/Lf) \quad (1)$$

式中, Dh(N-lip)——N-lip 平均粒径(nm);

Dh(N-lip/Lf)——N-lip/Lf 复合物平均粒径(nm); Fs——N-lip 滴加到 Lf 溶液后与 Lf 的相互作用。Lf 和 N-lip 之间的相互作用可以分为 2 种, 一种是由于 Lf 吸附到 N-lip 表面而导致 N-lip/Lf 复合物的平均粒径增加, 另一种是由于渗透驱动将 Lf 插到 N-lip 内部而导致 N-lip/Lf 复合物平均粒径减小。Fs 值对 Lf 存在时脂质体的大小变化很敏感, 当 Fs 值为 1 时, 表明 N-lip 具有隐形特性, 即在蛋白存在的情况下, N-lip 仍然保持自身稳定性不与蛋白发生相互作用。当 Fs 值在 0~1 之间时, 表明 N-lip 与蛋白通过氢键和疏水作用吸附在 N-lip 表面。将 N-lip 滴加到不同质量浓度的 Lf 溶液后, 随着 Lf 质量浓度的增加, Fs 值先增大后减



小且均在 0~1 之间 (表 3)。说明 Lf 吸附在 N-lip 表面,随着 Lf 质量浓度的增加,Lf 在 N-lip 表面包裹的复合物涂层先变薄后变厚,这可能是由于随着蛋白质质量浓度的增加,Lf 和 N-lip 之间的氢键、范德华力和疏水作用增强,部分 Lf 镶嵌到了 N-lip 的磷脂双分子层中,Lf 滴加质量浓度为 10 mg/mL 时,达到饱和,随着 Lf 质量浓度的继续增加,Lf 不再嵌入到磷脂双分子层中,而是堆积在 N-lip 表面,因此  $F_s$  值减小。从表 3 中可以看出,在 Lf 质量浓度为 0.1 mg/mL 时,N-lip/Lf 复合物 Zeta-电位绝对值最大,PDI 小于 0.3。确定在稳定的 Zeta-电位下获得足够的表面覆盖率和较小的粒径以及 N-lip/Lf 复合物粒径分布均匀所需的 Lf 质量浓度为 0.1 mg/mL。

表 3 不同质量浓度的 Lf 对 N-lip/Lf 复合物 Zeta-电位、平均粒径和 PDI 的影响

Table 3 Effects of different mass concentrations of LF on zeta potential, average particle size and PDI of N-lip/Lf complexes

乳铁蛋白质量浓度/mg·mL <sup>-1</sup>	Zeta-电位/mV	平均粒径/nm	PDI	$F_s$
0.1	-54.9 ± 2.276 <sup>a</sup>	100.80 ± 0.141 <sup>b</sup>	0.213 ± 0.013 <sup>abc</sup>	0.941
0.5	-35.9 ± 1.132 <sup>b</sup>	99.72 ± 1.081 <sup>b</sup>	0.233 ± 0.081 <sup>c</sup>	0.952
2	-39.0 ± 2.525 <sup>b</sup>	98.53 ± 0.687 <sup>b</sup>	0.210 ± 0.006 <sup>abc</sup>	0.963
10	-38.1 ± 3.584 <sup>b</sup>	95.16 ± 0.646 <sup>a</sup>	0.224 ± 0.006 <sup>bc</sup>	0.998
20	-33.2 ± 1.631 <sup>b</sup>	108.87 ± 0.602 <sup>c</sup>	0.207 ± 0.009 <sup>abc</sup>	0.871
50	-36.1 ± 2.301 <sup>b</sup>	112.20 ± 0.852 <sup>d</sup>	0.189 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.846
100	-19.1 ± 0.556 <sup>c</sup>	114.70 ± 0.572 <sup>c</sup>	0.198 ± 0.004 <sup>ab</sup>	0.828

注:同列不同的肩标字母表示有显著性差异( $P < 0.05$ )。

2.2.2 滴加方式对 N-lip/Lf 复合物 Zeta-电位、平均粒径和 PDI 的影响 不同滴加方式对 N-lip/Lf 复合物的影响如图 4 所示,N-lip/Lf 复合物与 N-lip 的粒径分布图相比,N-lip 的平均粒径在滴加 Lf 至 N-lip 或被滴加至 N-lip 后平均粒径均有所增加,而 N-lip 滴加至 Lf 中比 Lf 滴加至 N-lip 中的平均粒径小。通过这一结果初步推测 N-lip 和 Lf 发生了相互作用,且使 N-lip 的平均粒径增大了。滴加方式对纳米 N-lip 的平均粒径、Zeta-电位和 PDI 的影响如表 4 所示,N-lip 滴加 Lf 形成的 N-lip/Lf 复合物平均粒径为 100.80 nm,Zeta-电位的绝对值为 54.9 mV,PDI 为 0.213,Lf 滴加至 N-lip 形成的 N-lip/Lf 复合物平均粒径为 104.73 nm,Zeta-电位的绝对值为 38.2 mV,PDI 为 0.225。二者相比 Lf 滴加至 N-lip 形成的 N-lip/Lf 复合物

