

# 酪蛋白胶束与多元活性分子的相互作用及其复合物特性

郑杰<sup>1</sup>, 杨敏<sup>1,2,\*</sup>, 甄晨波<sup>1</sup>, 秦娟娟<sup>1</sup>

(1. 甘肃农业大学理学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学农业资源化学与应用研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以酪蛋白胶束 (casein micelles, MC) 为基质, 以单一原花青素 (proanthocyanidin, PC)、儿茶素 (catechin, Cat)、叶绿素铜钠 (chlorophyllin sodium copper salt, Chl) 或其二元组合为配体, 通过热处理或热处理联合超声处理制备二元、三元复合物, 系统分析了单一PC、Cat、Chl或其二元组合物与MC的相互作用, 解析MC对多元分子的同时结合能力, 表征复合物结构、微观形貌及热稳定性, 探究三元复合物的抗氧化性以及体外模拟消化特性。结果表明, 单一PC、Cat、Chl通过疏水相互作用与MC形成二元复合物, 其中MC对Chl表现出较高的亲和力。热处理条件下, 当MC以疏水作用结合一个分子后, 另一个分子则以范德华力、氢键结合于MC上, 且298 K时第1个分子的结合提升了第2个分子与MC的结合常数和结合位点数。PC、Cat、Chl单一分子或其二元组合物的结合对MC空间结构及微观形貌无显著影响。热处理条件下, 活性分子的结合增加了MC的热稳定性。就抗氧化性而言, 热处理改善了三元复合物的2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)阳离子自由基清除力, 而热处理联合超声处理改善了1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除活性。此外, 多元活性分子的同时负载改善了MC在模拟肠液中的消化性。本研究结果可为MC在多元活性分子负载中的应用提供一定参考。

**关键词:** 原花青素; 儿茶素; 叶绿素铜钠; 酪蛋白胶束; 相互作用; 抗氧化性; 消化性

## Interactions between Casein Micelles and Various Active Molecules and Properties of Their Complexes

ZHENG Jie<sup>1</sup>, YANG Min<sup>1,2,\*</sup>, ZHEN Chenbo<sup>1</sup>, QIN Juanjuan<sup>1</sup>

(1. College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Institute of Agricultural Resources Chemistry and Application, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** In this study, binary and ternary complexes were prepared by heat treatment or combined heat and ultrasonic treatment using casein micelles (MC) as matrix and proanthocyanidin (PC), catechin (Cat) and chlorophyllin sodium copper salt (Chl) or their binary combinations as ligands. The interactions between PC, Cat, Chl or their binary combinations and MC were analyzed, and the binding capacity of MC to the various active molecules was evaluated. In addition, the structure, microscopic morphology and thermal stability of the complexes were characterized, and the antioxidant properties and *in vitro* digestibility of the ternary complexes were investigated as well. The results showed that PC, Cat and Chl formed binary complexes with MC through hydrophobic interactions, among which MC showed the highest affinity for Chl. Under heat treatment conditions, MC bound one molecule through hydrophobic interaction and another one by van der Waals forces and hydrogen bonds. At 298 K, the binding of the first molecule improved the binding constant and the number of binding sites of the second one. The binding of PC, Cat, Chl or their binary complexes had no significant effect on the spatial structure or microscopic morphology of MC. The thermal stability of MC was enhanced after the binding of bioactive molecules under heat treatment conditions. In terms of antioxidant properties, heat treatment promoted the 2,2'-azino bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation scavenging activity of the ternary complexes, while combined heat and ultrasonic treatment promoted their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. In addition,

收稿日期: 2022-09-27

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (32060549); 甘肃省自然科学基金项目 (22JR5RA861); 甘肃农业大学伏羲杰出人才培养计划项目 (Gaufx-02J02)

第一作者简介: 郑杰 (1997—) (ORCID: 0000-0002-8770-9404), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品化学。

E-mail: 1499101700@qq.com

\*通信作者简介: 杨敏 (1981—) (ORCID: 0000-0001-9491-3385), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品化学。

E-mail: yummy12@163.com

the loading of active molecules improved the digestibility of MC in simulated intestinal fluid. This study could provide a reference for the application of MC in the loading of bioactive molecules.

**Keywords:** proanthocyanidin; catechin; chlorophyllin sodium copper salt; casein micelle; interaction; antioxidant properties; digestibility

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220927-285

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 14-0008-12

引文格式:

郑杰, 杨敏, 甄晨波, 等. 酪蛋白胶束与多元活性分子的相互作用及其复合物特性[J]. 食品科学, 2023, 44(14): 8-19.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220927-285. <http://www.spkx.net.cn>

ZHENG Jie, YANG Min, ZHEN Chenbo, et al. Interactions between casein micelles and various active molecules and properties of their complexes[J]. Food Science, 2023, 44(14): 8-19. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220927-285. <http://www.spkx.net.cn>

原花青素 (proanthocyanidin, PC, 图1A) 是自然界广泛存在的一类黄酮化合物, 是构成植物果实、花瓣等组织颜色的主要水溶性色素。PC由不同数量的儿茶素 (catechin, Cat) 或表儿茶素聚合而成。依据不同的聚合度, 可将PC分为单体、低聚物和高聚物, 其中二聚体分布最广。研究表明, PC具有抗氧化、抗过敏、降血糖等多种生理活性<sup>[1]</sup>。此外, PC还被作为天然色素, 广泛应用于食品工业。Cat (图1B) 为PC结构的组成单元, 是从茶叶中提取的一种天然黄酮类化合物, 不但具有较强的抗炎、抗菌、抗氧化作用, 还具有预防心脑血管疾病、抑制癌细胞增殖等功效<sup>[2-3]</sup>。叶绿素铜钠 (chlorophyllin sodium copper salt, Chl, 图1C) 为叶绿素的衍生化合物, 是一种允许添加在食品中的水溶性天然色素, 且具有抗炎、抗菌、清除自由基、促进细胞新陈代谢等生物活性<sup>[4]</sup>。

上述分子是常见的食源活性分子, 因具有优异的生物活性、来源广泛和食用安全等优点, 受到众多研究者的青睐。然而, 它们稳定性差, 在加工过程中易受光、热、pH值、氧化剂、酶等因素的影响而发生降解或者结构改变。此外, PC、Cat、Chl还表现出脂溶性差、亲水性强的性质, 使其在亲脂体系中的应用较少<sup>[3,5-6]</sup>。以上诸多因素都限制了其在医药、食品等领域的使用。

针对上述问题, 众多研究者以大分子作为基质, 采用乳化、喷雾干燥、酸化等技术构建出乳液、微胶囊、凝胶等不同类型的载体, 通过物理作用对活性分子进行保护, 在既不影响活性分子天然结构、又不会产生新的可能具有潜在危害物质的同时提高其稳定性及生理活性。研究表明, 人工合成的两性多肽负载PC后, 显著改善了PC对碱、金属离子和高温的敏感性<sup>[7]</sup>。黑豆分离蛋白的负载提高了PC的热稳定性<sup>[8]</sup>。玉米醇溶蛋白/壳聚糖纳米颗粒负载显著提高了Cat衍生物的抗氧化活性, 并实现了对它的控释<sup>[9]</sup>。大豆分离蛋白负载后, Chl的稳定性有效提升<sup>[10]</sup>。由此可见, 大分子负载可有效改善活性分子

的稳定性及生物活性。然而, 已有报道中的大分子载体及其对活性分子的负载均需要通过多个步骤实现, 致使负载工艺复杂、成本高。另外, 现有研究主要集中于载体对一种活性分子的负载方面, 其对多元分子的负载研究较少。因此, 有必要寻求一种天然大分子基质, 无需复杂的构建和负载工艺即可实现多个活性分子的负载。

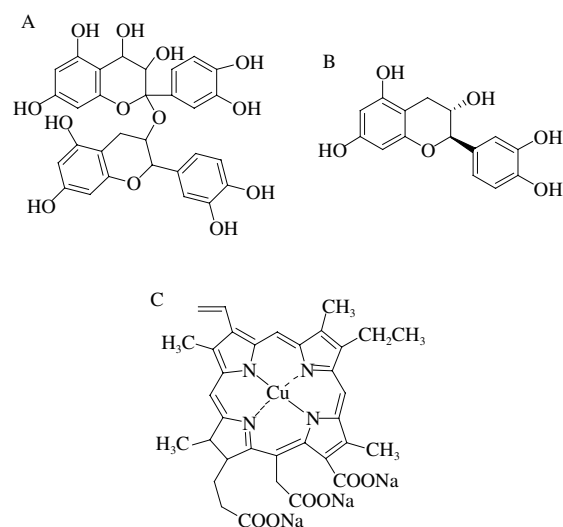


图1 PC (A)、Cat (B)、Chl (C) 的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of PC (A), Cat (B), and Chl (C)

