

大豆分离蛋白-姜黄素纳米颗粒制备工艺优化、结构表征和稳定性分析

任杰¹, 卢知浩¹, 吴晗硕¹, 焦芯茹², 刘文颖^{3*}, 李国明^{1*}

(¹中国食品发酵工业研究院 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心 北京 100015)

²北京农学院食品科学与工程学院 北京 100096)

³中国农业大学工学院 北京 100083)

摘要 由于姜黄素水分散性较差且不稳定,因此其在食品工业中的应用受到限制。为了克服这一限制,本研究采用 pH 驱动方法,以大豆分离蛋白作为包材(SPI),构建大豆分离蛋白-姜黄素纳米颗粒(SPI-Cur),并且以装载率为评价指标,分别对影响大豆分离蛋白-姜黄素纳米颗粒装载率的 3 大因素(蛋白浓度、姜黄素添加浓度、pH 驱动组合)进行单因素实验分析和响应面条件优化,确定了 SPI-Cur 纳米颗粒的最佳制备工艺是:蛋白质量浓度为 50 mg/mL,姜黄素添加质量浓度为 0.4 mg/mL,pH 驱动组合为 pH 值从 13.0 调回 7.0。通过对最优工艺得到的 SPI-Cur 纳米颗粒从粒径、 ζ 电位、PDI 分散性指数、外观形貌、傅里叶红外光谱(FTIR)和 x 射线衍射等方面进行的系统性表征,得出姜黄素被成功地负载到了 SPI 纳米复合物中,并且是以非晶态形式被捕获在大豆分离蛋白基质中。此外,稳定性分析结果得出 SPI 可以有效地提高姜黄素的热稳定性和胃肠道稳定性,对姜黄素具有较好的保护效果。本研究为 pH 驱动方法制备 SPI-Cur 纳米颗粒提供了最优工艺,也表明了 SPI 可作为疏水生物活性物质的递送基质。

关键词 pH 驱动; 大豆分离蛋白; 姜黄素; 响应面法; 稳定性

文章编号 1009-7848(2024)09-0256-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.024

近年来,疏水生物活性物质递送系统的开发,引起了越来越多研究者的关注^[1]。其中具有代表性的是疏水生物活性物质模型——姜黄素,是一种存在于植物根茎中的天然多酚类化合物,在抗炎^[2]、抗氧化^[3]、抗血脂^[4]、抗肿瘤^[5]等方面具有良好的医学价值。然而,由于姜黄素中存在活性亚甲基和 β -二酮^[6],使其溶解性、稳定性和生物利用度较差^[7],这限制了姜黄素在食品和医药中的应用^[8]。提高姜黄素在水中的溶解性、稳定性以及生物利用度,是姜黄素在食品和医药领域应用中亟待解决的问题。迄今为止,研究人员提出许多方法来克服这一限制,其中在纳米颗粒递送系统中封装姜黄素是克服这些缺点的有效方法^[9]。例如:用蛋清蛋白^[10]、小麦麦胶蛋白^[11]、玉米醇溶蛋白^[12]等封装姜黄素,由于蛋白质基材料的无毒、生物相容性、固

有的生物降解性和较高的营养价值,因此被认为是潜在的递送载体^[12]。

与其它植物蛋白相比,大豆蛋白具有较高的营养价值,富含相对均衡的必需氨基酸^[13],是一种有吸引力的食品材料和食品添加剂^[14]。大豆分离蛋白(SPI)是纯度最高的大豆蛋白产品,主要由 7S (β -conglycinin)和 11S (glycinin)两个球状蛋白组成^[15]。在水环境中,这些组分主要是由亲水壳和疏水核组成的球状分子和一定量的水溶性聚集体组成^[16]。研究表明,在极端 pH 条件下,SPI 的球形蛋白结构部分展开,产生更好的肽链灵活性,然而,在中性 pH 值下蛋白质部分再变性,形成“熔球”结构^[17]。此外,pH 驱动是一种低能量、无溶剂的自组装方法,可用于姜黄素的各种载体封装^[18-19],该方法是利用姜黄素在水介质中的 pH 依赖性溶解度^[20]。鉴于上述 SPI 在不同 pH 值下的特性,以及 pH 驱动自组装方法的高效性,本研究使用 pH 驱动大豆蛋白自组装来封装姜黄素。

目前,关于制备 SPI-Cur 纳米复合物时影响装载率的因素鲜有研究报道。本研究以影响 SPI-Cur 纳米颗粒装载率的 3 大因素(蛋白浓度、姜黄

收稿日期: 2023-09-17

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2021BEG02027)

第一作者: 任杰,男,硕士生

通信作者: 刘文颖 E-mail: wenylingliu888@126.com

李国明 E-mail: gml_1002@163.com

素添加浓度、pH 驱动组合)设计单因素实验,以得到 3 组最合适的蛋白浓度、姜黄素添加浓度、pH 驱动组合。采用响应面试验优化 SPI-Cur 纳米颗粒的制备工艺。对 SPI-Cur 纳米颗粒粒径、 ζ 电位、PDI 分散性指数、外观形貌进行表征。对其热稳定性和胃肠道模拟消化稳定性进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白粉(SPI, $\geq 86\%$ 蛋白,灰分约为 4.00%),烟台东方蛋白科技有限公司;姜黄素(Cur, $\geq 98\%$),萨恩化学技术有限公司(上海,中国);胃蛋白酶(≥ 250 units/mg),美国 Sigma 公司;胰蛋白酶(≥ 250 NFU/mg),美国 Solarbio 公司;所有其它化学品和溶剂均为分析纯级。

SPS202F 分析天平,瑞士梅特勒-托利多公司;FE20K 型 pH 计,瑞士梅特勒-托利多公司;UV-1780 紫外-可见分光光度计,日本 SHIMADZU 公司;NanoZS Zetasizer ZS90 激光粒度仪,英国 Malvern Instruments 公司;SU8020 扫描电子显微镜,日本 Hitachi 公司;Tensor 27 傅里叶红外光谱仪、AXS D8 Advance X 射线衍射仪,德国 BRUKER;3K15 冷冻离心机,德国 Sigma 公司;HH-4 数显恒温水浴锅,普瑞斯机械有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆蛋白姜黄素纳米复合物的制备单因素实验 大豆蛋白纳米复合物的制备采用 pH 驱动法制备,参照 Zhang 等^[21]大豆蛋白纳米复合物的制备方法稍有修改,将制备完成的大豆蛋白-姜黄素纳米复合物视为 SPI-Cur。SPI-Cur 纳米复合物的制备单因素实验分别考察大豆分离蛋白浓度、姜黄素添加浓度、pH 驱动组合对姜黄素装载率的影响。

