

pH 驱动法制备豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒及其结构表征

任杰¹, 卢知浩¹, 吴晗硕¹, 曲令航², 焦芯茹³, 刘文颖^{4*}, 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 北京工业大学环境与生命学部 北京 100124

³ 北京农学院食品科学与工程学院 北京 100096

⁴ 中国农业大学工学院 北京 100083

摘要 姜黄素的水溶性较差且稳定性低,阻碍了其广泛应用。以植物蛋白为姜黄素的输送载体,可以有效提高其溶解性和稳定性。采用 pH 驱动法,利用豌豆蛋白(PPI)实现姜黄素的纳米包封,通过单因素实验考察 pH 组合、姜黄素质量浓度和豌豆蛋白质量浓度对豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒装载率的影响。以装载效率、负载量为指标,通过响应面法优化 PPI-Cur 纳米颗粒的制备工艺,得到 PPI-Cur 纳米颗粒的最优制备工艺,即:pH 组合为 pH 13 和 pH 8,姜黄素质量浓度为 0.455 mg/mL,豌豆蛋白质量浓度为 43.64 mg/mL。对最优工艺制备的 PPI-Cur 纳米颗粒,从粒径、 ζ 电位、外观形貌、紫外光谱和二级结构进行系统表征,结果显示 PPI-Cur 纳米颗粒的平均粒径为 (254.5±9.0)nm, ζ 电位为 (-39.7±0.14)mV,PPI-Cur 纳米颗粒体系稳定,姜黄素与豌豆蛋白之间存在络合作用,PPI-Cur 纳米颗粒的二级结构发生变化, β -折叠由 33.6%显著减少至 25% ($P<0.05$),无规卷曲从 23%显著增至 31% ($P<0.05$)。研究结果为 pH 驱动方法制备 PPI-Cur 纳米复合物提供了最优工艺,也为植物蛋白基输送系统的开发应用提供了参数依据。

关键词 pH 驱动法; 豌豆蛋白; 姜黄素; 结构表征

文章编号 1009-7848(2024)10-0215-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.020

姜黄素是从姜黄属植物中提取的一种天然的亲脂性多酚^[1],已被证明具有多种潜在的健康益处,包括抗氧化^[2]、抗癌^[3]、抗菌^[4]和抗炎^[5]等生物活性,在医药和食品领域受到广泛关注。姜黄素的水溶性差,化学稳定性差,生物利用度低,阻碍了其广泛应用^[6]。寻找提高姜黄素水溶性和化学稳定性的方法至关重要。在以往研究中,提出了许多应对策略,例如:利用乳液、纳米颗粒、脂质体、微胶囊和胶束等纳米递送系统来包裹姜黄素^[7]。这些递送系统主要由天然聚合物制备,例如:将姜黄素与无机颗粒、多糖、蛋白质等纳米颗粒络合,来提高姜黄素的水分散性和化学稳定性^[2]。特别是基于蛋白质的纳米颗粒,因无毒和生物相容性,故被广泛用作姜黄素的纳米载体^[8],其制备简单,不需要复杂的设备和有毒化学品,同时,基于蛋白质的纳米颗

粒可以有效地提高姜黄素在无脂肪环境中的溶解度和生物利用度,使其适合应用于功能性食品和饮料系统^[9]。例如大豆分离蛋白-姜黄素^[10]、米糠蛋白-姜黄素^[11]、乳清分离蛋白-姜黄素^[12]等纳米颗粒,它们都可以大大提高姜黄素的水溶性、抗氧化活性和生物利用度。然而,关于豌豆蛋白在姜黄素递送系统中的研究鲜有报道。豌豆蛋白(PPI)具有与大豆蛋白、乳清蛋白同等重要的工业应用和学术研究价值,具有大量的必需氨基酸和良好的消化率,并且因其良好的乳化性能和简单的制备方法,故使豌豆蛋白成为皮克林稳定剂和制造新型结构纳米颗粒的候选者^[13]。此外,最近有研究报道豌豆蛋白可用于食品和饮料中^[14]。

本研究以影响豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒(PPI-Cur)装载效率的 3 大因素(姜黄素质量浓度、pH 组合、豌豆蛋白质量浓度)设计单因素实验,并用响应面法优化 PPI-Cur 纳米颗粒制备条件,得到以装载效率和负载量为评价指标的最优制备工艺。对最优工艺得到的 PPI-Cur 纳米颗粒,从粒径、 ζ 电位、外观形貌、紫外光谱和二级结构含量方面进行系统性表征,旨在为制备以豌豆

收稿日期: 2023-10-11

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: wenyingliu888@126.com

李国明 E-mail: gml_1002@163.com

蛋白为输送载体的纳米递送系统提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

豌豆蛋白粉(PPI, 蛋白质 \geq 72%), 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; 其它化学品和溶剂均为分析纯级。

SPS202F 分析天平、FE20K 型 pH 计, 梅特勒-托利多公司; 3K15 冷冻离心机, 德国 Sigma 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; UV-1780 紫外可见分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司; Chirascan V100 圆二色谱仪, 英国 Applied Photophysics 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 豌豆蛋白姜黄素纳米复合物的制备单因素实验 豌豆蛋白纳米复合物的制备采用 pH 驱动法, 参照 Chen 等^[8]的制备方法, 稍有修改。豌豆蛋白-姜黄素纳米复合物(PPI-Cur)制备的单因素实验是分别考察姜黄素质量浓度、pH 组合、豌豆蛋白质量浓度对豌豆蛋白纳米复合物中, 姜黄素装载效率和负载浓度的影响。

1) 配制质量浓度为 50 mg/mL 的豌豆蛋白悬液, 使用 1 mol/L NaOH 溶液将豌豆蛋白悬液分别调 pH 值为 9, 10, 11, 12, 13, 经 600 r/min 磁力搅拌 1 h 平衡后, 将不同质量浓度(0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/mL)的姜黄素晶体添加到豌豆蛋白分散液中, 并在室温下避光搅拌 30 min, 使用 1 mol/L HCl 溶液将豌豆蛋白悬液分别调 pH 值为 6, 7, 8, 避光磁力搅拌 1 h 后, 将样品溶液在 20 °C, 8 000 r/min 下离心 15 min, 取上清液透析过夜, 置于 4 °C 冰箱。

