

豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的稳定性及抗氧化活性

任杰¹, 卢知浩¹, 吴晗硕¹, 曲令航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北京工业大学环境与生命学部 北京 100124

³中国农业大学工学院 北京 100083)

摘要 保持和增加生物活性物质的稳定性和生物效价是功能性食品研发的关键。采用 pH 驱动法,以豌豆蛋白作为包埋材料进行豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒(PP-Cur)的制备,并评价其稳定性及其抗氧化性。以姜黄素保留率为评价指标,研究 PP-Cur 纳米颗粒在不同温度、光照条件以及模拟胃肠道条件下的稳定性,对 ABTS 自由基的清除作用。采用 FRAP 法测定其总抗氧化能力。结果表明,在 75,85 °C 和 95 °C 下处理 2 h 后 PP-Cur 中姜黄素的保留率显著高于游离姜黄素的保留率;在紫外光下照射 3 h 后 PP-Cur 纳米颗粒中的姜黄素的保留率仍为 (89.9±1.95)%,显著高于游离姜黄素 ($P<0.05$);胃肠道模拟消化后 PP-Cur 纳米颗粒中的姜黄素的保留率仍保持为 (94.38±1.93)%,显著高于游离姜黄素经胃肠道模拟消化后的保留率 ($P<0.05$);PP-Cur 纳米颗粒 ABTS 自由基清除能力为 0.119 mol TE/g, DPPH 自由基清除率为 71.27%, FRAP 值为 0.019 mol FeSO₄/g,因此,豌豆蛋白的包封作用可以保护姜黄素并保持和提高姜黄素的抗氧化能力。结论:用豌豆蛋白包封姜黄素可以提高姜黄素的稳定性和抗氧化活性,提示豌豆蛋白可作为疏水生物活性物质的递送基质。

关键词 pH 驱动; 豌豆蛋白; 姜黄素; 稳定性; 抗氧化活性

文章编号 1009-7848(2024)11-0118-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.11.012

蛋白质因其结构的多样性、生物可降解性和良好的生物相容性,已成为多种应用领域中的重要材料。蛋白质在脂溶性生物活性物质的包封、乳化以及稳定性提升方面具有显著优势。例如,蛋白质的两亲性特征使其能够有效地形成乳液,增强脂溶性物质的水溶性和生物利用度^[1]。此外,蛋白质的良好的乳化性和稳定性使其能够在改善生物活性物质的溶解性、稳定性以及生物效价等方面发挥重要作用,尤其是在功能性食品和药物递送系统中得到越来越广泛的应用^[2-3]。

近年来,蛋白质纳米复合物作为一种有效的递送载体,已被证明能显著提高脂溶性生物活性物质的稳定性和生物效价。在这些研究中,植物蛋白因其来源广泛、价格低廉且具有较低的过敏性,成为生物活性物质递送系统中的理想选择。大豆蛋白、豌豆蛋白、玉米醇溶蛋白和卵清蛋白等植物蛋白被广泛应用于食品工业和制药领域^[4-7]。尤其是豌豆蛋白,其具有较强的乳化性、较低的过敏

性、高生物可利用性和丰富的氨基酸组成,在食品、营养品及功能性材料领域表现出显著的潜力。近年来,豌豆蛋白逐渐成为替代传统蛋白质(如大豆蛋白和乳清蛋白)的优选材料,特别是在乳液稳定性、营养物质包封、控制性释放以及营养强化方面的研究得到了大量关注^[8-11]。豌豆蛋白纳米复合物在脂溶性生物活性物质递送中展现出良好的潜力,先前的研究显示,豌豆蛋白可以与多种脂溶性物质(如白藜芦醇、胡椒碱等)形成稳定的纳米复合物,从而显著提升其生物利用度和抗氧化活性^[9]。然而,虽然已有研究表明豌豆蛋白能够改善脂溶性生物活性物质的溶解性和稳定性,但关于豌豆蛋白与姜黄素复合物 (Pea protein-curcumin nanoparticles, PP-Cur) 在稳定性、生物利用度和增效性方面的系统性研究仍较为匮乏。

姜黄素作为一种具有强大生物活性的天然植物化合物,因其良好的抗炎、抗氧化和抗肿瘤特性,受到了广泛关注。然而,姜黄素在水中的溶解度低、生物利用度差以及化学稳定性差,严重限制了其在药物开发和功能性食品中的应用^[12]。为解决这些问题,研究者们开发了多种姜黄素递送系统,包括纳米颗粒、乳液、微胶囊等,其中,利用蛋

