

铁蛋白与绿原酸的非共价相互作用

刘玉茜, 贲婷婷, 张风姣, 宋思祺, 陈义伦*

(山东省高校食品加工技术与质量控制重点实验室, 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安 271018)

摘要: 该研究探讨了绿原酸与植物源铁蛋白的相互作用, 结合荧光光谱、圆二色谱、透射电子显微镜、动态光散射等对二者相互作用机制进行了表征和分析。结果显示, 绿原酸能与重组大豆种子铁蛋白(rH-2)发生相互作用, 引起铁蛋白三级/四级结构的变化, 而对其一级/二级结构无影响。荧光结果表明绿原酸并没有改变铁蛋白的特征发射峰 330 nm, 且随着浓度的升高, 铁蛋白荧光强度下降, 在这种非共价结合中氢键/范德华力起主要作用。在 25、37、55 °C 下, 二者的结合常数 K 分别为 1.7×10^4 (mol/L)⁻¹, 1.4×10^4 (mol/L)⁻¹ 和 1.04×10^4 (mol/L)⁻¹, 结合位点数 n 分别为 156.8、132.1 和 93.9, 表明随温度的升高, 绿原酸与铁蛋白的相互作用强度呈下降趋势。动态光散射结果显示加入绿原酸前后粒径分别为 7.61 nm 和 7.67 nm, 未发生显著变化, 表明绿原酸不能诱导铁蛋白之间的聚合。铁蛋白-绿原酸复合物 (FCAs) 中绿原酸的抗氧化能力得以保留但略有下降。研究结果进一步提高了对不同食物组分尤其是铁蛋白和酚酸相互作用机制的理解。

关键词: 绿原酸; 铁蛋白; 结构; 相互作用; 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2021)12-80-86

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0131

Non-covalent Interactions between Ferritin and Chlorogenic Acid

LIU Yuqian, BEN Tingting, ZHANG Fengjiao, SONG Siqi, CHEN Yilun*

(Key Laboratory of Food Processing Technology and Quality Control in Shandong Province, College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The mechanisms by which chlorogenic acid (CA; a phenolic compound) and ferritin [from the recombinant soybean seed H-2 (rH-2)] interact with each other were examined using fluorescence spectroscopy, circular dichroism spectroscopy, transmission electron microscopy, and dynamic light scattering. The results showed that CA could interact with phytoferritin, causing changes in the tertiary/quaternary structure of the iron-storing protein but not in its primary/secondary structure. The phenolic compound did not change the characteristic emission peak of ferritin at 330 nm, the fluorescence intensity of which decreased with increasing CA concentrations. Hydrogen bonds/van der Waals forces played a major role in the non-covalent interactions between CA and ferritin, the binding constants (K) for which were 1.7×10^4 , 1.4×10^4 , and 1.04×10^4 (mol/L)⁻¹, with 156.8, 132.1, and 93.9 binding sites (n), at 25, 37, and 55 °C, respectively. These results indicate that the strength of the interaction between CA and ferritin decreases with increasing temperature. According to the dynamic light scattering results, the particle size of ferritin did not change significantly before (7.61) and after (7.67) the addition of CA, indicating that the phenolic compound does not induce the aggregation of ferritin molecules. Additionally, the antioxidative capacity of CA in the ferritin-CA complexes was preserved, albeit slightly decreased. These results further enhance understanding of the interactions between different food components, especially ferritin and phenolic acids.

Key words: chlorogenic acid; ferritin; structure; interaction; antioxidative ability

引文格式:

刘玉茜, 贲婷婷, 张风姣, 等. 铁蛋白与绿原酸的非共价相互作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 80-86

LIU Yuqian, BEN Tingting, ZHANG Fengjiao, et al. Non-covalent interactions between ferritin and chlorogenic acid [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 80-86

收稿日期: 2021-02-04

基金项目: 山东省重点研究开发计划 (2019GNC106004); 国家自然科学基金面上项目 (31972070; 31571836)

作者简介: 刘玉茜, (1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 植物蛋白, E-mail: lyq0929@sda.u.edu.cn

通讯作者: 陈义伦 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品, E-mail: cylun@sda.u.edu.cn

铁蛋白 (Ferritin, FRT) 是一种普遍存在的铁储存和解毒蛋白, 广泛分布于植物、动物和细菌中^[1-2]。每个铁蛋白由 24 个亚基组成, 每两个亚基反向平行形成一组, 构成 4-3-2 重轴高度对称的中空球状分子 (外径为 12~13 nm, 内径为 7~8 nm)。此外, 铁蛋白内部空腔可储存 4500 个以无机矿物质形式存在的 Fe³⁺ 原子^[3-4] (图 1a)。铁蛋白由于外壳的保护, 能够降低它