酪蛋白是动物乳中特有的一种含磷、钙的结合蛋白质, 由4种不同类型单体组成 ( $\alpha_{s1}:\alpha_{s2}:\beta:\kappa=4:1:4:1$ )。4种单体间通过非共价相互作用以及钙桥形成直径约为80~400 nm的超分子胶束粒子, 称为酪蛋白胶束 (casein micelles, MC); MC具有“内部疏水、外部亲水”的特殊空间结构, 是天然纳米载体的首选基质之一<sup>[11]</sup>。MC具有活性分子的多个作用位点, 由于其为多孔型纳米颗粒, 活性分子不仅可以结合于MC表面的肽链上, 还可以进入结构内部, 与多肽链结合, 且形成交联作用。课题组前期研究发现, MC对大黄素<sup>[12]</sup>、咖啡酸及

咖啡酸苯乙酯<sup>[13]</sup>均表现出较强的结合作用；另外，也有研究指出，MC具有负载VD<sub>2</sub>、VD<sub>3</sub>的能力，可通过负载提升活性分子的溶解性、稳定性以及生物活性<sup>[14-15]</sup>。

截至目前，MC与小分子的结合作用研究主要集中于单一分子，其对多种分子的结合作用及负载能力尚不清楚。而多种活性分子联合使用可能会产生协同作用，对人体健康产生多种益处<sup>[16]</sup>。例如，β-乳球蛋白与香草酸、阿魏酸、槲皮素形成的三配体复合物表现出良好的稳定性与抗氧化活性，且三配体复合物的抗氧化性显著强于单一配体<sup>[17]</sup>。β-乳球蛋白同时负载PC B<sub>2</sub>和二氢杨梅素，具有增强活性分子稳定性和协同细胞毒性的作用<sup>[18]</sup>。

本研究在前期研究的基础上，选择了食源性色素PC和Chl，以及PC的结构单元Cat作为模型分子，采用荧光分析法系统分析热处理和热处理联合超声处理下MC与PC、Cat、Chl单一分子及其二元组合物的相互作用，对比3种分子与MC的结合常数及结合作用力，分析MC负载过程中分子间的相互影响，探讨MC对多元分子的同时负载能力。同时，研究二元及三元复合物的结构、表面形貌、热稳定性以及抗氧化性能，并评价复合物的体外模拟消化情况。研究结果可为MC在负载多元活性分子中的应用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

MC参照团队前期研究方法<sup>[13]</sup>制备，将巴氏杀菌牛乳在4 000×g离心30 min，所得脱脂乳进行膜过滤，截留分子质量为100 kDa，跨膜压力为0.4 MPa，流速为480 L/h。收集截留浓缩液后冷冻干燥至质量恒定，即得MC，其蛋白质质量分数为(83.26±1.87)%。

PC、(+)-Cat、Chl、胃蛋白酶(15 000 U/mg)、胰蛋白酶(2 500 U/mg) 上海麦克林生化科技有限公司；其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

NAI-GZJ型实验室小型喷雾干燥机 上海那艾精密仪器有限公司；RF-5301PC荧光分光光度计、S-3400N扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM) 日本日立公司；Nicolet iS50傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR) 美国赛默飞世尔科技公司；STA 449 F5热重-差示扫描量热分析仪(thermogravimetric-differential scanning calorimetry, TG-DSC) 德国耐驰仪器制造有限公司；SFX550超声处理仪 美国布兰森超声波公司；DYY-6D型电泳仪 北京六一生物科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 二元、三元复合物的制备

二元复合物的制备：将MC溶解于0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.86)中，制备质量浓度为2 g/L的储备液。将PC充分溶解于0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.86)，制备浓度为0.004 mol/L PC溶液。取不同体积PC溶液与20 mL MC溶液混合，用空白缓冲溶液补充，使混合液体积相等，分别置于298、310、318 K水浴中恒温处理20 min，即为热处理组；混合液分别置于298、310、318 K水浴中恒温处理2 min后，将12.7 mm超声波探头置于样品中心超声处理1 min，超声振幅为30%、脉冲开启时间5 s、关闭时间1 s，即为热处理联合超声处理组。处理后的溶液在避光条件下冷却至室温，贮存备用；其中PC终浓度分别为0、20、40、60、80、100 μmol/L，记作PC-MC复合物。

Cat-MC、Chl-MC复合物的制备过程同PC-MC复合物制备过程。其中，混合溶液中Cat终浓度分别为0、100、200、300、400、500 μmol/L；Chl终浓度分别为0、10、20、30、40、50 μmol/L。

三元复合物的制备：首先制备出PC-MC或Cat-MC的二元复合物，其中PC、Cat的终浓度分别为60、300 μmol/L(约为PC和Cat对MC荧光猝灭50%时的浓度，下同；MC终质量浓度为2 g/L)。将不同浓度Cat或PC分别加入PC-MC或Cat-MC二元复合物中，均匀混合后，分别进行热处理或热处理联合超声处理，形成相应的三元复合物记作PC-MC-Cat(Cat终浓度为0、100、200、300、400、500 μmol/L)或Cat-MC-PC(PC终浓度为0、20、40、60、80、100 μmol/L)。

PC-MC-Chl和Chl-MC-PC复合物的制备与上述方法相同，初始二元复合物中PC、Chl的终浓度分别为60、30 μmol/L(MC终质量浓度为2 g/L；PC-MC-Chl中Chl终浓度为0、10、20、30、40、50 μmol/L；Chl-MC-PC中PC终浓度为0、20、40、60、80、100 μmol/L)。

使用喷雾干燥机对复合物进行喷干处理，设定出口温度130 °C，物料流量300 mL/h，撞针间隔时间1 s。收集喷干后的粉末样品冷藏备用。

#### 1.3.2 荧光光谱分析

复合物内源荧光光谱由荧光分光光度计测定，激发波长280 nm，激发和发射狭缝均为10 nm，记录样品在300~500 nm区间的内源荧光光谱。通过Stern-Volmer方程(式(1))确定PC、Cat、Chl或其二元组合对MC内源荧光的猝灭机理<sup>[19]</sup>。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

式中： $F_0$ 、 $F$ 分别为加入小分子前后的荧光强度； $K_{sv}$ 为动态猝灭常数/(L/mol)； $K_q$ 为散射碰撞猝灭常数/(L/(mol·s))； $\tau_0$ 为不存在猝灭剂时荧光体的

寿命, 生物大分子的平均寿命为 $10^{-8}$  s;  $Q$ 为小分子浓度/(mol/L)。

PC、Cat、Chl与MC结合的结合常数( $K_a$ )、结合位点数( $n$ )通过双对数方程(式(2))计算:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

通过Van't Hoff方程(式(3)、(4))计算MC与小分子结合反应的吉布斯自由能变( $\Delta G$ )、焓变( $\Delta S$ )和焓变( $\Delta H$ ):

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

式中: $K_a$ 为对应温度下MC与小分子的结合常数/(L/mol);  $R$ 为理想气体常数/(J/(K·mol));  $T$ 为处理温度/K;  $\Delta G$ 为吉布斯自由能变/(J/mol);  $\Delta H$ 为焓变/(J/mol);  $\Delta S$ 为熵变/(J/(mol·K))。

### 1.3.3 FTIR测定

将复合物粉末置于衰减全反射(attenuated total reflection, ATR)元件,选择分辨率为 $4\text{ cm}^{-1}$ ,在透射模式下采用FTIR仪扫描 $500\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 之间的红外光谱。

### 1.3.4 SEM测定

取适量复合物粉末置于铜台上的导电胶条表面,小心涂抹使其分散为薄层,喷金后采用SEM观察,电压 $12.0\text{ kV}$ 。

### 1.3.5 TG-DSC分析

参照Qin Juanjuan等<sup>[13]</sup>的方法。准确称取 $4\sim 6\text{ mg}$ 样品,以同规格空坩埚作为参比,测定复合物在 $25\sim 500\text{ }^\circ\text{C}$ 区间内热稳定性,升温速率 $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 。

### 1.3.6 抗氧化性分析

制备浓度为 $0.1\text{ mmol/L}$  1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)储备液。将 $3\text{ mL}$  DPPH自由基储备液与 $0.4\text{ mL}$ 复合物溶液均匀混合,室温避光静置 $20\text{ min}$ ,测定混合液在 $517\text{ nm}$ 波长处吸光度,记为 $A_1$ ;将 $3\text{ mL}$ 无水乙醇与 $0.4\text{ mL}$ 复合物溶液均匀混合,吸光度记为 $A_2$ ;将 $3\text{ mL}$  DPPH自由基储备液与 $0.4\text{ mL}$ 磷酸盐缓冲液均匀混合,吸光度记为 $A_0$ 。按式(5)计算DPPH自由基清除能力<sup>[20]</sup>:

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (5)$$

制备 $7.4\text{ mmol/L}$  2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)原液和 $2.6\text{ mmol/L}$ 过硫酸钾原液,将二者混合均匀并避光保存 $12\text{ h}$ ;用 $\text{pH}$  7.4磷酸盐缓冲液稀释至 $734\text{ nm}$ 波长处吸光度为 $0.70 \pm 0.02$ ,获得ABTS阳离子自由基储备液。将 $3\text{ mL}$  ABTS阳离子自由基储备液与 $50\text{ }\mu\text{L}$ 复合物溶液均匀混合后,室温静置 $6\text{ min}$ ,测定混合液在 $734\text{ nm}$ 波长处的吸光度。按式(6)计算ABTS阳离子自由基清除能力:

$$\text{ABTS阳离子自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_s}{A_0}\right) \times 100 \quad (6)$$