收稿日期: 2023-11-27

第一作者: 任杰,男,硕士生

通信作者: 刘文颖 E-mail: wenyngliu888@126.com

李国明 E-mail: gml_1002@163.com

白质基纳米载体提高姜黄素的稳定性和生物利用度已成为热点研究方向之一。例如, Yi 等^[10]采用热处理制备豌豆蛋白纳米纤维, 并利用其封装白藜芦醇, 显著改善了水溶性和化学稳定性, 提示豌豆蛋白可作为纳米载体应用于改善疏水性营养成分水溶性和生物效价方面。虽然已有研究探索了豌豆蛋白与某些生物活性物质的复合, 但对于豌豆蛋白与姜黄素的复合及其在不同环境条件下的稳定性、增效性和生物利用度提升方面的研究仍然较为有限。

基于此, 本研究将系统评估豌豆蛋白与姜黄素复合纳米颗粒(PP-Cur)的稳定性和增效性。具体来说, 本研究通过 pH 驱动法制备 PP-Cur 纳米颗粒, 并分别从热稳定性、紫外稳定性和模拟胃肠道稳定性等多个维度对其进行评估。此外, 通过测定 PP-Cur 纳米颗粒在抗氧化活性方面的表现, 包括 ABTS、DPPH 自由基清除能力和铁离子还原能力, 评价其在抗氧化活性方面的增效作用, 旨在为姜黄素的高效递送系统开发提供理论依据, 并为功能性食品中的生物活性物质应用提供新的技术方案。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

豌豆蛋白粉(PP, $\geq 72\%$ 蛋白), 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 U/mg), 美国 Sigma 公司; 胰蛋白酶(≥ 250 NFU/mg), 美国 Solarbio 公司; 总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 法)、DPPH 自由基清除能力试剂盒、总抗氧化能力检测试剂盒(FRAP 法), 上海碧云天生物技术有限公司; 所有其它化学品和溶剂均为分析纯级。

Sevency S20 pH 酸度计, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司; SPS202F 分析天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; 3K15 冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; Spectra MR 多功能酶标仪, 美国 Dynex 公司; DL-CJ-2NDI 洁净工作台, 中国东联哈尔滨仪器制造公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 中国普瑞斯机械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒的制备 参照 Chen 等^[13]的方法制备豌豆蛋白纳米复合物。将商用豌豆蛋白粉(PP)分散于去离子水中并搅拌 2 h, 得到质量浓度为 50 mg/mL 的豌豆蛋白溶液。将其放置在 4 °C 过夜, 以便完全水合, 然后搅拌复温 2 h, 用 1 mol/L NaOH 将豌豆蛋白分散液的 pH 值调至 13 并平衡 1 h, 将姜黄素晶体添加到豌豆蛋白分散液中, 并在室温下搅拌 30 min, 然后将溶液 pH 值调至 8.0 并搅拌 1 h, 在 8 000×g 下离心 15 min。对所得上清液进行透析处理(3 000 u), 储存在冰箱(4 °C)中或冷冻干燥以进行后续测定, 视为 PP-Cur。

1.2.2 PP-Cur 的热稳定性 PP-Cur 纳米颗粒的热稳定性评价参照 Yuan 等^[14]的方法并稍有修改。在锥形瓶中分别加入 20 mL 新制备的 PP-Cur、游离姜黄素溶液, 将锥形瓶置于 75, 85, 95 °C 恒温水浴锅中水浴加热 2 h, 每隔 0.5 h 取样 0.2 mL, 用乙醇稀释萃取后, 在波长 426 nm 处测量吸光度值, 以起始时的吸光值为 100%, 其它时间的吸光值与起始值的比值即为姜黄素的保留率, 通过计算姜黄素在热环境下的保留率, 判断姜黄素的热稳定性。

1.2.3 PP-Cur 的光化学稳定性 PP-Cur 纳米颗粒的光化学稳定性评价参照 Zhan 等^[15]的方法并稍有修改。取 PP-Cur、游离姜黄素样品各 10 mL 置于培养皿中, 暴露在波长 340 nm 的紫外光中 3 h, 每 0.5 h 取 0.2 mL 样品, 用乙醇稀释萃取后, 在波长 426 nm 处测量吸光度值, 以起始时的吸光值为 100%, 其它时间的吸光值与起始值的比值即为姜黄素的保留率, 通过计算姜黄素在紫外光照射下的保留率, 判断姜黄素的紫外稳定性。

1.2.4 PP-Cur 的胃肠道稳定性 PP-Cur 纳米颗粒的胃肠道稳定性评价参考 Cheng 等^[16]的方法并稍有修改。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 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 250 mL, 视为肠模拟消化液。将 Cur、PP-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

