张园园, 刘思萱, 郑华, 等. 二氢槲皮素/双蛋白复合物的制备、表征及抗氧化活性 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(14): 36−43. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025120148

ZHANG Yuanyuan, LIU Sixuan, ZHENG Hua, et al. Preparation, Characterization and Antioxidant Activityof Dihydroquercetin/Dual-protein Complexes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(14): 36−43. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025120148

·特邀主编专栏—植物基食品原料基础研究、前沿技术创新及其健康绿色产品开发（客座主编：于寒松、张健、李健）·

二氢槲皮素/双蛋白复合物的制备、表征及抗氧化活性

张园园[1], 刘思萱[1], 郑　华[2], 王晨阳[1], 尹雨蒙[1], 李　哲[1], 钟姝凝[1], 李玉邯[1,*]

（1.吉林工商学院粮食工程与营养科学学院, 吉林长春 130507;
2.通化市中心医院, 吉林通化 134099）

摘　要: 为构建高效、稳定的二氢槲皮素（Dihydroquercetin，DHQ）递送载体，以大豆分离蛋白（Soy isolate protein，SPI）和乳清分离蛋白（Whey isolate protein，WPI）为基质，通过调控 SPI 和 WPI 质量比为 100∶0、70∶30、50∶50、30∶70、0∶100 制备 DHQ/双蛋白复合物，系统探究其理化特性、结构特征及抗氧化活性。结果表明，SPI 与 WPI 复配比例对复合物特性具有显著调控作用，当 SPI 与 WPI 质量比为 30∶70 时，复合物粒径为 171.2 nm，分散系数为 0.22，Zeta 电位绝对值>30 mV，形成了稳定胶体体系；同时 DHQ 的包封率和载药量分别高达 96.06%±1.4%、0.96%±0.01%。结构表征证实，DHQ 可通过氢键、疏水作用等非共价相互作用与双蛋白结合形成稳定复合物，随 WPI 占比升高，复合物中 α-螺旋含量显著升高，β-折叠含量则显著降低（P<0.05）。抗氧化实验表明，各配比复合物自由基清除能力均显著优于 DHQ（P<0.05），其中 SPI 占比≥50% 的复合物自由基清除能力>80%。本研究通过调控 SPI 与 WPI 质量比，成功构建了 DHQ/双蛋白递送载体，当 SPI 与 WPI 质量比为 30∶70 时，复合物理化特性和包载效果最优。

关键词: 二氢槲皮素, 大豆分离蛋白, 乳清分离蛋白, 双蛋白复合物, 递送载体, 结构表征, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)14−0036−08　　本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025120148

Preparation, Characterization and Antioxidant Activity of Dihydroquercetin/Dual-protein Complexes

ZHANG Yuanyuan[1], LIU Sixuan[1], ZHENG Hua[2], WANG Chenyang[1], YIN Yumeng[1], LI Zhe[1], ZHONG Shuning[1], LI Yuhan[1,*]

（1.School of Grain Engineering and Nutritional Sciences, Jilin Business and Technology College, Changchun 130507, China;
2.Tonghua Central Hospital, Tonghua 134099, China）

Abstract: To construct an efficient and stable delivery carrier for dihydroquercetin (DHQ), DHQ/dual-protein complexes were prepared using soy protein isolate (SPI) and whey protein isolate (WPI) as matrices by adjusting the mass ratios of SPI to WPI at 100∶0, 70∶30, 50∶50, 30∶70, and 0∶100. The physicochemical properties, structural characteristics, and antioxidant activities of the complexes were systematically investigated. The results showed that the blending ratio of SPI to WPI significantly regulated the properties of the complexes. When the mass ratio of SPI to WPI was 30∶70, the particle size of

收稿日期: 2025−12−11

基金项目: 2025 年吉林省教育厅科学技术研究课题（JJKH20251232KJ）。

作者简介: 张园园（1983−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 活性蛋白与多酚互作产物功能特性及应用研究, E-mail: 20110019@jlbtc.edu.cn。

*** 通信作者:** 李玉邯（1980−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 1784498436@qq.com。

the complex was 171.2 nm, the polydispersity index was 0.22, and the absolute value of Zeta potential was higher than 30 mV, forming a stable colloidal system. Meanwhile, the encapsulation efficiency and loading capacity of DHQ reached 96.06%±1.4% and 0.96%±0.01%, respectively. Structural characterization confirmed that DHQ could bind to the dual-protein via non-covalent interactions such as hydrogen bonds and hydrophobic interactions to form stable complexes. With the increase of WPI proportion, the α-helix content in the complexes increased significantly, while the β-sheet content decreased significantly (P<0.05). Antioxidant assays indicated that the radical scavenging ability of all complexes were significantly superior to those of pure DHQ (P<0.05), and the radical scavenging rate of complexes with SPI proportion ≥50% was higher than 80%. In this study, DHQ/dual-protein delivery carriers were successfully constructed by regulating the mass ratio of SPI to WPI. The complex with SPI:WPI at 30∶70 exhibited the optimal physicochemical properties and encapsulation performance.

Key words: dihydroquercetin (DHQ); soy protein isolate (SPI); whey protein isolate (WPI); dual-protein complex; delivery carrier; structural characterization; antioxidant activity

二氢槲皮素（Dihydroquercetin, DHQ）别名花旗松素，是一种重要的二氢黄酮醇类化合物[1]。DHQ 多存在于道格拉斯冷杉树皮、落叶松及柑橘类水果等多种植物中[2]，尤其在吉林省长白山寒带百年落叶松松根中含量较高，是迄今为止发现的最强纯天然抗氧化剂之一，其具有良好的抗炎、抗癌、抗病毒等功能[2−3]。根据欧盟（EU）2015/2283 号法规，DHQ 可作为食品添加剂用于牛奶、奶酪等相关食品[4]。2021 年 DHQ 被国家卫生健康委员会批准为新食品原料，目前已作为健康补充剂及延长巧克力、奶粉等食品保质期的添加剂投入使用[5]。然而，DHQ 水溶性差、稳定性不佳且生物利用度低，限制了其在食品工业中的应用[3,6]。因此，亟待开展 DHQ 递送体系的相关基础研究。

