
分类号：TS201.1

单位代码：10363

密 级：公开

学 号：2220530104

蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷稳定性影响及其口服液的
制备

THE EFFECT OF MAJOR ROYAL JELLY PROTEINS
ON THE STABILITY OF BLUEBERRY
ANTHOCYANINS AND PREPARATION OF ITS
ORAL LIQUID

学生姓名： 宁方方

指导老师： 张国强（教授）

专 业： 食品科学与工程

研究方向： 食品生物技术

论文答辩日期： 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：宁方方

日期：2025 年 5 月 18 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☐。

学位论文作者签名：宁方方

指导教师签名：张明

日期：2025 年 5 月 18 日

日期：2025 年 5 月 18 日

蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷稳定性影响及其口服液的制备

摘 要

蓝莓因富含花色苷及多种营养物质备受人们喜爱，市场上蓝莓的需求量呈现增长趋势。但蓝莓在加工过程中会造成花色苷的损失，为了更有效的保护花色苷，本文以蛋白质与小分子之间的相互作用为基础，研究了蜂王浆主蛋白（MRJPs）对蓝莓花色苷（BA）在加工条件下的稳定性影响、相互作用机制及其口服液的制备等相关内容。实验结果如下：

（1）MRJPs 对 BA 稳定性的影响

在光照、蔗糖、维生素 C 和加热等加工条件下 MRJPs 对 BA 含量及颜色的稳定性具有显著效果。其中 0.1 mg/mL 的 MRJPs 与 0.25 mg/mL 的 BA 以体积比 1:1 混合得到的 MRJPs-BA 复合物对花色苷的稳定效果最显著，特别是光照、蔗糖条件下 MRJPs-BA 复合物中花色苷的含量比 BA 组分别提高了 15.76%、20%。实验表明，VC 和高温加工下虽然加速了蓝莓花色苷的降解，但 MRJPs 的添加可在一定程度上保护蓝莓花色苷的稳定性。经热降解动力学分析，蓝莓花色苷符合一级热降解动力学，MRJPs 的加入没有改变花色苷热降解动力学模型，但缓解了花色苷降解速率。体外模拟消化表明胃模拟环境下的花色苷具有较高的稳定性，而肠模拟环境下由于温度和 pH 的变化，则使得 BA 和 MRJPs-BA 复合物都发生了及其显著的降解。但经过 2 小

时肠消化后可发现, MRJPs-BA 复合物的花色苷保留率显著大于 BA 组, 表明 MRJPs 在模拟消化过程中减缓了花色苷的降解。

(2) MRJPs 与花色苷相互作用机制研究

实验采用一系列光谱技术探究了 MRJPs 保护花色苷(C3G)的作用机制。荧光结果表明, C3G 的加入引起了 MRJPs 荧光强度的变化, 同时最大吸光波长发生轻微偏移(从 331.6 nm 偏移至 333.4 nm), 表明 MRJPs 中氨基酸环境发生变化。荧光淬灭机制中, 计算出 MRJPs-BA 之间的荧光淬灭速率超出了理论扩散极限, 确定了 MRJPs 和 C3G 之间是由静态淬灭引导的淬灭机制。FTIR 和 CD 光谱分析进一步表明 C3G 结合诱导 MRJPs 二级结构的构象变化, 其特征是 α -helix 含量的降低和 β -sheet 含量的增加。此外, 2D 分子模拟对接表明, MRJPs 与 C3G 之间的结合主要通过氢键和静电驱动; 3D 分子模拟对接则可看出, MRJPs 可以与 C3G 结合并封装 C3G 分子, 从而为 MRJPs 增强蓝莓花色苷的稳定性提供基础。

(3) 添加蜂王浆主蛋白的蓝莓花色苷口服液的制备

研究以蓝莓花色苷浓缩液、MRJPs 为基础, 通过添加牛磺酸、葡萄糖酸铜为营养增强剂, 用木糖醇、柠檬酸作调味剂制备一款含蜂王浆主蛋白的蓝莓花色苷口服液。经多因素正交实验、风味调配及模糊综合感官评价实验得出口服液最佳调配方案为: 蓝莓花色苷浓缩液(86 mg/100 mL)为 70%, 蜂王浆主蛋白使用量为 0.02%, 牛磺酸使用量为 0.25%, 葡萄糖酸铜使用量为 0.001%, 木糖醇使用量为 5%, 柠檬酸使用量为 0.3% (以 100 mL 口服液为标准)。

关键词：蜂王浆主蛋白，蓝莓花色苷，稳定性，机制研究，口服液

THE EFFECT OF MAJOR ROYAL JELLY PROTEINS ON THE STABILITY OF BLUEBERRY ANTHOCYANINS AND PREPARATION OF ITS ORAL LIQUID

ABSTRACT

Blueberries are loved by people because of their rich anthocyanins and a variety of nutrients, and the demand for blueberries in the market is increasing. However, the processing of blueberries will cause the loss of anthocyanins. In order to protect anthocyanins more effectively, based on the interaction between proteins and small molecules, this paper studied the influence of major royal jelly proteins (MRJPs) on the stability of blueberry anthocyanin (BA) under processing conditions, the interaction mechanism and the preparation of its oral liquid and other related contents. The experimental results are as follows:

(1) The effect of MRJPs on the stability of BA

Under various processing conditions such as light exposure, sucrose concentration, vitamin C presence, and heating, MRJPs significantly influence the stability of both BA content and color. Among them, the MRJPs-BA complex obtained by mixing 0.1 mg/mL MRJPs and 0.25 mg/mL BA at a volume ratio of 1:1 shows the most significant stabilizing

effect on anthocyanins, especially under light exposure and sucrose conditions, where the anthocyanin content in the MRJPs-BA complex is increased by 15.76% and 20%, respectively, compared to the BA group. The experiments demonstrate that although VC and high-temperature processing accelerate the degradation of blueberry anthocyanins, the addition of MRJPs can to some extent protect the stability of blueberry anthocyanins. Thermal degradation kinetic analysis reveals that the anthocyanins in blueberries adhere to first-order thermal degradation kinetics. While the addition of MRJPs does not alter the thermal degradation kinetic model of anthocyanins, it does mitigate the degradation rate of these compounds. In vitro simulated digestion studies indicate that anthocyanins exhibit high stability in a gastric simulated environment. However, in an intestinal simulated environment, significant degradation occurs for both BA and MRJPs-BA complexes due to variations in temperature and pH. Notably, after 2 hours of intestinal digestion, the retention rate of anthocyanins in the MRJPs-BA complex is significantly higher than that in the BA group, suggesting that MRJPs effectively slow down the degradation of anthocyanins during the simulated digestion process.

(2) Study on the interaction mechanism between MRJPs and anthocyanins

The experiment employed a series of spectroscopic techniques to investigate the protective mechanism of MRJPs on anthocyanins (C3G).

Fluorescence results indicated that the addition of C3G caused changes in the fluorescence intensity of MRJPs, accompanied by a slight shift in the maximum absorption wavelength (from 331.6 nm to 333.4 nm), suggesting alterations in the amino acid environment within MRJPs. In the fluorescence quenching mechanism, the calculated quenching rate between MRJPs-BA exceeded the theoretical diffusion limit, confirming that the quenching mechanism between MRJPs and C3G is governed by static quenching. FTIR and CD spectral analyses further demonstrated that C3G binding induced conformational changes in the secondary structure of MRJPs, characterized by a decrease in α -helix content and an increase in β -sheet content. Furthermore, 2D molecular docking simulations indicate that the binding between MRJPs and C3G is primarily driven by hydrogen bonds and electrostatic interactions; 3D molecular docking simulations reveal that MRJPs can bind to and encapsulate C3G molecules, thereby providing a foundation for MRJPs to enhance the stability of blueberry anthocyanins.

