绿豆-乳清双蛋白纳米颗粒的制备、结构表征及其功能特性

王浩宇[1]，张舒[1,2]，冯玉超[1]，王长远[1,2*]
（1.黑龙江八一农垦大学食品学院，黑龙江大庆 163000）
（2.国家杂粮工程研究技术中心，黑龙江大庆 163000）

摘要：针对单一植物蛋白功能局限（绿豆蛋白溶解性/乳化性差）和动物蛋白成本高的问题，通过构建绿豆-乳清双蛋白纳米复合体系，探究了绿豆蛋白、乳清蛋白及其复合纳米颗粒的结构和功能特性，该研究采用 pH 循环法制备了不同比例的绿豆-乳清双蛋白复合纳米颗粒，并系统研究了其微观结构、粒径分布、Zeta 电位、荧光光谱、红外光谱及乳化性能。双蛋白纳米颗粒粒径为 110~200 nm（单蛋白原料为微米级）；随乳清蛋白比例增加，表面疏水性、Zeta 电位（由-32.82 升至-24.13 mV）及荧光强度显著下降；红外光谱表明无新化学键生成；乳清蛋白的添加使双蛋白纳米颗粒的乳化活性从 3.22~3.56 提升至 4.85 m^2g^{-1}，乳化稳定性从 30.81%~59.41%显著提高至 89.68%。结果表明，通过 pH 循环法制备的绿豆-乳清双蛋白纳米颗粒粒径均匀、结构稳定，乳化性显著改善。为双蛋白体系在食品递送中的应用提供理论基础。

关键词：纳米颗粒；绿豆蛋白；乳清蛋白；双蛋白；结构表征

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.8.0410

Preparation, Structural Characterization and Functional Characteristics of Mung Bean-Whey Double Protein Nanoparticles

WANG Haoyu[1], ZHANG Shu[1,2], FENG Yuchao[1], WANG Changyuan[1,2*]
(1.College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, China)
(2.National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163000, China)

Abstract: In order to solve the problems of limited function of single plant protein (poor solubility/emulsibility of mung bean protein) and high cost of animal protein, this study constructed a mung bean-lactose milk double protein nanocomposite system. In order to investigate the structure and functional characteristics of mung bean protein, whey protein and their composite nanoparticles. In this study, mung bean and whey double protein composite nanoparticles were prepared by pH cycle method with different proportions. The nanoparticles were systematically characterized for their microstructure, particle size distribution, zeta potential, fluorescence spectra, FTIR spectra, and emulsifying properties. Results showed that the composite nanoparticles exhibited a uniform size distribution (110~200 nm), whereas the raw protein materials were at the micrometer scale. As the proportion of WPI increased, significant reductions were observed in surface hydrophobicity, zeta potential (increasing from -32.82 to -24.13 mV), and fluorescence intensity. FTIR analysis verified that no new chemical bonds formed during nanoparticle preparation. The inclusion of WPI enhanced the emulsification activity of the dual-protein nanoparticles from 3.22~3.56 m^2g^{-1} in to 4.85 m^2g^{-1}, while emulsification stability markedly improved from 30.81%~59.41% to 89.68%. These findings demonstrate that MBP-WPI composite nanoparticles prepared via pH-shifting possess homogeneous particle size, stable structure, and significantly improved emulsifying properties. This study establishes a theoretical foundation for applying dual-protein systems in food delivery applications.

Key words: nanoparticles; mung bean protein; whey protein; dual protein; structural characterization

《国民营养计划（2017-2030）》明确提出要重点发展动植物双蛋白食品，以提升全民营养健康水平[1]。绿豆

收稿日期：2025-03-21；修回日期：2025-10-12；接受日期：2025-10-15
基金项目：黑龙江省“双一流”创新成果项目（LJGXCG2023-019）；黑龙江省重点研发计划项目（2024ZX02B12-02）
作者简介：王浩宇（1998-），女，硕士研究生，研究方向：食品科学，E-mail：1693186582@qq.com
通讯作者：王长远（1976-），男，博士，教授，研究方向：粮食、油脂及植物蛋白工程，E-mail：byndwcy@163.com

蛋白作为优质植物蛋白来源，氨基酸组成均衡（必需氨基酸占比 43.50%），但其较差的溶解性和乳化性限制了其在食品工业中的应用。乳清蛋白虽然具有优异的溶解性、乳化性及胶凝特性，但其较高的生产成本制约了大规模推广[2]。植物蛋白与动物蛋白的复合可通过氨基酸互补作用提升其营养价值。尽管绿豆蛋白与乳清蛋白在营养和功能特性上具有互补优势，二者的复合应用仍面临挑战。该研究通过构建绿豆-乳清双蛋白复合体系，旨在实现营养与功能特性的协同增加。

