康晶晶, 杨美花, 陈慧芳, 等. 蛋白质-EGCG 复合物体外活性和结构稳定性的相关性研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(10): 98−106. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050115
KANG Jingjing, YANG Meihua, CHEN Huifang, et al. Research on the Correlation between Activity *in Vitro* and Structural Stability of Protein-EGCG Complexes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(10): 98−106. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050115

· 研究与探讨 ·

蛋白质-EGCG 复合物体外活性和结构稳定性的相关性研究

康晶晶[1,2], 杨美花[1,2], 陈慧芳[3], 陈　晨[1,2], 殷明月[1,2,*]
（1.贵州医科大学公共卫生与健康学院, 贵州 贵阳 561113;
2.贵州医科大学环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 561113;
3.贵州中医药大学公共卫生学院, 贵州 贵阳 550025）

摘　要: 本文以蛋白质（大豆分离蛋白、酪蛋白、鸡蛋清白蛋白和 β-乳球蛋白）和表没食子儿茶素没食子酸酯（Epigallocatechin gallate，EGCG）为原料，分别采用混合搅拌、偶联、羟自由基和酶促反应的方法，制备出 1 种蛋白质-EGCG 非共价物和 3 种共价物。以 EGCG 结合率、体外抗氧化和衰老酶抑制率等为评价指标，探讨蛋白种类和结合方式对蛋白质-EGCG 复合物结构和体外活性的影响，构建蛋白质-EGCG 共价物消化过程中体外活性和结构稳定性的相关性。结果显示，蛋白质-EGCG 复合作用可增加 EGCG 的自由基（DPPH·和 OH·）清除能力和衰老酶（酪氨酸酶和弹性蛋白酶）抑制作用，具体效果因蛋白质种类和结合方式而不同；酪蛋白-EGCG 复合物结合 EGCG 量最高（0.175~0.225 mg/mg Pro），但其体外活性却整体上弱于同结合模式下的大豆分离蛋白-EGCG 复合物；羟自由基共价反应能显著增加蛋白质-EGCG 非共价物的体外活性，使其 DPPH·清除率和酪氨酸酶抑制率分别提升了 86.73% 和 49.12% 以上，而酶促反应和偶联反应却起到相反的作用。蛋白质-EGCG 复合物体外活性与其 EGCG 结合量无显著关系，大豆分离蛋白-EGCG 羟自由基共价物的差消化稳定性（EGCG 结合量为 0.06~0.15 mg/mg Pro）和优越的体外抗氧化活性一定程度上证实了体外活性与结构稳定性的反相关性。

关键词: 蛋白质-EGCG 复合物, 结合方式, 蛋白质种类, 抗氧化活性, 抗衰老活性, 相关性研究
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)10−0098−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050115
本文网刊:

Research on the Correlation between Activity *in Vitro* and Structural Stability of Protein-EGCG Complexes

KANG Jingjing[1,2], YANG Meihua[1,2], CHEN Huifang[3], CHEN Chen[1,2], YIN Mingyue[1,2,*]
（1.School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China;
2.The Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China;
3.School of Public Health, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China）

Abstract: With epigallocatechin gallate (EGCG) and four proteins (soy protein isolate, casein, egg white albumin, and β-lactoglobulin) as materials, one protein-EGCG non-covalent complex and three covalent complexes were prepared through mixing, coupling reaction, hydroxyl radical reaction, and enzymatic reaction, respectively in this study. Indicators (such as EGCG binding rate, antioxidant *in vitro*, and inhibition rate of aging enzymes) were detected to examine effects of protein type and combination mode on EGCG binding status and activities *in vitro* of protein-EGCG complexes, and their

收稿日期: 2025−05−14
基金项目: 贵州省科技厅项目（ZK[2022]356, MS[2025]527）。
作者简介: 康晶晶（1986−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 植源性成分功能性研究, E-mail: kangjingjing1027@126.com。
*** 通信作者:** 殷明月（1981−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: 78479666@qq.com。

correlation between the activity *in vitro* and structural stability during the digestive process were determined. Results showed that when protein-EGCG complexes forming, abilities of EGCG to scavenge the free radical (DPPH· and OH·) and inhibit aging (tyrosinase and elastase inhibition) were enhanced differently with the varied protein type and the binding mode. Although having the largest EGCG binding amount (0.175~0.225 mg/mg Pro), casein-EGCG complexes were also discovered lower activities *in vitro* than complexes containing soy protein isolate and EGCG under the same combination mode. Activity of the protein-EGCG non-covalent complexes could be improved by the hydroxyl radical covalent reaction owing to their enhanced DPPH· scavenging rate and tyrosinase inhibition rate by more than 86.73% and 49.12% respectively, while effects of enzymatic reactions and alkali oxidation reaction were opposite. The activities *in vitro* of protein-EGCG complexes were found irrelevant to their EGCG binding amount, soy protein isolate-EGCG covalent complex prepared by hydroxyl radical reaction, was discovered to show a poor digestive stability (EGCG binding amounts ranging from 0.06 to 0.15 mg/mg Pro) but a superior extracellular antioxidant activity, confirming the inverse correlation between the extracellular activity and the structural stability to some extent.

Key words: protein-EGCG complex; combination mode; protein type; antioxidant activity; antiaging activity; correlation research

我国是全球茶叶的第一大生产和销售国。根据最新的茶叶产销数据，2023 年我国茶园面积达 5149.76 万亩，茶叶产量达 355 万吨，市场规模达到 3511.8 亿元，总产值达 3296.68 亿元，茶产业已成为我国特色优势产业，在发展经济、扩大就业和乡村振兴等方面发挥着重要的作用。茶多酚，茶叶的多酚类化合物，是茶叶中主要的活性成分，具有抗氧化、抗衰老、抗炎、抗菌和抗癌生理活性[1−3]。表没食子儿茶素没食子酸酯占总茶多酚含量 65% 左右，是茶多酚中生物活性最强的一类物质[4]，凭借着天然安全、活性显著、价廉易得等特点，在植源性活性成分研究中备受青睐。然而，EGCG 稳定性较差，在光、热、氧化剂及中碱性环境等条件中易发生氧化或降解[5]，且其生物利用度较低，仅为 0.14%[6]，一定程度上限制了其在工业中的应用。为了提高 EGCG 稳定性及吸收效率，纳米载体[7]、化学改性[8]、脂质体包埋[9] 等相关技术均用于研究，但这些技术是否能够改善 EGCG 生物活性则仍待商榷。随着生物大分子研究热潮的出现，构建蛋白质-EGCG 复合物（Pro-EGCG）已成为改善 EGCG 稳定性与生物活性的主要方案之一。