(3) The preparation of royal jelly main protein and blueberry anthocyanin oral liquid

This research focuses on the formulation of a blueberry anthocyanin concentrated liquid combined with major royal jelly proteins (MRJPs). Nutritional enhancers, specifically taurine and copper gluconate, are incorporated alongside flavoring agents such as xylitol and citric acid to

create an oral liquid enriched with blueberry anthocyanins and MRJPs. A multi-factor orthogonal experiment, along with flavor blending and fuzzy comprehensive sensory evaluation, was conducted to identify the optimal formulation of the oral liquid. The best blending scheme identified includes 70% blueberry anthocyanin concentrated liquid (86 mg/100 mL), 0.02% royal jelly main protein, 0.25% taurine, 0.001% copper gluconate, 5% xylitol, and 0.3% citric acid, all calculated based on 100 mL of the oral liquid.

KEY WORDS: Major royal jelly proteins, Blueberry anthocyanin, Stability, Interaction mechanism, Oral liquid

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 蓝莓概述.....	1
1.1.1 花色苷的结构.....	1
1.1.2 蓝莓花色苷的生物活性.....	2
1.1.3 影响花色苷稳定性的因素.....	4
1.1.4 提高花色苷稳定性的方法.....	6
1.2 蜂王浆概述.....	8
1.2.1 蜂王浆主蛋白.....	8
1.3 蛋白质对小分子保护机制的研究方法.....	9
1.3.1 紫外可见吸收光谱.....	9
1.3.2 荧光光谱.....	9
1.3.3 傅里叶红外光谱.....	10
1.3.4 圆二色谱.....	10
1.3.5 模拟分子对接技术.....	11
1.4 蓝莓市场发展趋势.....	11
1.4.1 蓝莓的发展前景.....	11
1.4.2 蓝莓花青素的产品形式.....	11
1.5 蓝莓花色苷口服液的发展及研究现状.....	12
1.6 研究内容及目的意义.....	13
1.6.1 研究目的与意义.....	13
1.6.2 研究内容.....	13
第 2 章 蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷稳定性及抗氧化活性研究	15
2.1 引言.....	15
2.2 材料试剂与设备.....	16
2.2.1 实验材料.....	16

2.2.2 实验试剂.....	16
2.2.3 仪器设备.....	17
2.2.4 实验方法.....	18
2.3 结果与分析.....	21
2.3.1 不同加工条件下 MRJPs 对 BA 稳定性影响	21
2.3.2 不同加工条件下 MRJPs 对 BA 抗氧化性影响	26
2.3.3 MRJPs-BA 复合物的热降解动力学分析结果	28
2.3.4 体外模拟消化条件下 MRJPs 对 BA 的影响	30
2.4 讨论.....	34
2.4.1 蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷的保护作用.....	34
2.5 本章小结.....	36
第 3 章 蜂王浆主蛋白与花色苷的相互作用机理研究	37
3.1 引言.....	37
3.2 材料试剂与设备.....	38
3.2.1 实验材料.....	38
3.2.2 实验试剂.....	38
3.2.3 仪器设备.....	38
3.2.4 实验方法.....	38
3.3 结果与分析.....	40
3.3.1 MRJPs 与 C3G 相互作用的紫外可见吸收光谱	40
3.3.2 MRJPs 与 C3G 相互作用的荧光光谱	41
3.3.3 MRJPs 与 C3G 相互作用的荧光淬灭机理	42
3.3.4 MRJPs 与 C3G 相互作用的同步荧光光谱	43
3.3.5 MRJPs 与 C3G 相互作用的傅里叶红外光谱	45
3.3.6 MRJPs 与 C3G 相互作用的圆二色谱	46
3.3.7 MRJPs 的 SDS-PAGE 凝胶电泳	47
3.3.8 计算机分子模拟对接.....	48
3.4 本章小结.....	49
第 4 章 添加蜂王浆主蛋白的蓝莓花色苷口服液的制备	50

4.1 引言.....	50
4.2 材料试剂与设备.....	50
4.2.1 材料.....	50
4.2.2 试剂.....	51
4.2.3 设备.....	51
4.3 蜂王浆主蛋白与蓝莓花色苷口服液的制作工艺.....	51
4.3.1 工艺流程.....	51
4.4 蜂王浆主蛋白与蓝莓花色苷口服液的工艺研究.....	52
4.4.1 口服液的基液组成成分.....	52
4.4.2 单因素实验用量的探究.....	52
4.4.3 多因素的正交实验设计.....	52
4.5 口服液的风味调配.....	52
4.5.1 感官评价指标.....	53
4.5.2 模糊感官评价法.....	54
4.5.3 柠檬酸和木糖醇用量的确定.....	54
4.6 灭菌消毒处理.....	55
4.7 口服液相关理化指标及微生物检测.....	55
4.8 结果与分析.....	55
4.8.1 单因素实验结果与分析.....	55
4.8.2 正交实验结果与分析.....	58
4.8.3 感官评价结果.....	60
4.8.4 产品微生物检测结果.....	62
4.8.5 产品理化指标检测结果.....	62
4.9 口服液成品展示.....	63
4.10 本章小结.....	63
第 5 章 结论与展望	64
5.1 结论.....	64
5.2 创新点.....	64
5.3 展望.....	65

参考文献.....	66
攻读学位期间发表的学术论文目录.....	82
致谢.....	83

第 1 章 绪论

1.1 蓝莓概述

蓝莓(Blueberry), 属杜鹃花科(Ericaceae), 原产于北美洲, 我国又称其为蓝浆果、都柿、越橘。蓝莓的果实为浆果, 大小及颜色因品种而异, 食之味酸且甜, 具有丰富的营养价值, 为药食两用的功能性保健水果^[1], 联合国粮农组织已经将其纳入全球五大健康食品名录^[2-4]。

作为一种营养密集型水果, 蓝莓不仅含有蛋白质、碳水化合物及多种维生素等基础营养成分, 其生物活性物质构成尤为突出。在功能性成分方面, 该果实富含超氧化物歧化酶(SOD)、多元不饱和脂肪酸以及多种微量元素。另外, 其植物化学物质含量显著, 主要包括花青苷类化合物、类黄酮物质以及维生素 B₃(烟酸)等特殊成分, 这些物质赋予了蓝莓独特的营养价值和保健功效。此外, 蓝莓还表现出一系列生理功能, 包括减少视觉疲劳、抗衰老、抑菌、调节肠道微生物和显著的抗氧化活性^[5]。研究表明, 蓝莓花色苷是蓝莓相关众多健康益处的主要贡献者^[6]。鉴于蓝莓花色苷的化学结构具有不稳定性, 其在生产加工和储存环节中易发生降解反应, 进而引发产品品质劣化和保质期缩减^[7], 这一现象对蓝莓产业的可持续发展形成了显著制约。基于此, 如何有效提升蓝莓花色苷在加工与储存环节中的化学稳定性, 已然成为蓝莓深加工领域亟需攻克的技术难题。