2) 分别配制质量浓度为 40, 50, 60 mg/mL 的豌豆蛋白悬液, 使用 1 mol/L NaOH 溶液将豌豆蛋白悬液分别调 pH 值为 12, 13, 经 600 r/min 磁力搅拌 1 h 平衡后, 添加姜黄素晶体(终质量浓度为 0.6 mg/mL), 并在室温下避光搅拌 30 min, 使用 1 mol/L HCl 溶液将样品 pH 值分别调至 7.0 和 8.0, 避光磁力搅拌 1 h 后, 将样品溶液在 20 °C, 8 000 r/min 下离心 15 min, 取上清液透析过夜, 置

于 4 °C 冰箱。

1.2.2 姜黄素装载效率(EE)和负载量(LC)的测定 对姜黄素装载效率(EE)和负载量(LC)的评估参照 Zhang 等^[15]的方法, 并稍有修改。使用无水乙醇从 PPI-Cur 纳米复合物中获得负载的姜黄素, 将 0.2 mL PPI-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 r/min, 25 °C 离心 15 min, 使用紫外可见分光光度计在波长 426 nm 处测定, 使用溶解在无水乙醇中的游离姜黄素(0~10 μ g/mL)绘制标准曲线 $y=0.0904x+0.004$ ($R^2=0.9973$), 计算姜黄素的负载质量浓度。此外, 使用 BCA 试剂盒(Beyotime)测定样品中可溶性蛋白的浓度, 用紫外可见分光光度计在波长 562 nm 处测定吸光度, 以 0.05~0.5 mg/mL 牛血清蛋白为标准品, 测定其吸光度并绘制标准曲线, 根据标准曲线计算样品的可溶性蛋白含量。使用式(1)和式(2)计算 EE 和 LC。

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

$$LC(\mu\text{g}/\text{mg}) = \frac{\text{姜黄素负载质量浓度}(\mu\text{g}/\text{mL})}{\text{豌豆蛋白中可溶性蛋白质量浓度}(\text{mg}/\text{mL})} \quad (2)$$

1.2.3 响应面优化试验设计 为进一步研究变量之间交互作用的影响关系, 以装载效率和负载量为指标, 使用响应面分析法筛选最优制备工艺。基于 Box-Behnken 采样原理, 选择对装载效率和负载量有影响的 3 个因素: pH 组合、姜黄素质量浓度、豌豆蛋白质量浓度, 设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验。试验样本共计 17 个, 其中中心组 5 个, 响应面试验因素水平见表 1, 响应面试验设计见表 2。

1.2.4 粒径 ζ 电位的测定 豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的平均粒径和 ζ 电位的测定参考 Liu 等^[7]的方法, 稍作修改。将 PPI、PPI-Cur 稀释到适当质量浓度后, 使用激光粒度仪测定平均粒径和 ζ 电位, 所有测量均在室温下进行, 并重复 3 次。

1.2.5 扫描电子显微镜 大豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的微观形貌观察参考 Yuan 等^[16]的方法, 稍作修改。使用扫描电子显微镜观察 PPI、PPI-Cur 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

表 1 响应面因素水平

编码	A (pH 值组合)	B (姜黄素质量浓度)/(mg/mL)	C (豌豆蛋白质量浓度)/(mg/mL)
-1	12-7	0.4	40
0	13-8	0.6	50
1	13-7	0.8	60

表 2 响应面试验设计

序号	A (pH 值组合)	B (姜黄素质量浓度)	C (豌豆蛋白质量浓度)
1	-1	-1	0
2	0	-1	-1
3	-1	0	-1
4	1	-1	0
5	1	1	0
6	-1	1	0
7	0	-1	1
8	1	0	-1
9	0	1	1
10	-1	0	1
11	0	0	0
12	1	0	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	1	-1

品的微观结构。

1.2.6 紫外光谱 使用紫外-可见分光光度计在波长 200~600 nm 范围,测定 Cur、PPI 和 PPI-Cur 的紫外吸收光谱,用去离子水或乙醇适当稀释样品,并用去离子水或无水乙醇作空白对照^[17]。

1.2.7 圆二色谱 圆二色谱表征参照 Jiang 等^[18]的方法,稍作修改。使用圆二色谱仪测定 PPI、PPI-Cur 的二级结构,制备蛋白质量浓度为 0.1 mg/mL 的样品溶液,置于光程为 0.1 cm 的石英皿中,设定步长 0.2 nm,带宽 2.0 nm,光谱范围 190~250 nm,扫描速度 200 nm/min。处理圆二光谱数据时需要将每个光谱扣除缓冲液的基线光谱,使用 Jasco 软件将得到的光谱数据值转换为摩尔椭圆率(θ),并

用 CDPro 软件对样品的 CD 光谱进行二级结构含量分析。

1.2.8 统计分析 所有试验均测定 3 次,使用 SPSS 20.0 软件分析,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 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 PPI-Cur 纳米颗粒制备的单因素实验分析

