陈阳, 李劲松, 裴国民, 等. 儿茶素类化合物调控乳清蛋白消化特性与消化产物研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(7): 83−92. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030129

CHEN Yang, LI Jinsong, PEI Guomin, et al. Regulation of Whey Protein Digestion Properties and Digestion Products by Catechins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(7): 83−92. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030129

· 研究与探讨 ·

儿茶素类化合物调控乳清蛋白消化特性与消化产物研究

陈　阳[1,2], 李劲松[3], 裴国民[3], 易湘洲[1,*]

（1.海南热带海洋学院食品科学与工程学院, 海南三亚 572022;
2.海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228;
3.海南自由贸易港健康医学研究院, 海南保亭 572300）

摘　要: 为探究不同结构儿茶素类化合物与乳清蛋白的结合差异及其对乳清蛋白消化特性的影响，本研究选取了四种结构不同的儿茶素类化合物，通过分子对接、相互作用力、基团含量和理化性质分析确定相互作用强度。进一步通过体外消化模型分析儿茶素类化合物结构对复合物消化特性和消化产物的影响。研究结果表明，羟基和没食子酰基的增加可提高儿茶素类化合物与乳清蛋白的相互作用强度，表没食子儿茶素没食子酸酯与乳清蛋白的相互作用最强，其结合率为 90.56%。儿茶素类化合物通过增强氢键和疏水相互作用，使乳清蛋白结构展开，内部基团暴露，促进形成了粒径较小的复合物。复合物的消化特性与儿茶素类化合物的结构密切相关。随着没食子酰基和羟基数量的增加，由于乳清蛋白结构的展开和粒径的减小，复合物表现出更高的消化率和水解度，同时消化产物中含有更高比例的小肽，其中表没食子儿茶素没食子酸酯-乳清蛋白复合物的消化产物中分子量<1000 Da 的小肽比例为 43.4%。抗氧化活性分析也表明，小肽的产生提高了消化产物的抗氧化活性。因此，更多羟基和没食子酰基的儿茶素类化合物能够与乳清蛋白产生更强的相互作用并促进其消化。本研究能为乳基茶饮的开发和复杂食品的消化过程提供理论指导。

关键词: 儿茶素, 乳清蛋白, 非共价键, 疏水基团, 消化特性, 抗氧化活性

中图分类号: TS272.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)07−0083−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030129

本文网刊:

Regulation of Whey Protein Digestion Properties and Digestion Products by Catechins

CHEN Yang[1,2], LI Jinsong[3], PEI Guomin[3], YI Xiangzhou[1,*]

（1.College of Food Science and Technology, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China;
2.School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China;
3.Hainan Free Trade Port Institute of Health Medicine, Baoting 572300, China）

Abstract: This study aimed to investigate the differential binding affinities of various catechins to whey proteins and their subsequent impact effects on the proteins' digestive properties by selecting four catechins with distinct structural characteristics. The strengths of these interactions were evaluated using molecular docking, interaction force analysis, group content evaluation, and physicochemical property assessment. Additionally, the influence of catechin structures on the digestive properties and digestion products of the complexes was examined using an *in vitro* digestion model. The results demonstrated that an increase in hydroxyl and galloyl groups enhanced the interaction strength between catechins and whey proteins. Notably, epigallocatechin gallate exhibited the strongest interaction, achieving a binding rate of 90.56%. The

收稿日期: 2025−03−13

基金项目: 海南省重点研发项目（ZDYF2024XDNY277）; 广东省水产品加工与安全重点实验室开放基金课题（GDPKLAPPS2405）。

作者简介: 陈阳（1995−）, 女, 博士研究生, 研究方向: 热带特色蛋白加工, E-mail: ccheny1995@163.com。

*** 通信作者:** 易湘洲（1995−）, 男, 博士研究生, 研究方向: 水产品加工及贮藏, E-mail: yixiangzhou@hntou.edu.cn。

catechins induced unfolding of the whey protein structure, exposing internal groups through the enhancement of hydrogen bonding and hydrophobic interactions, thereby facilitating the formation of complexes with reduced particle sizes. The digestive properties of these complexes were closely associated with the structural attributes of the catechins. As the number of galloyl and hydroxyl groups increased, the complexes exhibited improved digestibility and hydrolysis. This enhancement was attributed to the unfolding of the whey protein structure and a reduction in particle size. Consequently, the digested products contained a higher proportion of small peptides, with the proportion of peptides having molecular weights less than 1000 Da in the digested product of the epigallocatechin gallate-whey protein complex reaching 43.4%. Antioxidant activity analysis further indicated that the generation of small peptides enhanced the antioxidant activity of the digestion products. Therefore, catechins with a greater number of hydroxyl and galloyl groups facilitated stronger interactions with whey proteins, thereby promoting their digestion. This study provides theoretical insights for the development of milk-based tea beverages and the digestion processes of complex foods.

Key words: catechin; whey protein; non-covalent bonding; hydrophobic group; digestive properties; antioxidant activity

茶饮作为全球消费量第二大的饮品(仅次于水),其消费群体已覆盖全球 30 亿人口,日消耗量达 180~200 亿杯。根据市场预测,至 2025 年全球茶叶消费量将攀升至 740 万吨,市场估值超过 3180 亿美元[1]。这种跨越文化的饮品偏好不仅源于茶叶独特的风味特征,更与其丰富的生物活性物质密切相关。茶多酚作为茶叶的核心功能成分,占干物质总量的 18%~36%,其中以表儿茶素类化合物,表儿茶素(epicatechin, EC)、表儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, ECG)、表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)和表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)最具生物活性[2−3]。这类儿茶素类化合物可通过清除自由基、螯合金属离子等机制,展现出显著的抗氧化、抗炎及代谢调节功能,其摄入量与心血管疾病、Ⅱ型糖尿病等慢性病的发病率呈显著负相关[4−6]。

现代饮食文化中普遍存在的“茶乳共饮”现象引发了学界对多酚-蛋白质相互作用的关注。消费者在茶饮中添加乳制品的习惯不仅通过分子间相互作用改善茶汤的感官特性,更重要的是形成的复合体系可能通过界面效应显著改变营养物质的递送效率[7]。乳清蛋白(whey protein isolate, WPI)作为乳清中的主要功能组分(占乳清蛋白总量的 20%),其核心组分 α-乳白蛋白(α-lactalbumin, α-LA)和 β-乳球蛋白(β-lactoglobulin, β-LG)具有独特的结构特征[8−9]。β-LG 通过 8 条反平行 β-折叠构成疏水空腔[10],而 α-LA 在钙结合域聚集大量带电残基[11],这些拓扑结构特征使其成为多酚分子特异性结合的潜在靶点。

近年研究揭示,多酚-蛋白质相互作用存在显著的结构依赖性。以 EGCG 为例,其特有的三个相邻酚羟基和没食子酰基可形成多点结合模式,相较其他儿茶素具有更强的蛋白结合能力[12]。这种分子间作用不仅诱导蛋白质构象重排,还可能通过空间位阻效应改变酶切位点的可及性,进而调控消化进程[13]。然而现有研究存在三个关键局限:其一多聚焦于单一多酚组分,缺乏对儿茶素结构差异(羟基数目、没食子酰化程度)的系统性比较;其二对复合体系消化产物的抗氧化活性动态变化机制阐释不足;其三关于多酚结合对 WPI 二硫键网络、游离氨基等结构参数的影响尚不明确。

