

## (-)-表儿茶素和植物铁蛋白的非共价结合及功能表征

刘玉茜<sup>1</sup>, 张凤姣<sup>1</sup>, 程雷<sup>2</sup>, 陈义伦<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 山东农业大学食品科学与工程学院 山东泰安 271018

<sup>2</sup> 北京工商大学食品营养与健康学院 北京 100048)

**摘要** 采用荧光光谱、圆二色谱、透射电镜、动态光散射等手段研究去铁红小豆铁蛋白(apoRBF)与表儿茶素(EC)的非共价结合及其对蛋白质结构和功能性质的影响。荧光结果表明,EC未改变apoRBF的特征发射峰330 nm,且随浓度的升高,apoRBF荧光强度下降,EC与apoRBF发生相互作用,引起蛋白质三级/四级结构的改变,而对蛋白质的一、二级结构没有影响。荧光拟合显示二者的结合常数K和结合位点数n分别为 $3.65 \times 10^4 \text{ mol/L}^{-1}$ 和98.5。铁蛋白-表儿茶素复合物(FEC)在4℃和40℃下透析12 h,EC的释放率分别为29.1%和45.9%,均低于游离EC的释放率,表明EC与apoRBF发生结合,且低温更有利于二者的结合。经模拟胃肠液孵育2 h后,FEC中EC的释放率分别为68.6%和32.2%,与游离EC的释放率相比,表现出相对较慢和持续的释放过程,表明EC与apoRBF的结合显著抑制模拟胃肠液中蛋白酶对铁蛋白的降解,促进功能组分的缓释作用。此外,FEC保留了表儿茶素的抗氧化能力但略有下降。本研究结果明确了多酚与植物铁蛋白作用机理,为表儿茶素与植物铁蛋白非共价复合物的应用提供理论参考。

**关键词** 植物铁蛋白; (-)-表儿茶素; 铁蛋白-表儿茶素复合物; 缓释; 抗氧化能力

**文章编号** 1009-7848(2023)04-0048-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.005

在食品体系中,储存和加工过程中不同组分之间的相互作用可能会影响食品的稳定性和营养价值。蛋白质和多酚广泛共存于各类食品中,它们之间的相互作用是影响蛋白质稳定性和多酚抗氧化活性的主要因素,其作用机制主要有非共价结合和共价结合两种<sup>[1-2]</sup>。在多酚氧化酶作用或在碱性条件下,酚类化合物通常会被氧化成醌,与蛋白发生不可逆的共价相互作用<sup>[3-4]</sup>,且反应温度和pH值是影响蛋白质-多酚共价相互作用的两个主要因素<sup>[5]</sup>。相比之下,由于反应条件较为温和,蛋白质与多酚之间的非共价相互作用在食品体系中更为常见,其相互作用力主要包括疏水相互作用、范德华力、氢键和静电吸引力<sup>[6]</sup>。共价相互作用形成的化学键不同,非共价相互作用因不涉及共用电子对,故结合能力较弱且反应可逆<sup>[7]</sup>。众所周知,蛋白质和多酚对人体健康有诸多益处,它们之间的相互作用会影响蛋白质的结构,食品中多酚的抗氧化能力以及生物利用度等<sup>[8-9]</sup>。

(-)-表儿茶素(Epicatechin, EC)作为黄烷醇类的一种,是一种单体酚类化合物(图1),广泛存在于绿茶、红酒、可可制品和许多水果(黑莓、樱桃、苹果、桃、黑葡萄)中<sup>[10]</sup>。研究表明(-)-表儿茶素具有抗氧化,预防心血管疾病,改善糖尿病和抗癌等多种生理活性<sup>[11]</sup>。植物铁蛋白是一种铁储存和解毒蛋白,在铁代谢中起至关重要的作用。植物铁蛋白可以螯合细胞吸收多余的铁,并在缺铁时释放储存的铁以满足细胞的代谢需要<sup>[12]</sup>。铁蛋白有24个亚基,呈八面体对称排列,形成一个中空的蛋白质外壳(内径7~8nm,外径12~13nm)。铁蛋白内腔中最多可储存4500个 $\text{Fe}^{3+}$ 原子(图2)<sup>[13]</sup>。在豆类种子中,90%以上的铁以铁蛋白的形式储存<sup>[14]</sup>。因此,植物铁蛋白,特别是来自豆类的植物铁蛋白,被认为是膳食铁的一种新的替代来源<sup>[15]</sup>。另外,有文献报道,去除铁后,全铁蛋白变成去铁铁蛋白<sup>[13]</sup>。去铁铁蛋白可用于包埋生物活性分子,如 $\beta$ -胡萝卜素和姜黄素,可以提高其水溶性和热稳定性<sup>[15-18]</sup>。然而,铁蛋白在胃肠道中不稳定。探寻一种通过与蛋白质相互作用而减缓植物铁蛋白被蛋白酶降解的复合物具有重要的研究意义。