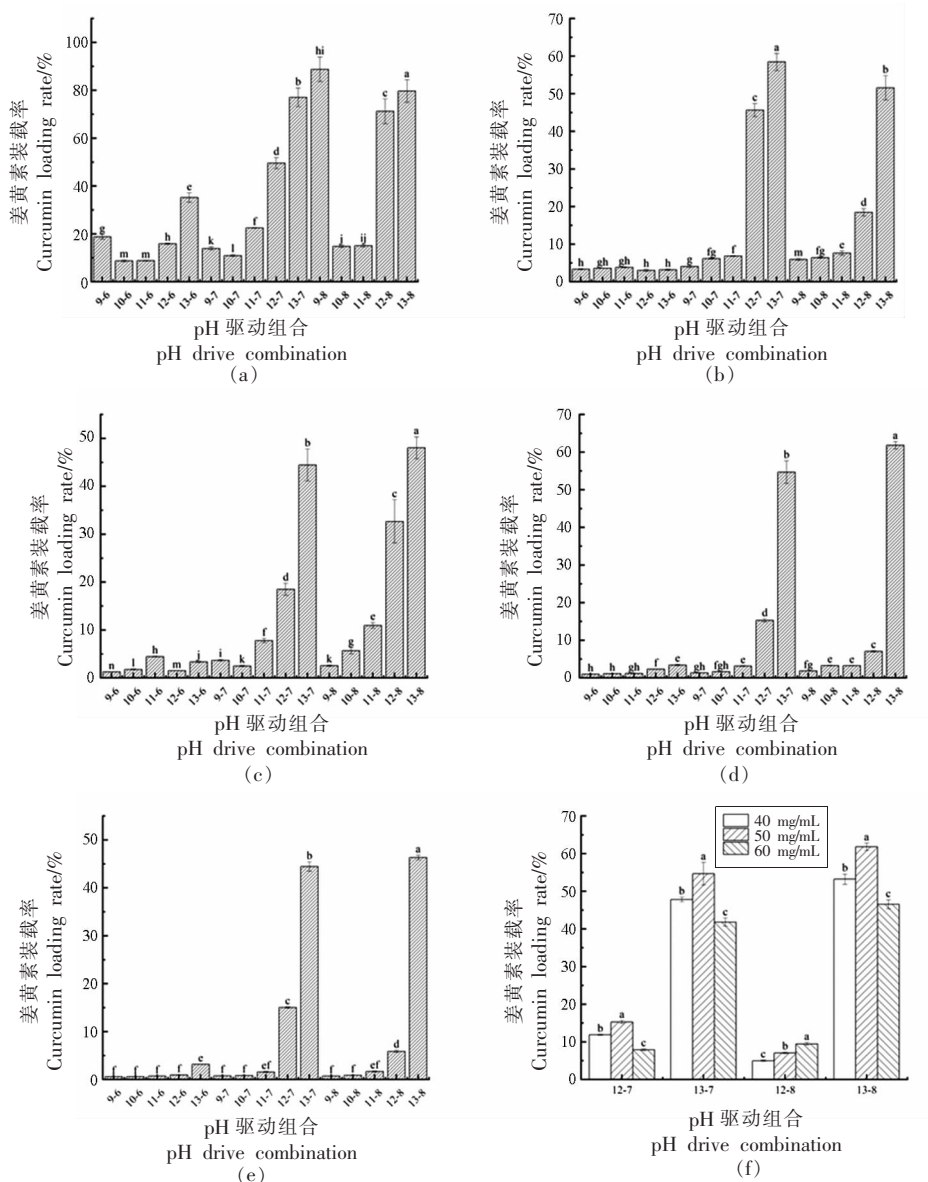
从 PPI-Cur 纳米颗粒制备的单因素实验结果可知,姜黄素的装载效率与 pH 组合、姜黄素质量浓度以及豌豆蛋白质量浓度密切相关。由图 1a~1e 可知,不同 pH 组合制备的 PPI-Cur 纳米颗粒,在 9-6,9-7,9-8,10-6,10-7,10-8,11-6,11-7,11-8,12-6 和 13-6 的 pH 组合制备条件下,姜黄素的装载率均极低,并且在不同姜黄素质量浓度(0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mg/mL)下,装载率仅不到 5%,该结果表明在这些 pH 组合环境下,不适合进行 PPI-Cur 纳米颗粒的制备,原因可能是在 pH 值为 9,10,11 的弱碱环境下,豌豆蛋白内部的疏水基团无法充分展开,从而使得豌豆蛋白与姜黄素未充分接触,减少了与姜黄素分子的接触面积,导致在固定时间内,附着的姜黄素减少,影响姜黄素负载;在 pH 值为 6 的弱酸性环境下,未形成“熔球”结构从而影响豌豆蛋白负载姜黄素^[9]。然而在 12-7,12-8,13-7,13-8 的 pH 组合制备条件下,PPI-Cur 表现出良好的装载率,并且显著高于其它 pH 组合($P < 0.05$)。pH 13 和 pH 8 组合在相同姜黄素添加量的条件下,各样品的姜黄素装载效率均高于其它 pH 组合,并且随着姜黄素添加量的变化,姜黄素装载效率均保持在 45%以上,相比之下,pH 组合 13-7 的各样品姜黄素装载效率略低于 13-8 的 pH 组合,此外,pH 组合 12-7、12-8 与上述两组的装载效率相比较低。因此,在响应面试验中选取 pH 组合为 12-7,13-7,13-8,作为 3 个水平进行优化。

由图 1a~1e 不同姜黄素添加量对装载率影响的结果得出,在 50 mg/mL 豌豆蛋白悬液中分别添加不同质量浓度(0.1~0.8 mg/mL)的姜黄素晶体,各 pH 驱动组合下装载率的变化趋势相似,其中

在姜黄素质量浓度为 0.1,0.2,0.4 mg/mL 时,姜黄素的装载效率较高,最高约 90%,随着姜黄素质量浓度提高至 0.6,0.8 mg/mL 时,姜黄素的装载效率下降,最高仅为 60%左右。然而,考虑到投入的姜黄素质量浓度过高,而能够进行自组装的豌豆蛋白质量浓度有限,使得豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的装载效率降低,可能在未来的工业化生产中造成浪费,因此,选取姜黄素质量浓度为 0.4,0.6,0.8

mg/mL 进行响应面优化试验。

由图 1f 可知,在 pH 值组合为 12-7,12-8,13-7,13-8 条件下,豌豆蛋白质量浓度为 50 mg/mL 的姜黄素装载率显著高于 40 mg/mL 和 60 mg/mL 的豌豆蛋白组 ($P<0.05$)。因此,在响应面优化试验中选取以 50 mg/mL 的豌豆蛋白质量浓度为浓度中心进行工艺优化。



注:在豌豆蛋白质量浓度(50 mg/mL)恒定下,分别添加姜黄素为 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)时,各 pH 组合下的姜黄素装载率结果;f 为姜黄素质量浓度(0.6 mg/mL)恒定,不同豌豆蛋白质量浓度下的姜黄素装载率结果。图中不同小写字母标注的样本具有显著性差异 ($P<0.05$)。

图 1 PPI-Cur 纳米颗粒制备的单因素实验结果

Fig.1 Single-factor test results for PPI-Cur nanoparticle preparation

2.2 响应面优化试验方差分析

在前期单因素实验的基础上, 建立响应面模型拟合及方差分析, 以 pH 组合(A)、姜黄素质量浓度(B)、豌豆蛋白质量浓度(C)为考察因素, 以装载率和负载量为评价指标, 利用 Design-Expert 10.0.1 软件对试验数据进行统计分析, 得到二次多项式回归方程: $Y_{\text{装载率}} = 58.878 + 4.57625A - 7.4175B + 0.38375C - 0.5175AB - 0.41AC -$

$0.4325BC - 27.329A^2 + 1.7285B^2 - 0.744C^2$; $Y_{\text{负载量}} = 6.452 + 0.4225A - 0.06125B - 0.25125C - 0.005AB + 0.09AC - 0.1025BC - 2.94475A^2 - 0.69225B^2 - 0.00225C^2$ 。为了更好检验模型的有效性, 对响应装载率和负载量预测数学模型分别进行方差统计分析, 回归模型的方差分析结果如表 3、4 所示。

表 3 装载率回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for load factor regression models