1) 分别配制质量浓度为 40,45,50,55,60 mg/mL 的大豆分离蛋白溶液,使用 1 mol/L NaOH 调节大豆分离蛋白溶液的 pH 值至 12.0,经 600 r/min 磁力搅拌 1 h 后,添加 0.2 mg/mL 姜黄素,避光搅拌 30 min 使其完全混合后,使用 1 mol/L HCl 立即回调溶液 pH 值至 7.0,避光磁力搅拌 1 h 后,将大豆蛋白姜黄素溶液在 20 °C,8 000 r/min 离心 15

min,取上清液透析过夜并储存在冰箱中(4 °C)。

2) 配制质量浓度为 50 mg/mL 的大豆分离蛋白溶液,1 mol/L NaOH 将其 pH 值调至 12.0,经 600 r/min 磁力搅拌 1 h 平衡后,添加 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mg/mL 姜黄素,避光搅拌 30 min 使其完全混合后,1 mol/L HCl 立即调回溶液 pH 值为 7.0,避光磁力搅拌 1 h 后,将大豆蛋白姜黄素溶液在 20 °C,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液透析过夜并储存在冰箱中(4 °C)。

3) 配制质量浓度为 50 mg/mL 的大豆分离蛋白溶液,1 mol/L NaOH 将其 pH 值调至 9.0,10.0,11.0,12.0,13.0,经 600 r/min 磁力搅拌 1 h 平衡后,添加 0.1 mg/mL 姜黄素,避光搅拌 30 min 使其完全混合后,1 mol/L HCl 立即调回溶液 pH 值为 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,避光磁力搅拌 1 h 后,将大豆蛋白姜黄素溶液在 20 °C,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液透析过夜并储存在冰箱中(4 °C)。

1.2.2 姜黄素的装载效率(LE)测定 对姜黄素的装载效率(LE)的评估参照 Zhang 等^[21]的方法并稍有修改。使用无水乙醇从 SPI-Cur 纳米复合物中获得负载的姜黄素,将 0.2 mL 负载姜黄素的 SPI-Cur 复合物与 1.8 mL 无水乙醇混合并剧烈摇动,将混合物在 10 000 $\times g$ 、25 °C 下离心 15 min,然后使用紫外-可见分光光度计在 426 nm 处测定。使用溶解在无水乙醇中的游离姜黄素 (0~10 $\mu\text{g/mL}$) 绘制的标准曲线 $y=0.0904x+0.004$ ($R^2=0.9973$) 来计算姜黄素的负载浓度。使用以下公式(1)计算 LE:

$$\text{LE}(\%) = \frac{\text{姜黄素负载量}(\text{mg})}{\text{姜黄素添加总量}(\text{mg})} \times 100 \quad (1)$$

1.2.3 响应面优化试验设计 在单因素实验的基础上,选取蛋白浓度(A)、姜黄素添加浓度(B)、pH 驱动组合(C)为考察因素,其中考察因素 C 中的 1 为将大豆蛋白溶液调至 pH 12.0,添加姜黄素后调回 pH 7.0;考察因素 C 中的 2 为将大豆蛋白溶液调至 pH 13.0,添加姜黄素后调回 pH 7.0;考察因素 C 中的 3 为将大豆蛋白溶液调至 pH 13.0,添加姜黄素后调回 pH 8.0。采用 Box-Behnken 设计对大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的制备工艺进行优化。试验因素及编码见表 1。

表1 试验因素水平及编码

Table 1 Test factor levels and codes

因素	水平		
	-1	0	1
A/(mg/mL)	40	50	60
B/(mg/mL)	0.4	0.6	0.8
C	1	2	3

1.2.4 结构表征

1.2.4.1 粒子大小、PDI 分散性指数、 ζ 势测定 大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的平均粒径、PDI 分散性指数和 ζ -电势的测定参考 Liu 等^[22]的方法稍有修改。将 SPI、SPI-Cur 稀释到适当浓度后,使用激光粒度仪测定它们的平均粒径、PDI 分散性指数和 ζ 电位,所有测量均在室温下进行,并重复 3 次。

1.2.4.2 形貌特征观察 大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的微观形貌观察参考 Yuan 等^[23]的方法稍有修改。使用扫描电子显微镜观察 SPI、SPI-Cur 纳米复合物的形态特征,采用喷金制样,将样品粉末进行喷金操作,使其被一层金属覆盖,然后在 3 kV 下观察样品的微观结构。

1.2.4.3 傅里叶红外光谱 傅里叶红外光谱表征参照 Yuan 等^[23]的方法稍有修改。用傅里叶红外光谱仪测定 Cur、SPI、SPI-Cur 以及 SPI 与 Cur 的物理混合物(SPI 与 Cur 的质量比为 50:1)的红外光谱。红外光谱的波数为 400~4 000 cm^{-1} ,分辨率为 2 cm^{-1} 。

1.2.4.4 XRD X 射线衍射图谱表征参照 Zhang 等^[24]的方法稍有修改。为了研究样品的分子排列,使用 X 射线衍射仪测量了 Cur、SPI、SPI-Cur 以及 SPI 与 Cur 的物理混合物(SPI 与 Cur 的质量比为 50:1)的 XRD 图谱,设定扫描角度为 3°~60°(2 θ),扫描速率为 4°/min。

1.2.5 大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的稳定性评价

1.2.5.1 热稳定性 大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的热稳定性评价参照 Yuan 等^[23]的方法稍有修改。取 2 mL Cur、SPI-Cur 样品置于试管中,放入 75, 85, 95 °C 恒温水浴锅中水浴加热 2 h,每 30 min 取少量样品,用乙醇萃取后,在 426 nm 波长下测量吸光度值,获得姜黄素浓度,并通过公式(2)计算姜黄素在热环境下的保留率,以判断姜黄素的热稳定性。

$$\text{姜黄素保留率}(\%) = \frac{\text{热处理后姜黄素浓度}}{\text{热处理前姜黄素浓度}} \quad (2)$$

1.2.5.2 胃肠道模拟消化 大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的胃肠道稳定性评价参考 Cheng 等^[25]的方法稍有修改。取 2.5 g 胃蛋白酶,加入至 1 mol/L 的稀盐酸中,并使用稀盐酸定容至 250 mL,视为胃模拟消化液。取 2.5 g 胰蛋白酶,加入至 pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中,定容至 250 mL,视为肠模拟消化液。将 Cur、SPI-Cur 各取 10 mL 与 10 mL 胃模拟消化液添加至锥形瓶中并放入搅拌子,在 37 °C 水浴锅中加热搅拌 1 h 后取出,调 pH 值至 7.4,用乙醇萃取并在 426 nm 波长下检测样品吸光度值。通过公式(3)计算姜黄素在模拟胃液中的保留率,判断其稳定能力。

$$\begin{aligned} & \text{姜黄素稳定能力}(\%) \\ &= \frac{\text{姜黄素在模拟胃液的浓度}}{\text{消化前姜黄素浓度}} \quad (3) \end{aligned}$$

进入肠道消化模拟试验,各锥形瓶加入 40 mL 肠模拟消化液,在 37 °C 水浴锅中加热搅拌 1 h 后取出,取锥形瓶中部分样品加入至离心管中,以 10 000 r/min 的转速,离心 15 min,以获得上清液。取上清液用乙醇萃取在 426 nm 波长下检测样品吸光度值。通过公式(4)计算姜黄素在模拟肠液中的保留率,判断其生物可利用能力。

$$\begin{aligned} & \text{姜黄素生物可利用能力}(\%) \\ &= \frac{\text{游离的姜黄素在模拟肠液的浓度}}{\text{消化前姜黄素浓度}} \quad (4) \end{aligned}$$