式中: $A_0$ 为ABTS阳离子自由基储备液与磷酸盐缓冲液混合后的吸光度; $A_s$ 为ABTS阳离子自由基储备液与复合物溶液混合后的吸光度。

### 1.3.7 体外模拟胃肠消化性分析

样品的体外模拟消化性采用课题组已有方法测定,稍作修改<sup>[12]</sup>。将 $2\text{ g}$ 氯化钠和 $0.032\text{ g}$ 胃蛋白酶溶解在 $1\text{ L}$ 去离子水中,并用浓盐酸将 $\text{pH}$ 值调至 $1.2$ ,得到模拟胃液(simulated gastric fluid, SGF)。在 $1\text{ L}$ 去离子水中加入 $6.8\text{ g}$ 磷酸二氢钾和 $0.1\text{ g}$ 胰蛋白酶,用氢氧化钠调节溶液 $\text{pH}$ 值至 $7.5$ ,充分溶解后得到模拟肠液(simulated intestinal fluid, SIF)。

将 $0.1\text{ g}$ 复合物粉末置于 $10\text{ mL}$ 试管中,加入 $2\text{ mL}$  SGF,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $130\text{ r}/\text{min}$ 水浴振荡 $120\text{ min}$ ,每 $60\text{ min}$ 取样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。模拟肠消化在相同条件下进行 $4\text{ h}$ ,以 $20$ 、 $40$ 、 $60$ 、 $120\text{ min}$ 和 $240\text{ min}$ 为时间节点,每次取样 $10\text{ }\mu\text{L}$ <sup>[12]</sup>。将取出后的消化液与聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液 $1:1$ 混合均匀,水浴煮沸 $4\text{ min}$ , $4000\text{ r}/\text{min}$ 离心 $4\text{ min}$ ,随后将 $6\text{ }\mu\text{L}$ 混合液注入凝胶轨道并在 $150\text{ V}$ 恒压下进行电泳,观察MC的胃肠模拟消化情况。

### 1.4 数据统计分析

所有数据均采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析,数据间差异显著分析采用Duncan法, $P < 0.05$ ,差异显著;数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据至少为 $3$ 次实验结果。

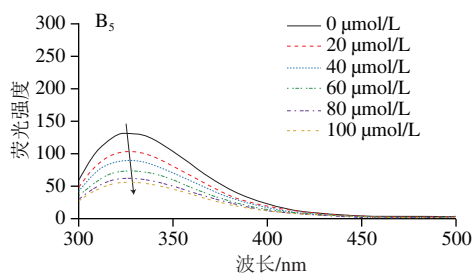
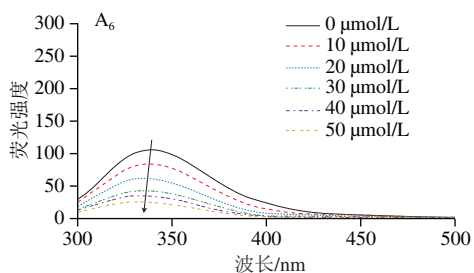
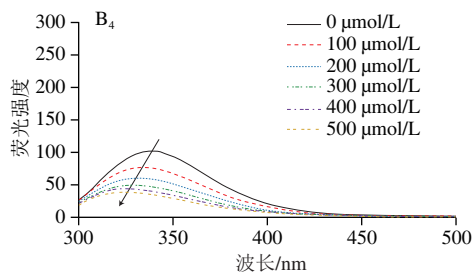
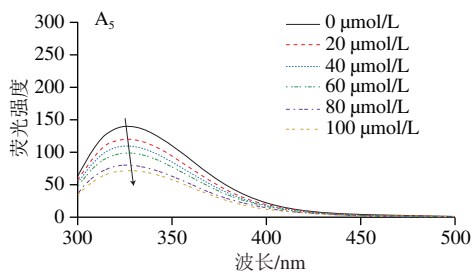
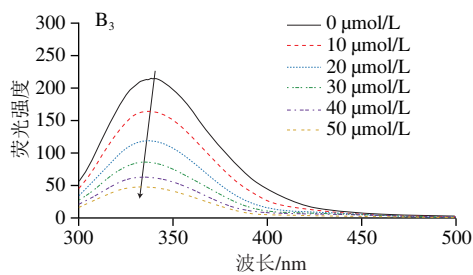
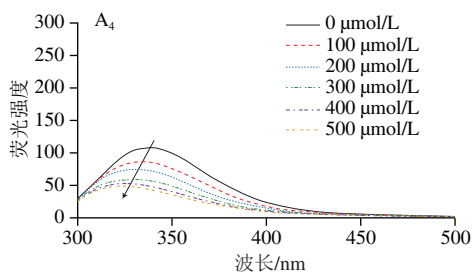
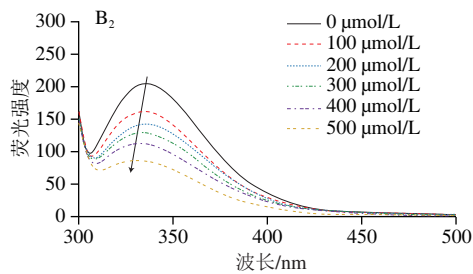
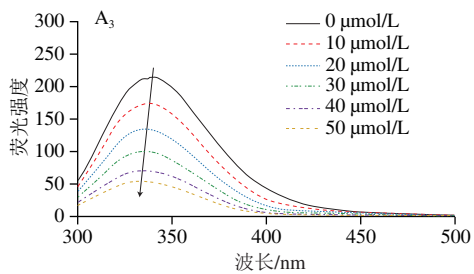
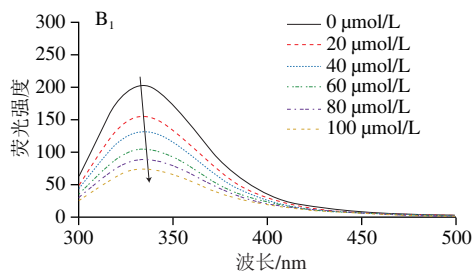
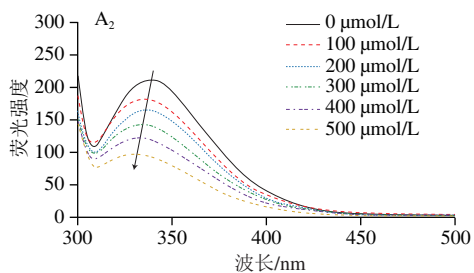
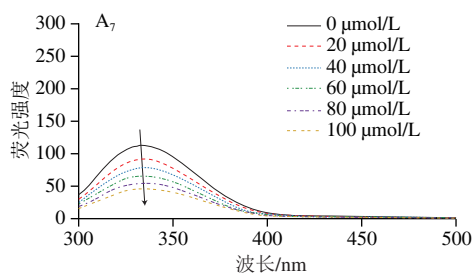
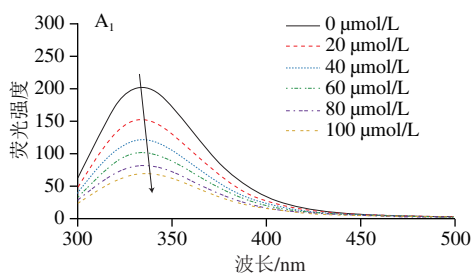
## 2 结果与分析

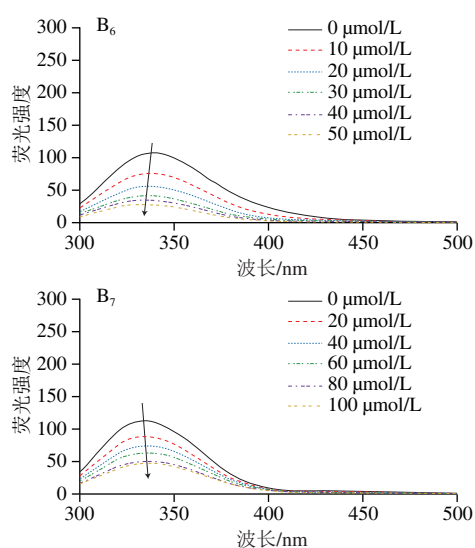
### 2.1 MC与PC、Cat、Chl的相互作用分析

#### 2.1.1 荧光光谱分析

由图2A<sub>1</sub>~A<sub>3</sub>、B<sub>1</sub>~B<sub>3</sub>可知,各条件处理组中,MC在 $336\text{ nm}$ (最大发射波长)处的荧光强度随着分子浓度的增加而降低,表明活性分子与MC形成了复合物。此外,随着Cat、Chl浓度的增加,MC的最大发射波长呈现蓝移现象;而PC的加入则导致其红移,说明PC的结合使MC上色氨酸残基微环境亲水性增强。相同条件处理下,Chl对MC的内源荧光猝灭效果最强,Cat最弱,表明MC与Chl之间的相互作用最强。尽管Cat是PC的结构单元,但它与MC的相互作用比PC弱,可能是由于PC结构中存在更多的黄酮单元,可与MC上不同肽链的氨基酸残基间形成非共价作用。