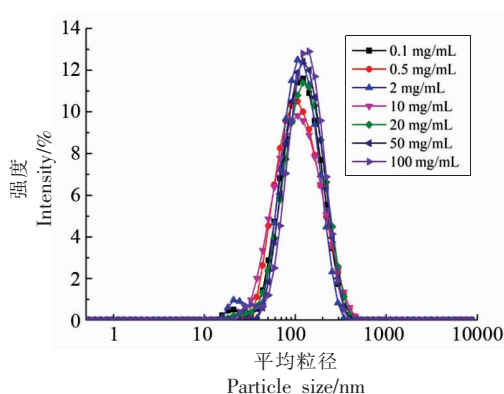


图 3 不同 Lf 质量浓度的 N-lip/Lf 复合物粒径分布图

Fig.3 The particle size distribution of N-lip/Lf complexes with different Lf mass concentration

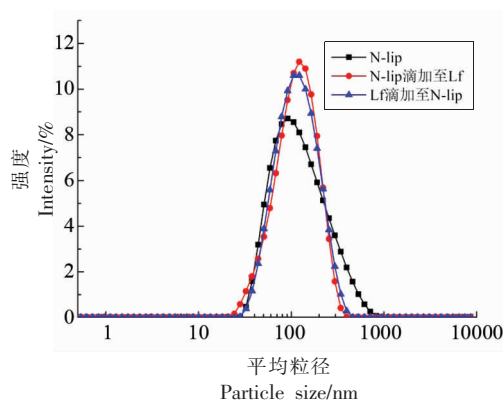


图 4 不同滴加方式对 N-lip/Lf 复合物粒径分布的影响

Fig.4 Effect of different dropping methods on particle size distribution of N-lip/Lf complexes

平均粒径和 PDI 更小,Zeta-电位的绝对值更大。证明 N-lip 滴加至 Lf 形成的 N-lip/Lf 复合物比 Lf

表 4 不同滴加方式对 N-lip/Lf 复合物 Zeta-电位、平均粒径和 PDI 的影响

滴加方式	Zeta-电位/mV	平均粒径/nm	PDI
N-lip	$-39.3 \pm 1.563^{ab}$	$94.93 \pm 0.989^a$	$0.211 \pm 0.007^a$
N-lip 滴加至 Lf	$-54.9 \pm 2.276^a$	$100.80 \pm 0.141^{ab}$	$0.213 \pm 0.013^a$
Lf 滴加至 N-lip	$-38.2 \pm 3.615^{ab}$	$104.73 \pm 0.974^b$	$0.225 \pm 0.001^a$

注:同列不同的肩标字母表示有显著性差异( $P < 0.05$ )。

滴加至 N-lip 形成的 N-lip/Lf 复合物体系更加稳定。

### 2.3 TEM 分析

为了研究 N-lip 和 Lf 是否发生了相互作用,以及作用前、后的形态学差异,采用透射电镜对 N-lip 和 N-lip/Lf 复合物 2 个样品的形态学进行观察。如图 5a 所示,N-lip 囊泡呈球状,粒径分布较为均匀,粒径约为 90 nm。图 5b 显示的 N-lip/Lf 复合物 TEM 图仍呈球状,然而与 N-lip 相比粒径有所增大,约为 100 nm,与上述 DLS 的测量结果一致。插图可见脂质体球形周围出现了一层浅色的包覆层。参考 Wagner 等<sup>[27]</sup>对蛋白质和脂质体吸附作用的研究,推测 Lf 可能通过氢键、范德华力和疏水作用吸附在了 N-lip 表面形成了一层浅色的包覆层。

### 2.4 UV 分析

紫外光谱能够有效的监测 Lf 中色氨酸和酪氨酸残基所处微环境变化。如果 Lf 和 N-lip 之间未发生相互作用,Lf 在滴加 N-lip 后 N-lip/Lf 复合物的光谱应与 N-lip 或 Lf 的图谱重合<sup>[28]</sup>。从图 6a 可以观察到 N-lip/Lf 复合物的紫外光谱峰强度

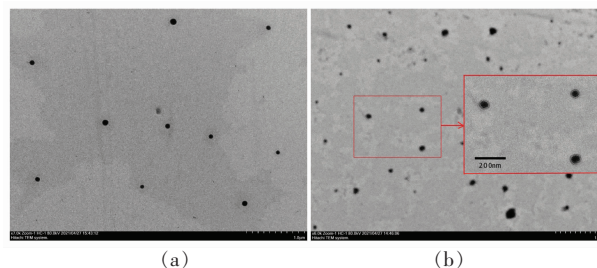


图 5 N-lip 的 TEM 图(a);N-lip/Lf 复合物的 TEM 图(b), 图中插图为对应区域的放大图

Fig.5 The TEM diagram of N-lip (a); The TEM image of the N-lip/Lf complexes (b), the inset in the figure is an enlarged view of the corresponding area