1.2.6 统计分析 所有测定均进行 3 次,使用 SPSS20.0 软件进行分析,数值以平均值 \pm 标准差表示;使用 Design-Expert 13 根据 Box-Behnken 设计试验方案制作响应面优化设计;使用 Origin 2021 进行相关图表的绘制。

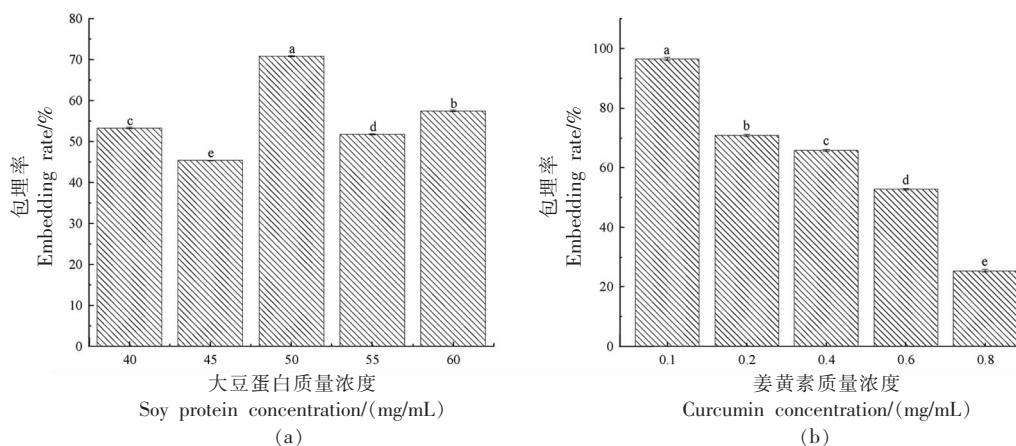
2 结果与分析

2.1 SPI-Cur 纳米颗粒制备的单因素实验分析

由图 1a 可知,在 pH 驱动组合为 pH 12.0 调至 7.0,姜黄素添加量为 0.2 mg/mL,大豆蛋白质量浓度为 40, 50, 60 mg/mL 时,制成的纳米颗粒装载率分别为 53.32%, 70.85%, 57.49%,因此在响应面试验中选取这 3 个蛋白浓度作为 3 个水平进行优化设计。

由图 1b 可知,在 pH 驱动组合为 pH 12.0 调至 7.0,大豆蛋白质量浓度为 50 mg/mL,姜黄素添加质量浓度为 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mg/mL 时,制成的纳米颗粒装载率最优的 3 组分别为 0.1,0.2,0.4

mg/mL,但综合考虑姜黄素添加质量浓度为 0.1 mg/mL 时的姜黄素负载量没有添加质量浓度为 0.6 mg/mL 时的效果理想,故在响应面试验中选取 0.2,0.4,0.6 mg/mL 作为 3 个水平进行优化设计。



注:图中字母(a-e)为不同的样本有显著差异, P 表示差异明显($P < 0.05$)。

图 1 大豆蛋白浓度(a)和姜黄素添加浓度(b)对姜黄素包埋率的影响

Fig.1 Effect of soy protein concentration (a) and curcumin addition concentration (b) on curcumin encapsulation rate

由图 2 可知,在 50 mg/mL 大豆蛋白中分别添加 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mg/mL 姜黄素的各 pH 驱动组合下装载率的变化趋势相似,并且得出将 pH 值由 13.0 调回 7.0 或 8.0 时的装载率较高且稳定,这与 Zhang 等^[21]制备大豆蛋白时 pH 12.0 调回 pH 7.0 的 pH 组合的装载率相似。因此,在响应面试验中选取 pH 12-7,13-7,13-8 作为 3 个水平进行优化。

2.2 SPI-Cur 纳米颗粒制备的响应面优化试验分析

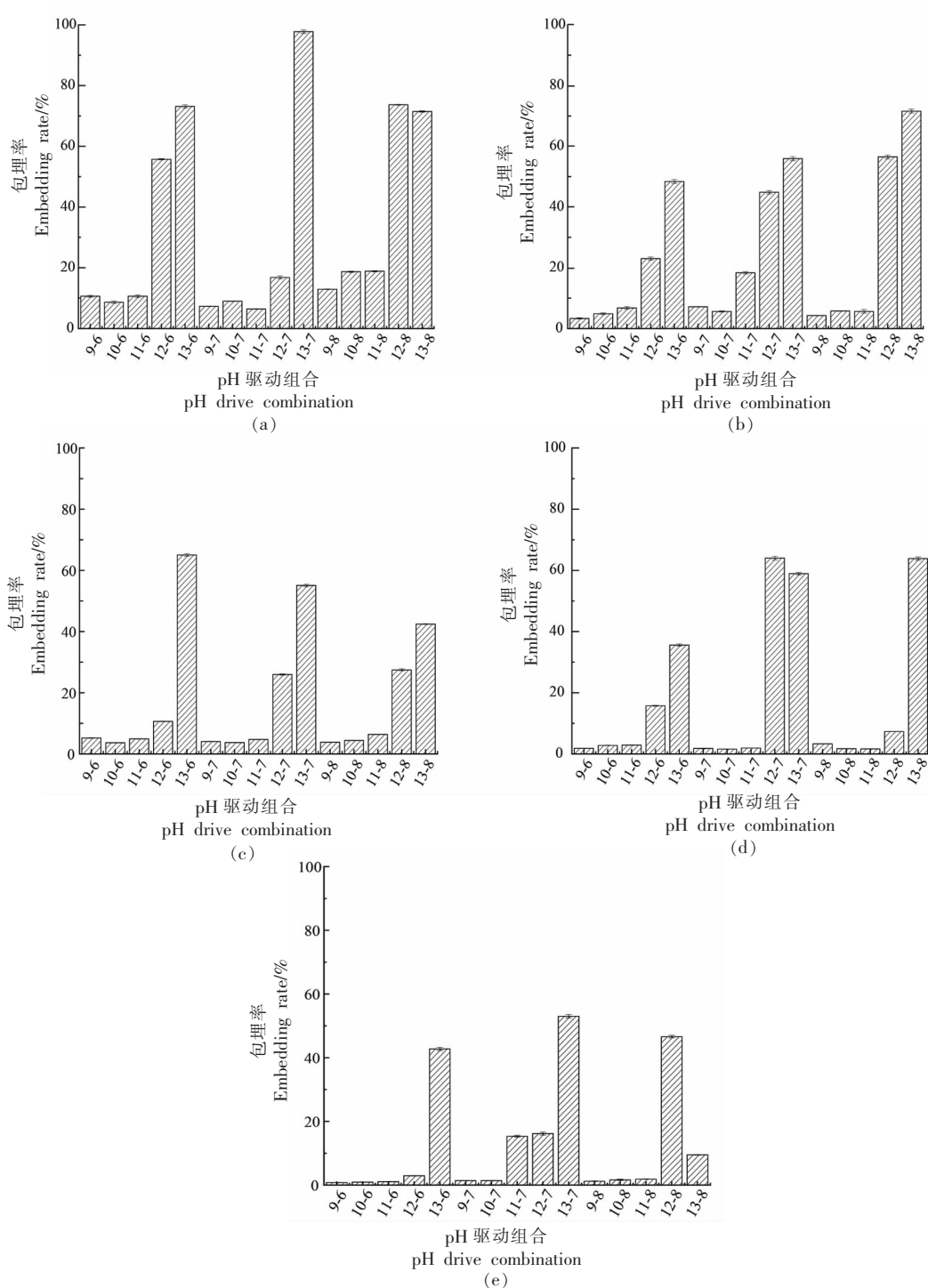
在前期单因素实验的基础上,以装载率($Y, \%$)为响应值,利用 Box-Behnken 中心组合设计试验模型,拟合二次多项方程可得最优制备方法。3 因素 3 水平的响应面试验结果如表 2 所示。

