

多光谱法探究壳聚糖与酪蛋白的结合作用

康柱¹, 闫焕¹, 周素珍^{1,2,3}, 范金波^{1,2,3}

(1.渤海大学 食品科学与工程学院, 辽宁 锦州 121013; 2.辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁 锦州 121013; 3.生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 锦州 121013)

摘要: 目的 以壳聚糖 (Chitosan, CS) 和酪蛋白 (Casein, CA) 为研究对象, 通过探究多糖对蛋白质结构的影响机制, 以期改进多糖对蛋白质食品贮藏的效果。方法 采用荧光光谱法和傅里叶变换红外光谱法, 在不同 pH 条件下, 研究 CS 与 CA 的结合反应, 通过数学方程计算其结合常数、结合位点数和结合作用力。结果 不同 pH 值条件下, CS 对 CA 均产生荧光猝灭, 均属于静态猝灭, pH=5.2 时猝灭常数达到最大值 4.702×10^3 L/mol, 且结合常数达到最大值 9.914×10^3 L/mol。热力学分析表明, 结合反应自发进行属于放热反应, 主要结合驱动力为静电相互作用。同步荧光光谱和三维荧光光谱表明, CS 与 CA 的相互作用能够使 CA 的空间构象发生改变。傅里叶变换红外光谱说明 CS 加入和 pH 值的变化导致了 CA 二级结构发生变化。结论 CS 与 CA 结合会导致 CA 的结构发生变化, 这为蛋白质-多糖相互作用提供一定的理论依据, 也为以蛋白质-多糖为基础的乳制品贮藏及开发提供实验依据。

关键词: 酪蛋白; 壳聚糖; 荧光猝灭; pH

中图分类号: TS255 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2023)11-0099-09

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2023.11.011

Binding Behavior between Chitosan and Casein by Multi-spectroscopic Method

KANG Zhu¹, YAN Huan¹, ZHOU Su-zhen^{1,2,3}, FAN Jin-bo^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Engineering, Bohai University, Liaoning Jinzhou 121013, China; 2. Key Lab of Food Safety of Liaoning Province, Liaoning Jinzhou 121013, China; 3. National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Liaoning Jinzhou 121013, China)

ABSTRACT: The work aims to improve the effect of polysaccharide on protein food storage by exploring the affecting mechanism of polysaccharide on protein structure with chitosan and casein as research objects. Fluorescence spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy were used to study the binding reaction between chitosan and casein under different pH conditions, and the binding constant, number of binding sites and binding force were calculated by mathematical equations. Under different pH conditions, chitosan quenched the fluorescence of casein, which belonged to static quenching. The quenching constant reached the maximum value of 4.702×10^3 L/mol at pH=5.2, and the binding constant reached the maximum value of 9.914×10^3 L/mol. Thermodynamic analysis showed that the spontaneous binding reaction was an exothermic reaction, and the main binding driving force was electrostatic interaction. Synchronous fluorescence spectroscopy and three-dimensional fluorescence spectroscopy indicated that the interaction of chitosan and casein could change the spatial conformation of casein. Fourier transform infrared spectroscopy illustrated that the addition of chitosan and the change of pH led to changes in the secondary structure of casein. The combination of chitosan and casein leads to structural changes in casein, which provides some theoretical basis for protein-polysaccharide interactions and also pro-

收稿日期: 2022-09-06

基金项目: 辽宁省教育厅一般项目 (LJ2020004); 辽宁省科技厅项目 (2022JH5/10400062)

作者简介: 康柱 (1997—), 男, 硕士生, 主攻食品加工与安全。

通信作者: 范金波 (1977—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品加工及分子营养。

vides some experimental basis for the storage and development of dairy products based on protein-polysaccharide.

KEY WORDS: casein; chitosan; fluorescence quenching; pH

壳聚糖 (Chitosan, CS) 作为天然生物大分子多糖, 因具有特殊的氨基结构, 故性质稳定^[1]。CS 可作为食品保鲜剂应用在果蔬保鲜、肉制品保鲜以及水产保鲜^[2-5]; 作为食品添加剂起到增稠、澄清的作用^[6-7], 还具有调节机体免疫力, 改善胃肠道等功能^[8-9]; 除此之外, 在食品包装上也有所应用^[10-11]。因此, CS 在食品领域的研究与开发具有广阔的前景。

酪蛋白 (Casein, CA) 是牛乳中含量最丰富的蛋白质^[12], 其含有多种必需氨基酸, 具有较高的营养价值^[13]。因其具有良好的乳化性、保水性、溶解性和发泡性, 已被成熟应用于肉制品、烘焙食品、人造奶油、干酪、饮料等食品的加工中^[14]。除此之外, 还可用作蛋白基载体来运输药物或多酚、黄酮类生物活性小分子^[15]。

食品中添加多糖较为常见, 多糖的添加不仅可以改善食品品质、风味, 还可以延缓食品变质, 延长货架期^[16-19]。乳制品货架期一直是消费者关注的焦点, 徐佳等^[20]研究表明在乳饮料中添加少量黄原胶、 β -葡聚糖等, 可改善产品口感和外观, 增强稳定性, 延长货架期。Zielinska 等^[21]研究表明将低聚果糖添加在发酵乳制品中, 可提高该产品的感官黏度和质量, 从而延长贮藏期。目前, 在乳制品中多糖的应用较为广泛, 但对研究 CA-多糖相互作用机制及机理的报道较为少见, 且 CA-多糖的相互作用易受到 pH、离子强度、电荷密度等因素影响^[17]。因此, 本文选用牛乳中含量最高的 CA 与在食品领域应用广泛的 CS 为研究对象, 在 3 种不同 pH 值 (7.4、5.2、3.0) 条件下, 探究 CS 与 CA 的结合作用, 以及对 CA 结构的影响, 这对乳制品的贮藏和开发研究具有重要意义。