鉴于表儿茶素常与铁蛋白共存于植物性食物中,且表儿茶素具有很强的抗氧化活性,研究这两

收稿日期: 2022-04-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(32102049);山东省高等学校青年人才引育计划项目

第一作者: 刘玉茜,女,博士,副教授

通信作者: 陈义伦 E-mail: cylun196605@163.com

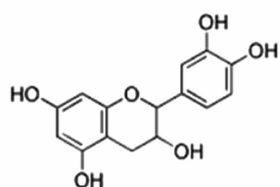


图 1 (-)-表儿茶素的化学结构图

Fig.1 Chemical structure of (-)-epicatechin

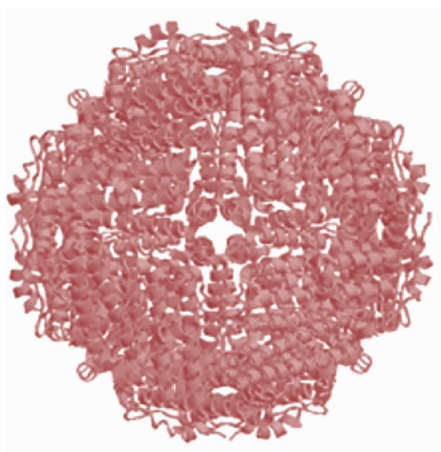


图 2 铁蛋白的晶体结构,沿蛋白外壳的 4 倍轴(通道)观察

Fig.2 Crystal structure of ferritin with views down the 4-fold axes (channels) of the protein shell

种分子的相互作用具有重要意义。目前虽有关于蛋白质-多酚非共价结合的研究报道,但鲜有使用表儿茶素-去铁红小豆铁蛋白作为相互作用的模型。本研究系统研究表儿茶素与去铁红小豆铁蛋白的相互作用,特别是对其非共价复合物(FEC)的功能特性进行表征,评估非共价相互作用对蛋白质结构、消化特性和对多酚抗氧化活性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

红小豆,中国北京超市。表儿茶素,国药集团化学试剂有限公司;电泳蛋白质 Marker、甘氨酸、福林酚、溴酚蓝、SDS、Tris、考马斯亮蓝等均购自北京索莱宝生物科技有限公司,其它试剂均为分析纯级。

### 1.2 主要仪器与设备

电泳槽 VE180,天能公司;荧光分光光度计 Cary Eclipse,美国安捷伦公司;紫外分光光度计,

美国安捷伦公司;透射电子显微镜,日本 Hitachi 公司;圆二光谱仪 MOS-450,法国 Biologic 公司;高速冷冻离心机,湖南湘仪仪器有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 去铁红小豆铁蛋白(apoRBF)的制备和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)表征 红小豆铁蛋白(RBF)的提取和去铁红小豆铁蛋白的制备参照文献[19]的方法。SDS-PAGE 在 15%SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行。采用 Lowry 法测定铁蛋白的浓度<sup>[13]</sup>。

1.3.2 圆二色谱分析 圆二色谱分析扫描速率为 60 nm/min,分辨率 1 nm,重复扫描 3 次。数据结果表示为平均残余椭圆度( $\theta$ ),单位为 degrees cm<sup>2</sup>/dmol。表儿茶素引起的蛋白质椭圆度的变化定义为在相同试验条件下混合物的椭圆度减去单独表儿茶素的椭圆度。

1.3.3 荧光光谱分析 通过向 1.0 mL 1.0  $\mu$ mol/L 铁蛋白(pH 6.8)中添加 0~150  $\mu$ L 表儿茶素溶液(12 mmol/L),得到不同物质的量比的铁蛋白/表儿茶素混合液,随后,在 25  $^{\circ}$ C 下反应 10 min 测定荧光强度。荧光参数激发波长为 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,根据文献[20]和[21]报道的方法,将数据拟合到方程式(1)中,计算表儿茶素与铁蛋白的结合常数和结合位点数。

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

式中, $n$ ——结合位点数; $K$ ——结合常数。 $[P]_0$ ——蛋白质浓度( $\mu$ mol/L); $[EC]_0$ ——表儿茶素浓度(mmol/L);当结合位点完全饱和时, $I_0$ 是在没有 EC 时蛋白质的相对荧光强度, $I_{\infty}$ 是存在 EC 时蛋白质的相对荧光强度。

1.3.4 透射电子显微镜分析 将去铁红小豆铁蛋白和铁蛋白-表儿茶素复合物(FEC)的液体样品用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 6.8)稀释,然后将样品放在碳涂层铜格栅上。用 2%醋酸铀酰染色 5 min,用透射电子显微镜在 80 kV 下观察。