对膳食中存在的螯合剂如植酸和鞣酸等的敏感性,是一种新颖的、具有代表性的膳食铁源^[5]。此外,铁蛋白在铁代谢中起着关键作用,通过储存与释放铁离子来调节体内铁的代谢平衡,因此,摄入铁蛋白是减缓全球铁缺乏症的一种有效策略^[6-7]。最近的研究表明,植物多酚可以与蛋白质相互作用,从而改变蛋白质的构象,如牛血清蛋白 BSA^[8]等。此外,研究已经发现 EGCG 诱导的铁蛋白聚合能够抑制蛋白酶对蛋白质的降解^[9-10]。因此,蛋白质和多酚之间的相互作用为提高蛋白质的稳定性提供了可能。与广泛分布在食品中的铁蛋白类似,绿原酸(chlorogenic acid, CA)是咖啡中的主要多酚类物质,而咖啡是一种世界范围内广泛消费的饮料^[11]。作为肉桂酸家族中最常见的一种单体化合物^[12],绿原酸也是大多数水果中具有代表性的一类酚类化合物^[13-14](图 1b)。酚酸具有很强的抗氧化性,增加酚酸的摄入量有助于降低人类患癌症和心血管疾病的风险,因此近年来人们对酚酸的研究热度逐渐上升^[11]。鉴于绿原酸常与植物源的铁蛋白共存于食品体系中,并且绿原酸具有很强的抗氧化活性,因此研究这两种物质能否发生相互作用尤为重要,且对其相互作用机制的了解会有助于设计更加稳定、生物利用率更高的功能性食品。

共价结合和非共价结合是多酚-蛋白质相互作用的两种基本机制^[15-16]。在多酚氧化酶存在下或在碱性环境中,酚类化合物被氧化为醌时,通常会发生较为强烈的而不可逆的共价结合^[17-19],因此非常适用于开发稳定的蛋白质预处理组分^[15]。据报道,温度和 pH 值是影响蛋白质-多酚共价作用的关键条件^[16]。相比较而言,由于反应条件相对温和,蛋白质与多酚的非共价相互作用在食品中更为常见。酚类化合物与蛋白质的非共价结合是指通过疏水相互作用、氢键、静电吸引力和范德华力等发生的可逆的相互作用。在可逆相互作用中,通常氢键和疏水相互作用是酚-蛋白质络合最主要的非共价驱动力^[15],因为多酚的羟基和肽链的羰基很容易形成氢键。此外,蛋白质氨基酸(苯环和脂肪族侧链)的疏水区域以及多酚的芳香核在多酚-蛋白质复合物的稳定中发挥着重要作用^[16-18]。研究表明,植物多酚与蛋白质相互作用可引发蛋白质结构、热稳定性和消化率的变化^[20]。例如,EGCG 降低了 α -乳清蛋白的变性温度并提高了其抗氧化能力^[9]。Arimbor 等^[21]发现沙棘原花青素能使蛋白质聚合并抑制消化酶的活性从而减少蛋白质的降解。此外,蛋白质和多酚之间的相互作用被认为是影响多酚抗氧化活性的主要原因。虽然已有很多关于铁蛋白-多酚相互作用的研究,但不同温度条件下二者的相互作用方式及

结合差异鲜为人知,且鲜有研究使用铁蛋白-绿原酸作为相互作用的研究模型。

因此,本文系统研究了不同浓度的绿原酸(5-O-咖啡酰奎宁酸)对重组大豆种子 H-2 亚基铁蛋白(rH-2)理化性质的影响,重点研究了绿原酸与铁蛋白在不同温度条件下的相互作用,通过方程拟合荧光光谱数据计算其结合位点和结合常数,还测定了铁蛋白-酚酸复合物的体外抗氧化能力,以了解单体酚类化合物与铁蛋白之间非共价相互作用的本质和程度。本研究为控制蛋白质与酚酸之间的相互作用,提高植物源蛋白-酚酸复合物在食品中的功能性应用提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

绿原酸(纯度>98%)购自 Sigma-Aldrich(美国);重组 H-2 亚基铁蛋白(rH-2)表达菌株来自实验室保存的菌液;蛋白电泳分子量 Marker、甘氨酸、福林酚、溴酚蓝、SDS、Tris、考马斯亮蓝购自北京索莱宝生物科技有限公司,其他所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

TGL-16A 高速冷冻离心机,长沙平凡仪器;YC-2 层析实验冷柜,北京博医康实验仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司;VE180 电泳槽,天能公司;SCIENTZ-11D 超声粉碎仪,宁波新芝;磁力搅拌器,天津市欧诺仪器仪表有限公司;透射电子显微镜,日本 Hitachi 公司;荧光光谱仪,美国 Agilent 公司;动态光散射仪,英国 Malvern 公司;圆二色谱仪,法国 Bio-Logic 公司。

