

儿茶素与卵黄免疫球蛋白互作的多重光谱分析及抑菌性变化

张孟军¹, 刘丽莉^{1*}, 杨协力², 郭净芳¹, 王浩阳¹

1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 食品加工与安全国家级教学示范中心, 食品微生物河南省工程技术研究中心, 功能食品资源研究与利用河南省教育厅科技创新团队, 河南 洛阳 471023
2. 河南科技大学丽正书院, 河南 洛阳 471023

摘要 鸡卵黄免疫球蛋白作为新生代抗体, 具有安全、性质稳定且无药物残留等特点, 对多种病原微生物具有抑制作用, 是抗生素最理想的替代品之一。但生产成本较高, 易被蛋白酶分解导致抑菌活性降低, 在一定程度上限制了其大规模应用。因此, 通过改性方式提升其经济效益及生物可利用度具有重要的意义。将儿茶素与鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)进行相互作用并制备其复合物, 为提升鸡卵黄免疫球蛋白的抑菌性能制备更加安全高效的抑菌剂提供支持。利用紫外-可见光谱、荧光光谱、傅里叶变换红外光谱研究儿茶素与鸡卵黄免疫球蛋白的互作机制, 并以鸡卵黄免疫球蛋白及鸡卵黄免疫球蛋白与儿茶素的混合物为对照, 研究鸡卵黄免疫球蛋白-儿茶素复合物的抑菌性能。随着儿茶素浓度的增加, 鸡卵黄免疫球蛋白的紫外可见吸收峰逐渐升高并发生蓝移; 儿茶素对鸡卵黄免疫球蛋白的荧光猝灭类型主要为静态猝灭, 二者结合形成结合位点数接近于1的复合物, 作用力类型为范德华力和氢键; 相较于鸡卵黄免疫球蛋白, 复合物二级结构中 β -折叠、 β -转角含量无明显变化, α -螺旋含量升高、无规卷曲含量降低, 表明儿茶素的引入使蛋白质构象发生变化; 相较于鸡卵黄免疫球蛋白与混合物, 复合物对金黄色葡萄球菌抑菌率平均分别提高了135.8%和9.95%, 在浓度大于 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对大肠杆菌抑菌率分别平均提高了15.74%和13.27%。儿茶素与鸡卵黄免疫球蛋白能够相互作用形成复合物, 相较于鸡卵黄免疫球蛋白与混合物, 复合物表现出较优的抑菌性能。该研究有助于了解儿茶素对鸡卵黄免疫球蛋白结构及功能的影响, 可为制备更加安全高效的抗生素替代品及其在食品加工过程中的性质变化提供理论指导。

关键词 儿茶素; 鸡卵黄免疫球蛋白; 相互作用; 光谱分析; 抑菌

中图分类号: TS253.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)07-2297-07

引言

卵黄免疫球蛋白(egg yolk immunoglobulin, IgY)因其安全且具有较高稳定性等优点, 在医药、功能食品、化工等领域得到了广泛应用。作为一种新生代抗体, 在人类保健、疾病的诊断和防治等方面成效显著, 具有极高的应用价值^[1-2]。目前有关于IgY的研究有很多, Karamzadeh^[3]等将益生菌与IgY联用研究其对犊牛生长性能、腹泻发生率和免疫系统的影响, 结果表明IgY能提高犊牛免疫力并有效预防其腹泻; 贺维朝等^[4]、Redwan等^[5]对其提取工艺及其在畜禽细菌性肠道疾病防治中的应用进行了研究, 结果表明IgY在抑制有害菌繁殖防治畜禽疾病方面可作为抗生素的替代品。IgY对

多种病原微生物具有良好的抑菌效果, 抑菌性能作为其一大重要功能特性, 在制备更加安全高效的抑菌剂, 缓解抗生素使用带来的药物残留及耐药性问题和制备高附加值天然产物功能食品等方面具有重要意义。然而IgY生产成本高, 且其在胃肠消化过程中易被蛋白酶分解而失活, 导致抗菌功效的发挥受到阻碍, 一定程度上限制了其大规模应用; 通过物理化学改性修饰等方式提高其生物利用率是目前亟待解决的问题。

多酚类物质可与蛋白质相互作用结合形成可逆或不可逆的复合物, 进而影响蛋白质的功能特性及生物可利用度^[6]。有报道将两者相互作用的机制对蛋白质性质及结构的影响进行了大量研究, 并将其广泛应用于功能食品及食品加工过程。Jia等^[7]用多光谱和建模方法比较 β -乳球蛋白与三种常