Pro-EGCG 复合物就是蛋白质与 EGCG 通过共价或非共价作用获得的复合生物大分子，其中非共价复合物主要是通过直接混匀搅拌法制得，蛋白质与 EGCG 主要通过氢键、范德华力、静电相互作用等非共价作用进行连接；而共价复合物则是蛋白质与 EGCG 通过化学键进行交联，比非共价物展现出更强的稳定性，常见的共价物制备方法有酶促法、自由基法和碱法等[10]。日常食品应用中，EGCG 多作为添加剂与蛋白质发生不可避免相互作用，生成 Pro-EGCG 复合物。因此，研究 Pro-EGCG 相互作用分别对蛋白质和 EGCG 理化性质及功能性的研究则具有重要的应用价值。前期研究发现，Pro-EGCG 复合物能够改善原有 EGCG 或蛋白质的稳定性、利用率和生物活性，例如，Zhou 等[11] 发现大豆分离蛋白与 EGCG 形成共价复合物后更易消化，且 EGCG 的稳定性更强，且在LPS 诱导的 RAW264.7 细胞模型中，CS-EGCG-CPP纳米复合物抗氧化、抗炎效果比同剂量 EGCG 更好[12]。目前，大多数研究主要集中在某种 Pro-EGCG复合物与 EGCG 生物活性的比较研究，关于蛋白质种类及结合方式影响 Pro-EGCG 复合物活性的研究则相对较少，Pro-EGCG 复合物活性和结构的关系仍处于未知阶段。

本文特选用大豆分离蛋白（Soybean protein isolate, SPI）、鸡蛋清白蛋白（Egg white albumin, E）、酪蛋白（Casein, C）和 *β*-乳球蛋白（*β*-Lactoglobulin, *β*-L）4 种常用蛋白质分别与 EGCG 构建 Pro-EGCG 非共价物和共价化合物，通过比较其 EGCG 结合状况和体外活性（抗氧化和抗衰老），探讨蛋白种类和结合方式对 Pro-EGCG 复合物性质的影响，体外模拟消化实验确定 Pro-EGCG 共价物结构稳定性和体外生物活性的相关性。该研究对提升 EGCG 合理利用、增强 EGCG 生物活性、明确富含 EGCG 食物活性机理具有重要的意义，为 EGCG 相关产品的开发和应用提供一定的理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

大豆分离蛋白、鸡蛋清白蛋白、酪蛋白、*β*-乳球蛋白、透明质酸钠、弹性蛋白酶（酶活力 30 U/mg）、乙酰丙酮、L-酪氨酸、乙酸钠、冰醋酸、福林酚　上海麦克林生化科技股份有限公司；酪氨酸酶（酶活力为 2500 U/mg）、透明质酸酶（酶活力为 300~500 U/mg）、胶原蛋白酶（酶活力为 135 U/mg）、N-[3-(2-呋喃基)丙烯酰基]-亮氨酸-甘氨酸-脯氨酸-丙氨酸（FALGPA）、无水磷酸氢二钠、对二甲氨基苯甲醛、无水碳酸钠、N-（甲氧基琥珀酰基）-L-丙氨酰-L-丙氨酰-L-脯氨酰-L-缬氨酸 4-硝基苯胺（MAAPVN）　上海源叶生物科技有限公司；氢氧化钠、氯化钠、磷酸二氢钠、碳酸钙　天津市科密欧化学试剂有限公司；2,2'-联氮双（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）二铵盐（ABTS）、1,1-二苯基-2-苦基肼自由基（DPPH）、Trolox　西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；盐酸　重庆川东化工（集团）有限公司；无水乙醇　成都金

山化学试剂有限公司; 表没食子儿茶素没食子酸酯 西安东峰生物科技有限公司; 以上所用试剂均属于分析纯。

HMS-28 电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司; Multiskin 酶标仪 美国 Thermo 公司; CN-LQC5003 电子天平 昆山优科维特电子科技有限公司; TS-111B 恒温摇床 上海天呈实验仪器制造有限公司; DZF-6050 真空干燥箱 上海齐欣科学仪器有限公司; DDSJ-308F pH 计 上海仪电科学仪器股份公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Pro-EGCG 复合物的制备

1.2.1.1 Pro-EGCG 非共价物的制备 Pro-EGCG 非共价物的制备参考杨美花等[13] 方法, 即磷酸盐缓冲液(1 mol/L, pH7.4)分别溶解定容 SPI、E、C、β-L 样品, 得到 4 种 5 mg/mL 蛋白质溶液。该 4 种蛋白溶液分别与 1.25 mg/mL EGCG 水溶液同体积混合, 25 ℃ 下 120 r/min 搅拌 24 h, 制成 Pro-EGCG 非共价物(Non-covalent complex, NC)。

1.2.1.2 Pro-EGCG 偶联共价物的制备 4 种 10 mg/mL 蛋白磷酸盐缓冲液(pH7.4)与 2.5 mg/mL EGCG 水溶液同体积混合, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 9.0, 25 ℃ 下 120 r/min 搅拌反应 24 h[14−15], 制成 Pro-EGCG 偶联共价物(Alkaline covalent complex, AC)。

1.2.1.3 Pro-EGCG 羟自由基共价物的制备 1 g 蛋白质固体样品(SPI、E、C 或 β-L)溶于 48 mL 磷酸盐缓冲液(pH7.2, 0.02 mol/L), 加入 1 mL 的丙酸钠溶液(0.2%)和 1 mL 过氧化氢溶液(10 mol/L)后, 加入 0.25 g 抗坏血酸粉末, 混匀, 25 ℃ 下 120 r/min 搅拌反应 2 h, 加入 0.25 g EGCG 粉末, 混匀, 25 ℃ 下 120 r/min 搅拌反应 24 h[16−17]。反应结束后, 制成 Pro-EGCG 羟自由基共价物(Covalent complex formed by hydroxyl radicals, HC)。

1.2.1.4 Pro-EGCG 酶促共价物的制备 25 mL 磷酸盐缓冲液(pH6.5, 0.02 mol/L)加入 50 mg 蛋白固体样品(SPI、E、C 或 β-L)和 12.5 mg EGCG 粉末溶解, 25 ℃ 下 120 r/min 搅拌反应 2 h, 加入 200 U 酪氨酸酶, 25 ℃ 下 120 r/min 搅拌反应 24 h[17−18]。反应结束后, 制成 Pro-EGCG 酶促共价物(Enzymatic covalent complex, EC)。

1.2.2 Pro-EGCG 复合物 EGCG 结合状况的测定 Pro-EGCG 复合物 EGCG 结合状况的测定参考杨美花等[13] 方法, 即在透析袋(500 Da)装入 10 mL Pro-EGCG 复合物溶液, 扎牢后放入烧杯中, 加入 25 mL 蒸馏水, 37 ℃ 搅拌 24 h, 福林酚比色法测定透析袋外 EGCG 含量, 根据下列公式计算 Pro-EGCG 复合物 EGCG 结合状况。

$$R_1(\%) = \left(\frac{\rho - \rho_1}{\rho}\right) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

$$R_2(\text{mg/mg Pro}) = \left(\frac{\rho - \rho_1}{\omega}\right) \times v \quad \text{式(2)}$$