萃取并在波长 426 nm 处检测样品吸光度值。经模拟肠液消化,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,用同样的方法检测样品中姜黄素的 OD 值,最后通过式(1)和式(2)计算姜黄素在模拟胃液和肠中的稳定能力,判断其生物可利用能力。

姜黄素保留率(%) = 经胃液消化后姜黄素的 OD 值/消化前姜黄素的 OD 值×100 (1)

姜黄素生物可利用能力(%) = 经肠液消化后姜黄素的 OD 值/消化前姜黄素的 OD 值×100 (2)

1.2.5 PP-Cur 的 ABTS 自由基清除能力 使用总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 法)评估 Cur(游离)、PP 和 PP-Cur 纳米颗粒在相同浓度下的 ABTS 自由基清除活性。用 Spectra MR 多功能酶标仪在波长 734 nm 处测定吸光度,以 0.15~1.5×10⁻³ mol/L Trolox 为标准品,计算样品的 ABTS 自由基清除活性。

1.2.6 PP-Cur 的 DPPH 自由基清除能力 使用 DPPH 自由基清除能力试剂盒评估 Cur(游离)、PP 和 PP-Cur 复合物在相同浓度下的 DPPH 自由基清除活性。用酶标仪在波长 517 nm 处检测各样品的吸光度,用式(3)计算样品的 DPPH 自由基清除率。

DPPH 自由基清除率(%) = [1-(A_{样品}-A_{对照})/A_{空白}]×100 (3)

式中:A_{样品}为样品组的吸光度值;A_{对照}为对照组的吸光度值;A_{空白}为空白组的吸光度值。

1.2.7 PP-Cur 的铁离子还原能力 使用总抗氧化能力检测试剂盒(FRAP 法)评估 Cur(游离)、PP 和 PP-Cur 复合物在相同浓度下的抗氧化能力。用 Spectra MR 多功能酶标仪在波长 593 nm 处测定吸光度,以 0.15~1.5×10⁻³ mol/L FeSO₄ 为标准品,测定其吸光度并绘制出标准曲线,根据标准曲线计算样品的总抗氧化能力。

1.2.8 统计分析 所有测定均进行 3 次,使用 SPSS 20.0 软件进行分析,数值以平均值±标准差表示;使用 Origin 2021 进行相关图表的绘制。

2 结果与分析

2.1 热稳定性

纳米颗粒输送系统提供的有效保护依赖于颗

粒结构的完整性,可确保生物活性物质在输送过程中的稳定性和有效释放,载有功能成分的纳米颗粒在加入食品时可能会经过热处理,因此,更好的热稳定性将促进其商业应用。本文研究了游离姜黄素和 PP-Cur 纳米颗粒在 75, 85 °C 和 95 °C 下姜黄素的保留率,结果如图 1 所示。在 75 °C 下处理 30 min 后,有近 40% 的游离姜黄素受热分解,经过 2 h 后,游离姜黄素的保留率仅为 43.12%,然而,PP-Cur 复合纳米颗粒在 75 °C 下处理 30 min 后,姜黄素保留率可达 87.36%,处理 2 h 后,姜黄素保留率仍为 63.82%,显然,与游离姜黄素相比,PP-Cur 纳米颗粒中的姜黄素的热稳定性显著提高($P<0.5$),这表明姜黄素的活性基团在 PP 的疏水腔中得到有效保护,免受热诱导降解或氧化^[6,17]。85 °C 的热处理 30 min 导致超过 50% 的姜黄素受热分解,经过 2 h 的热处理后,姜黄素保留率仅为 13.38%,95 °C 热处理的结果与 85 °C 热处理结果基本一致。随着温度的升高,姜黄素的受热分解速率升高,这与 Yuan 等^[14]研究的结果相似。Sun 等^[18]和 Jiang 等^[19]也发现,玉米-紫胶复合颗粒和 α-紫胶胶团可以改善姜黄素的热稳定性,提示包封可以通过创建物理屏障或提供不敏感的原位环境来保护姜黄素免受热降解。综上所述,在热处理条件下,豌豆蛋白可以有效地保护其所包裹的姜黄素分子,减缓其受热分解的速率,这是因为 PP 与姜黄素之间形成氢键可以提高配合物的熔点,从而提高了 PP-Cur 纳米颗粒的热稳定性^[20]。