大豆分离蛋白（Soy isolate protein, SPI）和乳清分离蛋白（Whey isolate protein, WPI）由多种复杂球状结构的蛋白组成[7]，兼具良好的生物相容性、乳化性与凝胶特性，二者不仅营养价值突出，还可通过非共价相互作用包埋、递送活性成分，显著提升黄酮类物质的水溶性、稳定性与生物利用度[6,8−9]。相较于单一蛋白载体，动植物双蛋白复合体系可通过分子协同组装与功能互补，进一步优化载体空间结构、提升包载能力与体系稳定性，更适配活性物质的高效递送需求[6]。同时，SPI 与 WPI 双蛋白载体的应用契合我国“双蛋白工程”中动植物蛋白协同利用的核心导向，符合食品营养强化与产业创新的发展方向。

当前国内外对 DHQ 的研究多聚焦于提取纯化、活性验证及功能应用等基础研究阶段[10]，而针对 DHQ 的食品级递送体系研究相对匮乏，尤其缺乏基于 SPI/WPI 双蛋白复合的高效递送载体构建、比例优化及机制解析。基于此，本研究以浓度为 2%（w/v）的 SPI/WPI 双蛋白为递送载体，通过调控二者配比制备 DHQ/双蛋白复合物，系统探究复合物的理化性质、结构特征及抗氧化活性，并结合分子对接分析 DHQ 与双蛋白的相互作用。本研究旨在为提升 DHQ 的食品适用性提供理论依据，为动植物双蛋白基活性物质递送系统的开发提供技术参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

乳清分离蛋白（纯度≥90%, 9410）　美国 Hilmar 公司；大豆分离蛋白（纯度≥90%, G805）　哈高科大豆食品有限责任公司；二氢槲皮素（纯度≥98%, B20539）、2,2-联氮-二（3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、8-苯胺-1-萘磺酸、溴化钾　源叶生物科技有限公司；其他试剂均为分析纯。

UV-2550 紫外可见分光光度计　PrekinElmer 企业管理（上海）有限公司；MOS-500 圆二色谱仪　法国 Bio-Logic 公司；NS-90Z 纳米粒度及电位分析仪　珠海欧美克仪器有限公司；Synergy HT 酶标仪　美国 BioTek 公司；SCIENTZ-18N 冷冻干燥机　宁波新芝生物科技股份有限公司；F-380 荧光分光光度计　天津港东科技股份有限公司；IRAffinity-1S 傅里变换红外光谱仪　日本株式会社岛津制作所；Sonifier-250D 超声波破碎仪　美国 Branson 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　SPI-WPI-DHQ 复合物的制备　参考赵茹[11]的方法，并稍作修改。将 SPI 和 WPI 粉末以 2%（w/v）的浓度分别溶解在超纯水中，室温下搅拌 2 h，使蛋白充分溶解，之后在 4 ℃ 条件下水合 12 h。用氢氧化钠将 SPI 溶液的 pH 调节至 12，搅拌 1.5 h 后，设置功率 200 W、振幅 30%，采用 5 s 开/5 s 关的脉冲超声模式，总超声时间 8 min，全程冰浴控温，避免样品受热变性。再使用盐酸将 SPI 溶液的 pH 调节至 7。将 WPI 溶液的 pH 也调节至 7 后，7000 r/min 离心 10 min 去除不溶解蛋白。将 SPI 和 WPI 按照质量比为 100∶0、70∶30、50∶50、30∶70、0∶100 的比例混合并搅拌 30 min。用无水乙醇溶解 DHQ，缓慢滴加进蛋白溶液中，使体系中 DHQ 的最终浓度为 0.02%（w/v），制得 SPI-WPI-DHQ 复合物。

1.2.2　粒径和 Zeta 电位的测定　用 pH 为 7 超纯水将所有复合物样品稀释至蛋白浓度为 0.2 mg/mL。采用纳米粒度及电位分析仪测定复合物的平均粒径、Zeta 电位和分散系数（Polydispersity index, PDI）。

1.2.3　浊度的测定　浊度的测定参考 Li 等[12]方法

并略作调整，所有复合物样品均用超纯水稀释 2 倍，设定波长为 600 nm，测定样品吸光度值。

1.2.4 包封率和载药量的测定 取新制备的复合物样品，于 12000 r/min 条件下离心 10 min，去除未包封的游离 DHQ 和不溶性蛋白聚集体。离心后取上清液用无水乙醇稀释 40 倍后，再次于 12000 r/min 条件下离心 20 min，去除蛋白沉淀，取上清液。采用已建立的标准曲线（y=0.0771x−0.0175，R^2=0.9991）在 289 nm 波长下测定吸光度并计算 DHQ 含量。用不含 DHQ 的双蛋白复合物为空白对照，按以上同样方法处理，扣除 SPI 与 WPI 在 289 nm 波长下的吸光度干扰。纳米复合物中 DHQ 的包封率（Encapsulation efficiency，EE）和载药量（Loading capacity，LC）按以下公式计算：

$$EE(\%) = \frac{C_{system}}{C_{total}} \times 100 \quad \text{式（1）}$$

$$LC(\%) = \frac{W_{system}}{W_{total}} \times 100 \quad \text{式（2）}$$

式中：C_{total} 表示体系中 DHQ 的总浓度，μg/mL；C_{system} 表示体系中去除游离 DHQ 后剩余 DHQ 的浓度，μg/mL；W_{system} 表示体系中去除游离 DHQ 后剩余 DHQ 的质量，g；W_{total} 表示体系中 SPI 和 WPI 的总质量，g。

1.2.5 傅里叶变换红外光谱法（FT-IR） 将冻干复合物与 KBr 以 1∶100 的质量比研磨成粉末，然后压制成 13 mm 薄片。以 4 cm^{-1} 的分辨率在 400~4000 cm^{-1} 范围内收集 FT-IR 光谱数据，并使用 Origin 25 软件标记峰值位置。