和位置与 N-lip、Lf 紫外光谱峰存在明显差异,表明 N-lip 和 Lf 之间的相互作用,致使 Lf 中色氨酸和酪氨酸残基周围微环境发生变化。从图 6b 可以看出,随着 N-lip:Lf 的质量比从 1:1 增加到了 8:1,N-lip/Lf 复合物的最大吸收峰从 210 nm 红移到了 242 nm,吸光度强度从 0.235 增加到了 0.792。导致这种现象的原因可能是由于 N-lip 对 Lf 的构象产生影响<sup>[29]</sup>,导致 Lf 中色氨酸和酪氨酸残基所处环境的疏水性增强<sup>[30]</sup>。N-lip 进入 Lf 中的

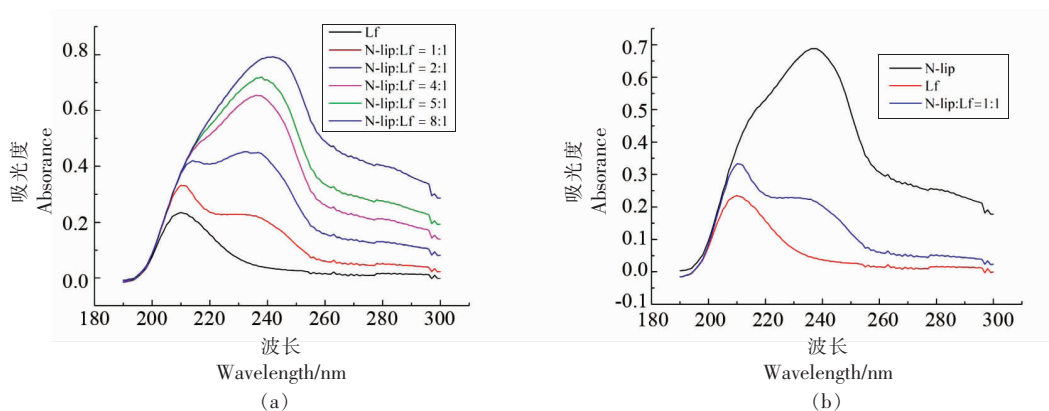


图 6 Lf、N-lip 和 N-lip/Lf 复合物的紫外光谱(a);Lf 和 N-lip:Lf 质量比不同的 N-lip/Lf 复合物的紫外光谱(b)

Fig.6 UV spectrum of Lf, N-lip and N-lip/Lf complexes (a); UV spectrum of N-lip/Lf complexes with different mass ratios of Lf and N-lip:Lf (b)

疏水性氨基酸残基之间,通过疏水相互作用形成疏水口袋,Lf的芳香环疏水基团暴露到表面,使得紫外吸光度不断增强。

## 2.5 荧光光谱分析

Lf的内源荧光主要来自芳香氨基酸残基,如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸3种荧光团,其中色氨酸和酪氨酸具有大的疏水表面积,并为稳定蛋白质的核结构提供疏水相互作用<sup>[31]</sup>。Lf的内源荧光发射主要是由于色氨酸和酪氨酸残基的激发,且受邻近氨基酸和周围疏水性的影响<sup>[32]</sup>。图7是N-lip与Lf相互作用的内源荧光光谱图。随着N-lip的质量比在N-lip:Lf复合物体系中逐渐增加,Lf的最大发射峰由332 nm蓝移至321.5 nm。色氨酸残基最大发射波长的蓝移可能是N-lip与Lf表面的色氨酸残基结合改变了其所处微环境的极性,导致色氨酸周围环境的疏水性增强<sup>[32]</sup>。蛋白疏水区的变化可能会改变其在油水界面上的分散和吸附<sup>[33]</sup>。另外,随着N-lip的质量比在N-lip:Lf复合物体系中逐渐增加,Lf的最大荧光发射强度也从1 583 a.u减小到了648.7 a.u,这可能是由于N-lip的硝基氧基团对Lf构象产生了潜在影响,导致Lf中色氨酸的内源荧光被猝灭<sup>[34]</sup>。