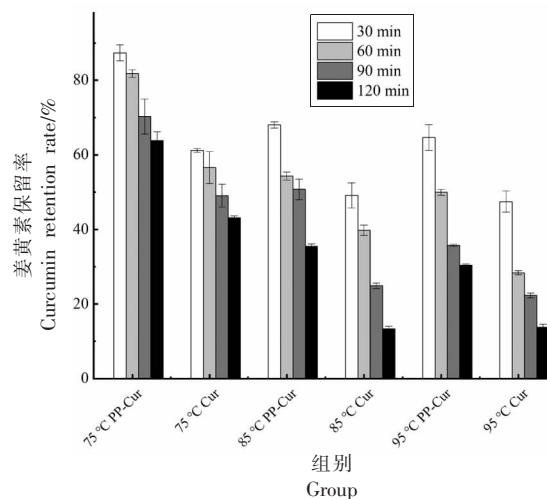


图 1 游离姜黄素和包封姜黄素热稳定性

Fig.1 Thermal stability of free and encapsulated curcumin

2.2 光化学稳定性

姜黄素对环境的敏感性限制了它的应用,光化学降解是其丧失生物活性的原因之一。通过对 PP-Cur 纳米颗粒进行光稳定性评价,可为其广泛应用提供理论依据。将 PP-Cur 纳米复合物中姜黄素在紫外光照射下的保留率随时间变化的情况进行拟合,发现 PP-Cur 纳米颗粒中的姜黄素和游离姜黄素在紫外光照射下的保留率和处理时间的数据均符合一阶降解动力学模型^[21],结果如图 2 所示。PP-Cur 纳米颗粒和游离姜黄素的动力学方程分别为 $y = 100 \times 0.83699 + 100 \times (1 - 0.83699) \times \exp(-0.00563t)$, $y = 100 \times 0.44802 + 100 \times (1 - 0.44802) \times \exp(-0.00817t)$, 拟合度 R^2 分别为 0.9713 和 0.99456, 均趋向于 1, 表明了 PP-Cur 纳米复合物的光化学稳定性动力学情况完全符合该模型所代表的动力学规律, 此外, 游离姜黄素的降解速率常数(k)为 0.00817 min^{-1} , 然而包埋物中姜黄素的降解速率常数(k)为 0.00563 min^{-1} , 这表明了通过 PP 对姜黄素进行包埋后, 抑制了姜黄素的光降解。

由图 2 可知, 经过紫外光照射 3 h 后, 游离姜黄素的保留率下降至 $(56.65 \pm 0.97)\%$, 这是因为它们的多酚和不饱和结构在紫外光的照射下被迅速降解^[22], 然而将游离姜黄素装入纳米粒子形成 PP-Cur 纳米颗粒后, 姜黄素的保留率仍为 $(89.9 \pm 1.95)\%$, 其光稳性显著 ($P < 0.05$) 提高, 这是因为姜黄素通过与 PP 的疏水口袋结合, 有效地隔离了紫外线, 并且纳米颗粒的小粒径可能会保护姜黄素分子中的活性基团, 这使得紫外线更难以进入复合物内部, 从而提高了它的光稳定性^[23]。此外, 紫外光可以被豌豆蛋白中的芳香族氨基酸和双键吸收, 从而使姜黄素具有更高的抗光降解稳定性^[24]。除了阻挡光或吸收的作用外, 蛋白质还可能通过与姜黄素形成配合物来改变姜黄素中活性基团的化学稳定性, 从而可能影响姜黄素的光化学稳定性^[25]。

2.3 胃肠道模拟消化稳定性

通过体外模拟消化试验评估了游离姜黄素和包封姜黄素(PP-Cur)的胃肠道模拟消化稳定性。如图 3 所示, 游离姜黄素经过胃液消化后保留率为 $(63.38 \pm 0.946)\%$, 再经肠液消化后保留率显著下降至 $(58.83 \pm 4.59)\%$ ($P < 0.05$), 然而包埋后的姜

黄素经过胃液消化后保留率为 $(96.9 \pm 2.83)\%$, 再经肠液消化后保留率仍保持为 $(94.38 \pm 1.93)\%$, 显著高于游离姜黄素经胃肠道模拟消化后的保留率 ($P < 0.05$), 这表明络合可大幅提高姜黄素的稳定性, 促进姜黄素在胃肠道消化中的持续释放。Zhang 等^[26]在超声组装大豆肽纳米颗粒的研究中也得到了类似的结果。此外, 包封后的姜黄素稳定性提高, 降解率低于 7%, 这可能与 PP 的抗消化特性密切相关, PP-Cur 纳米颗粒能够很好地保护疏