式中: R_1 为 EGCG 结合率, %; R_2 为 EGCG 结合量, mg/mg Pro; ρ 为 Pro-EGCG 复合物制备过程中 EGCG 浓度, mg/mL; v 为 Pro-EGCG 复合物体积, mL; ρ_1 为透析完成后, 水溶液中 EGCG 浓度, mg/mL; ω 为 Pro-EGCG 复合物中蛋白质质量, mg。

1.2.3 Pro-EGCG 复合物体外抗氧化活性实验 Pro-EGCG 复合物体外抗氧化活性主要由 DPPH·、$ABTS^{+}$·和羟自由基(·OH)清除率等指标衡量, 具体步骤如下。

DPPH·清除实验: 0.4 mmol/L DPPH 甲醇溶液与 Pro-EGCG 复合物上清液等体积混匀后, 避光反应 2 h, 517 nm 处测吸光度值[18−19]。

$ABTS^{+}$·清除实验: 等体积混合 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液和 7 mmol/L ABTS 溶液, 避光反应 12~16 h, 调整其 734 nm 吸光度至 0.7±0.02, 将其与 Pro-EGCG 复合物上清液按 30:1 体积比混合, 避光反应 30 min, 734 nm 处测吸光度值[18−19]。

OH·清除实验: 9 mmol/L $FeSO_4$ 溶液、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液与 Pro-EGCG 复合物上清液等体积混匀后, 加入同体积 8.8 mmol/L H_2O_2 试液, 混匀, 37 ℃ 反应 30 min, 510 nm 处测吸光度值[18−19]。

DPPH·、$ABTS^{+}$·和 OH·清除率计算如公式(3)所示:

$$X(\%) = (1 - A_i/A_0) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: X 为自由基清除率, %; A_i 为样品吸光度; A_0 为空白的吸光度, 即溶剂替代样品添加后的吸光度。

1.2.4 Pro-EGCG 复合物体外抗衰老实验 体外抗衰老实验主要由抗酪氨酸酶实验、抗胶原蛋白酶实验、抗弹性蛋白酶试验和抗透明质酸酶实验组成, 具体操作如下。

1.2.4.1 抗酪氨酸酶实验 将 220 μL 1.7 mmol/L 酪氨酸磷酸盐溶液(pH6.8)、5 μL Pro-EGCG 复合物溶液和 15 μL 酪氨酸酶(500 U/mL)混匀, 37 ℃ 孵育 60 min, 475 nm 处测吸光度值, 通过公式(4)计算 Pro-EGCG 复合物的酪氨酸酶抑制率[17,20]。

$$Z(\%) = (1 - A_i/A_0) \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: Z 为酪氨酸酶抑制率, %; A_i 为样品吸光度; A_0 为空白的吸光度, 即溶剂替代样品添加后的吸光度。

1.2.4.2 抗胶原蛋白酶实验 含有 0.4 mol/L NaCl 和 0.01 mol/L $CaCl_2$ 的混合液溶解甘氨酸制成浓度为 50 mmol/L 甘氨酸缓冲液, 用来分别溶解 I 型胶原蛋白酶和 N-[3-(2-呋喃基)丙烯酰基]-亮氨酸-甘氨酸-脯氨酸-丙氨酸等样品, 制备 1.1 U/mL A 液

（I 型胶原蛋白酶溶液）和 1 mmol/L 的 B 液。酶标板中依次加入 50 μL Pro-EGCG 溶液、20 μL A 液和 60 μL 甘氨酸缓冲液混合，37 ℃ 反应 20 min，加入 50 μL B 液，摇匀，37 ℃ 反应 30 min，335 nm 处测其吸光度值[17,20]。

1.2.4.3　抗弹性蛋白酶实验　酶标板依次加入 100 μL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液、50 μL 0.9 U/mL 弹性蛋白酶溶液和 50 μL Pro-EGCG 复合物液混合，25 ℃ 反应 20 min，加入 50 μL MAAPVN 二甲基亚砜溶液摇匀，25 ℃ 反应 1 h，410 nm 处测其吸光度值[17,20]。

1.2.4.4　抗透明质酸酶实验　5 mL 离心管中加入 12.5 μL Pro-EGCG 复合物溶液和 0.5 mL 600 U/mL 透明质酸酶溶液，混匀，37 ℃ 反应 20 min，加入 0.1 mL 氯化钙溶液（2.5 mmol/L），37 ℃ 下反应 20 min，加入 0.5 mL 透明质酸钠溶液（0.5 mg/mL），37 ℃ 反应 30 min，常温静置 5 min，加入 0.5 mL 乙酰丙酮 Na_2CO_3 溶液（即 1.4 mL 乙酰丙酮与 20 mL 1 mol/L Na_2CO_3 溶液混合）和 0.1 mL NaOH 溶液（0.4 mol/L），沸水浴 15 min 后立即冰浴，加 1 mL 埃尔利希试剂（0.8 g 对二甲氨基苯甲醛溶于 15 mL 浓盐酸和 15 mL 无水乙醇），常温下显色 20 min，530 nm 处测定吸光度值[21]。胶原蛋白酶、弹性蛋白酶和透明质酸酶的抑制率计算参考公式（5）。

$$Y(\%) = [1-(A_0-A_1)/(B_0-B_1)]\times 100 \qquad 式（5）$$

式中：Y 为酶抑制率，%；B_0 为不加样品液的反应体系的吸光度值；B_1 为不加样品液和底物液的反应体系吸光度值；A_0 为样品和底物溶液均添加的反应体系吸光度值；A_1 为不加底物的反应体系吸光度值。

1.2.5　Pro-EGCG 复合物体外模拟消化　体外模拟消化步骤参考 Ye 等[22] 方法，具体操作如下：

口腔消化阶段：蒸馏水溶解 0.119 g Na_2HPO_4、0.0095 g KH_2PO_4 和 0.4 g NaCl，并定容到 50 mL，调 pH 至 6.75，预热至 37 ℃，作为口腔消化液待用。等体积量取 Pro-EGCG 复合物样品与口腔消化液，混匀，NaOH 溶液调 pH 至 6.8，置于摇床中，37 ℃ 下 100 r/min 孵育 10 min。

胃消化阶段：蒸馏水溶解 2 g NaCl，加入 7 mL HCl，蒸馏水定容至 1 L，调 pH 至 1.2，用于溶解胃蛋白酶，使蛋白酶浓度为 3.2 mg/mL，预热至 37 ℃，作为胃消化液待用。等体积量取胃消化液和口腔消化产物，调 pH 至 2.5，置于摇床中，37 ℃ 100 r/min 孵育 2 h。

