

牦牛皮肽与EGCG的相互作用及其消化特性

黄玉荣¹, 于家乐¹, 张子瑶¹, 王洪泽¹, 曹孟云¹, 金艳^{1*}, 张民^{1,2*}

(1. 天津科技大学食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457)

(2. 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300392)

摘要: 该研究通过酶解制备牦牛皮肽 (Yak Skin Peptides, YSP), 将其与 (-)-表没食子儿茶素没食子酸酯 ((-)-Epigallocatechin Gallate, EGCG) 反应制备复合物, 通过浊度、粒径、zeta 电位、多光谱分析及分子对接技术研究其相互作用, 并对其体外抗氧化活性和消化特性进行评价。结果表明, 采用胰蛋白酶酶解时, YSP 得率最高, 达 67.96%, 其中疏水氨基酸占总氨基酸的 54.01%。随着 EGCG 浓度的增加, 体系浊度和粒径均有增加, 表面电荷发生显著改变, 紫外吸收逐渐增强且荧光发生明显猝灭, 表明 YSP 与 EGCG 分子间相互作用增强, 形成了较稳定的复合物。同时, 傅里叶红外光谱结果表明复合物二级结构发生轻微变化, 可能存在 N-H、C=O 基团相互作用。更重要的是, YSP-EGCG 复合物表现出比其中任何一种都更强的抗氧化性, EGCG 修饰可有效保护并提高 YSP 在消化过程中的抗氧化活性。经质谱鉴定得到一条肽序列 SGDRGETGPAGPAGPIGPV, 通过分子对接进一步证实了其 EGCG 的结合方式为氢键相互作用。该研究表明 EGCG 能够对 YSP 的抗氧化性和稳定性产生增效作用, 为 YSP 及其复合物在食品或化妆品中的应用奠定基础。

关键词: 牦牛皮肽; (-)-表没食子儿茶素没食子酸酯; 非共价相互作用; 抗氧化活性; 消化特性; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2025)04-152-162

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.0335

Interaction and Digestive Characteristics of Yak Skin Peptide with EGCG

HUANG Yurong¹, YU Jiale¹, ZHANG Ziyao¹, WANG Hongze¹, CAO Mengyun¹, JIN Yan^{1*}, ZHANG Min^{1,2*}

(1.Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2.College of Food Science and Bioengineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China)

Abstract: The preparation of yak skin peptides (YSP) are studied through enzymatic hydrolysis, followed by synthesis of its complex with (-)-epigallocatechin gallate (EGCG). The interactions between YSP and EGCG were investigated using turbidity, particle size, zeta potential, multispectral analysis, and molecular docking techniques. In addition, their *in vitro* antioxidant activities and digestion properties were evaluated. The results indicated that the highest yield of YSP reaching 67.96%, was achieved through trypsin hydrolysis, with hydrophobic amino acids comprising 54.01% of the total amino acids. As the concentration of EGCG increased, both, turbidity and particle size of the system increased, and a significant change in surface charge was observed. Meanwhile, ultraviolet absorption gradually increased and fluorescence quenching was significantly enhanced, suggesting strengthening of the YSP and EGCG molecular interaction, leading to the formation of a

引文格式:

黄玉荣,于家乐,张子瑶,等.牦牛皮肽与EGCG的相互作用及其消化特性[J].现代食品科技,2025,41(4):152-162.

HUANG Yurong, YU Jiale, ZHANG Ziyao, et al. Interaction and digestive characteristics of yak skin peptide with EGCG [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 152-162.

收稿日期: 2024-03-19

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFF1100201); 天津市 131 创新团队项目 (201926)

作者简介: 黄玉荣 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 食品添加剂与功能配料, E-mail: 1542943765@qq.com

通讯作者: 金艳 (1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与功能配料, E-mail: jinyan@tust.edu.cn; 共同通讯作者: 张民 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学与营养, E-mail: zm0102@tust.edu.cn

relatively stable complex. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy revealed slight changes in the secondary structure of the complex, with potential interactions occurring between N-H and C=O groups. More importantly, the YSP-EGCG complex exhibited stronger antioxidant activity than either component alone. EGCG modification effectively protected and enhanced the antioxidant activity of YSP during digestion. The peptide sequence SGDRGETGPAGPAGPIGPV was identified by mass spectrometry, and molecular docking confirmed that the binding interaction between YSP and EGCG was primarily driven by hydrogen bonds. This study demonstrates that EGCG can enhance the antioxidant activity and stability of YSP, providing a foundation for the application of YSP and its complexes in food or cosmetic products.

Key words: yak skin peptide; (-)-epigallocatechin gallate; non-covalent interactions; antioxidant activity; digestive properties; molecular docking

牦牛以“高原之舟”闻名，因长期栖息于高寒、缺氧、强辐射等恶劣环境，使其产品具有独特的营养、感官、生物和加工性能^[1]。我国是全球养殖牦牛数量最多的国家，主要分布在青海、西藏、四川等地，资源优势明显^[2]。牦牛皮作为牦牛加工产业主要副产物，目前大部分用于低值皮革生产，造成极大的资源浪费。充分利用牦牛皮资源、开发多样化高值化牦牛皮产品是实现牦牛产业提质增效的关键之一。牦牛皮中蛋白质约占牦牛皮干重的89.74%，可作为天然活性肽的良好来源^[3]。已有研究表明，牦牛皮肽具有良好的抗氧化、降血糖等生理活性^[4]，在食品、生物医药等领域有巨大的应用潜力。然而，肽的储存稳定稳定性差、在消化过程中活性下降或诱导乳糜泻等问题极大限制了其广泛应用^[5]，利用多酚与肽互作制备复合物是目前解决这类问题的有效途径。

多酚具有多种功能和生物活性（如金属螯合、抗氧化和抗菌活性等），并且可以与肽表现出协同作用^[6]。(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-Epigallocatechin Gallate, EGCG)是茶叶中最丰富的植物多酚，以其羟基数量和独特的结构基团而具有强大的生物学活性，如抗炎、抗癌、心血管保护活性等^[7]。已有大量研究表明EGCG通过非共价相互作用与蛋白质或肽形成具有潜力的复合物。Chen等^[8]发现EGCG与牛血清白蛋白逐层组装的微胶囊不仅在食品加工和胃消化中保护免疫球蛋白G，还可以将其在小肠中实现靶向递送。刘雪梅^[9]研究发现，EGCG的引入不仅提高了河蚬多肽在胃肠消化下的抗氧化能力，还能抑制其在胃肠道的进一步水解。Han等^[10]发现EGCG的添加能够改善大豆分离蛋白的起泡及乳化性能。总体而言，EGCG与蛋

白质或肽形成的复合物呈现出在食品工业中广泛的应用潜力，兼具优良的营养特性及加工特性。分子对接技术是运用计算机模拟探索分子间相互作用机制及可行性，可直接揭示分子间相互作用力、距离及结合位点等，与物质光谱分析结果相互印证，近些年来已受到广泛研究和应用^[11]。