纳米材料因其粒径小、比表面积高等特点，在食品、医药等领域具有广泛应用。目前，天然高分子材料是该领域的研究热点，主要包括淀粉、纤维素和蛋白质等。其中，蛋白质作为人体必需营养物质，其纳米颗粒具有包埋率高、生物相容性好等优势，常用于功能性成分的输送；蛋白质纳米颗粒能够显著改善食品的理化性质（如质地、稳定性等），同时提升功能成分的生物利用度，从而在营养强化和风味调控方面具有重要应用潜力[3]。汪晶晶等[4]利用玉米醇溶蛋白纳米颗粒包封姜黄素，显著提高了其生物利用度；李媛等[5]通过玉米醇溶蛋白纳米颗粒负载 *β*-胡萝卜素，经体外消化实验证实不仅增强了其稳定性和抗氧化活性，还提升了营养价值。在食品蛋白纳米颗粒制备领域，pH 循环法与反溶剂沉淀法使用率较高，相较为反溶剂沉淀法 pH 循环法制备蛋白质粒径更均一、复合效率更高，且无需有机溶剂，较为适合植物-动物蛋白复合制备[6]。pH 循环法是通过将蛋白强酸或强碱环境中，使其分子结构发生部分解旋，随后通过调节溶液 pH 值至中性范围，促使蛋白质分子重新折叠并形成纳米颗粒。这种方法操作过程简单，成本低廉，减少有机物的使用，是制备蛋白纳米颗粒常用的方法之一。Dai 等[7]发现桃蛋白与大豆蛋白复合使其乳化能力增强。该研究旨在通过植物蛋白与动物蛋白的复合，改变单一蛋白在功能特性和营养均衡性方面的局限性，为解决植物蛋白加工性能差和动物蛋白成本高的行业共性问题提供新思路。

该研究以绿豆蛋白和乳清蛋白为原料，旨在通过 pH 循环法改善绿豆蛋白的溶解性和乳化性，制备绿豆-乳清双蛋白复合纳米颗粒，系统表征其结构特性，并比较不同比例绿豆-乳清双蛋白纳米颗粒的功能特性。研究利用两种蛋白的特性差异，绿豆蛋白具有较高的热稳定性和营养性，但其溶解性和乳化性较差；而乳清蛋白则表现出优异的溶解性和表面活性，但热稳定性相对较弱。通过 pH 循环法制备，可实现二者的优势互补，构建功能协同的双蛋白纳米颗粒体系。这不仅拓展了绿豆蛋白的应用范围，也为开发新型营养健康食品提供了理论依据和技术支撑。绿豆-乳清双蛋白纳米颗粒，将为功能性食品、营养补充剂等产品的开发提供新型配料选择，具有广阔的应用前景。

1 材料和方法

1.1 试验材料

山西小明绿豆，市售；乳清蛋白（蛋白纯度≥90%），美国西尔玛配料有限公司。

表 1 绿豆蛋白乳清蛋白基本成分表

Table 1 Mung bean protein why protein basic composition

基本成分	乳清蛋白/%	绿豆蛋白/%
蛋白质	92.60	86.90
多糖	0.65	4.90
灰分	2.60	3.20
脂肪	0.60	0.28
水分	3.40	3.60

1.2 主要试剂仪器

石油醚，国药沪试；透析袋（3500），博飞美科；溴化钾，重庆市川东化工有限公司；氢氧化钠，国药沪试；盐酸，国药沪试；异硫氰酸荧光素，阿拉丁公司；十二烷基硫酸钠（SDS），BIO BASIC 公司，以上试剂皆为分析纯。

LYOQUEST PLUS 冷冻干燥机，西班牙泰事达公司；970 CRT 荧光分光光度计，上海仪电分析仪器有限公司；Mastersizer 3000 马尔文激光粒度分析仪，英国马尔文仪器有限公司；TGL-16C 离心机，上海安亭科学仪器厂制造。

1.3 实验方法

1.3.1 绿豆蛋白的提取

将脱皮绿豆烘干后研磨成粉，过 60 目筛，密封保存于-20 ℃条件下备用。参照 Du 等[8]的碱溶酸沉法提取绿豆蛋白。称取适量脱脂绿豆粉（石油醚：绿豆粉为 5:1）溶于去离子水中，料水比 1:10（*m/V*），用 2 mol·L^{-1} 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 9.00，搅拌 2 h，后，10 000 *g* 离心 20 min。合并上清液后，用 6 mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 值至 4.50，静置 1 h 沉淀蛋白，以 6 000 *g* 离心 20 min 收集沉淀，即得绿豆蛋白。将离心沉淀的蛋白质复溶于去离子水，调 pH 值至中性（7.00），再次以 4 000 *g* 离心 10 min 去除不溶物。收集上清液经-80 ℃预冻 24 h 后冻干，所得蛋白粉末密封保存于-20 ℃备用。

1.3.2 绿豆-乳清双蛋白纳米颗粒的制备

参照 Wang 等[9]方法适当修改，将提取的绿豆蛋白和乳清蛋白分散在去离子水中以获得绿豆蛋白/乳清蛋白质量比（1:0、0:1、1:0.1、1:0.2、1:0.5、1:1、1:1.5、1:2，绿豆蛋白/乳清蛋白；并将其命名为 L-N、R-N、LR-N3、LR-N4、LR-N5、LR-N6、LR-N7、LR-N8）。用 1 mol·L^{-1} NaOH 将混合液的 pH 值调节至 12，搅拌 4 h。采用 0.1 mol·L^{-1} HCl 缓慢中和溶液，随后在 4 ℃条件下以 10 000 *g* 离心 30 min 去除沉淀。收集的上清液使用 3.50 kDa 透析袋于 4 ℃去离子水中透析 48 h 脱盐。经冻干处理后研磨获得蛋白复合物粉末，-20 ℃保存备用。