收稿日期: 2021-06-13, 修订日期: 2021-08-19

基金项目: 2021年洛阳市社会发展专项(2101021A), 国家自然科学基金项目(U1704114)资助

作者简介: 张孟军, 女, 1997年生, 河南科技大学食品与生物工程学院硕士研究生 e-mail: 18438612672@163.com

* 通讯作者 e-mail: yangliuyilang@126.com

见多酚的结合相互作用机制,为多酚在乳品加工业中的应用奠定了理论基础。Jia 等^[8]分析了 EGCG 与乳清分离蛋白进行共价相互作用对其功能性质的影响,结果表明其起泡性和乳化性均得到了提高。周绪霞等^[9]研究了茶多酚对蛋清蛋白的影响,得出相互作用后蛋白质的凝胶特性及乳化稳定性均得到了提升。大量研究表明多酚与蛋白质之间的相互作用可以优化大多数蛋白质的特性^[7-10]。然而目前有关 IgY 改性以改善其性质的研究主要集中在糖基化、mPEG 修饰等对其稳定性的影响,将多酚类物质与 IgY 进行相互作用制备复合物并探究其结构及抑菌性能变化的研究鲜有报道。牛梦尧^[11]等考察了 3 种天然提取物对卵黄免疫球蛋白抑制胰脂肪酶作用的影响,结果表明三种物质均表现出增效作用,其中茶多酚效果最明显,但其增效机制尚不清楚。明确多酚类物质与 IgY 的互作机制对研究其结构、功能的变化及其在各领域内的应用具有重要的意义。

故本研究通过多重光谱分析探究儿茶素与 IgY 的相互作用机制,即紫外可见光谱法分析两者相互作用后蛋白质氨基酸微环境的变化,荧光光谱法对其荧光猝灭机理、结合常数、结合位点、热力学参数及相互作用力类型进行判定,傅里叶变换红外光谱法分析相互作用后二级结构的变化。并研究其复合物的抑菌性能变化。以期为提高 IgY 的生物利用率及制备更加安全高效的抑菌剂用以替代抗生素提供新思路,同时为 IgY 在功能食品中应用及加工过程中的性质变化提供理论基础。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

新鲜鸡蛋购于洛阳大张超市;儿茶素(AR)购自合肥博美生物科技有限公司;LB 培养基购自青岛海博生物技术有限公司;试验所需菌种均为河南科技大学食品学院实验室提供。

1.2 仪器

TDZ5-BP 高速冷冻离心机,长沙湘锐有限公司;LJG-10D 真空冷冻干燥机,上海旦鼎国际贸易有限公司;UV-2600 紫外-分光光度计,日本日立公司;Cary eclipse 荧光分光光度计,美国 Aglient Cary elipse 公司;VERTEX70 傅里叶红外光谱仪,德国 Bruker 公司。

1.3 方法

1.3.1 IgY、混合物及复合物的制备

IgY 的分离与纯化按照张曼等^[12]的方法并加以改进,将硫酸铵沉淀法制得的 IgY 溶液在 4 °C 条件下透析(截留分子量为 8 000~14 000 Da)48 h 除盐。经真空冷冻干燥制得 IgY 冻干粉。将 IgY 与儿茶素按照质量浓度为 1:1 混合,一份不做任何处理,另一份室温下于磁力搅拌器中搅拌 6 h,经真空冷冻干燥制得混合物及复合物微粒。

1.3.2 紫外可见光谱法测定儿茶素与 IgY 的相互作用

参考文献^[13]的方法并加以改进,将 IgY 配制成 0.5 mg·mL⁻¹ 的溶液,分别移取 4 mL 于编号 1—5 的离心管中,加入 50 μL 不同质量浓度的儿茶素溶液,使其终浓度分

别为 0, 6.25, 12.5, 18.75 和 25 μg·mL⁻¹。充分混匀后静置 20 min,扫描波长:250~350 nm。

1.3.3 荧光光谱法测定儿茶素与 IgY 的相互作用

按照 1.3.2 方法制备 3 组样品溶液,分别在 291, 298 和 310 K 条件下恒温水浴 5 min。测定条件为:激发波长(280 nm),激发和发射狭缝(10 nm),扫描范围(300~500 nm)。

1.3.4 傅里叶红外光谱法测定儿茶素与 IgY 的相互作用

将 IgY 与复合物分别与干燥后的溴化钾粉末按照 1:100 (m/m) 混匀研细后压片,分辨率为 4 cm⁻¹,扫描范围:4 000~400 cm⁻¹。用 Peak Fit v4.12 软件分析 IgY 与复合物酰胺 I 带蛋白质二级结构相对含量变化。