因此，本文利用不同蛋白酶进行酶解，制备出具有高抗氧化活性和高产量的牦牛皮肽(Yak Skin Peptides, YSP)，再将其与EGCG进行复配，采用浊度、粒径、电位、多光谱分析、质谱鉴定及分子对接技术研究YSP与EGCG之间的相互作用，并对其体外抗氧化活性和消化特性进行评价。本研究旨在通过与多酚互作提高牦牛皮肽在加工或应用过程中的稳定性和活性，改善其营养和加工双重特性，为开发更具创新性和功能性的活性肽产品提供新思路，为其在食品、化妆品、医药领域的广泛应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牦牛皮，阿坝州高原之歌食品有限公司；碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶（食品级），南宁东恒华道生物科技有限责任公司；EGCG，毕得医药；牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)，广州赛国生物科技有限公司；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)，美国Sigma公司；2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS)，上海麦克林生化科技股份有限公司；6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸

(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid, Trolox), 北京索莱宝科技有限公司; 乙腈(色谱纯), 国药集团化学试剂有限公司; 其它所用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Zetasizer Advance 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国马尔文帕纳科公司; F-7100 型荧光分光光度计, 日本日立; Synergy HTX 型多功能酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; MODULYOD-230 型真空冷冻干燥机, 美国赛默飞世尔科技有限公司; DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 2550 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; IS50 型傅里叶红外光谱仪, 美国尼高利公司; Q Exactive HF-X 质谱仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 牦牛皮预处理

将新鲜牦牛皮进行称重, 机械去毛, 去除结缔组织和脂肪, 经切块、匀浆、烘干、磨粉得到牦牛皮粉, 储存于 -20°C 备用。

1.3.2 YSP 的酶解制备

采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶六种蛋白酶进行 YSP 的酶解制备。具体来说, 配制料液比为 1:30 (g/mL) 的牦牛皮粉溶液, 加入 7 000 U/g 不同蛋白酶, 在各最适酶解温度和 pH 值条件下进行恒温震荡。酶解 4 h 后沸水浴 10 min, 再经 3 500 r/min 离心 20 min 后, 收集上清液冷冻干燥得到 YSP。

1.3.3 肽得率的测定

参考 Liu 等^[12]的方法并稍作修改, 采用双缩脲法进行多肽含量的测定。分别取 1 mL 0.2、0.4、0.6、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的 BSA 标准溶液, 加入 4 mL 双缩脲试剂, 室温反应 0.5 h 后于 540 nm 处进行吸光度测定。以 BSA 蛋白质浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。按照上述步骤测定 YSP 中肽的含量, 并计算肽得率。

1.3.4 抗氧化活性测定

1.3.4.1 DPPH 自由基清除率的测定

按照吴慧琳等^[13]描述的方法并稍作修改, 将

100 μL 样品溶液与 100 μL 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液混合, 并将混合物在室温下避光反应 30 min, 用紫外分光光度计在 517 nm 处测量吸光度。利用公式 (1) 计算样品 DPPH 自由基清除率, 计算结果如下:

$$X = \left(1 - \frac{A_x - A_0}{A_1 - A_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

X ——DPPH 自由基清除率, %;

A_x ——样品与 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液反应时吸光度值;

A_0 ——样品与无水乙醇溶液反应时吸光度值;

A_1 ——去离子水与 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液反应时吸光度值;

A_2 ——去离子水与无水乙醇溶液反应时吸光度值。

1.3.4.2 ABTS⁺自由基清除率的测定

参考 Karami 等^[14]的方法并稍作修改, 配制 7.4 mmol/L 的 ABTS 溶液, 与 2.6 mmol/L 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液等体积混合并避光 16 h, 用无水乙醇进行稀释, 使其在 734 nm 下的吸光度在 0.70 ± 0.02 范围内, 得到 ABTS 工作液。将 40 μL 样品溶液与 160 μL ABTS 工作液混合加入 96 微孔板中, 于室温避光反应 10 min, 在 734 nm 测得吸光度值。利用公式 (2) 计算样品 ABTS⁺ 自由基清除率: 计算结果如下:

$$X = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

X ——ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_0 ——表示样品与 ABTS 工作液反应时吸光度值;

A_1 ——表示去离子水与 ABTS 工作液反应时吸光度值。

1.3.5 YSP 中总氨基酸的测定

准确称取固体样品 50 mg 加入水解管中, 并加入 10 mL 6 mol/L 盐酸, 管中吹入氮气 30 s 并密封, 置于油浴锅 110°C 水解 22 h。水解结束后待冷却至室温, 用 0.45 μm 膜过滤到 50 mL 容量瓶中并定容。吸取定容后的样品 2 mL, 置旋转蒸发器上脱酸, 温度 45°C , 脱置干燥, 瓶底部留有少许固体或痕渍为止, 加入 2 mL 样品缓冲液充分溶解, 通过 0.45 μm 过滤器过滤后, 采用氨基酸分析仪进行分析。Na 型阳离子树脂层析柱: 200 mm $\times$ 4.6 mm, 紫外检测波长为 570、440 nm; 柱温: $55 \sim 65 \sim 77^{\circ}\text{C}$ 程序升

温, 反应槽的温度为 138 ℃, 进样量为 20 μL 。

1.3.6 YSP中肽分子量分布的测定

采用高效液相色谱法测定分子量分布。配制 2 mg/mL YSP 溶液并经 0.45 μm 的滤膜。选择 TSK-gel 2000 SWXL 色谱柱 (300 mm $\times$ 7.8 mm), 流动相为乙腈: 水: 三氟乙酸 (体积比为 10:40:0.05), 检测波长为 214 nm, 柱温 30 ℃, 流速为 0.5 mL/min, 进样量为 20 μL 。选择五种不同分子量标准品, 包括细胞色素 C (12 200 u)、抑肽酶 (6 511 u)、杆菌肽 (1 422 u)、Gly-Gly-Tyr-Arg (451 u)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (189 u), 以标准品的保留时间为横坐标, 以分子量对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归分析得到标准曲线。通过样品的峰面积可计算出 YSP 中不同分子量的分布范围。

1.3.7 YSP-EGCG复合物的制备

YSP 与 EGCG 的非共价复合物的制备过程参考相关研究方法^[15]。配制 5 mg/mL 的 YSP 水溶液, 涡旋混匀后过夜水合, 将其与不同质量浓度 (0.25、0.5、1、2.5、5、10 mg/mL) 的 EGCG 溶液等体积混合, 使 YSP 最终质量浓度为 2.5 mg/mL, 室温下搅拌 2 h, 得到质量浓度比为 20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、1:2 的 YSP-EGCG 复合物。

1.3.8 YSP-EGCG复合物的外观形貌及浊度

采用紫外分光光度计, 在 600 nm 处测量 YSP 和 YSP-EGCG 复合物的浊度。

1.3.9 YSP-EGCG复合物的粒径和电位测定

利用紫外-可见分光光度计测定 YSP 和 YSP-EGCG 复合物的粒径和电位, YSP 和 YSP-EGCG 复合物分别稀释 10 倍进行测定。

1.3.10 YSP-EGCG复合物的紫外吸收光谱测定

将样品稀释 10 倍 (即 YSP 质量浓度为 0.25 mg/mL) 后, 采用紫外-可见分光光度计在 200~400 nm 波长范围内测定 YSP 及 YSP-EGCG 复合物的紫外光谱。