通过采用 Design-Expert 13 软件对 Box-Behnken 中心组合设计试验模型数据进行拟合,可得二次多项回归方程: $Y=4.39A-1.75B+14.72C-1.72AB-2.86AC-6.71BC-16.66A^2-10.00B^2-14.08C^2+85.15$ 。为了更好地检验模型的有效性,对响应面模型进行方差和显著性分析,回归模型的方差分析结果如表 3 所示。

由表 3 方差分析可知,回归模型的 F 值为

3.92, P 值为 0.0425 (< 0.05),表示该回归模型显著;失拟项 F 值为 5.05, P 值为 0.0759 (> 0.05),表示失拟项不显著,上述结果说明该模型对真实情况的模拟是准确的,也表明此预测模型可以用于大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒制备工艺的优化。此外,该回归模型的回归系数 $R^2=0.8346$,表明该模型能解释 83.46% 响应值变化,拟合度较好。综上,说明可通过该模型预测获得制备大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的最佳工艺。通过表 3 中三因素的 P 值亦可知三因素对姜黄素装载率的影响力:pH 驱动组合>大豆蛋白浓度>姜黄素添加浓度。

图 3 是大豆蛋白浓度、姜黄素添加浓度和 pH 驱动组合三因素之间的交互作用对姜黄素装载率的等高线图和响应面图。由图可知,当蛋白质量浓度为 50 mg/mL,姜黄素添加质量浓度为 0.4 mg/mL 时,响应曲面为最高点,且等高线形状为马鞍状(图 3a),表明蛋白浓度和姜黄素添加浓度间的相互作用对制备大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的装载率影响显著;当蛋白质量浓度为 50 mg/mL,pH 驱动组合为 13.0 调回 7.0 时,响应曲面为最高点,且等高线形状为马鞍状(图 3b),表明蛋白浓度和 pH 驱动组合间的相互影响对制备大豆蛋白-姜黄



注:在 50 mg/mL 大豆蛋白条件下分别添加 0.1 mg/mL(a)、0.2 mg/mL(b)、0.4 mg/mL(c)、0.6 mg/mL(d)、0.8 mg/mL(e)姜黄素的各 pH 驱动组合。

图 2 pH 驱动组合对姜黄素包埋率的影响

Fig.2 Effect of pH-driven combinations on curcumin encapsulation rate

素纳米颗粒的装载率影响极显著;当姜黄素添加质量浓度为 0.4 mg/mL, pH 驱动组合为 13.0 调回 7.0 时,响应曲面为最高点,且等高线形状为马鞍

状(图 3c),表明姜黄素添加浓度和 pH 驱动组合对制备大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的装载率影响显著。综上所述,通过 Design-Expert 13 软件分

表 2 Box-Behnken 中心组合设计试验模型

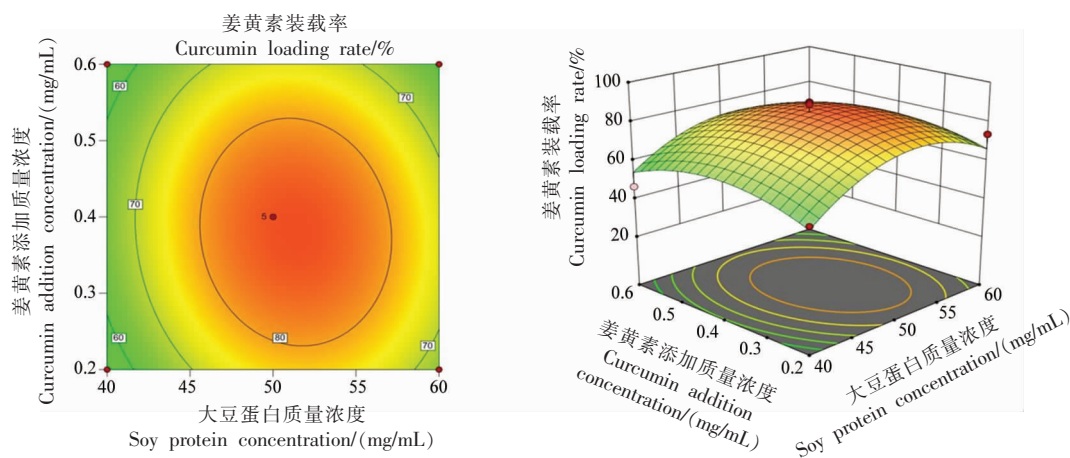
Table 2 Box-Behnken central combined design of experiments model

编号	A(蛋白质 量浓度)/ (mg/mL)	B(姜黄素 添加浓度) (mg/mL)	C(pH 驱动 组合)	Y(装载 率)/%	编号	A(蛋白质 量浓度)/ (mg/mL)	B(姜黄素 添加浓度) (mg/mL)	C(pH 驱动 组合)	Y(装载 率)/%
1	40	0.2	2	55.88	10	60	0.2	2	73.82
2	50	0.4	2	84.02	11	60	0.4	1	36.01
3	50	0.4	2	88.83	12	40	0.6	2	46.60
4	60	0.4	3	75.88	13	50	0.4	2	73.26
5	50	0.4	2	89.50	14	50	0.2	1	44.86
6	40	0.4	1	27.22	15	60	0.6	2	57.67
7	50	0.4	2	90.13	16	50	0.6	3	63.86
8	50	0.2	3	71.57	17	40	0.4	3	78.54
9	50	0.6	1	64.00					

表 3 回归模型的方差分析表

Table 3 Analysis of variance table for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	4 829.96	9	536.66	3.92	0.0425	显著
A(蛋白浓度)	154.35	1	154.35	1.13	0.3233	
B(姜黄素添加浓度)	24.5	1	24.5	0.1792	0.6848	
C(pH 驱动组合)	1 733.43	1	1 733.43	12.68	0.0092	
AB	11.8	1	11.8	0.0863	0.7775	
AC	32.78	1	32.78	0.2397	0.6394	
BC	180.23	1	180.23	1.32	0.2887	
A ²	1 168.34	1	1 168.34	8.54	0.0222	
B ²	420.86	1	420.86	3.08	0.1228	
C ²	834.45	1	834.45	6.1	0.0428	
残差	957.15	7	136.74			
失拟项	757.24	3	252.41	5.05	0.0759	不显著
净误差	199.91	4	49.98			
总和	5 787.11	16				



