娄梦雪, 纪帅奇, 乌日娜, 等. 芽孢杆菌 SNBS-3 抗菌肽 W1 脂质体制备、表征及其抑菌活性 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(8): 88−99. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040189

LOU Mengxue, JI Shuaiqi, WU Rina, et al. Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity of *Bacillus subtilis* SNBS-3 Antimicrobial Peptide W1-Loaded Liposomes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(8): 88−99. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040189

· 研究与探讨 ·

芽孢杆菌 SNBS-3 抗菌肽 W1 脂质体制备、表征及其抑菌活性

娄梦雪[1], 纪帅奇[1], 乌日娜[1], 王鹏杰[2], 刘可新[1], 郭　佳[1], 安飞宇[1], 杨续金[3,*], 武俊瑞[1,*]

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁省食品发酵技术工程研究中心, 沈阳市微生物发酵技术创新重点实验室, 辽宁沈阳 110866;
2.中国农业大学营养与健康研究院, 北京 100091;
3.内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古农业大学杨续金创新工作室, 内蒙古呼和浩特 010010)

摘　要: 为解决抗菌肽在食品保鲜和医药应用中面临的稳定性差、易降解等问题，通过脂质体包埋技术提高抗菌肽 W1 的稳定性和生物利用度。从枯草芽孢杆菌 SNBS-3 中提取纯化抗菌肽 W1，采用硫酸铵盐析、Sephadex-G25 凝胶层析和高效液相色谱（high performance liquid chromatography，HPLC）进行纯化，通过液相色谱-质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）技术鉴定其分子序列。随后，采用薄膜分散法制备 W1 负载脂质体，并通过单因素实验与响应面试验确定最佳制备工艺。通过粒径、Zeta 电位、包封率及微观结构分析评估脂质体的物理化学性质，并考察其在不同温度、pH 及酶处理条件下的稳定性及抑菌活性。此外，细胞实验评估了 W1 脂质体对人肝细胞 LO2 的生物毒性。结果表明，经 Sephadex-G25 纯化获得高活性组分，HPLC 进一步纯化得到核心抑菌峰，LC-MS/MS 鉴定抗菌肽 W1 序列为 IGLFGGAGVGK；脂质体最优制备条件为大豆脑磷脂（soybean phosphatidyl ethanolamine，SPE）与 *β*-谷甾醇质量比为 5.94∶1、SPE 与 W1 质量比为 5.18∶1 和超声时间为 6.75 min，在此条件下制得的 W1 脂质体的粒径为 105.88±6.35 nm，包封率为 68.2%±1.5%，表现出良好的物理化学稳定性。抗菌活性测试显示，W1 脂质体对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 32 mg/mL。细胞毒性实验表明，W1 脂质体在浓度低于 512 mg/mL 时对 LO2 细胞的存活率保持在 90% 以上（P>0.05），具有良好的生物相容性。综上，脂质体包埋技术显著提高了抗菌肽 W1 的稳定性和抗菌效果，为其在食品和医药领域的应用提供了新的解决方案。

关键词: 枯草芽孢杆菌 SNBS-3, 抗菌肽, 脂质体, 制备工艺优化, 包封率, 稳定性, 生物毒性

中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)08−0088−12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040189

本文网刊:

Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity of *Bacillus subtilis* SNBS-3 Antimicrobial Peptide W1-Loaded Liposomes

LOU Mengxue[1], JI Shuaiqi[1], WU Rina[1], WANG Pengjie[2], LIU Kexin[1], GUO jia[1], AN Feiyu[1], YANG Xujin[3,*], WU Junrui[1,*]

收稿日期: 2025−04−17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目（32172279）; 辽宁省“兴辽英才计划”项目（XLYC2213026, XLYC2402005）; 呼和浩特市科技计划项目（2023-揭榜挂帅-农-2）; 内蒙古自治区科技计划（2022YFHH0152）; 蒙牛全球研发创新中心乳品科学研究 院“征集全球最强大脑”项目（20241205600003899 9）; 辽宁省科学技术计划项目（2024JH2/101900005）; 沈阳农业大学高层次人才引进项目 （2023YJRC002）; 沈阳市科技创新平台项目（21-103-0-14, 21-104-0-28）。

作者简介: 娄梦雪（2000−）, 女, 博士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: mengxuelou2000@163.com。

*** 通信作者:** 杨续金（1975−）, 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品科学、农产品加工及贮藏方面的研究, E-mail: eter88@163.com。
武俊瑞（1977−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: junruiwu@126.com。

（1.School of Food, Shenyang Agricultural University, Liaoning Food Fermentation Technology Engineering Research Center, Shenyang Key Laboratory of Microbial Fermentation Technology Innovation, Shenyang 110866, China；
2.Institute of Nutrition and Health, China Agricultural University, Beijing 100091, China；
3.College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Yang Xujin Innovation Studio, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, China）

Abstract: To address the issues of poor stability and degradation of antimicrobial peptides in food preservation and pharmaceutical applications, liposome encapsulation technology was employed to enhance the stability and bioavailability of antimicrobial peptide W1. The antimicrobial peptide W1 was extracted and purified from *Bacillus subtilis* SNBS-3 using ammonium sulfate precipitation, Sephadex-G25 gel chromatography, and high-performance liquid chromatography (HPLC). Its molecular sequence was identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Subsequently, W1-loaded liposomes were prepared using the film dispersion method, and optimal preparation conditions were determined through single-factor experiments and response surface methodology. The physicochemical properties of the liposomes were evaluated through particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency, and microscopic structural analysis. The stability and antibacterial activity of the liposomes were tested under different temperature, pH, and enzyme treatment conditions. Additionally, cell experiments assessed the cytotoxicity of W1 liposomes on human liver cells (LO2). The results indicated that a highly active fraction was obtained by Sephadex-G25 purification, further purified by HPLC to obtain the core antibacterial peak, and the antimicrobial peptide W1 sequence was identified as IGLFGGAGVGK by LC-MS/MS. The optimal preparation conditions were determined to be a mass ratio of soybean phosphatidylethanolamine (SPE) to β-sitosterol of 5.94∶1, a mass ratio of SPE to W1 of 5.18∶1, and an ultrasonication time of 6.75 minutes. Under these conditions, W1-loaded liposomes were obtained with a particle size of 105.88±6.35 nm and an encapsulation efficiency of 68.2%±1.5%. Good physicochemical stability was exhibited by the resulting liposomes. Antibacterial tests revealed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of W1 liposomes against *Staphylococcus aureus* was 32 mg/mL. Cytotoxicity assays demonstrated that W1 liposomes maintained LO2 cell viability above 90% at concentrations below 512 mg/mL (P>0.05), indicating favorable biocompatibility. These findings suggest that liposomal encapsulation significantly enhances the stability and antimicrobial efficacy of W1, providing a promising strategy for its application in the food and pharmaceutical industries.

Key words: *Bacillus subtilis* SNBS-3; antimicrobial peptide; liposome; preparation process optimization; encapsulation efficiency; stability; biotoxicity

抗菌肽是一类广泛存在于生物体内的天然活性分子，具有广谱抗菌、抗病毒和抗真菌等多种生物活性[1]。由于其独特的抗菌机制，抗菌肽不易引发微生物耐药性，因此在食品保鲜、医药和农业领域展现出巨大的应用潜力[2]。然而，抗菌肽在实际应用中面临稳定性差、易被蛋白酶降解以及在复杂环境中活性降低等问题，限制了其广泛应用[3]。近年来，研究人员通过化学修饰、纳米载体包埋等手段提高抗菌肽的稳定性和生物利用度[4]，其中脂质体作为一种生物相容性良好的纳米载体，成为抗菌肽递送系统的研究热点。

脂质体是由磷脂双分子层构成的纳米级囊泡，具有良好的生物相容性、可降解性和低毒性[5−6]。脂质体能够包埋亲水性和疏水性物质，广泛应用于药物传递、功能性食品和化妆品领域[7]。其作为一种有效的载体系统，被用于包埋抗菌肽以提高其稳定性和长效抑菌能力[8]。通过脂质体包埋，抗菌肽可以免受外界环境（如温度、pH 和酶降解）的影响，同时实现目标物质的精确释放[9−10]。例如 Li 等[11] 以白藜芦醇与蛋黄卵磷脂为原料，构建了载细菌素 CAMT6 纳米脂质体，包封率达 97.32%，在牛奶等复杂食品体系中保持抑制李斯特菌活性。

前期研究表明，枯草芽孢杆菌 SNBS-3 可产生多种抑菌物质[12]。本研究以该菌株为来源，提取并纯化抗菌肽 W1，采用硫酸铵盐析、Sephadex-G25 凝胶层析及高效液相色谱（high performance liquid chromatography，HPLC）获得高纯度 W1，并利用液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）技术鉴定其分子序列。为提高 W1 的稳定性和应用潜力，采用薄膜分散法制备 W1 负载脂质体，并通过单因素实验与响应面试验确定最佳制备工艺。通过粒径、Zeta 电位、包封率及微观结构分析评估脂质体的物理化学性质，同时考察其在不同温度、pH 及酶处理条件下的稳定性及对金黄色葡萄球菌的抑菌活性。细胞实验还评估了 W1 脂质体对人肝细胞 LO2 的生物毒性，为其在食品和医药领域的安全应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