1.3.11 YSP-EGCG复合物的傅里叶红外光谱测定

采用傅里叶变换红外光谱分析 YSP 及 YSP-EGCG 复合物的二级结构。将样品冷冻干燥, 将 150 mg 溴化钾与 1 mg 样品混合并压片制备透明薄膜, 在 400~4 000 cm^{-1} 的范围内以 cm^{-1} 的分辨率进行 32 次扫描, 记录样品的红外光谱, 利用 OMNIC 8.2 软件进行数据分析。

1.3.12 YSP-EGCG复合物的荧光光谱测定

采用日立 F-7100 荧光分光光度计扫描 YSP 及 YSP-EGCG 复合物的荧光光谱, 测定条件: 激发波长为 280 nm, 发射波长为 300~500 nm。

1.3.13 YSP-EGCG复合物的胃肠模拟消化

采用 3.2 mg/mL 的胃蛋白酶与 2.0 mg/mL 的 NaCl 溶液混合制备 pH 值为 2.0 的模拟胃液, 采用 2.0 mg/mL 的胰蛋白酶、12 mg/mL 的胆盐、3.2 mg/mL 的胰脂酶、6.8 mg/mL 的 K_2HPO_4 和 8.8 mg/mL 的 NaCl 溶液混合制备 pH 值为 7.0 的模拟肠液, 将 YSP 与 YSP-EGCG 复合物进行模拟体外胃肠消化。未消化阶段的样品记作 S_0 ; 用 1 mol/L HCl 将样品溶液 pH 值调节至 2.0, 吸取 0.5 mL 样品与 4.5 mL 模拟胃液混合于 37 ℃ 的水浴振荡器中以 100 r/min 孵育 60 min, 得到胃模拟消化阶段的样品 S_1 ; 用 1 mol/L NaOH 将剩余样品溶液 pH 值调节至 7, 加入 4.5 mL 模拟肠液混合于 37 ℃ 的水浴振荡器中以 100 r/min 孵育 120 min, 得到肠模拟消化阶段的样品 S_2 。将消化样品以 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 4 ℃ 条件下进行保存。

采用 DPPH 自由基清除能力及 ABTS⁺ 自由基清除能力来评估消化产物的抗氧化能力, 方法可以参照 1.3.4.1 和 1.3.4.2。采用 Trolox 标准品绘制标准曲线, 方程为 $y=0.893\ 9x+6.731$ ($R^2=0.990\ 6$), 以每克样品 μmol Trolox 当量 (TE) 表示样品对 DPPH 自由基的清除能力。采用 Trolox 标准品绘制标准曲线, 方程为 $y=0.501\ 5x+13.519$ ($R^2=0.994\ 3$), 以每克样品 μmol Trolox 当量 (TE) 表示样品对 ABTS⁺ 自由基的清除能力。

1.3.14 YSP的肽序列鉴定

通过 LC-MS/MS 技术对 YSP 进行肽序列鉴定。液相色谱条件为: 流动相 A 液为 0.1% 甲酸水溶液, B 液为 0.1% 甲酸乙腈水溶液 (乙腈占 84%)。液相色谱柱为 RP-C18 (0.15 mm $\times$ 150 mm, Column Technology luc.)。液相梯度洗脱设置如下: 0~50 min, B 液从 4%~50% 线性梯度; 50~54 min, B 液从 50%~100% 线性梯度; 54~60 min, B 液维持在 100%。随后采用 Q Exactive HF-X 质谱仪 (Thermo Fisher) 进行 60 min 的正离子质谱分析, 肽及其碎片的质量电荷比按照每次全扫描 (Full Scan) 后采集 10 个碎片图谱。

1.3.15 YSP与EGCG的分子对接

通过 ChemDraw 软件绘制肽的 2D 结构式, 再使

用 Chem3D 转化为 3D 结构, 并进行能量最小化处理。利用 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载 EGCG 结构。采用 AutoDockTools 1.5.6 软件对肽分子进行去水、加氢和加电荷处理, 设置对接盒子包含整个肽结构, 运行 Grid 进行分子对接, 对接次数为 100 次。根据 Autodock Vina 对接结果, 筛选出结合能最低的构象作为绑定构象, 并使用 PyMol 2.5 进行可视化。

1.3.16 数据分析

所有的数据都重复 3 次, 数据结果以平均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS 软件进行单因素方差分析, 并采用 Origin 2018 对数据进行处理和作图, 使用 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶对 YSP 肽得率和抗氧化活性的影响

肽得率可客观量化地反映出酶解进程及其水解程度, 不同蛋白酶对 YSP 得率的影响如图 1a 所示。结果表明, 胰蛋白酶酶解制备的肽得率最高, 为 67.96%, 木瓜蛋白酶次之, 肽得率为 59.13%, 而胃蛋白酶酶解效果最差, 肽得率仅为 40.23%。胰蛋白酶酶解牦牛皮的肽得率显著高于其他五种蛋白酶酶解时的肽得率 ($P < 0.05$), 这可能是由蛋白酶的水解特异性和牦牛皮蛋白质氨基酸组成、排列和结构所决定的。虽然碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶是目前常用的蛋白质水解用酶, 但其水解特异性不同导致其对不同原料蛋白质的酶解效果会有明显差异。现有研究已发现, 碱性蛋白酶优先切割肽键 N 末端, 酶解效果较好, 但可能会产生较多的游离氨基酸; 中性蛋白酶优先切割 C 末端的亮氨酸和苯丙氨酸之间的肽键, 木瓜蛋白酶优先作用于疏水性和芳香族氨基酸肽键; 风味蛋白酶是一种混合物, 优先切割亮氨酸-脯氨酸或脯氨酸-脯氨酸之间的肽键; 胃蛋白酶主要作用于 N 端芳香氨基酸; 胰蛋白酶主要作用于赖氨酸和精氨酸残基, 是一种丝氨酸内肽酶^[16]。本研究结果中, 经胰蛋白酶酶解后牦牛皮肽得率最高, 表明牦牛皮蛋白中可能含有较多赖氨酸与精氨酸。Yang 等^[17]采用酶法制备了牦牛皮明胶水解物, 发现胰蛋白酶比中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶更有效的提高其水解度, 这与本研究结果相似。