1.3.5 菌悬液制备及抑菌活性的测定

参考文献^[14]的方法制备菌悬液并调整菌液浓度至 10⁶~10⁸ CFU·mL⁻¹,将菌悬液与灭菌后的固体培养基按照 1:100 的比例混匀后铺于平板。采用打孔法测定抑菌活性。每孔加入 200 μL 的 5 mg·mL⁻¹ 的样品,恒温培养箱中 37 °C 培养 24 h。

1.3.6 IgY、混合物、复合物的抑菌率测定

参照文献^[15]方法并加以改进,取 7 只试管分别加入 4 mL 液体培养基灭菌后备用,向灭菌后的 1—5 号试管中加入 100 μL 菌液及 1 mL 一定浓度的样品溶液使其终浓度分别为 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 和 0.2 mg·mL⁻¹,6 号试管加入 1 mL 灭菌后的蒸馏水及 100 μL 菌液作为阳性对照,7 号试管只加培养基作为阴性对照,置于恒温摇床中 37 °C 培养 12 h 后 600 nm 下测定光密度(optical density, OD)值。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{阳性对照 OD 值} - \text{试验 OD 值}}{\text{阳性对照 OD 值} - \text{阴性对照 OD 值}} \times 100\%$$

(1)

1.4 数据处理

每组试验均做 3 次平行,利用 Origin 9.0 软件对紫外光谱、荧光光谱数据进行平滑预处理及作图,利用 DPS 7.05 软件进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 紫外可见光谱分析儿茶素与 IgY 的相互作用

小分子物质与蛋白质结合后会引引起蛋白质结构发生改变,紫外-可见光谱可通过峰强度及峰位的变化反映其如何进行相互作用。峰强度及峰位的变化分别反映两者相互作用的强弱及蛋白质大分子疏水氨基酸残基所处的微环境是否发生了改变^[16]。蛋白质中的色氨酸及酪氨酸残基在紫外-可见光谱中吸收峰出现在 280 nm 附近^[13]。设定 IgY 浓度为 0.5 mg·mL⁻¹,向其中加入不同浓度的儿茶素后观察两者结合的紫外吸收光谱,其光谱变化如图 1 所示。儿茶素浓度越大,紫外吸收峰值越高,且随其浓度增强依次增大。最大吸收峰波长从 279 nm 蓝移至 276 nm,说明 IgY 的构象发生了改变。原因可能是儿茶素的加入能够使 IgY 中肽链发生改变,使其更加舒展,有助于蛋白质释放出分子内部的发色基团残基中的芳香杂环,进而使其紫外吸收强度增加。

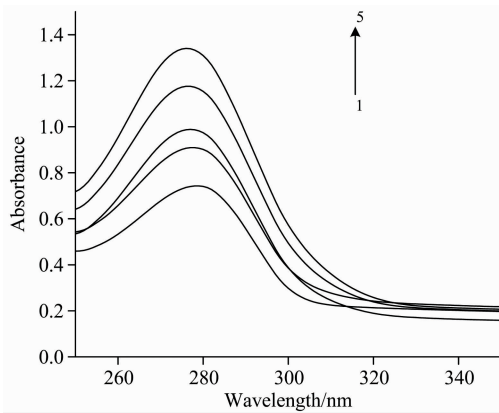


图1 不同质量浓度的儿茶素与IgY结合的紫外光谱图
IgY质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；1—5儿茶素的质量浓度分别为0, 6.25, 12.5, 18.75, $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，图2同

Fig. 1 Ultraviolet-visible spectrum of different concentrations of catechins binding to IgY

The mass concentration of IgY was $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; The mass concentrations of 1 to 5 catechins were 0, 6.25, 12.5, 18.75, $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, as shown in Figure 2