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	显著性
回归模型	3 776.32	9	419.59	11.64	0.0019	**
A	167.54	1	167.54	4.65	0.0680	
B	440.15	1	440.15	12.21	0.0101	*
C	1.18	1	1.18	0.033	0.8617	
AB	1.07	1	1.07	0.030	0.8680	
AC	0.67	1	0.67	0.019	0.8952	
BC	0.75	1	0.75	0.021	0.8895	
A ²	3 144.73	1	3 144.73	87.25	< 0.0001	**
B ²	12.58	1	12.58	0.35	0.5732	
C ²	2.33	1	2.33	0.065	0.8066	
残差	252.31	7	36.04			
失拟项	76.24	3	25.41	0.58	0.6601	
纯误差	176.08	4	44.02			
合计	4 028.64	16				

注: $R^2=0.9374, R_{\text{adj}}^2=0.8568, R_{\text{pred}}^2=0.6289$; *, 差异显著, $P<0.05$; **, 差异极显著, $P<0.01$ 。

表 4 负载量回归模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance for the loadings regression model

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	显著性
回归模型	41.76	9	4.64	47.26	< 0.0001	**
A	1.43	1	1.43	14.55	0.0066	**
B	0.030	1	0.030	0.31	0.5975	
C	0.51	1	0.51	5.14	0.0576	
AB	1.000×10^{-4}	1	1.000×10^{-4}	1.019×10^{-3}	0.9754	
AC	0.032	1	0.032	0.33	0.5836	
BC	0.042	1	0.042	0.43	0.5338	
A ²	36.51	1	36.51	371.94	< 0.0001	**
B ²	2.02	1	2.02	20.55	0.0027	**
C ²	2.132×10^{-5}	1	2.132×10^{-5}	2.171×10^{-4}	0.9887	
残差	0.69	7	0.098			
失拟项	0.36	3	0.12	1.45	0.3544	
纯误差	0.33	4	0.082			
合计	42.44	16				

注: $R^2=0.9838, R_{\text{adj}}^2=0.9630, R_{\text{pred}}^2=0.8530$; *, 差异显著, $P<0.05$; **, 差异极显著, $P<0.01$ 。

由表3装载率回归模型方差分析可知,回归模型的 F 值为11.64, P 值为0.0019(<0.01),表示该回归模型极显著,失拟项 F 值为0.58, P 值为0.6601(>0.05),表示失拟项不显著,此外,影响装载效率的不同工艺参数按贡献大小排序为:姜黄素质量浓度(B) $>$ pH组合(A) $>$ 豌豆蛋白质量浓度(C),模型的决定系数 R^2 为0.9374,校正后决定系数 $R_{adj}^2=0.8568$,表明模型具有高显著性。

由表4负载量回归模型方差分析可知,回归模型的 F 值为47.26, P 值 <0.0001 (<0.01),表示该回归模型极显著,失拟项 F 值为1.45, P 值为0.3544(>0.05),表示失拟项不显著,此外,影响负载量的不同工艺参数按贡献大小排序为:pH组合(A) $>$ 豌豆蛋白质量浓度(C) $>$ 姜黄素质量浓度(B),该模型的决定系数 R^2 为0.9838,说明模型拟合优度较高,并且 $R_{adj}^2=0.9630$,能够解释试验96.30%的响应值变化,并与预测相关系数 R_{pred}^2 相差不大,表明该模型具备较高预测精度。

综上所述,该模型对真实情况的模拟准确,此预测模型可以用于豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒制备工艺的优化。

2.3 PPI-Cur 纳米颗粒最佳制备工艺的验证试验

图2是pH组合、姜黄素质量浓度和豌豆蛋白质量浓度三因素之间的交互作用,对姜黄素装载率、负载量影响的响应面图和等高线图。由图2a和2d可知,pH组合和姜黄素质量浓度间的交互作用对装载率和负载量影响的等高线图马鞍状,这表明pH组合和姜黄素质量浓度间的交互作用对姜黄素的装载率和负载量影响显著。相较而言,pH组合和姜黄素质量浓度的交互作用对负载量的影响更显著。由图2b和2e可知,pH组合和豌豆蛋白质量浓度间交互作用对装载率和负载量影响不显著,等高线图未呈马鞍状。此外,姜黄素质量浓度和豌豆蛋白质量浓度间交互作用对装载率和负载量影响亦不显著,其等高线图未呈马鞍状。

为进一步确定最优解,以装载率、负载量最大为综合优化目标,根据Design-Expert 10.0.1软件运行结果,在pH组合、姜黄素质量浓度、豌豆蛋白质量浓度的共同影响下,最优制备工艺为:pH组合为13-8,姜黄素质量浓度为0.455 mg/mL,豌

豆蛋白质量浓度为43.64 mg/mL,在此条件下模型预测的装载率为64.648%,负载量为6.256 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。根据软件预测结果,结合实际工艺的可行性,取pH组合为13-8,姜黄素质量浓度为0.46 mg/mL,豌豆蛋白质量浓度为43 mg/mL,进行3次平行试验,得到平均装载率为62.55%,平均负载量为6.10 $\mu\text{g}/\text{mg}$,这与模型预测结果接近,表明基于该响应面模型分析优化装载率和负载量的工艺有效可行。此外,相关研究报道了游离姜黄素在PBS中的溶解度为88.54 ng/mL^[20]。而本研究得到的PPI纳米复合物中包裹的姜黄素在中性水溶液中的溶解度为287.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$,使姜黄素的水溶性显著提高。

2.4 PPI-Cur 纳米颗粒的粒径、 ζ 电位和微观形态

在纳米输送载体评价中,严格的将平均粒径为1~1 000 nm的颗粒,统称为纳米颗粒^[21]。纳米颗粒的尺寸对生物活性物质的输送特性以及对其生物利用度的增效作用密切相关。当载体的粒径小于500 nm时,可显著提高被输送的生物活性物质的生物利用度^[22]。表5为PPI-Cur纳米颗粒的平均粒径和 ζ 电位结果,该豌豆蛋白平均粒径为(1 619.0 \pm 34.22)nm,通过pH驱动法制备的豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的平均粒径为(254.5 \pm 9.00)nm,经过pH驱动法处理后颗粒粒径减小了约85%,这与Zhao等^[23]的试验结果相似。 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, ζ 电位的绝对值越高,体系越稳定^[24]。PPI的 ζ 电位为(-28.7 \pm 0.71)mV,通过pH驱动装载Cur后,PPI-Cur纳米粒子的 ζ 电位显著变为(-39.7 \pm 0.14)mV($P<0.05$),这一现象证明Cur与PPI蛋白分子相结合且PPI-Cur体系稳定。