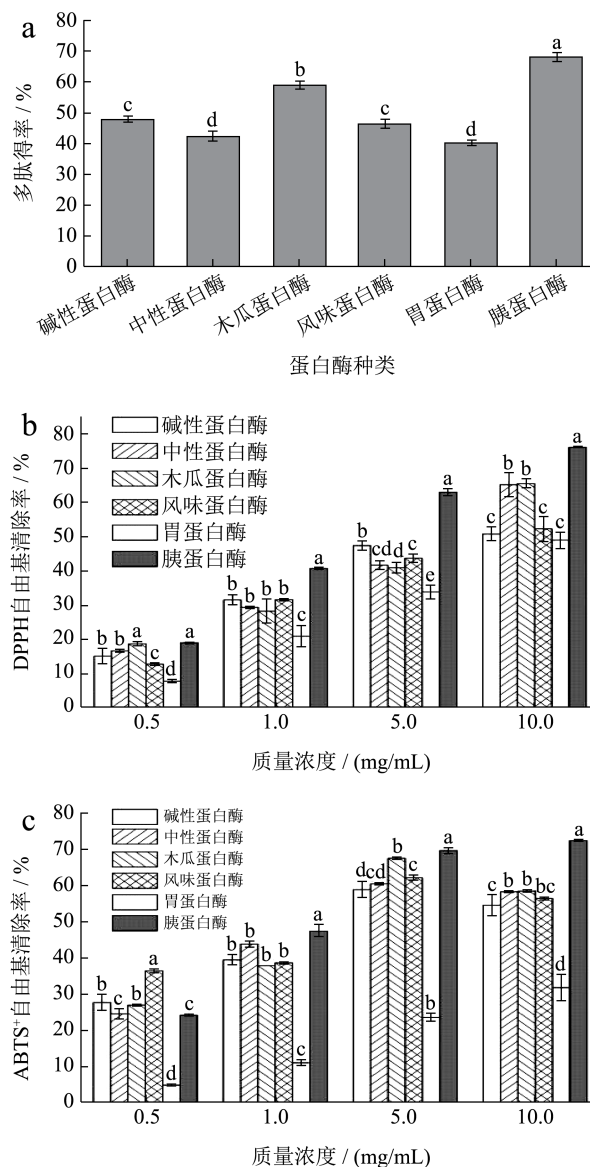


图 1 不同蛋白酶对 YSP 肽得率和抗氧化活性的影响

Fig.1 Effect of different proteases on the yield and antioxidant activity of YSP peptide

注: 小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

不同蛋白酶对 YSP 抗氧化活性的影响如图 1b 所示, 在各质量浓度下, 胰蛋白酶酶解制备的 YSP 对 DPPH 自由基的清除能力显著高于其他蛋白酶 ($P < 0.05$), 并在 10 mg/mL 时清除率达到了 76.09%。同时, 当质量浓度大于 0.5 mg/mL 时, 胰蛋白酶酶解制备的 YSP 对 ABTS⁺ 自由基的清除能力显著高于其他蛋白酶 ($P < 0.05$), 且在 10 mg/mL 时清除率达到了 72.37%。已有研究表明肽链长度或肽分子量与其抗氧化活性有明显关系, 通常低分子量肽的抗氧化能力更强^[18]。综上所述, 胰蛋白酶的酶解效果最佳, YSP 得率最高, 且具有良好的抗氧化活性。

表 1 YSP的总氨基酸成分分析

Table 1 Analysis of the total amino acid composition of the YSP

序号	名称	氨基酸含量/(mg/g)
1	天冬氨酸 (Asp)	66.19
2	谷氨酸 (Glu)	94.70
3	丝氨酸 (Ser)	42.81
4	甘氨酸 (Gly)	124.90
5	苏氨酸 (Thr)	28.00
6	丙氨酸 (Ala)	72.22
7	脯氨酸 (Pro)	118.67
8	精氨酸 (Arg)	71.96
9	缬氨酸 (Val)	28.80
10	赖氨酸 (Lys)	46.13
11	组氨酸 (His)	13.58
12	酪氨酸 (Tyr)	16.65
13	苯丙氨酸 (Phe)	24.27
14	亮氨酸 (Leu)	40.36
15	异亮氨酸 (Ile)	32.10
16	半胱氨酸 (Cys)	12.23
17	蛋氨酸 (Met)	19.39
必需氨基酸 EAA		232.63
非必需氨基酸 NEAA		620.33
疏水性氨基酸 HAA		460.71
芳香氨基酸 AAA		40.92
氨基酸总量 TAA		852.96

2.2 YSP中总氨基酸组成

活性肽的氨基酸组成受蛋白质来源、蛋白酶类型及酶解条件的影响，对其理化性质和生物特性起重要作用，也在一定程度上决定了肽的生物活性^[19]。经胰蛋白酶酶解制备得到的 YSP 中氨基酸组成及含量如表 1 所示。YSP 中氨基酸总量为 852.96 mg/g，17 种氨基酸均被检出，其中甘氨酸含量最高，约占总氨基酸含量的 14.64%，其次是脯氨酸约占 13.91%、谷氨酸约占 11.1%、丙氨酸约占 8.47% 及精氨酸约占 8.44%，而半胱氨酸约占 1.43%、组氨酸约占 1.59%。总体而言，YSP 中疏水氨基酸、碱性氨基酸、酸性氨基酸占比分别为 54.01%、15.43%、18.86%。已研究表明疏水氨基酸能够通过 与 自 由 基 反 应 减 少 氧 化 应 激 对 细 胞 或 组 织 的 损 伤，进而显著提高生物活性肽的抗氧化活性，也可通过提高活性肽的脂溶性、促进其于脂质之间相互作用，从而抑制脂质过氧化^[20]。同时，酸性氨基酸与碱性氨基酸也能提高活性肽的抗氧化性，例如酸性

氨基酸天冬氨酸和谷氨酸可作为有效的电子供体或金属离子的螯合剂，碱性氨基酸可作为有效的氢供体^[21]。本研究发现 YSP 中各类氨基酸含量较为丰富且疏水氨基酸占比最高，表明 YSP 具有开发高活性抗氧化剂的良好潜力。

2.3 YSP的分子量分布

YSP 的分子量分布如表 2 所示。YSP 的分子量小于 1 421.69 u 部分约占总肽含量的 89.74%，说明 YSP 主要由多种分子量较小的肽组成。研究发现活性肽的分子质量和抗氧化活性呈负相关^[22]，低分子量多肽可能表现出较强的抗氧化活性，这是因为小分子多肽易与氧化物质相互作用，中和自由基，具备良好的抗氧化性。低分子量多肽因分子量较小，更易被生物体吸收和利用，可能在生物体内发挥特定的生物学功能，如调节免疫系统、促进生长、改善皮肤健康等^[23]。这可能成为 YSP 作为生物活性物质的一个优势。但是，YSP 在生物体内可能会受多种因素影响，如氧化、水解、酶解等导致其稳定性下降，为保护 YSP，可通过与多酚复配形成复合物来提高其稳定性。

表 2 YSP的相对分子质量的分布

Table 2 Distribution of relative molecular weights of YSP

分子量范围/u	含量/%
>12 200	0.006 4
6 511.44~12 200	1.26
1 421.69~6 511.44	8.99
451.48~1 421.69	42.17
189.17~451.48	26.01