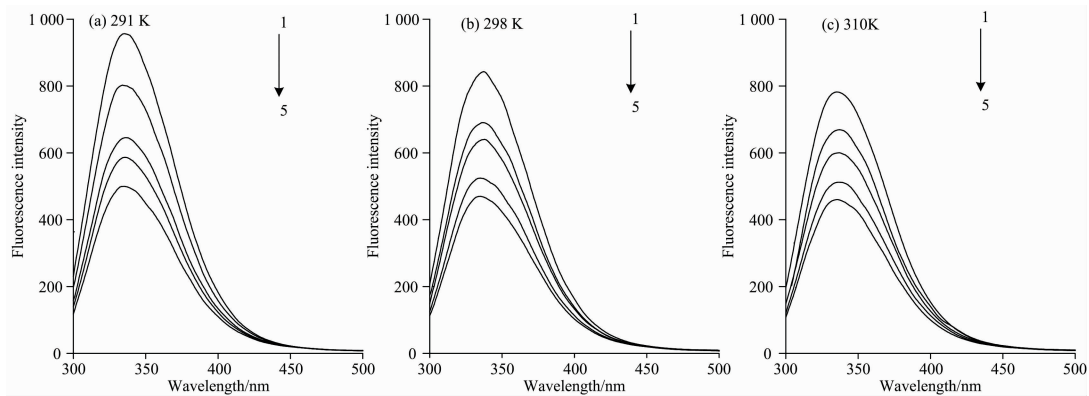


图2 不同温度和质量浓度的儿茶素与IgY结合的荧光光谱图

(a): $18 \text{ }^\circ\text{C}$; (b): $25 \text{ }^\circ\text{C}$; (c): $37 \text{ }^\circ\text{C}$

Fig. 2 Fluorescence spectra of different concentrations of catechins and different temperature binding to IgY

(a): $18 \text{ }^\circ\text{C}$; (b): $25 \text{ }^\circ\text{C}$; (c): $37 \text{ }^\circ\text{C}$

2.2.2 荧光猝灭机理的判定

猝灭剂对蛋白质分子的荧光猝灭类型分为两种。一种是由于离子扩散导致猝灭常数随温度的升高而增大的动态猝灭；另一种为形成了复合物而导致猝灭常数变化趋势与其相反的静态猝灭。在多酚与蛋白质相互作用的研究中，常用Stern-Volmer方程判断其猝灭类型。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

式(2)中： F_0 和 F 分别为未添加儿茶素和儿茶素浓度为 Q 时IgY的荧光强度， $[Q]$ 为儿茶素的浓度($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)，式(3)同； K_q 为猝灭速率常数， K_{sv} 为动态猝灭常数； τ_0 为猝灭剂不存在时生物大分子的平均寿命，约为 10^{-8} s 。

2.2 荧光光谱分析儿茶素与IgY的相互作用

2.2.1 儿茶素与IgY结合的荧光光谱分析

蛋白质分子中的生色基团可以在特定波长下产生特征峰，除去生色基团中自身发射荧光较弱且很容易被猝灭剂猝灭的氨基酸残基，主要研究色氨酸(348 nm)的荧光光谱变化^[17]。以280 nm为激发波长，研究不同质量浓度的儿茶素在18, 25和 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 与IgY结合的荧光光谱，结果如图2(a, b, c)所示。

儿茶素作为一种小分子物质与IgY结合，降低了蛋白质分子中发射荧光物质的量子产率，使得其荧光强度降低，产生荧光猝灭现象。图2显示了不同温度处理下不同质量浓度的儿茶素与IgY结合的荧光光谱图。由图2可知，在同一温度下，随着儿茶素浓度的增加，IgY的荧光猝灭效果均呈现增强趋势，并发生红移现象。进一步表明两者之间产生了相互作用，且在这种相互作用的促进下形成了荧光强度较低的复合物。原因可能是儿茶素的加入导致IgY中色氨酸周围微环境发生变化，促进两者之间疏水相互作用及氢键的形成。文鹏程等^[18]研究了茶多酚对牛奶蛋白结构的影响，结果与本文相似。热处理对IgY的荧光强度也有影响，在 $291 \sim 310 \text{ K}$ 温度范围内，随着温度的升高，IgY荧光强度呈现逐渐降低的趋势，儿茶素存在时荧光猝灭效果也有类似的变化。

以 F_0/F 为因变量，对 $[Q]$ 进行线性拟合，结果如图3所示，进而通过式(2)得出 K_q 及 K_{sv} ，结果如表1所示。由图3及表1可知，儿茶素与IgY的Stern-Volmer曲线具有良好的线性关系。 K_{sv} 随着温度的升高呈现降低趋势，这表明儿茶素与IgY相互作用的猝灭机制可能是静态猝灭。经研究表明，各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$ 。由表1可知，291, 298和 310 K 条件下 K_q 均远远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$ ，进一步表明两者相互作用的猝灭机制主要为儿茶素与IgY结合形成了基态稳定复合物而导致的静态猝灭。王晨等^[19]在花青素与小麦蛋白相互作用研究中发现花青素与麦谷蛋白相互作用的荧光猝灭方式为静态猝灭。与本研究结果相似。