1.3 方法

1.3.1 重组大豆种子 H-2 亚基铁蛋白(rH-2)的制备

重组大豆种子 H-2 亚基铁蛋白(rH-2)的制备参照文献报道的方法制备^[10,22-23]。重组基因载体由大肠杆菌 BL21 菌株(具有 H-2 亚基的 cDNA 序列)表达。所提取的粗蛋白通过凝胶过滤层析在聚丙烯酰胺-葡聚糖凝胶柱(Sephacryl S-300)中进一步纯化,该柱用 50 mmol/L Tris-HCl、0.15 mol/L NaCl 的缓冲液(pH 7.5)进行平衡。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-和 Native-PAGE)表征蛋白纯度。采用 Lowry 法测定铁蛋白浓度^[24]。

1.3.2 溶液的配置

用蒸馏水溶解绿原酸, 制备终浓度为 10 mmol/L 的绿原酸母液, 用 20 mmol/L Tris-HCl 稀释铁蛋白样品得到终浓度为 0.5 μmol/L 的铁蛋白溶液, 将二者放置 4 °C 下备用, 以便后续进行铁蛋白与绿原酸的相互作用分析。

1.3.3 圆二色谱分析

配制摩尔浓度比为 40:1 (FRT:CA, *m/m*) 的铁蛋白-绿原酸 (FCAs) 溶液, 使用 MOS-450 型圆二色谱仪, 在 25 °C、远紫外 190~260 nm 波长范围内扫描, 进行样品的圆二色谱分析。扫描速度为 60 nm/min, 分辨率为宽 1 nm, 石英比色皿光径为 1 mm, 扫描重复三次。使用网络程序 K2D2 计算蛋白二级结构的比

$$I = I_0 - \left(\frac{I_0 - I_\infty}{2n[P]_0} \right) \times \left[\frac{1}{K} + [CA]_0 + n[P]_0 - \sqrt{\left(\frac{1}{K} + [CA]_0 + n[P]_0 \right)^2 - 4n[P]_0[CA]_0} \right] \quad (1)$$

式中:

n——结合位点数;

K——结合常数;

[*P*]₀——蛋白质的浓度;

[*CA*]₀——绿原酸的浓度;

*I*₀——结合位点完全饱和时, 在没有绿原酸的情况下蛋白质的相对荧光强度;

*I*_∞——结合位点完全饱和时, 在存在绿原酸的情况下蛋白质的相对荧光强度。

1.3.5 动态光散射 (DLS) 分析

使用动态光散射仪在 25 °C 下对铁蛋白和 FCAs (1:40) 进行 DLS 测量。在 DLS 测量之前, 样品需要静置 2 h, 以确保反应充分。采用 Omnisize 2.0 软件计算不同样品的粒径分布。

1.3.6 透射电子显微镜分析

透射电镜制样参照文献报道的方法^[28]。将不同样品用 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液稀释, 然后放置在碳膜包被的铜网上, 静置 10 min, 并用滤纸吸去过量的溶液。待样品干燥后, 将样品用 2% 乙酸铀酰染色 5 min, 然后用滤纸吸掉多余的染液, 待样品晾干后, 用透射电子显微镜在 80 kV 下进行观察。

1.3.7 抗氧化能力

使用市售的测定试剂盒 (南京建城生物工程研究所) 测定铁蛋白、绿原酸以及铁蛋白-绿原酸复合物 (FCAs) 不同样品的抗氧化能力。

1.4 数据统计分析

所有图表绘制均使用 Origin 8.5 软件, SPSS 软件进行显著性差异分析, 结构式由软件 Chem Draw 7.0 处理。所有检测均重复三次, 结果用平均值±标准差 (SD) 来表示。显著水平为 *p*<0.05。

2 结果与分析

例^[5], 同时以相应浓度的铁蛋白溶液作为空白对照。

1.3.4 荧光光谱分析

用荧光分光光度计检测绿原酸对 rH-2 荧光强度的影响。通过向 1.5 mL 的铁蛋白样品 (0.5 μmol/L, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 中添加 0~12 μL 的绿原酸溶液 (10 mmol/L), 得到不同摩尔比的铁蛋白/绿原酸混合液 (0, 1:20~1:160), 随后在 25、37 和 55 °C 下反应 10 min 测定荧光强度。激发波长为 290 nm, 发射波长 300~500 nm。激发和发射狭缝宽度分别为 5 nm 和 10 nm。为了获得化学计量比和结合常数, 根据先前描述的方法^[25-27], 将数据拟合到方程式 (1) 中, 以计算绿原酸与铁蛋白的结合常数和结合位点数。