2.4 YSP-EGCG复合物的表征结果

2.4.1 外观形貌及浊度

YSP-EGCG 复合物的外观和浊度结果如图 2 所示，在 YSP 质量浓度为 2.5 mg/mL 的条件下，随 EGCG 浓度的增加，样品溶液的颜色逐渐加深，浊度逐渐增加，这表明 YSP 和 EGCG 发生了聚集，形成了足够大的络合物来散射光。当较低多酚的浓度的情况下，浊度没有显著性变化，当 YSP 与 EGCG 的质量比达到 2:1 时，浊度发生显著性变化 ($P<0.05$)。当质量比达到 1:2 时，样品浑浊且有沉淀析出，可能出现多酚与多肽之间的饱和效应，从而促使凝聚或沉淀的形成，导致浊度的增加。在之前的研究中也报道了类似的现象，当多酚与玉米醇溶蛋白混合时透光率逐渐下降，表明浊度逐渐增

加，由于较多的多酚与蛋白发生相互作用导致颗粒发生聚集^[24]。

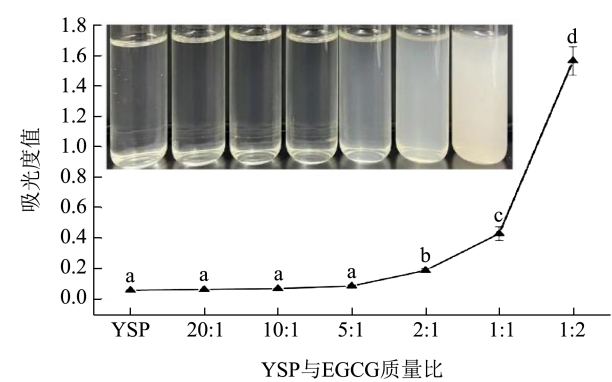


图 2 YSP-EGCG 复合物的外观形貌及浊度

Fig.2 Morphology and turbidity of YSP-EGCG complexes

注：小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.4.2 粒径分布及Zeta电位

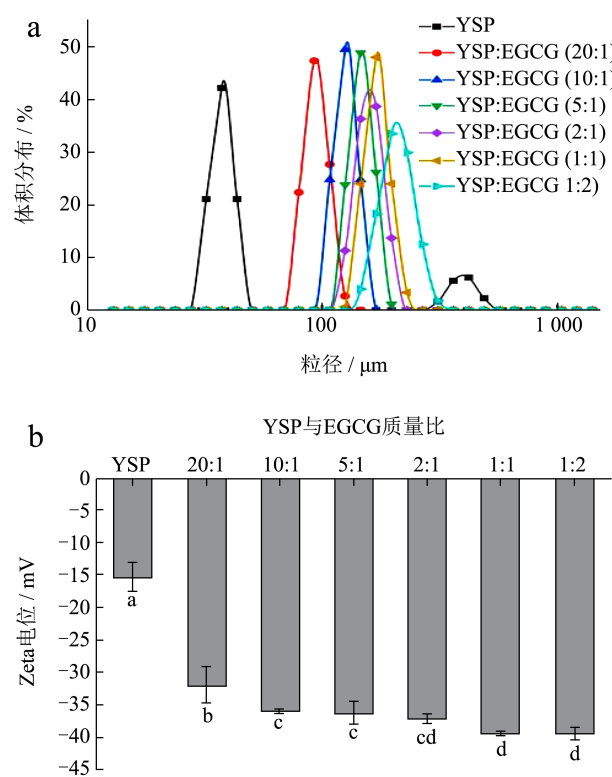


图 3 YSP-EGCG 复合物的粒径分布及 Zeta 电位

Fig.3 Particle size distribution and zeta potential of YSP-EGCG complexes

注：小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

YSP-EGCG 复合物的粒径体积分布图和 Zeta 电位如图 3a、3b 所示。由图 3a 可以看出，YSP-EGCG 复合物的粒径随 EGCG 浓度的增加而增加，在较高 EGCG 的浓度下会形成较大的颗粒。在低 EGCG 浓度下，YSP 结合 EGCG 的数量有限，不会

形成较大的聚集体。增加 EGCG 浓度可促进 YSP 与 EGCG 的交联，图 2 展示了复合物的外观形貌，从中可以看出复合物存在较大的聚集体。有研究发现大豆分离蛋白与儿茶素形成的复合物粒径随儿茶素浓度的增加而增加，儿茶素浓度增加可促进其与儿茶素的交联，复合物中出现较大的聚集体^[25]，这与本研究结果相似。

由图 3b 可以看出，YSP 和 YSP-EGCG 复合物的 Zeta 电位均为负值，表明所有的样品表现出来的是负电荷，与 YSP 相比，YSP-EGCG 复合物的 Zeta 电位绝对值显著增加 ($P<0.05$)。Zeta 电位与溶液中粒子表面的电荷强度有关，反映了静电排斥或静电吸引的强度。YSP 溶液的 Zeta 电位为 -15.33 mV，随着 EGCG 浓度的增加，电位绝对值逐渐增加，表面电荷的改变可能是由于 EGCG 带有多酚羟基引入造成的，YSP 与大量带负电荷的 EGCG 结合。有研究发现原花青素与花生主要过敏原形成聚合物后，Zeta 电位降低，改变了过敏原上的整体负电荷，证实多酚与蛋白结合^[26]。YSP 与 EGCG 质量浓度比从 1:1 变化到 1:2 时，复合物的电位绝对值无显著性差异，可能体系达到了平衡，相互作用已经饱和。Zeta 电位的大小与体系稳定性之间有很大关系^[27]，较高的负电荷说明 YSP-EGCG 复合物可能会比单独的 YSP 具有较高的稳定性。

2.5 YSP-EGCG复合物的多光谱分析结果

2.5.1 紫外吸收光谱分析

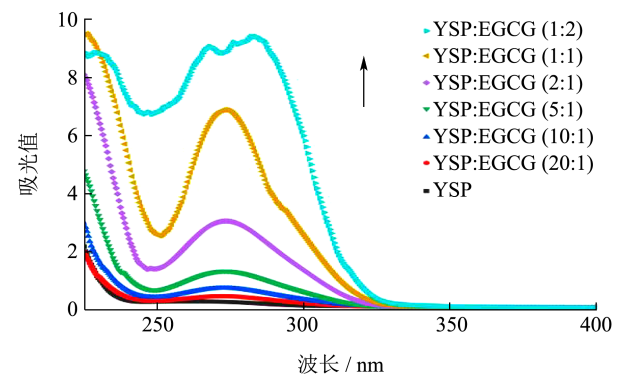


图 4 YSP-EGCG 复合物的紫外吸收光谱

Fig.4 UV-absorption spectra of the YSP-EGCG complex

YSP-EGCG 复合物的紫外吸收光谱如图 4 所示，所有样品的紫外吸收峰最大值在 275 nm 左右，这表明样品中可能存在含共轭双键的酪氨酸和苯丙氨酸等芳香族氨基酸残基。因为色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸残基和较小程度上的二硫键分别在 280、