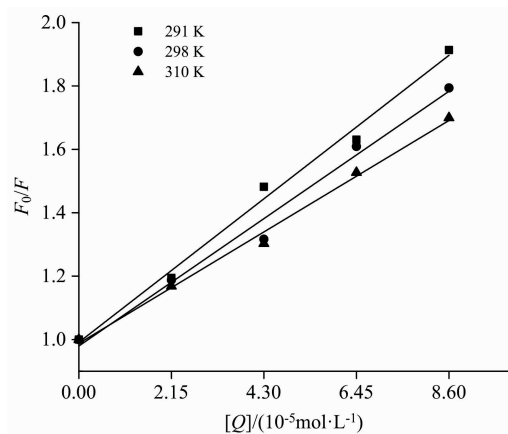


图 3 不同温度条件下儿茶素猝灭 IgY 的 Stern-Volmer 图
Fig. 3 Stern-Volmer plots of IgY quenched by catechin at different temperatures

表 1 儿茶素-IgY 复合物的荧光猝灭常数及线性相关系数
Table 1 Quenching rate constants and correlation coefficients of catechin and IgY

温度/ K	$K_{sv}/$ ($L \cdot mol^{-1}$)	$K_q/$ [$L \cdot (mol \cdot s)^{-1}$]	R^2
291	1.053×10^4	1.053×10^{12}	0.989 9
298	0.934×10^4	0.934×10^{12}	0.982 0
310	0.818×10^4	0.818×10^{12}	0.992 6

2.2.3 结合常数和结合位点的计算

对于猝灭类型为静态猝灭的小分子与蛋白质的相互作用,可采用式(3)计算其结合常数 K_A 及结合位点 n 。

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3)$$

根据式(3)将数据经拟合后绘制双对数图,并计算出 K_A 和 n ,结果如图 4 和表 2 所示。由表 2 可知,3 个温度下,儿茶素与 IgY 均存在着强烈的相互作用。均形成了结合位点数接近于 1 的静态复合物,即二者结合比例接近 1:1。

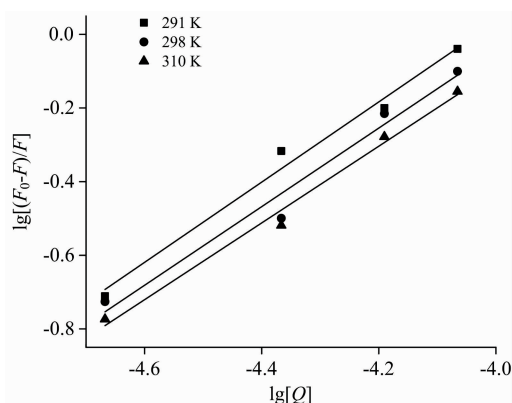


图 4 不同温度条件下 IgY-儿茶素复合物的双对数图
Fig. 4 Logarithmic diagram of IgY-catechin complexes at different temperatures

表 2 儿茶素-IgY 复合物的表观结合常数、结合位点数及线性相关系数

Table 2 Apparent binding constant, number of binding sites and linear correlation coefficient of catechin-IgY complex

温度/K	$K_A/(L \cdot mol^{-1})$	n	R^2
291	2.455×10^4	1.089	0.979
298	1.694×10^4	1.067	0.961
310	1.183×10^4	1.042	0.984

2.2.4 热力学参数及相互作用力类型判定

热力学参数焓变 ΔH 、吉布斯自由能变化 ΔG 、熵变 ΔS 根据刘建奎^[20] 的方法进行计算并进行作用力类型判断,结果如表 3 所示。由表 3 可知,儿茶素与 IgY 互作结合可自发进行,且该过程为放热反应,这与 2.2.3 中 K_A 随温度变化的趋势结果一致。由 ΔH 及 ΔS 均小于 0 可以得出,范德华力及氢键作用力是儿茶素与 IgY 互作结合形成复合物的主要作用力类型。

表 3 儿茶素-IgY 复合物的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of catechin-IgY complex

温度/ K	$\Delta H/$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)	$\Delta G/$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)	$\Delta S/$ ($J \cdot K^{-1}$)
291		-24.456	-47.282
298	-38.215	-24.125	-47.282
310		-24.171	-45.303