三元复合物中,Cat和Chl的加入导致PC-MC复合物的最大发射波长发生蓝移;但PC的加入导致Cat-MC和Chl-MC最大发射波长红移,与它们对游离MC的影响相似(图2A<sub>4</sub>~A<sub>7</sub>、B<sub>4</sub>~B<sub>7</sub>)。与游离MC相比,二元复合物最大发射波长的移动程度更大,表明二元分子的组合对MC的色氨酸微环境有更大的影响。





下标1~7. PC-MC、Cat-MC、Chl-MC、PC-MC-Cat、Cat-MC-PC、PC-MC-Chl、Chl-MC-PC。

图2 热处理(A)或热处理联合超声(B)处理下二、三元复合物荧光光谱图

Fig. 2 Fluorescence spectra of binary or ternary complexes with heat treatment (A) or combined heat and ultrasonic treatment (B)

为了探究PC、Cat、Chl对MC内源荧光的猝灭机理，利用Stern-Volmer方程计算了 $K_{sv}$ 和 $K_q$ <sup>[19]</sup>。由表1可知，各处理组中二元、三元复合物的 $K_q$ 值远大于最大 $K_q$ 值( $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ )，表明3种小分子及其二元复合物对MC内源荧光的猝灭机理均为静态猝灭，形成了稳定性较高的静态复合物<sup>[21]</sup>。二元复合物Chl-MC的 $K_{sv}$ 和 $K_q$ 值均高于PC-MC和Cat-MC，这与荧光强度的变化趋势一致。此外，三元复合物的 $K_{sv}$ 和 $K_q$ 值与二元复合物接近，表明MC具有同时结合两个分子的能力。

表1 热处理或热处理联合超声处理下PC、Cat和Chl对MC的结合参数  
Table 1 Binding parameters of MC to PC, Cat or Chl with heat treatment or combined heat and ultrasonic treatment

样品	TK	处理 方式	$K_{sv}$ ( $10^4 \text{ L/mol}$ )	$K_q$ ( $10^{12} \text{ L}/$ ( $\text{mol} \cdot \text{s}$ ))	$K_q$ ( $10^4 \text{ L/mol}$ )	$n$	$\Delta H/$ ( $\text{kJ/mol}$ )	$\Delta S/$ ( $\text{J}/$ ( $\text{mol} \cdot \text{K}$ ))	$\Delta G/$ ( $\text{kJ/mol}$ )
PC-MC	298	H	2.10±0.12	2.10±0.12	3.66±1.59	1.07±0.05	17.91	147.45	-26.03
		U	1.91±0.12	1.91±0.12	2.98±2.06	1.06±0.07	43.59	233.15	-25.53
	310	H	1.89±0.10	1.89±0.10	4.34±1.46	1.09±0.04	17.91	146.54	-27.52
		U	1.84±0.03	1.84±0.03	6.33±1.20	1.14±0.02	43.59	233.70	-28.50
	318	H	1.78±0.10	1.78±0.10	5.60±2.22	1.13±0.08	17.91	147.21	-28.90
		U	1.78±0.12	1.78±0.12	9.26±1.58	1.19±0.05	43.59	233.30	-30.24
Cat-MC	298	H	0.18±0.009	0.18±0.009	0.50±0.16	1.15±0.06	3.97	84.14	-21.10
		U	0.20±0.006	0.20±0.006	0.62±0.16	1.15±0.05	15.58	124.92	-21.65
	310	H	0.16±0.008	0.16±0.008	0.54±0.15	1.15±0.05	3.97	81.08	-21.17
		U	0.17±0.006	0.17±0.006	0.74±0.12	1.19±0.04	15.58	124.34	-22.97
	318	H	0.15±0.009	0.15±0.009	0.56±0.15	1.17±0.05	3.97	84.18	-22.80
		U	0.15±0.006	0.15±0.006	0.91±0.08	1.24±0.02	15.58	124.76	-24.10
Chl-MC	298	H	8.47±0.21	8.47±0.21	109.22±2.69	1.28±0.09	48.62	278.74	-34.45
		U	7.19±0.16	7.19±0.16	71.46±1.75	1.25±0.05	86.68	402.95	-33.40
	310	H	8.31±0.42	8.31±0.42	450.97±1.50	1.42±0.04	48.62	284.36	-39.54
		U	6.82±0.57	6.82±0.57	181.72±1.56	1.35±0.04	86.68	399.45	-37.15
	318	H	7.44±0.68	7.44±0.68	458.68±1.69	1.43±0.05	48.62	280.26	-40.55
		U	8.16±0.64	8.16±0.64	375.60±1.50	1.45±0.04	86.68	402.00	-41.15

续表1

样品	TK	处理 方式	$K_{sv}$ ( $10^4 \text{ L/mol}$ )	$K_q$ ( $10^{12} \text{ L}/$ ( $\text{mol} \cdot \text{s}$ ))	$K_q$ ( $10^4 \text{ L/mol}$ )	$n$	$\Delta H/$ ( $\text{kJ/mol}$ )	$\Delta S/$ ( $\text{J}/$ ( $\text{mol} \cdot \text{K}$ ))	$\Delta G/$ ( $\text{kJ/mol}$ )
PC-MC-Cat	298	H	0.33±0.02	0.33±0.02	0.73±0.16	1.11±0.06	-100.24	-262.43	-22.03
		U	0.41±0.02	0.41±0.02	0.55±0.14	1.05±0.04	-43.03	-72.77	-21.34
	310	H	0.31±0.003	0.31±0.003	0.51±0.11	1.07±0.02	-100.24	-252.36	-22.00
		U	0.37±0.007	0.37±0.007	0.44±0.11	1.03±0.02	-43.03	-68.98	-21.64
	318	H	0.22±0.008	0.22±0.008	0.28±0.15	0.86±0.05	-100.24	-259.70	-17.65
		U	0.31±0.02	0.31±0.02	0.37±0.13	1.01±0.03	-43.029	-71.75	-20.21
Cat-MC-PC	298	H	1.04±0.11	1.04±0.11	3.04±1.87	1.13±0.06	-109.88	-282.91	-25.58
		U	1.48±0.07	1.48±0.07	2.51±1.57	1.04±0.07	-32.59	-25.12	-25.10
	310	H	0.87±0.05	0.87±0.05	2.51±0.75	1.12±0.09	-109.88	-270.23	-26.11
		U	1.32±0.09	1.32±0.09	1.51±1.55	1.03±0.07	-32.59	-25.11	-24.80
	318	H	0.73±0.06	0.73±0.06	0.28±0.11	0.90±0.05	-109.88	-279.47	-21.01
		U	1.34±0.11	1.34±0.11	1.10±1.56	0.98±0.08	-32.59	-25.12	-24.60
PC-MC-Chl	298	H	6.36±0.23	6.36±0.23	1278.31±1.66	1.54±0.05	-104.47	-241.54	-40.54
		U	5.86±0.30	5.86±0.30	42.83±1.31	1.20±0.03	70.31	343.74	-32.13
	310	H	5.97±0.40	5.97±0.40	691.13±1.55	1.48±0.04	-104.47	-206.08	-40.59
		U	6.51±0.58	6.51±0.58	67.44±2.77	1.24±0.10	70.31	338.38	-34.59
	318	H	6.93±0.69	6.93±0.69	118.73±2.37	1.29±0.08	-104.47	-212.24	-36.98
		U	7.20±0.58	7.20±0.58	214.29±2.13	1.35±0.07	70.31	342.29	-38.54
Chl-MC-PC	298	H	1.46±0.09	1.46±0.09	4.76±1.82	1.13±0.06	-55.61	-97.07	-26.69
		U	1.43±0.08	1.43±0.08	2.10±1.65	1.04±0.06	-39.28	-49.04	-24.67
	310	H	1.26±0.04	1.26±0.04	1.45±0.65	1.02±0.05	-55.61	-99.72	-24.70
		U	1.44±0.02	1.44±0.02	1.36±0.85	1.00±0.02	-39.28	-47.56	-24.54
	318	H	0.98±0.04	0.98±0.04	1.07±0.48	1.01±0.04	-55.61	-97.79	-24.52
		U	1.67±0.04	1.67±0.04	0.82±0.15	0.92±0.01	-39.28	-48.64	-23.82