大豆脑磷脂　浙江森瑞生物科技有限公司；大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、β-谷甾醇　上海生工有限公司；二氯甲烷　广东百傲化学试剂有限公司；枯草芽孢杆菌 SNBS-3、金黄色葡萄球菌 J1、单增李斯特

菌 DL-2、蜡样假单胞菌 DK-6、沙门氏菌 S2、铜绿假单胞菌 K2、青霉菌 Q1、灰霉菌 H3　辽宁省食品发酵技术工程研究中心菌库；麦克林葡聚糖凝胶 G25、LB 培养基　上海源叶生物科技有限公司；BCA 试剂盒　北京索莱宝科技有限公司；PDA 培养基　广东环凯生物科技有限公司；硫酸铵　国药集团化学试剂有限公司；木瓜蛋白酶　100 U/mg，天津市华盛化学试剂有限公司；蛋白酶 K　40 U/mg，伊势久生物有限公司；次氯酸钠　广东博锐化工有限公司；所有化学试剂均为分析纯。

DYY-6C 电泳仪　北京六一生物科技有限公司；UVP GDS-8000 凝胶成像系统　美国通用电气公司；RE-52CS 旋转蒸发仪　上海亚荣生化仪器厂；FJ200-SH 均质机　上海沪析实业有限公司；SN-QX-20 超声仪　上海尚善仪器设备有限公司；HL-2B 数显恒流泵　上海驰唐电子有限公司；Centrifuge 5804R 离心机　德国艾本德股份有限公司；Eon 酶标仪　美国 Biotek 公司；Dionex P680 半制备反相高效液相色谱仪　美国 Dionex 公司；ZS90 纳米粒度、Zeta 电位分析仪　北京瑟奇科技有限公司；LX-B50L 高压灭菌锅　合肥华泰医疗设备有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　抗菌肽 W1 的提取、纯化与鉴定

1.2.1.1　抗菌肽 W1 的提取　从辽宁省食品发酵技术工程研究中心菌库中获取枯草芽孢杆菌 SNBS-3，并接种于 LB 液体培养基中，在 37 ℃、160 r/min 条件下培养 24 h。根据郭丽丹等[13] 的方法，采用硫酸铵盐析法进行粗提取。具体步骤为：将硫酸铵粉末在冰水浴条件下缓慢加入发酵液中，调节至 80% 饱和度，4 ℃ 静置 2 h 后离心（10000 r/min，30 min），收集上清液。上清液用 10 mmol/L PBS 缓冲液（pH6.2）溶解，经过 3.5 kDa 透析袋进行过夜流动透析以去除盐分。

1.2.1.2　抗菌肽 W1 的纯化　使用葡聚糖凝胶 Sephadex-G25 进行初步纯化[14]。粗提物透析除盐后，制备为 20 mg/mL 溶液，并通过 0.22 μm 过滤器过滤。将凝胶柱填充至距柱顶 10 cm，使用缓冲液平衡后，以 0.5 mL/min 流速洗脱，每 10 min 收集一次样品，并在 280 nm 处检测吸光度。收集具有抗菌活性的组分，并进一步通过反向高效液相色谱纯化。使用 C_{18} 色谱柱，流动相 A 为乙腈，流动相 B 为水（含 1‰三氟乙酸），梯度洗脱条件见表 1。检测波长为 280 nm，进样量为 20 μL，流速为 1 mL/min，柱温为 25 ℃。

表 1　HPLC 梯度洗脱条件

Table 1　Gradient elution condition of HPLC

时间（min）	流动相A	流动相B
0	100	0
0.1	100	0
10	98	2
20	55	45
30	0	100

1.2.1.3　抗菌肽 W1 的鉴定　参照周健平等[15] 使用 LC-MS/MS 进行检测与分析，借助 Thermo Xcalibur 4.0 软件，根据样品的质量/电荷比（m/z）来确定目标化合物的分子量，进而通过对比分析初步识别出菌株产生的脂肽种类。使用 LC-MS/MS 分析菌株产生的脂肽种类。HPLC 采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（50 mm×2.1 mm，粒径 1.7 μm），色谱柱温度设定为 30 ℃，样品管理器温度为 10 ℃。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水，流动相 B 为纯甲醇。洗脱梯度如下：0~2 min，95%A；2~13 min，A 由 95% 降至 5%；13~16 min，A 维持在 5%；16~16.1 min，A 迅速回升至 95%；16.1~18 min，保持 95% A。流速为 0.3 mL/min，注入量为 2 μL。质谱检测采用热电喷雾电离源，喷雾电压为 3 kV，毛细管温度 320 ℃，喷雾气体压力 30 psi，辅助气压力 10 psi。质谱扫描范围为 200~2000 m/z，使用全扫描和动态数据依赖二级质谱模式，一级分辨率为 70000，二级分辨率为 17500，碰撞气体为氮气。

1.2.1.4　粗提物的蛋白浓度测定　采用 BCA 法测定，使用全自动酶标仪在 562 nm 处读取吸光度，利用 GraphPad Prism 8.0 软件建立标准曲线（R^2=0.9973）：y=0.0008x+0.0593，x 为抗菌肽 W1 质量浓度，μg/mL；y 为样品 562 nm 处的吸光值。

1.2.2　抗菌活性测定方法　抗菌活性通过琼脂打孔法评估[16]。将金黄色葡萄球菌 J1、单增李斯特菌 DL-2、蜡样假单胞菌 DK-6、沙门氏菌 S2、铜绿假单胞菌 K2 菌悬液（10^5 CFU/mL）分别接种于 LB 固体培养基上，将青霉菌 Q1、灰霉菌 H3 菌悬液（10^5 CFU/mL）分别接种于 PDA 固体培养基上，打孔后加入 100 μL 待测样品（W1 粗提物、纯化 W1 溶液、W1 脂质体悬液或相应空白对照），37 ℃ 孵育 24 h，测量抑菌圈直径。

1.2.3　脂质体的制备　将蛋黄卵磷脂（egg yolk phosphatidylcholine，EPC）、大豆卵磷脂（soybean phosphatidylcholine，SPC）和大豆脑磷脂（soybean phosphatidyl ethanolamine，SPE）三者分别与 β-谷甾醇按一定比例称量，置于 50 mL 棕色锥形瓶中，加入 20 mL 二氯甲烷，超声至完全溶解。在冰水浴条件下，以 10000 r/min 的转速均质，缓慢加入 5 mL 超纯水或一定浓度的 W1 溶液，继续均质 5 min。将混合液转移至棕色圆底烧瓶中，通过旋转蒸发（30 ℃，0.1 MPa）去除二氯甲烷，直至瓶底形成高黏性凝胶。向烧瓶中加入 25 mL 超纯水，水浴超声至凝胶完全分散，随后水化 20 min。使用探针超声仪（37 kHz，2 s 开/3 s 关）进一步处理，最后通过 0.22 μm 水系膜过滤 10 次，得到纳米脂质体[17]。

1.2.4　空脂质体的表征方法

1.2.4.1　空脂质体粒径、Zeta 电位、PDI 值测定　使用 Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度分析仪测定脂质

体的粒径、Zeta 电位和多分散指数（polydispersity index, PDI）。测量条件为：温度 25 ℃，水作为分散介质，散射角 90°，平衡时间 120 s。测量前，将脂质体样品用超纯水稀释 10 倍，并在测量前静置 120 s 以确保平衡[18]。

1.2.4.2　原子力显微镜观察　将脂质体样品用超纯水按 1:1000 稀释，滴加至新剥离的云母片上，室温静置 30 min 至完全干燥。采用轻敲模式进行微观形貌表征，扫描频率为 1 Hz，图像分辨率为 512×512[19]。

1.2.4.3　衰减全反射-傅立叶变换红外光谱测定　将 5 mg 脂质体冻干样品置于晶体表面，以空气为背景，在常温下进行光谱测量。光谱采集范围为 500~4000 cm^{-1}，扫描次数为 32 次。

1.2.4.4　拉曼光谱测定　将 30 μL 脂质体样品滴加至载有铝箔片的载玻片上，使用 50 倍物镜聚焦激光进行观察。采用配备 He-Ne 激光器的拉曼光谱仪，激发波长为 633 nm，扫描范围为 600~3000 cm^{-1}。记录 718、1440、2850 和 2890 cm^{-1} 处的光谱线强度，通过 I718/I1440 和 I2890/I2850 比值分别表征脂质体极性头部的胆碱基团构型及脂质链的横向堆积序列[20]。