1.1.1 花色苷的结构

作为一类源于花青素的水溶性多酚物质, 花色苷在植物器官中普遍存在, 尤其在花朵、叶片、果实及种子中含量丰富, 其赋予了植物组织多样的色彩表现, 涵盖红色、黄色及蓝色等多种色调^[8]。从化学结构来看, 这类物质以 2-苯基苯并吡喃阳离子为基本单元, 其骨架呈现典型的 C6-C3-C6 排列方式^[9], 花色苷的形成过程涉及糖苷键的连接机制, 使糖苷基团与母核结构相结合。值得注意的是, 这类色素的显色特性受环境因素影响显著, 特别是在不同 pH 条件下呈现差异化表现, 当 pH 处于 1-2 的酸性环境中时, 其结构主要以红色的黄烺盐阳离子形式存在; 当 pH 处于 4-5 时, 以无色的甲醇假碱形式存在; 在 pH 值在 6-6.5 时, 以蓝色的醌型碱形式存在; 在 pH 的值>7 时, 呈现形式为淡黄色的查尔酮^[10]。花色

苷的不同类型主要与糖的数量和类型、羟基的数量、糖苷键连接的位置、芳香酸的数量和类型等多方面因素相关^[11]。花青素能够通过糖苷键与多种糖基结合，形成相应的花色苷，常见的糖基包括葡萄糖、芸香糖、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖等单糖以及蔗糖等双糖^[10]。目前，自然界中已发现的花色苷种类超过 20 种，其中在食品中占据主导地位的主要有六大类：飞燕草色素（Delphinidin, Dp）、锦葵色素（Malvidin, Mv）、矢车菊色素（Cyanidin, Cy）、天竺葵色素（Pelargonidin, Pg）、牵牛色素（Petunidin, Pt）以及芍药色素（Peonidin, Pn）。如表 1-1 所示，这六种花色苷的主要差异体现在其分子 B 环上 R₁ 和 R₂ 所连接的基团类型不同（-H、-OH、-OCH₃）^[12]。

表 1-1 常见的六种花色苷
Table 1-1 Six common anthocyanins

	R ₁	R ₂	花色苷
	OH	H	矢车菊色素（Cyanidin）
	H	H	天竺葵色素（Pelargonidin）
	OH	OH	飞燕草色素（Delphinidin）
	OCH ₃	H	芍药色素（Peonidin）
	OCH ₃	OH	矮牵牛花色苷（Petunidin）
	OCH ₃	OCH ₃	锦葵色素（Malvidin）

1.1.2 蓝莓花色苷的生物活性

花色苷具有广泛的生物学活性，例如抗氧化剂，抗炎，抗病毒，抗菌和抗毒素，同时也与抑制某些疾病有关，例如肥胖症、癌症，心血管疾病和糖尿病^[13]。此外，花色苷颜色多彩，其生物活性和自然性使它们广泛用于食品，药品，化妆品和健康产品^[14]。

1.1.2.1 抗氧化作用

蓝莓花色苷展现出卓越的抗氧化特性，能够高效清除生物体内自由基，进而减轻氧化应激对细胞造成的损害。研究表明，花色苷在体内起着氢供体的作用，可以中和自由基（如超氧阴离子、羟基自由基等）充当有效的抗氧化剂，可保护细胞膜、蛋白质和 DNA 免受氧化损伤^[2,15]。

1.1.2.2 抗炎作用

蓝莓花色苷抑制炎症反应保护机体组织的机制主要是花色苷及其代谢物可

以调节相关炎症反应的基因的表达和细胞信号通路。研究表明花色苷可以抑制促炎因子（如 VCAM-1、ICAM-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β ）的产生^[16]，还可以通过直接结合细胞信号蛋白来实现诱导蛋白质功能的变化以及下游信号传导蛋白、转录蛋白和转录因子的激活（如调节 NF- κ B 和 MAPK 等炎症信号通路）^[17-18]。

1.1.2.3 抗癌作用

蓝莓花色苷有潜在的抗癌能力，可阻止癌细胞的发展。花色苷的抗癌机制包括调节信号传导通路(如诱导癌细胞凋亡，调节细胞增殖周期)和减少肿瘤微环境中的炎症（如抑制肿瘤血管生成，阻断癌细胞的营养供应）^[19]。研究发现^[20]，由乙醇诱导的 ErbB2/cSrc/FAK 通路的激活，在矢车菊素-3-葡萄糖苷(C3G)的作用下可得到抑制，这种阻止细胞迁移/入侵的能力对预防乙醇诱发的乳腺癌转移有益。Mazewski^[21]等人的研究发现，紫玉米的花色苷能通过诱导细胞凋亡和阻断血管的生成，从而来实现抑制人结肠癌细胞的增殖的作用。

1.1.2.4 保护心血管健康

蓝莓花色苷通过改善和保护血管功能，降低血脂来实现对心血管系统的多重保护作用。其中改善血管内皮功能来自双链转运酶促进一氧化氮(NO)的生成，降低氧化应激，舒张血管^[21]；降缓血脂，抑制低密度脂蛋白(LDL)的氧化，清除动脉壁上巨噬细胞白细胞的积累^[22-23]；减少血小板之间的凝聚，有效阻止形成血栓^[24-25]。

1.1.2.5 调节血糖作用

研究发现，花色苷可以通过促进胰岛素分泌，减少胰岛抵抗，显著降低总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白 LDL 的含量，可预防II型糖尿病的发展^[26-28]。此外，花色苷与 α -葡萄糖苷酶结合后，可通过抑制其活性来延缓葡萄糖的释放和吸收，进而改善糖代谢^[29]。

1.1.2.6 改善认知功能

蓝莓花色苷通过改善认知功能，减轻神经退行性疾病，以此来保护神经系统。研究表明，花色苷在接受活性氧(ROS)或活性氮(RNS)的未配对电子后，可通过血脑屏障进入脑组织进行自由基清除，从而减少脑部氧化应激和炎症反应，进而降低神经退行性疾病和认知能力下降的风险^[30-31]。另外，花色苷还可以通过促进神经营养因子（如 BDNF 和 CREB）的表达，增强神经元存活和突触可塑

性，从而改善空间工作记忆^[32-33]。

1.1.2.7 保护视力

蓝莓花色苷可有效保护眼睛健康，在改善视网膜和视力方面有卓越的效果。Wang 等^[34]研究发现，蓝莓花色苷通过降低细胞内活性氧的水平，使 ARPE-19 细胞免受可见光诱导的损伤，减少视网膜的氧化损伤，以及上调 HO-1，从而预防黄斑变性和白内障的发生。钟绍金等^[35]的研究进一步解释，花色苷可能通过激活大鼠视网膜相关信号通路（Notch1/Hes-1）来发挥视神经保护和氧化应激改善作用。杨丹等^[36]的研究则证实，信号通路蛋白因子 PI3K/AKT 在蓝莓花色苷调控下，改善了由糖尿病引起的大鼠的视网膜组织病化症状，同时减轻视网膜氧化应激损伤和炎症发生。此外，花色苷具有促进视网膜视紫红质再生的功能，可显著提高夜间视力^[37]。

1.1.3 影响花色苷稳定性的因素

花色苷的稳定性由多重因素限制，主要表现在自身结构特征以及加工和消化环境两方面^[7]。如加工和消化过程中的酸碱、温度、光照的变化以及氧化还原剂（维生素 C）、糖、金属离子和酶等理化参数的加入，对其稳定性有影响。其中光照、pH 值和温度作用尤为显著。

1.1.3.1 花色苷自身结构的影响

花色苷的核心构型为 2-苯基苯并吡喃阳离子，该离子化学性质活泼，可结合羟基、甲氧基、糖基、酰基等基团进行羟基化、氧基化、糖基化、酰基化反应，花色苷稳定性可由这些连接基团的数目、类型和位置的不同来决定。研究发现，当花色苷发生酯基化、酰基化、甲基化的程度越高，其稳定性越好，而羟基化对花色苷的稳定性只体现在 C3 或 C5 位置上^[38-39]。