1.2.6 圆二色光谱 稀释复合物样品蛋白浓度为 0.2 mg/mL，设置扫描范围为 190~260 nm，扫描速度为 200 nm/min，光程为 0.1 cm，记录各样品的圆二色光谱图（Circular dichroism spectroscopy，CD），使用 CD Pro 软件对蛋白质二级结构的组成成分及相对含量进行拟合。

1.2.7 内源荧光和表面疏水性 稀释复合物样品蛋白浓度为 0.2 mg/mL，然后用荧光分光光度计测量样品的稳态内源荧光光谱。设置激发波长为 280 nm，发射光谱测定范围为 290~450 nm，狭缝宽度为 5 nm。采用 ANS 荧光探针评估样品的表面疏水性。将所有复合物中蛋白质浓度稀释到 0.4 mg/mL 后，取 4 mL 样品加入 20 μL 浓度为 8 mmol/L 的 ANS，避光孵育 15 min 后，分析样品的发射光谱，设置激发波长为 390 nm，发射波长范围为 400~600 nm。

1.2.8 分子对接 根据 WPI 与 SPI 的主要成分[13−14]，选用 β-Lg、Gly 代表 WPI 和 SPI 做分子对接。对接方法参考 Duan 等[15] 和 Zhang 等[16] 的研究，并稍作修改。β-Lg、Gly 蛋白晶体结构采用 HDOCK 对接获得（http://hdock.phys.hust.edu.cn/），经 Pymol 2.1 去除无关小分子后，再用 AutoDock Tools-1.5.6 删除水分子、添加氢原子并定义原子类型；小分子配体 DHQ 分子结构来自于 PubChem 数据库，经 Chem3D 通过加氢、结构优化、能量最小化处理。以 DHQ 为配体，β-Lg 与 Gly 为受体，设定 Grid Box 中心坐标（x=31.534，y=14.785，z=17.439）及长宽高 126×126×126，采用 AutoDock 软件的 Lamarckian 遗传算法（参数：群体规模 150、能量评估最大值 2500 万次、最大迭代次数 2000、交叉率 0.8、突变率 0.02、独立运行 200 次）进行分子对接，依据结合自由能筛选最优结构，通过 Pymol 2.1 软件可视化配体-受体结合作用。

1.2.9 抗氧化活性 复合物抗氧化活性的测定参照文献 [17] 的方法，对部分操作细节略作调整。

1.2.9.1 DPPH 自由基清除能力的测定 用甲醇配制 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液。将复合物稀释 10 倍后，取 50 μL 稀释样品分别与 150 μL DPPH 工作液混合（A_S），与 150 μL 甲醇混合（A_{S1}），另取 50 μL 甲醇与 150 μL DPPH 工作液混合做空白对照（A_0），室温避光反应 30 min 后，用酶标仪测量所有溶液在 517 nm 处的吸光度。DHQ（20 μg/mL）和抗坏血酸（20 μg/mL）做对照。根据公式（3）计算 DPPH 自由基清除能力：

$$\text{DPPH自由基清除能力}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_{s1}}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式（3）}$$

1.2.9.2 $ABTS^+$自由基清除能力的测定 ABTS 储备液的配制：将 7 mmol/L 的 ABTS 溶液与 4.95 mmol/L 过硫酸钾溶液按体积比 1∶1 混合，室温下避光反应 12 h，将 ABTS 储备液稀释使得在 734 nm 下的吸光度值为 0.70±0.02 进而得到 ABTS 工作液，每次使用前重新校准。将稀释 10 倍后的样品（50 μL）与 150 μL 活化的 ABTS 工作液混合（A_S），与 150 μL 超纯水混合（A_{S2}），另取 50 μL 超纯水与 150 μL ABTS 作液混合做空白对照（A_0），37 ℃ 避光孵育 0 min。在 734 nm 处测量所有样品的吸光度。DHQ（20 μg/mL）和抗坏血酸（20 μg/mL）做对照。根据公式（4）计算 $ABTS^+$自由基清除能力：

$$ABTS^+\text{自由基清除能力}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_{s2}}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式（4）}$$

1.3 数据处理

所有实验重复 3 次，并以平均值±标准差（$\bar{x}$±SD）表示。采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计学差异及相关性分析。采用单因素方差分析，方差齐性时采用 LSD 法多重比较，方差不齐时采用沃勒-邓肯法。

2 结果与分析

2.1 粒径和 Zeta 电位

复合物的粒径和分散系数结果如图 1 所示，随 WPI 比例从 0% 增至 100%，复合物粒径和分散系数

呈降低趋势，从 205.5 nm 降至 171.2 nm；PDI 从 0.39 降至 0.22。WPI 粒径最小，SPI 的粒径显著大于 WPI（P<0.05）。当 SPI 与 WPI 按照不同比例混合时，WPI 的小分子蛋白可填充 SPI 聚集体空隙形成空间位阻，且 WPI 中 β-乳球蛋白的疏水口袋能与 SPI 球蛋白疏水核作用，削弱 SPI 因疏水作用导致的聚集[7]。同时，WPI 的均匀分散特性可“稀释”SPI 的多分散性，SPI 与 WPI 间氢键、疏水作用的协同使复合颗粒分布更集中。DHQ 可通过羟基与蛋白形成氢键[18]，芳环嵌入蛋白疏水区域，进一步稳定复合物粒径，优化分散系数。电位结果如图 2 可知，复合物电位绝对值随 WPI 占比升高呈明显递增趋势，且各组均满足电位绝对值>30 mV，电位越高，颗粒间的排斥力越强，系统也越稳定[19]。

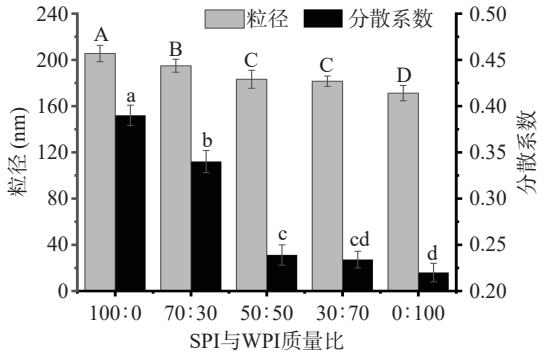


图 1　SPI 与 WPI 不同质量比和 DHQ 形成复合物的粒径及分散系数

Fig.1　Particle size and polydispersity index (PDI) of the complexes formed by SPI/WPI at different mass ratios with DHQ