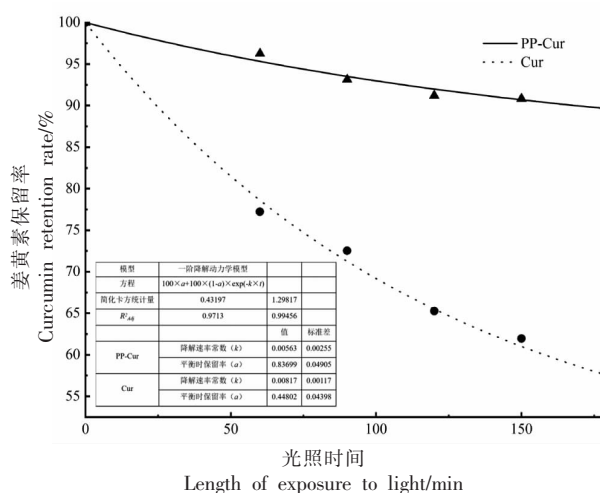
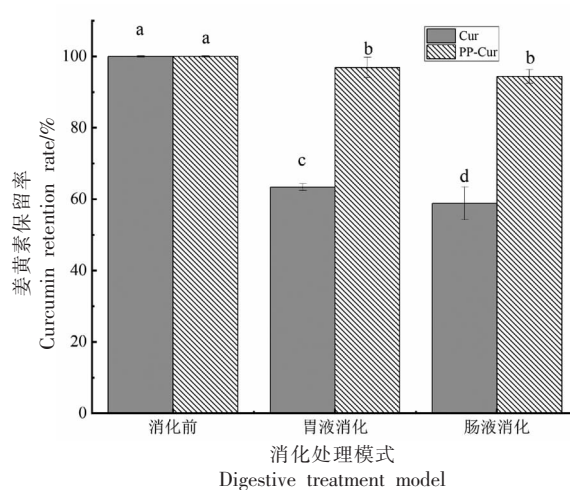


图 2 游离姜黄素和包封姜黄素光化学稳定性拟合曲线
Fig.2 Fitting curves for photochemical stability of free and encapsulated curcuminoids



注: 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
图 3 游离姜黄素和包封姜黄素体外模拟胃肠消化的稳定性

Fig.3 Stability of free and encapsulated curcumin in simulating gastrointestinal digestion *in vitro*

水核心的姜黄素不被消化酶释放或降解^[14]。因此,豌豆蛋白可作为一种潜在的纳米载体,用于调控生物活性物质在肠道中的释放。

2.4 抗氧化活性评估

姜黄素被证明是良好的抗氧化剂,可以作为自由基和分子氧化剂的清除剂^[27]。为了评估PP载体是否能保持和增加姜黄素的抗氧化活性,进行了ABTS、DPPH自由基清除能力和铁离子还原能力考察。

2.4.1 ABTS自由基清除能力 游离姜黄素、PP-Cur纳米颗粒和豌豆蛋白的ABTS自由基清除能力如图4所示,水中游离姜黄素的ABTS自由基清除能力仅有0.008 mol TE/g,然而经过pH驱动包埋后的姜黄素(PP-Cur)的ABTS自由基清除能

力极显著性地($P<0.01$)提高至0.119 mol TE/g,这种增强是由于包裹在具有亲水表面的PP纳米颗粒中的疏水姜黄素可以更好地分散在水中,提高了姜黄素在水中的溶解度,增加了姜黄素与自由基的接触,这验证了姜黄素溶解度的提高确实增加了其潜在的生物活性。Pan等^[28]和Gomez-Estaca等^[29]的研究也表明了包封姜黄素水溶性/分散性的提高大大提高了其抗氧化活性。此外,观察到豌豆蛋白(PP)的ABTS自由基清除能力为0.024 mol TE/g,这可能是由于豌豆蛋白中的半胱氨酸和甲硫氨酸具有巯基,可以通过还原作用起到抗氧化剂的作用,以及缺乏电子的自由基可以从芳香族氨基酸残基中获取质子,从而稳定这些自由基,降低其氧化反应的活性^[30]。

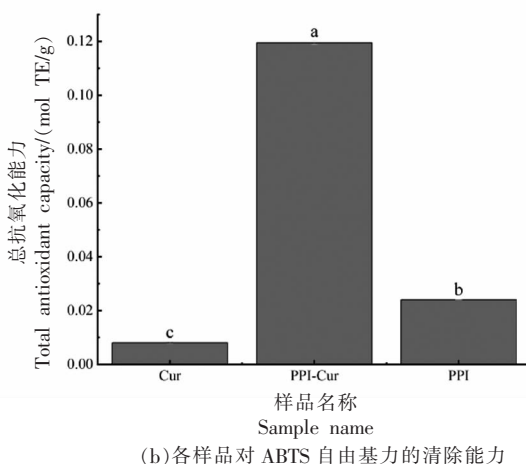
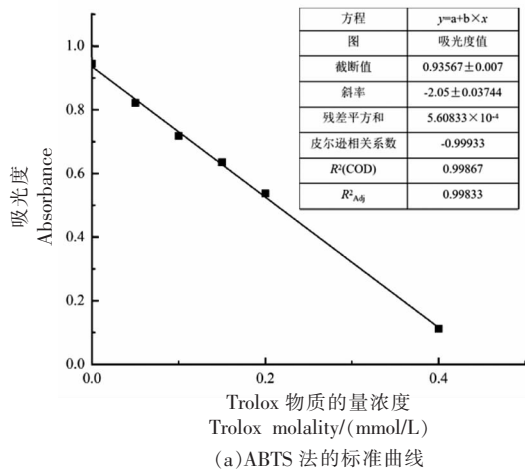