小肠消化阶段：蒸馏水溶解胰酶和胆盐制备肠消化液（24 mg/mL 胰酶和 50 mg/mL 胆盐），预热至 37 ℃ 待用。30 mL 胃消化产物调 pH 至 7.0 后，加入 2.5 mL 肠消化液和 3.5 mL 盐溶液（含 0.5 mol/L $CaCl_2$ 和 5.6 mol/L NaCl），调 pH 至 7.0，置于摇床，37 ℃ 下 100 r/min 孵育 2 h，NaOH 溶液保持消化液体系 pH 为 7.0。检测各消化阶段中蛋白质-EGCG 复合物的 EGCG 结合率和体外抗氧化活性的变化。

1.3　数据处理

实验重复三次取平均值±标准偏差，Origin 2018 绘图，SPSS 26 因素显著性分析，$P<0.05$ 为差异显著的判断标准。

2　结果与分析

2.1　Pro-EGCG 复合物的 EGCG 结合状况

Pro-EGCG 复合物的 EGCG 结合状况因蛋白质组成和结合方式不同而异。由图 1 可知，偶联结合能最大程度地提高 Pro-EGCG 复合物的 EGCG 结合率和结合量，即 SPI-EGCG-AC、C-EGCG-AC、E-EGCG-AC 和 β-L-EGCG-AC 的 EGCG 结合率分别达到 91.03%、95.31%、90.05% 和 91.06%，展现出 0.228、0.238、0.225 和 0.228 mg/mg Pro 的 EGCG 结合量。与 NC 组比较，酶促反应改善 Pro-EGCG 复合物 EGCG 结合状况不显著（$P>0.05$），而羟自由基反应却一定程度地抑制蛋白质结合 EGCG，SPI-EGCG-HC、C-EGCG-HC、E-EGCG-HC 和 β-L-EGCG-HC 的 EGCG 结合率较其 NC 分别降低了 54.06%、20.30%、15.78% 和 11.60%。相对于碱性环境和酪氨酸酶，过氧化氢作为强氧化剂和弱还原剂，不仅可以破坏蛋白质原有的空间结构，还可替代 EGCG 与蛋白质发生反应，导致原 Pro-EGCG 复合物体系中的 EGCG 结合率显著下降（$P<0.05$）。蛋白质种类影响 EGCG 结合状况方面，C-EGCG 复合物整体上的

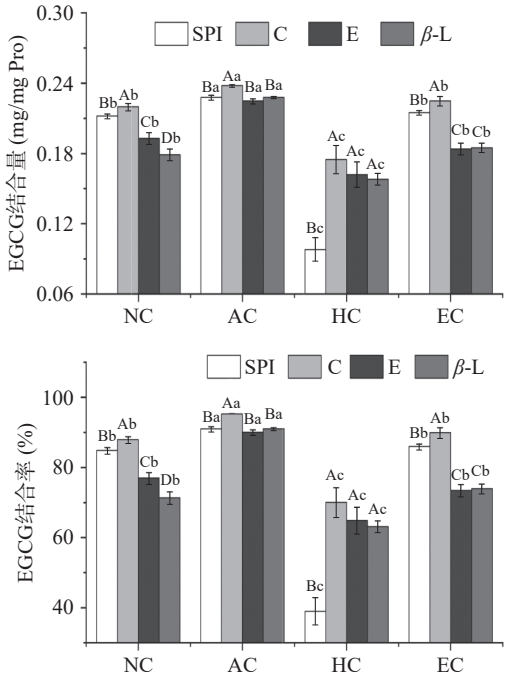


图 1　Pro-EGCG 复合物的 EGCG 结合状况

Fig.1　EGCG binding status of protein-EGCG complexes

注：小写 a、b、c、d 不同字母代表一种 Pro-EGCG 复合物不同结合形式间的差异显著性（$P<0.05$）；大写 A、B、C、D 不同字母代表相同结合形式下四种 Pro-EGCG 复合物间的差异性（$P<0.05$）；图 2~图 3 同。

EGCG 结合状况最好(0.175~0.238 mg/mg Pro), SPI-EGCG(0.098~0.228 mg/mg Pro)和 E-EGCG 复合物(0.162~0.225 mg/mg Pro)次之, β-L-EGCG 复合物最弱, 这种蛋白质种类对 Pro-EGCG 复合物 EGCG 结合状况的影响可能是蛋白质空间结构及 EGCG 结合位点的差异性引起的。综合比较发现, C-EGCG-AC 具有最好的 EGCG 结合状况(EGCG 结合率和 EGCG 结合量分别为 95.31% 和 0.238 mg/mg Pro), SPI-EGCG-AC 次之, E-EGCG-AC 最低。然而, Pro-EGCG 复合物是否仍展现出优越的体外活性则有待进一步验证。

2.2 Pro-EGCG 复合物的体外抗氧化活性

由图 2 可知, Pro-EGCG 复合物比游离 EGCG 具有更高的 DPPH·和 OH·清除率。DPPH·清除方面, 羟自由基共价反应能显著增强蛋白质-EGCG 非共价物的体外活性(P<0.05), 使其 DPPH·清除率提升了 86.73%, 达到 90% 以上, 酶促反应次之, Pro-EGCG-EC 的 DPPH·清除率为 55% 以上, Pro-EGCG-NC 和 Pro-EGCG-AC 的 DPPH·清除能力最弱, 低于 50%。OH·清除方面, C-EGCG 复合物的形成阻碍了 EGCG 清除 OH·活性, 而其他 Pro-EGCG-HC 的