注：同一指标不同字母表示数据之间具有显著性差异（P<0.05）；图 2~图 4、图 10 同。

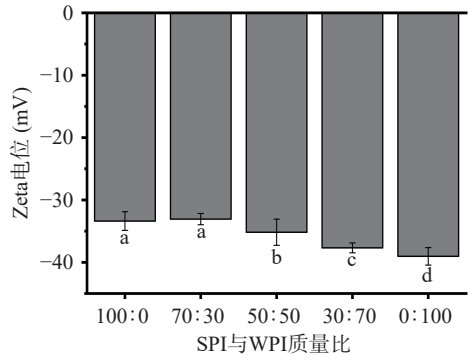


图 2　SPI 与 WPI 不同质量比和 DHQ 形成复合物的电位

Fig.2　Zeta-potential of the complexes formed by SPI/WPI at different mass ratios with DHQ

2.2　浊度

浊度可作为复合物颗粒大小和蛋白质聚集程度的指标参考，复合物的浊度与颗粒的浓度和大小成正比[11]。如图 3 所示，当 SPI 与 WPI 以不同比例混合时，随着体系中 SPI 含量的增加，复合物在 600 nm 波长下的吸光度呈显著上升趋势（P<0.05）。单一 SPI 体系（100:0）OD_{600} 达到最大值，较大颗粒通常会导致更高的浊度，因为散射作用增强，这与粒径测定结果趋势一致。这表明，随着 SPI 占比的提升，体系内蛋白质颗粒易发生聚集并形成更大尺寸的复合物，最终导致溶液浊度显著增加。

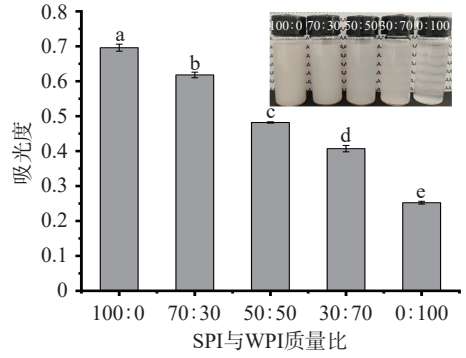


图 3　SPI 与 WPI 不同质量比和 DHQ 形成复合物的浊度

Fig.3　Turbidity of the complexes formed by SPI/WPI at different mass ratios with DHQ

2.3　EE 和 LC

SPI 与 WPI 质量配比对 DHQ 的包封率（EE）和载药量（LC）具有显著调控作用（P<0.05）。复合物中 DHQ 的 EE 和 LC 结果如图 4 所示，SPI 与 WPI 质量比为 30:70 时，EE 和 LC 达最大值（96.06%±1.4%、0.96%±0.01%），这是由于 WPI 的优异乳化性能与 SPI 超声解聚后的柔性结构互补，促使复合蛋白自组装形成致密核-壳结构[20]，为疏水性 DHQ 提供了丰富的疏水内核及界面吸附位点，从而提升了 DHQ 的 EE 和 LC。SPI 与 WPI 质量比为 70:30 时，复合结构中 SPI 刚性占比偏高，疏水区域排布密度不足，EE 和 LC 略低于 30:70 配比。SPI 与 WPI 质量比为 50:50 时，与 30:70 配比复合物粒径和 PDI 没有显著性差异，但是浊度显著增大。浊度的显著升高通常与颗粒形状不规则、表面粗糙或内部结构松散导致的散射增强有关，这可能是因为两类蛋白的亲疏水基团产生空间位阻，导致复合蛋白自组装形成不规则聚集体[21]，疏水内核结构不完整，从而对 DHQ 的包埋效果不佳。单一 SPI 体系（100:0）粒径和 PDI 最

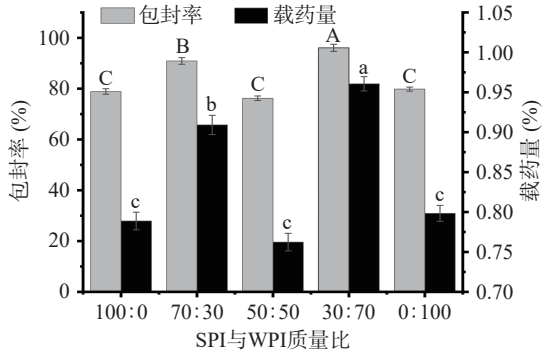


图 4　SPI 与 WPI 不同质量比和 DHQ 形成复合物的中 DHQ 的包封率和载药量

Fig.4　Encapsulation efficiency and loading capacity of DHQ in the complexes formed by SPI/WPI at different mass ratios with DHQ

大，且浊度最大，胶体网络稳定性不足，容易发生聚集；单一 WPI 体系（0∶100）虽然粒径最小、浊度最小，但是缺乏 SPI 的多孔网络结构支撑，无法形成多尺度疏水区域[22]，所以两种单一蛋白对 DHQ 的包埋能力均受限。结果表明，通过调控 SPI 与 WPI 的混合比例可优化复合载体的结构特性[23]，进而提升对 DHQ 的包封率与载药量。

2.4 FTIR 光谱

傅里叶变换红外光谱（FTIR）是研究化合物官能团和结构的高效方法[24]。DHQ、蛋白和复合物的 FTIR 光谱如图 5 所示。DHQ 的光谱显示出多个特征吸收峰，例如 3418 cm^{-1}（O-H 伸缩振动）、1640 cm^{-1}（C=O 伸缩振动）、1478 cm^{-1}（C=C 弯曲振动）、1373 cm^{-1}（-C-OH 变形振动）和 1264 cm^{-1}（酚基 C-O 伸缩振动）[25]。SPI 和 WPI 分别在 1658、1641 cm^{-1} 处表现出酰胺 I 带，两者在 1535 cm^{-1} 处出现酰胺 II 带，二者均与 C=O 的伸缩振动及 N-H 的弯曲振动相关[26]。对于 SPI-WPI-DHQ 复合物，SPI 与 WPI 比例为 100∶0 和 70∶30 的复合物在 1658 cm^{-1} 处出现酰胺 I 带，50∶50、30∶70 和 0∶100 的复合物在 1641 cm^{-1} 处出现酰胺 I 带，酰胺 II 带没有变化，这与 Yin 等[19] 研究结果相似。然而，在复合物中，许多 DHQ 特征峰消失了，表明 DHQ 与蛋白发生了相互作用，从而掩盖了其化学基团的红外吸收。该结果与 Li 等[27] 研究结论类似，其研究发现 DHQ 与玉米醇溶蛋白纳米颗粒发生相互作用时，同样会出现特征基团红外吸收被掩盖的现象。