1.1.3.2 pH 值对花色苷稳定性的影响

花色苷的分子结构会随环境酸碱度的变化而呈现多种形态。当花色苷以黄烺盐阳离子、半缩醛的形式存在时，表明其处于酸性条件。花色苷在碱性条件下时，其电子、质子会转移进一步形成离子化的醌式碱和查尔酮^[40]，该条件下花色苷极敏感，其不稳定也会随着 pH 值的升高而严重^[41]。

1.1.3.3 温度对花色苷稳定性的影响

高温会加速降解花色苷。研究人员通过实验发现，随着温度的升高花色苷的

降解常数显著增加^[42-44]。这是因为高温促进了花色苷的水解和氧化反应。余以刚等^[45]研究表明,花色苷在高温下被水解,这个过程会引起糖苷键断裂并进一步诱导了开环反应,最后在氧气的作用下分解为酚酸、醛类和酮类等小分子物质。

1.1.3.4 光照对花色苷稳定性的影响

光照能引起花色苷的降解,致使其颜色降解和生物活性丢失。其机制主要是发生了光氧化和光催化反应。花色苷分子中含有多个酚羟基和不饱和双键,这些结构使其对光敏感,容易发生光化学反应。花色苷分子在受到光照时,会引起其结构上酰基的脱落,此时 2、4 位 C 原子的活性被激活,花色苷发色团显露出来,进而引起其他降解反应加速花色苷分解^[7]。

1.1.3.5 氧气对花色苷稳定性的影响

花色苷是活性酚类物质,具有多个酚羟基和不饱和双键,这些结构使易受氧化反应影响。而分子氧的存在则是直接加速氧化过程发生、破坏花色苷稳定性的重要因素。根据周笑犁等^[46]研究显示,花色苷的降解过程遵循一级降解动力学,其分解速率常数在有氧环境中较无氧环境显著提高,前者约是后者的六倍。

1.1.3.6 抗坏血酸和糖对花色苷稳定性的影响

抗坏血酸(维生素 C)和糖是食品中常见的成分,它们对花色苷的稳定性和降解具有重要影响。如抗坏血酸会通过被氧化成强氧化剂-过氧化氢,加速分解花色苷^[47]。糖主要的通过糖的种类和浓度来影响花色苷稳定性和降解速率。研究发现高浓度的糖会通过降低水分活度在花色苷分子周围形成保护层,减少其与氧气和光的接触来提高花色苷稳定性,所以环境处于低浓度的糖环境时,水分子活跃度升高,加速了花色苷的分解^[48]。另外,对于果糖>蔗糖>葡萄糖的这种降解速率顺序,可归因于糠醛或 5-羟甲基糠醛,这些在降解反应后产生的中间产物引起的^[49]。

1.1.3.7 金属离子对花色苷稳定性的影响

某些金属离子(如 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+})会通过催化氧化反应或形成络合物影响花色苷的稳定性。如 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 等金属离子的添加会催化花色苷的氧化而使其发生降解^[50]。而 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 等金属离子的添加可能会和花色苷络合生成沉淀使其稳定性下降^[51]。

1.1.3.8 酶对花色苷稳定性的影响

某些酶能够直接或间接地通过催化氧化反应或水解反应导致花色苷的降解、颜色褪去和生物活性丧失。如常见的一些多酚氧化酶、花色苷酶、过氧化物酶、 β -葡萄糖苷酶和果胶酶会加速降解花色苷^[52]。

1.1.4 提高花色苷稳定性的方法

花色苷在自身及其加工条件下，其结构的不稳定性是困扰各研究人员的难题。目前关于保护花色苷的方法主要是从化学修饰、物理修饰、生物技术修饰和复合体系构建等方面进行的。

1.1.4.1 化学修饰

花色苷的化学修饰和作用机制主要为：(1)酰化。在花色苷的糖基上引入酰基（如乙酰基、香豆酰基、咖啡酰基），形成空间位阻效应保护花色苷的活性位点，减少花色苷与水 and 氧气的接触，降低水解和氧化速率，形成酰化花色苷。通过将不同链长的饱和脂肪酸酶酰化作为酰基供体进行酰化反应，并引入月桂酸，科研团队^[53-54]有效提高了高山熊果花色苷的亲脂特性及其对高温的耐受能力。谢凤英^[55]等人的研究显示，采用有机酸作为酰基供体对黑米花色苷进行修饰，由于双酰化空间结构的形成，有效阻止了水分子对花色苷发色团的亲核攻击，缓解了其他反应的发生，提高了花色苷稳定性。(2)甲基化。在花色苷的羟基（-OH）基因上引入甲基（-CH₃），通过降低酚羟基的电子密度，有效抑制了自由基的攻击。Luo等^[56]人发现，当花色苷的核心构型（2-苯基苯并吡喃阳离子结构）中羟基数目增加时，花色苷的稳定性降低；相反，甲基化程度高的花色苷反而对其稳定性有利。(3)糖基化。通过改变糖基的类型或连接方式（如从单糖变为双糖），增强分子极性和水溶性，减少聚集沉淀，而且糖基也可以覆盖花色苷的活性羟基，减少氧化和酶解。如 Zhao 等^[57]调查了黄原胶对在不同条件下含有 L-抗坏血酸的模型饮料系统中黑米花青素的颜色稳定性，结果表明黄原胶的添加有效地提高了 L-抗坏血酸的存在下，尤其是在黑暗中黑米花青素的储存稳定性。

1.1.4.2 物理修饰

花色苷的物理修饰和作用机制主要为：(1)共色作用。花色苷与共色剂（如酚酸、黄酮类、金属离子）通过疏水作用或 π - π 堆积形成复合物，可扩大吸收波长范围，提高显色稳定性，同时共色剂覆盖了花色苷的活性位点，减少了光氧化和

水解,减缓了花色苷降解^[58-59]。先前的研究表明,有机酸例如没食子酸、阿魏酸、p-豆酸和咖啡酸可以通过非共价相互作用与花青素结合,有效地增强其稳定性,减少的颜色褪色^[60-61]。Huang 等^[60]在共同色素草酸对洛神花花青素提取热稳定性研究中表明,有机酸的引入保持了洛神花花青素的颜色稳定性。同样,Lv 等^[61]通过探究巨峰葡萄皮花青素或矢车菊素-3-O-葡萄糖苷与有机酸的交配相互作用,观察并评估了不同的酸摩尔比和处理温度下共色物的颜色变化,结果表明共色物颜色增强,热稳定性增加。(2)微胶囊化。将花色苷包裹在壁材(如多糖、蛋白质、脂质体)中,形成微米或纳米颗粒,隔绝氧气、光和水分,减少降解,还可在特定条件下(如肠道 pH)释放花色苷,提高生物利用度。研究发现,通过对安第斯蓝莓花青素喷涂两种不同的性质微胶囊材料进行了比较分析,得出从刺梨皮中提取的副产品具有有利的特性,可作为高度抗氧化色素的封装材料^[62]。

(3)纳米复合物。将花色苷与纳米材料(如二氧化硅、纤维素纳米晶、脂质体)结合,纳米载体为花色苷提供更大的负载容量和保护效果。近年来,基于蛋白质和肽的纳米技术也在增强花青素的稳定性、生物活性和递送中发挥作用^[63]。如Candido 等^[64]研究了 γ -辐照白蛋白纳米颗粒与花青素的相互作用,结果表明封装在蛋白质纳米颗粒中的花青素氧化过程的减慢,氧化耐药性增强。Xie 等^[65]研究开发了一种基于硫酸软骨素为原料的纳米复合物水凝胶系统,这种较高的负载能力不但提升了蓝莓花青素的颜色,还进一步改善了蓝莓花青素对各种不利环境(温度, pH 和金属离子)的稳定性。