1 实验

1.1 材料与试剂

主要材料与试剂: 酪蛋白 (98%), 北京索莱宝科技有限公司; 壳聚糖 (分子质量 $\approx 30\ 000\ \text{u}$, 纯度 $\geq 95\%$), 酷尔化学科技 (北京) 有限公司; 其他实验试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

主要仪器与设备: F-7000 荧光分光光度计, 日本日立高新技术公司; IRTracer-100 傅里叶变换红外光谱仪, 岛津企业管理 (中国) 有限公司; PHS-25 pH 计, 仪电科学仪器 (上海) 股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 储备液的配制

称取一定量的酪蛋白和壳聚糖, 配制 2 mg/mL 的

CA 储备液和 8 mg/mL 的 CS 储备液 (溶于体积分数为 1% 的乙酸溶液), 配制浓度为 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液。

1.3.2 荧光光谱

1.3.2.1 荧光光谱测定

向离心管中加入一定量的 PBS 缓冲液, 再加入 30 μL CA 溶液, 最后加入 CS 溶液, 使之充分反应 30 min。最终离心管中体系的总体积为 3 mL, CA 的质量浓度为 0.02 mg/mL, CA 与 CS 浓度比为 1:0、1:9、1:18、1:27、1:36、1:45 (6 个不同浓度比在图中分别以 1—6 表示)。在 298 K 和 310 K 温度下, 设置激发波长为 280 nm, 狭缝宽度为 5.0 nm, 扫描范围为 290~500 nm 内的荧光发射光谱^[22], 并在 3 种不同 pH 值 (7.4、5.2、3.0) 条件下进行测量。

1.3.2.2 荧光猝灭机理和结合常数计算

本实验采用 Stern-Volmer 方程 (1) 和 Hill 方程 (2) 分析荧光猝灭机理^[23]。

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

$$\lg(F_0/F - 1) = \lg K_a + n \lg[Q] \quad (2)$$

式中: F_0 和 F 为未加入和加入 CS 时 CS 的荧光强度峰值; $[Q]$ 为 CS 在体系中浓度; τ_0 为荧光团的平均寿命 ($10^{-8}\ \text{s}$); K_{sv} 为猝灭常数; K_q 为生物分子猝灭速率常数; K_a 为表观结合常数。

1.3.2.3 热力学性质分析

通过 Van't Hoff 方程 (3) 和热力学方程 (4) 计算相关参数, 分析其作用力类型^[24]。

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \frac{\Delta H\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}{R} \quad (3)$$

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

式中: R 为气体常数, $R=8.314\ \text{J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$; K_1 和 K_2 为对应 T_1 、 T_2 的表观结合常数; ΔG 为结合反应的吉布斯自由能变化; ΔS 为熵变。

1.3.3 同步荧光光谱测定

样品配制方法同 1.3.2.1 节, 参考郝明皓^[25]方法并做修改, 在 298 K 温度下, 设置激发波长和发射波长间隔 $\Delta\lambda=60\ \text{nm}$ 和 $\Delta\lambda=15\ \text{nm}$, 测定样品在 250~350 nm 范围内同步荧光光谱。分别在 3 种不同 pH (7.4、5.2、3.0) 条件下进行测量。

1.3.4 三维荧光光谱测定

固定 CA 质量浓度为 0.02 mg/mL, CS 质量浓度为 0.36 mg/mL, 设定激发波长为 200~350 nm, 发射波长为 200~450 nm, 在 298 K 温度下, 进行三维荧

光光谱的测定^[25]。分别在 3 种不同 pH (7.4、5.2、3.0) 条件下进行测量。

1.3.5 傅里叶变换红外光谱测定

样品溶液配制方法同 1.3.2 节, 参考张超等^[26]的方法, 将反应完全的样品通过真空冷冻干燥制成粉末状固体, 分别称取待测样品和 KBr, 使待测样品和 KBr 质量比约为 1:100, 混合均匀并进行充分研磨, 制成待测薄片; 放入傅里叶变换红外光谱仪中, 设置扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} , 进行光谱扫描并记录。

1.4 数据处理

实验均重复 3 次, 实验数据表示为平均值 $\pm$ 标准差; 实验数据采用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行处理, 使用 Origin 2022 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 荧光光谱分析