1.3.3 蛋白质纳米颗粒形态表征-扫描电镜

冷冻干燥后的蛋白质纳米颗粒用电镜导电胶粘台、离子溅射喷金处理，固定于样品台上，放入扫描电镜后调节最佳拍摄视野及放大倍数进行拍照观察[10]。

1.3.4 蛋白质纳米颗粒的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

参考张舒等[11]的方法并稍做修改，将样品溶解在等量的上样品缓冲液中并混合。沸水浴 5 min，将 20 μL 的样品加入电泳凝胶通道中，当条带跑到距底端 1 cm 停止，染色液染色 2 h 后脱色液脱色 3-4 次，最后将胶条凝胶电泳扫描仪扫描观察。

1.3.5 蛋白质纳米颗粒的粒径、电位的测定

采用马尔文激光纳米粒度仪测定双蛋白纳米颗粒的粒径、多分散指数（PDI）和 Zeta 电位[12]。

1.3.6 蛋白质纳米颗粒表面疏水性的测定

参考 Ren 等[13]的方法并稍做修改。采用 8-苯胺基-1-萘磺酸（ANS）荧光探针法测定样品表面疏水性。将其溶于磷酸盐缓冲液后，取 25 μL 加入 5 mL 样品溶液，25 ℃避光孵育 8 min。使用荧光分光光度计测定，参数设置为：激发波长 390 nm，发射波长 450 nm，狭缝宽度 5 nm。

1.3.7 蛋白质纳米颗粒荧光光谱的测定

采用荧光分光光度计测定样品的荧光发射光谱，不同样品稀释至相同蛋白浓度。测定条件为：激发波长 240 nm，发射波长 300~500 nm。每个发射光谱是三次测定的平均值[14]。

1.3.8 蛋白质纳米颗粒红外光谱的测定

将 KBr 烘干去除水分备用。将粉末状样品与预先烘干的 KBr 粉末以质量比 1:200 放入玛瑙研钵中充分研磨后压片，以空白 KBr 片为对照[15]。

1.3.9 蛋白质纳米颗粒的乳化活性及乳化稳定性的测定

参考 Li 等[16]的方法并稍作修改。将各样品与大豆油以 1:3 的比例混合，在 6 000 r·min^{-1} 条件下 2 min。将样品 50 μL 加入到 0.10 wt.% SDS 溶液中，共 10 mL。分别于 0 和 30 min 在 500 nm 处测量样品的吸光度。乳化活性（EAI）和乳化稳定性（ESI）使用公式计算：

$$EAI(m^2\cdot g^{-1}) = \frac{(2\times 2.303\times A_0\times N)}{C\times\theta\times 10000} \quad (1)$$

$$ESI（\%）= 100\times\frac{A_t}{A_0} \quad (2)$$

式中：

C——样品浓度，g/mL;

Θ——乳液中油相的体积分数;

A_0——0 min 时乳液在 500 nm 处的吸光度;

A_t——30 min 时乳液在 500 nm 处的吸光度;

N——为稀释倍数（100）。

1.3.10 统计学分析

实验重复三次，报告的数据为平均偏差。数据处理采用 Excel、Origin 2020 软件进行作图，采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因素方差分析（ANOVA），Duncan 检验显示份样本间差异有统计学意义（P≤0.05）。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质纳米颗粒粒径