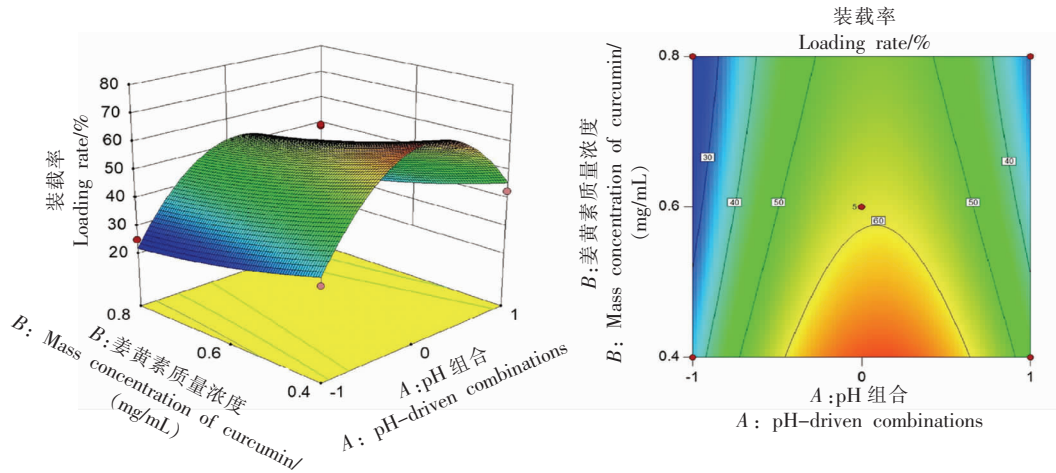
使用扫描电镜观察了PPI和PPI-Cur纳米颗粒的微观形貌,如图3所示,PPI颗粒呈规则的球状,结构紧凑,表面光滑,pH驱动包埋姜黄素后,PPI-Cur纳米颗粒变得更细小,尺寸约为200 nm左右,这与动态光散射(DLS)测量的平均粒径测定结果相似。

2.5 紫外光谱

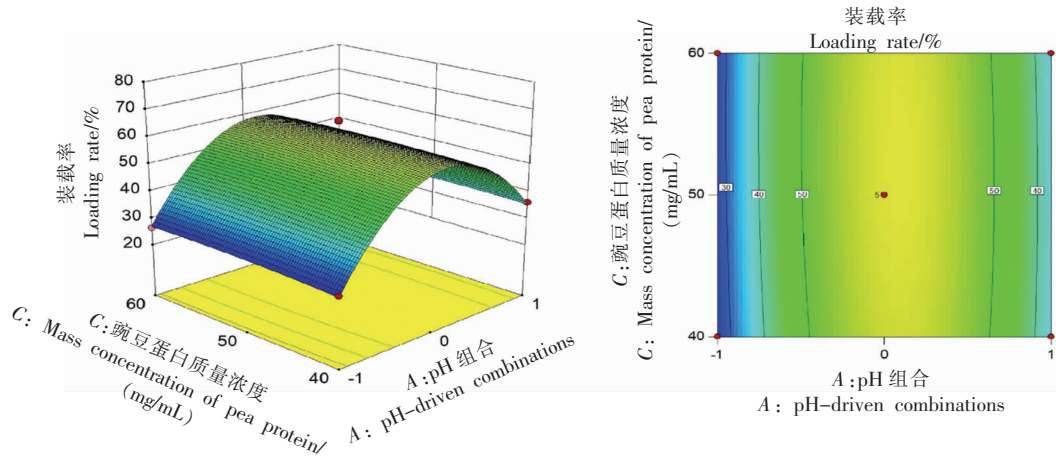
紫外吸收光谱法经常被用来分析蛋白质与小分子的相互作用以及微环境的变化。如图4所示PPI-Cur纳米颗粒的形成导致豌豆蛋白在波长

260~280 nm 处的吸收峰面积增加, 并发生蓝移, 这与 Li 等^[17]在大豆蛋白纳米包封姜黄素的研究中的结果一致。此外, 在波长 275 nm 处的吸收峰是豌豆蛋白中芳香氨基酸(Tyr 和 Trp)残基的特征吸收峰^[25], 姜黄素使 PPI-Cur 的光谱在波长 410 nm

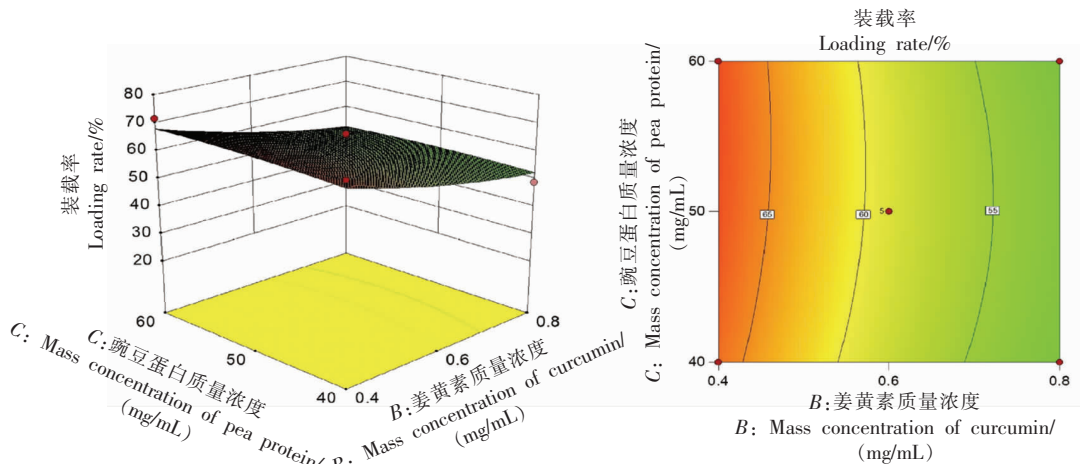
处出现了新的特征吸收峰, 对比单独的姜黄素在波长 430 nm 处的特征吸收峰, 该处吸收峰发生了蓝移, 这些现象表明豌豆蛋白与姜黄素之间存在络合作用。