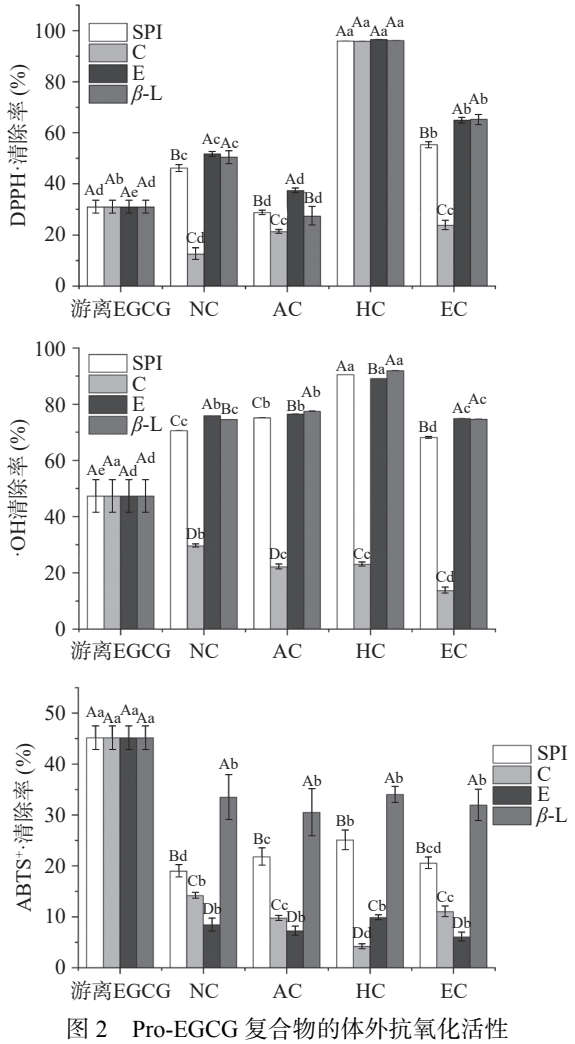


图 2 Pro-EGCG 复合物的体外抗氧化活性

Fig.2 Antioxidant activity *in vitro* of protein-EGCG complexes

OH·清除率却整体上达到 80% 以上, Pro-EGCG-NC 和 Pro-EGCG-AC的 OH·清除率为 70%~80%, 清除能力次之, 而 Pro-EGCG-EC 最差。与结合形式的影响相似, 蛋白质种类也显著影响 Pro-EGCG 复合物的自由基清除活性(P<0.05); 例如, E-EGCG 复合物整体清除 DPPH·效果(37.34%~96.50%)显著强于 β-L-EGCG(27.39%~96.14%)和 SPI-EGCG (28.73%~95.94%)复合物, 而 β-L-EGCG 共价物清除 OH·效果(74.69%~91.92%)则整体优于 E-EGCG 共价物(74.90%~89.14%)和 SPI-EGCG 复合物(70.53%~90.49%)。

与 DPPH·和 OH·相比, Pro-EGCG 复合物清除 $ABTS^{+}$·的能力较弱。蛋白质种类的影响中, β-L-EGCG 复合物清除 $ABTS^{+}$·最强, $ABTS^{+}$·清除率为 30.49%~34.02%, SPI-EGCG 复合物次之($ABTS^{+}$·清除率为 18.95%~25.05%), C-EGCG 与 E-EGCG 复合物清除能力较弱。其中, β-L-EGCG 复合物清除 $ABTS^{+}$·效果不受结合方式的影响(P>0.05); 而所有 SPI-EGCG 复合物中 SPI-EGCG-HC 的 $ABTS^{+}$·清除率较 SPI-EGCG-NC 提高了 32.19%, 结合方式对其 $ABTS^{+}$·清除能力的影响显著(P<0.05); 但对于 C-EGCG-NC 和 E-EGCG-NC 复合物来讲, 共价结合反应却降低了其 $ABTS^{+}$·清除能力。

整体上看, Pro-EGCG-HC 的 DPPH·和 OH·清除能力最好, 以 β-L-EGCG-HC 和 SPI-EGCG-HC 的自由基清除效果最好, 其 DPPH·清除率分别为 96.14% 和 95.94%, OH·清除率分别为 91.92% 和 90.49%。

2.3 Pro-EGCG 复合物的体外抗衰老活性

Pro-EGCG 复合物体外抗衰老活性的测定由酪氨酸酶、透明质酸酶、胶原蛋白酶和弹性蛋白酶抑制率 4 个指标组成, 分别涉及黑色素合成[23−24]、皮肤松弛[25−26]、皮肤结构和弹性[27−28] 状况, 这些指标共同表征人体衰老的程度。

由图 3 可知, Pro-EGCG 复合物比游离 EGCG 具有更高的酪氨酸酶和弹性蛋白酶抑制率, 且酶抑制率因 Pro-EGCG 复合物蛋白种类和结合方式而有所差异。酪氨酸酶抑制方面; 羟自由基共价反应能显著(P<0.05)增加蛋白质-EGCG 非共价物的酪氨酸酶抑制率, 使其提升 49.12% 以上。Pro-EGCG-HC 的酶抑制率最高(91.12%~93.34%), Pro-EGCG-NC 和 Pro-EGCG-AC 次之(26.17%~55.20%), Pro-EGCG-EC 最低(18.49%~36.99%); 相对于其他蛋白质, SPI 和 β-L 组成的 Pro-EGCG-NC 和 Pro-EGCG-EC 酪氨酸酶抑制率整体较高, 而 C-EGCG-HC 和 C-EGCG-AC 的酪氨酸酶抑制作用最强, 抑制率分别为 93.34% 和 45.16%。弹性蛋白酶抑制方面, C-EGCG-EC 和 SPI-EGCG-EC 的酶抑制作用较好, 约 50% 左右; 而 SPI-EGCG-NC 和 SPI-EGCG-AC 则显著弱于相同制备模式下的其它 Pro-EGCG 复合物(P<0.05)。