因此,本研究探讨了 WPI 与儿茶素类化合物之间的结合行为差异及其对蛋白质的消化特性的影响。通过分子对接模拟与实验验证相结合的策略,系统解析 EGCG、ECG、EGC、EC 四种特征儿茶素与 WPI 的结合模式差异,定量表征不同结构多酚对 WPI 巯基/氨基暴露、粒径电位及多酚结合率的影响规律。进一步通过体外动态消化模型,阐明多酚结合对 WPI 水解度、多肽释放及消化产物抗氧化活性的调控机制。通过多尺度表征揭示儿茶素没食子酰化程度与羟基分布对 WPI 消化特性的构效关系,旨在为乳基茶饮的开发提供理论依据与设计策略。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

WPI(80%)、尿素(98%)、二硫苏糖醇(98%)、没食子酸(99%)、邻苯二甲醛(98%)、四硼酸钠(99%)、L-亮氨酸(99%)、1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(98%)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)(98%)、亚铁氰化钾(99%) 上海源叶生物科技有限公司;EC(99%)、ECG(99%)、EGC(99%)、EGCG(99%)、磷酸二氢钠(99%)、磷酸氢二钠(99%)、十二烷基硫酸钠(99%)、Tris-Glycine-SDS 缓冲液、三氯乙酸(98%)、氯化钙(99%)、盐酸(37%)、氯化钠(99%)、氢氧化钠(99%)、碳酸钠(98%)、福林酚试剂、无水乙醇(99%)、细胞色素 C(95%)、过硫酸钾(98%) 上海阿拉丁试剂有限公司;胃蛋白酶(来源于猪胃黏膜, ≥250 U/mg)、胰酶(来源于猪胰,胰脂肪酶≥16 U/mg,胰蛋白酶≥200 U/mg,胰淀粉酶≥200 U/mg)、胆盐、芽孢杆菌酶 美国 Sigma-Aldrich 公司;β-巯基乙醇(98%)、Ellman 试剂(98%)、乙腈(99%)、三氟乙酸(98%) 美国赛默飞世尔科技有限公司;二喹啉甲酸试剂盒 上海碧云天生物科技有限公司;乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(98%)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(98%) 北京沃凯生物科技有限公司。

TU-1901 紫外可见分光光度计 北京普析通用

仪器有限公司；Nano ZS-90 粒径电位仪　英国马尔文公司；ST 16R 高速冷冻离心机　美国 Sigma 公司；SHA-B 恒温震荡水浴摇床　上海力辰科技有限公司；1260 Infinity 凝胶渗透液相色谱仪　美国安捷伦科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　样品的制备　WPI、EGCG、ECG、EGC、EC 粉末在磷酸盐缓冲液中（PBS，pH6.0，0.01 mol/L）充分搅拌溶解，然后等体积混合蛋白和儿茶素类化合物以制备复合物，搅拌均匀。最终体系中蛋白质浓度为 1 mg/mL，儿茶素类化合物的浓度为 0.5 mg/mL。

1.2.2　分子对接模拟　在 RCSB 蛋白质数据库（http://www.rcsb.org/）中获得 α-LA（ID：1A4V）和 β-LG（ID：1BSY）的 3D 分子模型，在 ChemSpider 数据库（https://www.chemspider.com/）中获得 EGCG、ECG、EGC 和 EC 的分子结构。在 MOE 2019 软件中对 α-LA、β-LG 及儿茶素类化合物结构进行快速优化，分别以 α-LA 和 β-LG 作为受体，4 种儿茶素类化合物作为配体进行半柔性对接。以最低结合能的对接结果表示为最优构象，根据 2D 相互作用结果分析非共价键。

1.2.3　相互作用力的测定　相互作用力根据 Chen 等[14] 的方法进行测定。向复合物溶液中分别加入十二烷基硫酸钠（0.5%）、尿素（6 mol/L）和二硫苏糖醇（30 mmol/L）分别破坏分子间的疏水相互作用、氢键和二硫键。充分混合均匀并静置 30 min 后使用粒径电位仪测定复合物的粒径大小。根据以下公式对相互作用力进行量化：

$$\text{相互作用力}(\%) = \frac{S_1 - S_0}{S_1} \times 100 \qquad \text{式（1）}$$

式中，S_1 和 S_0 分别代表样品初始粒径和在溶剂中的粒径。

1.2.4　多酚结合程度　将复合物样品溶液用纯水透析 24 h（截留分子量 8000 Da）后，将透析液与福林酚试剂混合反应 5 min。随后，将反应液与 20% 的碳酸钠溶液混合，避光孵育 2 h 后，在 765 nm 处测定吸光度。利用没食子酸建立标准曲线，根据吸光值计算透析后溶液中多酚浓度。多酚结合程度通过以下公式计算：

$$\text{多酚结合率}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \qquad \text{式（2）}$$

式中，C_0 和 C_1 分别代表最初多酚浓度和透析后多酚浓度。

1.2.5　游离巯基和二硫键含量的测定　根据 Yin 等[15] 的方法测定游离巯基和二硫键含量。将 1 mL 的复合物样品溶液与 Tris-Glycine-SDS 缓冲液（2 mL，0.1 mg/mL）和 Ellman 试剂（0.5 mL）混合孵育 1 h，使用分光光度计在 412 nm 处测定其吸光度。游离巯基的含量根据以下公式进行计算：

$$\text{巯基含量}(\text{nmol/mg protein}) = \frac{A_{412} \times 10^6}{\varepsilon \times L \times C} \qquad \text{式（3）}$$

式中，A_{412} 为样品在 412 nm 下的吸光值，ε 为摩尔消光系数（13600 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$），L 为光程（1 cm），C 为样品中蛋白质浓度（mg/mL）。

测定二硫键含量时，将 2 mL 样品溶液与 0.1 mL β-巯基乙醇和 4.0 mL 尿素-盐酸胍溶液（1∶1，6 mol/L）的试剂混合，孵育 15 min。加入 10 mL 12%（v/v）三氯乙酸，反应 1 h 后，10000×g 离心 10 min，所得沉淀溶于 10 mL Tris-Glycine-SDS 缓冲液（0.1 mg/mL）中，加入 0.5 mL 的 Ellman 试剂，在 412 nm 下测定样品吸光度，根据公式（3）计算总巯基含量。样品中二硫键含量根据以下公式进行计算：

$$\text{二硫键含量}(\text{nmol/mg protein}) = \frac{\text{总巯基含量} - \text{游离巯基含量}}{2} \qquad \text{式（4）}$$

1.2.6　游离氨基含量的测定　根据 Chen 等[16] 的方法，采用邻苯二甲醛法测定游离氨基的含量。制备邻苯二甲醛溶液时，使用甲醇（1 mL）、四硼酸钠（0.95 g）和十二烷基硫酸钠（0.5 g）的混合物溶解邻苯二甲醛（40 mg），然后将其悬浮在 50 mL 水中。将复合物溶液稀释至 1 mg/mL，然后与邻苯二甲醛溶液（1∶0.75，v/v）混合，在黑暗条件下反应 2 min。使用分光光度计测定混合溶液在 340 nm 处的吸光度。以 L-亮氨酸制作校准曲线计算游离氨基的含量。