如图 1 所示, 在不同条件下, CS 对 CA 均产生荧

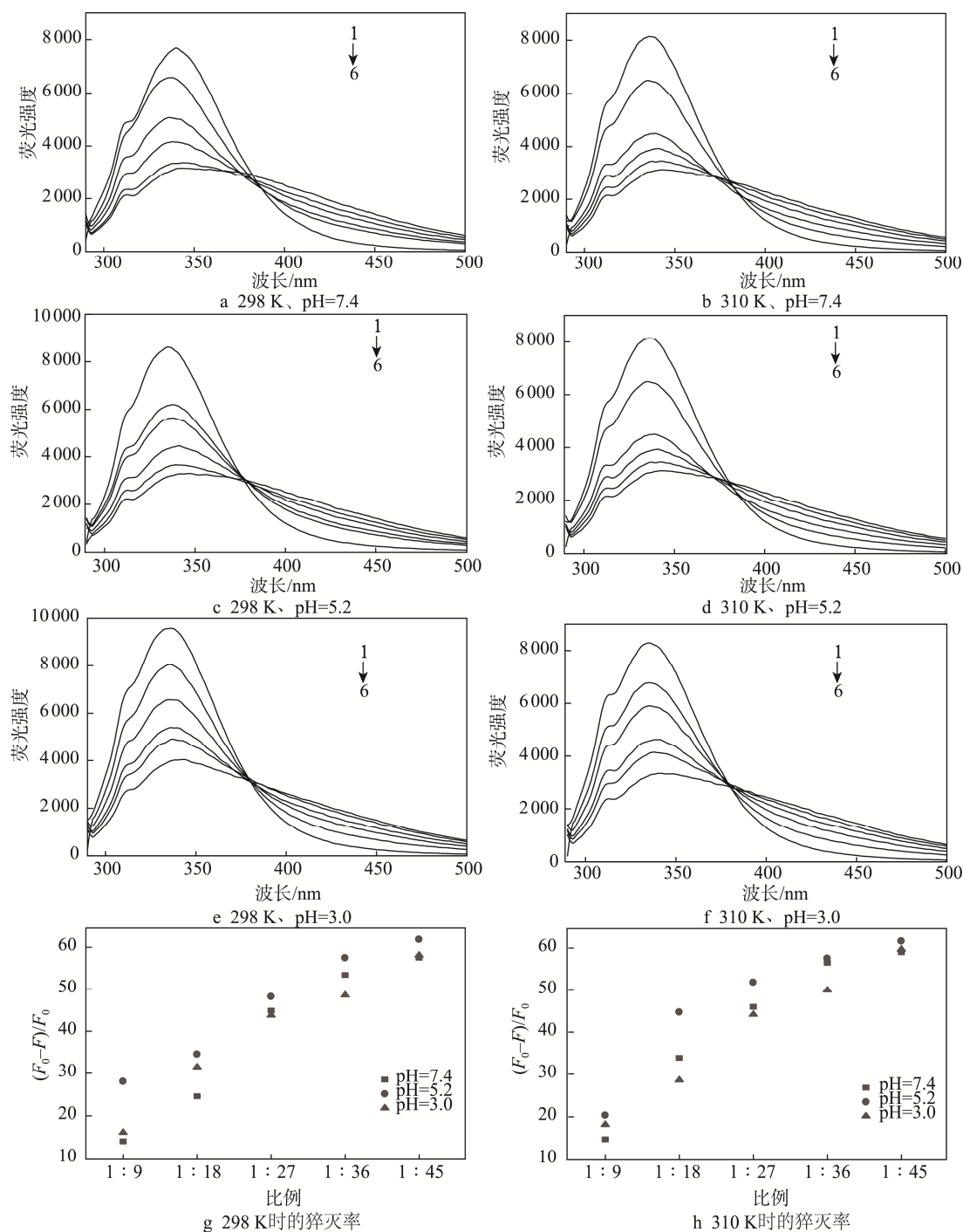


图 1 pH 对 CS 与 CA 相互作用影响的荧光光谱

Fig.1 Fluorescence spectra for the effect of pH on the interaction between chitosan on casein

光猝灭效应,且在 340 nm 附近出现荧光最大吸收峰。在 298 K 时,3 种 pH 条件下,CA 的荧光强度峰值分别降低了 57.5%、61.9%和 58.1%;当 pH=7.4 时,最大发射波长($\lambda_{\max}$)发生微弱的红移;pH=5.2 时, $\lambda_{\max}$ 红移 6 nm (335~341);pH=3.0 时, $\lambda_{\max}$ 发生红移 4 nm (336~340)。在 310 K 时,CA 的荧光强度峰值分别降低了 59%、61.7%和 59.7%,且均发生红移;在相同 pH 条件下,与 298 K 相比较, $\lambda_{\max}$ 也发生轻微的变化。这说明 pH 的变化,使二者相互作用的微环境发生改变,同时温度也改变了二者发生反应的微环境。由图 1g、h 可知,随着 CS 浓度的逐渐升高,猝灭率也随之增大,且 pH=5.2 时猝灭率最高。

2.2 荧光猝灭机理和结合常数

本文通过分析荧光猝灭机理,探究 CS 与 CA 之间的相互作用。荧光猝灭类型包括动态猝灭和静态猝灭,2 种方式均可以降低 CA 的荧光强度^[27-28]。本文采用方程(1)和方程(2)计算,并分析 CS 与 CA 相互作用的荧光猝灭机理^[29]。

由表 1 可知,在同一 pH 值条件下,在 CA 中加入 CS, K_{sv} 与温度呈现负相关关系,但 K_q 均大于最大散射碰撞猝灭常数 ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$),说明 CS 对

CA 产生静态猝灭,且二者结合形成新的复合物。在 pH=5.2 时,猝灭常数 K_{sv} 最大,与图 1g、h 的结果一致。由 Hill 方程计算出来的结合常数 K_a 都在 10^3 数量级,说明 CS 与 CA 的结合能力较强。在不同 pH 条件下, n 均在 1 左右,这表明 CA 结构中至少有一个结合位点与 CS 相结合^[30],与前人的研究结果相一致^[26]。 R^2 的值越接近于 1,说明数据越精确。

2.3 热力学性质分析和作用力类型

当生物大分子与小分子相互作用时,主要通过氢键、范德华力、静电相互作用等作用力相连接^[31-32]。本文通过 Van't Hoff 方程(3)和热力学方程(4)来分析其反应的热力学性质和作用力类型^[33-34]。

由表 2、3 可知, $\Delta G < 0$, $\Delta S > 0$ 说明 CS 与 CA 结合均为熵增加的自发反应。当 pH=7.4 和 pH=3.0 时, $\Delta H < 0$,说明在这 2 个 pH 条件下,该反应为放热反应,与表 1 中随着温度升高 K_a 减小相呼应。由此可推断在此 pH 条件下,静电相互作用为主要驱动力;在 pH=5.2 时, $\Delta H > 0$,二者反应为吸热反应,可推断出二者通过疏水相互作用结合,与前人结果相一致^[26]。在 pH=5.2 时,热力学常数的方向发生变化,且 pH=5.2 更接近于 CA 的等电点。由此可推断 pH 值的变化影响了 CA 与 CS 结合的微环境。