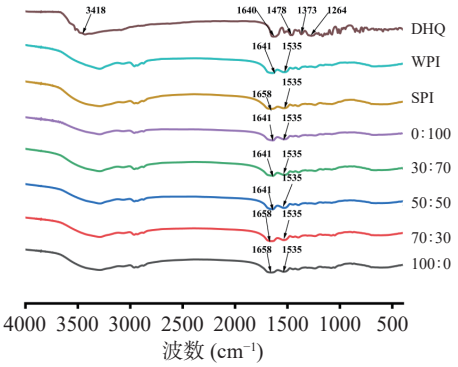


图 5 SPI 与 WPI 不同质量比和 DHQ 形成复合物的红外光谱

Fig.5 FTIR spectra of the complexes formed by SPI/WPI at different mass ratios with DHQ

2.5 圆二色光谱

圆二色光谱（CD）是一种高灵敏度分析技术，广泛用于表征蛋白质的二级结构。不同配比复合物的远紫外 CD 光谱如图 6 所示，所有样品在 208 nm 和 222 nm 处均显示出 α-螺旋的特征负峰[28]，且 222 nm 处该峰随 WPI 的占比升高伴有轻微蓝移；同时，摩尔椭圆度绝对值随 WPI 占比升高而逐渐增大，表明 α-螺旋含量相应提升[29]，该变化趋势与表 1 中蛋白质二级结构含量的测定结果一致。由表 1 可知，当 SPI 与 WPI 质量比从 100∶0 调整至 0∶100 时，α-螺旋含量由 6.02%±0.61% 显著上升至 10.79%±0.62%（$P<0.05$），而 β-折叠含量则由 37.09%±0.83% 显著下降至 31.22%±0.54%（$P<0.05$）。这表明蛋白质二级结构发生了解折叠，整体构象灵活性增强，可能更有利于其与小分子物质结合[30]。此外，β-转角与无规则卷曲含量随配比变化保持基本稳定。值得注意的是，随着 SPI 含量的增加，α-螺旋含量降低而 β-折叠含量升高，这一结构变化可促使蛋白质结构松散化、构象柔性提升，进而增强其在油水界面的吸附能力，提高其乳化性能。

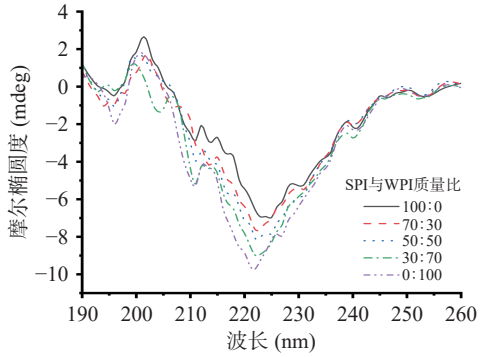


图 6 SPI 与 WPI 不同质量比和 DHQ 形成复合物的圆二光谱

Fig.6 CD spectra of the complexes formed by SPI/WPI at different mass ratios with DHQ

表 1 复合物中蛋白的二级结构含量

Table 1 Secondary structure content of proteins in complexes

样品名称	α-螺旋(%)	β-折叠(%)	β-转角(%)	无规则卷曲(%)
100∶0	6.02±0.61^{d}	37.09±0.83^{a}	23.45±0.62^{b}	33.44±0.31^{a}
70∶30	6.98±0.22^{cd}	36.78±0.94^{a}	22.98±0.38^{b}	33.26±1.21^{a}
50∶50	7.65±0.41^{c}	35.64±0.62^{b}	23.47±0.34^{b}	33.24±0.72^{a}
30∶70	9.06±0.62^{b}	33.17±0.54^{c}	23.21±0.28^{b}	34.56±0.75^{a}
0∶100	10.79±0.62^{a}	31.22±0.54^{d}	24.78±0.28^{a}	33.21±0.75^{a}

注：同列不同字母表示样品之间具有显著性差异（$P<0.05$）。

2.6 内源荧光光谱

内源荧光光谱可反映蛋白质分子内如色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基的微环境变化[31]，进而揭示分子

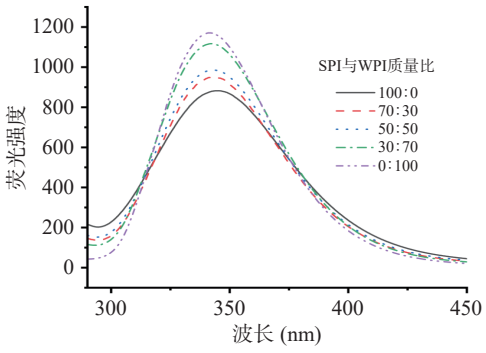


图 7 SPI 与 WPI 不同质量比和 DHQ 形成复合物的内源荧光光谱

Fig.7 Intrinsic fluorescence spectra of the complexes formed by SPI/WPI at different mass ratios with DHQ

间相互作用特征。从图 7 中可以看出，SPI 与 WPI 不同质量比的复合物的荧光强度呈现出明显差异，随着 SPI 占比升高，复合物荧光峰强度逐渐降低，在 SPI 与 WPI 比例为 100∶0 时达到最低。这是因为 SPI 比例增加促使 SPI 颗粒发生聚集，覆盖了部分暴露的芳香族氨基酸残基，进而导致复合物荧光强度降低。同时，随着 SPI 占比升高，复合物的最大荧光发射波长由 341 nm 红移至 345 nm，表明色氨酸残基所处微环境的极性降低，复合物疏水性增强[32]。