1.2.5　负载 W1 的 SPE 脂质体制备工艺优化

1.2.5.1　脂质体包封率的测定　采用高速离心机，以 4 ℃、10000 r/min 的条件离心 15 min，分离脂质体与未包埋的 W1。利用改良 BCA 法（参照 1.2.1.4 节）测定上清液中未包埋 W1 的含量，并根据标准曲线计算其浓度，从而得出 SPE 脂质体的包封率。

$$包封率(\%) = \frac{M_{总肽} - M_{未包埋肽}}{M_{总肽}} \times 100$$

式中：$M_{总肽}$为 W1 的总量；$M_{未包埋肽}$为上清液中未包埋 W1 的含量。

1.2.5.2　单因素实验设计　按照 1.2.3 节方法，分别设置 SPE 与 β-谷甾醇的质量比为 3:1、4:1、5:1、6:1 和 7:1，SPE 与 W1 的质量比为 3:1、4:1、5:1、6:1 和 7:1，探针超声时间为 3、5、7、9 和 11 min。考察其中一个因素时，其余两个因素均固定在中间水平：SPE:β-谷甾醇质量比固定为 5:1；SPE:W1 质量比固定为 5:1；探针超声时间固定为 7 min。均质过程中加入 5 mL W1 溶液，40 ℃ 水化 20 min。随后，按照 1.2.4.1 节方法测定脂质体的粒径、Zeta 电位和 PDI 值。

1.2.5.3　响应面优化试验　本试验采用三因素三水平的响应面试验进行选择见表 2，通过响应面优化试验来确定脂质体制备的最佳配方。

表 2　响应面试验优化设计

Table 2　Experimental design of response surface optimization

水平	A SPE:β-谷甾醇	B SPE:W1	C 超声时间(min)
1	5:1	4:1	5
2	6:1	5:1	7
3	7:1	6:1	9

1.2.6　W1 脂质体透射电镜观察　将 10 μL W1 脂质体样品滴加至 200 目碳覆铜网上，静置 5 min 使其自然铺展。吸除多余样品后，用 2%(w/v)磷钨酸负染色 5 min。去除过量染色液，室温风干后，使用透射电镜观察脂质体的微观结构[21]。

1.2.7　W1 脂质体的抑菌活性测定　根据李建勋等[22] 的方法，略作调整，采用改良肉汤稀释法测定金黄色葡萄球菌 J1 对 W1 及 W1 脂质体的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值。将金黄色葡萄球菌 J1 培养至对数生长期后，稀释至适宜浓度，加入 W1 或 W1 脂质体溶液，使用 96 孔板进行测试。每孔加入 100 μL LB 培养基，第 1 孔加入 W1 或 W1 脂质体溶液 100 μL，按梯度稀释法依次转移 100 μL 至后续孔，第 9 孔后弃去 100 μL，最终得到溶液浓度梯度为 1024、512、256、128、64、32、16、8 mg/mL。第 10 孔为阳性对照，第 11 孔为阴性对照。每个浓度组设置 3 个平行孔，37 ℃ 孵育 18 h。测量各孔在 600 nm 处的吸光度（Optical Density, OD），若测试孔与空白对照孔的 OD_{600} 无显著差异，则认为该浓度下无菌生长，确定此时 W1 或 W1 脂质体的 MIC 值。抑菌谱测定方法同 1.2.2，采用 W1 脂质体替代 W1 进行测试。

1.2.8　W1 脂质体的稳定性测定　耐热稳定性：将 W1 和 W1 脂质体分别置于 20、40、60 和 80 ℃ 水浴中，静置 1 h。然后按照 1.2.2 方法测定不同温度处理后，W1 和 W1 脂质体对金黄色葡萄球菌 J1 的抑菌圈直径变化。

耐酸碱稳定性：将 W1 和 W1 脂质体溶解于 pH 为 1、3、7、9 和 11 的磷酸盐缓冲液中，室温静置 1 h。随后根据 1.2.2 方法，测定不同 pH 条件下 W1 和 W1 脂质体对金黄色葡萄球菌 J1 的抑菌圈直径变化，评估酸碱稳定性。

耐木瓜蛋白酶稳定性：将木瓜蛋白酶与 W1 及 W1 脂质体在 37 ℃ 孵育 1 h，随后在 65 ℃ 水浴中灭活 30 min。使用无菌 PBS 缓冲液制备不同浓度的木瓜蛋白酶溶液，混合后孵育，最后根据 1.2.2 方法测定 W1 和 W1 脂质体对金黄色葡萄球菌 J1 的抑菌圈直径变化，以评估 W1 脂质体的水解稳定性[23]。

耐蛋白酶 K 稳定性：按与耐木瓜蛋白酶稳定性相同的方法进行蛋白酶 K 稳定性测试。

贮藏稳定性：将制备好的 W1 脂质体分装至 2 mL 棕色避光玻璃瓶中密封，置于 4 ℃ 冰箱避光贮藏。分别在贮藏的第 0（制备当天）、7、14、21 和 28 d 取样进行粒径、电位、PDI 值及包封率的变化。

1.2.9　W1 脂质体生物毒性测定　LO2 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液的 DMEM 培养基中，37 ℃、5% CO_2、95% 湿度条件下培养至对数生长期。细胞用 PBS 润洗

后，使用 1 mL 0.25% 胰酶溶液消化，计数后以 2×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板。待细胞贴壁后，弃去培养液，加入不同浓度（8、16、32、64、128、256、512、1024、2048 mg/mL）的纳米脂质体培养基，继续培养 24 h。接着，每孔加入 20 μL（5 mg/mL）MTT 溶液，继续培养 4 h。吸弃 MTT 溶液后，每孔加入 150 μL DMSO，震荡 5 min，使用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度。每个处理组设五个平行孔，未处理的细胞为空白对照组[24]。

1.3 数据处理

所有试验和测量均重复三次，数据以平均值±标准偏差（Mean±SD）表示。数据整理使用 Excel 2019 完成，统计分析采用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析（ANOVA）及 Duncan 多重比较，显著性水平设定为 $P<0.05$。差异具有统计学意义时，在图中以相应符号标注。图表绘制采用 GraphPad Prism 9.5 和 Origin 2022 软件完成。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽 W1 的提取、纯化与鉴定结果

2.1.1 粗提样品抑菌效果与蛋白质含量 采用硫酸铵沉淀法对枯草芽孢杆菌 SNBS-3 进行提取，粗提物表现出明显的抑制金黄色葡萄球菌 J1 效果，抑菌圈直径为 16.22±2.34 mm。而硫酸铵对照组未表现出抑菌活性，表明枯草芽孢杆菌 SNBS-3 能够产生具有抗菌活性的成分，这与纪帅奇等[12] 的研究结果一致。根据 BCA 法测定，粗提取物中的蛋白质浓度为 0.22 mg/mL，表明硫酸铵沉淀法能够有效提取出具有抗菌活性的蛋白质成分。

2.1.2 提取物纯化与活性分析 通过 Sephadex-G25 凝胶过滤层析，粗提物被分离为三个主要洗脱峰（Sephadex 1，Sephadex 2，Sephadex 3），结果见图 1。其中，第二个洗脱峰（Sephadex 2）显示出较高的峰值。琼脂打孔法测定各洗脱峰对金黄色葡萄球菌 J1 的抑菌活性显示（表 3），Sephadex 2 峰的抑菌圈直径显著大于 Sephadex 1 峰和 Sephadex 3 峰（$P<0.05$），表明 Sephadex 2 组分含有主要的抗菌活性物质。进一步通过 HPLC 分离 Sephadex 2 峰，得到三个主要峰（HPLC 1，HPLC 2，HPLC 3），结果见图 2，其中第三个峰 HPLC 3（洗脱时间约为 7.935 min）显示出最高的峰值。抗菌活性测试（表 3）证实 HPLC 3 峰具有最强的抑菌活性（抑菌圈直径：17.35±0.19 mm），显著高于 HPLC 1 和 HPLC 2 峰（$P<0.05$），表明该组分具有潜在的抗菌肽活性。

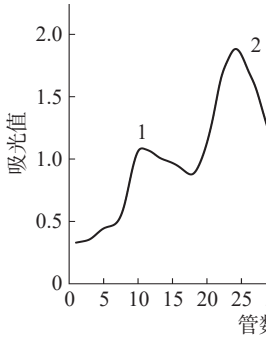


图 1 葡聚糖凝胶 Sephadex-G25 层析结果

Fig.1 Results of Sephadex-G25 gel chromatography

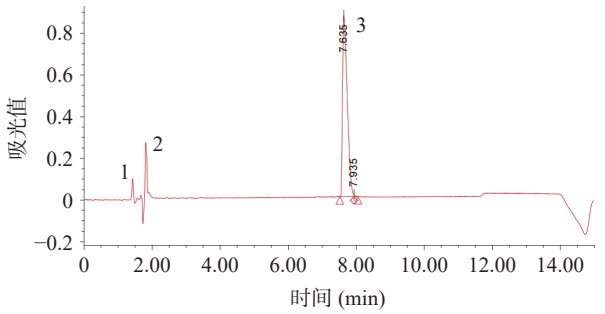


图 2 高效液相色谱结果

Fig.2 High performance liquid chromatography results

2.1.3 抗菌肽 W1 的鉴定 通过 LC-MS/MS 技术分析，鉴定出一个多肽序列 IGLFGGAGVGK。该序列的质谱评分（Score 值 293.67）、序列覆盖率（5.3%）和分子量（0.975 kDa）均支持其可信度。质谱图（图 3）进一步验证了该序列的正确性，并通过 Antimicrobial Peptide Scanner 分析确认其具有抗菌活性。