表 1 CS 与 CA 相互作用的常数
Tab.1 Constants for the interaction between chitosan and casein

pH	温度/K	$K_{sv}/(10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R_1^2	$K_a/(10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	R_2^2	n
7.4	298	3.692±0.047	3.692±0.047	0.995 4	3.778±0.085	0.968 0	1.398
	310	4.072±0.055	4.072±0.055	0.997 5	3.280±0.135	0.984 7	1.352
5.2	298	4.503±0.063	4.503±0.063	0.998 5	2.965±0.046	0.993 1	0.9336
	310	4.702±0.046	4.702±0.046	0.998 0	9.914±0.054	0.943 5	1.121
3.0	298	3.575±0.093	3.575±0.093	0.998 1	1.170±0.033	0.992 5	1.202
	310	3.735±0.035	3.735±0.035	0.996 6	1.021±0.078	0.975 9	1.175

表 2 CS 与 CA 相互作用的热力学参数
Tab.2 Thermodynamic constants for interaction between chitosan and casein

pH 值	T/K	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
7.4	298	-20.41±0.045	-9.047±0.976	38.12±3.430
	310	-20.66±0.224		
5.2	298	-19.81±0.033	77.257±0.527	306.58±1.661
	310	-23.72±0.012		
3.0	298	-17.50±0.057	-8.828±0.526	29.48±1.671
	310	-17.86±0.163		

表 3 热力学常数与相互作用力的关系
Tab.3 Relationship between thermodynamic constants and interaction forces

ΔH 与 ΔS	主要作用力
$\Delta H<0$ 或 $\Delta H\approx 0, \Delta S>0$	静电相互作用
$\Delta H>0, \Delta S<0$	静电相互作用、疏水相互作用
$\Delta H<0, \Delta S<0$	氢键、范德华力
$\Delta H>0, \Delta S>0$	疏水相互作用

2.4 同步荧光光谱的分析

同步荧光光谱通过对荧光团氨基酸残基——酪

氨酸 (Tyr) 和色氨酸 (Trp) 的微环境变化进行分析, 判断蛋白质构象是否发生改变^[35]。在同步荧光光谱中, Tyr 的微环境变化在 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 处, Trp 的微环境变化在 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 处^[36]。本文通过同步荧光光谱中 λ_{max} 的偏移情况, 判断 CA 构象是否发生改变。

如图 2 所示, 在 pH=7.4 时, Tyr 和 Trp 残基的 λ_{max} 均发生轻微红移, 说明对应氨基酸残基附近暴露的微环境的亲水性增强; 当 pH=5.2 时, λ_{max} 未发生明显变化; 当 pH=3.0 时, Trp 残基的 λ_{max} 红移 4 nm, 这反映出 Trp 残基附近的微环境极性增强, 更容易在环境中暴露; 而 Tyr 残基的 λ_{max} 没有发生偏移。以上结果可推测出 CS 的存在和 pH 值共同使 CA 的构象发生了变化。