1.3.5 动态光散射分析 使用动态光散射仪测量

溶液中蛋白的流体力学半径  $RH$  及尺寸分布。样品水合半径使用正则化直方图方法和球体模型,根据已知球蛋白的标准曲线进行估算<sup>[22]</sup>。利用 Omni-SIZE 2.0 软件计算 apoRBF 和 FEC 样品的粒径分布。

**1.3.6 表儿茶素与铁蛋白的体外结合** 为了证实表儿茶素与铁蛋白能够发生非共价结合,将 apoRBF 和表儿茶素以 1:40 ( $m/m$ ) 的比例溶解在 20 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) 中。将混合物在 10 °C 和 40 °C 下搅拌 30 min,然后透析去除过量或未结合的表儿茶素。测定表儿茶素释放曲线,分析表儿茶素结合铁蛋白的能力,并以游离的表儿茶素作对照。

**1.3.7 模拟胃肠液条件下复合物 FEC 中表儿茶素的稳定性** 为研究与铁蛋白非共价结合的表儿茶素在胃肠道中的稳定性,根据 Yang 等<sup>[23]</sup>报道的方法模拟胃液和肠液的消化条件,并略作修改。胃液 (pH 2):100 mmol/L KCl-HCl 缓冲溶液+30 mmol/L NaCl+3.2 mg/mL 胃蛋白酶。肠液 (pH 7.5):100 mmol/L  $KH_2PO_4$ -NaOH 缓冲溶液+10 mg/mL 胰蛋白酶。在酶水解过程中,分别在 0,10,20,30,60,120 min 收集样品,并在  $\lambda=280$  nm 处用紫外分光光度计测定吸光度。通过测定表儿茶素释放曲线分析复合物的消化稳定性,并以游离的表儿茶素作为模拟胃液和肠液消化过程的对照。

**1.3.8 抗氧化能力** 使用市售的总抗氧化能力 (ABTS 法) 测定试剂盒 (南京建城生物工程研究所),根据操作说明书测定铁蛋白、表儿茶素以及复合物 FEC 不同样品的抗氧化能力。

#### 1.4 统计分析

所有试验均重复 3 次,数据以“平均值 $\pm$ 标准偏差 (SD)”表示。采用 Student's *t* 检验确定两组样本间的差异,显著性水平为  $P<0.05$ 。采用单因素方差分析 (ANOVA) 和邓肯多范围检验多组样本间的差异,显著性水平为  $P<0.05$ 。统计分析均采用 SPSS 13.0 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 apoRBF 的制备表征

如图 3 所示,SDS-PAGE 显示得到的 apoRBF 由一个分子质量为 28.0 ku 的亚基组成,与文献

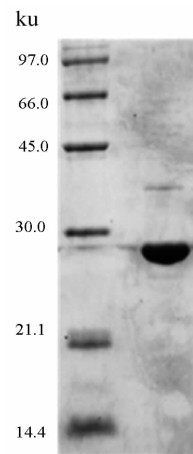


图 3 apoRBF 的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analyses of apoRBF

[24]报道的一致,表明制备成功,满足后续试验需求。

### 2.2 铁蛋白-表儿茶素 (FEC) 复合物的圆二色谱分析

远紫外圆二色谱的变化反映蛋白质二级结构的变化<sup>[25]</sup>。如图 4 和表 1 所示,apoRBF 在圆二光谱中 208 nm 和 222 nm 处具有两个负椭圆率, $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规卷曲含量分别为 41.3%, 21.2% 和 37.5%,与文献[24]报道的 apoRBF 二级结构非常吻合。当加入表儿茶素时,蛋白质的圆二色谱几乎没有变化,说明表儿茶素对蛋白质的二级结构影响不大 (图 4)。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处理后,脱铁铁蛋白的二级结构没有发生变化,本结论与文献[22]和[23]报道一致。

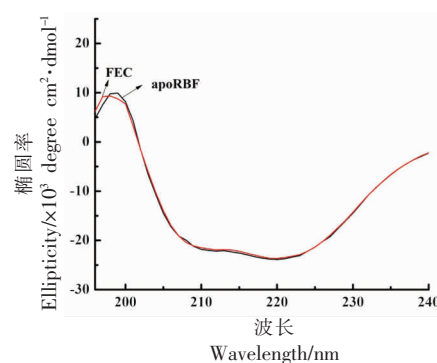


图 4 存在和不存在 ECs 的情况下 apoRBF 的圆二光谱图

Fig.4 CD spectra of apoRBF in the presence and absence of ECs

表 1 红小豆去铁铁蛋白和 FEC 复合物二级结构含量组成表

Table 1 Estimated secondary structural fractions of apoRBF and FEC (apoRBF/EC = 1:40, *m/m*)

| 二级结构组成         | 红小豆去铁铁蛋白       | FEC 复合物        |
|----------------|----------------|----------------|
| $\alpha$ -螺旋/% | 40.2 $\pm$ 1.9 | 41.3 $\pm$ 1.5 |
| $\beta$ -折叠/%  | 23.3 $\pm$ 1.2 | 21.2 $\pm$ 2.1 |
| 无规则卷曲/%        | 36.8 $\pm$ 2.0 | 37.5 $\pm$ 1.6 |