1.1.4.3 生物技术修饰

生物技术修饰主要包括:(1)酶法改性。利用酶(如糖基转移酶、酰基转移酶)定向修饰花色苷结构,可精准引入特定基团,避免副反应。洪森辉等^[66]通过酶法反应,在花色苷分子的糖基上-OH 位连接酰化反应后的阿魏酸和咖啡酸,这种措施在改善蓝莓花色苷分子的疏水性能和抗氧化活性方面有着卓越的效果。Yang 等^[54]以酶催化的饱和脂肪酸为酰基供体,引入月桂酸,显著提高了高山熊果花色苷的亲脂性和热稳定性。(2)基因工程。通过基因编辑技术调控植物中花色苷合成相关基因,提高花色苷的含量。如 Wei 等^[67]研究发现,将结构基因 3GT 置于马铃薯块茎特异性启动子 GBSS 之后,块茎表皮的花色苷含量得到显著提高。目前,已有研究表明,基因编辑中 CRISPR/CAS9 系统在改善花青素方面有着巨大的可

能性,这将会创建新型的生物技术方法来生产具有较高花色苷含量的增值植物^[68]。

1.1.4.4 复合体系构建

复合体系构建是将花色苷与其他成分(如多糖、蛋白质、多酚)复配形成稳定体系,通过氢键、疏水作用或静电吸引保护花色苷。Liu 等^[69]在新型胶体食品成分:蛋白质复合物和缀合物综述中着重描述了由蛋白质、多糖和/或多酚组成的新型胶体食品成分的开发和应用。探讨了蛋白质结合物和复合物的形成、功能以及潜在的应用。特别是突出了这些胶体成分来稳定乳液、控制脂质消化、封装生物活性成分、修饰纹理和形式膜的利用。

1.2 蜂王浆概述

蜂王浆又被称作蜂皇浆,是一种来自于成年工蜂的腹膜和下颌腺体分泌的粘状物,颜色一般为淡黄色,具有轻微的特殊气味,口感辛辣并略带酸涩感。蜂王浆是蜂王一生的食物,而普通蜜蜂仅在孵化后的前三天才会喂食蜂王浆^[70-71]。作为一种天然保健食品,蜂王浆含有多种营养物质,如蛋白质、维生素、有机酸、多酚、酶等^[72-74],深受当代众多消费者青睐。截至今日,越来越多的研究表明,蜂王浆具有抗氧化剂,抗菌,抗炎,伤口愈合,免疫调节,细胞增殖刺激,抗癌,抗衰老,抗过敏性等功能活性^[75-79]。

1.2.1 蜂王浆主蛋白

蜂王浆中总体的 12%~15%为蛋白质,分为水溶性蛋白和非水溶性蛋白两类,其中水溶性蛋白占 46%~89%,被称为蜂王浆主蛋白 MRJPs (Major Royal Jelly Proteins)^[80,81]。MRJPs 包含九个成员(MRJP1-MRJP9)^[82,83],其中 MRJP1 是最丰富的(占蜂王浆总蛋白的 31-66%),其次是 MRJP3, MRJP2 和 MRJP5^[81,84]。研究表明,MRJPs 是与 N 末端残基处的寡糖共价结合的糖蛋白,所有 MRJPs 都有 1-8 个预测的 N-糖基化位点^[81,85]。

MRJPs 展现出显著的抗氧化特性、免疫调节功能和抑菌效果,并能刺激细胞生长。作为决定蜂王生殖能力的重要生物活性物质,MRJPs 在蜂王中扮演重要角色。实验数据证实,MRJPs 中富含人体必需的氨基酸成分,这些成分可能构成了其生物学功能的关键物质基础。值得注意的是,这些必需氨基酸同样构成了蜂王浆中具有生物活性的核心要素^[86]。

最近的研究越来越强调 MRJPs 相对于其他蛋白质的明显优势。有研究表明,

人胚胎肺成纤维细胞（HFL-I）细胞系经 MRJPs 处理后，可出现繁殖增强、抗衰老现象。这项研究还发现，补充 MRJPs 的培养基在某种程度上显示出比 BSA 更高的生物活性^[87]。另一项研究表明，MRJPs 可以诱导人类细胞系的增殖，并且可以在细胞培养中部分替代胎牛血清（FBS）^[88]。此外，研究发现，在人类胃肠道的蛋白水解消化过程中，三种 MRJPs（1-3）明显比 BSA 更稳定^[89]。值得注意的是，研究人员发现 MRJP1 寡聚物是一种耐热蛋白（热处理高达 65°C）^[90]，特别是在高温下与钙结合时，增强了其稳定性^[91]。目前，食品加工中以巴氏杀菌为常用灭菌方法。MRJP1 低聚物对中度热处理（高达 65°C）的功能性抵抗性表明它适用于低温巴氏杀菌应用。因此，蜂王浆在低温巴氏杀菌中的应用可以显著增加安全蜂王浆的供应，并支持基于蜂王浆的保健食品的发展。

1.3 蛋白质对小分子保护机制的研究方法

1.3.1 紫外可见吸收光谱

蛋白质小分子相互作用的研究中，紫外可见分光光度法作为基础且应用广泛的技术手段。每种物质根据其结构都有特定的吸收光谱，当蛋白质与小分子物质发生反应后，其吸收光谱也会随着变化（峰型的位置偏移和强度变化），因此可用于探究蛋白质与小分子之间的作用。如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等芳香族氨基酸在 230-310 nm 区间展现出特征吸收。通常酪氨酸与色氨酸的吸收是由于含有共轭双键，从而在 280 nm 处有特征吸收峰，肽键的吸收峰则在 210 nm 附近，而 250-280 nm 范围内的变化是因为氨基酸残基经历了 $\pi-\pi^*$ 跃迁。通过紫外-可见吸收光谱谱图的解析，可有效推断蛋白质氨基酸残基所处的微环境变化情况^[92]。

1.3.2 荧光光谱

作为一种操作便捷且灵敏度优异的技术手段，荧光光谱分析在探究分子间相互作用时得到广泛应用。该技术基于物质受辐射激发后跃迁至激发态，随后在去激发过程中释放与激发波长相同或不同辐射的物理现象，这种辐射终止后即停止的发射光被定义为荧光^[93]。在蛋白质-小分子体系中，构成蛋白质的氨基酸中，色氨酸（Trp，348 nm 处）、酪氨酸（Tyr，303 nm）和苯丙氨酸（Phe，282 nm）具有特征内源荧光的残基，其荧光强度比展现出 $F_{\text{Trp}} : F_{\text{Tyr}} : F_{\text{Phe}} = 100:9:0.5$ 的关系。当在 280 nm 激发波长时，蛋白质的荧光主要由色氨酸与酪氨酸贡献，（色氨酸为主），而 295 nm 激发时则仅有色氨酸产生相对较弱的荧光。因此，在研究时

一般选择用 280 nm 处激发荧光^[94]。探究分子之间的相互作用主要聚焦于分子之间的淬灭机制-静态淬灭和动态淬灭。前者是因为小分子和荧光剂基态结合形成新的配合物，后者是小分子与淬灭剂间发生了碰撞作用。可根据 Stern-Volmer 方程计算出淬灭常数 (K_q) 和淬灭速率 (K_{sv})，比较不同温度下 K_q 变化以及 K_{sv} 与最大速率常数的关系，从而判断淬灭方式^[95]。