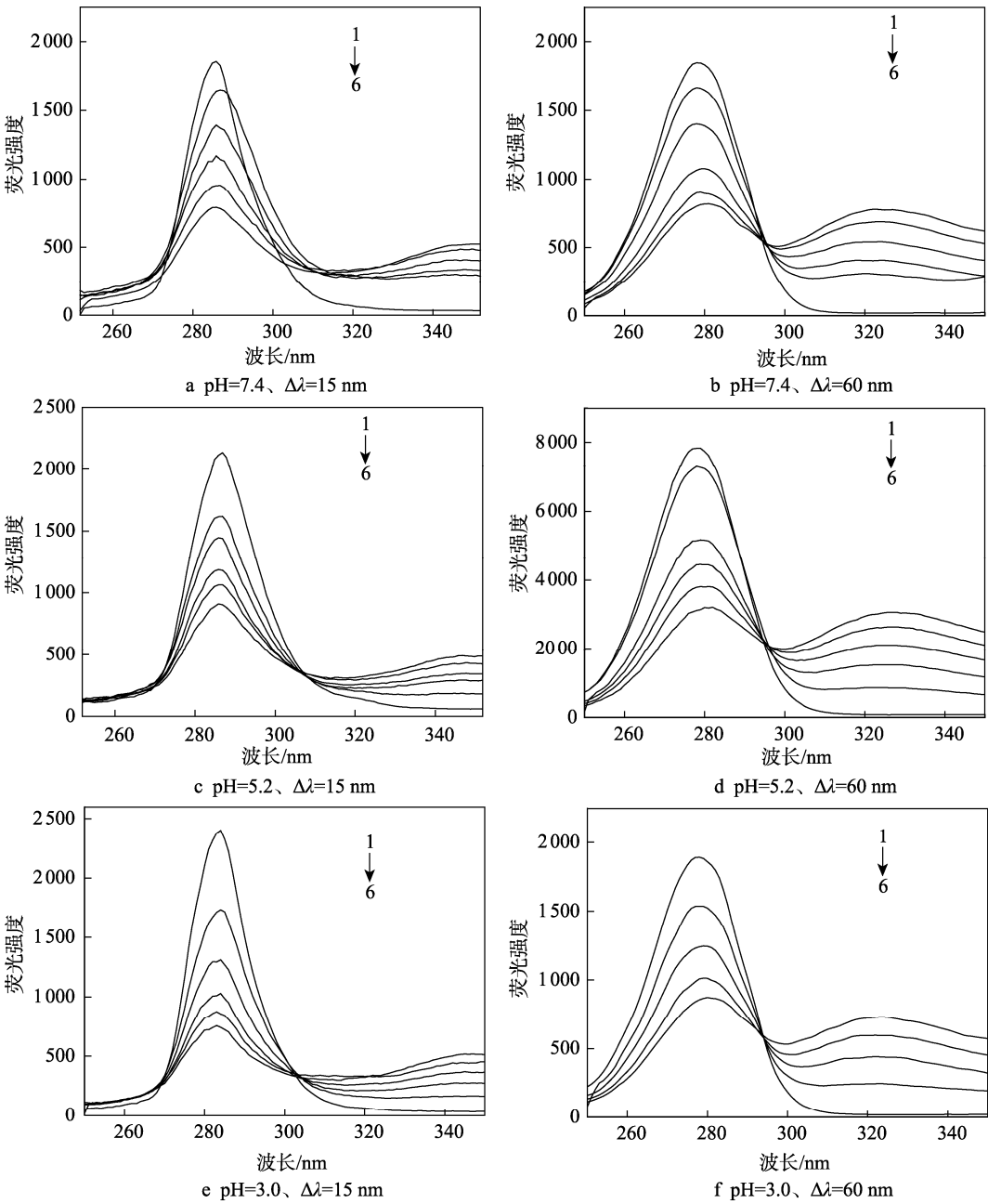


图 2 温度为 298 K 时, CS 与 CA 相互作用的同步荧光光谱
Fig.2 Synchronous fluorescence spectra of interaction between chitosan and casein at 298 K

2.5 三维荧光光谱分析

三维荧光光谱与荧光发射光谱相比,对 CA 的荧光强度和峰的信息展示更全面、更直观。其中峰 a 表示 Trp 残基的光谱特征峰,峰 b 反映的是 CA 多肽骨架光谱变化^[37]。

由图 3 可观察出,当 CS 加入后,峰 a 和峰 b 的荧光强度都发生了不同程度的降低。由表 4 可知,加入 CS 后,当 pH=7.4 时,Trp 残基的光谱特征峰 a 的 $\lambda_{\max}$ 蓝移 6 nm,荧光强度降低 4.54%,峰 b 的 $\lambda_{\max}$ 红移 3 nm,荧光强度降低了 12.98%;当 pH=5.2 时,峰

a 的 $\lambda_{\max}$ 蓝移 5 nm,峰 b 的 $\lambda_{\max}$ 红移 2 nm,荧光强度分别降低了 17.72%和 40.20%;当 pH=3.0 时,峰 a 的 $\lambda_{\max}$ 蓝移 4 nm,峰 b 的 $\lambda_{\max}$ 红移 4 nm,荧光强度分别降低 6.75%和 29.05%。pH=5.2 时猝灭效果最强,与前文发射荧光光谱中的结果相一致。以上结果表明在不同 pH 条件下,与 CA 三维荧光光谱相比,加入后 CS,峰 a 均发生明显蓝移,蛋白荧光基团残基微环境的非极性增强,且峰 b 均发生不同程度红移,反映出蛋白荧光基团残基的微环境的亲水性增强。由此可推测,CS 的加入和 pH 值的影响,使得 CA 的构象发生改变。