2.3 傅里叶变换红外光谱分析儿茶素与 IgY 的相互作用

通过傅里叶变换红外光谱进一步研究 IgY 与复合物蛋白质构象的变化,结果如图 5 所示。

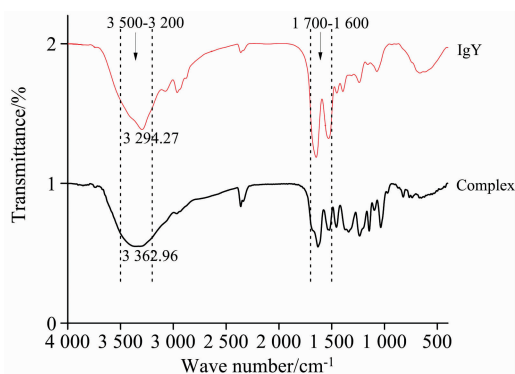


图 5 IgY 和 IgY-儿茶素复合物的傅里叶变换红外光谱图
Fig. 5 Fourier transform infrared spectra of IgY and IgY-catechins complex

由图 5 可知,相较于 IgY,复合物酰胺 I 带的峰位从 1646.90 cm^{-1} 蓝移至 1631.14 cm^{-1} 。酰胺 II 带从 1529.49 cm^{-1} 蓝移至 1520.94 cm^{-1} ,说明儿茶素的引入使 IgY 的二级结构发生了变化。刘勤勤等^[21] 研究发现茶多酚与大豆分离蛋白相互作用也引起其酰胺 I 带和酰胺 II 带发生蓝移,与本研究结果一致。 $3500 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰为

O—H的特征峰，由图5可以看出，复合物此范围内的峰形较IgY变宽，说明复合物形成了新的氢键，相比于IgY，其缔合程度增大。对酰胺I带进行去卷积处理，通过Gaussian拟合计算峰面积进而得出各类二级结构的相对百分含量，结果如表4所示。由表4可知，相较于IgY，复合物 β -折叠、 β -转角含量变化不明显， α -螺旋含量升高，无规卷曲含量降低。 α -螺旋是蛋白质二级结构中的主要有序结构，与 β -折叠相同，二者皆通过分子内氢键维持。 α -螺旋含量的升高表明儿茶素的引入促进蛋白质分子内新的氢键的形成，推测新的氢键可能为儿茶素的酚羟基与IgY中的羰基结合导致氢键的重排所致。与上述结果一致。

表4 IgY与IgY-儿茶素复合物酰胺I带蛋白质二级结构相对含量

Table 4 The relative content of secondary structure of protein in amide I band of IgY and IgY-catechin complex

样品	β -折叠 /%	无规卷曲 /%	α -螺旋 /%	β -转角 /%
IgY	42.81	23.12	19.68	14.39
复合物	42.53	17.84	25.16	14.47

表5 IgY、混合物与IgY-儿茶素复合物的抑菌率

Table 5 Bacteriostatic rate of IgY, mixture and IgY-catechin complex

菌种	样品	抑菌率/%				
		0.025 mg·mL ⁻¹	0.05 mg·mL ⁻¹	0.1 mg·mL ⁻¹	0.15 mg·mL ⁻¹	0.2 mg·mL ⁻¹
大肠杆菌	IgY	22.08±0.86 b	23.98±0.44 b	29.88±0.21 b	30.75±0.11 b	32.11±1.15 b
	混合物	27.60±0.68 a	29.07±1.03 a	29.48±0.73 b	31.17±0.17 b	34.26±0.40 b
	复合物	22.33±0.86 b	24.38±0.82 b	34.14±0.21 a	35.41±0.62 a	37.83±0.76 a
金黄色葡萄球菌	IgY	24.97±1.27 c	24.85±0.91 c	26.99±1.13 c	41.85±1.86 c	54.49±1.53 c
	混合物	61.58±1.20 b	67.19±0.29 b	68.01±0.13 b	70.46±1.16 b	74.12±0.25 b
	复合物	68.29±0.30 a	72.16±0.83 a	75.06±0.49 a	79.15±0.29 a	80.79±1.12 a

注：同列字母a, b, c表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著

Note: Significant differences (a, b, c) at $p < 0.05$ is indicated by different letters in the same group

由表5结果可知，IgY、混合物及复合物浓度与其对大肠杆菌以及金黄色葡萄球菌的抑菌率呈现正相关，当浓度小于 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，对大肠杆菌的抑制率从大到小表现为混合物>复合物>IgY；而当浓度大于 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，复合物表现出最好的抑制作用，对大肠杆菌的抑菌率较IgY和混合物分别平均提高了15.74%和13.27%。对于金黄色葡萄球菌，抑菌率表现为复合物>混合物>IgY，复合物较IgY和混合物抑菌率分别平均提高了135.8%和9.95%。图6为三种样品浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的抑菌圈结果，在培养24 h的情况下，IgY抑菌圈较小，原因可能是培养时间较长，菌浓度较大，IgY部分成为了氮源导致的。结合图6可以看出，复合物的抑菌效果最好。以混合物为对照进一步证实了复合物的形成，且表明抑菌效果的提升来源于复合物。