在荧光光谱中，同步扫描技术通过设定固定波长间隔(如 $\Delta\lambda=15$ nm 或 60 nm)对激发波长和发射波长进行同步检测，而获得反应蛋白质构象的特征光谱。当波长间隔设置为 15 nm 时，所得光谱主要表征酪氨酸残基所在微环境的构象特征，而 60 nm 的波长间隔则主要反映色氨酸残基的微环境状态。根据同步荧光光谱图的最大吸收波长 (λ_{max}) 的位移变化，可推断氨基酸残基的疏水性和极性的转变趋势。当 λ_{max} 向长波长方向偏移 (红移)，表明氨基酸残基微环境疏水性降低而极性增强；反之，当 λ_{max} 向短波方向偏移 (蓝移)，则意味着微环境的疏水性增强而极性减弱^[96]。

1.3.3 傅里叶红外光谱

红外光谱分析 (Infrared Spectroscopy, IR) 作为一重要的物质表征手段，其原理基于分子与红外辐射的相互作用。当入射红外光的频率与分子内部化学键 (包括 C-H、O-H、C=O 等) 特征频率相吻合时，分子在吸收特定波长的光能后，会引起振动能级改变。这种能量吸收过程会在光谱图上形成特定吸收峰，其位置以波数 (cm^{-1}) 表示，形成独特的“指纹”谱图。在蛋白质中的红外光谱研究中，酰胺带 I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) 与酰胺 II ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) 是具有代表性的特征谱带。其中酰胺 I 带主要反应 C=O 键的伸缩振动，而酰胺 II 带则与 C-N 伸缩振动以及 C-H 键的面内变形振动有关。值得关注的是，蛋白质的二级结构信息，如 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲等构象特征，均可在酰胺 I 带的图谱中观察到^[88,97]。

1.3.4 圆二色谱

圆二色谱 (Circular Dichroism, CD)，一种通过分析物质对左旋和右旋圆偏振光吸收差异来研究手性分子 (如蛋白质、核酸) 构象的技术，常用于监测蛋白质二级结构的快速表征和动态构象的变化。其基本原理是手性分子 (如蛋白质中的 α 螺旋、 β 折叠) 对左旋 (LCP) 和右旋 (RCP) 圆偏振光的吸收不同而导致透射光的偏振方向发生旋转 (即椭圆偏振)。在远紫外波段 (180–250 nm) 的光

谱分析中,蛋白质主链酰胺键的电子跃迁特征,可有效反映其二级结构特征信息。其中, α 螺旋在对应的 208 nm 和 222 nm 处会展现出特征性负峰; β 折叠结构虽然在 218 nm 附近显示负峰,但其吸收强度明显弱于 α 螺旋;对应无规则卷曲结构,其特征光谱表现为在 220 nm 处出现正吸收峰,198 nm 附近可能出现负峰^[98]。

1.3.5 模拟分子对接技术

基于化学原理的分子对接方法,是一种利用算法预测配体与生物大分子(包括受体,如蛋白质、核酸)直接结合模式及亲和力的方法,该方法在药物设计、靶点发现和分子相互作用机制研究中广泛应用。其核心是通过结合位点预测来确定小分子在受体上的最优结合位置(结合口袋),根据结合模式预测模拟小分子在结合口袋中的空间取向和构象。分子模拟过程的对接软件包括 PDB(受体结构)、PubChem/ZINC(配体库)、AutoDock、DOCK 等是常用软件^[99]。

1.4 蓝莓市场发展趋势

1.4.1 蓝莓的发展前景

蓝莓因凭借其独特的口感和丰富的营养而深受当代消费人群喜爱,尤其是蓝莓中富含的花色苷,具备抗氧化、抗衰老、保护视力等多种功效已成为当代年轻人的最佳选择。截至到 2025 年,由于健康意识的提升和消费水平的提高,我国蓝莓消费市场近年来呈现快速增长态势,蓝莓产品也正从单一鲜果向多元化、高附加值方向转型。近年来中国蓝莓鲜果产量得到极大提升,根据国际蓝莓组织(BIO)显示,中国已在 2021 年成为全球蓝莓最大生产国^[100]。市场需求的增加和产品形式转化预示着蓝莓有着广阔的市场前景。

1.4.2 蓝莓花青素的产品形式

目前蓝莓产品已形成多维度、全产业链覆盖的形态,涵盖鲜食、加工食品、功能性产品及衍生品等领域。当前蓝莓的相关产品形式主要呈现在以下几个方面:(1)蓝莓的鲜食和初加工:鲜食蓝莓作为核心消费形式,占主导地位;冷冻蓝莓主要用于出口和深加工原料;初加工产品注意包括蓝莓粉、蓝莓果酱、果汁、果干等传统产品。(2)蓝莓的深加工与功能性产品:蓝莓饮料及发酵制品主要有蓝莓及多肽复合饮品、蓝莓果酒、酵素饮料等;保健食品如蓝莓提取物(如蓝莓花青素咀嚼片、花青素胶囊、花青素口服液、蓝莓叶黄素酯咀嚼片)在抗氧化、护眼等领域广泛应;医药与化妆品原料中蓝莓花青素被用于护肤品(如精华液、面膜)

和医药领域。(3)蓝莓的新兴应用场景：零食与功能性食品如蓝莓涂层坚果、能量棒等零食成为年轻消费者的健康选择；冻干蓝莓因其便携性和营养保留度高，市场需求增长显著。另外，其他一些新型蓝莓产品如花青素-蛋白口腔膜也逐渐在开发和应用中^[101]。

1.5 蓝莓花色苷口服液的发展及研究现状

口服液的发展最早可追溯到六十年代，是在汤剂的基础吸取糖浆剂和针剂的优点而开发出的一种新型药剂，具备携带方便、显效快、小剂量等特点。口服液在七八十年代开始逐步得到人们的重视。在此期间，一些中药成分的药剂或其他剂型被制成口服安瓿剂（如藿香正气散口服液、四逆汤口服液、北芪口服液、虫草蜂王浆口服液等）而深受大众欢迎。此后《中国药典》在 77 年版中首次将安瓿瓶（口服液）收载其中，这极大的促进了口服液的发展和生产。随着八九十年代中药制药业的兴起，口服液也开始迅速发展并开始被人们推崇。一些药厂更是生产出多功能、多类型的口服液，使得口服液除去药品的功效还具备保健品的功能（如双宝素、太阳神、人参蜂王浆口服液等）^[102]。如今随着经济的发展，人们生活节奏加快，口服液因用药方便、见效快、方便携带等优势在众多制剂生产中的占有比例在逐年上升^[103]。市面上涌现很多兼具治疗与保健功效的口服制剂，其配方多以药物成分为核心，辅以营养补充物质。如常见的双黄连口服液、蓝芩口服液、柴胡口服液等，用于治疗 and 预防感冒。一些营养补充型口服液，如葡萄糖酸锌口服液、蓝瓶钙等更是受消费者所青睐。