## 2.6 ATR-FTIR 分析

由图8可以看出随着N-lip占比的增加,N-lip/Lf复合物的FTIR在 $3\ 200\text{ cm}^{-1}$ 附近的特征峰从 $3\ 209\text{ cm}^{-1}$ 移至 $3\ 274\text{ cm}^{-1}$ ,表明随着N-lip占比增加,N-lip/Lf复合物中形成了更多的氢键,这可以归因于Lf的羰基与磷脂的氧基团之间形成了更多的氢键。N-lip/Lf复合物的特征峰随着N-lip占比的增加,对称和非对称 $\text{CH}_2$ 伸缩振动的光谱峰从 $2\ 853.26\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\ 923.35\text{ cm}^{-1}$ 位移到 $2\ 853.15\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\ 922.17\text{ cm}^{-1}$ 。这可能归因于Lf与N-lip相互作用后的疏水性增强。在 $1\ 736\text{ cm}^{-1}$ 处的峰可以被认为是N-lip中酯基的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动。随着N-lip占比的增加,N-lip/Lf复合物在此处的峰略有增加,说明Lf与N-lip发生了相互作用。综上,通过FTIR光谱图初步推测脂质体与乳铁蛋白之间存在氢键和疏水性相互作用<sup>[35-36]</sup>。

在蛋白质的FT-IR图谱中,酰胺I带( $1\ 700\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$ )由代表羰基伸缩振动的几个子带组成<sup>[37]</sup>。将Lf及N-lip/Lf复合物的二阶导数谱图和

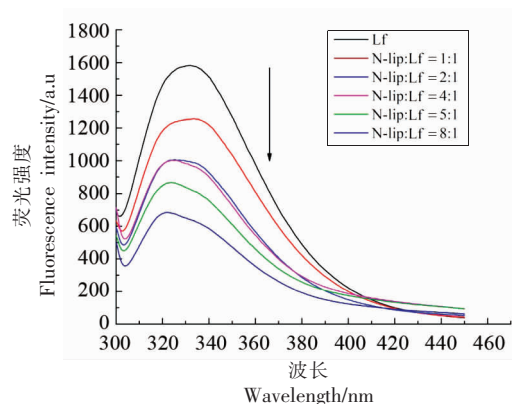


图7 Lf、N-lip:Lf质量比不同的N-lip/Lf复合物荧光光谱图

Fig.7 Lf, N-lip:Lf fluorescence spectra of N-lip/LF complexes with different mass ratios

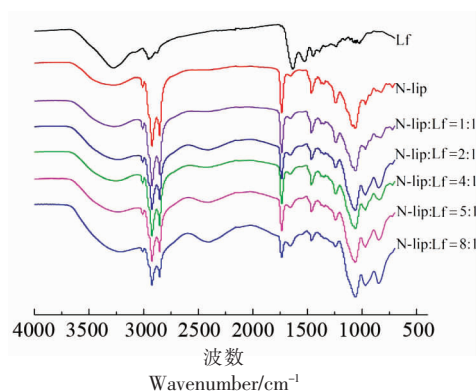


图8 Lf、N-lip、N-lip:Lf质量比不同的N-lip/Lf复合物FTIR光谱

Fig.8 Lf, N-lip, N-lip/Lf protein complexes FTIR spectra with different mass ratios of N-lip:Lf

曲线拟合谱图进行峰位分析后,得到Lf振动吸收峰在图谱中对应的二级结构相对百分含量。变化见表5,随着N-lip:Lf质量比从1:1增加到8:1,Lf中 $\beta$ -折叠结构所占比例先减少后增加,整体从21.86%降低到14.60%。无规则卷曲先减少后增加,整体变化不大。 $\alpha$ -螺旋从21.29%增加到35.89%。 $\beta$ -转角先增加后减少,整体从27.76%减少到20.50%。二级结构的变化说明Lf内部有新的二级结构排列形成,新的结构变化主要为 $\alpha$ -螺旋结构的增加。通过对N-lip:Lf质量比不同的复合物的二级结构进行分析,可以看出,随着N-lip添加比例的增加,Lf内部多肽链又进行了重新自组装,产生了大量以 $\alpha$ -螺旋为主的有序结构<sup>[38]</sup>。

表 5 利用酰胺 I 带拟合 Lf、N-lip:Lf 质量比不同的 N-lip/Lf 复合物二级结构的结果

Table 5 The results of fitting the secondary structure of N-lip/Lf complexes with different mass ratios of Lf and N-lip:Lf using amide I bands

样品	$\beta$ -折叠/%	无规则卷曲/%	$\alpha$ -螺旋/%	$\beta$ -转角/%
Lf	21.86	29.09	21.29	27.76
N-lip:Lf (1:1)	15.46	24.76	29.60	30.18
N-lip:Lf (2:1)	13.67	27.03	32.58	26.72
N-lip:Lf (4:1)	13.85	28.75	35.02	22.37
N-lip:Lf (5:1)	13.96	29.60	35.02	21.42
N-lip:Lf (8:1)	14.60	29.01	35.89	20.50