275、258 和 260 nm 处最大程度地吸收紫外光^[28]。吸收峰的强度和位置变化可以揭示氨基酸残基微环境的变化,随着 EGCG 浓度的增加, YSP 的吸收峰强度增强,说明 YSP 的芳香氨基酸和 EGCG 之间存在有效的相互作用,且相互作用增强,形成了新的复合物。当 YSP 与 EGCG 的质量浓度比 1:2 时,吸收峰发生明显的变化,这可能由于高浓度的多酚导致复合物颗粒较大,相对体积较大,进而降低表面能量,使紫外吸收峰向长波长方向移动。先前研究已证实,枣叶多酚与不同骆驼奶蛋白络合后,紫外吸收光谱发生变化,这与本研究 YSP-EGCG 复合物的结果相吻合^[29]。总之,吸收峰的强度的增加和吸收峰发生轻微移动,表明 YSP 和 EGCG 结合形成了新的复合物。

2.5.2 傅里叶红外光谱分析

傅里叶变换红外光谱通过测定蛋白质在不同振动频率下的吸收特征光谱峰,可反映其构象和相互作用状态^[30]。YSP 与 YSP-EGCG 复合物的傅里叶红外光谱图如图 5 所示, YSP 在酰胺 A 带 3401.4 cm^{-1} 处有特殊吸收峰, YSP-EGCG 复合物在酰胺 A 带发生红移,峰位变化表明 YSP 与 EGCG 的相互作用程度不同。具体地,峰位从 3401.4 cm^{-1} 移到 3376.76 cm^{-1} ,说明 YSP 分子间的 N-H 键拉伸振动。此外,随着 EGCG 浓度的增加,更多的酚羟基被引入,进而促进了与 YSP 的氢键形成^[31]; YSP 在酰胺 I 带 1641.27 cm^{-1} 处有吸收峰,可能是多肽骨架酰胺基团 ($\text{C}=\text{O}$) 的伸缩振动所致, YSP-EGCG 复合物在酰胺 I 带发生红移,从 1641.27 cm^{-1} 移至 1620.95 cm^{-1} ,证实 EGCG 可能与 YSP 的 N-H、 $\text{C}=\text{O}$ 基团相互作用。在之前的大豆分离蛋白与儿茶素的研究中发现儿茶素浓度的增加会导致蛋白结构发生改变^[32],这与本研究中结果相似。

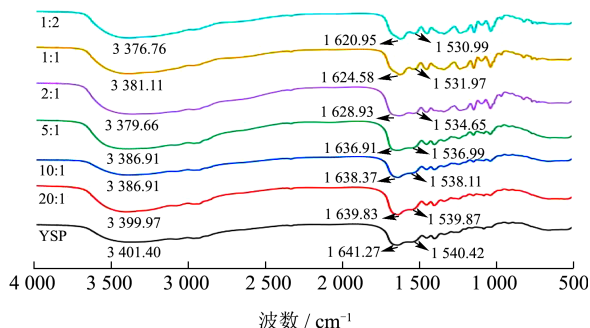


图 5 YSP-EGCG 复合物的傅里叶红外光谱

Fig.5 Fourier transform infrared spectra of the YSP-EGCG complex

2.5.3 荧光光谱分析

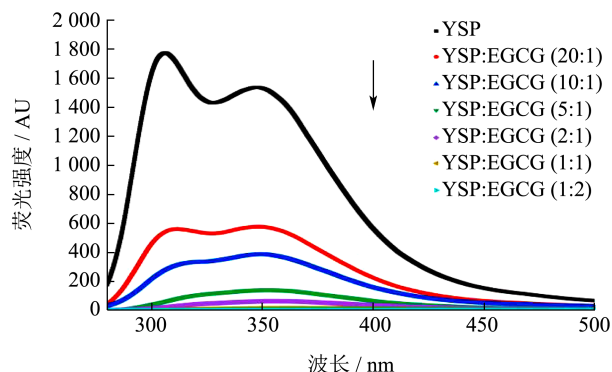


图 6 YSP-EGCG 复合物的荧光光谱

Fig.6 Fluorescence spectra of YSP-EGCG complexes

特定激发波长的光照射色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸时,会发生荧光发射。通过激发和检测这些氨基酸的荧光信号,可以研究蛋白质的结构^[33]。YSP 与 YSP-EGCG 复合物的荧光光谱图如图 6 所示, YSP 具有高荧光强度,加入 EGCG 后,荧光强度随其浓度增加而减弱,表明 EGCG 猝灭了 YSP 的内源荧光,可能由于多酚与蛋白的荧光团发生了相互作用,也可能由于多酚的芳香环可与 YSP 的酪氨酸残基结合,导致芳香族氨基酸残基微环境疏水性降低,进而使 YSP 的内源荧光猝灭^[34]。有研究发现乳清蛋白与酚类化合物结合后,由于疏水氨基酸参加了两者的相互作用,导致乳清蛋白的荧光猝灭^[35]。总之,EGCG 的加入导致 YSP 的荧光强度降低,这表明 EGCG 可能与 YSP 发生了相互作用。

2.6 消化产物的抗氧化活性分析

体外模拟消化前后 YSP 与 YSP-EGCG 复合物的抗氧化活性变化如表 3 所示,一方面可以看出 EGCG 的加入明显提高了 YSP-EGCG 复合物对 DPPH 和 ABTS^+ 自由基的清除率,相较于纯 YSP,差异显著 ($P < 0.05$)。这表明 YSP-EGCG 复合物的抗氧化能力优于纯 YSP,且随 EGCG 浓度增加而提高。这种增强可能与 EGCG 分子结构中的氢原子或电子供体能力有关,使其更易于与 DPPH 自由基发生反应,从而更有效地清除自由基。此外,多酚与蛋白质结合时,游离的羟基也可能产生抗氧化功能。有研究发现多酚与胶原蛋白和酪蛋白相互作用后,复合物的自由基清除活性增加,这与本研究结果相似^[36]。

表 3 YSP-EGCG复合物体外消化物DPPH、ABTS⁺自由基清除率测定
Table 3 *In vitro* digestate DPPH and ABTS free radical scavenging assay of YSP-EGCG complex

NO.	DPPH 自由基清除率活性/(μmol TE/g)			ABTS ⁺ 自由基清除率活性/(μmol TE/g)		
	S ₀	S ₁	S ₂	S ₀	S ₁	S ₂
20:1	83.40±2.86 ^b	73.44±0.42 ^b	88.95±1.10 ^b	137.32±2.04 ^b	117.37±0.76 ^b	141.67±2.14 ^b
10:1	85.90±1.18 ^{bc}	82.11±3.05 ^c	90.66±1.88 ^{bc}	138.41±0.54 ^b	132.82±5.44 ^c	143.34±0.86 ^{bc}
5:1	87.00±2.15 ^c	86.75±0.97 ^{cd}	91.88±1.94 ^{bc}	141.52±1.68 ^c	141.09±1.73 ^{cd}	149.05±1.83 ^{bcd}
2:1	88.09±1.18 ^{cd}	84.68±0.76 ^d	93.47±2.44 ^{cd}	147.30±1.18 ^d	137.40±1.36 ^e	153.64±0.42 ^{bcd}
1:1	88.56±0.54 ^{cd}	86.75±0.97 ^d	96.28±1.32 ^d	151.21±0.28 ^e	141.09±1.73 ^e	155.04±0.64 ^{cd}
1:2	91.21±2.93 ^d	87.36±1.18 ^d	101.16±1.29 ^c	152.58±0.72 ^e	142.19±2.09 ^e	156.99±0.42 ^d
YSP	77.60±0.52 ^a	63.18±3.16 ^a	52.19±1.69 ^a	117.34±0.65 ^a	93.77±4.18 ^a	72.46±4.10 ^a