3 结论

(1)儿茶素与IgY相互作用的多重光谱分析结果表明：

2.4 IgY、混合物及复合物抑菌性能对比分析

有研究表明，鸡卵黄免疫球蛋白IgY能够使细胞聚集，通过降低细菌细胞膜表面疏水性及粘附性进而抑制多种病原微生物的生长和繁殖^[22]。其抑菌活性具有重要的生理意义，尤其当这种抑制作用发生在肠道消化过程时，IgY有利于抑制有害菌的生长并将其排除体外，这也使得其有望成为抗生素的理想替代品之一。本研究将儿茶素与IgY进行相互作用制备其复合物并以IgY与儿茶素的混合物为对照组，对其抑菌性能进行了研究。结果如图6及表5所示。

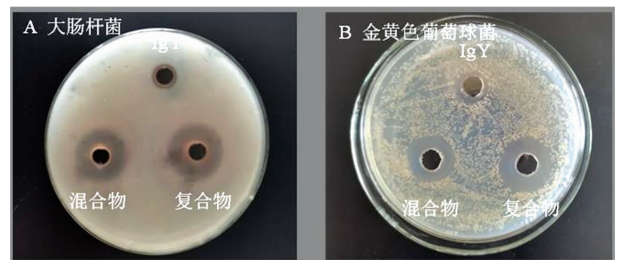


图6 IgY、混合物与IgY-儿茶素复合物的抑菌效果图

Fig. 6 Antibacterial effect of IgY, mixture and IgY-catechin complex

蛋白质构象发生了改变，儿茶素与IgY两者相互作用结合形成了结合位点接近于1的基态稳定复合物，其荧光猝灭机制主要为静态猝灭，范德华力及氢键为二者互作结合的主要作用力。与IgY相比，复合物二级结构含量发生改变，其中 β -折叠、 β -转角含量无明显变化， α -螺旋含量升高、无规卷曲含量降低。

(2)对比分析IgY、混合物、复合物的抑菌效果。得出相比于IgY和混合物，复合物对金黄色葡萄球菌的抑菌率分别平均提高了135.8%和9.95%，在浓度大于 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对大肠杆菌的抑菌率分别平均提高了15.74%和13.27%。复合物表现出最好的抑菌效果。

(3)结合多重光谱分析与抑菌效果分析，得出儿茶素与IgY可相互作用结合形成复合物，其抑菌效果优于IgY，可为抗生素替代品的制备提供理论指导及为IgY在食品加工中的应用提供理论支持。

References

- [1] Hu B C, Yang X D, Guo E P, et al. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(5): 2565.
- [2] Abbas A T, El-Kafrawy S A, Sohrab S S, et al. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2019, 15(1): 264.
- [3] Karamzadeh D A, Towhidial A, Zhandia M, et al. *Animal*, 2020, 15(2): 100124.
- [4] HE Wei-chao, ZHANG Hui-yan, WANG Hao, et al(贺维朝, 张会艳, 王浩, 等). *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine (中国畜牧兽医)*, 2021, 48(2): 640.
- [5] Redwan E M, Aljadawi A A, Uversky V N. *Poultry Science*, 2020, 100(3): 100956.
- [6] YAO Qi-feng, WU Zheng-qi, CHEN Xiao-qiang, et al(姚其凤, 吴正奇, 陈小强, 等). *Science and Technology of Food Industry(食品工业科技)*, 2019, 40(8): 337.
- [7] Jia J J, Gao X, Hao M H, et al. *Food Chemistry*, 2017, 228: 143.
- [8] Jia Z B, Zheng M, Tao F, et al. *LWT—Food Science and Technology*, 2016, 66: 305.
- [9] ZHOU Xu-xia, CHEN Ting, LÜ Fei, et al(周绪霞, 陈婷, 吕飞, 等). *Food Science(食品科学)*, 2018, 39(16): 13.
- [10] ZHANG Chuan-ying, PENG Xin, RAO Heng-jun, et al(张传英, 彭鑫, 饶恒军, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2021, 41(6): 1701.
- [11] NIU Meng-xian, SUI Jian-xin, LIN Hong, et al(牛梦宪, 隋建新, 林洪, 等). *Food Science and Technology(食品科技)*, 2018, 43(7): 203.
- [12] ZHANG Man, LIU Xi, CONG Ri-hua, et al(张曼, 柳溪, 丛日华). *Journal of Tianjin Agricultural University(天津农学院学报)*, 2020, 27(2): 56.
- [13] LI Qing-shu, CHENG Lin, DENG Hong, et al(李庆舒, 程琳, 邓红, 等). *Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业)*, 2020, 46(3): 180.
- [14] JIANG Ming(蒋鸣). *China Condiment(中国调味品)*, 2021, 46(1): 63.
- [15] NI Xiao-xia, YE Cai-fa, SHEN Qiu-lian, et al(倪晓霞, 叶财发, 沈秋莲, 等). *Guiding Journal of TCM(中医药导报)*, 2020, 26(15): 25.
- [16] ZHU Ying, WANG Zhong-jiang, LI Yang, et al(朱颖, 王中江, 李杨, 等). *Transactions of The Chinese Society of Agricultural Machinery(农业机械学报)*, 2018, 49(6): 368.
- [17] CHEN Shuang, WANG Xiao-dan, LI Rui, et al(陈爽, 王小丹, 李瑞, 等). *Food Science(食品科学)*, 2019, 40(23): 8.
- [18] WEN Peng-cheng, JIAO Yao-yao, ZHANG Wei-bing, et al(文鹏程, 焦瑶瑶, 张卫兵, 等). *Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业)*, 2020, 46(8): 40.
- [19] WANG Chen, XIE Yan-li, FAN Ting-ting(王晨, 谢岩黎, 范亭亭). *Food Science(食品科学)*, 2019, 40(20): 60.
- [20] LIU Jian-lei, XING Xiao-juan, ZHOU Rui, et al(刘建垒, 邢效娟, 周瑞, 等). *Food Science(食品科学)*, 2017, 38(5): 7.
- [21] LIU Qin-qin, ZHU Ke-xue, GUO Xiao-na, et al(刘勤勤, 朱科学, 郭晓娜, 等). *Food Science(食品科学)*, 2015, 36(17): 43.
- [22] Zhang Q, Lin H, Sui J X, et al. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(1): 136.