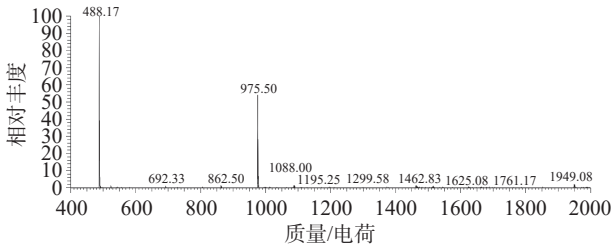


图 3 抗菌肽 W1 质谱图

Fig.3 Mass spectrum of antimicrobial peptide W1

2.1.4 W1 的抑菌谱分析 W1 对革兰氏阳性菌（如金黄色葡萄球菌 J1 和单增李斯特菌 DL-2）表现出较强的抑制效果，抑菌圈直径分别为 17.30±0.21 mm 和 16.56±0.10 mm，实验结果如表 4。对革兰氏阴性菌的抑制效果较弱，而对真菌（如青霉菌 Q1 和灰霉菌 H3）则显示出一定的抑制效果。

表 3 Sephadex-G25 洗脱峰及 HPLC 分离组分的抗菌活性（mm）

Table 3 Elution peak of Sephadex-G25 and antibacterial activity of separated components by HPLC (mm)

Sephadex 1	Sephadex 2	Sephadex 3	HPLC 1	HPLC 2	HPLC 3
13.32±0.25^{b}	15.25±0.21^{a}	12.63±0.49^{c}	14.82±0.03^{C}	15.24±0.11^{B}	17.35±0.19^{A}

注：不同大写、小写字母表示组间数据差异显著（$P<0.05$）。

表 4　W1 抑菌谱测定结果(mm)

Table 4　Results of W1 bacteriostatic assay (mm)

金黄色葡萄球菌J1	单增李斯特菌DL-2	蜡样假单胞菌DK-6	沙门氏菌S2	铜绿假单胞菌K2	青霉菌Q1	灰霉菌H3
17.30±0.21^{a}	16.56±0.10^{b}	11.65±0.05^{c}	4.57±0.68^{g}	3.40±0.05^{f}	7.73±0.20^{e}	8.60±0.36^{d}

注：不同小写字母表示组间数据差异显著(P<0.05)。

2.2　负载 W1 脂质体壁材的筛选结果

2.2.1　空脂质体粒径、Zeta 电位、PDI 值测定　表 5 展示了使用不同磷脂(EPC、SPC 和 SPE)制备的脂质体的粒径、PDI 和 Zeta 电位。结果表明，SPC、EPC 和 SPE 脂质体的平均粒径分别为 135.2±12.5 nm、157.4±10.1 nm 和 109±15.2 nm。其中，SPE 脂质体的粒径最小，表明其具有较低的聚集倾向和更好的稳定性[25]。PDI 值用于评估脂质体的粒径分布均匀性，EPC 脂质体的 PDI 值为 0.326，略高于 SPC 和 SPE 脂质体，表明其粒径分布均匀性稍差。Zeta 电位是衡量脂质体稳定性的关键指标，绝对值大于 30 mV 表明系统稳定性较高[26]。实验结果显示，三种磷脂制备的脂质体 Zeta 电位绝对值均大于 30 mV，表明其具有强静电排斥力，能够有效减少颗粒聚集。

表 5　脂质体的平均粒径、PDI 值及 Zeta 电位

Table 5　Average vesicle size, PDI and Zeta potential of liposomes

不同壁材的脂质体	平均粒径(nm)	PDI	Zeta电位(mV)
SPC	135.2±12.5^{b}	0.263±0.1^{b}	−56.3±3.1^{b}
EPC	157.4±10.1^{a}	0.326±0.1^{a}	−49.2±2.5^{a}
SPE	109±15.2^{c}	0.256±0.1^{b}	−60.3±2.7^{c}

注：同列不同小写字母表示组间数据差异显著(P<0.05)。

2.2.2　原子力显微镜观察　图 4 展示了由不同磷脂(SPC、EPC、SPE)制备的空脂质体的表面形貌。通过原子力显微镜(AFM)图像可观察到，SPC 与 EPC 脂质体普遍存在粒径较大的聚集体，且颗粒轮廓较为模糊，尤其是 EPC 脂质体，其粒子间黏连现象更为显著。这种结构模糊性表明其脂质体间可能存在较强的吸附或融合行为。相应地，在 2.2.1 节中 EPC 脂质体的平均粒径为 157.4±10.1 nm，PDI 值为 0.326±0.1，明显高于 SPE 脂质体，说明其粒径分布较宽、聚集倾向更强。相较之下，SPE 脂质体在形貌上表现出较高的规则性和分散性，AFM 图像显示其脂质体粒子形貌清晰，大多数呈规则球形，粒径分布集中，几乎未观察到明显的聚集现象，这与前人研究成功制备的脂质体表征相似[27−29]，并且与 2.2.1 节所测得 SPE 的最低平均粒径(109±15.2 nm)、最低 PDI 值(0.256±0.1)及较高 Zeta 电位绝对值(−60.3±2.7 mV)高度一致，表明 SPE 脂质体具有良好的结构稳定性和分散性。

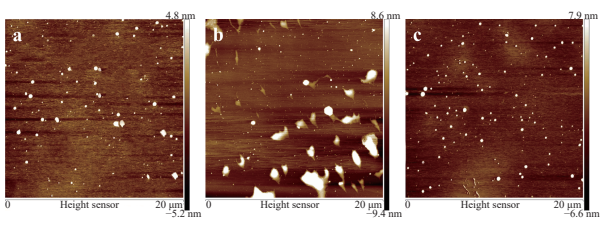


图 4　SPC(a)、EPC(b)及 SPE(c)脂质体原子力显微镜成像

Fig.4　Atomic force microscope imaging of SPC (a), EPC (b), and SPE (c) liposomes

2.2.3　衰减全反射-傅里叶变换红外光谱测定　衰减全反射-傅里叶变换红外光谱(attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR)技术可通过分析分子键的振动模式，表征脂质体的化学组成、分子构象及相互作用机制。由图 5 可知，SPC 和 EPC 在形成脂质体过程中，CH_2 和 PO^{2-}的对称及不对称伸缩振动峰未发生显著变化，表明脂质分子间相互作用力较弱。然而，SPE 脂质体中 CH_2 的对称伸缩振动峰从 2856 cm^{-1} 移至 2847 cm^{-1}，不对称伸缩振动峰从 2923 cm^{-1} 移至 2915 cm^{-1}，这可能是由于 SPE 中高饱和脂肪酸含量增强了分子间作用力，限制了 CH_2 的振动。此外，SPE 脂质体中 $N(CH_3)^{3+}$和 C=O 的特征吸收峰分别从 966 cm^{-1} 和 1730 cm^{-1} 偏移至 969 cm^{-1} 和 1736 cm^{-1}，表明胆碱基团和羰基构象发生了部分变化。同时，PO^{2-}的对称和非对称伸缩振动峰分别从 1095 cm^{-1} 和 1255 cm^{-1} 移至 1090 cm^{-1} 和 1236 cm^{-1}，表明 PO^{2-}基团与 β-谷甾醇的羟基之间形成了氢键。这些结果表明，SPE 脂质体中脂质分子间存在较强的疏水相互作用、范德华力和氢键作用，验证了脑磷脂脂质体的成功制备。

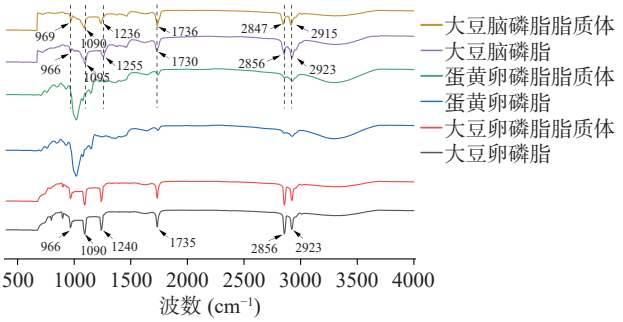


图 5　脂质体及不同磷脂的 ATR-FTIR 吸收光谱

Fig.5　ATR-FTIR spectra of the phospholipids and liposomes

2.2.4　拉曼光谱测定　通过拉曼光谱分析，研究了脂质体在不同波段的构象变化及其分子排列有序性。由图 6 可知，在 600 至 800 cm^{-1} 和 1300 至 1600 cm^{-1} 波段，脂质体的拉曼光谱显示，头部胆碱基团的 C-N 对称伸缩振动在 718 cm^{-1} 处呈现扭曲构象，而外源性分子干扰可使其振动频率移至 770 cm^{-1} 并转变为反式构象。1440 cm^{-1} 处的峰主要源于