## 2.7 XRD 分析

XRD 常被用来检测结晶度和晶体的结构特征,一般来讲,尖峰象征晶体结构,宽峰表示为无定形结构<sup>[39]</sup>。图 9 显示 Lf、N-lip 和 N-lip/Lf 复合物的 XRD 图,均表现出无尖峰、无定形的特征。Lf 衍射峰的  $2\theta$  角为  $21.67^\circ$ , N-lip 衍射峰的  $2\theta$  角为  $19.69^\circ$ 。N-lip/Lf 复合物表现出一个宽的衍射峰,  $2\theta$  角为  $19.83^\circ$ , 表明 N-lip 和 Lf 的复合物仍为非晶体结构。然而, N-lip/Lf 复合物的 X 衍射峰位置、强度和宽度明显区别于 N-lip 和 Lf 的峰, 邹文洁<sup>[39]</sup>的研究有类似发现, 这可能是由于 Lf 包裹到了 N-lip 膜外层后脂质体膜体系发生改变, 相互作用并形成了更加稳定有序的结构。

## 2.8 CD 分析

CD 光谱是表征蛋白质二级结构的重要技术手段。Yi 等<sup>[40]</sup>研究发现 N-lip 加入到蛋白后会改

变蛋白的二级结构。为了进一步探索 Lf 和 N-lip 的相互作用, 对 Lf 和含不同质量浓度 N-lip 的 N-lip/Lf 复合物溶液进行了 CD 光谱扫描。如图 10 所示, Lf 在 208 nm 左右有一处负的吸收峰, 是  $\alpha$ -螺旋构象<sup>[41]</sup>。在加入不同质量浓度的 N-lip 后, 各样品的 CD 光谱的 208 nm 处峰强绝对值较 Lf 都有所增加, 且随着 N-lip 质量浓度的增加, 峰强绝对值越大。Lf 的氨基酸残基组成 50% 以上是疏水性氨基酸, 且主要处于  $\alpha$ -螺旋结构<sup>[42]</sup>, 结合紫外疏水性结果分析, N-lip 可能是通过氢键、范德华力与 Lf 相互作用促使疏水性氨基酸环境改变, 并影响到 Lf 的二级结构, 使 Lf 的  $\alpha$ -螺旋结构含量增加<sup>[43]</sup>。这一观察结果表明, N-lip/Lf 复合物和 Lf 相比二级结构变化主要发生在  $\alpha$ -螺旋结构上, 且  $\alpha$ -螺旋结构含量的增加具有 N-lip 质量浓度依赖关系, 这一结论和红外分析结果一致。

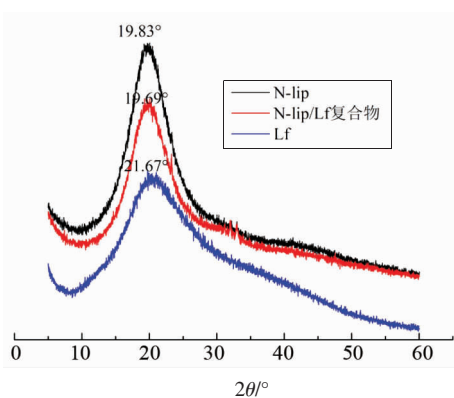


图 9 Lf、N-lip 和 N-lip/Lf 复合物的 XRD 图

Fig.9 X-ray patterns of Lf, N-lip and N-lip/Lf protein complexes

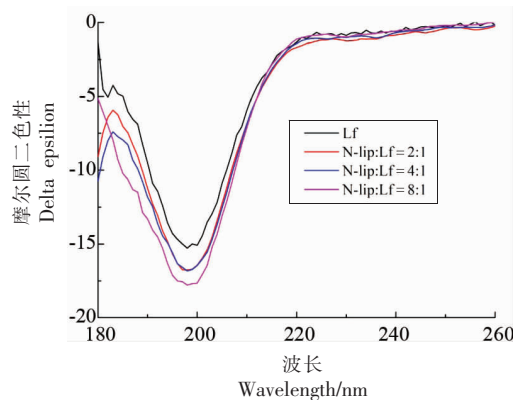


图 10 LF、N-lip:Lf 质量比不同的 N-lip/Lf 复合物 CD 光谱

Fig.10 Lf, N-lip:N-lip/Lf protein complexes CD spectra with different mass ratios of Lf