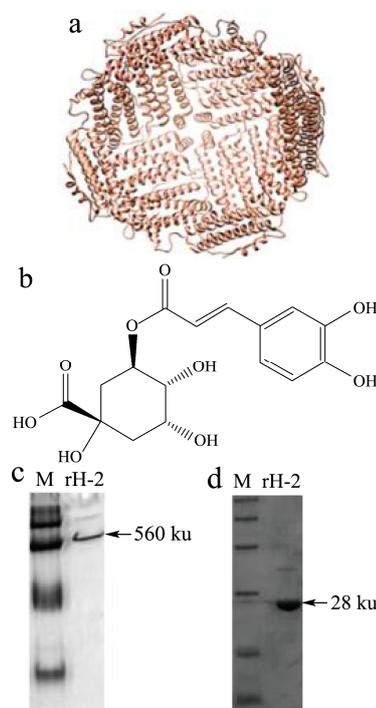


图1 铁蛋白的四倍轴通道结构 (a)、绿原酸的化学结构 (b)、铁蛋白 rH-2 的非变性凝胶电泳图 (c) 和变性电泳 SDS-PAGE 图 (d)

Fig.1 Crystal structure of ferritin with views down the 4-fold axes (channels) of the protein shell (a); Chemical structure of chlorogenic acid (b); Native PAGE (c) and SDS-PAGE analyses of rH-2 ferritin (d)

2.1 铁蛋白 (rH-2) 的表征

提取纯化的 rH-2 的电泳条带如图 1c、1d 所示。Native-PAGE 显示铁蛋白为单条带，分子量约为 560 ku (图 1c)，SDS-PAGE 显示 rH-2 仅包含一个分子量为 28 ku 的亚基(图 1d)，这与之前文献报道的一致^[24]，蛋白纯度能够满足后续的实验要求，表明铁蛋白 rH-2 制备成功。

2.2 铁蛋白-绿原酸复合物 (FCAs) 的圆二色谱分析

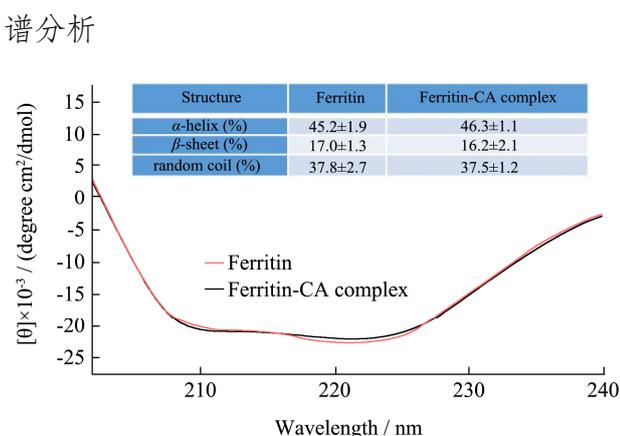


图 2 有无绿原酸时 rH-2 的圆二光谱图

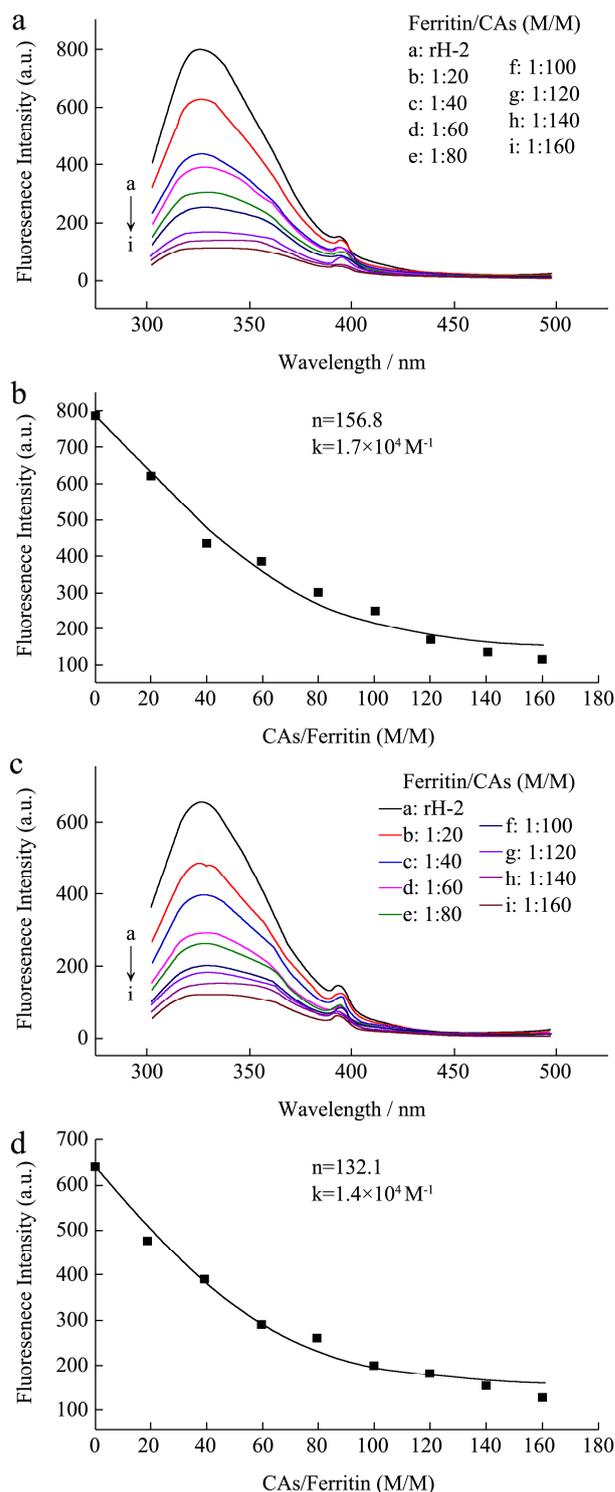
Fig.2 CD spectra of rH-2 in the presence and absence of CAs