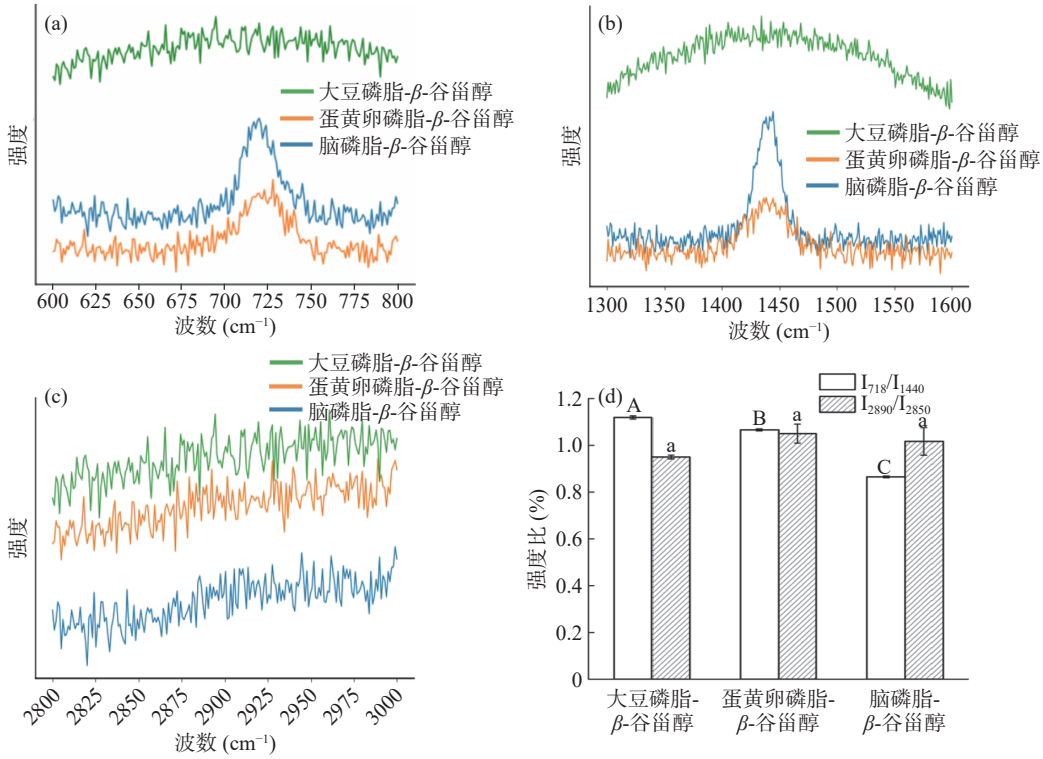


图 6 拉曼光谱分析

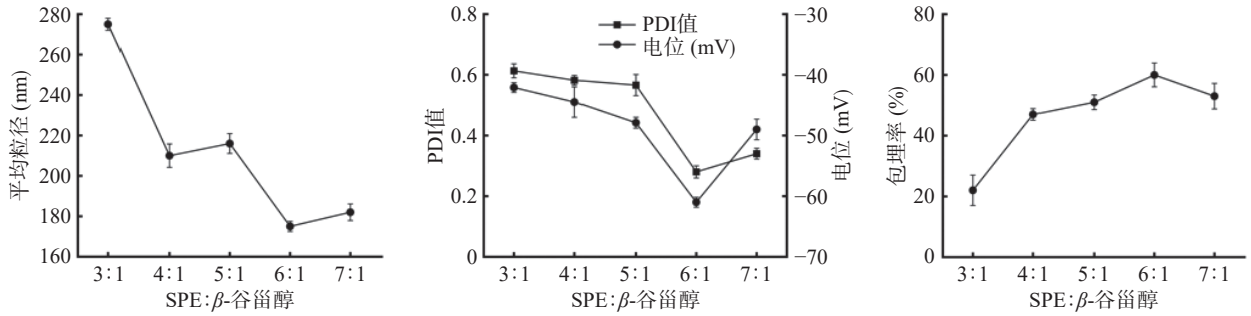
Fig.6 Raman spectrum analysis

注: 不同大写、小写字母表示组间数据差异显著(P<0.05)。

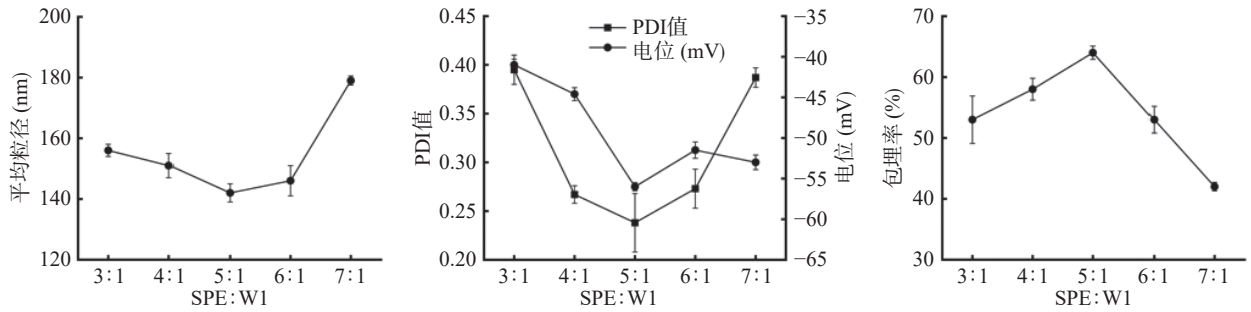
CH_2 的变角振动, 对头部极性构象变化的敏感性较低。通过 I_{718}/I_{1440} 比值可监测胆碱基团构象的变化[20], 而 I_{2890}/I_{2850} 比值(分别对应 CH_2 的对称和反对称伸缩振动)则用于评估脂质分子横向排列的有序性[30]。结果表明, 含 β-谷甾醇的 SPC、EPC 和 SPE 脂质体的 I_{2890}/I_{2850} 比值相近, 表明 β-谷甾醇显著增强了不同脂质体分子间的稳定性和紧密程度, 这与 Song 等[31] 发现甾醇提高了膜的刚性并降低了膜的变形性一致。相比之下, SPE-β-谷甾醇的 I_{718}/I_{1440} 比值较低, 表明其头部区域构象变化更为显著, 可能形成了更有序、更紧密的结构, 从而增强了脂质相互作用和膜稳定性, 揭示了 SPE-β-谷甾醇在药物传递和脂质体基础研究中的潜在优势。

2.3 负载 W1 的 SPE 脂质体制备工艺优化结果与分析

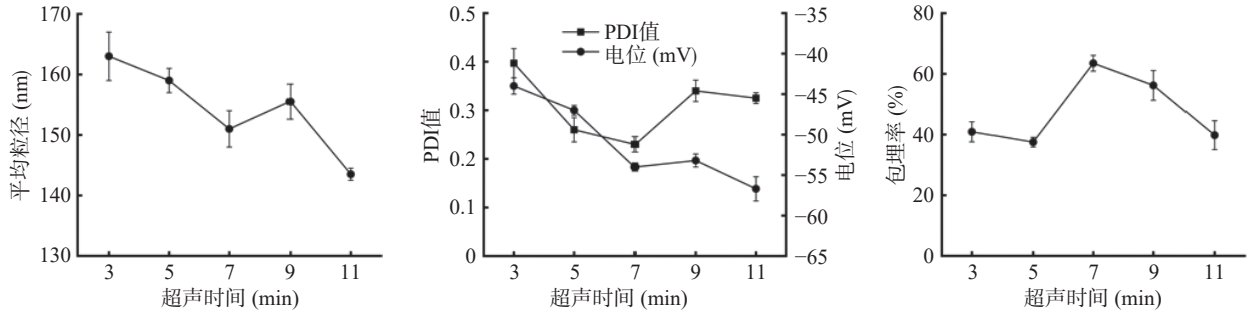
实验研究了 SPE 与 β-谷甾醇比例、SPE 与 W1 质量比以及超声时间对脂质体性能的影响。图 7 结



(a) SPE与β-谷甾醇质量比不同时脂质体的粒径、PDI值、Zeta电位、包埋率



(b) SPE与W1质量比不同时脂质体的粒径、PDI值、Zeta电位、包埋率



(c) 超声时间不同时脂质体的粒径、PDI值、Zeta电位、包埋率

图 7　不同因素对脂质体粒径、PDI 值、Zeta 电位、包埋率的影响

Fig.7　Effects of different factors on particle size, PDI, Zeta potential and entrapment efficiency of liposomes

果表明，当 SPE 与 β-谷甾醇比例为 6∶1 时，脂质体粒径最小且 PDI 值低于 0.3，包封率达到最高，表明该条件下脂质体分散性和稳定性最佳，这可能是由于 β-谷甾醇含量对膜流动性的调节作用[32]。此外，SPE与 W1质量比的优化实验显示，当比例为 5∶1 时，包埋率最高，粒径较小且 PDI 值低于 0.3，电位绝对值大于 30 mV，表明体系具有较好的均一性和稳定性[25−26]；而过高或过低的 SPE 与 W1 比例会导致体系不稳定和包埋率下降。超声时间的影响研究表明，随着超声时间增加，脂质体粒径逐渐减小，但超过 7 min 后，PDI 值增大且包埋率下降，表明过长的超声时间可能导致脂质体膜氧化破裂，从而影响分散性和包埋效率。