1.2.7　粒径和电位的测定　根据 Yi 等[17] 的方法，采用动态光散射法测定复合物的粒径。测定前样品用 PBS 缓冲液（pH6.0，0.01 mol/L）稀释至蛋白浓度为 0.1 mg/mL。将样品加入粒径池或电位槽中，排去气泡。仪器平衡时间设定为 120 s，测定重复次数为 3 次。

1.2.8　体外消化模拟　复合物在体外的消化模拟根据 INFOGEST 方法进行[18]。将蛋白质溶液（20 mL）与 15 mL 模拟胃液（simulated gastric fluid，SGF）混合。向混合溶液中加入 3.2 mL 新鲜胃蛋白酶溶液（溶于 SGF，使胃液中最终浓度为 2000 U/mL）、10 μL 氯化钙（0.3 mol/L）和蒸馏水，使体系最终体积为 40 mL，用 1 mol/L 盐酸调至 3.0。胃消化在 37 ℃、200 r/min 的振荡水浴中进行。在消化 120 min 后，煮沸 5 min 以终止胃蛋白酶作用。将剩余的消化液（20 mL）与 12.5 mL 模拟肠液（simulated intestinal fluid，SIF）、2.5 mL 含有胆盐的 SIF（胆盐最终浓度为 0.01 mol/L）和 5 mL 含有胰酶的 SIF（脂肪酶的最终活性为 200 U/mL）混合。加入去离子水和 40 μL 氯化钙（0.3 mol/L），使体系最终体积为 40 mL，用 1 mol/L 氢氧化钠调节至 pH7.0。肠消化在 37 ℃、200 r/min 的振荡水浴中进行。在消化 120 min 时，煮沸 5 min 以终止胰蛋白酶的作用。将制备好的胃和胃肠消化物储存在−80 ℃ 下以供进一步分析。

1.2.9 消化率和水解程度的测定 将消化 2 h 的胃或肠消化液与无水乙醇混合(1∶1, v/v), 在 4 ℃ 下放置 12 h, 离心(12000×g, 4 ℃, 10 min)后将沉淀物悬浮在氯化钠溶液中, 使用二喹啉甲酸试剂盒测定溶液中蛋白质含量。消化率根据以下公式计算[19]:

$$消化率(\%)=\frac{W_0-W_1}{W_0}\times 100 \quad 式(5)$$

式中, W_0 和 W_1 代表消化前、后样品的蛋白质含量。

邻苯二甲醛溶液的配制参考 1.2.6。将消化后的溶液与邻苯二甲醛溶液混合(1∶0.75, v/v), 在黑暗条件下反应 2 min 后, 在 340 nm 处测定其吸光度。另取消化前溶液用 6 mol/L 盐酸水解 6 h 后与邻苯二甲醛溶液反应, 测定吸光度。使用 L-亮氨酸(0~0.06 mol/L)制作校准曲线计算氨基酸浓度。水解程度按以下公式计算[20]:

$$水解度(\%)=\frac{C_1-C_0}{C_2-C_0}\times 100 \quad 式(6)$$

式中, C_0 和 C_1 分别表示消化前、后游离氨基酸的浓度, C_2 表示酸水解后总游离氨基酸的浓度。

1.2.10 肽段分布的测定 参考 Qiao 等[21] 的方法对消化产物的肽段分布进行测定。将浓度为 1 mg/mL 的样品用流动相稀释后用 0.45 μm 微孔滤膜除去不溶物。用凝胶渗透液相色谱仪对肽段分布进行测定。色谱条件: 色谱柱: TSKgel® SuperSW2000 (300×4.6 mm); 流动相: 乙腈-水-三氟乙酸(45∶55∶0.1); 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL, 检测波长: 220 nm。用流动相以 0.5 mL/min 的流速洗脱。用细胞色素 C(12400 u)、芽孢杆菌酶(1450 u)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(451 u)和乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(189 u)制作标准曲线。

1.2.11 体外抗氧化活性的测定 DPPH 自由基清除率的测定参考 Wang 等[22] 的方法。将消化液与 DPPH 溶液(0.2 mmol/L, 溶于乙醇)混合(1∶3, v/v), 剧烈摇动并避光孵育 30 min 后, 在 517 nm 处测定溶液的吸光度。样品的 DPPH 自由基清除能力通过以下公式计算:

$$DPPH\ 自由基清除能力(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100 \quad 式(7)$$

式中, A_0 为 DPPH 溶液加 PBS 的吸光度, A_1 为 DPPH 溶液加样品溶液的吸光度, A_2 为乙醇加样品溶液的吸光度。

$ABTS^+$自由基清除率的测定参考 Wu 等[23] 的方法。$ABTS^+$自由基溶液由 7.0 mmol/L 的 ABTS 和 2.45 mmol/L 的过硫酸钾避光孵育 14 h 制备。使用前, 用 5 mmol/L 的 PBS(0.02 mol/L, pH7.4)稀释溶液, 直到 734 nm 处的吸光度为 0.70±0.02。将样品溶液和稀释后的 ABTS 溶液(1∶10, v/v)混合避光反应 10 min, 在 734 nm 处测定溶液的吸光度。以不含样品的溶液作为对照。

$$ABTS^+自由基清除能力(\%)=\left(\frac{A_0-A_1}{A_0}\right)\times 100 \quad 式(8)$$

式中, A_0 代表不含样品空白溶液的吸光度, A_1 代表含样品溶液的吸光度。

还原力根据 Qing 等[24] 的方法进行测定, 将样品溶液(1 mg/mL, 1 mL)、PBS(0.2 mol/L, pH6.6, 1 mL)和亚铁氰化钾溶液(1%, 1 mL)在 50 ℃ 水浴中孵育 20 min。随后, 加入 1 mL 三氯乙酸溶液, 5000×g、4 ℃ 下离心 5 min。取上清液与氯化铁(0.1%, m/v)溶液充分混匀(3∶1, v/v), 在 700 nm 处测定吸光度表示样品的还原力。

1.3 数据处理

所有实验都至少重复测定 3 次, 数据采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 所有结果以平均值±标准差进行表示。比较采用单因素方差分析和 Duncan 分析进行差异比较, 显著性水平 $P<0.05$ 时, 数据间的差异被认为具有显著性。采用 Origin pro 2024b 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 WPI 与 EGCG、ECG、EGC、EC 的相互作用强度分析