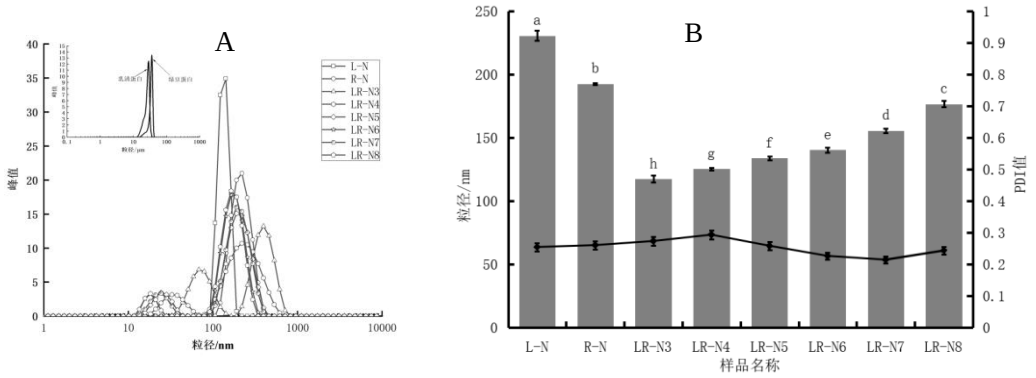

图 1 蛋白质纳米颗粒粒径分布图

Fig.1 The particle size distribution map of protein nanoparticles

注：每组试验重复三次数据使用平均值±标准差表示，显著性水平（P≤0.05），不同字母表示不同的显著性水平。

如图 1 绿豆蛋白和乳清蛋白的粒径为 84.39 和 12.80 μm，经制备后形成蛋白纳米颗粒，其粒径变化为 230.60 和 192.50 nm。双蛋白纳米颗粒较单一蛋白纳米颗粒粒径小，推测原因可能是 pH 循环法制备过程中，使两个蛋白质结构展开，降解成小分子蛋白，小分子蛋白重新聚集使其粒径变小；随着乳清蛋白比例的提高，双蛋白纳米颗粒的粒径逐渐增大。推测是因为乳清蛋白分子通过与绿豆蛋白发生特异性相互作用，促进了蛋白质聚集体的形成，将多个较小的蛋白聚集体连接整合，从而导致颗粒粒径逐渐增加。从图 1 中可以看出，单一蛋白纳米颗粒的粒度分布呈单峰分布为单分散体系，而双蛋白纳米颗粒粒度分布为双峰分布为多分散体系，这说明乳清蛋白比例的增加使颗粒变得不均匀，可能原因是乳清蛋白的加入使纳米颗粒之间产生聚集效应[9]。随着双蛋白比例的增加，粒径也随之变大，且颗粒分布均匀程度即 PDI 值始终维持在较稳定范围内，表明纳米颗粒体系具有良好的分散稳定性。当乳清蛋白占比提高时，颗粒平均粒径由 119.80 nm 显著增大至 163.10 nm，蛋白纳米颗粒比例为 1:2 时仍没有产生不溶性的大颗粒沉淀，以上说明两个蛋白质结合比较完全，颗粒均一性最好。

2.2 蛋白质纳米颗粒微观结构

如图 2 为蛋白质纳米颗粒的扫描电镜图，发现绿豆、乳清和双蛋白纳米颗粒分别表现出不同的颗粒形貌，电镜观察显示不同纳米颗粒具有显著不同的形貌特征：L-N 呈现致密球形，R-N 为不规则片状，而 LR-N 形成新的表面粗糙的球状结构。随着乳清蛋白比例增加，颗粒表面逐渐光滑，形貌趋于完整。与粒径测定结果一样，所有样品均分布在 100~200 nm 范围内，证实成功制备了纳米级蛋白颗粒。双蛋白体系形成了与单一蛋白不同的微观结构。结合预实验结果，通过颗粒尺寸与形貌表征，证实了双蛋白纳米颗粒的均匀性和结构，进一步验证了实验结果的可靠性。

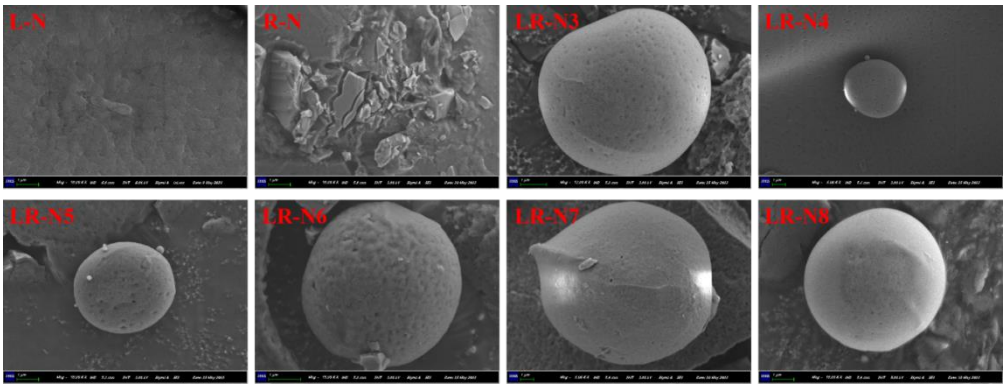

图 2 蛋白质纳米颗粒的微观结构

Fig.2 Microstructure of protein nanoparticles

注：从左向右分别是蛋白质纳米颗粒 SEM 图像，顺序分别为绿豆蛋白纳米颗粒；乳清蛋白纳米颗粒；1:0.1；1:0.2；1:0.5；1:1；1:1.5；1:2 绿豆蛋白：乳清蛋白，比例尺：1 μm。