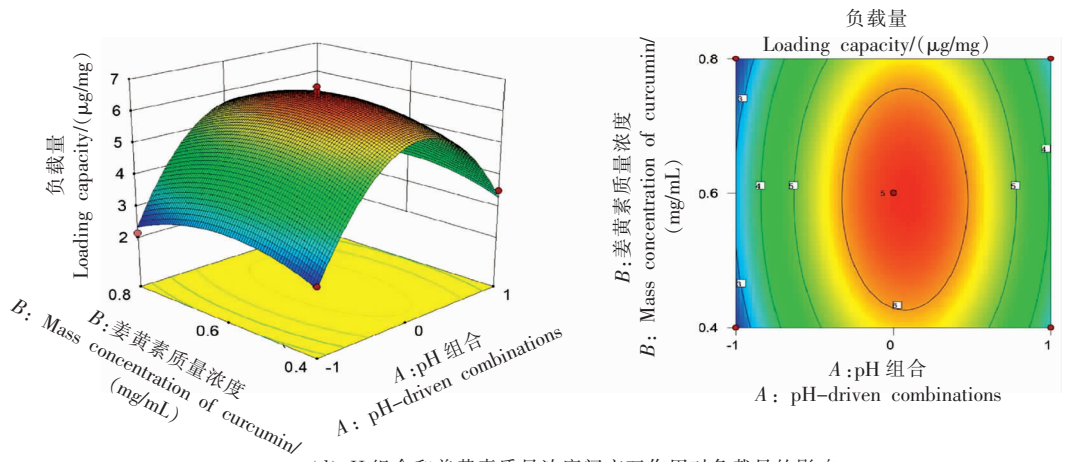
(a) pH 组合和姜黄素质量浓度间交互作用对装载率的影响



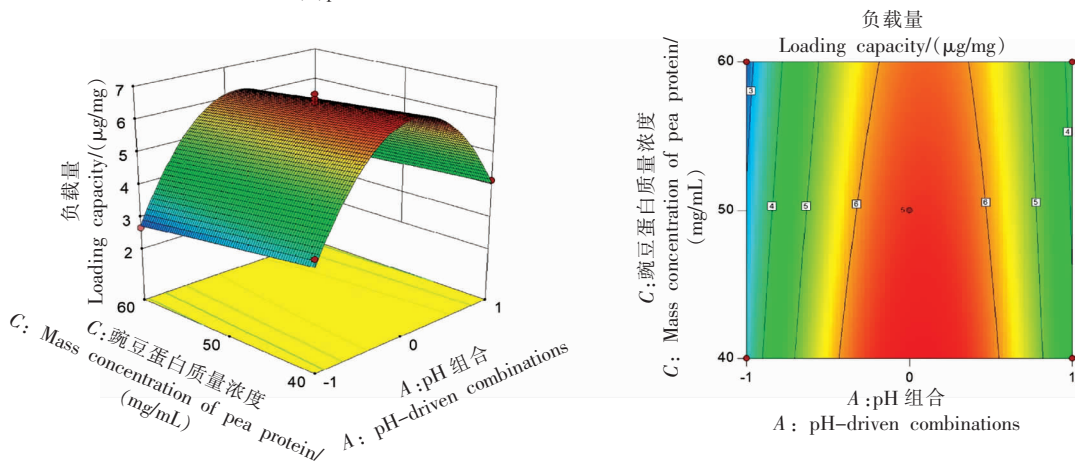
(b) pH 组合和豌豆蛋白质量浓度间交互作用对装载率的影响



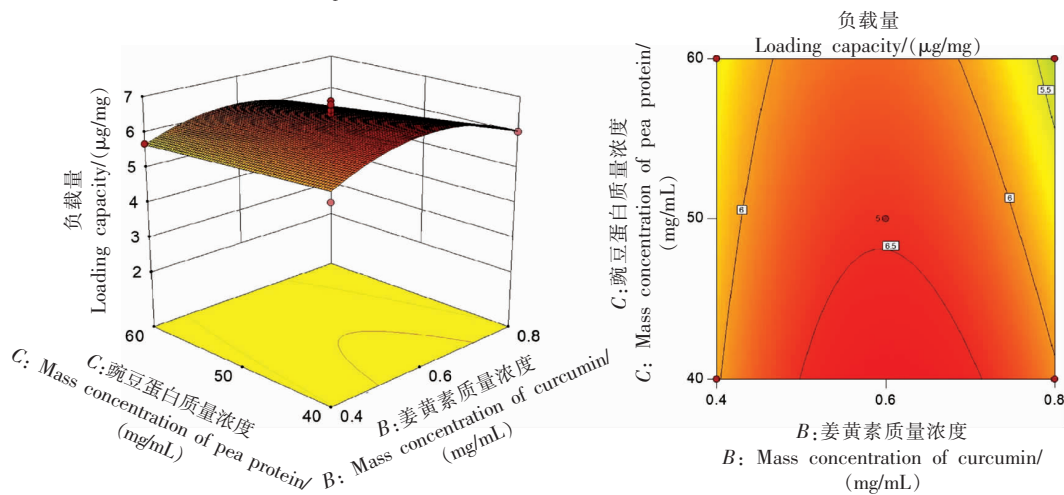
(c) 姜黄素质量浓度和豌豆蛋白质量浓度间交互作用对装载率的影响



(d)pH 组合和姜黄素质量浓度间交互作用对负载量的影响



(e)pH 组合和豌豆蛋白质量浓度间交互作用对负载量的影响



(f)姜黄素质量浓度和豌豆蛋白质量浓度间交互作用对负载量的影响

图2 pH 组合、姜黄素质量浓度和豌豆蛋白质量浓度对姜黄素装载率、负载量的影响

Fig.2 Effect of pH combination, curcumin mass concentration and pea protein mass concentration on loading rate and loading of curcumin

表 5 PPI、PPI-Cur 的平均粒径、 ζ 电位
Table 5 Mean particle size and ζ -potential of PPI, PPI-Cur

组别	平均粒径/nm	ζ 电位/mV
PPI	1 619.0 ± 34.22 ^a	-28.7 ± 0.71 ^b
PPI-Cur	254.5 ± 9.00 ^b	-39.7 ± 0.14 ^a

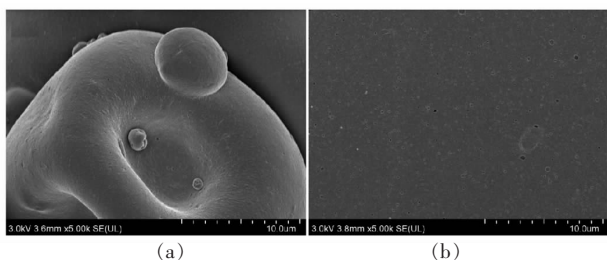


图 3 PPI(a)、PPI-Cur(b)的扫描电镜
Fig.3 Scanning electron microscopy of PPI (a), PPI-Cur (b)