图4 游离姜黄素和包封姜黄素 ABTS 自由基清除能力

Fig.4 ABTS radical scavenging capacity of free curcumin and encapsulated curcumin

2.4.2 DPPH自由基清除能力 如图5所示,PP表现出较弱的DPPH自由基清除能力,清除率仅为5.41%,然而PP包封Cur后,PP-Cur纳米颗粒的DPPH自由基清除能力达到了71.27%,略高于游离的Cur,未显著提高其DPPH自由基清除能力,原因是DPPH自由基清除试验是在有机溶剂中进行,这使得游离Cur的溶解度提高,并且该试验的乙醇介质可能阻碍Cur与PP络合,使得Cur在测定介质中可能游离,因此PP对其抗氧化活性没有显著影响^[31]。综上,PP-Cur纳米复合物可以提高和保持姜黄素的抗氧化能力。

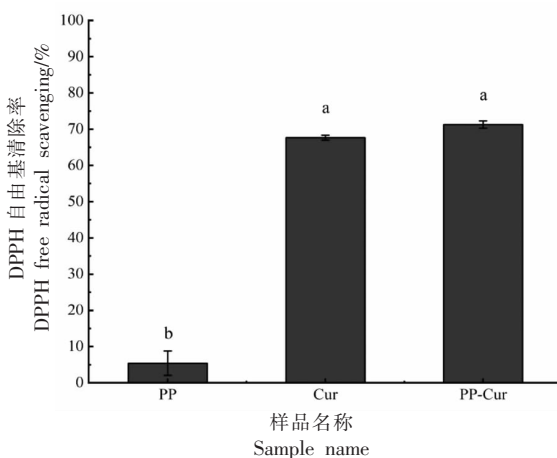


图5 游离姜黄素和包封姜黄素 DPPH 自由基清除能力

Fig.5 DPPH radical scavenging capacity of free curcumin and encapsulated curcumin

2.4.3 铁离子还原能力 使用 FRAP 法评估了游离姜黄素、PP-Cur 纳米颗粒和豌豆蛋白的铁离子还原能力,如图 6 所示,姜黄素铁离子还原能力仅为 0.003 mol FeSO₄/g,然而 PP-Cur 纳米颗粒的铁离子还原能力极显著性地 ($P<0.01$) 提高到 0.019 mol FeSO₄/g,这种趋势与 ABTS 自由基清除能力的结果相同,其原因是 PP-Cur 纳米颗粒使得姜黄素可以更好地分散在水中,提高了姜黄素在水中的溶解度,此外,观察到豌豆蛋白也具有一定的铁离子还原能力,这是因为豌豆蛋白中的半胱氨酸和甲硫氨酸含有巯基,具有一定的还原作用^[30],这

也是 PP-Cur 纳米颗粒抗氧化活性显著提高的原因之一。

综上所述,本文采用了 3 种方法评估了豌豆蛋白载体是否能保持和增加姜黄素的抗氧化活性,结果表明 PP-Cur 纳米颗粒比游离姜黄素具有更高的抗氧化活性,其主要归因于纳米复合物的包封使姜黄素具有良好的溶解度。此外,豌豆蛋白的包封对姜黄素的抗氧化活性具有增效性,这是因为蛋白质自身的一些氨基酸残基(Tyr、Trp、Met 和 Lys)具有一定的还原作用^[32]。