2.4　响应面优化结果

前期试验表明，SPE 与 β-谷甾醇质量之比、SPE 与 W1 质量之比和超声时间这三个因素对脂质体包埋率有明显影响，因此在试验的基础上，分别对 SPE∶β-谷甾醇（A）、SPE∶W1（B）与超声时间（C）三个因素选取三个水平，以包封率作为指标，进行 Box-Benhnken 响应面设计优化试验，以包封率为响应值的二次回归方程为：

$$Y=68.23-1.03\times A+1.47\times B-0.71\times C-0.15\times AB-1.81\times AC-2.45\times BC-7.22\times A^2-5.08\times B^2-4.21\times C^2$$

试验结果如表 6 所示。

如表 7 所示，方差分析表明，所采用的模型在极显著水平上有效（$P<0.01$），而失拟项的 P 值为 0.2533（>0.05），表明差异不显著，从而验证了模型与实际观测值之间拥有良好的拟合度，确保了试验设计的结果的可靠性。模型的相关系数 R^2 为 0.9905，显示出极强的相关性；而修正的决定系数 R^2_{Adj} 为 0.9782，意味着有 97.8% 的数据变异可以通过该回归模型来解释；CV 值等于 1.39%，表示试验的可信度和精确度良好。SPE∶β-谷甾醇、SPE∶W1 与超声时间，这三个因素中两两相互作用对包封率大小的影响结果如图 8 所示，SPE∶β-谷甾醇和超声时间、SPE∶W1 和超声时间交互作用对响应值的影响明显。

根据上述分析及 Box-Behnken 软件预测，获得负载 W1 的纳米脂质体最佳制备工艺的条件为：SPE 与 β-谷甾醇质量比为 5.94∶1、SPE 与 W1 质量比为 5.18∶1 和超声时间为 6.75 min。在此条件下进行的三组重复性试验结果显示，此时预测的最大包

表 6　Box-Behnken 试验设计及其结果

Table 6　Design and results of Box-Behnken experiments

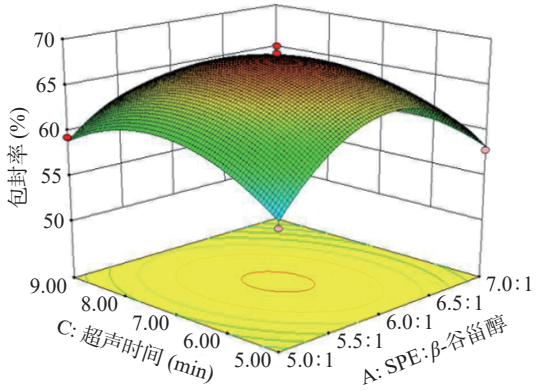
实验号	A: SPE∶β-谷甾醇	B: SPE∶W1	C: 超声时间(min)	包封率(%)
1	7∶1	4∶1	7	53.39
2	5∶1	5∶1	9	59.35
3	5∶1	4∶1	7	55.48
4	6∶1	4∶1	9	58.67
5	7∶1	5∶1	5	57.87
6	6∶1	6∶1	5	64.11
7	6∶1	5∶1	7	68.45
8	6∶1	4∶1	5	56.36
9	6∶1	6∶1	9	56.63
10	7∶1	5∶1	9	54.01
11	7∶1	6∶1	7	56.09
12	6∶1	5∶1	7	68.34
13	5∶1	5∶1	5	55.98
14	6∶1	5∶1	7	69.23
15	6∶1	5∶1	7	67.69
16	5∶1	6∶1	7	58.79
17	6∶1	5∶1	7	67.45

表 7　回归模型方差分析

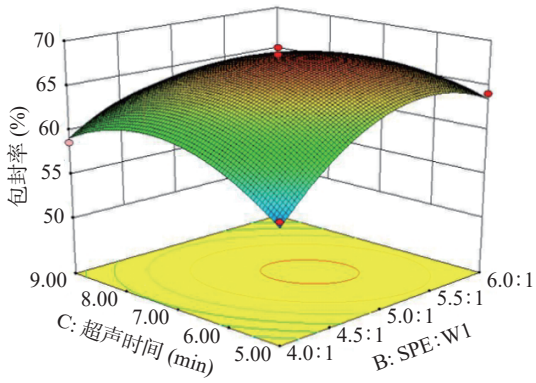
Table 7　Variance analysis of regression model

因素	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	513.34	9	57.04	80.92	<0.0001	++
A: SPE∶β-谷甾醇	8.49	1	8.49	12.04	0.0104	+
B: SPE∶W1	17.17	1	17.17	24.36	0.0017	++
C: 超声时间	4.00	1	4.00	5.68	0.0486	+
AB	0.09	1	0.09	0.13	0.7271	
AC	13.07	1	13.07	18.54	0.0035	++
BC	23.96	1	23.96	33.99	0.0006	++
A^2	219.32	1	219.32	311.16	<0.0001	++
B^2	108.54	1	108.54	153.99	<0.0001	++
C^2	74.70	1	74.70	105.99	<0.0001	++
残差	4.93	7	0.70			
失拟	2.97	3	0.99	2.02	0.2533	
纯误差	1.96	4	0.49			
合计	518.27	16				

注：$P<0.01$，为极显著，用“++”表示；$P<0.05$，为显著，用“+”表示；$P>0.05$，为不显著。



(a) SPE与β-谷甾醇之比与超声时间的交互作用



(b) SPE与W1之比和超声时间交互作用

图 8 响应面优化结果

Fig.8 Response surface optimization results

封率为 68.433%，后在此最佳的配比模型下进行 3 次验证性试验，结果得到包封率为 68.4%±1.5%，与先前的理论预测结果较为相近，说明模型的拟合程度较好，回归方程对脂质体最佳制备工艺的分析和预测有效。在此条件下，制备的脂质体平均粒径为 105.88±6.35 nm，包封率达 68.2%±1.5%，电位值为 −54.1±4.3 mV。

2.5 W1 脂质体透射电镜结果

采用透射电子显微镜对通过响应面优化方法制备的 W1 脂质体进行表征，结果如图 9 所示。可以观察到，W1 脂质体呈球形结构，表面光滑，具有明显的双层磷脂膜包裹，这是脂质体的典型结构特征[33]。此外，粒子之间尺寸均一，未见明显聚集现象，表明该制备方法具有良好的重复性与分散性。双层膜结构完整的脂质体在体内具有更好的稳定性，可延缓药物释放、提高递送效率[34]。在本研究中，W1 脂质体表现出良好的膜结构清晰度，暗示其具备较强的结构稳定性，这与 2.2 节中空脑磷脂脂质体 Zeta 电位和粒径分布结果相一致。已有研究指出，粒径小且分布均

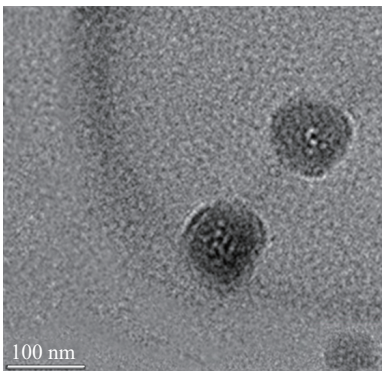


图 9 透射电子显微镜下的脂质体

Fig.9 Liposomes under transmission electron microscope

一的脂质体在体内的分布行为更具可控性，更易穿透生物屏障并实现靶向递送[35−36]。W1 脂质体的形貌特征表明其具有潜在的应用优势，尤其在需要高封装效率和稳定性的药物递送系统中具有较高价值。

2.6 W1 脂质体的抑菌活性测定结果

本试验通过测定 MIC 来评价 W1 对金黄色葡萄球菌 J1 的抑制效果。试验得到的 MIC 值如表 8 所示，W1 和 W1 脂质体对金黄色葡萄球菌 J1 的 MIC 都为 32 mg/mL。W1 在包封前后的 MIC 值相同，表明其抗菌活性并未受到影响，这与 Changsan 等[37] 的研究结果一致。

表 8 W1 和 W1 脂质体对金黄色葡萄球菌的 MIC 值

Table 8 MIC values of W1 and W1 liposomes against *Staphylococcus aureus*

指示菌	MIC(mg/mL)	
	W1	W1脂质体
金黄色葡萄球菌J1	32	32

由表 9 可知，W1 脂质体对革兰氏阳性菌有较强的抑制效果，对金黄色葡萄球菌 J1、单增李斯特菌 DL-2 表现出良好的抑制效果。而对革兰氏阴性菌的抑制效果较弱，例如沙门氏菌 S2 和铜绿假单胞菌 K2 几乎无抑制效果。真菌方面，对曲青霉菌 Q1 和灰霉菌 H3 则显示出一定的抑制效果。这与 2.1.4 中 W1 的抑菌谱结果相似。