2.3 蛋白质纳米颗粒分子量

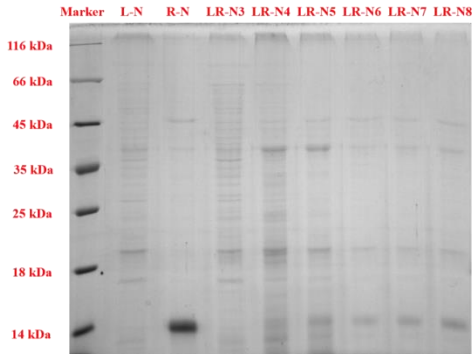

图 3 蛋白质纳米颗粒 SDS-PAGE 图像

Fig.3 SDS-PAGE image of protein nanoparticles

如图 3 所示，L-N 在 17、20、28、38 kDa 处有特征亚基条带，R-N 亚基中主要有 14 和 45 kDa 的亚基条带，在 R-N 的电泳条带中，发现在 35~45 kDa 区间有一个条带（约 38 kDa），推测该条带为 β-乳球蛋白与 α-乳白蛋白的复合物，这种相互作用可能是纳米颗粒形成过程中通过分子间二硫键形成的。L-N 的 4 条特征条带较浅，但是与乳清蛋白初步复合时 20、38 kDa 两条带颜色变深，之后随着乳清蛋白比例增加条带逐渐变浅，推测原因可能与蛋白质结构展开及分子间相互作用增强有关，乳清蛋白逐渐增多，可能与绿豆蛋白的结合也增加，因而影响了蛋白质分子间的二硫键交联，则条带逐渐变浅[17]。R-N 的 14 kDa 条带在纳米颗粒形成过程中显著增强，这可能反映了蛋白质变性导致低分子量组分富集。随着乳清蛋白添加量增加，该条带进一步加深，可能是两种蛋白亚基间发生了结合。与单一蛋白纳米颗粒相比，双蛋白纳米颗粒呈现出的条带包含两者的且在 18.40~25 kDa 和 38~45 kDa 出现了新增条带，这些显著变化表明蛋白质发生了明显的降解和聚集现象。该现象可能源于纳米颗粒制备过程中碱性条件诱导的蛋白质构象改变，以及随后中性条件下的重折叠过程[18]。

2.4 蛋白质纳米颗粒电位与表面疏水性

检测表面疏水性是反映蛋白质功能特性的重要方法[19]。如图 4A 结果显示 LR-N 的表面疏水性高于单一蛋白纳米颗粒，这表明了绿豆蛋白和乳清蛋白的疏水基团暴露于 LR-N 结构中，或发生通协同作用形成了新的疏水微环境现象，从而使表面疏水性增加。随着乳清蛋白含量的增加，LR-N 的表面疏水性降低，可能是因为两种蛋白质的相互作用使乳清蛋白本身的疏水性基团被包埋在蛋白质的内部，即证实了 LR-N 的重折叠，因而无法被 ANS 探针接触检测[20]，则表面疏水性下降。

L-N 的电位为-31.40 mV，R-N 的电位为-27.20 mV，随着乳清蛋白比例的增加，LR-N 的 Zeta-电位强度逐渐降低，数值从 32.83 降到 24.13 mV，这与表面疏水性趋势相一致。双蛋白纳米颗粒的形成可能促使极性/非极性基团被埋藏在蛋白质内部，从而导致 LR-N 表面电位降低。该现象证实两种蛋白质通过分子间相互作用发生了折叠现象，构建了新的蛋白结构。电位值的降低是还可能因为绿豆蛋白和乳清蛋白的折叠，使其将足够的带电残基包埋于蛋白内部。此外，随着蛋白质分子表面同性电荷排斥作用的减弱，分子间聚集现象明显减少。同时，疏水基团的内卷导致其表面暴露程度降低，这与表面疏水性测定结果相符。Zeta-电位强度值都大于 20 mV，说明所制备的纳米颗粒较稳定。总的来说，在制备过程中，疏水相互作用、氢键和静电作用共同影响了蛋白质构象变化绿豆蛋白的复性过程被乳清蛋白改变，使得绿豆蛋白无法回复到原始状态，最终两种蛋白质通过相互作用形成了新的结构。