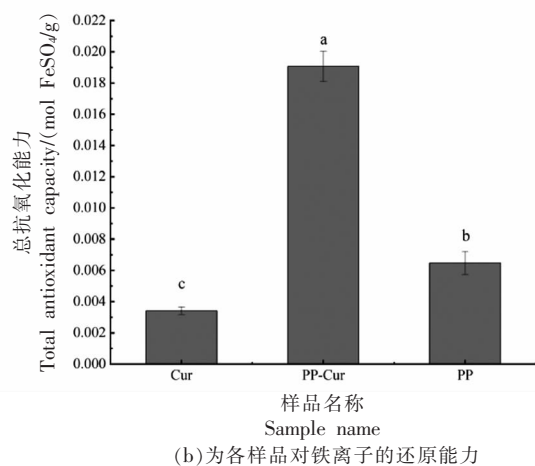
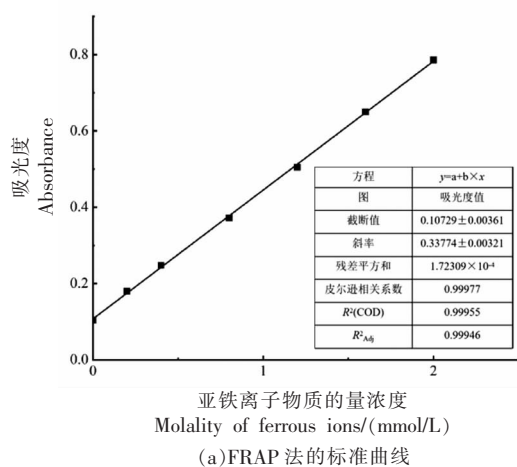


图 6 游离姜黄素和包封姜黄素铁离子还原能力

Fig.6 Ability of free and encapsulated curcumin to reduce iron ions

3 结论

本研究通过 pH 驱动法制备豌豆蛋白-姜黄素纳米颗粒,分析其稳定性和抗氧化活性,结果表明,在热处理条件下,豌豆蛋白可以有效地保护姜黄素分子,显著减缓其受热分解的速率($P<0.05$);在紫外光照射条件下,豌豆蛋白包埋姜黄素后,抑制了姜黄素的光降解,显著提高了姜黄素的光化学稳定性($P<0.05$);在胃肠道模拟消化条件下,姜黄素和豌豆蛋白的络合可大幅提高姜黄素的稳定性,促进姜黄素在胃肠道消化中的持续释放。此外,豌豆蛋白的包封可以保持和提高姜黄素的抗氧化能力,这归因于 PP-Cur 纳米颗粒使得姜黄素具有良好的溶解度,并且包埋材料自身结构性质增强了姜黄素的抗氧化活性。因此,包封是一种潜在的保护姜黄素、保持和提高姜黄素溶解性、生物活

性的策略,通过创建物理屏障或提供不敏感的原位环境来保护姜黄素免受热降解、光降解和消化酶降解。

【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] SARKAR A, DICKINSON E. Sustainable food-grade Pickering emulsions stabilized by plant-based particles[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2020, 49: 69-81.
- [2] PAN K, CHEN H, DAVIDSON P M, et al. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: Physical