注：H.热处理；U.热处理联合超声处理。

### 2.1.2 结合常数和结合位点数分析

对于静态猝灭机制， $K_a$ 与 $n$ 可通过双对数方程计算，结果如表1所示。相同条件处理下，二元复合物的 $K_a$ 值均随温度的升高而升高，表明结合过程为吸热过程。此外，两种处理条件下，PC-MC、Cat-MC、Chl-MC在各温度下的 $K_a$ 值均高于 $10^3$ ，且遵循 $\text{Chl} > \text{PC} > \text{Cat}$ ，表明MC对Chl具有更强的亲和力。PC与MC的 $K_a$ 值高于其与 $\beta$ -酪蛋白的 $K_a$  ( $10^3$ )，与 $\beta$ -乳球蛋白的 $K_a$ <sup>[22-23]</sup>相似。Cat和MC的 $K_a$ 值高于其与大豆分离蛋白 ( $10^2$ ) 和 $\beta$ -乳球蛋白的 $K_a$ 值<sup>[24-25]</sup>。Chl和MC的 $K_a$ 值高于其与大豆蛋白的 $K_a$ 值 ( $10^4$ )<sup>[10]</sup>。此外，MC对大黄素、咖啡酸、咖啡酸苯乙酯也表现出较强的结合作用<sup>[12-13]</sup>。可见，MC是一种生物活性分子天然纳米载体。

Chl-MC复合物在热处理条件下的 $K_a$ 值高于热处理联合超声处理，而Cat-MC复合物的 $K_a$ 则表现出相反的趋势。这可能是由于MC和Chl之间的强相互作用导致Chl很容易与MC结合，而超声波产生的空化作用削弱了二者间的结合作用。对于 $K_a$ 值较低的Cat而言，超声产生的空化作用通过增加它们的碰撞加速Cat与MC结合。此外，由于其分子体积小，空化作用可以使Cat轻松进入胶束内部区域并与MC牢固结合。

除热处理联合超声处理下的PC-MC-Chl复合物外，在三元复合物中，第2个分子结合的 $K_a$ 值随处理温度的

增加而减小, 这表明低温有助于三元复合物的形成。此外, 298 K热处理条件下, Chl和Cat与二元复合物结合的 $K_a$ 值比它们与游离MC结合的 $K_a$ 值大, 而PC的 $K_a$ 值变化与此相反, 这可能是由于PC分子体积较大, 其与MC的结合域与其他分子不同所致。总的来说, MC可以连续结合两个生物活性分子, 并具有较单一分子高或相似的结合强度。298 K时, 热处理下的三元复合物的 $K_a$ 值高于热处理联合超声处理, 这表明当MC与一个分子结合后, 超声处理不利于另一个分子的结合。

由表1可知, MC上有一个PC或Cat的结合位点。PC- $\beta$ -乳球蛋白和Cat-大豆分离蛋白也表现出类似的结果<sup>[23-24]</sup>。MC上Chl的结合位点数较PC和Cat多, 表明Chl与MC产生结合作用的基团比PC、Cat更多。298 K热处理条件下, 三元复合物的结合位点数也接近1, 且相较于二元复合物表现出较大或相近的结合位点数。进一步证实, 第一个活性分子的结合有利于另一个分子与MC的结合。

### 2.1.3 热力学参数分析

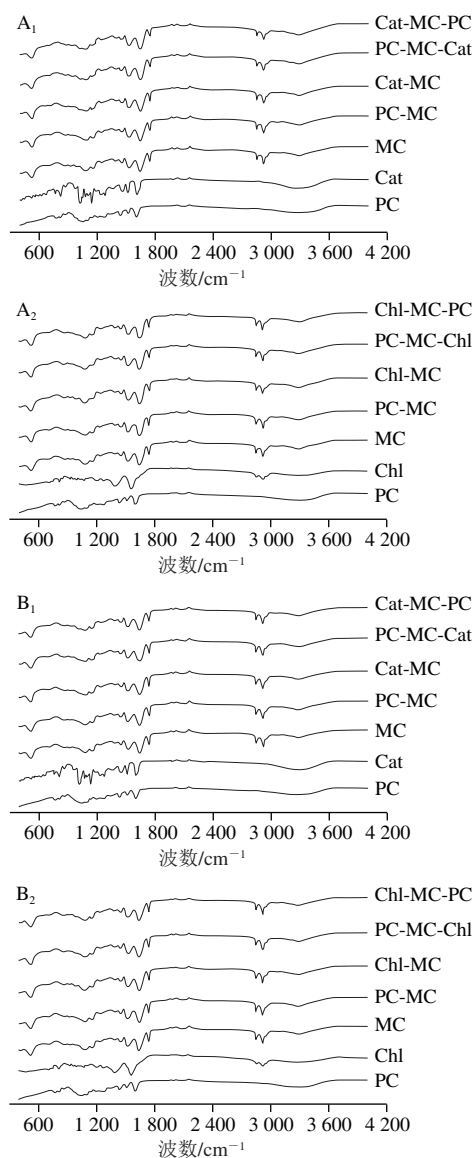
蛋白质与酚类化合物的结合方式可通过热力学参数判定。采用Van't Hoff方程计算得到的二元、三元复合物形成过程的热力学参数, 如表1所示。各条件处理组中, 二元复合物形成过程中 $\Delta H$ 和 $\Delta S$ 均为正值, 表明PC、Cat、Chl与MC之间的结合方式主要以疏水作用为主。热处理条件下, 第2个分子与MC结合的 $\Delta H$ 和 $\Delta S$ 均为负值, 即MC以疏水作用与一个分子结合后, 另一个分子则以范德华力和氢键与之结合。由于第1个分子已经占据了MC上易于结合的疏水位点, 另一个分子只能以其他方式结合在其他位点上。然而, 超声处理下, Chl仍然以疏水作用与PC-MC结合, 这是因为PC和Chl的体积较大, PC结合在MC的疏水位点后, 受PC体积和超声波的双重作用, MC的结构变化较大, 由于位阻效应, 不能在临近位置继续结合第2个分子。因此, 第2个分子可能结合于MC的其他疏水位点。受到超声波的影响, 第2个分子与MC的结合作用弱于其单独与MC的结合作用。但是, 二元、三元复合物的 $\Delta G$ 均为负值, 表明复合物的形成均为自发过程, 证明MC具有自发结合多个活性分子的能力, 这与其特殊的纳米结构有关。

## 2.2 多元复合物的结构表征

### 2.2.1 FTIR分析

如图3所示, 游离PC、Cat在 $1\ 604\ \text{cm}^{-1}$ 处为C=C的伸缩振动,  $1\ 518\ \text{cm}^{-1}$ 处为C=C骨架的伸缩振动,  $1\ 440\ \text{cm}^{-1}$ 处为C—H的弯曲振动<sup>[26-27]</sup>; 游离Chl在 $2\ 975\ \text{cm}^{-1}$ 处为CH<sub>3</sub>的不对称C—H伸缩振动,  $2\ 855\ \text{cm}^{-1}$ 处为醛基的伸缩振动,  $1\ 525\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 356\ \text{cm}^{-1}$ 处为卟啉环的C—C和C—N骨架振动<sup>[28]</sup>。MC中, 酰胺I ( $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ )和酰胺II带 ( $1\ 514\ \text{cm}^{-1}$ )的位置分别与

蛋白质的C—O和N—H的伸缩振动有关<sup>[12]</sup>。MC与PC、Cat、Chl在不同处理条件下结合后, 酰胺I、II带未出现明显的偏移, 但PC、Cat、Chl的特征峰均消失, 三元复合物也表现出类似的变化。这可能是由于MC自身结构稳定性高, 低浓度的PC、Cat、Chl通过物理作用结合在MC表面或孔隙间, 从而对其酰胺带没有产生显著影响。前期研究表明, MC与葛根素/黄豆苷元结合后, 其酰胺带也未发生明显变化<sup>[29]</sup>。



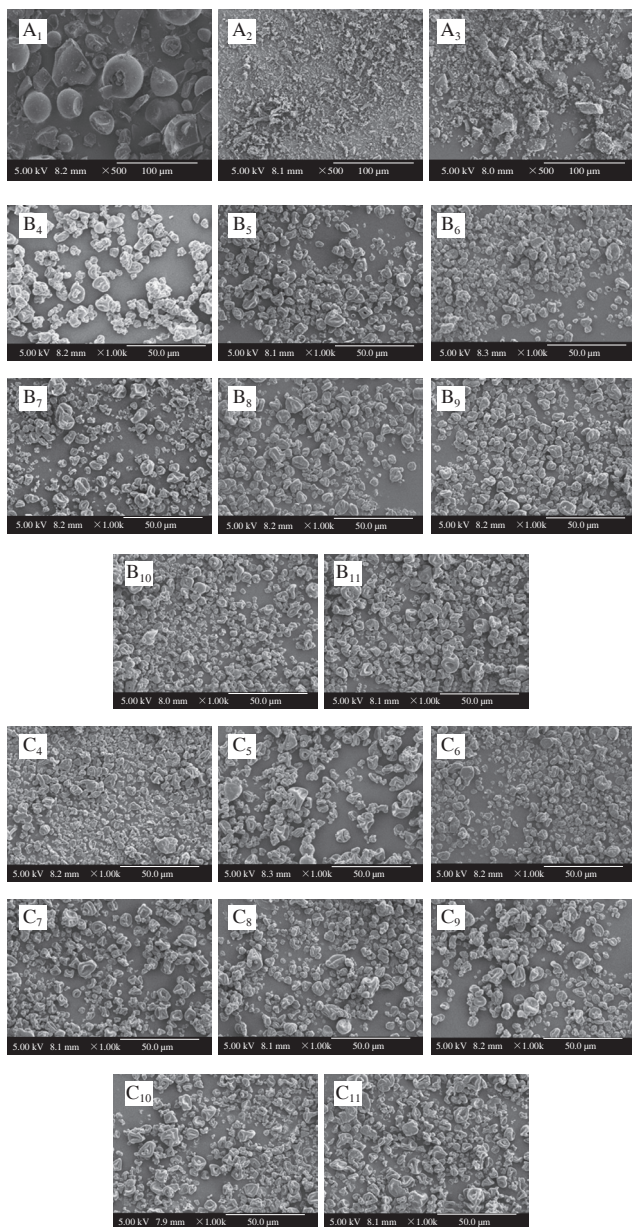
下标1. PC与Cat的二元分子组合; 下标2. PC与Chl的二元分子组合; 图5~7同。