2.7　表面疏水性

表面疏水性是蛋白质颗粒表面相关性质的重要指标，该指标与蛋白质分子的功能性质密切相关[33]，荧光探针 ANS 可结合疏水区域，从而增加荧光发射强度。从图 8 可知，随着 WPI 占比的升高，复合物体系的表面疏水性呈显著下降趋势，且荧光光谱出现红移现象，与 Yin 等[19] 研究结果类似。这一结果表明，随着 WPI 占比的升高，复合物表面可与荧光探针 ANS 结合的疏水位点数量减少，体系表面疏水性减弱；而荧光红移现象是因为 ANS 所处微环境的极性增强。此外，SPI 表面疏水性大，其主要原因可能是 11S 和 7S 球蛋白具有大量暴露与分子表面的疏水基团，从而使含 SPI 高的复合物表现出较强的表面疏水性[34]。

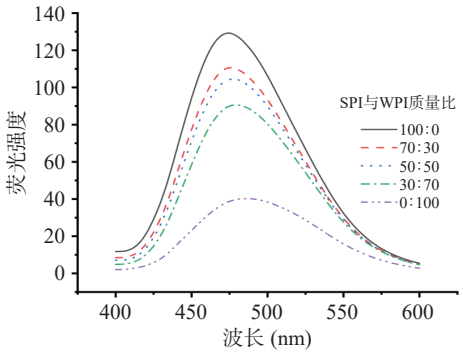


图 8　SPI 与 WPI 不同质量比和 DHQ 形成复合物的 ANS 荧光图谱

Fig.8　ANS fluorescence spectra of the complexes formed by SPI/WPI at different mass ratios with DHQ

2.8　分子对接

DHQ 与双蛋白分子的结合亲和力为−7.406 kcal·mol^{-1}，表明两者具有较高的结合亲和力和良好的匹配度。对接后利用 PyMOL2.1 软件对复合物进行可视化分析，对接结果如图 9 所示。图 9B 和 C 表明 DHQ 能够通过氢键、疏水相互作用[19]、范德华力以及 π-π 堆积[35] 等与 β-Lg、Gly 蛋白发生相互作用，DHQ 在 β-Lg 与 Gly 蛋白活性位点与 SER116、ASN88、SER110、ASN109、GLY204 等残基形成稳定的氢键网络，显著增强了化合物的结合稳定性，表明 DHQ 在极性微环境中与蛋白存在稳定的结合，这一结果与 Duan 等[15] 研究结果类似。同时，参与相互作用的氨基酸残基中包含带负电氨基酸，表明范德华力也参与了相互作用[36]。此外，DHQ 还与 β-Lg 与 Gly 蛋白疏水结合腔的非极性残基 PHE209、PHE205 产生静电相互作用，并与 PHE205 产生 π-π 相互作用，该作用机制有助于 DHQ 配体深度嵌入蛋白结合口袋，并排除腔内溶剂水分子，进而提高结合过程的熵驱动力与复合物稳定性。

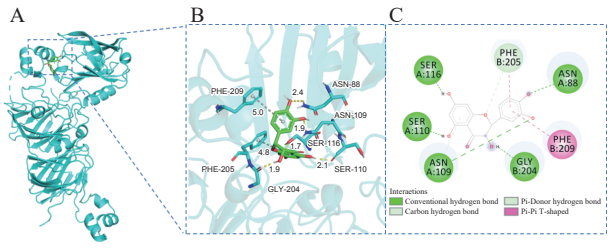


图 9　DHQ 与 β-Lg、Gly 的分子对接图

Fig.9　Molecular docking diagrams of DHQ with β-Lg and Gly

注：A. DHQ 与 β-Lg、Gly 的结合模式；B. DHQ 与 β-Lg、Gly 的三维（3D）结构；C. DHQ 与 β-Lg、Gly 的交互作用力图；相互作用的二维视图中红色虚线代表的是静电相互作用，绿色虚线代表氢键，青色渐变代表 π-π 作用。

2.9　抗氧化活性

氧化过程是引发食品品质劣变的关键诱因，抗氧化剂在延缓、控制乃至阻断氧化链式反应中发挥着不可替代的作用。SPI 与 WPI 富含组氨酸、酪氨酸等抗氧化氨基酸残基，可通过氢原子转移（HAT）或电子转移（ET）机制参与自由基清除能力；DHQ 作为天然黄酮类化合物，其酚羟基与自由基反应生成稳定的半醌式化合物，从而有效终止自由基链式传递，表现出较强的 DPPH 和 ABTS$^+$自由基清除能力。已有研究证实，蛋白和多酚可通过非共价相互作用增强复合物的抗氧化活性[37−38]。复合物 DPPH 自由基清除能力测定结果如图 10A 所示，SPI 占比≥50% 的复合物清除能力无显著差异，均>80%；随 WPI 比例升高，清除活性逐渐降低，复合物 DPPH 自由基清除能力显著（P<0.05）高于 DHQ 和抗坏血酸。DPPH 自由基为脂溶性自由基，其清除反应主要依赖疏水环境中的氢原子转移[39]，高 SPI 比例体系可通过疏水相互作用形成稳定的疏水微环境，将 DHQ 的酚羟基包埋于蛋白疏水口袋中，减少酚羟基的氧化损失，同时促进 DHQ 与 DPPH 自由基的接触反应。这与 Fu 等[40] 研究结论类似，其研究证实大豆蛋白基纳米颗粒可通过疏水作用包埋原花青素并形成疏水微环境，减少原花青素氧化降解，同时增加其与 DPPH 自由基的接触反应机会，进而提升自由基清除能力。

ABTS$^+$自由基清除能力测定结果如图 10B 所示，复合物的清除能力随 SPI 比例升高呈递增趋势，这与 SPI 大分子在水溶性体系中形成的多孔网络结构密切相关。该结构不仅增加了 DHQ 与 ABTS$^+$自由基的接触概率，还可促使 SPI 分子中的酪氨酸、色氨酸等活性氨基酸残基暴露；其侧链的酚羟基与吲哚基可直接通过氢原子转移稳定 ABTS$^+$自由基，并与