### 3 结论

本文在优化 N-lip 制备配方的基础上,研究了 N-lip 与 Lf 形成复合物的结构特性及不同质量浓度的 N-lip 与 Lf 之间的相互作用。N-lip 在与 Lf 形成复合物后,粒径增大,电位绝对值增加, PDI < 0.3, 仍保持较好分散性。形貌观察表明 Lf 在 N-lip 边缘形成浅色包裹,致使体系平均粒径增大。这可能是由于 Lf 可以通过氢键和疏水作用与 N-lip 双层膜发生相互作用,吸附到磷脂膜表面。N-lip/Lf 复合物的形成导致 Lf 中色氨酸和酪氨酸残基周围微环境的疏水性增强,改变其在油水界面上的分散和吸附。N-lip 的作用改变了 Lf 的二级结构,主要表现为  $\alpha$ -螺旋结构含量的增加。N-lip 与 Lf 结合形成了一种新的、更加稳定有序的结构。N-lip 与 Lf 之间的相互作用随着 N-lip 质量浓度的增加而增强。本研究以 Lf 为模型蛋白,证实了食品蛋白与 N-lip 之间能够通过分子互作形成复合物,进而改变其结构和理化特性。结果可为纳米脂质体作为传输载体与食品蛋白的相互作用及其应用提供重要的理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] CHEN B, MCCLEMENTS D J, GRAY D A, et al. Stabilization of soybean oil bodies by enzyme (laccase) cross-linking of adsorbed beet pectin coatings [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(16): 9259-9265
- [2] PANJA S, KHATUA D K, HALDER M. Effect of casein on pure lecithin N-liposome: Mixed biomacromolecular system for providing superior stabilization to hydrophobic molecules [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 180: 298-305.
- [3] 毛荣良, 李坤, 杨开, 等. 猴头菇维生素 D<sub>2</sub> 纳米脂质体的制备与分析 [J]. *食药菌*, 2020, 28(6): 440-445.  
MAO R L, LI S, YANG K, et al. Preparation Nano-liposome of VD<sub>2</sub> from *Hericium erinaceus* [J]. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 2020, 28(6): 440-445.
- [4] 张冉, 李秋莹, 杨丽丽, 等. 茶多酚脂质体/溶菌酶-壳聚糖逐级释放涂膜的制备、表征及抗菌机理研究 [C]. *中国食品科学技术学会第十七届年会摘要集*, 2020: 471-472.
- [5] 吴瑶瑶. 大豆异黄酮脂质体的制备及相关性质研究 [D]. 上海: 上海应用技术大学, 2020.  
WU Y Y. Preparation and related properties of soybean isoflavone liposomes [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2020.
- [6] KAPCHIE V N, YAO L, HAUCK C C, et al. Oxidative stability of soybean oil in oleosomes as affected by pH and iron [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2286-2293.
- [7] MARY E N, KURT W R, LAWRENCE T B, et al. A comparison of biodistribution of n-liposomal and soluble il-2 by a new method based on time-resolved fluorometry of europium [J]. *Cytokine*, 2000, 12(11): 1702-1711.
- [8] YI X Z, ZHENG X, DING B M, et al. Liposome-whey protein interactions and its relation to emulsifying properties [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2018, 99: 505-512.
- [9] CHEN C, SUN D X, ZHANG Y, et al. The chemistry behind the antioxidant actions of soy protein isolate hydrolysates in a liposomal system: Their performance in aqueous solutions and liposomes [J]. *Food Chemistry*, 2020, 323: 126789.
- [10] RAGNHILDUR E, MONIKA G, BENJAMIN Z, et al. Osmotic dehydration of liposomal dispersions: Influence of particle size and electrostatic deposition of cold water fish skin gelatin [J]. *Food Biophysics*, 2016, 11(4): 417-428.
- [11] 王楠楠, 蔡婷婷, 朱婉萍. 乳铁蛋白抗菌作用研究进展 [J]. *食品科技*, 2020, 45(8): 233-237.  
WANG N N, CAI T T, ZHU W P. Research progress on antibacterial effects of lactoferrin [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(8): 233-237.
- [12] LIU J F, YANG J, ABLIZ A, et al. Influence of thermal treatment on physical, structural characteristics and stability of lactoferrin, EGCG and high methoxylated pectin aggregates [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2020, 125: 109221.
- [13] LIU W, WEI F, YE A, et al. Kinetic stability and