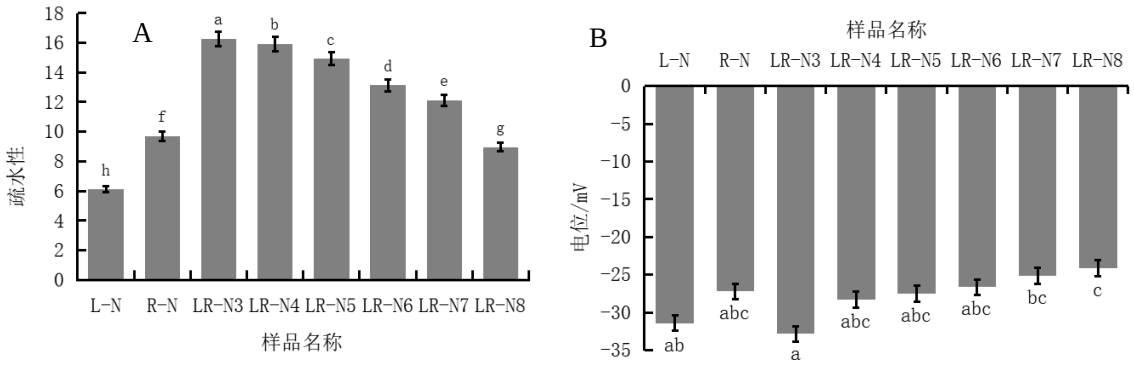

图 4 蛋白质纳米颗粒的电位值和表面疏水性

Fig.4 Potential value and surface hydrophobicity of protein nanoparticles

注：每组试验重复三次数据使用平均值±标准差表示，显著性水平（$P \leq 0.05$），不同字母表示不同的显著性水平。

2.5 蛋白质纳米颗粒荧光光谱

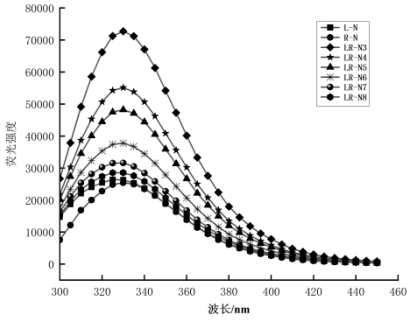

图 5 蛋白质纳米颗粒的荧光光谱图

Fig.5 Fluorescent profiles of protein nanoparticles

为了深入研究蛋白质与蛋白质的相互作用，该研究对绿豆蛋白、乳清蛋白制备的纳米颗粒结构进行了表征。由于绿豆蛋白和乳清蛋白都含有大量的芳香族氨基酸，如色氨酸和苯丙氨酸，会产生自发荧光[21]，因此测定其荧光强度，如图 5，在该研究中绿豆蛋白和乳清蛋白中的芳香族氨基酸均在 330 nm 波长附近呈现明显的发射光谱，单一蛋白纳米颗粒荧光强度较低，蛋白复合后荧光强度大于两者之和，说明两个蛋白质发生相互作用，可能原因是发生相互作用使蛋白中发色基团暴露，导致其荧光强度增加[22]。此外，随着乳清蛋白比例的增加，LR-N 的荧光强度逐渐降低，并伴随明显的荧光猝灭现象，荧光发射强度降低而不改变最大发射波长现象[23]，符合静态猝灭机制，表明绿豆蛋白与乳清蛋白之间可能形成了稳定的复合结构。荧光猝灭通常反映蛋白质分子间的相互作用，其淬灭形式可揭示作用位点与结构区域的变化信息。该过程可能涉及光诱导电子从富电子的芳香族氨基酸向缺电子生色基团的转移[24]。综上，荧光猝灭现象证实了绿豆蛋白与乳清蛋白在复合过程中发生了分子相互作用，且其

作用模式与比例调控密切相关。

2.6 蛋白质纳米颗粒红外光谱图

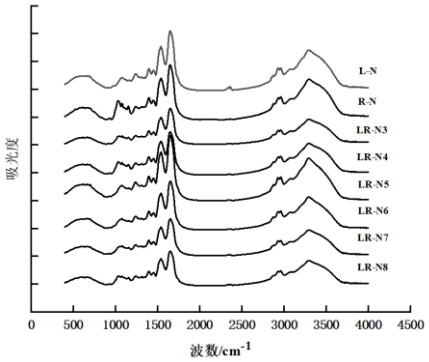

图 6 蛋白质纳米颗粒的红外光谱图

Fig.6 IR profiles of protein nanoparticles

表 2 蛋白质纳米颗粒的二级结构含量变化

Table 2 Changes in the secondary structure content of the protein nanoparticles

样品	β-折叠含量%	α-螺旋含量%	β-转角含量%	无规则卷曲含量%
L-N	47.69±0.21^{b}	25.91±0.20^{b}	17.23±0.24^{f}	9.17±0.18^{g}
R-N	56.31±0.18^{a}	24.99±0.21^{c}	0.62±0.19^{h}	18.21±0.21^{b}
LR-N3	47.69±0.24^{b}	18.99±0.22^{g}	18.44±0.18^{d}	14.88±0.23^{c}
LR-N4	43.66±0.19^{e}	21.71±0.23^{f}	21.04±0.17^{c}	13.60±0.22^{e}
LR-N5	32.71±0.23^{g}	35.05±0.21^{a}	12.84±0.20^{g}	19.40±0.21^{a}
LR-N6	43.47±0.18^{f}	26.00±0.19^{b}	21.31±0.21^{b}	9.22±0.19^{g}
LR-N7	44.10±0.17^{d}	21.98±0.19^{e}	21.47±0.22^{a}	12.46±0.21^{f}
LR-N8	45.47±0.19^{c}	22.64±0.18^{d}	17.67±0.19^{e}	14.22±0.17^{d}

注：同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异（P≤0.05）。

如图 6 为绿豆蛋白纳米颗粒、乳清蛋白纳米颗粒和双蛋白纳米颗粒的红外光谱。蛋白质结构相关的条带出现在 1 700~1 600 cm^{-1}（酰胺 I 区，C-O 伸展振动）和 1 600~1 500 cm^{-1}（酰胺 II 区，C-N 伸展和 N-H 弯曲）[25]。如图所示，L-N、R-N 和 LR-N 在 1 645.76、1 657.17、1 640~1 660 cm^{-1} 出现特征吸收峰，双蛋白纳米颗粒较单一蛋白纳米颗粒的酰胺 I 和 II 区的峰值强度低，表 2 中可以看到 α 螺旋向 β 折叠转移，表明 α-螺旋含量降低，原因可能是由于乳清蛋白通过氢键和疏水吸引与绿豆蛋白的 C-O、C-N 和 N-H 基团结合，如 3 500~3 200 cm^{-1} 范围内的带移动（N-H 伸展）。LR-N 在 1 527.39 cm^{-1} 处有一个主要特征吸收峰，代表 N-H 基团的弯曲振动和 C-N 基团的拉伸振动。LR-N 中酰胺 I 和酰胺 II 区的改变可能是绿豆蛋白与乳清蛋白分子之间的疏水和静电相互作用的结果。与单一蛋白纳米颗粒相比，双蛋白纳米颗粒中酰胺 II 的峰位发生红移，且峰值降低，说明制备过程中改变了绿豆蛋白的 N-H 或 C-N 键。LR-N 的谱峰位于 3 000~3 100 cm^{-1} 处，与单一蛋白相比发生蓝移，这与-OH 伸展振动有关，说明了蛋白质的相互作用影响了它们分子之间的羟基[26]。蛋白质结合后没有出现新的谱带，这表明这种相互作用主要是一个物理过程，没有导致核心和基质之间形成共价连接[27]。乳清蛋白成功与绿豆蛋白结合生成双蛋白纳米颗粒。