WPI 主要是由 β-LG(50%~55%)和 α-LA(20%~25%)组成[25], 因此利用分子对接模拟了 WPI 中 β-LG 和 α-LA 与四种儿茶素类化合物之间的相互作用, 从而对 WPI 与儿茶素类化合物之间的相互作用强度进行表征。图 1 为 β-LG 和 α-LA 与 EC、EGC、ECG 和 EGCG 之间形成复合物的最佳对接模型, 在此模型下复合物具有最低的能量。在与 α-LA 的对接中, ECG、EGC 和 EC 都对接到同一口袋中, 而 EGCG 由于分子较大对接到了不同的口袋。在与 β-LG 的对接中, 所有的分子都对接到了同一口袋。进一步通过 2D 相互作用图观察了分子间相互作用力。EGCG 与 α-LA(Asp37、Asp37、Gln39)和 β-LG(Lys69、Asp85、Asn88)侧链之间均形成了 3 个氢键。氢键强度与羟基数量有关, 羟基数量越多, 氢键越强, 复合物的稳定性也越高。同时, ECG 与 α-LA(Gln2、Asp37、Gln39)和 β-LG(Glu44、Glu45、Gln159)侧链之间也形成了 3 个氢键。这表明由于结构的差异较小, EGCG 与 ECG 与 β-LG 和 α-LA 结合时具有相似的相互作用强度。与 EGCG 和 ECG 相比, 由于羟基数量的减少, EGC 与 β-LG 和 α-LA 之间的相互作用强度下降, 分别与 α-LA 的 Asp78 主链和侧链和 β-LG 的 Trp19 主链和 Glu44 侧链形成了 2 个氢键。EC 与 β-LG 和 α-LA 的相互作用强度进一步下降, 分别仅观察到 1 个氢键的形成。这些结果表明没食子酰形式和非没食子酰形式

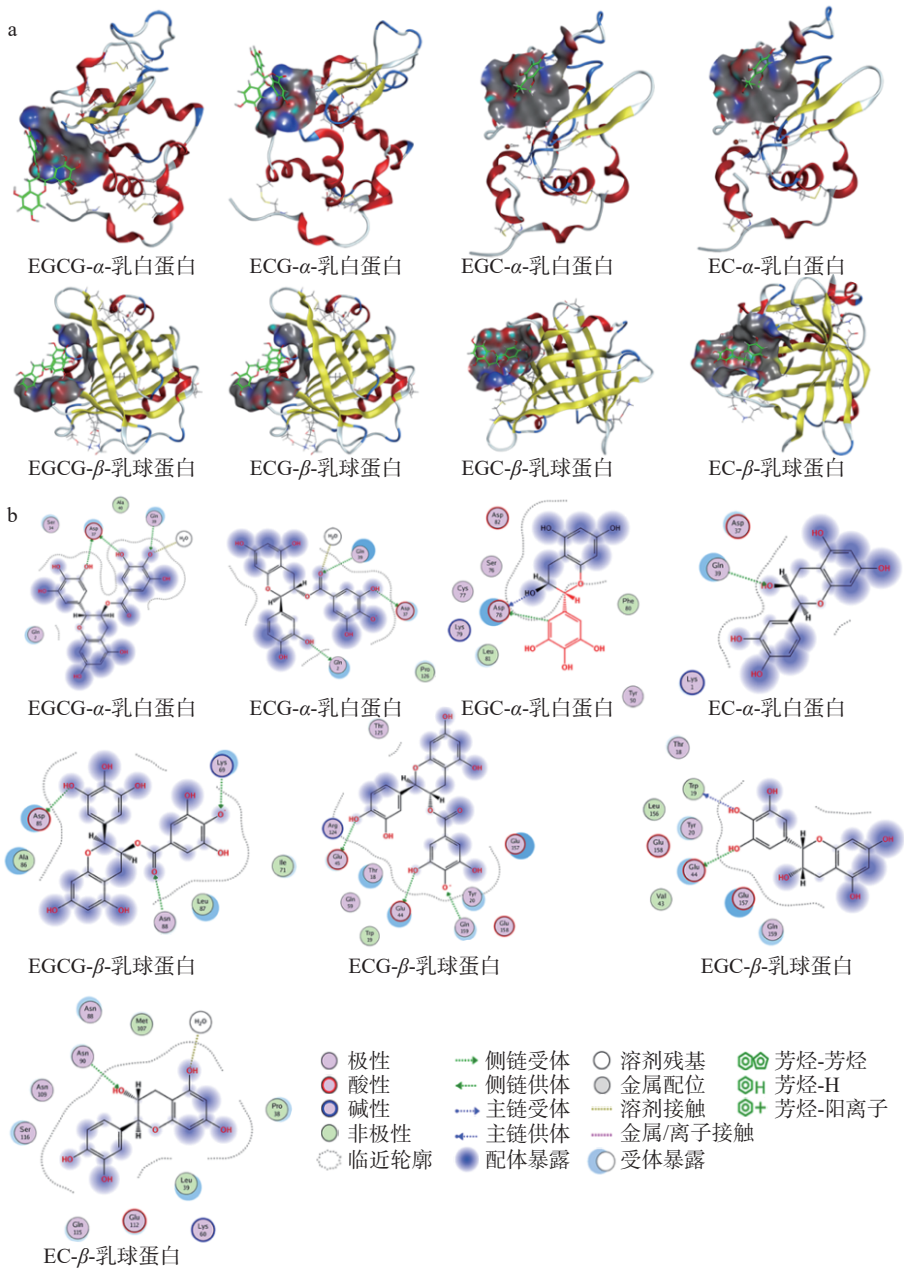


图 1　儿茶素类化合物与 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白分子对接结合位点(a)和相互作用力 2D 图(b)

Fig.1　Molecular docking binding site (a) and 2D interaction forces (b) of catechins with α-lactalbumin and β-lactoglobulin

显著影响了儿茶素类化合物与 WPI 之间的相互作用，非没食子酰化的儿茶素类化合物(EC 和 EGC)具有较少的结合功能基团，导致复合物的相互作用较弱，这会进一步导致复合物的稳定性下降。相反，没食子酰基提供了更多的氢键供体和受体，以及其他的相互作用力(疏水和 π-π 相互作用等)使儿茶素类化合物能够与蛋白质表面产生更强的结合，从而提高复合物的稳定性[26]。

蛋白质构象的稳定性主要由氢键、疏水相互作用和二硫键决定[27]。尿素、十二烷基硫酸钠和二硫苏糖醇作为变性剂能够分别破坏复合物中氢键、疏水相互作用和二硫键，降低分子间相互作用，使复合物粒径下降[28]。图 2a 为各相互作用力的贡献程度，即复合物在不同溶剂中粒径下降的百分比。尿素处理对 WPI-儿茶素复合物的相互作用力影响最显著，表明氢键在维持该复合物稳定性方面起关键作用。其中，EGCG-WPI 复合物的变化尤为明显，原因在于 EGCG 含有丰富的羟基，可与 WPI 分子侧链中的氨基、羧基和羟基形成氢键[29]。儿茶素类化合物与 WPI 结合后，会扰乱蛋白质的分子构象，导致内部疏水基团暴露，并促成新的二硫键形成[29]。此外，十二烷基硫酸钠和二硫苏糖醇对 EGCG-WPI 复合物的影响最大，而对 EC-WPI 复合物的影响最小。这是由于 EGCG 与 WPI 之间的相互作用更强，通过试剂破坏相互作用后对蛋白质结构的影响也更大。因此，分子间相互作用力进一步证明，在 pH6.0 条件下，WPI 与儿茶素类化合物主要通过氢键和疏水相互作用形成非共价结合。这一结论与 Chen 等[30] 在酸性条件下研究牛血清白蛋白与 EGCG、ECG、EGC、EC 之间主要存在氢键和疏水性相互作用的结果一致。