- membrane structure of liposomes during *in vitro* infant intestinal digestion: Effect of cholesterol and lactoferrin[J]. Food Chemistry, 2017, 230: 6–13.
- [14] PALMANO K P, RAMOS R, WATSON M, et al. Survival and bone-active properties of bovine lactoferrin supplemented into stirred yoghurt[J]. International Dairy Journal, 2011, 21(7): 477–483.
- [15] ZHANG Y, PU C, TANG W, et al. Gallic acid N-liposomes decorated with lactoferrin: Characterization, *in vitro* digestion and antibacterial activity[J]. Food Chemistry, 2019, 293: 315–322.
- [16] PAN L, ZHANG V X, FAN X Z, et al. Whey protein isolate coated N-liposomes as novel carrier systems for astaxanthin[J]. European Journal of lipid Science and Technology, 2020, 122(4): 1900325.
- [17] 祝钢, 鞠梦楠, 崔守琦, 等. 大豆蛋白/表没食子儿茶素没食子酸酯纳米复合颗粒制备 Pickering 乳液及其性质研究[J]. 食品科技, 2020, 45(9): 221–226.
- ZHU G, JU M N, CUI S Q, et al. Preparation of Pickering emulsion from soy protein/epigallocatechin gallate nanocomposite particles and its properties[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(9): 221–226.
- [18] SUDIPTA P J, DEB K K, MINTU H. Effect of casein on pure lecithin liposome: Mixed biomacromolecular system for providing superior stabilization to hydrophobic molecules[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 180: 298–305.
- [19] YU K I, ZHANG H, LIU Y Z, et al. Adipose tissue estimates the postmortem interval based on ATR-FTIR spectroscopy[J]. Microchemical Journal, 2021, 164: 105977.
- [20] 单杰, 刘雯, 冯金凤, 等. 基于 FTIR 技术的乳清分离蛋白聚集物的二级结构表征[J]. 食品工业, 2014, 35(5): 156–160.
- SHAN J, LIU W, FENG J F, et al. The secondary structure characterization of whey protein isolate aggregates based on FTIR technology[J]. Food Industry, 2014, 35(5): 156–160.
- [21] LI S, HE Z, LI M, et al. A study of the physicochemical properties of rabbit glycosylated myofibrillar protein with high solubility in low ionic strength medium[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 241–249.
- [22] 郭润发, 梁菊, 何佳彧, 等. 小粒径、高稳定性多隔室及单室脂质体的制备工艺[J]. 武汉大学学报(理学版), 2021, 67(1): 87–92.
- GUO R F, LIANG J, HE J Y, et al. Preparation process of multi-compartment and single-compartment liposomes with small particle size and high stability[J]. Journal of Wuhan University (Science Edition), 2021, 67(1): 87–92.
- [23] 周伟, 刘玮琳, 刘伟, 等. 不同因素对中链脂肪酸脂质体 Zeta 电位的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 128–132.
- ZHOU W, LIU W L, LIU W, et al. The influence of different factors on the Zeta potential of medium-chain fatty acid liposomes[J]. Food Science, 2012, 33(19): 128–132.
- [24] 许雪儿, 李娟, 陈正行. 负载生育酚的玉米醇溶蛋白纳米颗粒的构建及性质表征[J]. 中国食品学报, 2020, 20(12): 24–30.
- XU X E, LI J, CHEN Z X. Construction and characterization of tocopherol-loaded zein nanoparticles[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(12): 24–30.
- [25] DOUGLAS G D, SARAH J W, ROSS H. The characterization of small emulsion droplets made from milk proteins and triglyceride oil[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1997, 123(97): 145–153.
- [26] PAPAGEORGIOU F, NATASSA P, NIKOLAOS N, et al. Physicochemical study of the protein-liposome interactions: Influence of liposome composition and concentration on protein binding[J]. Journal of Liposome Research, 2019, 29(4): 663–688.
- [27] WAGNER J, DILLENBURGER M, SIMON J, et al. Amphiphilic dendrimers control protein binding and corona formation on N-liposome nanocarriers[J]. Chemical Communications, 2020, 56(61): 8663–8666.
- [28] 孙丽莉, 张朝, 陈刚, 等. 光谱法研究高效氯氰菊酯与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2020, 32(4): 32–36.
- SUN L L, ZHANG C, CHEN G, et al. Study on the interaction between beta-cypermethrin and bovine serum albumin by spectroscopy[J]. Journal of Hunan University of Arts and Science (Natural Science Edition), 2020, 32(4): 32–36.
- [29] JIANG S, LI M, CHANG R, et al. *In vitro* inhibition of pancreatic alpha-amylase by spherical and polygonal starch nanoparticles[J]. Food Function, 2018, 9(1): 355–366.