图3 热处理(A)或热处理联合超声(B)处理下复合物的FTIR图  
Fig. 3 FTIR spectra of complexes with heat treatment (A) or combined heat and ultrasonic treatment (B)

### 2.2.2 SEM分析

如图4所示, 游离PC表现为带有厚壁的光滑球体, 部分球体因喷干时内部水分子挥发皱缩而破裂; 游离Cat和

ChI则呈现不规则的块状。经喷雾干燥后, MC和二元、三元复合物呈葡萄干状, 粒径介于5~25 μm之间。超声处理后, 因MC空间结构变得紧凑, 尺寸略有减小<sup>[30]</sup>。但二元、三元复合物未表现出类似的现象。这可能是由于结合的PC、Cat、ChI起到了稳定MC空间结构的作用。此外, 与MC相比, Cat较小的分子结构使得二元复合物Cat-MC在热处理或热处理联合超声处理下均表现出粒径较小、粒度趋于均匀的特点。



下标1~11. PC、Cat、ChI、MC、PC-MC、Cat-MC、ChI-MC、PC-MC-Cat、Cat-MC-PC、PC-MC-ChI、ChI-MC-PC。  
 图4 未经任何处理(A)、热处理(B)或热处理联合超声处理(C)游离PC、Cat、ChI及其二、三元复合物的SEM图

Fig. 4 SEM images of free PC, Cat, ChI and their binary or ternary complexes without treatment (A), with heat treatment (B) or combined heat and ultrasonic treatment (C)

### 2.3 多元复合物性质分析

#### 2.3.1 热稳定性分析

如图5所示, 不同条件处理下, 游离PC、Cat、ChI与MC及其复合物在50~100 °C之间均存在一个明显的吸热峰, 这是由于少量水分蒸发所致。随着温度的升高, PC和ChI的DSC曲线没有出现明显的晶体熔融吸热峰, 表明它们具有无定形结构。Cat的DSC曲线具有样品熔化的吸热峰以及与类黄酮氧化和降解相关的放热峰<sup>[31]</sup>。与MC相互作用后, PC、Cat、ChI的特征吸热峰消失, 二元、三元复合物表现出与游离MC相似的蛋白宽峰特征曲线。

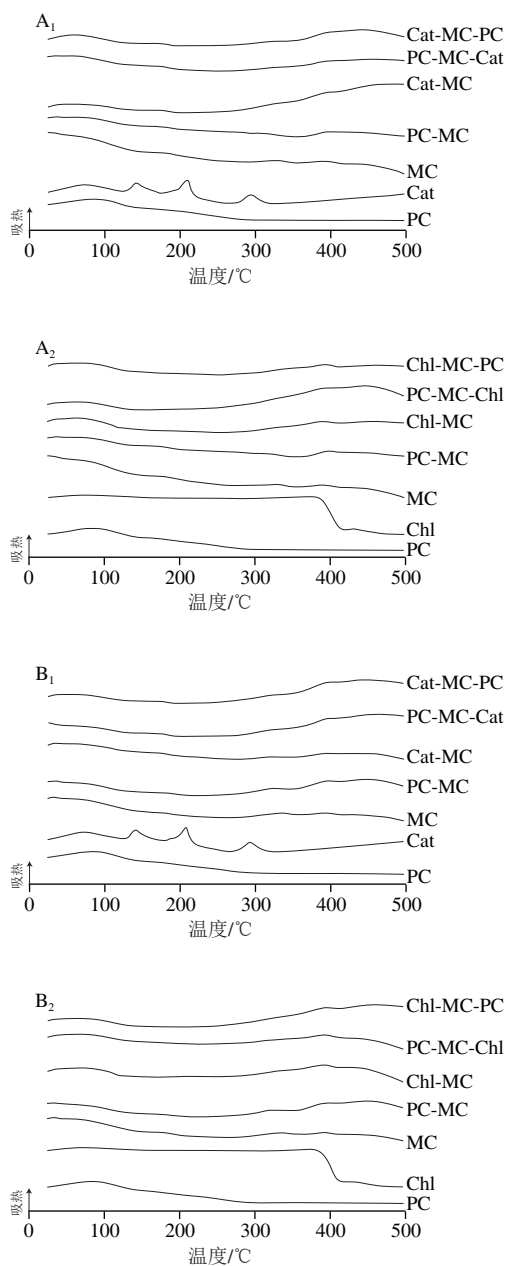


图5 热处理(A)或热处理联合超声(B)处理下复合物的DSC曲线  
 Fig. 5 DSC curves of complexes with heat treatment (A) or combined heat and ultrasonic treatment (B)



由图6可知, PC在150~425 °C的质量损失为28.43%; Chl在225~425 °C的质量损失为23.31%; 而Cat在200~280 °C的质量损失为6.98%, 在280~425 °C的质量损失为22.05%。MC在热处理下于225~425 °C的质量损失为63.28%, 热处理联合超声处理下为58.11%, 表明超声处理改善了MC的热稳定性; 这可能与超声处理使MC的空间结构变得紧凑有关。二元、三元复合物的TG曲线与游离MC相似, 分别在50~100、100~200 °C和225~425 °C 3个阶段出现质量损失: 第1阶段是由于水的蒸发, 第2阶段是由于PC、Cat、Chl和MC之间的相互作用被破坏, 第3阶段是由于PC、Cat、Chl和MC的热分解。热处理条件下, 二元、三元复合物的质量损失低于游离MC, 而热处理联合超声处理则表现出相反的趋势, 表明在热处理条件下活性分子的结合增加了MC的热稳定性。

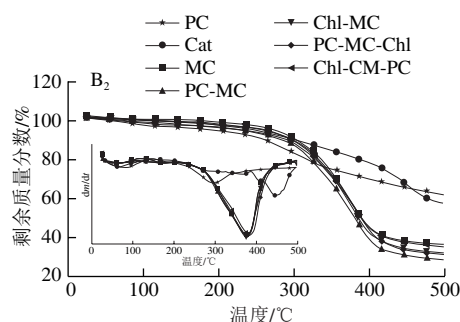
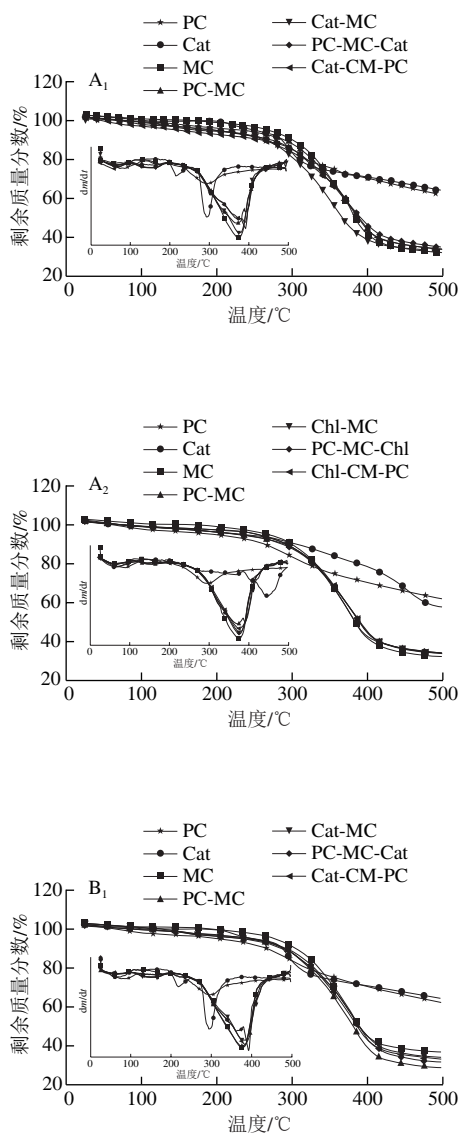
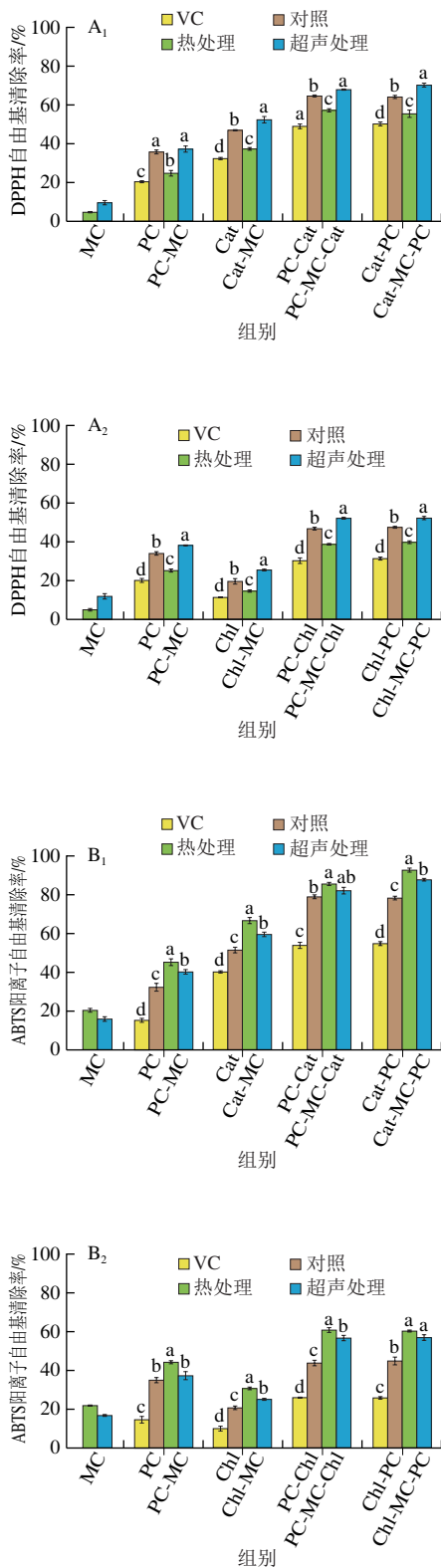