加入绿原酸后，rH-2 的 Native-和 SDS-PAGE 上的电泳条带没有改变（数据未显示），表明绿原酸对 rH-2 的一级结构没有影响。随后，用圆二色谱仪研究了铁蛋白 rH-2 的二级结构，远紫外-圆二色谱的变化对应于蛋白质整体二级结构的变化。如图 2 所示，rH-2 在远紫外光谱中有两个负椭圆度，分别为 208 和 222 nm，这与文献报道^[3]的大豆铁蛋白的二级结构非常吻合，使用 K2D2 程序估算的铁蛋白 α-螺旋含量为 45.20%，β-折叠含量为 17.00%，无规则卷曲含量为 37.80%。在加入绿原酸后，蛋白质的圆二光谱几乎与未加绿原酸铁蛋白样品的光谱重叠（图 2），表明绿原酸对铁蛋白二级结构的影响也很小。这些结果表明铁蛋白 rH-2 的二级结构相对稳定。此外，一些研究表明经单宁酸、原花青素、没食子酸及其衍生物或超高压处理后，rH-2 的二级结构没有发生变化，本文的结果与这些研究结论一致^[5,6,10,14]。

2.3 荧光光谱分析铁蛋白与绿原酸的相互作用

为了进一步阐明二者的相互作用机理，使用公式 (1) 分析了荧光猝灭数据。计算出结合常数 K 为 $1.7 \times 10^4 \text{ (mol/L)}^{-1}$ ，结合位点数 n 为 156.8，表明约有 156.8 个（摩尔比）绿原酸附着到铁蛋白分子上（图

3b)。更重要的是，这些结果表明，氢键和范德华力等弱键在绿原酸与铁蛋白的相互作用中起着重要作用^[25]。除 25 °C 外，上述实验也在 37 °C (图 3c) 和 55 °C (图 3e) 下进行了比较分析。绿原酸与铁蛋白相互作用后，结合常数 K 分别为 $1.4 \times 10^4 \text{ (mol/L)}^{-1}$ (图 3d) 和 $1.04 \times 10^4 \text{ (mol/L)}^{-1}$ (图 3f)，结合位点数 n 分别为 132.1 和 93.9。这些数据表明，随着温度的升高 (25、37 和 55 °C)，绿原酸与铁蛋白的相互作用强度呈下降趋势。



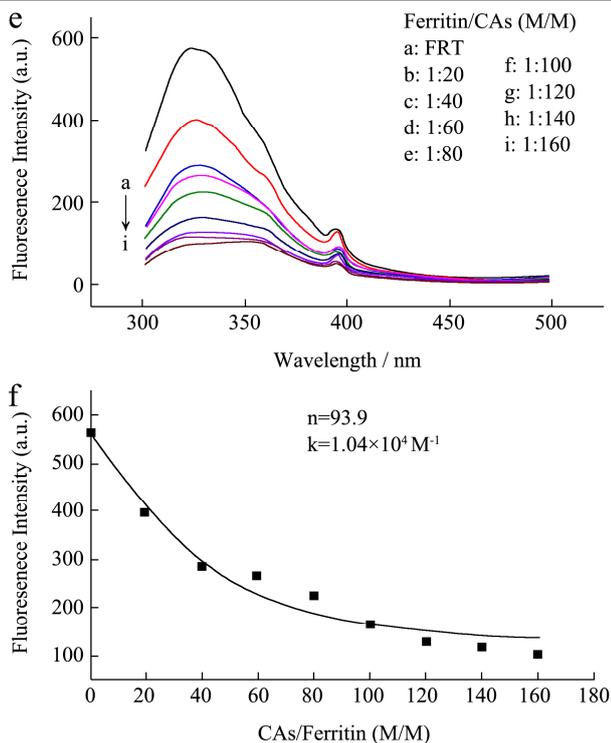


图3 在 25 °C (a)、37 °C (c)、55 °C (e) 下分别加入不同浓度绿原酸的铁蛋白 rH-2 的荧光光谱图; 根据公式 (1) 的荧光强度的相应拟合曲线为 (b)、(d)、(f)

Fig.3 Fluorescence spectra of rH-2 treated with CAs at different concentrations, respectively at 25 °C (a), 37 °C (c), 55 °C (e) and the corresponding fitting curves of fluorescence intensity according to Eq. (1) were (b), (d), (f)