2.7 W1 脂质体的稳定性测定结果

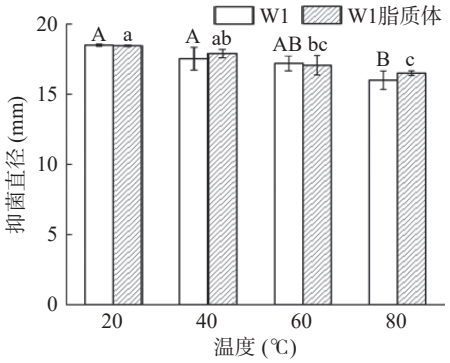
图 10 实验结果表明，W1 和 W1 脂质体的抑菌活性在不同温度、pH 和酶处理条件下表现出显著差异（P<0.05）。温度处理方面，随着温度升高，两者的抑菌活性均有所下降，这可能是由于高温导致 W1 活性成分的结构变性或降解。然而，W1 脂质体在 60 和 80 ℃ 时仍能维持较高的抑菌活性，说明脂

表 9 W1 脂质体抑菌谱测定(mm)

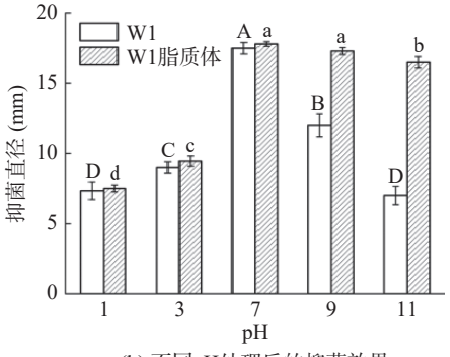
Table 9 Determination of bacteriostatic profile of W1 liposomes (mm)

金黄色葡萄球菌J1	单增李斯特菌DL-2	蜡样假单胞菌DK-6	沙门氏菌S2	铜绿假单胞菌K2	青霉菌Q1	灰霉菌H3
17.21±0.24^{a}	16.33±0.23^{b}	11.76±0.42^{c}	4.06±0.72^{g}	3.98±0.24^{f}	7.01±0.32^{e}	8.16±0.33^{d}

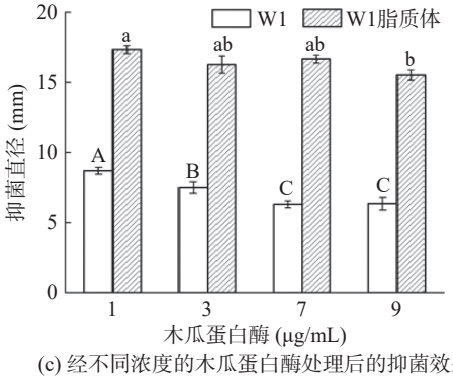
注：不同小写字母表示组间数据差异显著（P<0.05）。



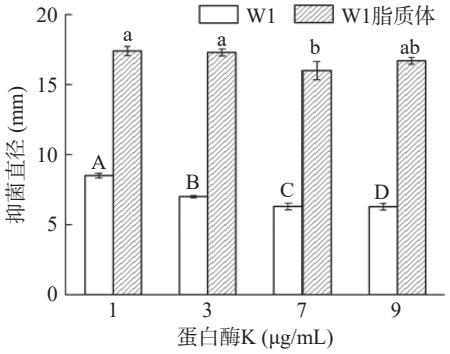
(a) 不同温度处理后的抑菌效果



(b) 不同pH处理后的抑菌效果



(c) 经不同浓度的木瓜蛋白酶处理后的抑菌效果



(d) 经不同浓度的蛋白酶K处理后的抑菌效果

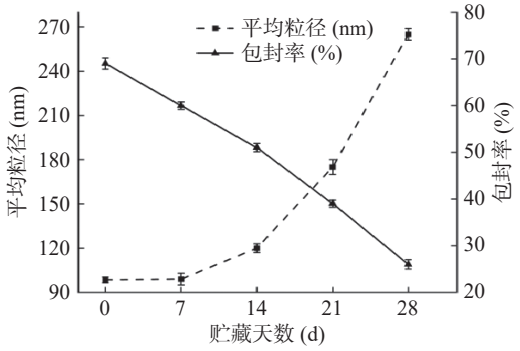
图 10　W1 和 W1 脂质体不同条件处理后的抑菌效果

Fig.10　Antibacterial effects of W1 and W1 liposomes treated under different conditions

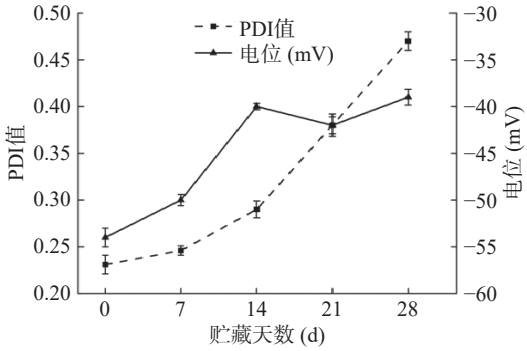
注：不同大写、小写字母表示组间数据差异显著（P<0.05）。

质体包埋能减缓温度对其活性的破坏。这种保护效应可能来源于磷脂双层对活性成分的热屏障作用，抑制其与外界高温环境的直接接触。pH 处理方面，W1 脂质体在 pH1 和 pH11 等极端条件下的抑菌效果仍优于未包埋的 W1。这一现象可能与脂质体包裹结构对酸碱条件的缓冲作用有关，能有效延缓内容物暴露于极端 pH 环境，从而保持其生物活性。此外，在木瓜蛋白酶和蛋白酶 K 处理下，W1 的活性显著下降，而 W1 脂质体则维持较高水平的抑菌效果。说明脂质体不仅对物理条件具有保护作用，在酶降解方面也具有一定的屏障效果。这些结果表明，脂质体通过其独特的包裹结构，显著提升了 W1 在多种胁迫环境下的稳定性和抑菌能力。相比于游离态的 W1，其更适合作为食品添加剂应用于复杂加工与储藏条件下，如高温杀菌、pH 波动和酶活性存在的肉制品加工过程中。

由图 11(a)可知，存储初期 W1 脂质体的粒径保持较稳定状态，14 d 贮存期间粒径变化不明显。然而，随着时间延长至 28 d，包封率逐渐下降且脂质体粒径有所增大，这可能因为贮存期间脂质体内部结构逐渐聚集，部分脂质体形态发生破裂，进而影响包埋效果。由图 11(b)可知，随着贮藏时间的增加，W1 脂质体的 PDI 值逐渐增大，而 Zeta电位的绝对值逐渐减小。PDI 值的增大表明脂质体的粒径分布逐渐变宽，即粒径的均匀性有所下降，这与粒径变化的结果相一致，进一步证实了脂质体在长期贮藏过程中出现了一定程度的聚集现象。Zeta 电位绝对值的减小则表明脂质体表面的电荷密度降低，静电排斥力减弱，这可能是导致脂质体聚集倾向增加的原因之一。



(a) W1脂质体4 ℃下贮藏28 d内的粒径及包埋率的变化



(b) W1脂质体4 ℃下贮藏28 d内的PDI值及电位的变化

图 11　W1 脂质体在 4 ℃ 下贮藏 28 d 内的变化

Fig.11　Changes of W1 liposomes stored at 4 ℃ for 28 days

2.8　W1 脂质体生物毒性测定

研究表明，环境中的不可降解纳米颗粒可能通过食物链积累并在人体内富集，对人类健康构成潜在

风险[38]。为探究脂质体包埋抗菌肽 W1 对正常人类肝细胞 LO2 的生物毒性，本研究评估了不同浓度 W1 脂质体对细胞活性的影响。图 12 结果表明，当 W1 脂质体浓度低于 512 mg/mL 时，细胞存活率与对照组无显著差异（P>0.05），均保持在 90% 以上，表明该浓度范围内具有较高的生物安全性；然而，当浓度增至 2048 mg/mL 时，细胞存活率显著（P<0.05）下降至 30% 以下，超出安全阈值。因此，初步研究表明，W1脂质体在食品应用中的安全浓度应控制在 512 mg/mL 以下。

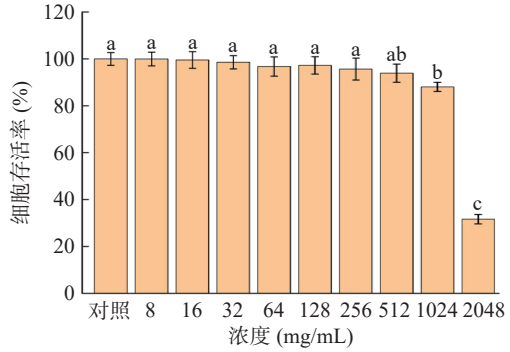


图 12 W1 脂质体毒理学结果

Fig.12 Toxicological results of W1 liposomes

注：不同小写字母表示组间数据差异显著（P<0.05）。

3 结论

本研究从枯草芽孢杆菌 SNBS-3 中提取并鉴定出抗菌肽 W1，经硫酸铵沉淀、Sephadex G-25 纯化和 LC-MS 分析确定其结构。采用薄膜分散法制备的 SPE 脂质体粒径为 105.88±6.35 nm，包封率达 68.2%±1.5%，表现出良好的热稳定性、碱稳定性及抗蛋白酶能力，显著提升了 W1 的稳定性和抗菌效果。与既有研究相比，本研究不仅获得来源安全的天然抗菌肽，还通过脂质体包埋技术增强了其在中性及微碱环境下对金黄色葡萄球菌等病原菌的抑制能力，拓展了其在食品保鲜等领域的应用潜力，具有一定的理论创新与实用价值。但本研究仍存在一些限制，如 W1 脂质体的作用机制尚不明确，其在复杂食品体系中的行为及长期稳定性需进一步研究。未来应聚焦于机制解析及实际应用评估。综上，SPE 脂质体包埋的 W1 抗菌肽为天然、安全的食品保鲜新策略提供了有力支撑，具备广阔的应用前景。

© 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] JI Shuaiqi, AN Feiyu, ZHANG Taowei, et al. Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2024, 265: 116072.