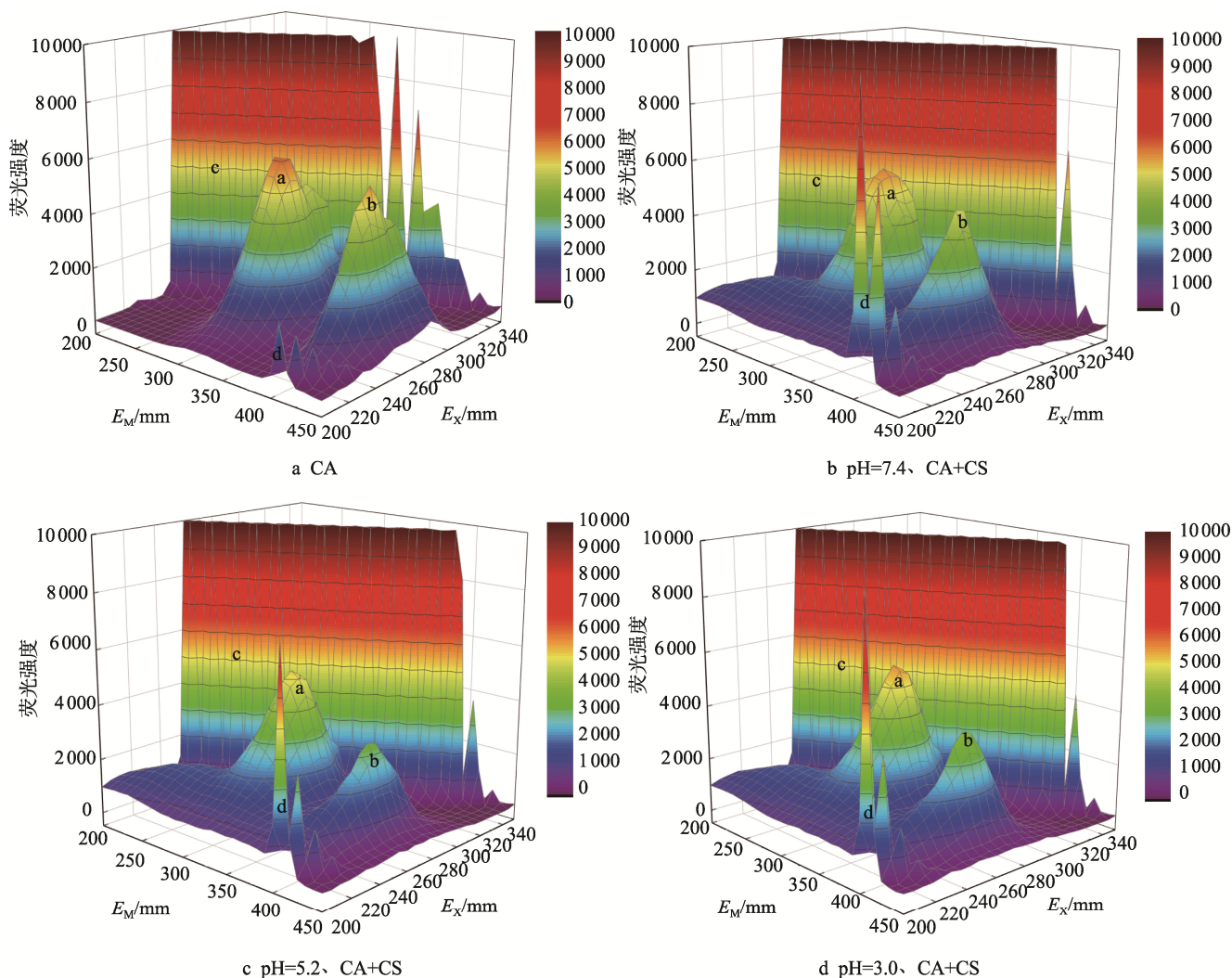


图 3 温度为 298 K 时, CS 与 CA 相互作用的三维荧光光谱
Fig.3 Three-dimensional fluorescence spectra of interaction between chitosan and casein at 298 K

表 4 CA 和 CA-CS 的三维荧光特征参数
Tab.4 Three-dimensional fluorescence characteristic parameters of casein and casein-chitosan

样品	峰 a 位置/nm	$\Delta\lambda/\text{nm}$	荧光强度	峰 b 位置/nm	$\Delta\lambda/\text{nm}$	荧光强度
酪蛋白	280/350	70	6 085	225/340	115	5 662
pH=7.4 (CA-CS)	280/344	64	5 809	228/340	112	4 927
pH=5.2 (CA-CS)	280/345	65	5 250	227/340	113	3 386
pH=3.0 (CA-CS)	280/346	66	5 674	229/340	111	4 017

2.6 傅里叶变换红外光谱分析

傅里叶变换红外光谱可用来进一步研究蛋白质二级结构的变化。通常根据光谱中酰胺I带($1\ 700\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$)和酰胺II带($1\ 600\sim 1\ 500\text{ cm}^{-1}$)的偏振情况,分析出蛋白质结构的变化,从而进一步说明蛋白质与配体发生了相互作用^[38]。也可通过光谱中的酰胺A带($3\ 400\sim 3\ 300\text{ cm}^{-1}$)的改变来辅助说明^[39]。

由图4可知,CA在酰胺I带和酰胺A带有较明显的特征吸收峰。在pH=7.4的条件下,CA与CS发生作用后,酰胺I带的峰位从 $1\ 688.94\text{ cm}^{-1}$ 偏移到 $1\ 653.49\text{ cm}^{-1}$;同时酰胺A带的峰位从 $3\ 445.72\text{ cm}^{-1}$ 偏移到 $3\ 433.98\text{ cm}^{-1}$ 。pH=5.2时,与pH=7.4时相比,酰胺I带的峰位从 $1\ 653.49\text{ cm}^{-1}$ 偏移到 $1\ 638.31\text{ cm}^{-1}$,且酰胺A带也发生了偏移;当pH=3.0时,酰胺I带的峰位发生偏移,酰胺A带未发生偏移。以上结果表明CA的结构在与CS结合后发生了变化,同时pH值的变化也会影响CA与CS结合后的构象。

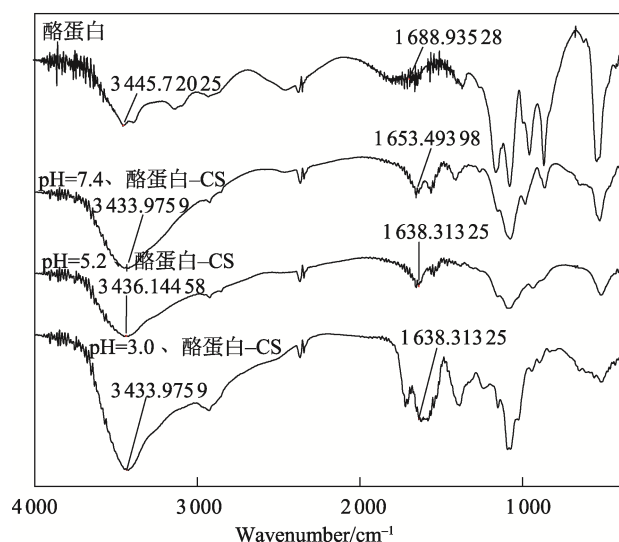


图4 温度为298 K时,CS与CA相互作用的傅里叶变换红外光谱

Fig.4 FTIR spectra of interaction between chitosan and casein at 298 K

3 结语

本文通过荧光光谱法、同步荧光光谱法、三维荧光光谱法以及傅里叶变换红外光谱法探究CA与CS的相互作用,以及CS的加入对CA产生的影响。研究表明,在3种pH条件下,CS的加入,使CA产生荧光猝灭现象。通过对荧光猝灭机理和热力学分析可知,该猝灭类型属于静态猝灭,二者通过静电相互作用结合。在pH=5.2时,猝灭效果最为明显,这可能与CA的等电点有关。同步荧光光谱和三维荧光光谱表明,CS的加入和pH值的影响改变了CA的空

间构象;傅里叶变换红外光谱中酰胺I带和酰胺A带的偏振情况表明CA的结构发生了变化。实验结果表明,CS的加入使得CA的结构发生变化,同时,pH值的变化也影响到了二者的结合。这将为蛋白质-多糖的相互作用提供实验依据,对乳制品的贮藏及开发具有重要意义。

参考文献:

- [1] 鲁孝俊. 壳聚糖处理柞蚕丝的染整加工性能研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2007.
LU Xiao-jun. Study on Dyeing and Finishing Properties of Tussah Silk Treated with Chitosan[D]. Suzhou: Soochow University, 2007.
- [2] NAIR M S, TOMAR M, PUNIA S, et al. Enhancing the Functionality of Chitosan- and Alginate-Based Active Edible Coatings/Films for the Preservation of Fruits and Vegetables: A Review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 304-320.
- [3] 沈秋霞, 李明元, 朱克永, 等. 3种保鲜剂及其复配对虹鳟鱼片冷藏品质的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 145-151.
SHEN Qiu-xia, LI Ming-yuan, ZHU Ke-yong, et al. Effects of Three Kinds of Preservatives and Their Complexation on the Refrigerated Quality of Rainbow Trout[J]. Food & Machinery, 2019, 35(11): 145-151.
- [4] CHANTARASATAPORN P, TEPKASIKUL P, KINGCHA Y, et al. Water-Based Oligochitosan and Nanowhisker Chitosan as Potential Food Preservatives for Shelf-Life Extension of Minced Pork[J]. Food Chemistry, 2014, 159: 463-470.
- [5] 郑家辉, 杨梅, 祖煦, 等. 羧甲基壳聚糖/壳聚糖涂膜保鲜千禧果[J]. 包装工程, 2022, 43(11): 107-114.
ZHENG Jia-hui, YANG Mei, ZU Xu, et al. Effect of Carboxymethyl Chitosan/Chitosan Layer by Layer Self-Assembly Coating on Preservation of Millennium Fruit[J]. Packaging Engineering, 2022, 43(11): 107-114.
- [6] 贺韵雅, 孙森. 壳聚糖及其衍生物在保健食品中的应用[J]. 食品安全导刊, 2019(3): 56.
HE Yun-ya, SUN Miao. Application of Chitosan and Its Derivatives in Health Food[J]. China Food Safety Magazine, 2019(3): 56.
- [7] NIAZ T, IMRAN M, MACKIE A. Improving Carvacrol Bioaccessibility Using Core-Shell Carrier-Systems under Simulated Gastrointestinal Digestion[J]. Food Chemistry, 2021, 353: 129505.
- [8] 吕长鑫, 巴俊文, 纪秀凤, 等. 响应面优化红树莓-蓝莓复合果酒澄清工艺研究[J]. 渤海大学学报(自然科学)

- 学版), 2020, 41(1): 30-36.
- LYU Chang-xin, BA Jun-wen, JI Xiu-feng, et al. Optimization of Clarification Technology of Raspberry-Blueberry Compound Wine by Response Surface Methodology[J]. Journal of Bohai University (Natural Science Edition), 2020, 41(1): 30-36.
- [9] 刘明珠, 魏凌峰, 蔡杰, 等. 多糖-纳米硒在食品包装中应用的研究进展[J]. 食品科技, 2022, 47(3): 1-7.
- LIU Ming-zhu, WEI Ling-feng, CAI Jie, et al. Polysaccharide-Selenium Nanoparticles: A Review of Their Application in Food Packaging[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(3): 1-7.
- [10] CHEN Kun, ZHAO Jia-jia, SHI Xiao-han, et al. Characterization and Antioxidant Activity of Products Derived from Xylose-Bovine Casein Hydrolysate Maillard Reaction: Impact of Reaction Time[J]. Foods, 2019, 8(7): 242.
- [11] 徐冰冰, 杨国超, 张求慧. 纸质食品包装材料防水防油改性的研究进展[J]. 包装工程, 2021, 42(3): 107-115.
- XU Bing-bing, YANG Guo-chao, ZHANG Qiu-hui. Research Progress of Water-Proof and Oil-Proof Modification of Paper Food Packaging Materials[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(3): 107-115.
- [12] ANITA F, ANNETT K, INTA S, et al. Stability and Release Properties of Double-Emulsions Stabilised by Caseinate-Dextran Conjugates[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(5): 943-952.
- [13] 顾瑞霞. 乳与乳制品的生理功能特性[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- GU Rui-xia. Physiological and Functional Characteristics of Milk and Dairy Products[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2000.
- [14] 葛伟. 超声预处理对酪蛋白美拉德反应及其产物功能特性的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- GE Wei. Effect of ultrasonic pretreatment on Maillard reaction of casein and functional characteristics of its products[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.
- [15] JIANG Yi-ke, ZHENG Ting, JIN Wei-ping, et al. Enhancing Intestinal Permeability of Theaflavin-3, 3'-Digallate by Chitosan-Caseinophosphopeptides Nanocomplexes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(6): 2029-2041.
- [16] CHE H Q, ZHANG H, TIAN Y J, et al. Exopolysaccharide from *Streptococcus Thermophilus* as Stabilizer in Fermented Dairy: Binding Kinetics and Interactions with Casein of Milk[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 1018-1025.
- [17] MOHAMMAD Y, SEID M J. Recent Advances in Application of Different Hydrocolloids in Dairy Products to Improve Their Techno-Functional Properties[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 88: 468-483.
- [18] 王芳, 张昊, 郭慧媛, 等. 酪蛋白与多糖相互作用研究及其在食品中的应用[J]. 中国乳业, 2012(8): 52-55.
- WANG Fang, ZHANG Hao, GUO Hui-yuan, et al. Study on the Interaction between Casein and Polysaccharide and Its Application in Food[J]. China Dairy, 2012(8): 52-55.
- [19] 李学鹏, 励建荣, 孟良玉, 等. 生物保鲜剂对中国对虾蛋白质生化特性的影响[J]. 渤海大学学报(自然科学版), 2013, 34(1): 48-51.
- LI Xue-peng, LI Jian-rong, MENG Liang-yu, et al. Effects of Different Bio-Preservative on Biochemical Characteristics of the Muscle Proteins from Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus Chinensis*)[J]. Journal of Bohai University (Natural Science Edition), 2013, 34(1): 48-51.
- [20] 徐佳, 吴正钧, 翁新楚, 等. 细菌胞外多糖及其在乳制品中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2017, 40(1): 33-37.
- XU Jia, WU Zheng-jun, WENG Xin-chu, et al. Bacterial Exopolysaccharides and Their Application in Dairy Products[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2017, 40(1): 33-37.
- [21] ZIELINSKA D, MARCINIAK-LUKASIAK K, KARBOWIAK M, et al. Effects of Fructose and Oligofructose Addition on Milk Fermentation Using Novel *Lactobacillus* Cultures to Obtain High-Quality Yogurt-like Products[J]. Molecules, 2021, 26(19): 5730.
- [22] QI P X, ONWULATA C I. Physical Properties, Molecular Structures, and Protein Quality of Texturized Whey Protein Isolate: Effect of Extrusion Moisture Content[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(5): 2231-2244.
- [23] 张颖, 钟莉, 杜静, 等. 多酚与蛋白质相互作用的荧光内滤效应校正方法的选择[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(1): 116-121.
- ZHANG Ying, ZHONG Li, DU Jing, et al. Assessment of Inner Filter Effect Corrections in Fluorimetry of the Interaction between Polyphenols and Proteins[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(1): 116-121.
- [24] XU Liang, HU Yan-xi, LI Yan-cheng, et al. Study on the Interaction of Paeoniflorin with Human Serum Albumin (HSA) by Spectroscopic and Molecular Docking Techniques[J]. Chemistry Central Journal, 2017, 11(1): 116.