2.4 铁蛋白-绿原酸复合物(FCAs)的粒径分析

运用动态光散射仪研究了绿原酸对铁蛋白粒径的影响, 结果如图 4 所示。在单一的铁蛋白样品中, 粒径分布主要为 7.9 nm (图 4a), 约占总体的 98%, 这与文献报道的铁蛋白 rH-2 流体动力学半径较为一致^[24]。然而, 在向铁蛋白中添加绿原酸后, 粒径分布主要为 7.67 nm, 粒径大小分布没有明显改变, 表明绿原酸即使在高剂量下也不能诱导铁蛋白之间的聚合 (图 4b)。为了进一步证实这一结果, 用透射电镜观察铁蛋白的形态。在照片中可以看到大多数铁蛋白 rH-2 粒子在未加入绿原酸的情况下是单分散的, 且较为均匀 (图 4c)。铁蛋白暴露于绿原酸后, 大多数蛋白颗粒不会聚合在一起, 分子之间有大约 5~10 nm 的空间, 像单独铁蛋白一样分散均匀 (图 4d)。这些发现证实了以下结论: 尽管绿原酸可以结合在铁蛋白上, 但无法促进铁蛋白之间的聚合。该结果也不同于之前报道的单宁酸在很大程度上能够诱导铁蛋白聚集^[6]。一个单宁酸分子可能通过氢键将两个或两个以上的蛋白分子聚合在一起, 可能因为它比绿原酸含有更多的

羟基^[10]。而绿原酸只能结合单个铁蛋白分子上, 但其具体原因有待进一步研究。

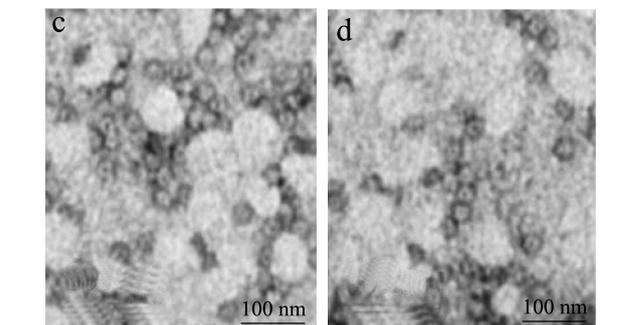
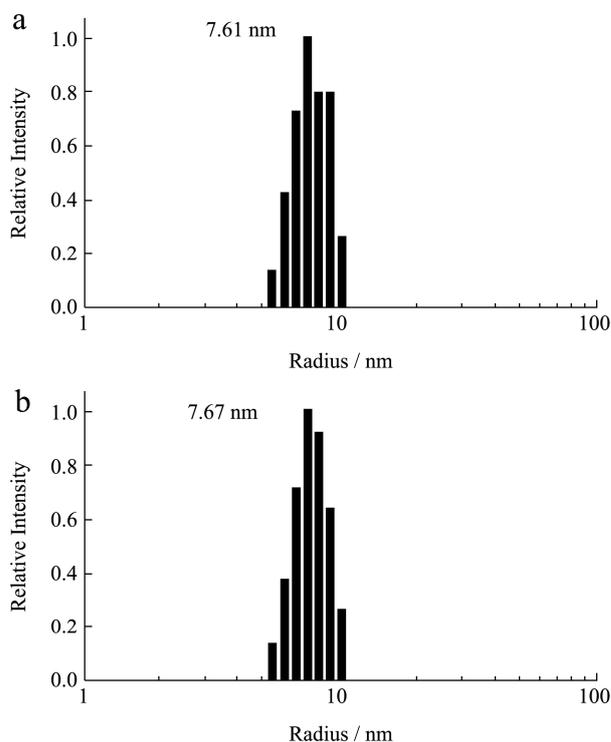


图4 在未加入 (a) 和加入绿原酸 (b) 时铁蛋白 rH-2 的粒径分布图 (rH-2/CAs, 1:40); 在不存在 (c) 和存在 (d) 绿原酸的情况下铁蛋白 rH-2 的透射电子显微照片。

Fig.4 Relative scattered light intensity distribution curves for rH-2 in absence (a) and presence of CA (b) (rH-2/CAs, 1:40); Transmission electron micrographs of apo rH-2 in the absence (c) and presence (d) of CA

2.5 相互作用对绿原酸抗氧化活性的影响

绿原酸是一种酚酸, 具有很强的抗氧化和清除自由基的活性^[11]。保留绿原酸在 FCAs 中的抗氧化能力将有助于扩大其在功能性添加剂方面的应用。为了评估铁蛋白是否对绿原酸的抗氧化活性有影响, 本研究进行了 ABTS⁺ 的清除试验。如图 5 所示, 未加入绿原酸时, 铁蛋白 rH-2 的抗氧化能力 0.703 mmol/L, 显著低于游离的绿原酸和 FCAs。加入绿原酸后, 在 1:25、1:40 和 1:100 (铁蛋白/绿原酸) 的摩尔比时, 复合物