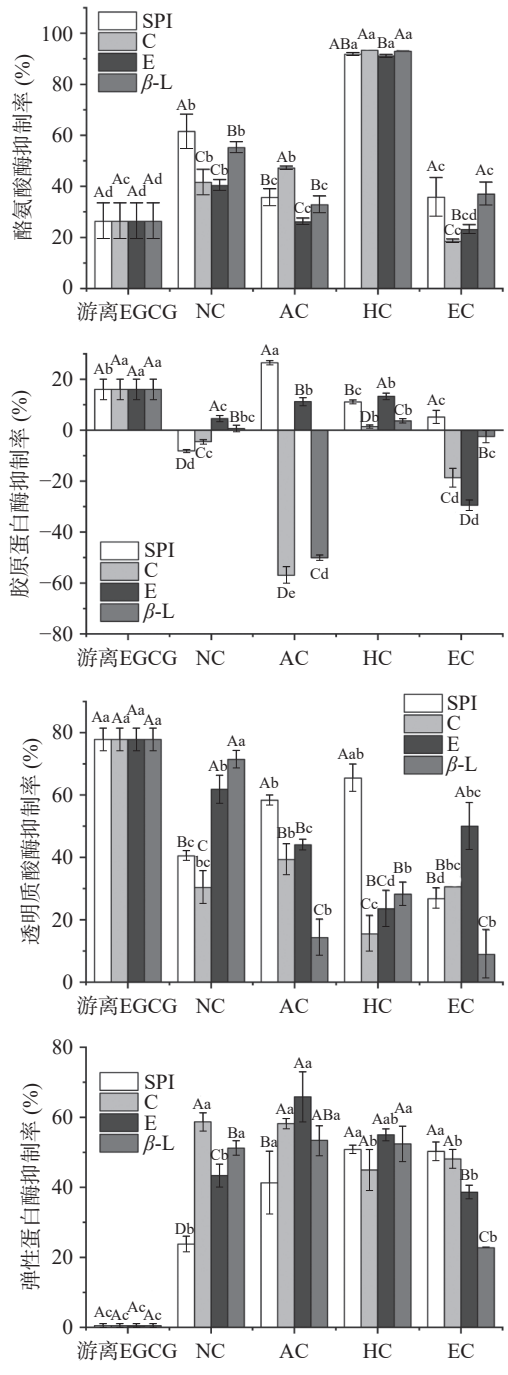


图 3　Pro-EGCG 复合物的体外抗衰老活性

Fig.3　Anti-aging activity *in vitro* of protein-EGCG complexes

与同剂量游离 EGCG 相比，Pro-EGCG 复合物的胶原蛋白酶和透明质酸酶抑制作用整体较弱，可能是游离态 EGCG 小分子能够竞争性结合胶原蛋白酶和透明质酸酶，一定程度上阻碍了这两种酶对其底物的催化作用，展现出较强的酶抑制性；而蛋白质的加入及作用改变了原体系 EGCG 的分子状态，使得 EGCG 结合胶原蛋白酶和透明质酸酶的难度增大，恢复了酶和底物的催化反应，呈现出酶抑制率的下降。相同结合模式下，SPI-EGCG 复合物的胶原蛋白酶抑制作用整体强于其它 Pro-EGCG 复合物，可能与 SPI 的空间分子结构和分子量有关。四种结合方式对 SPI-EGCG 复合物的胶原蛋白酶抑制率影响显著（P<0.05），其中碱环境下制备的 SPI-EGCG-AC 胶原蛋白酶抑制率最高（为 26.05%），可能是结合方式影响 SPI-EGCG 复合物的空间分子结构和具体分子组成，进而改变其与胶原蛋白酶的结合作用，致使胶原蛋白酶活性的变动。

综合发现，SPI-EGCG-HC 体外抗衰老活性整体较好，该结果与体外抗氧化实验结果相似。比较 16 种 Pro-EGCG 复合物 EGCG 结合量与体外活性的相关性发现，两者无显著关系，Pro-EGCG 复合物的体外活性可能更多由其结构稳定性和生物利用率决定的[29]。采用体外消化模型，模拟 Pro-EGCG 复合物在口腔和胃肠道等生理条件下的消化情况，探讨各消化阶段 Pro-EGCG 复合物 EGCG 结合状况和体外活性的关系，可以准确地评估 Pro-EGCG 复合物结构稳定性和体外活性的相关性[30]。为了更好地区分消化过程中 Pro-EGCG 复合物的结构，特参考 EGCG 结合量数据，选择两种结构迥异的 Pro-EGCG 复合物（C-EGCG-AC 和 SPI-EGCG-HC）用于后续的实验，来探讨消化过程中 Pro-EGCG 复合物结构稳定性和生物活性的关系。

2.4　体外消化过程中 Pro-EGCG 复合物的结构稳定性

由图 4 可知，随着消化的进行，C-EGCG-AC 的 EGCG 结合量逐渐降低，由最初的 0.238 mg/mg Pro 降至 0.133 mg/mg Pro（肠消化后），降幅达 44.07%；而 SPI-EGCG-HC 却呈波浪形发展，即口腔和肠消化后 SPI-EGCG-HC 产物的 EGCG 结合量较于其原始态和胃部消化态分别提高了 56.12% 和 55.56%。SPI-EGCG-HC 的 EGCG 结合量均显著低于同消化阶段的 C-EGCG-AC（P<0.01），意味着消化过程中 C-EGCG-AC 的结构稳定性高于 SPI-EGCG-HC。

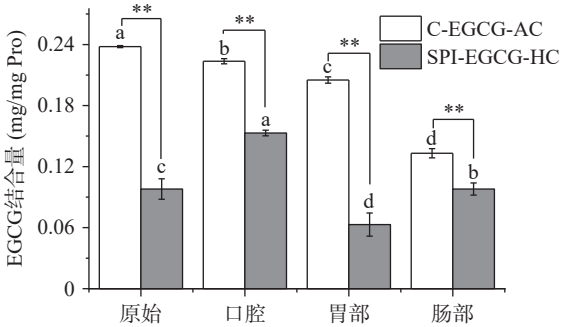


图 4　Pro-EGCG 复合物消化过程中 EGCG 结合量的变化

Fig.4　Changes of protein-EGCG complexes in the EGCG binding amount during the digestion

注：a、b、c、d 不同字母代表一组样品消化过程中的差异显著性（P<0.05）；**表示相同消化阶段下两种蛋白-EGCG 复合物数据的差异极显著，P<0.01，图 5 同。

SPI-EGCG-HC 经口腔消化后 EGCG 结合量增加了 56.12%，却在胃蛋白酶作用下降低到最初 EGCG 结合量的 64.29%，可能是胃蛋白酶分解了 SPI-EGCG-HC，向溶剂体系中释放出大量的 EGCG[31]，进而促进了 SPI-EGCG-HC 体外活性的发挥[32]。为了验证

这个猜测，检测消化过程中两种 Pro-EGCG 共价物体外活性的变化则势在必行。本课题组研究发现，消化过程中的 Pro-EGCG 共价物体系掺入了大量的金属离子、蛋白酶及酸碱性离子，这些成分势必会影响衰老酶原有活性的发挥，干扰 Pro-EGCG 共价物对衰老酶的作用效果，导致检测结果混乱而有效性不足[33]；而体外抗氧化实验则主要是对体系中自由基浓度的检测，检测结果受溶剂介质的干扰较小，结果相对有效，故体外消化过程中 Pro-EGCG复合物的体外活性主要聚焦于其体外抗氧化活性的监测。

2.5 体外消化过程中 Pro-EGCG 复合物的抗氧化稳定性

由图 5 可知，消化过程中 SPI-EGCG-HC 的自由基清除率显著高于同消化阶段的 C-EGCG-AC（P<0.05），展现出较好的体外抗氧化活性。消化过程中 SPI-EGCG-HC 的 DPPH·和 $ABTS^{+}$·清除率均随消化进行呈波浪式发展，即相对于 SPI-EGCG-HC 口腔和肠消化态的 DPPH·和 $ABTS^{+}$·清除率比其原始态和胃消化态低，变化趋势与其 EGCG 结合量相反。基于这种变化，SPI-EGCG-HC 较好的 DPPH·和 $ABTS^{+}$·清除效果可能与其体系中较高的游离态 EGCG 含量密切正相关。相对而言，SPI-EGCG-HC 的 OH·清除率则随消化进程呈 U 形变化，即 SPI-EGCG-HC 口腔和胃消化态的 OH·清除率较低，分别为 48.20% 和 35.92%；SPI-EGCG-HC 可能存在潜在的 OH·活性位点，口腔消化液中矿物质对 SPI-EGCG-HC 的 OH·活性位点占据及胃蛋白酶对 SPI-EGCG-HC 原有 OH·清除活性位点的破坏均会不利于 SPI-EGCG-HC 的 OH·清除活性的发挥[34]。由此可知，消化过程中 SPI-EGCG-HC 的分子稳定性与其体外抗氧化活性反相关。