- [25] 郝明皓. 三种多酚与 β -酪蛋白及 β -乳球蛋白相互作用研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2019.
- HAO Ming-hao. Study on the Interaction of Three Polyphenols with β -Casein and β -Lactoglobulin[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2019.
- [26] 张超, 傅玉颖, 沈亚丽, 等. 不同带电特性的壳聚糖/酪蛋白相互作用研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 63-71.
- ZHANG Chao, FU Yu-ying, SHEN Ya-li, et al. Studies on the Interaction between Chitosan and Casein with Different Charge Characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 63-71.
- [27] BAGHERI M, FATEMI M H. Fluorescence Spectroscopy, Molecular Docking and Molecular Dynamic Simulation Studies of HSA-Aflatoxin B1 and G1 Interactions[J]. Journal of Luminescence, 2018, 202: 345-353.
- [28] GOKARA M, SUDHAMALLA B, AMOORU D G, et al. Molecular Interaction Studies of Trimethoxy Flavone with Human Serum Albumin[J]. PLoS One, 2010, 5(1): 8834.
- [29] CHAI Wei-ming, OU-YANG Chong, HUANG Qian, et al. Antityrosinase and Antioxidant Properties of Mung Bean Seed Proanthocyanidins: Novel Insights into the Inhibitory Mechanism[J]. Food Chemistry, 2018, 260: 27-36.
- [30] HE Z Y, CHEN J, MOSER S E. Interaction of β -Lactoglobulin with Epigallocatechin-3-Gallate under Different Processing Conditions of pH and Temperature by the Fluorescence Quenching Method[J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(3): 357-366.
- [31] JIANG Jiang, ZHANG Zhi-peng, ZHAO Jing, 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.
- [32] 范金波, 麻奥, 闵爽, 等. 超声波处理对绿原酸与牛血清白蛋白结合作用的影响[J]. 中国食品学报, 2022, 22(3): 129-138.
- FAN Jin-bo, MA Ao, MIN Shuang, et al. Effect of Ultrasonic Treatment on the Binding of Chlorogenic Acid to Bovine Serum Albumin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(3): 129-138.
- [33] SURYAWANSHI V D, WALEKAR L S, GORE A H, et al. Spectroscopic Analysis on the Binding Interaction of Biologically Active Pyrimidine Derivative with Bovine Serum Albumin[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016, 6(1): 56-63.
- [34] 顾佳丽, 李东玲, 赵刚, 等. 辣条中糖精钠含量测定及其与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(5): 257-263.
- GU Jia-li, LI Dong-ling, ZHAO Gang, et al. Determination of Saccharin Sodium Content in Spicy Gluten and Spectroscopic Analysis on the Interaction of Saccharin Sodium with Bovine Serum Albumin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(5): 257-263.
- [35] 汤小玉, 罗云敬, 魏安琪, 等. 同步与三维荧光光谱法研究日落黄和人血清蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(10): 3129-3135.
- TANG Xiao-yu, LUO Yun-jing, WEI An-qi, et al. Application of Synchronous and Three-Dimensional Fluorescent Spectrometry in Studies on Interaction between Sunset Yellow and Human Serum Albumin[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(10): 3129-3135.
- [36] 吴春, 马琳, 孙天一. 改性柑橘皮渣对牛血清白蛋白吸附行为的研究[J]. 包装工程, 2021, 42(1): 25-31.
- WU Chun, MA Lin, SUN Tian-yi. Adsorption Behavior of Bovine Serum Albumin by Modified Citrus Peel Residue[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(1): 25-31.
- [37] ZHANG Qiu-lan, ZHU Zhi, NI Yong-nian. Interaction between Aspirin and Vitamin C with Human Serum Albumin as Binary and Ternary Systems[J]. Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 236: 118356.
- [38] NAIK K M, NANDIBEWOOR S T. Spectral Characterization of the Binding and Conformational Changes of Bovine Serum Albumin Upon Interaction with an Anti-Fungal Drug, Methylparaben[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2013, 105: 418-423.
- [39] 肖仕杰, 王巧华, 樊懿楷, 等. 傅里叶变换红外光谱的牛乳中 α s1-酪蛋白和 κ -酪蛋白含量的快速检测[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(12): 3688-3694.
- XIAO Shi-jie, WANG Qiao-hua, FAN Yi-kai, et al. Rapid Determination of As1-Casein and K-Casein in Milk Based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2021, 41(12): 3688-3694.