注：结果表示为 Mean ± SD (n=3)，同一列不同数字代表数据间显著性差异 (P<0.05)。S₀ 表示未消化样品，S₁ 表示胃消化产物，S₂ 表示肠消化产物。

另一方面可以观察 YSP 与 YSP-EGCG 复合物在不同消化阶段的 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力。首先，YSP 的 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力在模拟消化过程中呈下降趋势，可能因其水解成游离氨基酸，导致抗氧化活性降低。相比之下，YSP-EGCG 复合物的 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力呈现先下降后上升的趋势。在模拟胃消化过程中，酸性环境可能促进 EGCG 与胃蛋白酶的结合，影响酚类化合物的释放。在模拟肠道消化过程中，随着蛋白质聚集体的崩解，释放出小分子肽和 EGCG。肽与 EGCG 协同增强抗氧化效果。因此，EGCG 的修饰提高了 YSP 在消化过程中的抗氧化活性，通过胃消化阶段促进结合和肠道消化阶段的协同作用，最终提升抗氧化能力。也有研究发现桑多酚可增强猪肉肌原纤维蛋白在消化过程中的抗氧化能力^[37]。总之，EGCG 的修饰提高了 YSP 在消化过程中的自由基清除活性。

2.7 YSP与EGCG的分子对接结果

为了探索互作机制，对 YSP 的肽序列进行鉴定，通过液相保留时间内的分子离子峰，经诱导解析得到二级质谱图，将 bn 及 yn 离子比对计算。牦牛皮氨基酸序列可在数据库中搜索 (uniprot_Bos_mutilus_grunniens_39886_20230713)，通过对质谱图中的四个分子离子峰二级质谱解析，质核比 (m/z) 分别为 1140.581 5、1690.827 5、1275.645 9 和 950.409 37 u 的母离子经诱导解离断裂所产生的 bn 及 yn 离子系列完全匹配，确定了四条活性肽序列，这些序列分别为 DLSFLPQPPQ、SGDRGETGPAGPAGPIGPV、GETGPAGPAGPIGPV 和 GPSGPPGPDGN。

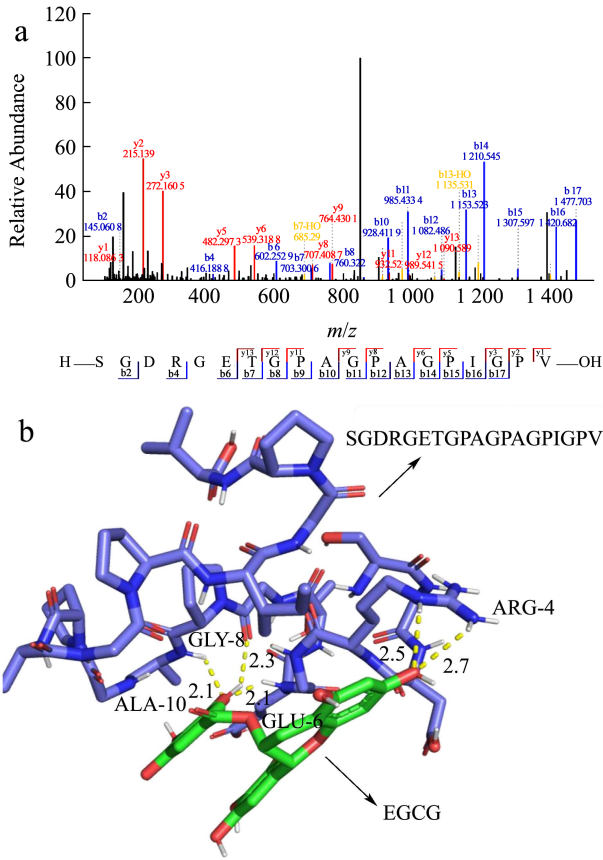


图 7 SGDRGETGPAGPAGPIGPV 的二级质谱图 (a) 及其与 EGCG 的分子对接图 (b)

Fig.7 Seconury mass spectrum of SGDRGETGPAGPAGPIGPV (a) and its molecular docking diagram with EGCG (b)

分子对接被广泛用于预测配体与受体之间的相互作用。通过分子对接技术建立 YSP 与 EGCG 相互作用的结合模型，四条活性肽与 EGCG 的结合能分别为 -3.6、-5.6、-4.4 和 -3.7 kJ/mol，SGDRGETGPAGPAGPIGPV 结合能力强，其二级质谱图如 7a 所示。其与 EGCG 相互作用位点如

图 7b 所示, 两者相互结合, 且具有多个结合位点, EGCG 与 SGDRGETGPAGPAGPIGPV 的 ARG-4、GLU-6、GLY-8、ALA-10 氨基酸残基形成 5 个氢键, 结合距离为 2.1~2.7 Å。键长越接近 2.5 Å 则氢键作用力越强^[38], 说明两者氢键作用力很强。分子对接结果与上述的光谱试验结论一致。