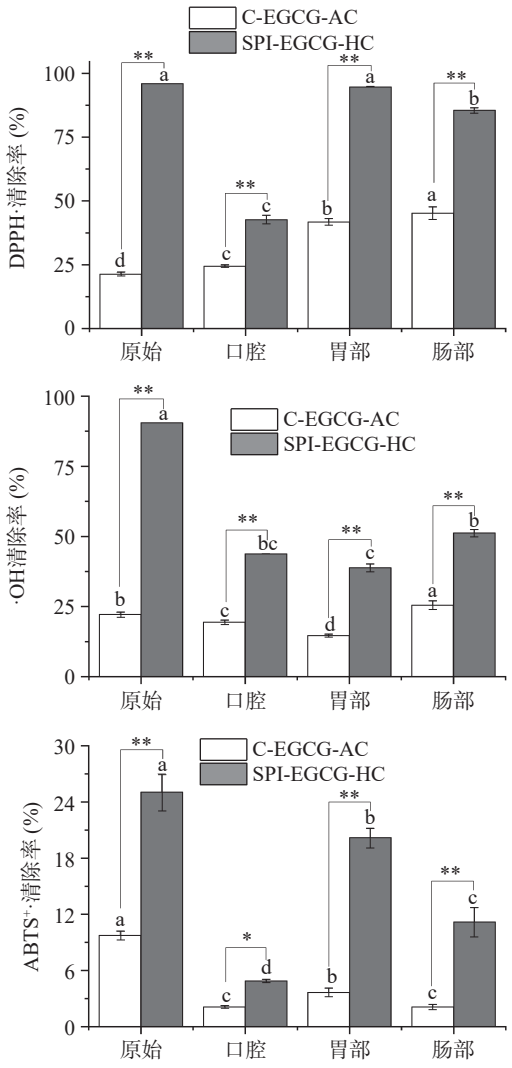


图 5 Pro-EGCG 复合物消化过程中体外抗氧化活性的变化

Fig.5 Changes of protein-EGCG complexes in antioxidant activity *in vitro* during the digestion

注：*代表相同消化阶段下两种 Pro-EGCG 复合物间的差异性分别为 P<0.05。

3 结论

本研究发现，Pro-EGCG 复合物的形成有助于提高 EGCG 的 DPPH·清除率、OH·清除率、酪氨酸抑制率和弹性蛋白酶抑制率，改善效果因蛋白质种类及结合方式有所差异。蛋白质种类影响方面，C 结合 EGCG 的含量最高，SPI 次之，E 和 β-L 最少，且蛋白质种类对 Pro-EGCG 复合物体外活性的影响因活性指标不同而有所差异，其中，SPI-EGCG 和 C-EGCG 复合物的作用效果较其它 Pro-EGCG 复合物更稳定。结合方式影响方面，偶联反应能显著提高 Pro-EGCG 非共价物的 EGCG 结合量，酶促反应次之，羟自由基反应效果最差。Pro-EGCG 复合物体外活性与其 EGCG 结合量无显著关系，消化过程中 Pro-EGCG 复合物的体外抗氧化活性与其结构稳定性密切相关，SPI-EGCG-HC 的消化结构稳定较差，容易释放游离 EGCG，展现出更强的体外抗氧化活性。

© 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] SUN L, ZHANG Y, ZHANG W, et al. Green tea and black tea inhibit proliferation and migration of HepG2 cells via the PI3K/Akt and MMPs signaling pathway[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 125: 109893.

[2] KAEWKOD T, BOVONSOMBUT S, TRAGOOLPUA Y. Efficacy of kombucha obtained from green, oolong, and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line[J]. Microorganisms, 2019, 7(12): 700.

[3] 葛天睿, 黄雪君, 张娜, 等. 茶多酚在医药和食品领域的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(17): 176−184. [GE Tianrui, HUANG Xuejun, ZHANG Na, et al. Advances in the application of tea polyphenols in medicine and food[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2024, 15(17): 176−184.]

[4] ZHANG W, LIU Y, ZHANG X, et al. Tea polyphenols-loaded nanocarriers: Preparation technology and biological function[J]. Biotechnology Letters, 2022, 44(3): 387−398.

[5] 王然, 钟玉珍, 张丽红. 茶多酚对淀粉酯纳米颗粒及其稳定

的 Pickering 乳液性质的影响[J]. 农业工程学报，2022，38(17)：303−310. [WANG Ran, ZHONG Yuzhen, ZHANG Lihong. Effects of tea polyphenols on the properties of starch ester nanoparticles and their stabilized Pickering emulsions[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2022, 38(17): 303−310.]

[6] YANG C S, SANG S, LAMBERT J D, et al. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2008, 52(1): 139−151.

[7] 王思宇，蔡轶男，王宇加，等. 纳米乳液改善多酚性能及在食品中的应用进展[J]. 现代食品科技，2023，39(9)：353−363. [WANG Siyu, CAI Yinan, WANG Yujia, et al. Improvement of polyphenol properties of nano-emulsion system and its application in food[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 353−363.]

[8] 董俊丽. 含肉桂醛和茶多酚的壳聚糖/海藻酸二醛三层膜的构建及其在鱼肉保鲜中的应用[D]. 无锡：江南大学，2023. [DONG Junli. Construction and fish preservation of chitosan/alginate dialdehyde tri-layer films incorporated with cinnamaldehyde and tea polyphenol[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.]

[9] 陈俊婕，劳颖仪，陈晓维，等. 茶多酚的功能活性及稳态化研究进展[J]. 中国果菜，2024，44(8)：25−31. [CHEN Junjie, LAO Yingyi, CHEN Xiaowei, et al. Research progress on functional activity and stabilization of tea polyphenols[J]. China Fruit & Vegetable, 2024, 44(8): 25−31.]

[10] 杜艳. 青稞蛋白-多酚相互作用机制及复合物应用研究[D]. 无锡：江南大学，2023. [DU Yan. The interaction mechanism of highland barley proteins-polyphenols and the application of its complexes[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.]

[11] ZHOU S D, LIN Y F, XU X, et al. Effect of non-covalent and covalent complexation of (-)-epigallocatechin gallate with soybean protein isolate on protein structure and *in vitro* digestion characteristics[J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125718.

[12] 杨迎康. 壳聚糖-EGCG-酪蛋白磷酸肽纳米复合物的制备及其抗氧化和抗炎症作用研究[D]. 南京：南京农业大学，2020. [YANG Yingkang. The study of the preparation of chitosan-EGCG-casein phospho-pepetide nanocomplexes and their anti-oxidant and anti-inflammatory activities[D]. Nanjing: Nanjing University, 2020.]