- [30] 胡淼, 杨秋萍, 郑环宇, 等. 非共价作用对球蛋白-花青素复合物结构特性的影响[J]. 大豆科技, 2020(5): 3-12.  
HU M, YANG Q P, ZHENG H Y, et al. The influence of non-covalent interactions on the structural properties of globulin-anthocyanin complexes[J]. Soybean Science and Technology, 2020(5): 3-12.
- [31] 汤小玉, 罗云敬, 魏安琪, 等. 同步与三维荧光光谱法研究日落黄和血清蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(10): 3129-3135.  
TANG X Y, LUO Y J, WEI A Q, et al. Study on the interaction between sunset yellow and human serum protein by synchronous and three-dimensional fluorescence spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(10): 3129-3135.
- [32] YI X Z, ZHENG Q H, PAN M H, et al. Liposomal vesicles-protein interaction: Influences of iron liposomes on emulsifying properties of whey protein[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89: 602-612.
- [33] 李杨, 李明达, 王中江, 等. 基于光谱技术的维生素 B<sub>12</sub> 与大豆分离蛋白相互作用分析[J]. 农业机械学报, 2020, 51(1): 341-348.  
LI Y, LI M D, WANG Z J, et al. Analysis of the interaction between vitamin B<sub>12</sub> and soybean protein isolate based on spectroscopic technology[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2020, 51(1): 341-348.
- [34] 张帆, 隋森芳. 天花粉蛋白可以插入含有天然细胞膜非胞质侧组分的磷脂膜[J]. 生物物理学报, 2005(3): 169-174.  
ZHANG F, SUI S F. Trichosanthin can be inserted into phospholipid membrane containing non-cytoplasmic side components of natural cell membrane[J]. Chinese Journal of Biophysics, 2005(3): 169-174.
- [35] DAG D, GUNER S, OZTOP M H. Physicochemical mechanisms of different biopolymers' (lysozyme, gum arabic, whey protein, chitosan) adsorption on green tea extract loaded N-liposomes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 473-482.
- [36] ZHAO Z T, XIONG X, ZHOU H, et al. Effect of lactoferrin on physicochemical properties and microstructure of pullulan-based edible films[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(8): 4150-4157.
- [37] 卢静静, 孙炜炜. FT-IR 分析乳清分离蛋白-葡聚糖接枝物的结构变化[J]. 现代食品科技, 2014, 30(8): 89-93.  
LU J J, SUN W W. FT-IR analysis of the structural changes of whey protein isolate-dextran grafts[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(8): 89-93.
- [38] 操强, 胡巍, 高金燕, 等. 卵白蛋白-白藜芦醇相互作用机理及其对卵白蛋白的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(4): 31-37.  
CAO Q, HU W, GAO J Y, et al. Ovalbumin-resveratrol interaction mechanism and its effect on ovalbumin[J]. Food Science, 2021, 42(4): 31-37.
- [39] 邹文洁. 卵白蛋白-藻酸丙二醇酯复合纳米颗粒包载花青素及其显色包装薄膜的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020, 123(2): 127-128.  
ZOU W J. Study on anthocyanin and its color packaging film encapsulated by ovalbumin-propylene glycol alginate composite nanoparticles[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020, 123(2): 127-128.
- [40] YI X Z, ZHENG Q H, PAN M H, et al. Liposomal vesicles-protein interaction: Influences of iron N-liposomes on emulsifying properties of whey protein[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89: 602-612.
- [41] 王辰, 江连洲. 使用圆二色性光谱分析二级结构对大豆分离蛋白表面疏水性的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(14): 134-137.  
WANG C, JIANG L Z. Using circular dichroism spectroscopy to analyze the effect of secondary structure on the surface hydrophobicity of soy protein isolate[J]. Food Industry Science and Technology, 2016, 37(14): 134-137.
- [42] RAO S Q, XU G W, LU X N, et al. Characterization of ovalbumin-carvacrol inclusion complexes as delivery systems with antibacterial application[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105753.
- [43] 王震, 贾丽华, 杨瑞, 等. 光谱法结合分子对接研究茶酰亚胺衍生物与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析实验室, 2020, 39(8): 936-941.  
WANG Z, JIA L H, YANG R, et al. Study on the interaction between naphthimide derivatives and bovine serum albumin by spectroscopy combined with molecular docking[J]. Analysis Laboratory, 2020, 39(8): 936-941.

## The Interaction between Lactoferrin and Nanoliposomes and Its Influence on the Structure of Phospholipid Membrane

Li Risheng, Tang Wenting, Sun Yue, Pu Chuanfen\*

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

**Abstract** In order to explore the interaction between nano-liposome (N-lip) and food protein, N-lip was prepared by the thin film dispersion method. Lactoferrin (Lf) was used as the model protein to evaluate the effects of the nanoliposome/lactoferrin (N-lip/Lf) complex formation under different protein concentrations and dripping methods on the particle size, Zeta-potential and polydispersity coefficient, and the stealth rate (Fs) was used to estimate the degree of binding of N-lip and Lf. The transmission electron microscope was used to compare the morphological changes before and after the action of lactoferrin, and the interaction between Lf and N-lip was analyzed by spectroscopy and X-ray diffraction. The results showed that: when the phospholipid mass concentration was 10.0 mg/mL, the mass ratio of phospholipid to cholesterol was 10:1, the mass ratio of phospholipid to Tween-80 was 4:1, and the protein mass concentration was 0.1 mg/mL, the average particle size and the zeta potential of the N-lip/Lf complex formed were  $(100.80 \pm 0.141)$  nm and  $(-54.9 \pm 2.276)$  mV, respectively, with favourable dispersion. Transmission electron microscope observation showed that Lf formed a light-colored wrapper around the edge of N-lip. The interaction between Lf and N-lip promoted the hydrophobicity of the environment where tryptophan and tyrosine residues in Lf were located, and the content of the alpha-helical structure of Lf increased; Lf could interact with the N-lip phospholipid bilayer membrane through hydrogen bonding, van der Waals force and hydrophobic interaction, adsorb to the surface of the phospholipid membrane and change the polar environment of the N-lip membrane. The research results can provide a theoretical basis for the interaction between liposomes and food proteins and the potential application of the former in the food industry.

**Keyword** nanoliposome; lactoferrin; phospholipid bilayer; interaction