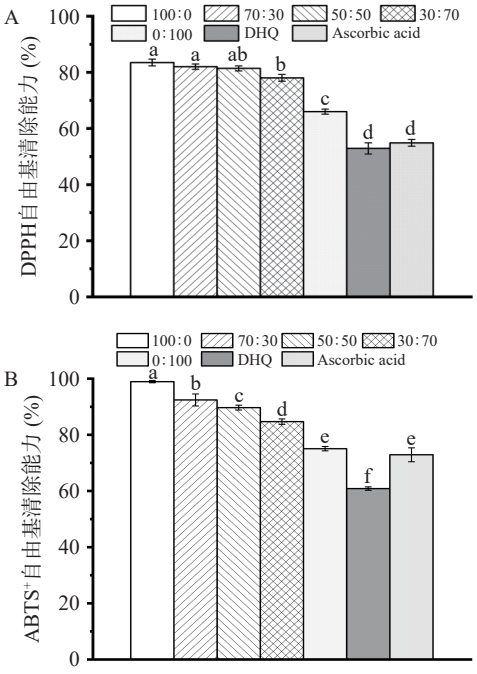


图 10 SPI-WPI-DHQ 复合物的抗氧化活性

Fig.10 Chemical antioxidant activity of SPI-WPI-DHQ complexes

DHQ 的酚羟基形成氢键网络，进一步强化电子传递效率，提升自由基清除能力[41]。随 WPI 占比提升，复合物抗氧化清除能力逐渐降至 75.06%±0.78%，但仍显著优于游离 DHQ 的清除能力（P<0.05）。这是因为 WPI 占比高的复合物疏水作用减弱，减少了对 DHQ 的疏水保护作用，导致抗氧化能力相对减弱。

3 结论

本研究通过调控 SPI 与 WPI 的混合比例，成功构建了用于递送 DHQ 的双蛋白复合载体。结果表明，当 SPI 与 WPI 质量比为 30∶70 时，复合物粒径为 171.2 nm，分散系数 0.22，Zeta 电位绝对值>30 mV，形成了稳定均一的胶体体系，且 DHQ 的包封率与载药量分别高达 96.06%±1.4%、0.96%±0.01%。结构分析证实 DHQ 主要通过氢键、疏水作用等非共价相互作用与双蛋白结合，随 WPI 占比升高，复合物中 α-螺旋含量显著升高，β-折叠含量则显著降低（P<0.05），提升了蛋白构象的灵活性。抗氧化实验显示，所有复合物均具有优于 DHQ 和抗坏血酸的自由基清除能力，其中 SPI 比例≥50% 的复合物清除能力>80%。综上，SPI 与 WPI 在 30:70 配比下可通过多重分子相互作用形成稳定的核壳结构，有效提升 DHQ 的包埋稳定性与抗氧化活性，该研究为 DHQ 在动植物双蛋白食品体系中的高效递送提供了理论基础与技术方案。

© 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] BORISENKO A A, BOBRYSHEVA T N, ZOLOTOREVA M S, et al. Analysis of the mechanisms and efficiency of Taxifolin encapsulation in whey proteins via thermomechanical mixing and spray drying[J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2025, 10: 100261.

[2] SUNIL C, XU B. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin)[J]. Phytochemistry, 2019, 166: 112066.

[3] NGUYEN M H T, NGUYEN T H T, PHAN T T, et al. Evaluation of stability and *in vitro* anti-cancer activity of dihydroquercetin nanoemulsion[J]. Current Nanoscience, 2025, 21(1): 127−139.

[4] TURCK D, CASTENMILLER J, HENAUW S D, et al. Safety of hot water extract of fruits and peduncles of Hovenia dulcis as a novel food pursuant to Regulation 1(EU) 2015/2283[J]. EFSA Journal, 2020, 18(8): e06196.

[5] XU Y, WANG Y, LI C, et al. Preparation, characterization, and biological activity of the inclusion complex of dihydroquercetin and β-cyclodextrin[J]. AAPS Open, 2023, 9(1): 16.

[6] ZHANG T, LI Z, ZHOU R, et al. Optimizing whey isolate protein/mung bean protein ratios in emulsion gels for enhanced dihydroquercetin delivery: Gel properties, stability, and bioaccessibility insights[J]. Food Chemistry, 2025, 493: 145814.

[7] YANG J W, TU Z C, WU T T, et al. Selective enhancement of fish gelatin emulsification via structural compatibility with sodium alginate: A comparative study with SPI and WPI[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 322: 146906.

[8] YANG J, ZHU B, LU K, et al. Construction and characterization of Pickering emulsions stabilized by soy protein hydrolysate microgel particles and quercetin-loaded performance in vitro digestion [J]. Food Research International, 2023, 169: 112844.

[9] JIA Y, YAN X, HUANG Y, et al. Different interactions driving the binding of soy proteins (7S/11S) and flavonoids (quercetin/rutin): Alterations in the conformational and functional properties of soy proteins[J]. Food Chemistry, 2022, 396: 133685.

[10] IRINA K, RINAT F, NATALYA N, et al. The influence of flavonoid dihydroquercetin on the enzymatic processes of dough ripening and the antioxidant properties of bread[J]. Fermentation, 2023, 9(3): 263−263.

[11] 赵茹. 乳清蛋白/豌豆蛋白可溶性复合物制备及在乳液基递送体系中应用[D]. 长春: 吉林大学, 2024. [ZHAO Ru. Preparation of whey protein/pea protein soluble complexes and its application in emulsion-based delivery systems[D]. Changchun: Jilin University, 2024.]

[12] LI H, ZHANG J, WU Y, et al. Preparation and characterization of whey protein isolate-dextran-proanthocyanidins ternary complexes: Formation mechanism, physicochemical stability[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 151: 109773.

[13] NICOLAI T, BRITTEN M, SCHMITT C. β-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1945−1962.

[14] SAMOTO M, MAEBUCHI M, MIYAZAKI C, et al. Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate[J]. Food Chemistry, 2007, 102(1): 317−322.