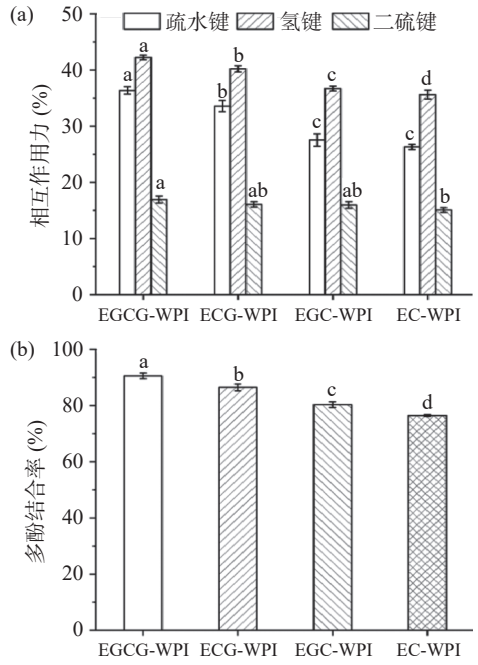


图 2 儿茶素类化合物与 WPI 结合的相互作用力(a)和多酚结合率(b)

Fig.2 Interaction force (a) and polyphenol binding rate (b) of catechins with WPI

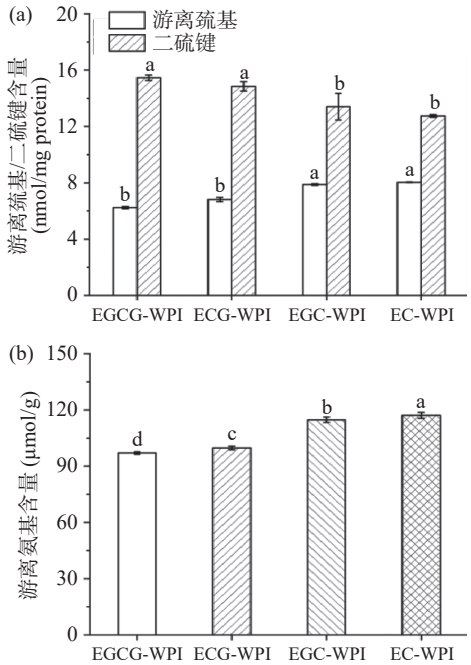


图 3 儿茶素类化合物与 WPI 结合的游离巯基/二硫键含量(a)和游离氨基含量(b)

Fig.3 Free sulfhydryl/disulfide bond content (a) and free amino content (b) of catechins with WPI

注: 不同小写字母代表样品间存在显著差异(P<0.05), 图 3~图 7 同。

在 pH6.0 条件下(显著高于 WPI 等电点), WPI 因表面携带净负电荷而发生构象舒展, 其三级结构松散化暴露出更多疏水微区及极性氨基酸结合位点, 从而显著增强儿茶素类化合物的结合倾向[31]。结合率实验(图 2b)表明, 四种儿茶素类化合物与 WPI 的结合率呈现明显梯度特征: EGCG(90.56%)>ECG(86.48%)>EGC(80.32%)>EC(76.45%)。这种递变规律与其分子结构特征高度相关: EGCG 凭借 8 个羟基及疏水性没食子酰基的双重优势, 通过多羟基氢键网络、疏水空腔包埋及 π-π 共轭协同作用实现最高结合效率; ECG 虽保留没食子酰基但羟基数量减少至 7 个, 导致其结合效率降低约 4%; 而 EGC 和 EC 因缺乏关键疏水基团(没食子酰基), 主要依赖羟基的极性作用(EGC 含 6 个羟基, EC 仅 5 个), 其结合率分别下降 10% 和 14%[32]。该结果揭示儿茶素类化合物与 WPI 的结合强度由羟基密度和疏水基团的协同效应共同决定。

2.2 儿茶素类化合物对 WPI 基团含量的影响

蛋白质中的游离巯基和二硫键含量变化可反映儿茶素类化合物对蛋白质构象的影响, 这些基团的变化也与相互作用强度有关[33]。如图 3a 所示, 在 pH6.0 条件下, 不同儿茶素类化合物与 WPI 复合物的游离巯基和二硫键含量呈现规律性变化。其中, EGCG-WPI 复合物显示最低的游离巯基含量(6.24 nmol/mg protein)和最高的二硫键含量(15.46 nmol/mg protein), 表明 EGCG 与 WPI 的相互作用最为显著。这可能与 EGCG 分子结构中特有的没食子酰基有关, 该基团可能通过空间位阻效应促进巯基氧化, 或直接参与巯基的共价结合[34]。随着儿茶素分子结构的简化(EGCG→ECG→EGC→EC), 游离巯基含量呈递增趋势, 而二硫键含量则递减。这种梯度变化表明, 儿茶素的羟基取代模式和分子大小显著影响其与乳清蛋白的相互作用能力。特别是没食子酰基的存在, 可能通过疏水相互作用和氢键网络增强蛋白质构象变化, 促使更多巯基参与二硫键形成[35]。

进一步通过游离氨基定量分析发现(图 3b), 复合体系中游离氨基含量与结合效率呈显著负相关: EGCG-WPI 复合物游离氨基最少(97.04 μmol/g), 其后依次为 ECG(99.68 μmol/g)、EGC(114.76 μmol/g)和 EC(117.13 μmol/g)。与前述结合率的大小顺序完全相反, 从分子互作层面印证了多酚结合对蛋白质表面氨基的掩蔽效应, 即结合越紧密的复合物, 其游离氨基残留量越少。这个结果再次印证了儿茶素类化合物与 WPI 的结合强度为 EGCG>ECG>EGC>EC。

2.3 儿茶素类化合物对 WPI 理化性质的影响

如图 4a 所示, WPI 与不同儿茶素类化合物形成的复合物粒径分别为: 319.6 nm(EGCG-WPI)、324.5 nm(ECG-WPI)、362.4 nm(EGC-WPI)和 372.0 nm(EC-WPI), 其中 EGCG-WPI 的粒径最小。在 pH6.0 条件下, WPI 分子表面带负电荷, 所有样品的 Zeta 电位均为负值(图 4b)。随着多酚羟基数量的增加, WPI-儿茶素复合物的 Zeta 电位绝对值显著增加(P<0.05), EGCG-WPI 达到最大值(23.83 mV)。这些结果表明, WPI 与儿茶素类化合物结合后, 带负电荷的氨基酸残基更多地暴露出来, 影响了复合物的

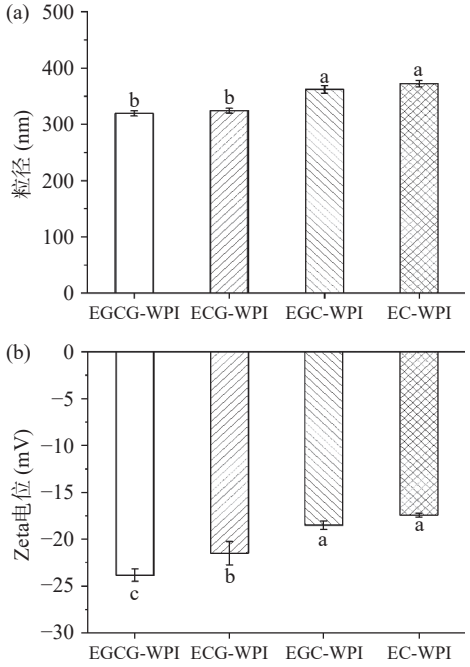


图 4　WPI-儿茶素复合物的粒径(a)和电位(b)