2.7 蛋白质纳米颗粒乳化活性和乳化稳定性

蛋白质的乳化特性主要受表面疏水性和电荷分布影响。如图 7 所示，L-N 和 R-N 的乳化活性指数（EAI）分别为 3.22 和 3.56 m^{2} g^{-1}，乳化稳定性（ESI）分别为 59.41%和 30.81%，乳清蛋白比例的添加，使 LR-N 乳化活性得到提高，当绿豆蛋白与乳清蛋白以 1:2 比例复合时，LR-N 的 EAI 提升至 4.85 m^{2} g^{-1}，ESI 显著增至 89.68%。这可能是由于乳清蛋白结构强烈聚集，无法在油滴表面展开并发生重排，蛋白质疏水相互作用诱导的构象重排促进了其在油滴表面的快速吸附，说明制备过程中对蛋白质的乳化性有着重要作用[28]。而乳化稳定性的增加可能是因

为 LR-N 中有越来越多的乳清蛋白接枝到了绿豆蛋白的表面形成了三维网络结构，使得蛋白质更加紧密，故蛋白质能够很好的够附着于油滴表面[29]。综上所述，乳清蛋白的加入提高了双蛋白纳米颗粒的乳化活性和乳化稳定性。双蛋白纳米颗粒在油-水界面的快速吸附，形成致密界面膜，具有较好的稳定性。该特征适用于果汁乳饮料、低脂酱料等食品体系，可有效解决植物蛋白在食品中的不稳定现象。

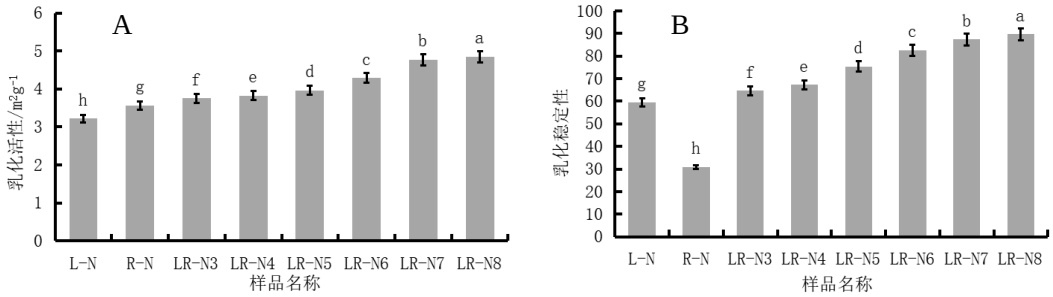

图 7 蛋白质纳米颗粒的乳化活性和乳化稳定性

Fig.7 Emulsifying activity and emulsification stability of protein nanoparticles

注：每组试验重复三次数据使用平均值±标准差表示，显著性水平（$P \leq 0.05$），不同字母表示不同的显著性水平。

3 结论

该研究通过 pH 循环法制备绿豆-乳清双蛋白纳米颗粒，成功将微米级原料蛋白(绿豆蛋白 84.39 μm，乳清蛋白 12.80 μm)制备成粒径分别为 230.60 nm 和 192.50 nm 的纳米颗粒，双蛋白纳米颗粒的粒径在 110~200 nm 范围内。随着乳清蛋白含量的增加，双蛋白纳米颗粒的表面疏水性降低，Zeta-电位值逐渐降低；双蛋白纳米颗粒相较于单一蛋白纳米颗粒荧光强度降低，发生荧光猝灭现象，形成了更稳定的蛋白结构；红外光谱检测结果显示两种蛋白质结合后没有出现新的谱带，表明二者相互作用主要依靠物理过程；同时乳清蛋白的加入提高了双蛋白纳米颗粒的乳化活性和乳化稳定性。在该研究中，成功构建结构稳定、乳化活性和乳化稳定性较高纳米颗粒，为开发天然蛋白纳米颗粒载体提供了原材料，绿豆蛋白和乳清蛋白的开发提供了一个基本途径。同时在食品工业中有广阔应用前景，在植物蛋白饮料领域，可有效解决果汁豆奶等产品的分层问题，显著提升乳化稳定性；在发酵乳制品中，其结构特征能够提高对益生菌的包埋效率；此外，较好界面特性使可开发低脂酱料和功能性乳液的理想载体。该研究虽说明双蛋白纳米颗粒在改善乳化稳定性方面的显著效果，但仍需深入探究其在食品加工和消化过程中的相关特性。未来研究将着重解决加工适应性和消化特性等关键问题，以加速其商业化应用进程。

参考文献

[1] 卢江.改善国民营养助力全面小康[J].中国食品卫生杂志,2020,32(4):351-355.