FCAs 的抗氧化能力分别为 0.756、0.816 和 1.01 mmol/L, 随着绿原酸浓度的增加, FCAs 清除自由基的能力显著增强, 高于单独的铁蛋白但比相同摩尔浓度的游离绿原酸要低 ($p < 0.05$)。这之前多酚与蛋白相互作用的研究结果一致^[11]。据报道, 绿原酸的抗氧化活性与其羟基密切相关^[31]。据此推断绿原酸中的一些羟基可能在与铁蛋白结合时被掩盖, 这是导致 FCAs 抗氧化活性降低的一个重要原因^[11]。此外, 绿原酸的抗氧化活性与样品的供氢能力密切相关^[20]。绿原酸与铁蛋白结合后, 绿原酸与铁蛋白的相互作用改变了绿原酸的供氢能力, 氢键的存在削弱了绿原酸的供氢能力, 导致复合物的抗氧化能力较游离的绿原酸有所下降。虽然二者相互作用后其抗氧化能力有所降低, 但铁蛋白-绿原酸复合物既可以作为一种很好的补铁功能食品, 又保留了绿原酸的部分抗氧化能力, 同时也为以后进一步改善复合物的功能特性提供了研究依据。

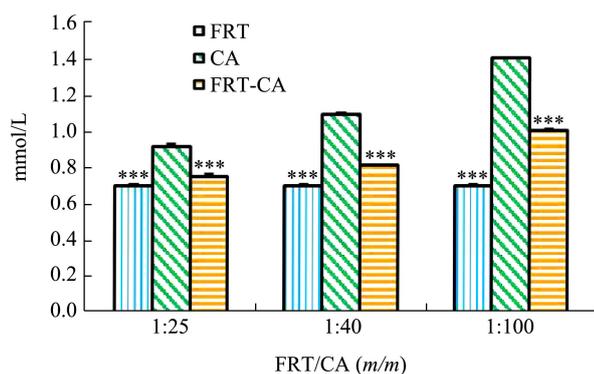


图5 铁蛋白、复合物 FCAs 以及游离绿原酸的 ABTS⁺清除能力
Fig 5 ABTS⁺ radical-scavenging ability of rH-2, FCAs, and free CA

注: ***0.0001 < $p < 0.001$, **0.001 < $p < 0.01$ 。

3 结论

在本研究中, 证明了绿原酸可以与铁蛋白相互作用, 并且首次研究了它们在不同温度下相互作用的程度。这种相互作用仅对铁蛋白的三级/四级结构有影响, 而没有影响其一级和二级结构。此外, 绿原酸与铁蛋白相互作用时, 其抗氧化活性显著下降。这些结果可以帮助理解复杂食品基质中蛋白质与酚酸之间的相互作用, 并为扩大蛋白质-酚酸非共价复合物在功能食品中的应用和功能改善提供了理论参考。

参考文献

[1] Zhao, G H. Phytoferritin and its implications for human health and nutrition [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2010, 1800: 815-823

[2] 周中凯,刘玉茜,杨瑞. 葡萄籽原花青素诱导脱铁红小豆铁蛋白聚合的特性研究[J]. *天津科技大学学报*, 2017, 32(4): 9-14
ZHOU Zhongkai, LIU Yuqian, YANG Rui. Properties of apo adzuki bean seed ferritin association induced by proanthocyanidins [J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2017, 32(4): 9-14

[3] Theil E C. Iron, ferritin, and nutrition [J]. *Annual Review of Nutrition*, 2004, 24: 327-343

[4] 周中凯,徐晶晶,刘玉茜,等. 铁蛋白-原花青素的相互作用及原花青素稳定性[J]. *食品科学*, 2017, 38(13): 34-40
ZHOU Zhongkai XU Jingjing LIU Yuqian, et al. Interaction between apoferritin and proanthocyanidins and stability of their complex [J]. *Food Science*, 2017, 38(13): 34-40

[5] Deng J J, Li M L, Zhang T, et al. Binding of proanthocyanidins to soybean (*Glycine max*) seed ferritin inhibiting protein degradation by protease *in vitro* [J]. *Food Research International*, 2011, 44: 33-38

[6] Li M L, Jia X L, Yang J Y, et al. Effect of tannic acid on properties of soybean (*Glycine max*) seed ferritin: a model for interaction between naturally-occurring components in foodstuffs [J]. *Food Chemistry*, 2012, 133: 410-415

[7] Yang R, Liu Y Q, Gao Y J, et al. Nano-encapsulation of epigallocatechin gallate in the ferritin-chitosan double shells: Simulated digestion and absorption evaluation [J]. *Food Research International*, 2018a, 108: 1-7