(a)大豆蛋白质量浓度和姜黄素添加质量浓度间交互作用对装载率的影响

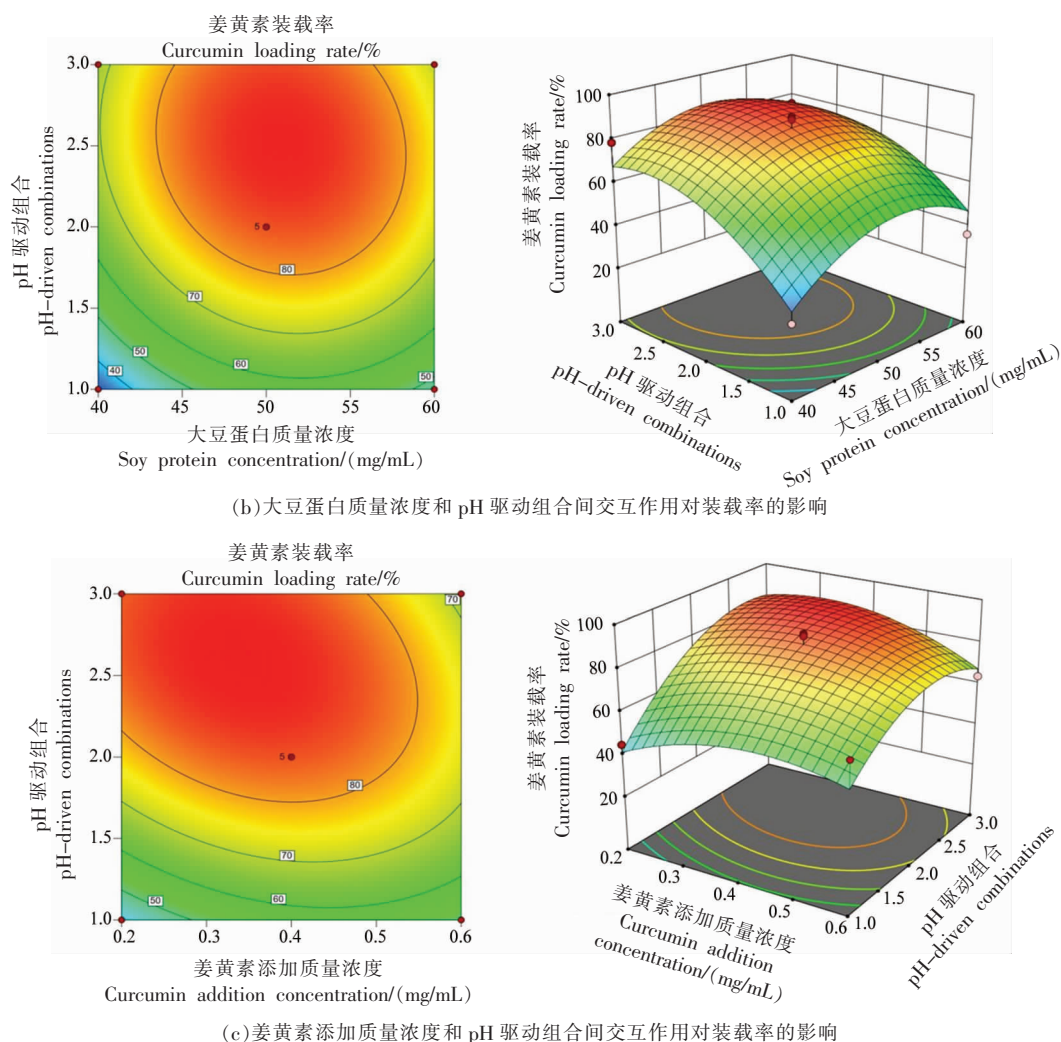


图3 大豆蛋白质量浓度、姜黄素添加质量浓度和 pH 驱动组合对姜黄素装载率的影响

Fig.3 Effect of soy protein concentration, curcumin addition concentration and pH-driven combination on curcumin loading rate

析, 得出了 SPI-Cur 纳米复合物的最佳制备工艺为: 蛋白质量浓度为 50 mg/mL, 姜黄素添加质量浓度为 0.4 mg/mL, pH 驱动组合为 13.0 调回 7.0。

2.3 SPI-Cur 纳米颗粒的结构表征

2.3.1 粒径、PDI 分散性指数和 ζ 电位分析 表 4 揭示了 SPI-Cur 纳米颗粒复合物的平均粒径、PDI 和 ζ -势。在纳米输送载体领域, 严格地将平均粒径为 1~1 000 nm 的颗粒定义为纳米粒子^[26], 输送载体对生物活性物质的输送特性以及对其生物效价的增效作用与载体的尺寸密切相关, 当载体的粒径小于 500 nm, 可显著提高被输送的生物活性物质的生物效价^[27]。由表可知, SPI 的平均粒径为 (914±34.22) nm, 经过 pH 驱动处理后, 使得颗粒

表 4 SPI、SPI-Cur 的平均粒径、多分散性指数和 ζ 电位

Table 4 Mean particle size, polydispersity index and ζ -potential of SPI, SPI-Cur

	平均粒径/d.nm	PDI	ζ 电位/mV
SPI	914 ± 34.22 ^a	0.753 ± 0.43 ^a	-33.97 ± 0.25 ^a
SPI-Cur	211.7 ± 6.58 ^b	0.38 ± 0.06 ^b	-38.4 ± 0.4 ^b

注: 同一列中字母(a-b)为不同的样本有显著差异; P 表示差异明显 ($P < 0.05$)。

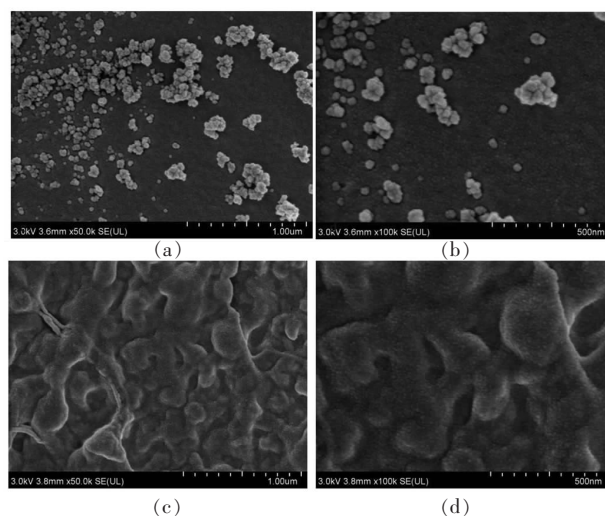
平均粒径显著 ($P < 0.05$) 减小为 (211.7±6.58) nm, 这可能是由于静电斥力和空间位阻^[28]。这一结果与 Pan 等^[29]使用 pH 驱动制备酪蛋白纳米颗粒的结果一致。