3 结论

本研究结果表明, 胰蛋白酶酶解制备的 YSP 具有良好的肽得率及抗氧化活性, 氨基酸含量丰富且分子量大部分小于 1 500 u。通过非共价相互作用, 制备了不同浓度多酚的 YSP-EGCG 复合物, 随着 EGCG 浓度的增加, 复合物粒径、浊度及电位绝对值增加, 紫外吸收光谱强度增加且 YSP 荧光发生明显猝灭, 表明 YSP 与 EGCG 分子间相互作用增强, 形成稳定复合物。傅里叶红外光谱显示复合物二级结构发生轻微变化。由于 EGCG 的修饰, 复合物表现出比其中任何一种都更强的抗氧化特性, 同时提高了 YSP 在消化过程中的抗氧化活性。分子对接结果显示 EGCG 通过氢键相互作用与 YSP 紧密结合。YSP 与 EGCG 最佳复配比例为 1:1 时, YSP 与 EGCG 可形成可溶配合物。总之, EGCG 通过氢键相互作用增强 YSP 的抗氧化性和消化稳定性, YSP 及其 EGCG 复合物在食品配方中具有应用潜力, 为 YSP 加工特性和植物活性成分在健康食品开发中的应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 李金, 黄彪, 刘惠考, 等. 牦牛胶原蛋白肽降血糖效果研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(15): 338-343.
- [2] YANG H, XUE Y T, LIU J H, et al. Hydrolysis process optimization and functional characterization of yak skin gelatin hydrolysates [J]. Journal of Chemistry, 2019, 2019(3): 1-11.
- [3] HONG H, FAN H B, CHALAMAIAH M, et al. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives [J]. Food Chemistry, 2019, 301: 125222.
- [4] HE L, HAN L, WANG Y R, et al. Appropriate ultrasonic treatment improves the production of antioxidant peptides by modifying gelatin extracted from yak skin [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2022, 57(9): 5897-5908.
- [5] SINGH B P, VIJ S. *In vitro* stability of bioactive peptides derived from fermented soy milk against heat treatment, pH and gastrointestinal enzymes [J]. LWT, 2018, 91: 303-307.
- [6] BOUARAB CHIBANE L, DEGRAEVE P, FERHOUT H, et al. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(4): 1457-1474.
- [7] PAYNE A, TAKA E, ADINEW G M, et al. Molecular mechanisms of the anti-inflammatory effects of Epigallocatechin 3-Gallate (EGCG) in LPS-activated BV-2 microglia cells [J]. Brain Sciences, 2023, 13(4): 632.
- [8] CHEN C X, CHEN G J, WAN P, et al. Characterization of bovine serum albumin and (-)-Epigallocatechin gallate/3, 4-O-dicaffeoylquinic acid/tannic acid layer by layer assembled microcapsule for protecting immunoglobulin G in stomach digestion and release in small intestinal tract [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(42): 11141-11150.
- [9] 刘雪梅. 多酚与河蚬多肽复合物的抗氧化活性及消化特性研究[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2022.
- [10] HAN S, CUI F Z, MCCLEMENRS D J, et al. Structural characterization and evaluation of interfacial properties of pea protein isolate-EGCG molecular complexes [J]. Foods, 2022, 11(18): 2895.
- [11] 余雨婷, 张彦, 张迎, 等. 基于分子对接探究紫苏粗提物对代谢综合征相关酶的抑制作用[J]. 食品与机械, 2022, 38(4): 183-188.
- [12] LIU Z L, PAN J H. A practical method for extending the biuret assay to protein determination of corn-based products [J]. Food Chemistry, 2017, 224: 289-293.
- [13] 吴慧琳, 李苗云, 朱瑶迪, 等. 发酵小米体外胃肠消化特性及抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(11): 154-162.
- [14] KARAMI Z, PEIGHAMBARDoust S H, HESARI J, et al. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates [J]. Food Bioscience, 2019, 32: 100450.
- [15] WANG N, WANG R, XING K W, et al. Microfluidization of soybean protein isolate-tannic acid complex stabilized emulsions: Characterization of emulsion properties, stability and *in vitro* digestion properties [J]. Food Chemistry, 2024, 430: 137065.
- [16] 左依瑾. 罗非鱼皮抗氧化肽分离纯化过程对其结构及活性的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2024.
- [17] YANG H, XUE Y, LIU J, et al. Hydrolysis process optimization and functional characterization of yak skin gelatin hydrolysates [J]. Journal of Chemistry, 2019, 2019(3): 1-11.
- [18] ZHENG Z J, WEI X B, SHANG T T, et al. Bioconversion of duck blood cell: process optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization [J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 1-12.

- [19] SARABANDI K, AKBARBAGLU Z, PEIGHAMBARDOST S H, et al. Physicochemical, antibacterial and bio-functional properties of persian poppy-pollen (*Papaver bracteatum*) protein and peptides [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023, 17(5): 1-12.
- [20] ZOU T B, HE T P, LI H B, et al. The structure-activity relationship of the antioxiunt peptides from natural proteins [J]. Molecules, 2016, 21(1): 72.
- [21] WANG L, MA M, YU Z, et al. Preparation and identification of antioxiunt peptides from cottonseed proteins [J]. Food Chemistry, 2021, 352: 129399.
- [22] 张羽,汪芳,翁泽斌,等.麦胚清蛋白抗氧化肽的筛选及对细胞氧化损伤的保护作用[J].食品科学,2021,42(17):10-18.
- [23] ZHAO M G, LI B Y, HE H, et al. Preparation, identification, computational analysis of antioxiutive peptides derived from Lumbricus protein and prevention of UV-B radiation-induced skin umaged [J]. Food Bioscience, 2023, 52: 102492.
- [24] 高瑾,梁宏闪,赵靖昀,等.玉米醇溶蛋白-多酚相互作用及复合物制备与表征[J].食品科学,2022,43(2):8-17.
- [25] 董亚博,兰天,付元涛,等.大豆蛋白肽聚集体与EGCG复合纳米颗粒及其乳液特性[J].食品科学,2022,43(6):1-7.
- [26] GENG Q, ZHANG Y, MCLEMENTS D J, et al. Investigation of peanut allergen-procyanidin non-covalent interactions: Impact on protein structure and *in vitro* allergenicity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 258: 128340.
- [27] HU C, XIONG H G. Structure, interfacial adsorption and emulsifying properties of potato protein isolate modified by chitosan [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2022, 638: 128314.
- [28] BITER A B, POLLET J, CHEN W H, et al. A method to probe protein structure from UV absorbance spectra [J]. Analytical Biochemistry, 2019, 587: 113450.
- [29] BABA W N, ABDELRAHMAN R, MAQSOOD S. Production and utilization of non-covalent uiry-based proteins complexed with ute palm leave polyphenols for improving curcumin stability [J]. Food Bioscience, 2023, 53: 102690.
- [30] WANG X W, ZHAO R Y, YUAN W Q. Composition and seconury structure of proteins isolated from six different quinoa varieties from China [J]. Journal of Cereal Science, 2020, 95: 103036.
- [31] 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.
- [32] DAI S C, LIAN Z T, QI W J, et al. Non-covalent interaction of soy protein isolate and catechin: Mechanism and effects on protein conformation [J]. Food Chemistry, 2022, 384: 132507.
- [33] 裘兰兰,李金贵,李芳.分子对接技术与光谱法分析薯蓣皂苷和人血清白蛋白的相互作用[J].现代食品科技,2020, 36(10):93-99.
- [34] YANG R, LIU Y Q, XU J J, et al. Interaction between rice bran albumin and epigallocatechin gallate and their physicochemical analysis [J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(6): 1561-1569.
- [35] MENG Y Y, LI C. Conformational changes and functional properties of whey protein isolate-polyphenol complexes formed by non-covalent interaction [J]. Food Chemistry, 2021, 364: 129622.1-129622.7.
- [36] ZHAO Q, YU X J, ZHOU C S, et al. Effects of collagen and casein with phenolic compounds interactions on protein *in vitro* digestion and antioxiution [J]. LWT 2020, 124: 109192.
- [37] YANG W, LIU F G, XU C Q et al. Molecular interaction between (-)-epigallocatechin-3-gallate and bovine lactoferrin using multi-spectroscopic method and isothermal titration calorimetry [J]. Food Research International, 2014, 64: 141-149.
- [38] 刘丽莉,于影,苏克楠,等.植物多酚-牛血清白蛋白相互作用及对蛋白质结构的影响[J].农业工程学报,2023, 39(13):290-298.