图6 热处理(A)或热处理联合超声(B)处理下复合物的热稳定性  
Fig. 6 TG curves of complexes with heat treatment (A) or combined heat and ultrasonic treatment (B)

### 2.3.2 抗氧化性分析

如图7A所示, 3种分子对DPPH自由基的清除能力显著高于同浓度VC, 表现出较强的抗氧化活性。PC、Cat、Chl二元或三元复合物均表现出良好的DPPH自由基清除活力, 但低于游离分子和MC的DPPH自由基清除力的总和, 说明二者的结合位点与DPPH自由基清除有关。与MC结合后, 复合物对DPPH自由基的清除能力随处理条件不同表现出显著差异。热处理条件下, MC与PC、Cat、Chl相互作用强于超声处理, 因此热处理复合物的DPPH自由基清除率低于相同浓度游离分子的清除率。三元复合物的DPPH自由基清除力变化趋势与二元复合物一致, 且均大于二元复合物的活性。此外, PC, Cat和Chl的添加顺序不会对三元复合物的清除能力产生显著影响, 说明不同活性分子都是独立结合于MC的不同位点, 其抗氧化性没有拮抗作用。如图7B所示, 相较于VC, 3种分子对ABTS阳离子自由基均表现出较强的清除能力。不同条件处理下, 二元、三元复合物对ABTS阳离子自由基的清除能力遵循以下顺序: 热处理组>热处理联合超声处理组>游离分子。ABTS阳离子自由基属于亲水性自由基, 通常用于确定抗氧化剂属于氢原子转移还是单电子转移<sup>[13]</sup>。MC与活性分子均以疏水作用结合, 其亲水基团不受影响, 因此活性分子的ABTS阳离子自由基清除力没有被削弱。热处理下, MC与活性分子结合作用较强, 更有利于活性分子的亲水基团发挥ABTS阳离子自由基清除活力。此外, 超声处理对MC空间结构的影响也是导致ABTS阳离子自由基的清除能力低于热处理的原因之一。三元复合物的ABTS阳离子自由基清除能力变化趋势与二元复合物一致, 且显著高于二元复合物, 证明MC可以同时高效结合多个活性分子, 且对活性分子的抗氧化性无拮抗作用, 是一种性能较好的天然载体。



不同处理组一样品字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图7 热处理或热处理联合超声处理下复合物的DPPH自由基(A)和ABTS阳离子自由基(B)清除能力

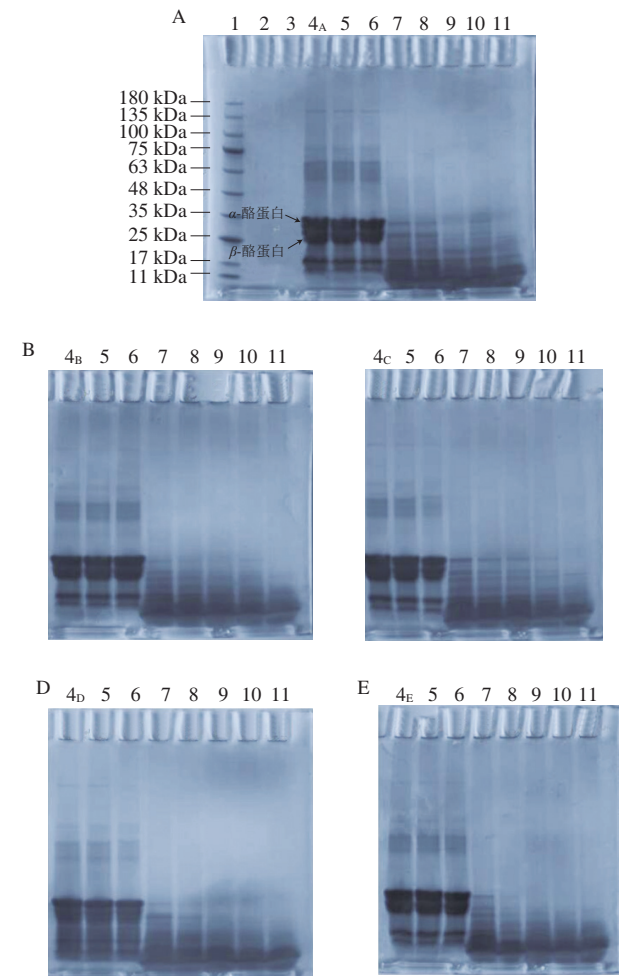
Fig. 7 DPPH radical (A) and ABTS radical cation (B) scavenging capacity of complexes under heat treatment or combined heat and ultrasonic treatment

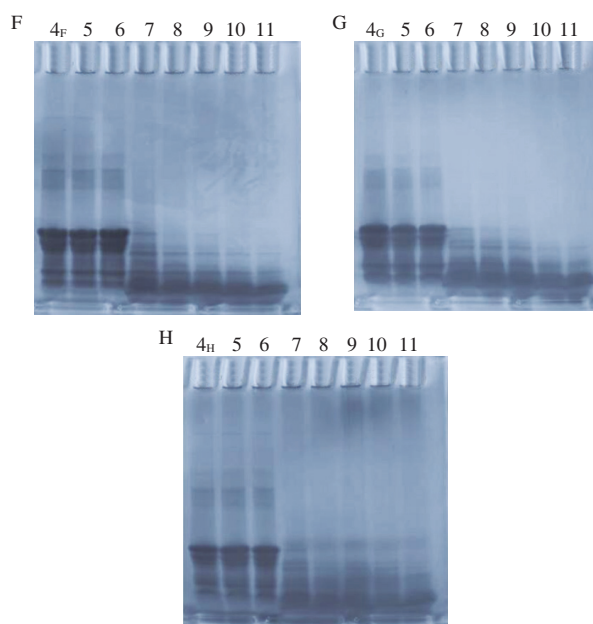
#### 2.4 复合物的体外模拟消化性分析

因热处理条件下MC对活性分子的结合作用较强,选择热处理下的复合物为样品,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析其不同时间段的模拟胃肠消化产物。如图8所示,游离MC的电泳条带主要为 $\alpha$ -酪蛋白和 $\beta$ -酪蛋白<sup>[32]</sup>。SGF中消化120 min时,少量MC被SGF中的胃蛋白酶消化。二元、三元复合物在SGF中也表现出类似的消化结果,说明小分子结合不影响MC在SGF中的消化速率。

在SIF中,游离MC的 $\alpha$ -酪蛋白和 $\beta$ -酪蛋白含量随消化时间的延长逐渐减少,消化240 min后被完全水解。二元复合物在SIF中的消化趋势与游离MC一致。相较于PC-MC与Chl-MC, Cat-MC复合物在各时间段的消化程度较低,这可能是由于Cat分子体积较小,其与胰蛋白酶的接触面积较大,且具有潜在的胰蛋白酶抑制性,因此降低了MC的消化速率<sup>[33]</sup>。

就三元复合物而言,其消化性强于二元复合物,表明三元复合物的形成对MC的空间结构影响大于二元复合物,多个活性分子的结合打开了MC的肽链,更有利于酶与其接触,加剧了MC的水解。因此,多个活性分子的结合改善了MC的消化性。





A~H. MC、PC-MC、Cat-MC、Chl-MC、PC-MC-Cat、Cat-MC-PC、PC-MC-Chl、Chl-MC-PC。泳道1~11. Marker、SGF对照、SIF对照、A~H样品对照、SGF中消化60 min、SGF中消化120 min、SIF中消化20 min、SIF中消化40 min、SIF中消化60 min、SIF中消化120 min、SIF中消化240 min。