PDI 常用于评价样品溶液的平均均匀性, PDI 值越大, 说明样品溶液中粒径分布范围越大^[30]。SPI 的 PDI 为 (0.753 ± 0.43) , 大于 0.7 表示 SPI 的粒径分布非常广泛, 而 SPI-Cur 的 PDI 为 (0.38 ± 0.06) , 小于 0.4 表明其分散性良好并且粒径分布较窄。 ζ 电位是纳米粒子表面电荷的指示物, 一般来说, 分子或分散粒子越小, Zeta 电位的绝对值 (正或负) 越高, 体系越稳定^[31], SPI 的 ζ 电位为 (-33.97 ± 0.25) mV, 通过 pH 驱动装载 Cur 后, SPI-Cur 复合纳米粒子的 ζ 电位显著 ($P < 0.05$) 变为 (-38.4 ± 0.4) mV, 这一现象证明了 Cur 与 SPI 蛋白分子相结合。由此可见, 粒径较小、PDI 较低、Zeta 电位的绝对值较高的 SPI-Cur 纳米复合物具有自稳定性, 其增强的电荷可以防止聚集体的形成, 提高了其稳定性。

2.3.2 外观形貌分析 用扫描电镜观察了 SPI 和 SPI-Cur 复合纳米颗粒的表面形貌, 如图 4 所示, SPI 呈规则的球状形态, 结构紧凑, 粒子是呈簇状分布, pH 驱动包埋姜黄素后, SPI-Cur 复合纳米颗粒为重叠交错的不规则片状, 表面粗糙, 这与 Yuan 等^[23]在通过部分酶解自组装大豆蛋白纳米颗粒进行 pH 驱动封装姜黄素研究中的结果相似。与动态光散射 (DLS) 测量的粒径相比, 粒径有减小的趋势, 粒径数据的差异可能是冻干和水合样品表现出不同状态的结果, 并且 DLS 粒径反映了颗粒的平均直径, 扫描电镜反映了局部粒径^[32]。

2.3.3 FTIR 分析 姜黄素、SPI 和 SPI-Cur 纳米复合物的 FTIR 光谱如图 5 所示, 游离 Cur 在 3 500.63, 1 610.48, 1 502.47, 1 271.02, 1 163.01, 1 026.08, 960.50 cm^{-1} 处表现出几个特征峰, 但被包封到 SPI 后, 姜黄素大部分的特征吸收峰消失了, 这是因为姜黄素分子的拉伸振动受到限制, 这表明姜黄素被包裹进了 SPI^[33]。然而, SPI 和 Cur 的物理混合物 SPI-Cur-Mix (SPI:Cur=50:1) 的光谱中, 姜黄素的部分特征峰仍然被检测到, 这些现象证明姜黄素被成功地负载到了 SPI 纳米复合物中。这一结果与姜黄素负载的玉米醇溶蛋白^[7]、卵清蛋白^[34]等研究结果一致。

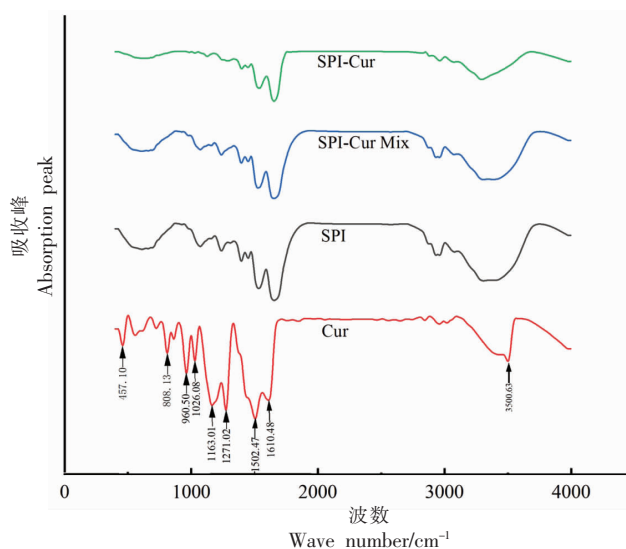
2.3.4 XRD 分析 通过 XRD 分析姜黄素和 SPI-Cur 纳米颗粒的物理状态 (图 6), 游离姜黄素高度结晶, 在 $28.97^\circ, 27.34^\circ, 26.60^\circ, 25.61^\circ, 24.61^\circ,$



注: a、b 为 SPI 在 1.00 μm 和 500 nm 下的形貌; c、d 为 SPI-Cur 在 1.00 μm 和 500 nm 下的形貌。

图 4 SPI、SPI-Cur 的扫描电镜

Fig.4 Scanning electron microscopy of SPI, SPI-Cur

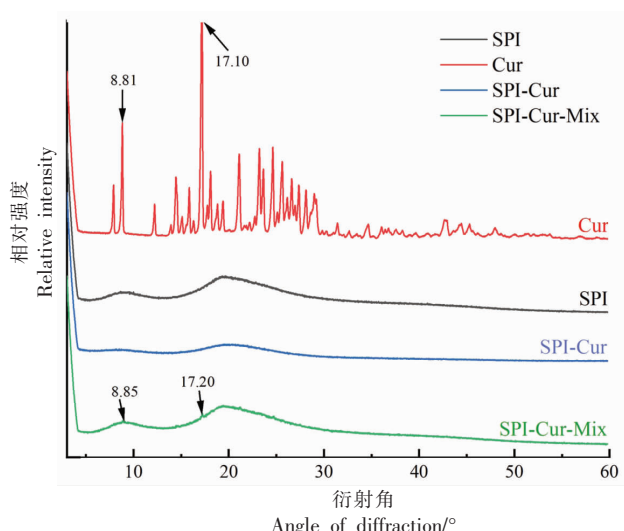


注: SPI-Cur-Mix 为大豆分离蛋白与姜黄素质量比为 50:1 的物理混合物。

图 5 Cur、SPI、SPI-Cur 和 SPI-Cur-Mix 的傅里叶红外光谱

Fig.5 FTIR spectra of Cur, SPI, SPI-Cur and SPI-Cur-Mix

$23.20^\circ, 21.07^\circ, 19.38^\circ, 18.81^\circ, 17.10^\circ, 15.85^\circ, 14.45^\circ, 12.19^\circ, 8.81^\circ$ 等衍射角处有明显的特征吸收峰, 这与 Dai 等^[35]的研究结果相似。物理混合物 SPI-Cur-Mix 的 XRD 图谱中, 在 $17.20^\circ, 8.85^\circ$ 衍射角处观察到了姜黄素的特征吸收峰, 相比之下,



注:SPI-Cur-Mix 为大豆分离蛋白与姜黄素质量比为 50:1 的物理混合物。

图 6 Cur、SPI、SPI-Cur 和 SPI-Cur-Mix 的 XRD 谱
Fig.6 XRD spectra of Cur, SPI, SPI-Cur and SPI-Cur-Mix

在SPI-Cur 纳米复合物颗粒中,姜黄素结晶形式的特征峰消失了,这表明姜黄素以非晶态形式被捕获在大豆分离蛋白基质中,Pujara 等^[36]也报道了类似的结果。