[8] Soareset S, Mateus N, De Freitas V. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α -amylase (HSA) by fluorescence quenching [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(16): 6726-6735

[9] Wang A, Zhou K, Qi X, et al. Phytoferritin association induced by EGCG inhibits protein degradation by proteases [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2014, 69(4): 386-391

[10] Wang Q Q, Zhou K, Ning Y, et al. Effect of the structure of gallic acid and its derivatives on their interaction with plant ferritin [J]. *Food Chemistry*, 2016, 213: 260-267

[11] Liu J W, Wang Q Y, Zhang H, et al. Interaction of chlorogenic acid with milk proteins analyzed by spectroscopic and modeling methods [J]. *Spectroscopy Letters*, 2015, 49(1): 44-50

[12] Clifford M N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80: 1033-1043

[13] Prigent S V E, Gruppen h, Visser A J W G, et al. Effects of

- non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 5088-5095
- [14] Zhang J, Xiong D X, Chen L N, et al. Interaction of pyrrolizine derivatives with bovine serum albumin by fluorescence and UV-Vis spectroscopy [J]. *Spectrochimica Acta Part A-molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, 96(1): 132-138
- [15] Cao Y, Xiong Y L. Interaction of whey proteins with phenolic derivatives under neutral and acidic pH conditions [J]. *Food Chemistry*, 2017, 82(2): 1-11
- [16] Ozdal T, Capanoglu E, Altay F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes [J]. *Food Research International*, 2013, 51: 954-970
- [17] Cao Y, Xiong Y L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein [J]. *Food Chemistry*, 2015, 180: 235-243
- [18] Jiang J, Zhang Z P, Zhao J, et al. The effect of non-covalent interaction of chlorogenic acid with whey protein and casein on physicochemical and radical-scavenging activity of *in vitro* protein digests [J]. *Food Chemistry*, 2018, 268: 334-341
- [19] Wang X, Zhang J, Lei F, et al. Covalent complexation and functional evaluation of (-)-epigallocatechin gallate and alpha-lactalbumin [J]. *Food Chemistry*, 2014, 150: 341-347
- [20] Labuckas D O, Maestri D M, Perelló M, et al. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: antioxidant activity and interactions with proteins [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107: 607-612
- [21] Arimboor R, Arumughan C. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) proanthocyanidins inhibit *in vitro* enzymatic hydrolysis of protein [J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76: T130-137
- [22] 陈胜楠,刘玉茜,刘梦肴,等.橙皮素对铁蛋白的共价相互作用及其对铁蛋白理化性质的影响[J/OL]. *食品科学*:1-10[2021-08-17].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201211.1654.030.html>.
CHEN Shengnan, LIU Yuqian, LIU Mengyao, et al. Covalent interaction between hesperidin and ferritin and the influence on the physicochemical properties of ferritin [J/OL]. *Food Science*: 1-10[2021-08-17].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201211.1654.030.html>.
- [23] 刘玉茜,杨瑞,张志平,等.重组大豆铁蛋白受食源活性小分子诱导的还原释放性质[J].*天津科技大学学报*,2018,33(5):14-19
LIU Yuqian YANG Rui ZHANG Zhiping, et al. Iron release properties of recombinant soybean ferritin induced by active molecule from food resources [J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2018, 33(5): 14-19
- [24] Yang R, Liu Y Q, Gao Y J, et al. Ferritin glycosylated by chitosan as a novel EGCG nano-carrier: structure, stability, and absorption analysis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 105: 252-261
- [25] Lyu C, Bai Y, Yang S, et al. NADH induces iron release from pea seed ferritin: a model for interaction between coenzyme and protein components in foodstuffs [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141: 3851-3858
- [26] 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
- [27] Zhou Z K, Xu J J, Liu Y Q, et al. Thermal stability improvement of rice bran albumin protein incorporated with epigallocatechin gallate [J]. *Journal of Food Science*, 2017, 8: 350-357
- [28] 杨瑞,田婧,刘玉茜,等.基于铁蛋白-壳聚糖制备芦丁纳米复合物及芦丁稳定性研究[J].*中国食品学报*,2017,17(9):58-65
YANG Rui, TIAN Jing, LIU Yuqian, et al. Research on preparation of rutin nanocomposite based on ferritin-chitosan and stability analysis of rutin [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(9): 58-65
- [29] Wan Z L, Wang J M, Wang L Y, et al. Complexation of resveratrol with soy protein and its improvement on oxidative stability of corn oil/water emulsions [J]. *Food Chemistry*, 2014, 161: 324-331
- [30] Wu X, Wu H, Liu M, et al. Analysis of binding interaction between (-)-epigallocatechin (EGC) and β -lactoglobulin by multi-spectroscopic method [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, 82: 164-168
- [31] Rawel H M, Ranters H, Rohn S, et al. Assessment of the reactivity of selected isoflavones against proteins in comparison to quercetin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(16): 5263-5271