### 2.3 EC 与 apoRBF 相互作用的荧光光谱分析

由于蛋白质内源荧光对极性微环境非常敏感,因此荧光被广泛应用于检测蛋白质三级结构的变化<sup>[6]</sup>。在不同浓度的表儿茶素(20 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8)加入前、后,apoRBF 的荧光光谱如图 5 所示。当激发波长为 290 nm 时,apoRBF 在波长 330 nm 处显示出最高的相对荧光强度,即铁蛋白中色氨酸的荧光特征发射峰,表明荧光主要

来源于色氨酸残基<sup>[25-27]</sup>,而单独的表儿茶素在激发波长为 290 nm 时没有荧光(未显示)。随着表儿茶素浓度的增加(物质的量比为 10:1~170:1),apoRBF 的荧光强度逐渐减弱,表明加入表儿茶素改变了色氨酸周围的微环境(图 5a),表儿茶素和 apoRBF 间存在相互作用,从而改变了 apoRBF 的三级/四级结构<sup>[22]</sup>。

为了进一步阐明相互作用机制,根据式(1)分析荧光猝灭数据,计算得出结合常数  $K=3.65 \times 10^4$  mol/L,结合位点数  $n=98.5$ ,表明约有 98.5 个表儿茶素分子与铁蛋白分子结合(物质的量比)(图 5b)。该结合常数与文献报道的茶多酚分别与  $\beta$ -乳球蛋白和铁蛋白结合程度相当,推测 EC 与 apoRBF 的结合涉及氢键和范德华力等弱键<sup>[28]</sup>。此外,表儿茶素中的 -OH 基团与铁蛋白中的氨基酸之间的相互作用引起蛋白的构象变化<sup>[29]</sup>。

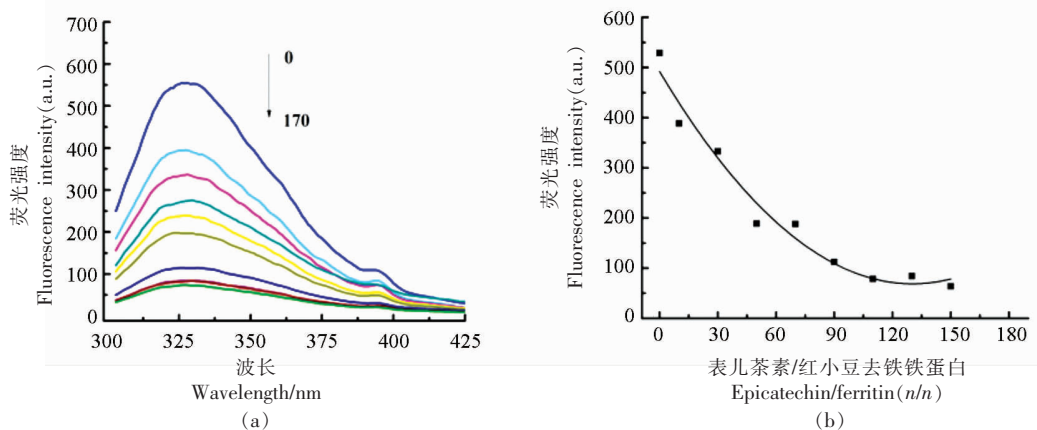


图 5 用不同浓度 ECs 处理的 apoRBF 和 apoRBF 的荧光光谱(a)和根据方程(1)对应的荧光强度拟合曲线(b)

Fig.5 Fluorescence spectra of apoRBF and apoRBF treated with ECs at different concentrations (a), and the corresponding fitting curves of fluorescence intensity according to Eq. (1) (b)

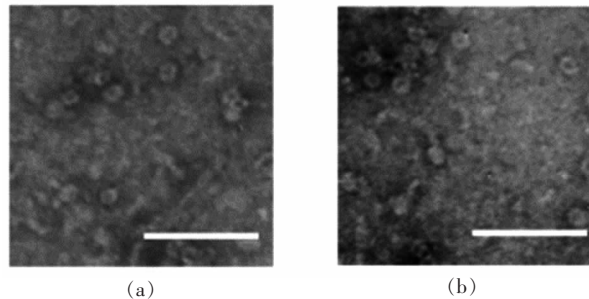
### 2.4 形态和粒径分析

使用透射电子显微镜观察铁蛋白颗粒的形态。如图 6a 所示,大多数 apoRBF 颗粒是单分散的,典型的直径约 7.52 nm。向铁蛋白中加入表儿茶素后,大多数颗粒没有聚合到一起,而是像单独铁蛋白一样均匀分散(图 6b)。说明表儿茶素的加入对铁蛋白的形态没有显著影响。研究证实,表儿茶素虽可与铁蛋白结合,但在此试验条件下不能诱导铁蛋白的聚合。