图8 复合物体外模拟消化产物的电泳图

Fig. 8 Electropherogram of digestion products of complexes during simulated gastrointestinal digestion

### 3 结论

MC可自发与PC、Cat、Chl或其二元组合物形成稳定的二元或三元复合物。在热处理或热处理联合超声处理下, MC与PC、Cat、Chl的结合作用为疏水相互作用, 且MC对Chl的结合作用最强。热处理条件下, 当MC与PC、Cat、Chl结合后, 另一个分子以范德华力和氢键与MC结合, 且298 K下第1个分子的结合提升了第2个分子与MC的结合常数和结合位点数。然而, 热处理联合超声处理却降低了第2个分子的结合常数。MC结合PC、Cat、Chl或其二元组合物后, 喷干物形貌并未发生显著变化。此外, PC、Cat、Chl的结合提高了MC的热稳定性。

热处理和热处理联合超声处理对PC/Cat/Chl-MC二元及三元复合物的抗氧化性影响规律不同。热处理改善了复合物的ABTS阳离子自由基清除力, 但削弱了其DPPH自由基清除活性; 超声处理的作用结果与热处理相反。然而, 两种处理条件下, 三元复合物的抗氧化性均高于二元复合物。Cat的结合降低了MC在SIF中的消化性, 但二元活性分子的同时结合对MC的SIF消化性具有改善作用。

综上所述, MC对多种分子表现出较高的亲和性, 可实现多种活性分子的同时负载, 且不影响结合常数, 也不会对活性分子的抗氧化性产生拮抗作用, 是一种性能优异的天然纳米级活性分子载体, 在功能食品设计和开发方面具有潜在的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 张慧文, 张玉, 马超美. 原花青素的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 296-304. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201505052.
- [2] JIANG Y K, JIANG Z Y, MA L, et al. Advances in nanodelivery of green tea catechins to enhance the anticancer activity[J]. Molecules, 2021, 26(11): 3301. DOI:10.3390/molecules26113301.
- [3] 陆昌琪, 毛世红, 童华荣, 等. 儿茶素及其衍生物合成研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 316-326. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201811048.
- [4] LI J T, PENG Y F, HAN X Y, et al. Nonlinear optical properties of sodium copper chlorophyllin in aqueous solution[J]. Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials, 2017, 15(1): 19-24. DOI:10.5301/jabfm.5000350.
- [5] 徐佳慧, 陈明舜, 陈军, 等. 不同聚合度原花青素分离制备的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 345-350. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020030412.
- [6] 张晓蓉, 唐雯熙, 刘继旋, 等. 黄花蒿蜡油叶绿素含量及其铜钠盐制备工艺[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(9): 127-130. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201509024.
- [7] YAO L A, XU J, ZHANG L W, et al. Nanoencapsulation of anthocyanin by an amphiphilic peptide for stability enhancement[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118(1): 106741. DOI:10.1016/j.foodhyd.2021.106741.
- [8] CHEN W, XIE Y L. Interaction of protein isolate with anthocyanin extracted from black soybean and its effect on the anthocyanin stability[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(11): 3140-3146. DOI:10.1111/1750-3841.14816.
- [9] LIANG J, YAN H, WANG X L, et al. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems[J]. Food Chemistry, 2017, 231(15): 19-24. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.02.106.
- [10] CAO J R, LI F W, LI Y Y, et al. Hydrophobic interaction driving the binding of soybean protein isolate and chlorophyll: improvements to the thermal stability of chlorophyll[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 113: 106465. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.106465.
- [11] SMITH G N, BROK E, CHRISTIANSEN M V, et al. Casein micelles in milk as sticky spheres[J]. Soft Matter, 2020, 16(43): 9955-9963. DOI:10.1039/D0SM01327G.
- [12] YANG M, WEI Y M, ASHOKKUMAR M, et al. Effect of ultrasound on binding interaction between emodin and micellar casein and its microencapsulation at various temperatures[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 62: 104861. DOI:10.1016/j.ultsonch.2019.104861.
- [13] QIN J J, YANG M, WANG Y C, et al. Interaction between caffeic acid/caffeic acid phenethyl ester and micellar casein[J]. Food Chemistry, 2021, 349(5): 129154. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129154.
- [14] MOELLER H, MARTIN D, SCHRADER K, et al. Spray- or freeze-drying of casein micelles loaded with vitamin D<sub>2</sub>: studies on storage stability and *in vitro* digestibility[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 97: 87-93. DOI:10.1016/j.lwt.2018.04.003.
- [15] HAHAM M, ISH-SHALOM S, NODELMAN M, et al. Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles[J]. Food and Function, 2012, 3(7): 737-744. DOI:10.1039/c2fo10249h.
- [16] ZHANG L, MCCLEMENTS D J, WEI Z L, et al. Delivery of synergistic polyphenol combinations using biopolymer-based systems: advances in physicochemical properties, stability and bioavailability[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(12): 2083-2097. DOI:10.1080/10408398.2019.1630358.

- [17] ZHANG S Y, LI X L, ZHENG L L, et al. Encapsulation of phenolics in  $\beta$ -lactoglobulin: stability, antioxidant activity, and inhibition of advanced glycation end products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 162: 113437. DOI:10.1016/j.lwt.2022.113437.
- [18] REN Y F, LIU H, WANG D F, et al. Antioxidant activity, stability, *in vitro* digestion and cytotoxicity of two dietary polyphenols co-loaded by  $\beta$ -lactoglobulin[J]. Food Chemistry, 2022, 371: 131385. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131385.
- [19] FU X Z, BELWAL T, HE Y H, et al. Interaction and binding mechanism of cyanidin-3-*O*-glucoside to ovalbumin in varying pH conditions: a spectroscopic and molecular docking study[J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126616. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126616.
- [20] JI W, YANG F M, YANG M. Effect of change in pH, heat and ultrasound pre-treatments on binding interactions between quercetin and whey protein concentrate[J]. Food Chemistry, 2022, 384: 132508. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132508.
- [21] ZENG H J, LIU Z, HU G Z, et al. Investigation on the binding of aloe-emodin with tyrosinase by spectral analysis and molecular docking[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 211: 79-85. DOI:10.1016/j.saa.2018.11.045.
- [22] MA G Q, TANG C Y, SUN X J, et al. The interaction mechanism of  $\beta$ -casein with oligomeric proanthocyanidins and its effect on proanthocyanidin bioaccessibility[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 113: 106485. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.106485.
- [23] TANG C Y, TAN B, SUN X J. Elucidation of interaction between whey proteins and proanthocyanidins and its protective effects on proanthocyanidins during *in vitro* digestion and storage[J]. Molecules, 2021, 26(18): 5468. DOI:10.3390/molecules26185468.
- [24] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132507.
- [25] AL-SHABIB N A, KHAN J M, MALIK A, et al. Molecular interaction of tea catechin with bovine  $\beta$ -lactoglobulin: a spectroscopic and *in silico* studies[J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2020, 28(3): 238-245. DOI:10.1016/j.jsps.2020.01.002.
- [26] 王楠, 杨敏, 郑杰, 等. 酪蛋白胶束对原花青素稳定性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 164-174. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029537.
- [27] RAMOS-TEJADA M M, DURÁN J D G, ONTIVEROS-ORTEGA A, et al. Investigation of alumina/(+)-catechin system properties. Part I: a study of the system by FTIR-UV-Vis spectroscopy[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002, 24(3): 297-308. DOI:10.1016/S0927-7765(01)00284-3.
- [28] FARAG A A M. Optical absorption of sodium copper chlorophyllin thin films in UV-Vis-NIR region[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2006, 65(3/4): 667-672. DOI:10.1016/j.saa.2005.12.026.
- [29] WANG Y C, YANG M, QIN J J, et al. Interactions between puerarin/daidzein and micellar casein[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(2): 14048. DOI:10.1111/jfbc.14048.
- [30] ZHANG R H, PANG X Y, LU J, et al. Effect of high intensity ultrasound pretreatment on functional and structural properties of micellar casein concentrates[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 47: 10-16. DOI:10.1016/j.ultsonch.2018.04.011.
- [31] LATOS-BROZIO M, MASEK A, PIOTROWSKA M. Thermally stable and antimicrobial active poly(catechin) obtained by reaction with a cross-linking agent[J]. Biomolecules, 2021, 11(50): 1-14. DOI:10.3390/biom11010050.
- [32] ZHUANG F C, XIANG L, HU J H, et al. Effects of casein micellar structure on the stability of milk protein-based conjugated linoleic acid microcapsules[J]. Food Chemistry, 2018, 269(15): 327-334. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.07.018.
- [33] ZHANG H, LU M, JIANG H, et al. Evaluation inhibitory activity of catechins on trypsin by capillary electrophoresis-based immobilized enzyme microreactor with chromogenic substrate[J]. Journal of Separation Science, 2020, 43(15): 3136-3145. DOI:10.1002/jssc.202000132.