- and pntilisterial properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(7): 1649–1657.
- [3] SHPIGELMAN A, COHEN Y, LIVNEY Y D. Thermally-induced β -lactoglobulin-EGCG nanovehicles: Loading, stability, sensory and digestive-release study[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 29(1): 57–67.
- [4] ZHONG M M, SUN Y F, SUN Y D, et al. Soy lipophilic protein self-assembled by pH-shift combined with heat treatment: Structure, hydrophobic resveratrol encapsulation, emulsification, and digestion[J]. *Food Chemistry*, 2022, 394: 133514.
- [5] YI J, HE Q Y, PENG G F, et al. Improved water solubility, chemical stability, antioxidant and anticancer activity of resveratrol via nanoencapsulation with pea protein nanofibrils[J]. *Food Chemistry*, 2022, 377: 131942.
- [6] MENG R, WU Z 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.
- [7] HU G, BATOOL Z, CAI Z X, et al. Production of self-assembling acylated ovalbumin nanogels as stable delivery vehicles for curcumin[J]. *Food Chemistry*, 2021, 355: 129635.
- [8] 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.
- [9] HINDERINK E B A, SCHRODER A, SAGIS L, et al. Physical and oxidative stability of food emulsions prepared with pea protein fractions[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 146: 111424.
- [10] YI J, HUANG H M, LIUY X, et al. Fabrication of curcumin-loaded pea protein-pectin ternary complex for the stabilization and delivery of β -carotene emulsions[J]. *Food Chemistry*, 2020, 313: 126118.
- [11] DJOULLAH A, SAUREL R. Controlled release of riboflavin encapsulated in pea protein microparticles prepared by emulsion-enzymatic gelation process[J]. *Journal of Food Engineering*, 2021, 292: 110276.
- [12] TAN Y, ZHOU H, MCCLEMENTS D J. Application of static *in vitro* digestion models for assessing the bioaccessibility of hydrophobic bioactives: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 122: 314–327.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] GUO Q, SHU X, HU Y Y, et al. Formulated protein-polysaccharide-surfactant ternary complexes for co-encapsulation of curcumin and resveratrol: Characterization, stability and *in vitro* digestibility [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 111: 106265.
- [18] SUN C X, XU C Q, MAO L K, et al. Preparation, characterization and stability of curcumin-loaded zein-shellac composite colloidal particles[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 656–667.
- [19] JIANG P, HUANG J, BAO C, et al. Enzymatically partially hydrolyzed α -lactalbumin peptides for self-assembled micelle formation and their application for coencapsulation of multiple antioxidants[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(49): 12921–12930.
- [20] PENG H L, XIONG H, LI J H, et al. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol[J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 23–28.
- [21] SUN X Y, XU H, WU B H, et al. A first-order kinetic model for simulating the aerobic degradation of municipal solid waste[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 329: 117093.
- [22] 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.
- [23] CUEVAS-BERNARDINO J C, LEYVA-GUTIERREA F M A, VERNON-CARTER E J, et al. Formation of biopolymer complexes composed of pea protein and mesquite gum - Impact of quercetin addition on their physical and chemical stability[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 77: 736-745.
- [24] XIAO J, NIAN S, HUANG Q R. Assembly of kafirin/carboxymethyl chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 51: 166-175.
- [25] 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.
- [26] 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 Food Chemistry*, 2018, 66(16): 4208-4218.
- [27] MUSTAFA Y. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent[J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 20091-20112.
- [28] PAN K, ZHONG Q X, BAEK S J. Enhanced dispersibility and bioactivity of curcumin by encapsulation in casein nanocapsules[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(25): 6036-6043.
- [29] GOMEZ-ESTACA J, BALAGUER M P, LOPE-CARBALLO G, et al. Improving antioxidant and antimicrobial properties of curcumin by means of encapsulation in gelatin through electrohydrodynamic atomization[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 70: 313-320.
- [30] ŽILIC S, AKILLOĞLU G, SERPEN A, et al. Effects of isolation, enzymatic hydrolysis, heating, hydration and Maillard reaction on the antioxidant capacity of cereal and legume proteins[J]. *Food Research International*, 2012, 49(1): 1-6.
- [31] LUCAS-ABELLÁN C, MERCADER-ROS M T, ZAFRILLA M P, et al. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(6): 1255-1260.
- [32] HU Y, HE C X, JIANG C J, et al. Complexation with whey protein fibrils and chitosan: A potential vehicle for curcumin with improved aqueous dispersion stability and enhanced antioxidant activity[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 104: 105729.

Stability and Antioxidant Activity of Pea Protein-curcumin Nanoparticles

Ren Jie¹, Lu Zhihao¹, Wu Hanshuo¹, Qu Linghang², Liu Wenyong^{3*}, 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 Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract Maintaining and increasing the stability and bioefficacy of bioactive substances is the key to the development of functional foods. In this study, the pH-driven method was used to prepare pea protein-curcumin nanoparticles (PP-Cur) using pea protein as the embedding material and evaluate their stability and their antioxidant properties, using curcumin retention rate as the evaluation index to study the PP-Cur nanoparticles at different temperatures, light conditions. The stability of PP-Cur nanoparticles under different temperature, light conditions and simulated gastrointestinal conditions was investigated. Its scavenging effect on ABTS free radicals was examined and its total antioxidant capacity was determined by FRAP method. The results showed that the retention rate of curcumin in PP-Cur was significantly higher than that of free curcumin after treatment at 75, 85 and 95 °C for 2 h. The retention rate of curcumin in PP-Cur nanoparticles after irradiation under UV light for 3 h was still (89.9±1.95)%, which was significantly higher than that of free curcumin ($P<0.05$), and that after simulated digestion in gastrointestinal tract, the retention rate of curcumin in PP-Cur nanoparticles remained (94.38±1.93)%, which was significantly higher than that of free curcumin after gastrointestinal

simulated digestion ($P < 0.05$). In addition, it was concluded that PP-Cur nanoparticles with ABTS radical scavenging capacity of 0.119 mol TE/g, DPPH radical scavenging rate of 71.27% and FRAP value of 0.019 mol FeSO₄/g, the encapsulation of pea protein could maintain and improve the antioxidant capacity of curcumin. In summary, the results demonstrated that pea protein encapsulated curcumin could effectively improve the stability and antioxidant activity of curcumin and could be used as a delivery matrix for hydrophobic bioactive substances.

Keywords pH-driven; pea protein; curcumin; stability; antioxidant activity