Fig.4　Particle size (a) and Zeta potential (b) of WPI-catechin complexes

稳定性。与其他复合物相比，EC-WPI 的 Zeta 电位较高，为−17.41 mV，说明含有较少羟基的多酚不足以显著改变 WPI 的结构并暴露其内部带电基团。排斥力较小的胶体粒子由于粒子间相互作用容易发生聚集，导致复合体系不稳定[36]。

2.4　儿茶素类化合物对 WPI 消化特性的影响

如图 5 所示，WPI-儿茶素复合物在胃肠消化过程中表现出显著差异。在胃蛋白酶消化阶段，EGCG-WPI 复合物显示出最高的消化率(42.92%)和水解程度(27.04%)。随着儿茶素结构的简化(EGCG→ECG→EGC→EC)，复合物的消化率逐渐降低，EC-WPI 复合物的消化率仅为 38.41%。这种趋势可能归因于 EGCG 与 WPI 之间形成的强氢键网络和疏水相互作用，导致 WPI 分子结构展开，增加了胃蛋白酶对特定酶切位点(如苯丙氨酸、酪氨酸残基)的识别效率[37]。

与胃消化阶段相比，在肠道消化阶段所有复合物的消化率均显著提升(超过 80%)，这表明胰蛋白酶对 WPI 具有更高的水解效率。其中，EGCG-WPI 复合物在肠道阶段仍保持最高的消化率(91.53%)和水解程度(68.02%)，而 EC-WPI 复合物的水解程度最低(58.02%)。这种差异可能与儿茶素的空间位阻效应有关：EGCG 的 D 环没食子酰基可能在肠道 pH 环境下发生构象调整，暴露出更多的蛋白酶作用位点；而 EC 的小分子结构可能通过更强的疏水相互作用维持复合物核心区域的稳定性，降低胰蛋白酶对 WPI 作用位点的可及性[38]。

综上所述，儿茶素的结构特征，特别是没食子酰基的存在与否，显著影响其与 WPI 复合物在胃肠道中的消化特性。

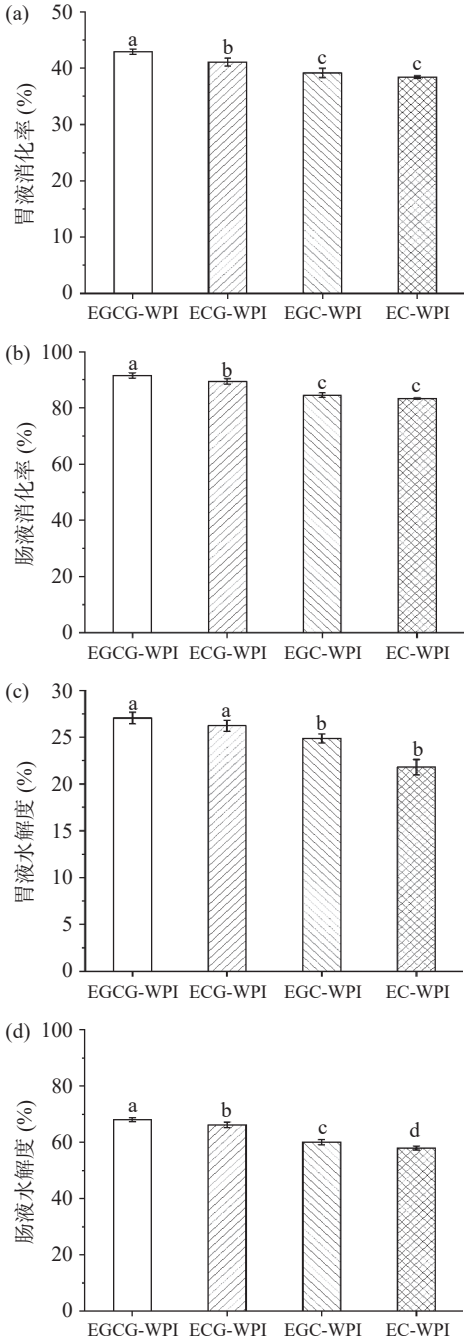


图 5　WPI-儿茶素复合物的胃液消化率(a)、肠液消化率(b)、胃液水解度(c)和肠液水解度(d)

Fig.5　Gastric digestibility (a), intestinal digestibility (b), gastric hydrolysis degree (c), and intestinal hydrolysis degree (d) of WPI-catechin complexes

2.5　儿茶素类化合物对 WPI 消化产物的影响

进一步通过凝胶渗透色谱对 WPI-儿茶素复合物消化后产物的分子量分布进行了测定，结果如图 6 所示。可以观察到，所有样品大部分肽段分布在<1000 Da 和 1000~2000 Da 区间，这表明所有复合物有较好的消化率。通常分子量<1000 Da 的肽段代表蛋白质的水解程度较高，产生了 8 肽及以下的片段，这些小肽能够更好地被肠道吸收和利用[39]。由于 EGCG-WPI 结构的展开，更多的小肽(<1000 Da)在消化过程中产生，从而表现出最高的肽段比例

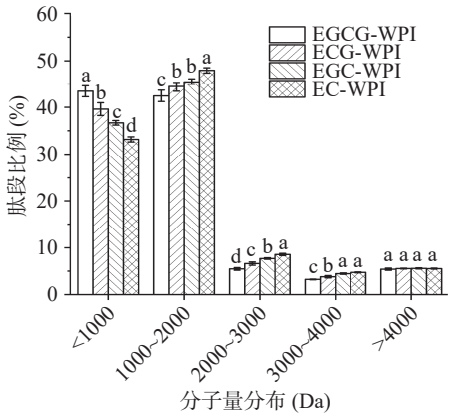


图 6 WPI-儿茶素复合物水解产物的分子量分布

Fig.6 Molecular weight distribution of WPI-catechin complex hydrolyzed products

(43.4%)。相比而言,ECG、EGC 和 EC 产生小肽的数量随着羟基的减少而逐渐下降。同时,更多的大分子肽段(2000~3000 Da 和 3000~4000 Da)在 EGC-WPI 和 EC-WPI 的水解产物中检测到。这些结果进一步表明,儿茶素类化合物中没食子酰基的存在促进了 WPI 的水解,形成了更多的小分子肽,这将会产生潜在的营养和健康益处[40]。