2.4 稳定性分析

2.4.1 热稳定性 在中性 pH 下,热处理会加速姜黄素的降解,极大地限制了姜黄素在加工过程中的应用。图 7 结果显示,75,85,95 °C 孵育 30 min 后,游离姜黄素的保留率分别显著($P < 0.05$)降低至 61.2%,49.15%,47.45%,pH 驱动封装后,姜黄素的热稳定性显著($P < 0.05$)提高,保留率分别为 92.8%,68.7%,65.87%;孵育 120 min 后,3 种温度下游离姜黄素的保留率仅为 43.12%,13.38%,13.78%,而封装后,姜黄素的保留率分别为 63.64%,27.41%,24.37%,不同温度下姜黄素的保留率分别比游离姜黄素提高了 1.48,2.05 和 1.77 倍,这说明了 SPI 对姜黄素具有较好的保护效果。

2.4.2 胃肠道模拟消化稳定性 在模拟胃和肠道条件下测定游离和包埋姜黄素的保留率(图 8),游离姜黄素经过胃液消化后保留率为 78.56%,再经肠液消化后保留率显著($P < 0.05$)下降至 63.38%,经过 pH 驱动包埋后的姜黄素经过胃液消化后保留率为 94.27%,再经肠液消化后保留率仍保持为

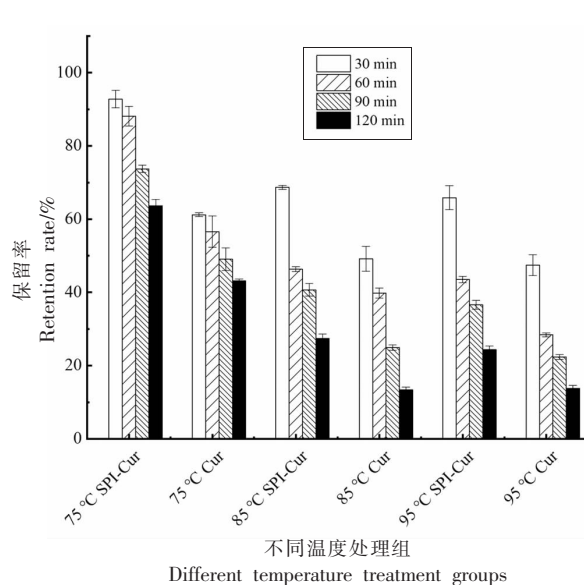
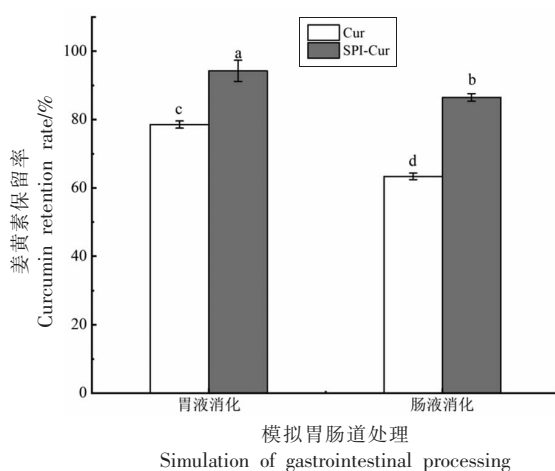


图 7 游离姜黄素和封装姜黄素热稳定性

Fig.7 Thermal stability of free and encapsulated curcumin



注:图中字母(a-d)为不同的样本有显著差异; P 表示差异明显($P < 0.05$)。

图 8 游离姜黄素和封装姜黄素体外模拟胃肠道消化的稳定性

Fig.8 Stability of free and encapsulated curcumin in simulating gastrointestinal digestion *in vitro*

86.5%,显著($P < 0.05$)高于游离姜黄素经胃肠道模拟消化后的保留率,这可能与 SPI 的抗消化特性密切相关,SPI-Cur 能够很好地保护疏水核心的姜黄素不被消化酶释放或降解。Zhang 等^[37]也得到了类似的结果,封装后的姜黄素稳定性提高,降解

率低于 10%。因此,可以得出大豆分离蛋白纳米复合物可显著提高姜黄素在模拟消化液中的稳定性和生物可利用性。

3 结论

本研究以装载率为评价指标,分别对影响大豆分离蛋白-姜黄素纳米颗粒装载率的 3 大因素(蛋白浓度、姜黄素添加浓度、pH 驱动组合)进行单因素实验分析和响应面条件优化,最终确定了 SPI-Cur 纳米复合物的最佳制备工艺是:蛋白质量浓度为 50 mg/mL,姜黄素添加质量浓度为 0.4 mg/mL,pH 驱动组合为 13.0 调回 7.0。最优工艺得到的 SPI-Cur 纳米颗粒的平均粒径为 (211.7 ± 6.58) nm,其分散性良好、粒径分布较窄并且具有较好的稳定性,SEM、FTIR 和 XRD 结果显示姜黄素被成功地负载到了 SPI 纳米复合物中,并且是以非晶态形式被捕获在大豆分离蛋白基质中。此外,SPI 的保护使姜黄素具有更好的热稳定性和胃肠道生物可及性。上述结果为 SPI-Cur 纳米颗粒的制备提供了技术依据、科学的理论支撑,也为深入探索蛋白基输送载体在装载和递送生物活性化合物方面奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] CHEN F P, OU S Y, CHEN Z, et al. Soy soluble polysaccharide as a nanocarrier for curcumin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(8): 1707-1714.
- [2] FALLAHI F, BORRAN S, ASHRAFIZADEH M, et al. Curcumin and inflammatory bowel diseases: From *in vitro* studies to clinical trials[J]. *Molecular Immunology*, 2021, 130: 20-30.
- [3] LIU W J, PAN N, HAN Y, et al. Solubilization, stability and antioxidant activity of curcumin in a novel surfactant-free microemulsion system[J]. *LWT*, 2021, 147: 111583.
- [4] RAUF A, IMRAN M, ORHAN I E, et al. Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 74: 33-45.
- [5] ARAVIND S R, LAKSHMI S, S R, KRISHNAN L K. Sustained release of curcumin from fibrin matrix induces cancer cell death and immunomodulation[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 133: 110967.
- [6] SAHU P K, SAHU P K, SAHU P L, et al. Structure activity relationship, cytotoxicity and evaluation of antioxidant activity of curcumin derivatives [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(4): 1342-1347.
- [7] ZHAN X Y, DAI L, ZHANG L, et al. Entrapment of curcumin in whey protein isolate and zein composite nanoparticles using pH-driven method[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 106: 105839.
- [8] PAN K, ZHONG Q X. Low energy, organic solvent-free co-assembly of zein and caseinate to prepare stable dispersions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 600-606.
- [9] LIU Z, SMART J D, PANNALA A S. Recent developments in formulation design for improving oral bioavailability of curcumin: A review[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020, 60: 102082.
- [10] CHANG C, MEIKLE T G, SU Y, et al. Encapsulation in egg white protein nanoparticles protects anti-oxidant activity of curcumin[J]. *Food Chemistry*, 2019, 280: 65-72.
- [11] WU W H, KONG X Z, ZHANG C M, et al. Improving the stability of wheat gliadin nanoparticles - Effect of gum arabic addition[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 80: 78-87.
- [12] MENG R, WU Z, XIE Q T, et al. Preparation and characterization of zein/ carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: Physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties [J]. *Food Chemistry*, 2021, 340: 127893.
- [13] BOYE J I, L'HOCINE L, RAJAMOHAMED S H. Processing foods without soybean ingredients[M]// *Allergen Management in the Food Industry*, 2010: 355-391.
- [14] XIANG H, SUN D X, CUI C, et al. Modification of soy protein isolate by glutaminase for nanocomplexation with curcumin[J]. *Food Chemistry*, 2018, 268: 504-512.
- [15] LEE H, YILDIZ G, DOS SANTOS L C, et al. Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 55:

- 200–209.
- [16] TENG Z, LUO Y C, WANG Q. Nanoparticles synthesized from soy protein: Preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(10): 2712–2720.
- [17] JIANG J, CHEN J, XIONG Y L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(16): 7576–7583.
- [18] GUO Q, BAYRAM I, ZHANG W T, et al. Fabrication and characterization of curcumin-loaded pea protein isolate-surfactant complexes at neutral pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 111: 106214.
- [19] PENG S F, ZHOU L, CAI Q Z, et al. Utilization of biopolymers to stabilize curcumin nanoparticles prepared by the pH-shift method: Caseinate, whey protein, soy protein and gum Arabic[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 107: 105963.
- [20] DIAS L D, BLANCO K C, MFOUO-TYNGA I S, et al. Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2020, 45: 100384.
- [21] ZHANG Y H, YUAN D, SHEN P H, et al. pH-Driven formation of soy peptide nanoparticles from insoluble peptide aggregates and their application for hydrophobic active cargo delivery [J]. *Food Chemistry*, 2021, 355: 129509.
- [22] LIU K, ZHA X Q, LI Q M, et al. Hydrophobic interaction and hydrogen bonding driving the self-assembling of quinoa protein and flavonoids[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118: 106807.
- [23] YUAN D, ZHOU F B, SHEN P H, et al. Self-assembled soy protein nanoparticles by partial enzymatic hydrolysis for pH-driven encapsulation and delivery of hydrophobic cargo curcumin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 120: 106759.
- [24] ZHANG X G, WANG C, QI Z T, et al. Pea protein based nanocarriers for lipophilic polyphenols: Spectroscopic analysis, characterization, chemical stability, antioxidant and molecular docking[J]. *Food Research International*, 2022, 160: 111713.
- [25] CHENG C, PENG S F, LI Z L, et al. Improved bioavailability of curcumin in liposomes prepared using a pH-driven, organic solvent-free, easily scalable process[J]. *RSC Adv*, 2017, 7: 25978–25986.
- [26] PINTO REIS C, NEUFELD R J, RIBEIRO A J, et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2006, 2(1): 8–21.
- [27] ACOSTA E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009, 14(1): 3–15.
- [28] ZHU Q M, LU H Q, ZHU J Y, et al. Development and characterization of pickering emulsion stabilized by zein/corn fiber gum (CFG) complex colloidal particles[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 91: 204–213.
- [29] PAN K, LUO Y C, GAN Y D, et al. PH-driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity[J]. *Soft Matter*, 2014, 10: 6820–6830.
- [30] HU G, BATOOL Z, CAI Z, et al. Production of self-assembling acylated ovalbumin nanogels as stable delivery vehicles for curcumin[J]. *Food Chemistry*, 2021, 355: 129635.
- [31] VISENTINI F F, SPONTON O E, PEREZ A A, et al. Biopolymer nanoparticles for vehiculization and photochemical stability preservation of retinol[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 70: 363–370.
- [32] ZHAO C C, WEI L P, YIN B B, et al. Encapsulation of lycopene within oil-in-water nanoemulsions using lactoferrin: Impact of carrier oils on physicochemical stability and bioaccessibility[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 153: 912–920.
- [33] GUO Q, BAYRAM I, ZHANG W T, et al. Fabrication and characterization of curcumin-loaded pea protein isolate-surfactant complexes at neutral pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 111: 106214.
- [34] FENG J, XU H Q, ZHANG L X, et al. Development of nanocomplexes for curcumin vehiculization using ovalbumin and sodium alginate as building blocks: Improved stability, bioaccessibility, and antioxidant activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 67(1): 379–390.
- [35] DAI L, WEI Y, SUN C X, et al. Development of protein-polysaccharide-surfactant ternary complex

- particles as delivery vehicles for curcumin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 85: 75–85.
- [36] PUJARA N, JAMBHRUNKAR S, WONG K Y, et al. Enhanced colloidal stability, solubility and rapid dissolution of resveratrol by nanocomplexation with soy protein isolate[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, 488: 303–308.
- [37] ZHANG Y H, ZHAO M M, NING Z X, et al. Development of a sono-assembled, bifunctional soy peptide nanoparticle for cellular delivery of hydrophobic active cargoes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(16): 4208–4218.

Process Optimisation, Structural Characterisation and Stability Analysis of Soybean Isolate Protein-curcumin Nanoparticle Preparation

Ren Jie¹, Lu Zhihao¹, Wu Hanshuo¹, Jiao Xinru², Liu Wenyong^{3*}, Li Guoming^{1*}

(¹Beijing Protein Functional Peptide Engineering and Technology Research Centre, China National Institute of Food and Fermentation Industry, Beijing 100015)

²School of Food Science and Engineering, Beijing Agricultural College, Beijing 100096)

³College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract The application of curcumin in the food industry is limited due to its poor water dispersibility and instability. To overcome this limitation, in this study, a pH-driven method was used to construct soybean isolate protein-curcumin nanoparticles (SPI-Cur) using soybean isolate protein as the packaging material (SPI), and the loading rate was used as the evaluation index, and the three major factors affecting the loading rate of soybean isolate protein-curcumin nanoparticles (protein concentration, curcumin addition concentration, and pH-driven combinations) were respectively subjected to one-factor experimental analysis and response surface condition optimization, the optimal preparation process for SPI-Cur nanoparticles was determined to be: protein amount concentration of 50 mg/mL, curcumin addition mass concentration of 0.4 mg/mL, and pH-driven combination of pH value adjusted back from 13.0 to 7.0. By the optimal process obtained SPI-Cur nanoparticles were evaluated in terms of the particle size, ζ -potential, PDI dispersibility index, appearance and morphology, Fourier infrared spectroscopy (FTIR) and x-ray diffraction, it was concluded that curcumin was successfully loaded into the SPI nanocomplexes and was captured in an amorphous form in the soybean isolate protein matrix. In addition, the stability analysis results concluded that SPI could effectively improve the thermal and gastrointestinal stability of curcumin, and had a better protective effect on curcumin. This study provides an optimal process for the preparation of SPI-Cur nanoparticles by pH-driven method and also shows that SPI can be used as a delivery matrix for hydrophobic bioactives.

Keywords pH-driven; soybean isolate protein; curcumin; response surface methodology; stability