此外,利用动态光散射来测定溶液中 apoRBF 和复合物 FEC 的流体动力学半径(RH),通过 RH 的变化,可以反映蛋白分子与其它物质的相互作用。如图 7a 所示,apoRBF 的 RH 为 7.52 nm,与文献[24]的报道一致。与铁蛋白的典型粒径类似,复合物 FEC 的 RH 主要分布于 7.61 nm 处(图 7a),总量的 78.5%。该数据表明 FECs 的聚合程度很低,与透射电子显微镜的观察结果一致。然而,这一结果与文献[22]和[26]报道的单宁酸或 EGCG 与

植物铁蛋白的非共价结合观察结果不同,后者在很大程度上可以诱导铁蛋白的聚合,可能的原因是一个单宁酸或 EGCG 分子通过氢键将 2 个或多

个蛋白质分子连接在一起,这两种物质所含的羟基比表儿茶素多<sup>[18]</sup>。具体作用机制有待研究。



(a) (b)  
注:样品经 2%醋酸双氧铀负染。

图 6 不存在(a)和存在(b)EC的情况下 apoRBF的透射电子显微照片

Fig.6 Transmission electron micrographs of apoRBF in the absence (a) and presence (b) of EC

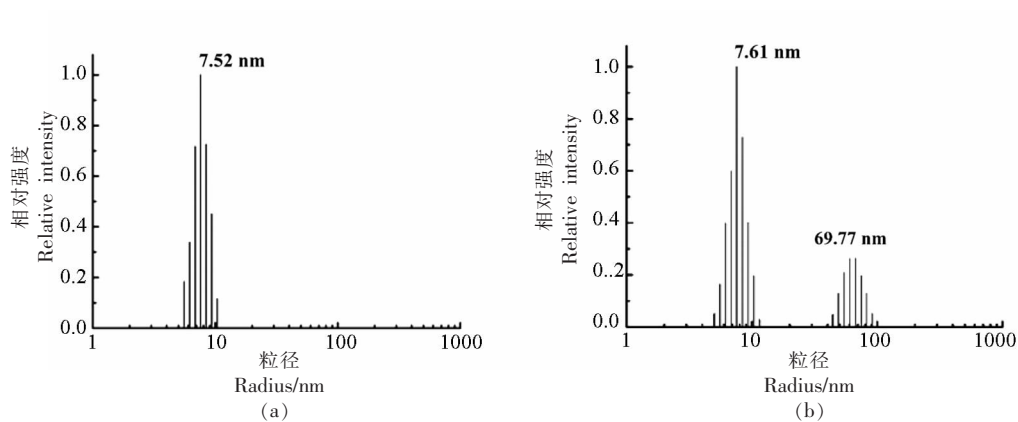


图 7 0.5  $\mu\text{mol/L}$  apoRBF(a)和 0.5  $\mu\text{mol/L}$  apoRBF 在 EC(b)存在下的相对散射光强度分布曲线(apoRBF/EC, 1:40)

Fig.7 Relative scattered light intensity distribution curves for 0.5  $\mu\text{mol/L}$  apoRBF (a) and 0.5  $\mu\text{mol/L}$  apoRBF in presence of EC (b) (apoRBF/EC, 1:40)

## 2.5 表儿茶素与 apoRBF 的结合

为了证实小分子表儿茶素可与 apoRBF 结合,做透析试验。透析过程中,未结合的表儿茶素分子穿过透析膜扩散到溶液中,而结合的分子留在透析膜内。如图 8 所示,在 4  $^{\circ}\text{C}$ (图 8a)和 40  $^{\circ}\text{C}$ (图 8b)下测定从 FEC 中释放的表儿茶素的量,并与游离表儿茶素分子进行对比。在 4  $^{\circ}\text{C}$ 和 40  $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下透析 12 h,FEC 中表儿茶素的释放率均低于游离表儿茶素分子的释放率。然而,FEC 在 40  $^{\circ}\text{C}$ 处理 12 h 后表儿茶素的释放率为 45.9%(图 8b),显著高于 4  $^{\circ}\text{C}$ 处理的释放率 29.1%(图 8a)。此外,游离的表儿茶素在 4  $^{\circ}\text{C}$ 时的释放率低于 40  $^{\circ}\text{C}$ 时的释放率,这可能是由于高温条件下分子运