[2] GANESAN K, XU B. A critical review on phytochemical profile and health promoting effects of mung bean(*Vigna radiata*) [J]. Food Science and Human Wellness, 2018, 7(1): 11-33.

[3] TING Z, JIAMIN X, JIAHUI C, et al. Protein nanoparticles for Pickering emulsions: A comprehensive review on their shapes, preparation methods, and modification methods [J].Trends in Food Science & Technology, 2021, 113: 26-41.

[4] 汪晶晶,祁冰洁,李宏漫,等.含姜黄素奶茶凝珠的研制及特性研究[J].现代食品,2020,24:120-124.

[5] 李媛,傅玉颖,李泽亚,等.乳清分离蛋白纤维-多糖复合纳米颗粒负载 β-胡萝卜素特性研究[J].中国食品学报,2021,21(12):25-32.

[6] HAN M, LIU K, LIU X, et al. Research progress of protein-based bioactive substance nanoparticles [J]. Foods, 2023, 12(16): 2999.

[7] DAI Y X, XU Y, SHI C H, et al. Formation mechanism and functional properties of walnut protein isolate and soy protein isolate nanoparticles using the pH-cycle technology [J].Frontiers in Nutrition, 2023, 10: 1135048.

[8] DU M, XIE J, GONG B, et al. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 76: 131-140.

[9] WANG T, XU P, CHEN Z, et al. Mechanism of structural interplay between rice proteins and soy protein isolates to design novel protein hydrocolloids [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84: 361-367.

[10] 陈振家,杨雅婧,陈琼玲,等.不同品种高粱醇溶蛋白理化性质的研究[J].中国粮油学报,2024,39(12):114-125.

[11] 张舒,王长远,谭朝印,等.绿豆清蛋白 Osborne 分级提取工艺优化及亚基组成分析[J].食品与机械,2019,35(10):174-178.

[12] 胡婕.甘草次酸修饰还原敏感脂质体的构建及抗肝癌评价[D].武汉:中南民族大学,2022.

[13] REN C, XIONG W, PENG D, et al. Effects of thermal sterilization on soy protein isolate/polyphenol complexes: Aspects of structure, in vitro digestibility and antioxidant activity [J]. Food Research International, 2018, 112: 284-290.

[14] 王岸娜,韩丽雅,吴立根.基于光谱法的山柰酚、白藜芦醇与面筋蛋白的相互作用研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2025,46(2):45-53.

[15] 何传统,蒋嘉慧,李文龙,等. 太子参多糖对 A$\beta_{1\sim42}$ 诱导斑马鱼认知损伤的改善作用[J].现代食品科技,2025,41(6):13-24.

[16] LI R, CUI Q, WANG G, et al. Relationship between surface functional properties and flexibility of soy protein isolate-glucose conjugates [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 349-357.

[17] 张唯唯,何振东,马天怡,等.极端酸碱 pH 偏移改善白果蛋白溶解性和乳化性[J].精细化工,2021,38(6):1204-1211.

[18] SUN L, LIN Y, LIU W, et al. Effect of pH shifting on conformation and gelation properties of myosin from skeletal muscle of blue round scads(Decapterus maruadsi) [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 93: 137-145.

[19] LI J, ZHANG S, LI H, et al. Cellulase pretreatment for enhancing cold caustic extraction-based separation of hemicelluloses and cellulose from cellulosic fibers [J]. Bioresource Technology, 2018, 251: 1-6.

[20] 王宇慧,张金凤,李昊坤,等.pH 对箭筈豌豆白蛋白和球蛋白物化性质的影响[J].食品工业科技,2023,44(17):76-83.

[21] ZHANG L, WANG P, YANG Z, et al. Molecular dynamics simulation exploration of the interaction between curcumin and myosin combined with the results of spectroscopy techniques [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101: 105455.

[22] 张燕鹏,张曼君,刁云春,等.复合米糠蛋白-卵白蛋白的起泡特性及相关机理分析[J].食品科学,2022,43(12):81-86.

[23] 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.

[24] ACHARYA P D, SANGUANSRI L, AUGUSTIN A M. Binding of resveratrol with sodium caseinate in aqueous solutions [J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 1050-1054.

[25] HAN L, LU K Y, ZHOU S J, et al. Development of an oil-in-water emulsion stabilized by a black bean protein-based nanocomplex for co-delivery of quercetin and perilla oil [J]. LWT, 2021, 138: 110644.

[26] DAI L, SUN C, LI R, et al. Structural characterization, formation mechanism and stability of curcumin in zein-lecithin composite nanoparticles fabricated by antisolvent co-precipitation [J]. Food Chemistry, 2017, 237: 1163-1171.

[27] 任祥瑞,于明,程赞,等.制备方法对大豆 7S 和 11S 球蛋白的结构和热稳定性影响[J].食品科技,2023,48(1):205-212.

[28] 贾润红.pH 对糖基化花生蛋白乳化特性的影响[J].粮食与油脂,2021,34(3):107-110.

[29] KATHERINE G, VUHOLM A S, WEJSE K S, et al. Behavior of mixed pea-whey protein at interfaces and in bulk oil-in-water emulsions [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2022, 81: 103136.