目前，人们生活水平得到极大改善，人们开始逐渐追求更好的生活质量及更健康生活方式。如健身健美、美容护肤、抗衰老、抗疲劳等理念已经融入到每个人的生活中。对此，市场逐渐研究并开发出了相应的以美白、抗衰老、抗疲劳等为功效的产品。蓝莓花青素因凭借抗氧化、抗衰老、清除自由基、抗肿瘤、缓解眼睛疲劳等的多种功效在众多产品中脱颖而出。一些以蓝莓花青素为主的产品也随之被开发和应用，其中蓝莓花青素口服液作为富含花青素的产品也逐渐走向人们的视野。如郑斌^[104]等人以蓝莓汁和胶原蛋白为主，通过添加矫味剂、增稠剂等制备了蓝莓复方口服液，在保持好的口感的同时也获得了更好的养生效果。高岩松^[105]的研究者，采用黑豆和蓝莓为原料，经单因素试验和正交试验分析，制作了一款蓝莓-黑豆多肽复合饮料，在体外抗氧化实验中发现，产品的羟自由基

清除率、DPPH 清除率和乙醇脱氢酶激活率均显著 ($P < 0.05$)，证明了该复合饮料在抗氧化方面效果显著。毕远林^[106]以蓝莓花青素提取稳定性为研究基础，用木糖醇和白砂糖进行调配，经感官评价研制出一款风味、色泽、口感最好的蓝莓花青素口服液。吴元宏^[107]团队基于蓝莓与红景天两种成分，成功开发出一种新型复合口服液。该产品经过对小鼠耐力测试和多项生化指标检测，验证了该复合口服液具有很好的抗疲劳作用。目前，尽管市场上已有多种以蓝莓花青素为核心的相关保健品，但该研究仍具有最重要的创新价值。

1.6 研究内容及目的意义

1.6.1 研究目的与意义

近年来，为了更有效的利用花色苷，减少花色苷在加工过程中的损失量，多种针对花色苷稳定性的措施已被研究和应用起来，其中用蛋白来保护相关花色苷的方法是最常用的手段。如乳清蛋白、大豆分离蛋白、酪蛋白、蚕蛹蛋白等多种蛋白已被证实对花色苷稳定性有显著作用。

蜂王浆作为纯天然保健品，具有增强免疫力、抗菌、细胞增殖刺激，抗癌，抗衰老、抗氧化等多种功效备受大众推崇。然而蜂王浆主蛋白作为蜂王浆多种积极功效的活性因子，其产品单一、口感较差往往让人们难以选择。经查阅资料，蜂王浆主蛋白对花色苷的保护作用还未见到相关报道。根据之前蛋白对花色苷稳定性作用的相关研究基础，本文希望能将蜂王浆主蛋白与花色苷稳定性相关联，研究并揭示蜂王浆主蛋白在不同加工条件下对花色苷稳定性及作用机制。这不仅填补了蜂王浆主蛋白与花色苷之间结合运用的空白，也为阐明蛋白质与花色苷之间的相互作用奠定新的理论基础，同时还可以在此基础上增加蜂王浆主蛋白与蓝莓花色苷产品的多样性，对于改善蜂王浆主蛋白口感，增加蜂王浆蛋白与蓝莓花色苷相关产品的研究并提供相关数据支撑。

1.6.2 研究内容

(1) 研究不同加工条件下（光照、蔗糖、维生素 C、加热）蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷稳定性和抗氧化性影响；探究蜂王浆主蛋白对花色苷热降解动力学影响；通过设计体外模拟消化实验，研究胃消化和肠消化条件下蜂王浆主蛋白对花色苷稳定性和抗氧化性影响。

(2) 在蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷具有保护作用的基础上，采用多维度表

征技术进行系统分析。通过分子对接模拟结合多种光谱检测手段，包括紫外-可见吸收光谱、傅里叶变换红外光谱、荧光光谱以及圆二色光谱等，深入解析了 MRJPs 与 C3G 之间的分子相互作用特征。

（3）设计一款含蜂王浆主蛋白的蓝莓花色苷口服液。确定口服液成分，选择添加合适的营养强化剂与风味调配剂，通过正交实验确定各稳定剂的最适使用量，设计感官评价和模糊综合评价方案，从而得出口服液的最佳调配方案。

第2章 蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷稳定性及抗氧化活性研究

2.1 引言

蓝莓为杜鹃花科植物，又称为越橘，是一种集营养价值和经济价值于一体的功能性保健水果^[1]，享有“浆果之王”的称号^[108]。此外蓝莓更因花色苷(ACNs)含量高，具有多种生理功能，如减缓视觉疲劳、抗衰老抑菌、调节肠道微生物、抗氧化活性高等，在人类膳食体系中占有重要地位^[3-5]。有研究表明，蓝莓之所以对健康有诸多益处，其最大的贡献者是蓝莓花色苷(Blueberry anthocyanins, BA)^[6]。

花色苷是一种水溶性且对人体有益的天然色素，是蓝莓和其他浆果的主要功能成分^[39]，广泛存在于各种植物中。在机体内，花色苷是供氢体，是有效的抗氧化剂，具有强大的自由基清除活性^[6,15]。花色苷作为一种生物活性物质，其抗氧化特性已得到证实。研究表明，这类物质能有效中和自由基，同时对血脂代谢有调节效应。在疾病预防领域，可抑制炎症及预防癌症的发生^[109]。然而，该化合物的实际应用受到其化学稳定性的严重制约。研究证实，环境光照、热效应、氧化还原条件等多种因素均可导致花色苷发生结构降解^[110,111]。目前在针对花色苷稳定性方面，多种途径和措施已被探索，包括共色素沉着、分子结构优化、包埋、食品添加剂和金属离子添加等^[112]。这些方法中，色素沉着方法通常涉及花色苷与生物大分子的络合^[113]。据报道，蛋白质和多酚(如 ACNs 和酚酸)的结合通过使用各种蛋白质分子作为转运体来保护酚类的功能成分^[114,115]。如大豆分离蛋白(SPI)、卵白蛋白(OVA)和黑大豆分离蛋白(B-SPI)的络合已被用于研究蛋白质与多酚的相互作用^[76,116,117]。乳清分离蛋白(WPI)与 ACNs 联合使用在肠道消化 1 h 时，可使 ACNs 的保留率比单独使用 ACNs 提高 14.09%^[118]。另外，研究人员发现，处于 pH 7.0 环境下，酵母甘露蛋白可以增强花色苷的稳定性^[119]。因此，利用多酚和蛋白质之间的相互作用对于更好地了解它们的生理活动至关重要。

蜂王浆因其卓越的营养价值和生理活性而被认可，赢得了“超级食品”的声誉，其消费对人类具有许多健康益处^[76,120]。中国是蜂王浆最大的生产商（2010 年生产 3,500 吨）和出口国^[121]（2014 年出口 220 吨，全球 39 英镑的出口价值）。如

今,随着蜂王浆进入大众视野,人们对其了解越来越深,其生理功能和作用机理也在长期大量的临床应用中得到证实,营养学和现代医学证明其具有很强的保健功能和疗效^[122],蜂王浆正在被制药,化妆品和食品行业应用^[123],具有相当大的商业价值。研究表明,蜂王浆主蛋白质是蜂王浆发挥多种生物活性组分的关键^[95]。

蜂王浆主蛋白 MRJPs (Major royal jelly proteins) 是蜂王浆中所有水溶性蛋白总称,在蜂王发育中起着的特定生理作用。MRJPs 富含许多必需氨基酸,其成分与卵巢蛋白和酪蛋白具有相似性^[81]。作为蜂王浆核心组成成分,MRJPs 通过多重生物活性维持蜂王的繁殖力,这些活性包括显著的细胞增殖促进作用、突出的免疫活性、优异的抗氧化活性以及广谱的抗菌效果,此外,MRJPs 还具备显著的保健功效,使其在维持蜂王生殖系统功能中发挥关键作用。