动更为活跃。这些结果表明表儿茶素分子可与 apoRBF 结合,且低温更有利于表儿茶素与蛋白质的结合。

## 2.6 表儿茶素对铁蛋白消化稳定性的影响

以游离表儿茶素为对照,研究 FEC 中表儿茶素在胃肠道中的释放特性。如图 9a 所示,游离表儿茶素经模拟胃液处理后,在 20 min 内表现出爆发性释放,释放率达 71.4%。然而,FEC 中表儿茶素的释放率较低,20 min 时释放率仅 36.2%。孵育 2 h 后,游离表儿茶素的释放率为 72.3%,而 FEC 中表儿茶素的释放率为 68.6%。FEC 在相同时间范围减缓表儿茶素释放速率的原因可能是表儿茶素与铁蛋白通过弱键的非共价结合。

在模拟肠液中(图 9b),游离表儿茶素分子在 10 min 内表现出快速释放过程,释放率达 51.1%,随后持续下降。造成这种现象的原因是表儿茶素在弱碱性环境(pH 7.5 左右)下会发生降解<sup>[24]</sup>,可能导致表儿茶素的结构损伤。相比之下,FEC 中的表儿茶素在模拟肠道条件下表现出相对较慢和持续的释放过程,2 h 后的释放率约 32.2%。结合模

拟胃液中的结果,推断多酚-蛋白质复合的非共价驱动力可显著延缓表儿茶素的释放。此外,FECs 中表儿茶素经胃液处理的释放率明显快于经肠液处理的释放率,这可能是由于肠液处理过程中多酚在弱碱性条件(pH 7.5)下性质不稳定,导致降解损失<sup>[30-31]</sup>。其作用机制需进一步研究。

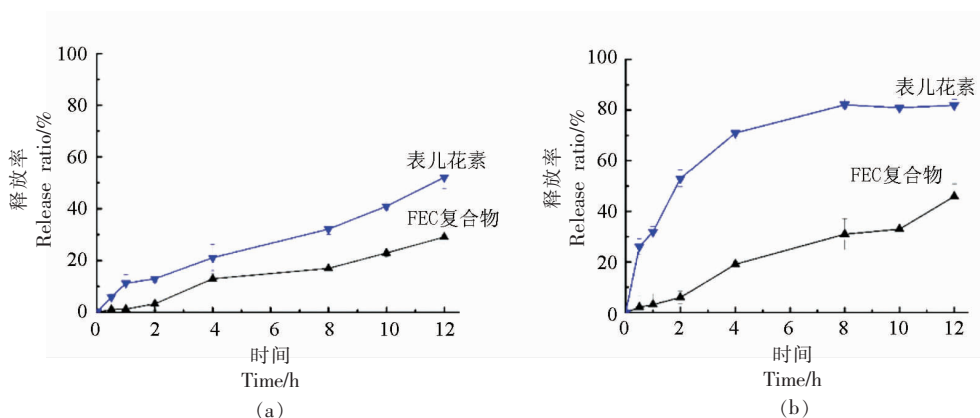


图 8 4 °C(a)和 40 °C(b)暗处透析时游离 EC 和 FEC 中 EC 的释放曲线

Fig.8 The release curves of free EC and EC in FEC during dialysis at 4 °C (a) and 40 °C (b) in the dark

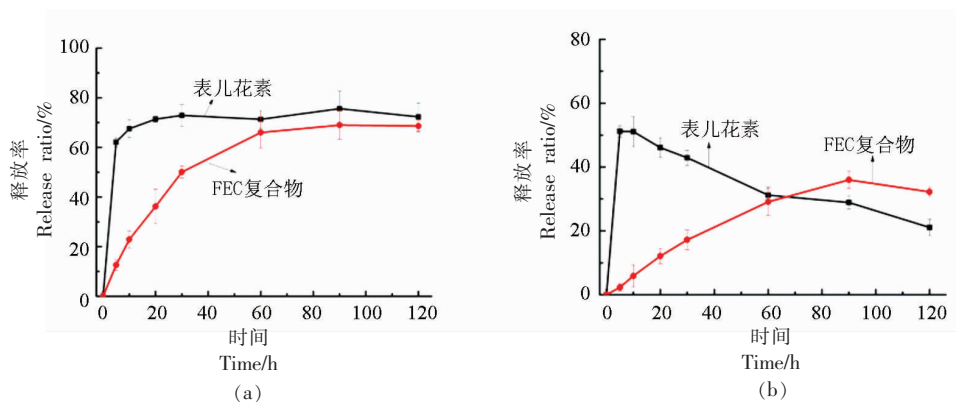


图 9 在模拟胃液(a)和肠液(b)条件下,孵育 2 h 后 FEC 中游离 EC 和 EC 的体外释放率

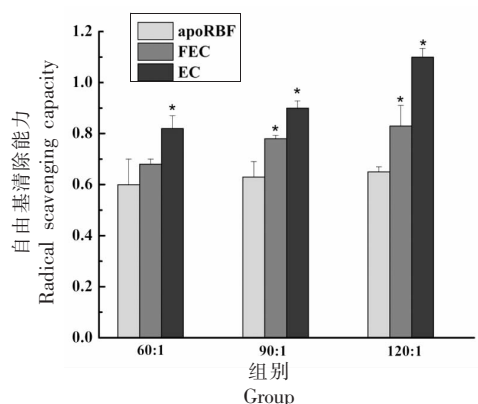
Fig.9 *In vitro* release ratio of free EC and EC in FECs in (a) simulate gastric and (b) intestinal fluids conditions over 2 h of incubation