2.6 儿茶素类化合物对 WPI 消化产物抗氧化活性的影响

如图 7a~c 所示,EGCG-WPI 水解产物的抗氧化活性显著优于其他三种复合物,其 DPPH 自由基清除率(74.02%)、$ABTS^+$自由基清除率(18.53%)及还原力(0.816)均最高,且与结合强度(EGCG>ECG>EGC>EC)和消化能力顺序完全一致。这种正相关关系可从以下两方面解释,一是非共价相互作用促进蛋白质的水解。EGCG 与 WPI 之间的强相互作用(如疏水相互作用、氢键)改变了蛋白质的构象,使其在消化过程中更有效地释放具有抗氧化活性的小分子肽段[41];二是活性羟基增强电子供体能力[42]。EGCG 本身具有较多的酚羟基,赋予其优越的电子供体能力。水解后,这些特性可能通过协同效应增强肽段的自由基清除能力。

不同抗氧化指标的梯度差异具有明显特征:DPPH 自由基清除率(EGCG>ECG>EGC≈EC)与还原力(EGCG>ECG>EGC>EC)均呈现显著差异($P<0.05$),而 $ABTS^+$自由基清除率虽趋势相同但整体偏低。这可能反映了不同抗氧化机制的敏感性差异—DPPH 实验主要检测氢原子转移能力,对亲脂性抗氧化剂更敏感;ABTS 则依赖单电子转移机制,更易受水溶性抗氧化成分的影响[43]。EGCG 复合物在两类体系中均保持优势,提示其水解产物兼具脂溶性与水溶性抗氧化成分。此外,ECG 与 EGCG 的抗氧化指标差距较小(如 DPPH 差值仅 3%),可能与其共有的没食子酰基结构相关,该基团作为强供电子体在自由基清除中起关键作用。这些结果进一步证明,没食子酰结构的存在促进了 WPI-儿茶素复合物在消化过程中释放更多具有高抗氧化活性的小肽。

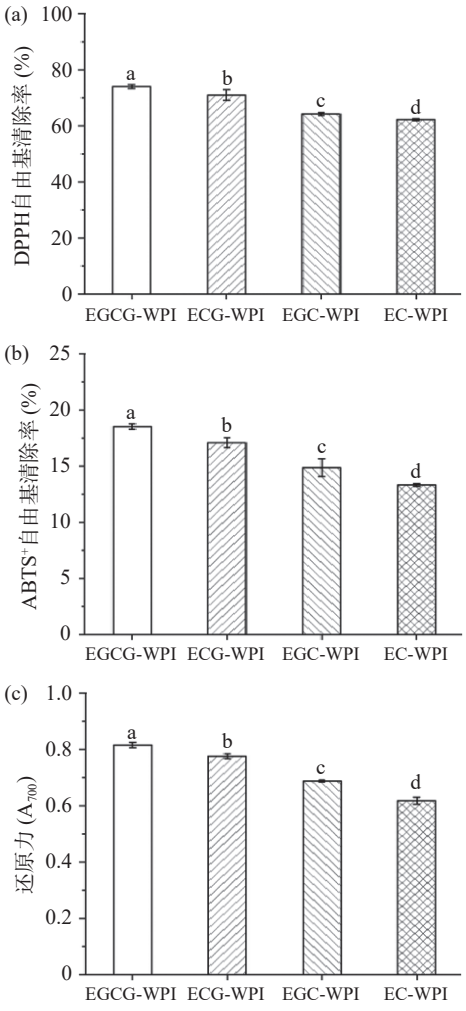


图 7 WPI-儿茶素复合物水解产物的 DPPH 自由基清除率(a)、$ABTS^+$自由基清除率(b)和还原力(c)

Fig.7 DPPH free radical clearance (a), $ABTS^+$ free radical clearance (b), and reducing power (c) of WPI-catechin complex hydrolyzed products

3 结论

不同结构儿茶素类化合物与 WPI 中 β-LG 和 α-LA 结合模式存在显著差异。随着羟基数量的增加和没食子酰基的存在,儿茶素类化合物与 β-LG 和 α-LA 的结合强度显著增加,表现为氢键数量的增多和疏水相互作用的加强,尤其是 EGCG 与 WPI 具有最高的结合率。同时,相互作用的增强也导致蛋白质结构展开,伴随着二硫键的形成和内部基团的暴露,这进一步减小了复合物的粒径。经过体外模拟消化后,随着羟基数量的增多,WPI-儿茶素复合物内部基团更多暴露,使其更容易被酶水解,表现出更高的消化率和水解度。其中,EGCG-WPI 具有最高的消化率,并在消化后产生了更多小分子肽。复合物的消化产物表现出良好的抗氧化活性,尤其是 EGCG-WPI,这与其消化后释放更多的小分子肽密切相关。本研究的结果明确了儿茶素类化合物结构与蛋白质结合之间的联系,能为茶饮的开发提供指导。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] YUAN Yongkai, MA Mengjie, ZHANG Shuaizhong, et al. Efficient utilization of tea resources through encapsulation: Dual perspectives from core material to wall material[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(3): 1310−1324.

[2] YAN Zhaoming, ZHONG Yinzhao, DUAN Yehui, et al. Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits[J]. Animal Nutrition, 2020, 6(2): 115−123.

[3] SUN Mufang, JIANG Changling, KONG Yashuai, et al. Recent advances in analytical methods for determination of polyphenols in tea: A comprehensive review[J]. Foods, 2022, 11(10): 1425.

[4] LI Hang, GUO Huan, LUO Qiong, et al. Current extraction, purification, and identification techniques of tea polyphenols: An updated review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(19): 3912−3930.

[5] LI Q Q, van de WIELE T. Gut microbiota as a driver of the interindividual variability of cardiometabolic effects from tea polyphenols[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(11): 1500−1526.

[6] MA Mengjie, GU Mingfei, ZHANG Shuaizhong, et al. Effect of tea polyphenols on chitosan packaging for food preservation: Physicochemical properties, bioactivity, and nutrition[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259: 129267.

[7] 张春花, 颜学行, 崔廷宏, 等. 4 种云南大叶种白茶主要化学成分及抗氧化活性差异分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 234−242. [ZHANG Chunhua, YAN Xuexing, CUI Tinghong, et al. Comparative analysis on chemical components and antioxidant activity for four different varieties of Yunnan large-leaf white tea[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 234−242.]

[8] ZHU Fan. Modifications of whey proteins for emulsion based applications: Current status, issues and prospectives[J]. Food Research International, 2024, 178: 113935.

[9] ZHANG Yihan, HAN Menghan, GUO Qing. Understanding of formation, gastrointestinal breakdown, and application of whey protein emulsion gels: Insights from intermolecular interactions[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(6): e70034.

[10] JENNINGS C C, FREIDENBERGER M, CHRISTENSEN S A, et al. Thermal characterization and separation of whey proteins by differential scanning calorimetry[J]. Food Chemistry, 2024, 441: 138347.

[11] LI Xing, ZHANG Xiaomei, ZHANG Minghui, et al. Human milk whey proteins: Constituents, influencing factors, detection methods, and comparative analysis with other sources[J]. Food Chemistry: X, 2025, 25: 102082.

[12] AL-HANISH A, STANIC-VUCINIC D, MIHAILOVIC J, et al. Noncovalent interactions of bovine α-lactalbumin with green tea polyphenol, epigalocatechin-3-gallate[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61: 241−250.

[13] CAO Y Y, WANG Q L, XIONG Y L. Differential binding of gallic acid and epigallocatechin gallate to whey protein affects the interfacial adsorption and gastric digestion of O/W emulsion[J]. Food Chemistry, 2025, 464(Pt 2): 141672.