[15] DUAN Y, YE C, SHAO J, et al. Modulation mechanism of dextran-mediated glycation on soy protein isolate-quercetin interaction: a spectroscopic and molecular docking study[J]. Food Chemistry, 2025, 493: 146016.

［16］ ZHANG Y, LU Y, LIU Y, et al. Formation of whey protein, pectin, and chlorogenic acid ternary complexes and their application in emulsions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 283: 137871.
［17］ 张园园. 乳清蛋白/绿原酸/高酯果胶纳米复合物的构建及作用机制[D]. 长春: 吉林大学, 2023. ［ZHANG Yuanyuan. Construction and interaction mechanism of whey protein/chlorogenic acid/high methoxyl pectin nanocomposites[D]. Changchun: Jilin University, 2023.］
［18］ CHOWDHURY S, BHUIYA S, HAQUE L, et al. In-depth investigation of the binding of flavonoid taxifolin with bovine hemoglobin at physiological pH: Spectroscopic and molecular docking studies[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 225: 117513.
［19］ YIN Y, XU J, SHI Z, et al. Research on the preparation of soy protein isolate and whey protein isolate composite nanoparticles and their characteristics in high internal phase Pickering emulsions [J]. Food Chemistry, 2025, 477: 143476.
［20］ 江连洲, 孙娜, 王哲, 等. 一种通过 pH 偏移结合超声提高大豆蛋白-乳清蛋白双蛋白 Pickering 乳液稳定性的方法[P]. 中国: CN117652651A, 2024-03-08. ［JIANG Lianzhou, SUN Na, WANG Zhe, et al. A method for improving the stability of soy protein-whey protein binary protein Pickering emulsion by pH shift combined with ultrasound[P]. China: CN117652651A, 2024-03-08.］
［21］ PINHO S C, BRITO-OLIVEIRA T C, GEREMIAS-ANDRADE I M, et al. Microstructure and in vitro digestion of mixed protein gels of soy and whey protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 155: 110189.
［22］ 刘雅轩. 高溶解性乳清/植物双蛋白体系构建及在乳液中应用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2025. ［LIU Yaxuan. Construction of highly soluble whey/plant dual-protein system and its application in emulsion[D]. Changchun: Jilin University, 2025.］
［23］ WANG Y, WANG Y, XU Z. Research progress on protein-based unary, binary, and ternary encapsulation systems: A review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 321: 146467.
［24］ YANG J, SUN Y, MU H, et al. The formation of protein coronas and the interaction of soy protein isolate and whey protein isolate with starch nanoparticles[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282: 137451.
［25］ STENGER MOURA F C, PINNA N, VIVANI R, et al. Exploring taxifolin polymorphs: Insights on hydrate and anhydrous forms[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(9): 1328.
［26］ YUE Y, ZHAO S, SUN Y, et al. Effects of plant extract aurantio-obtusin on pepsin structure: Spectroscopic characterization and docking simulation[J]. Journal of Luminescence, 2017, 187: 333−339.
［27］ LI Y, SU H, WANG W, et al. Fabrication of taxifolin loaded zein-caseinate nanoparticles and its bioavailability in rat[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(6): 2306−2313.
［28］ BIJAN R, POORIA G. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- a review[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2009, 74(2): 101−120.
［29］ ZHAO R, CHANG C, HE Y, et al. Effects of mixing ratio on physicochemical, structural properties and application in lycopene-loaded emulsions of blends of whey protein and pea protein[J]. Food Chemistry, 2025, 463: 141062.
［30］ LIU K, CHEN S, CHEN H, et al. Cross-linked ovalbumin catalyzed by polyphenol oxidase: Preparation, structure and potential allergenicity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 2057−2064.
［31］ CHEN W, LI T, YU H, et al. Structure and emulsifying properties of whey protein isolate: Effect of safflower yellow concentration[J]. LWT, 2020, 123: 109079.
［32］ ZHANG H, XU W, WANG Y, et al. Interactions and binding mechanisms of soy protein isolate with theasinensin A in different pH conditions by multi-spectroscopy analysis and molecular docking[J]. Food Chemistry, 2026, 506: 148139.
［33］ GONZALEZ W G, MIKSOVSKA J. Application of ANS fluorescent probes to identify hydrophobic sites on the surface of DREAM[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2014, 1844(9): 1472−1480.
［34］ YAXUANLIU, FENGGAO, BOXUEXIA, et al. Physicochemical, structural, and emulsifying properties of stable blended whey and soy protein colloidal dispersion prepared by pH - shifting and ultrasound[J]. International Journal of Dairy Technology, 2024, 77(2): 324−337.
［35］ 潘俊坤, 焦中高, 张强. 二氢槲皮素抑制 α-葡萄糖苷酶的机理研究[J]. 中国食物与营养, 2025, 31(10): 74−80. ［PAN Junkun, JIAO Zhonggao, ZHANG Qiang. Study on the inhibitory mechanism of dihydroquercetin against α-glucosidase[J]. Food and Nutrition in China, 2025, 31(10): 74−80.］
［36］ LIU J, ZHANG S, ZHAO X, et al. Molecular simulation and experimental study on the inclusion of rutin with β-cyclodextrin and its derivative[J]. Journal of Molecular Structure, 2022, 1254: 132359.
［37］ YIN B, WU Q, ZHENG Z, et al. Effects of non-covalent binding of different proteins and apple polyphenols on structure and functional properties[J]. Food Hydrocolloids, 2025, 166: 111333.
［38］ ZHANG Y, WANG Z, LIU J, et al. Interactions of different polyphenols with wheat germ albumin and globulin: Alterations in the conformation and emulsification properties of proteins[J]. Food Chemistry, 2024, 457: 140129.
［39］ BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. LWT - Food Science and Technology, 1995, 28(1): 25−30.
［40］ FU H, GONG H, GAO J, et al. Improved chemical and gastrointestinal stability of natural proanthocyanidins encapsulated in hydrolyzed soy protein-based nanoparticles[J]. Food Research International, 2025, 220: 117152.
［41］ WANG Y, WANG X. Binding, stability, and antioxidant activity of quercetin with soy protein isolate particles[J]. Food Chemistry, 2015, 188: 24−29.