[2] LOU Mengxue, JI Shuaiqi, WU Rina, et al. Microbial production systems and optimization strategies of antimicrobial peptides: A review[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2025, 41(2): 66.

[3] LAI Zhenheng, YUAN Xiaojie, CHEN Hongyu, et al. Strategies employed in the design of antimicrobial peptides with enhanced proteolytic stability[J]. Biotechnology Advances, 2022, 59: 107962.

[4] XU Shenrui, TAN Peng, TANG Qi, et al. Enhancing the stability of antimicrobial peptides: From design strategies to applications[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 475: 145923.

[5] XUN Zengyu, LI Tianqi, XUE Xue. The application strategy of liposomes in organ targeting therapy[J]. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2024, 16(2): e1955.

[6] 王震, 刘昱璇, 张梦奇, 等. 包埋青蛤免疫活性肽脂质体的制备及性质表征[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(5): 104−114. [WANG Z, LIU Y X, ZHANG M Q, et al. Preparation and characterization of liposome entrapped clam immune active peptide[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 42(5): 104−114.]

[7] XU Xiankang, TIAN Fang, PAN Yujie, et al. Emerging mechanistic insights into liposomal stability: Full process management from production and storage to food application[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 505: 159552.

[8] WANG Cheng, HONG Tingting, CUI Pengfei, et al. Antimicrobial peptides towards clinical application: Delivery and formulation[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2021, 175: 113818.

[9] CAI Rui, LIANG Yunhao, YUAN Yahong, et al. Antimicrobial activity and mechanism of chitosan-coated *Epsilon*-poly-lysine nanoliposomes against *Alicyclobacillus* spp. in apple juice[J]. Food Control, 2024, 164: 110589.

[10] XUE Hao, LI Jiaying, ZHANG Liwei, et al. Nanoliposomes protecting antimicrobial peptides via membrane-fused incorporation to fight wound infection[J]. Materials Advances, 2023, 4(15): 3303−3309.

[11] LI Qibin, LV Linao, LIU Ying, et al. Preparation, characterization and application of bacteriocin CAMT6 nanoliposomes using resveratrol as a novel stabilizer[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134293.

[12] 纪帅奇, 乌日娜, 张洵崴, 等. 枯草芽孢杆菌 SNBS-3 全基因组测序及其抑菌物质预测分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 57−63. [JI S Q, WU R N, ZHANG T W, et al. Whole genome sequencing of *B. subtilis* SNBS-3 and predictive analysis of its antibacterial substances[J]. Food Science, 2024, 45(2): 57−63.]

[13] 郭丽丹, 张晓妍, 周婉婷, 等. 枯草芽孢杆菌拮抗菌的筛选鉴定及其抑菌特性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 152−158. [GUO D L, ZHANG X Y, ZHOU W T, et al. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Bacillus subtilis* and their antibacterial properties[J]. Food Industry Technology, 2022, 43(21): 152−158.]

[14] KAUNIETIS A, BUIVYDAS A, ČITAVIČIUS D J, et al. Heterologous biosynthesis and characterization of a glycocin from a thermophilic bacterium[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1115.

[15] 周健平, 谢云巧, 廖雨虹, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 BR-01 菌株高产抗菌肽培养基的优化及其抗菌肽的鉴定[J]. 广西科学, 2023, 30(4): 693−705. [ZHOU J P, XIE Y Q, MIU Y H, et al. Optimization of high-yield antimicrobial peptide medium of *Bacillus velezensis* BR-01 strain and identification of antimicrobial peptides[J]. Guangxi Sciences, 2023, 30(4): 693−705.]

[16] CHAI Qianqian, WU Qiong, LIU Tianlong, et al. Enhanced antibacterial activity of silica nanorattles with ZnO combination nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

[J]. Science Bulletin, 2017, 62(17): 1207−1215.
[17] TIAN Mengmeng, HAN Jianzhong, YE Aiqian, et al. Structural characterization and biological fate of lactoferrin-loaded liposomes during simulated infant digestion[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(6): 2677−2684.
[18] TAI Kedong, RAPPOLT M, MAO Like, et al. The stabilization and release performances of curcumin-loaded liposomes coated by high and low molecular weight chitosan[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 99: 105355.
[19] BHARGAVI N, DHATHATHREYAN A, SREERAM K J. Regulating structural and mechanical properties of pectin reinforced liposomes at fluid/solid interface[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106225.
[20] ZHANG Yating, PU Chuanfen, TANG Wenting, et al. Effects of four polyphenols loading on the attributes of lipid bilayers[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 282: 110008.
[21] YU Jiankun, WANG Shanshan, QI Jing, et al. Mannose-modified liposome designed for epitope peptide drug delivery in cancer immunotherapy[J]. International Immunopharmacology, 2021, 101: 108148.
[22] 李剑勋, 步雨珊, 刘银雪, 等. α-螺旋抗菌肽 YHX-1 的从头设计及抑菌活性研究[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(3): 98−104,111. [LI J X, BU Y S, LIU Y X, et al. Ab initio design and antibacterial activity of α-helical antimicrobial peptide YHX-1[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(3): 98−104, 111.]
[23] CHOYAM S, JAIN P M, KAMMARA R. Characterization of a potent new-generation antimicrobial peptide of *Bacillus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 710741.
[24] ZOU Zhipeng, PURNAWAN M A, WANG Yiming, et al. A novel antimicrobial peptide WBp-1 from wheat bran: Purification, characterization and antibacterial potential against *Listeria monocytogenes*[J]. Food Chemistry, 2025, 463: 141261.
[25] YAO Yexuan, MA Li, YU Chengwei, et al. The improvement of tyrosol bioavailability by encapsulation into liposomes using pH-driven method[J]. Food Chemistry, 2024, 445: 138661.
[26] NÉMETH Z, CSÓKA I, SEMNANI JAZANI R, et al. Quality by design-driven Zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(9): 1798.
[27] LI Junhua, CHANG Cuihua, ZHAI Jiali, et al. Ascorbyl palmitate effects on the stability of curcumin-loaded soybean phosphatidylcholine liposomes[J]. Food Bioscience, 2021, 41: 100923.
[28] SONG Fanfan, TIAN Shaojun, YANG Guolong, et al. Effect of phospholipid/flaxseed oil ratio on characteristics, structure change, and storage stability of liposomes[J]. Lwt, 2022, 157: 113040.
[29] GADAPA S, BATTULA S N, MOR S, et al. Green tea catechin loaded niosomes: Formulation and their characterization for food fortification[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 59(9): 3669−3682.
[30] HUANG Meigui, SU Erzheng, ZHENG Fuping, et al. Encapsulation of flavonoids in liposomal delivery systems: The case of quercetin, kaempferol and luteolin[J]. Food & Function, 2017, 8(9): 3198−3208.
[31] SONG Fanfan, CHEN Jingnan, ZHENG Aoze, et al. Effect of sterols on liposomes: Membrane characteristics and physicochemical changes during storage[J]. Lwt, 2022, 164: 113558.
[32] JOVANOVIĆ A A, BALANČ B D, DJORDJEVIĆ V B, et al. Effect of gentisic acid on the structural-functional properties of liposomes incorporating β-sitosterol[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 183: 110422.
[33] HARRIS B S, HUANG Yuqi, KARSAI A, et al. Impact of surface polarity on lipid assembly under spatial confinement[J]. Langmuir, 2022, 38(24): 7545−7557.
[34] GUIMARÃES D, CAVACO-PAULO A, NOGUEIRA E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2021, 601: 120571.
[35] DONG Yaoda, TCHUNG E, NOWELL C, et al. Microfluidic preparation of drug-loaded PEGylated liposomes, and the impact of liposome size on tumour retention and penetration[J]. Journal of Liposome Research, 2019, 29(1): 1−9.
[36] DEJEU I L, VICAȘ L G, MARIAN E, et al. Innovative approaches to enhancing the biomedical properties of liposomes[J]. Pharmaceutics, 2024, 16(12): 1525.
[37] CHANGSAN N, ATIPAIRIN A, SAKDISET P, et al. Br-SPR-20-P1 peptide isolated from *Brevibacillus* sp. developed into liposomal hydrogel as a potential topical antimicrobial agent[J]. RSC Advances, 2024, 14(37): 27394−27411.
[38] UDDIN M N, DESAI F, ASMATULU E. Engineered nanomaterials in the environment: Bioaccumulation, biomagnification and biotransformation[J]. Environmental Chemistry Letters, 2020, 18(4): 1073−1083.