[14] CHEN Yang, CHEN Yile, JIANG Lianzhou, et al. Investigating binding mechanism between coconut globulin and tannic acid mediated by atmospheric cold plasma: Protein structure and stability[J]. Food Chemistry, 2025, 464: 141670.

[15] YIN Yantao, JIANG Meiyan, LIANG Yiwen, et al. Ultrasound improves the digestibility of oxidized silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myofibrillar protein: Changes from structure to peptide release[J]. Food Research International, 2025, 204: 115962.

[16] CHEN Yang, WEI Qiaozhu, CHEN Yile, et al. Atmospheric cold plasma pretreatment for effective enhancement of covalent crosslinking between coconut globulin and tannic acid: Improving interfacial activity and emulsifying properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281: 136524.

[17] YI Xiangzhou, PEI Zhisheng, XIA Guanghua, et al. Interaction between liposome and myofibrillar protein in surimi: Effect on gel structure and digestive characteristics[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 126731.

[18] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion[J]. Nature Protocols, 2019, 14(4): 991−1014.

[19] MA Yue, LI Jinzhe, HUANG Yuxuan, et al. Physicochemical stability and *in vitro* digestibility of goat milk affected by freeze-thaw cycles[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134646.

[20] TANG J Y, WICHERS H J, HETTINGA K A. Glycation of soy and pea proteins influences infant gastric digestibility more than intestinal digestibility[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 136: 108251.

[21] QIAO Kaina, ZHOU Xuewei, WU Huimin, et al. Research on the release and absorption regularities of free amino acids and peptides *in vitro* digestion of yeast protein[J]. Food Chemistry, 2025, 482: 144176.

[22] WANG Xixi, ZHOU Zhongkai, CHEN Conggui. *In vitro* digestion of a mixed gel of pork muscle and resistant starch: Salt-soluble protein perspective[J]. Food Chemistry, 2022, 394: 133478.

[23] WU Changling, DONG Hualin, WANG Peng, et al. Sequential changes in antioxidant activity and structure of curcumin-myofibrillar protein nano complex during *in vitro* digestion[J]. Food Chemistry, 2022, 382: 132331.

[24] QING Mingmin, ZANG Jingnan, MA Yanqiu, et al. Effects of rice vinegar treatment on the antioxidant activities and protein structures of whole egg liquid before and after gastrointestinal digestion[J]. Food Chemistry, 2023, 404(Pt A): 134574.

[25] LI Jiecheng, ZHU Fan. Whey protein hydrolysates and infant formulas: Effects on physicochemical and biological properties[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(3): e13337.

[26] HAN Lu, PENG Xiao, CHENG Yang, et al. Effects of catechin types found in tea polyphenols on the structural and functional properties of soybean protein isolate-catechin covalent complexes [J]. LWT, 2023, 173: 114336.

[27] WANG Ziyuan, XIAO Nan, GUO Shanguang, et al. Tea polyphenol-mediated network proteins modulate the NaOH-heat induced egg white protein gelling properties[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 149: 109514.

[28] LI Hongcai, YANG Mingran, JIA Yumiao, et al. Interaction mechanism, intestinal delivery and sustained release potential of co-encapsulated EGCG based on sulfobutylether-β-cyclodextrin/casein composite nanoparticles[J]. Food Chemistry, 2025, 484: 144436.

[29] JIAO Qingbo, REN Gerui, LÜ Nan, et al. Enhancing protein interactions in Zein-β-lactoglobulin complexes by (-)-epigallocate-

chin-3-gallate: Expanding the potential of molecular glues in food application[J]. Food Hydrocolloids, 2025, 167: 111398.
[30] CHEN Yang, YAO Mengying, PENG Su, et al. Development of protein-polyphenol particles to stabilize high internal phase Pickering emulsions by polyphenols' structure[J]. Food Chemistry, 2023, 428: 136773.
[31] CAO Y Y, XIONG Y L. Interaction of whey proteins with phenolic derivatives under neutral and acidic pH conditions[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(2): 409−419.
[32] ZHOU Fei, LU Baiyi, CHEN Xiachao, et al. Interaction of major tea polyphenols with bovine milk proteins and its effect on *in vitro* bioaccessibility of tea polyphenols[J]. Food Chemistry, 2025, 475: 143341.
[33] WEN Wenjun, LI Shijie, WANG Junping, et al. The effects of tea polyphenol on chicken protein digestion and the mechanism under thermal processing[J]. Foods, 2023, 12(15): 2905.
[34] SUN X H, SARTESHNIZI R A, UDENIGWE C C. Recent advances in protein-polyphenol interactions focusing on structural properties related to antioxidant activities[J]. Current Opinion in Food Science, 2022, 45: 100840.
[35] 朱颖, 黄雨洋, 刘琳琳, 等. 热处理对大豆分离蛋白-姜黄素互作机理及消化特性的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 53−59. [ZHU Ying, HUANG Yuyang, LIU Linlin, et al. Effect of heat treatment on the interaction mechanism and digestibility of soybean protein isolate-curcumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(9): 53−59.]
[36] CHEN Yang, WEI Qiaozhu, CHEN Yile, et al. Enhancement of hydrogen bonds between proteins and polyphenols through magnetic field treatment: Structure, interfacial properties, and emulsifying properties[J]. Food Research International, 2024, 192: 114822.
[37] YAN Jiannan, GU Qianqian, XING Fangxiao, et al. Effect of non-covalent and covalent complexation on structure, functional properties and digestive behavior of soybean protein isolate-soybean isoflavone complexes[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2025, 100: 103928.
[38] SHI Wenyi, XIE Hexiang, OUYANG Kefan, et al. The effect of rice protein-polyphenols covalent and non-covalent interactions on the structure, functionality and *in vitro* digestion properties of rice protein[J]. Food Chemistry, 2024, 450: 139241.
[39] CHEN Yang, CHEN Yile, JIANG Lianzhou, et al. Mechanism of improving the digestibility of coconut globulin by atmospheric cold plasma treatment: The perspective of protein structure [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 152: 109886.
[40] ZHANG Yiwen, FENG Meiqin, ZHANG Jie, et al. Peptidomics insights into the interplay between the pre-digestion effect of mixed starters and the digestive pattern of sausage proteins[J]. Food Research International, 2022, 162: 111963.
[41] CAO Hongwei, HUANG Qilong, SHI Junru, et al. Effect of conventional and microwave heating treatment on antioxidant activity of quinoa protein after simulated gastrointestinal digestion[J]. Food Chemistry, 2023, 415: 135763.
[42] 朱卉宇, 关爽, 崔娥玲, 等. 多酚与海参卵肽复合物结构表征、功能性质及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(18): 67−73. [ZHU Huiyu, GUAN Shuang, CUI Eling, et al. Structural characterization, functional properties and antioxidant activity analysis of polyphenols and sea cucumber ovum peptide complexes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(18): 67−73.]
[43] LI Yang, WANG Haoran, WANG Lijuan, et al. Milling of wheat bran: Influence on digestibility, hydrolysis and nutritional properties of bran protein during *in vitro* digestion[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134559.