## 2.7 非共价结合对表儿茶素抗氧化活性的影响

表儿茶素作为一种抗氧化剂,在体外具有很强的自由基清除能力。为了评估铁蛋白是否影响表儿茶素的抗氧化活性,做 ABTS<sup>+</sup>·自由基清除试验。图 10 显示 FEC 的自由基清除活性显著高于单独的铁蛋白( $P < 0.05$ )。当多酚与蛋白质结合后,与苯环相连的游离羟基可以发挥抗氧化功能<sup>[16,32]</sup>,使多酚-蛋白质系统能够清除自由基。值

得注意的是,FEC 的自由基清除能力随表儿茶素浓度的增加而增大。

然而,当物质的量比为 60:1~120:1(表儿茶素/铁蛋白)时,FEC 的自由基清除能力显著低于单独的表儿茶素( $P < 0.05$ )。研究表明,多酚的抗氧化活性与其羟基密切相关<sup>[33-35]</sup>。FEC 中的一些羟基与蛋白质结合后可能被掩盖,导致 FEC 抗氧化活性降低<sup>[1]</sup>。



注:每列代表 ABTS<sup>+</sup>·自由基清除率和标准偏差的平均值,数值是“平均值±标准差”(n=3),\*, P<0.05。

图 10 apoRBF、FEC 和游离 EC 的 ABTS<sup>+</sup>·自由基清除能力

Fig.10 ABTS<sup>+</sup>· radical-scavenging ability of apoRBF, FEC, and free EC

### 3 结论

本文评估了表儿茶素与 apoRBF 的结合特性。表儿茶素降低了铁蛋白的荧光强度,且对铁蛋白的三级/四级结构有影响。表儿茶素与 apoRBF 结合主要依靠氢键和范德华力等弱键,透析不能从 apoRBF 中去除结合的表儿茶素分子。表儿茶素和铁蛋白间的相互作用不影响铁蛋白的一级和二级结构。此外,体外消化试验表明铁蛋白可以延长表儿茶素在胃肠道中的释放。FEC 的抗氧化活性虽被保留,但低于游离 ECs。

### 参 考 文 献

- [1] 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, 2016, 49(1): 44–50.
- [2] SUI X N, SUN H B, QI B K, et al. Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: Focus on covalent and non-covalent interactions[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 871–878.
- [3] CAO Y, XIONG Y L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2015, 180: 235–243.
- [4] 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.
- [5] WEI Z H, YANG W, FAN R, et al. Evaluation of structural and functional properties of protein-EGCG complexes and their ability of stabilizing a model  $\beta$ -carotene emulsion[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 45: 337–350.
- [6] 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.
- [7] NAGY K, COURTET COMPONDU M C, WILLIAMSON G, et al. Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence[J]. Food Chemistry, 2012, 132: 1333–1339.
- [8] OZDAL T, CAPANOGLU E, ALTAY F L. A review on protein-phenolic interactions and associated changes[J]. Food Research International, 2013, 51 (2): 954–970.
- [9] 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.
- [10] MARTÍNEZ V, UGARTONDO V, VINARDELL M P, et al. Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60 (16): 4090–4095.
- [11] NUCARA A, MASELLI P, GILIBERTI V, et al. Epicatechin-induced conformational changes in  $\beta$ -lactoglobulin B monitored by FT-IR spectroscopy[J]. SpringerPlus, 2013, 2(1): 661.
- [12] ZHAO G H. Phytoferritin and its implications for human health and nutrition[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2010, 1800 (8): 815–823.
- [13] 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(1): 252–261.
- [14] THEIL E C. Iron, ferritin, and nutrition[J]. Annual