2.6 圆二色谱

使用圆二色谱评价了 PPI、PPI-Cur 纳米颗粒的二级结构变化。由图 5a 可知,豌豆蛋白和豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒在波长 210~220 nm 处产生负峰,说明 β -折叠是豌豆蛋白主要的二级结构^[26],并且与豌豆蛋白对比,豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒受到 pH 驱动的影响,波峰发生了红移,表明 PPI 纳米颗粒的构象由无序向有序过度^[27]。利用

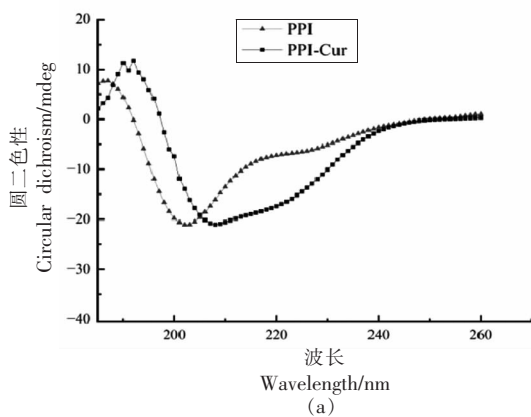


图 5 PPI 和 PPI-Cur 的圆二色谱 (a) 和二级结构 (b)

Fig.5 Circular dichroism (a) and secondary structure (b) of PPI and PPI-Cur

3 结论

通过单因素实验考察了 pH 组合、姜黄素质量浓度和豌豆蛋白质量浓度对豌豆蛋白-姜黄素纳

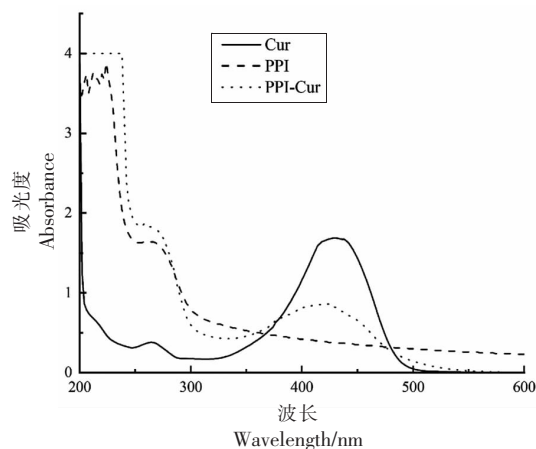
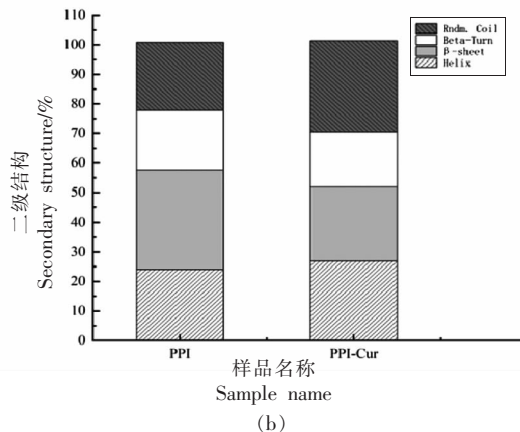


图 4 Cur、PPI 和 PPI-Cur 的紫外光谱
Fig.4 UV spectra of Cur, PPI and PPI-Cur

CDNN 软件计算了 PPI、PPI-Cur 纳米颗粒的二级结构含量,如图 5b 所示,相比于 PPI,当 Cur 被封装后,PPI 纳米颗粒的二级结构发生了一些改变, β -折叠由 33.6%显著减少至 25% ($P < 0.05$),无规卷曲从 23%显著增加至 31% ($P < 0.05$), α 螺旋增加了约 5%,该现象与 Li 等^[17]在大豆蛋白分离物纳米封装姜黄素的研究结果相似。



米颗粒装载率的影响,并以装载率、负载量最大为综合优化目标,利用响应面法筛选出 PPI-Cur 纳米颗粒的最优制备工艺:pH 组合为 13-8,姜黄素

质量浓度为 0.455 mg/mL, 豌豆蛋白质量浓度为 43.64 mg/mL。最佳工艺获得的 PPI-Cur 纳米颗粒的平均粒径为 (254.5±9.0)nm, 并且 ζ 电位显示了 PPI-Cur 纳米颗粒体系稳定, 扫描电子显微镜、紫外光谱和圆二色谱结果显示姜黄素被成功地负载到了 PPI 纳米复合物中, 并且姜黄素与豌豆蛋白之间存在络合作用。综上, 本研究为 PPI-Cur 纳米颗粒的制备提供了理论支撑, 也为深入开发植物蛋白基输送系统在递送生物活性化合物方面奠定了基础。