[13] 杨美花，陈晨，董令，等. 营养素影响蛋白质-EGCG 非共价物体外抗衰老活性的研究[J]. 食品工业科技，2025，46(21)：150−158. [YANG Meihua, CHEN Chen, DONG Ling, et al. Effects of nutrients on anti-aging activities *in vitro* of protein-egcg non-covalent complex[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(21): 150−158.]

[14] 祝钢，鞠梦楠，崔守琦，等. 大豆蛋白/表没食子儿茶素没食子酸酯纳米复合颗粒制备 Pickering 乳液及其性质研究[J]. 食品科技，2020，45(9)：221−226. [ZHU Gang, JU Mengnan, CUI Shouqi, et al. Preparation and characterization of Pickering emulsion stabilized by soybean protein/epigallocatechin gallate nanocomposite particles[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(9): 221−226.]

[15] 艾亮，澳洲坚果蛋白的提取及其与茶多酚复合体系构建和微胶囊化应用[D]. 长春：吉林大学，2024：4−6. [AI Liang. Extraction of macadamia nut protein and its composite system with tea polyphenol construction and microencapsulation application[D]. Changchun: Jilin University, 2024: 4−6.]

[16] 李远桥. 茶黄素对鸡蛋溶菌酶的非共价/共价相互作用及其复合物结构与功能的变化研究[D]. 成都：成都大学，2024：4−6. [LI Yuanqiao. Study on non-covalent/covalent interaction of the aflavins on egg lysozyme and changes in structure and function of the complex[D]. Chengdu: Chengdu University, 2024: 4−6.]

[17] KIM K Y, LEE E J, WHANG W K, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-aging effects of compounds isolated from artemisia iwayomogi [J]. Journal of Analytical Science and Technology, 2019, 10(10): 1−8.

[18] YEDIDYA, ZAGURY, MEITAL, et al. Improved antioxidant activity, bio-accessibility and bio-availability of EGCG by delivery in β-lactoglobulin particles[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 121−130.

[19] ALAVI F, CIFTCI O N. Boosting curcumin bioavailability with egg white protein aerogels: A sustainable supercritical CO_2-based approach for enhanced bio-accessibility, antioxidant activity, and anti-inflammatory effects[J]. Future Foods, 2024, 100532.

[20] 胡露，魏瑞敬，聂艳峰，等. 毛豆提取物的体外抗衰老活性研究[J]. 广东化工，2021，48(7)：28−30. [HU Lu, WEI Ruijing, NIE Yanfeng, et al. Study on the *in vitro* anti-aging activity of soybean extracts[J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(7): 28−30.]

[21] 王占一，廖成斌，公金艳，等. 石榴瓤多糖提取工艺的优化及其抑制透明质酸酶活性[J]. 中成药，2020，42(9)：2266−2271. [WANG Zhanyi, LIAO Chengbin, GONG Jinyan, et al. Extraction process optimization and anti-hyaluronidase activity of polysaccharides from punica granatum pericarp[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(9): 2266−2271.]

[22] YE Y, JIA G X, SHUI Q H, et al. Free radical-induced soybean protein isolate-curcumin conjugates: Characterization, antioxidant and *in vitro* digestion characteristics[J]. LWT- Food Science and Technology, 2024, 203: 116351.

[23] PANG H Y, JIA Y M, ZHANG Z, et al. Mushroom polyphenol oxidase inactivation kinetics and structural changes during radio frequency heating[J]. Food Bioscience, 2024, 62: 105136.

[24] 赵美娟，户晶晶，倪辉，等. 黑色素生成信号通路研究进展[J]. 生物工程学报，2019，35(9)：1633−1642. [ZHAO Meijuan, HU Jingjing, NI Hui, et al. Research progress in melanogenesis signaling pathway[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(9): 1633−1642.]

[25] KAUL A, SHORT W D, WANG X Y, et al. Hyaluronidases in human diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(6): 3204.

[26] KAYA Y, SACAN O, Erçag A, et al. Anti-tyrosinase, anti-elastase, and antioxidant activities of some symmetric bisthio carbohydrazone compounds[J]. Indian Journal of Chemistry, 2022, 61(8): 895−900.

[27] YOUNIS MM, AYOUB, IM, MOSTAFA, NM, et al. GC/MS profiling, anti-collagenase, anti-elastase, anti-tyrosinase and anti-hyaluronidase activities of stenocarpus sinuatus leaves extract[J]. Plants-Basel, 2022, 11(7): 918.

[28] YÜCEL C, KARATOPRAK GS, YALCINTAS S, et al. Ethosomal (-)-epigallocatechin-3-gallate as a novel approach to enhance antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase effects[J]. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2022, 13: 491−502.

[29] NYDIA E B-C, JANET A G-U, SERGIO O S-S. Phenolic-protein interactions: Effects on food properties and health benefits [J]. Journal of Medical Food, 2018, 21(2): 188−198.

[30] 陈树俊，郑婕. 复合果蔬发酵汁有机酸动态分析及体外模拟消化抗氧化活性和功能成分分析[J]. 食品科学，2021，42(7)：90−97. [CHEN Shujun, ZHENG Jie. Dynamic analysis of organic

acids in a mixture of vegetable and fruit juices during fermentation and changes in antioxidant activity and functional constituents during simulated gastrointestinal digestion[J]. Food Science, 2021, 42(7): 90−97.]

[31] 徐子惠. 大豆分离蛋白的酶法改性及其体外模拟胃消化特性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2022: 1−92. [XU Zihui. Enzyme-assisted modification of soy protein isolates and their *in vitro* simulated gastric digestion behaviors[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022: 1−92.]

[32] 夏文. 杨梅酚类化合物生物活性、生物利用度及其抑制乳腺癌细胞增殖的机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2022. [XIA Wen. Bioactivity and bioavailability of chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) phenolic compounds and their anticancer mechanism towards human breast cancer cells[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022.]

[33] 王鹏, 郭丽, 甘文山. 大菱鲆鱼肉透明质酸酶的酶学特性研究[J]. 食品科技, 2018, 43(9): 186−191. [WANG Peng, GUO Li, GAN Wenshan. Enzyme properties and extraction of hyaluronidase from turbot meat[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(9): 186−191.]

[34] 钟坦君, 洪鹏志, 周春霞, 等. 没食子酸对金线鱼鱼糜凝胶特性及其体外消化产物活性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 76−84. [ZHONG Tanjun, HONG Pengzhi, ZHOU Chunxia, et al. Effect of gallic acid on gel properties and *in vitro* activity of digested products of nemipterus virgatus surimi[J]. Food Science, 2022, 43(14): 76−84.]