- Review of Nutrition, 2004, 24(1): 327-343.
- [15] LÖNNERDAL B. Soybean ferritin: Implications for iron status of vegetarians [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2009, 89(5): 1680S-1685S.
- [16] CHEN L L, BAI G L, YANG R, et al. Encapsulation of  $\beta$ -carotene within ferritin nanocages greatly increases its water-solubility and thermal stability[J]. Food Chemistry, 2014, 149: 307-312.
- [17] CHEN L L, BAI G L, YANG S P, et al. Encapsulation of curcumin in recombinant human H-chain ferritin increases its water-solubility and stability[J]. Food Research International, 2014, 62(8): 1147-1153.
- [18] 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.
- [19] LI M L, YUN S J, YANG X L, et al. Stability and iron oxidation properties of a novel homopolymeric plant ferritin from adzuki bean seeds: A comparative analysis with recombinant soybean seed H-1 chain ferritin[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2013, 1830(4): 2946-2953.
- [20] LV C Y, BAI Y F, YANG S P, 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(4): 3851-3858.
- [21] XU H X, ZHANG T T, LU Y Q, et al. Effect of chlorogenic acid covalent conjugation on the allergenicity, digestibility and functional properties of whey protein[J]. Food Chemistry, 2019, 298: 125024.
- [22] 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(2): 410-415.
- [23] YANG R, LIU M Y, LIU Y Q, et al. The structure and stability analysis of the pea seed legumin glycosylated by oligochitosan[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 101(3): 1065-1075.
- [24] YANG R, LIU Y Q, MENG D M, et al. Urea-driven epigallocatechin gallate (EGCG) permeation into the ferritin cage, an innovative method for fabrication of protein-polyphenol co-assemblies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(7): 1410-1419.
- [25] ZAMORANO L S, PINA D G, GAVILANES F, et al. Two-state irreversible thermal denaturation of anionic peanut (*Arachis hypogaea* L.) peroxidase[J]. Thermochimica Acta, 2004, 417(1): 67-73.
- [26] 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(1): 33-38.
- [27] YANG R, GAO Y J, ZHOU Z K, et al. Fabrication and characterization of ferritin-chitosan-lutein shell-core nanocomposites and lutein stability and release evaluation *in vitro*[J]. RSC Advances, 2016, 6: 35267-35279.
- [28] 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 Z K, XU J J, LIU Y X, et al. Interaction between ferritin and procyanidins and stability of procyanidins[J]. Food Science, 2017, 38(13): 34-40.
- [29] XUE J, TAN C, ZHANG X, et al. Fabrication of epigallocatechin-3-gallate nanocarrier based on glycosylated casein: Stability and interaction mechanism [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(20): 4677-4684.
- [30] SHPIGELMAN A, ISRAELI G, LIVNEY Y D. Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: Beta lactoglobulin-based nano-complexes as protective nanovehicles for EGCG[J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(8): 735-743.
- [31] ISIK N, ALTEHELD B, KUHN S, et al. Polyphenol release from protein and polysaccharide embedded plant extracts during *in vitro* digestion[J]. Food Research International, 2014, 65(A): 109-114.
- [32] ALMAJANO M P, DELGADO M E, GORDON M H. Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate [J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 126-130.
- [33] 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(2): 607-612.
- [34] RAWEL H M, RANTERS H, ROHN S, et al. Assessment of the reactivity of selected isoflavones a-



- gainst proteins in comparison to quercetin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(16): 5263–5271.
- [35] 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 Z K, LIU Y Q, YANG R. Study on characteristics of ferritin polymerization induced by grape seed proanthocyanidins [J]. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 2017, 32(4): 9–14.

## Non-covalent Complexation and Functional Evaluation of (–)-Epicatechin and Phytoferritin

Liu Yuqian<sup>1</sup>, Zhang Fengjiao<sup>1</sup>, Cheng Lei<sup>2</sup>, Chen Yilun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong

<sup>2</sup>Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

**Abstract** In this study, the non-covalent complexation between EC and apoRBF, and the effects on the structural and functional properties of proteins were investigated using a combination of fluorescence, circular dichroism (CD) spectra, transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS). The fluorescence results showed that EC did not change the characteristic emission peak of apoRBF at 330 nm, and the fluorescence intensity of apoRBF decreased with an increase in EC concentration, suggesting EC interacts with apoRBF, causing changes in the tertiary/quaternary structure of the protein, while having no effect on its primary and secondary structure. The fluorescence fitting results showed the binding constant  $K$  and the number of binding sites  $n$  between EC and apoRBF were  $3.65 \times 10^4$  mol/L and 98.5, respectively. After dialysis at 4 °C and 40 °C for 12 h, the release rates of EC in FEC were 29.1% and 45.9%, respectively, which were lower than those of free EC, indicating that ECs bond to apoRBF, and lower temperature was more conducive to the binding of EC molecules and proteins. After incubation with simulated gastrointestinal fluid for 2 hours, the release rates of EC in FEC were 68.6% and 32.2%, respectively. Compared with the release rate of free EC, it showed a relatively slow and sustained release process, indicating the binding of EC to apoRBF can significantly inhibit the degradation of apoRBF by the protease(s) in simulated gastrointestinal fluid. Additionally, the antioxidant ability of EC in ferritin-EC complex (FEC) was retained but slightly decreased. This study clarified the interaction mechanism between polyphenols and phytoferritin, providing the theoretical reference for the application of non-covalent complexes between (–)-epicatechin and phytoferritin.

**Keywords** phytoferritin; (–)-epicatechin; ferritin-epicatechin complex; sustained release; antioxidant ability