Multispectral Analysis of Interaction Between Catechins and Egg Yolk Immunoglobulin and the Change of Bacteriostasis

ZHANG Meng-jun¹, LIU Li-li^{*}, YANG Xie-li², GUO Jing-fang¹, WANG Hao-yang¹

1. College of Food and Bioengineering, National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Processing and Security, Food Microbiology Engineering Technology Research Center of Henan Province, Research and Utilization of Functional Food Resources Science and Technology Innovation Team of Henan Provincial Department of Education, Luoyang 471023, China
2. LIZHENG College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

Abstract As a Cenozoic antibody, chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) has the characteristics of safety, stability and no drug residue. It has an inhibitory effect on a variety of pathogenic microorganisms. IgY is one of the ideal substitutes for antibiotics. However, it cannot be used on an extensive scale application to a certain extent because of its high production cost and low antibacterial activity caused by protease decomposition. Therefore, it is of great significance to improve its economic benefit and bioavailability using modification. In this study, catechin interacted with IgY to prepare its complex. It provides support for improving the antibacterial properties of IgY and preparing safer and more efficient antibacterial agents. The interaction mechanism between catechin and IgY was studied via UV-Vis, FS and FT-IR. The antibacterial properties of the IgY-catechin complex were studied by using IgY and a mixture of IgY and catechin as control. With the increase of catechin concentration, the UV-Vis absorption peak value of IgY gradually increased and showed a blue shift. The quenching type of IgY by catechins is mainly static quenching. The IgY and catechin combine to form a complex with a number of binding sites close to 1. The interaction types were van der Waals force and hydrogen bond. Compared with IgY, the content of β -folded and β -corner in the secondary structure of the IgY-catechin complex had no significant change, while the content of α -helix was increased and irregular convolution was decreased. It indicated that the conformation of protein was changed due to the introduction of catechin. Compared with IgY and a mixture of IgY and catechin, the antibacterial rate of IgY-catechin complex against *Staphylococcus aureus* was increased by 135.8% and 9.95% on average, respectively. When the concentration was greater than $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the antibacterial rate against *Escherichia coli* was increased by 15.74% and 13.27%, respectively. Catechins and IgY could form a complex, which showed better antibacterial properties than IgY and mixture of IgY and catechin. This study is helpful in understanding the effects of catechins on the structure and function of IgY. It can also provide theoretical support for preparing safer and more efficient antibiotic substitutes. In addition, this study can supply theoretical guidance for the property changes of IgY during food processing.

Keywords Catechin; Egg yolk immunoglobulin; Interaction; Spectroscopic analysis; Bacteriostasis

(Received Jun. 13, 2021; accepted Aug. 19, 2021)

* Corresponding author