【致谢】

本文得到“中轻集团科技创新基金项目(ZQ2022JC-QN08)”的支持。

参 考 文 献

- [1] MAHMOUDI A, KESHARWANI P, MAJEED M, et al. Recent advances in nanogold as a promising nanocarrier for curcumin delivery [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2022, 215: 112481.
- [2] WANG Z J, XU J J, JI F Y, et al. Fabrication and characterization of soy β -conglycinin-dextran-polyphenol nanocomplexes; Improvement on the antioxidant activity and sustained-release property of curcumin[J]. Food Chemistry 2022, 395: 133562.
- [3] YU H L, HUANG Q R. Enhanced *in vitro* anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch [J]. Food Chemistry 2010, 119(2): 669-674.
- [4] WANG L, MU R J, LI Y, et al. Characterization and antibacterial activity evaluation of curcumin loaded konjac glucomannan and zein nanofibril films [J]. LWT, 2019, 113: 108293.
- [5] YI J, PENG G F, ZHENG S J, et al. Fabrication of whey protein isolate-sodium alginate nanocomplex for curcumin solubilization and stabilization in a model fat-free beverage[J]. Food Chemistry, 2021, 348: 129102.
- [6] HASELI S, POURMADADI M, SAMADI A, et al. A novel pH-responsive nanoniosomal emulsion for sustained release of curcumin from a chitosan-based nanocarrier: Emphasis on the concurrent improvement of loading, sustained release, and apoptosis induction[J]. Biotechnology Progress, 2022, 38(5): e3280.
- [7] 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.
- [8] CHEN F P, LI B S, TANG C H. Nanocomplexation between curcumin and soy protein isolate: Influence on curcumin stability/bioaccessibility and *in vitro* protein digestibility [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(13): 3559-3569.
- [9] MOHAMMADIAN M, SALAMI M, MOMEN S, et al. Enhancing the aqueous solubility of curcumin at acidic condition through the complexation with whey protein nanofibrils[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 902-914.
- [10] LIU C, YANG X Q, WU W, et al. Elaboration of curcumin-loaded rice bran albumin nanoparticles formulation with increased *in vitro* bioactivity and *in vivo* bioavailability [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 834-842.
- [11] TAGHAVI H, MOHAMMADIAN M, SALAMI M. Complexation of curcumin with whey protein isolate for enhancing its aqueous solubility through a solvent-free pH-driven approach[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43: e14227.
- [12] TANG C H. Nanocomplexation of proteins with curcumin: From interaction to nanoencapsulation (A review)[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 109: 106106.
- [13] HADIDI M, BOOSTANI S, JAFARI S M. Pea proteins as emerging biopolymers for the emulsification and encapsulation of food bioactives[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 126: 107474.
- [14] BOUKID F, ROSELL C M, CASTELLARI M. Pea protein ingredients: A mainstream ingredient to (re) formulate innovative foods and beverages[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110: 729-742.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] LI H Y, ZHANG X H, ZHAO C R, et al. Entrapment of curcumin in soy protein isolate using the pH-driven method: Nanoencapsulation and formation mechanism[J]. *LWT*, 2022, 153: 112480.
- [18] JIANG W, WANG Y Y, MA C C, et al. Pea protein isolate-inulin conjugates prepared by pH-shift treatment and ultrasonic-enhanced glycosylation: Structural and functional properties[J]. *Food Chemistry*, 2022, 384: 132511.
- [19] 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: 7576-7583.
- [20] LIU Y J, CAI Y X, YING D Y, et al. Ovalbumin as a carrier to significantly enhance the aqueous solubility and photostability of curcumin: Interaction and binding mechanism study[J]. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018, 116: 893-900.
- [21] 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.
- [22] ACOSTA E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2009, 14(1): 3-15.
- [23] ZHAO Y L, HAN X X, YIN H H, et al. Preparation and characterisation of curcumin-loaded pea protein-zein nanocomplexes using pH-driven method[J]. *Int J Food Sci Technol*, 2022, 57(6): 3589-3603.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] YANG Y X, WANG Q M, LEI L, et al. Molecular interaction of soybean glycinin and β -conglycinin with (-)-epigallocatechin gallate induced by pH changes[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 108: 106010.
- [27] MA G Q, TANG C Y, SUN X J, et al. The interaction mechanism of β -casein with oligomeric proanthocyanidins and its effect on proanthocyanidin bioaccessibility[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 113: 106485.

Preparation and Structural Characterization of Pea Protein-Curcumin Nanoparticles by pH-Driven Method

Ren Jie¹, Lu Zhihao¹, Wu Hanshuo¹, Qu Linghang², Jiao Xinru³, Liu Wenying^{4*}, Li Guoming^{1*}
(¹Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015

²Department of Environment and Life Sciences, Beijing University of Technology, Beijing 100124

³College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 100096

⁴College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract The poor water solubility and instability of curcumin hinders its widespread application. The use of plant proteins as delivery vehicles for curcumin can effectively improve its solubility and stability. A pH-controlled method was used to realise the nanoencapsulation of curcumin using pea protein (PPI), and the effects of pH combination, quality concentration of curcumin and quality concentration of pea protein on the loading rate of pea protein-curcumin nanoparticles were investigated by one-way experiments. Taking the loading efficiency and loading amount as indicators, the preparation process of PPI-curcumin nanoparticles was optimised by response surface methodology experiments, and the optimal preparation process of PPI-curcumin nanoparticles was obtained, i.e. the pH combinations of pH 13 and pH 8, the mass concentration of curcumin at 0.455 mg/mL, and the mass concentration of pea protein at 43.64 mg/mL. The PPI-Cur nanoparticles prepared by the optimal process were then systematically characterized in terms of particle size, ζ -

potential, appearance and morphology, UV spectra and secondary structure changes. The results showed that the average particle size of the PPI-Cur nanoparticles was (254.5 ± 9.0) nm, the ζ -potential was (-39.7 ± 0.14) mV, the PPI-Cur nanoparticle system was stable, and the complex interaction between curcumin and pea protein complexation existed, and the secondary structure of PPI-Cur nanoparticles changed, with a significant decrease in β -folding from 33.6% to 25% ($P < 0.05$) and a significant increase in random curling from 23% to 31% ($P < 0.05$). The results provide an optimal process for the preparation of PPI-Cur nanocomplexes by pH-driven methods and a parametric basis for the development and application of plant protein-based delivery systems.

Keywords pH-driven method; pea protein; curcumin; structural characterization

《中国食品学报》2025年征订启事

《中国食品学报》(月刊,ISSN 1009-7848,CN 11-4528/TS)是中国科协主管、中国食品科学技术学会主办的学术期刊,是代表中国食品科技发展水平,反映食品科学技术及其交叉领域新概念、新成果、新进展以及学术水平,为我国食品科技工作者广泛认可的权威学术期刊,连续多年被中国科协评为社会效益与出版质量优秀期刊。属中国科技核心期刊和中文核心期刊,目前已被国内外众多著名文献检索机构收录,如:美国《工程索引》(EI)、美国《化学文摘》(CA)、英国《食品科学与技术文摘》(FSTA)、荷兰《文摘与引文数据库》(Scopus)、日本科学技术振兴机构(中国)数据库(JSTChina)、国际农业与生物科学中心(CABI)数据库、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊(核心库)、中信所国家工程技术图书馆、中国知网、万方、维普、超星、世界期刊影响力指数(WJCI)报告收录期刊、《食品科学与工程领域高质量科技期刊分级目录》T1类期刊等。

《中国食品学报》刊载内容主要有:食品及食品工业发展相关的原辅料、工艺、包装、机械、检测、安全、流通、综合利用等方面的研究报告,以及国内外食品科技发展动态等方面的综述文章。辟有特约专栏(约稿)、名家论坛(约稿)、青年论坛(约稿)、基础研究、营养与功能、加工与制造、贮藏与保鲜、分析与检测、研究进展等栏目。欢迎国内外食品及相关专业领域的科研人员踊跃订阅。

定 价: 60元/期,全年12期,共计720元(含邮资)

联 系 人: 蒋老师

联系电话: 010-65265376 转 831

传 真: 010-65264731

邮 箱: chinaspbx@vip.163.com

通讯地址: 北京市海淀区阜成路北三街8号9层(邮编100048)