尽管 MRJPs 作为一种特殊的蛋白质,对于蜂王浆的多种活性功能的实现具有重要意义,但 MRJPs 在食品应用中的形式较为单一,主要应用是鲜食或制作成冻干粉,且在加工过程中对花色苷等食品着色剂的保护作用未见研究,因此,我们设计了不同的加工条件(如光照、蔗糖、维生素 C、加热),研究蜂王浆主蛋白对花色苷稳定性影响;同时也研究了加热条件下蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷热降解动力学及体外模拟消化的影响。为后续研究蛋白与花色苷作用提供新的数据支撑并推动产品多样性的进展。

2.2 材料试剂与设备

2.2.1 实验材料

本实验所使用的蓝莓品种是绿宝石,来自安徽紫约生物科技有限公司,蜂王浆为市售新鲜蜂王浆。

2.2.2 实验试剂

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagent

材料和试剂名称	规格	生产厂家
氢氧化钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
浓盐酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
碳酸氢钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	国药集团化学试剂有限公司

材料和试剂名称	规格	生产厂家
柠檬酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
抗坏血酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
蔗糖	AR	国药集团化学试剂有限公司
BCA 试剂盒	200T	上海碧云天生物及技术股份有限公司
ABTS	98%	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
大孔树脂	D101	东鸿化工有限公司
透析袋	14kDa	VISKASE
α -淀粉酶（枯草杆菌）	50 U/mg	上海源叶生物科技有限公司
胰酶	4000 U/g	国药集团化学试剂有限公司
胃蛋白酶	10000U/mg	索莱宝生物科技有限公司
胆盐	25g	索莱宝生物科技有限公司

2.2.3 仪器设备

表 2-2 实验设备
Table 2-2 Experimental equipmen

仪器名称	型号	生产厂家
分析天平	JY1002	上海精密科学仪器有限公司
分光光度计	UV-520	上海元析仪器有限公司
pH 计	SX-610	上海三信仪表厂
水浴锅	DK-S26	上海三发科学仪器有限公司
全波长酶标分析仪	HBS-SCANX	南京德铁生物科技有限公司
色差仪	CR-10 Plus	KONICA MINOLTA, INC. japan
恒温培养箱	HOP-70BE	上海力辰邦西仪器科技有限公司
旋转蒸发仪	RE-2000A	上海予创仪器有限公司
真空冷冻干燥机	LGJ-12	北京松源华兴科技有限公司
恒温震荡摇床	ZQZY-78BES	上海知捷仪器有限公司
玻璃中压层析柱	600mm×20mm	北京惠德易科技有限责任公司
台式高速冷冻型微量离心机	D3024R	北京大龙兴创实验仪器有限公司
磁力搅拌器	DF-101S	上海力辰仪器科技有限公司

2.2.4 实验方法

2.2.4.1 花色苷溶液制备

蓝莓花色苷溶液的提取是在 Ren^[124]的工作基础上略微修改后进行的。先将蓝莓破碎后，用 pH 2.0、80%乙醇溶液按料液比 1:20 (m/V) 混合。在常温条件下，在功率 400 W 下超声 30 min。过滤后通过使用旋转蒸发器浓缩混合物来去除乙醇，得到蓝莓花色苷的紫红色粘稠粗提取物。随后将粗提取物溶解在含有 0.01% HCl 的蒸馏水中，然后使用 C-18 小柱采用固相萃取方法对样品进行半纯化^[125]。将纯化的蓝莓花色苷重新溶解在酸化蒸馏水 (0.01% v/v HCl) 中，设置最终体积为 100 mL，并在 -18℃ 下避光储存以尽量减少色素降解。单体蓝莓花色苷含量的计算则依据 pH 差分法测定^[2]。

2.2.4.2 蜂王浆主蛋白的制备

蜂王浆主蛋白的提取采用 Salazar-Olivo 等人^[126]方法并略加修改。称取新鲜蜂王浆 5 g，置于离心管中，加 50 mL 磷酸盐缓冲盐水溶液 (0.5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 8.7; 缓冲液必须预冷) 将样品均质。混合物在 4℃ 下进行提取 24 h。结束后以 12,000 rpm/min 离心 50 min。上清液用 0.22 μm 水系过滤膜过滤后，即得到蜂王浆水溶性蛋白提取物。然后使用孔径为 14 kDa 的透析膜在 4℃ 下用 ddH₂O 透析 24 h，每 6 h 换水一次。在冷冻干燥机内将透析液干燥和浓缩，随后在 -20℃ 下储存。使用 BCA 蛋白检测试剂盒定量样品中的总蛋白浓度^[127]。

2.2.4.3 不同加工条件下 MRJPs 对 BA 影响

方法在 Zang 等人^[118]的基础上稍作修改。分别用 0.1 M、pH 3.3 和 pH 6.6 的柠檬酸溶液配制蓝莓花色苷和王浆主蛋白溶液，将花色苷最终浓度稀释为 0.25 mg/mL，蜂王浆蛋白浓度为 0、0.02、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/mL；按体积比 1:1 将蓝莓花色苷溶液与不同浓度的蜂王浆蛋白溶液进行混合，得到 MRJPs-BA 复合物混合液。

(1) 光照条件下 MRJPs 对 BA 稳定性及抗氧化性影响：

准备 5 只透光性好的具塞试管，将梯度浓度 BA-MRJPs 复合物等分分装后，放于在 35℃、5000 lux 光照下放置处理 7 d。在 0、1、3、5、7 d 检测样品中的花色苷含量，0、7 d 检测样品的 L、a、b 值以及 7 d 后的抗氧化能力。

(2) 蔗糖条件下 MRJPs 对 BA 稳定性及抗氧化性影响：

蔗糖处理通过向不同浓度 BA-MRJP 复合物添加糖,使蔗糖浓度最终为 0.25 mg/mL,将样品等分于 5 只试管中,在避光下处理 7 d,于 0、1、3、5、7 d 检测样品中的花色苷含量,0、7 d 检测样品的 L、a、b 值及 7 d 抗氧化能力。

(3) Vitamin C (VC) 条件下 MRJPs 对 BA 苷稳定性及抗氧化性影响:

VC 处理通过加入 VC,使最终样品中 VC 浓度为 0.15 mg/mL,等分于 5 只试管中,避光条件处理 7 d,在 0、1、3、5、7 d 后检测样品中的花色苷含量,0、7 d 检测样品的 L、a、b 值及 7 d 抗氧化能力。

(4) 加热条件下 MRJPs 对 BA 稳定性及抗氧化性影响:

将浓度为 0.25 mg/mL 的蓝莓花色苷溶液与浓度为 0.1 mg/mL 的王浆主蛋白溶液等体积混合,分别放置在 70°C、80°C、90°C 加热 2 h,结束后测量加热前后混合液中的花色苷含量和 L、a、b 值及抗氧化能力。

2.2.4.4 蓝莓花色苷含量测定

采用 pH 示差法来检测花色苷的含量:分别取 1 mL 花色苷溶液加入到 2 个 25 mL 试管,再分别用 pH 1.0 缓冲液和 pH 4.5 缓冲液将样品稀释合适倍数,避光条件放置 60 min,随后分别记录样品在 520 nm 和 700 nm 处吸光度,每个样品进行 3 次平行测定。带入公式 (1) 计算。

$$\rho/(g/L) = \frac{(A_{520} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH4.5} \times DF \times M_r}{26900} \quad (1)$$

$$\text{花色苷保留率}(\%) = (C_t/C_0) \times 100\% \quad (2)$$

其中,DF 代表稀释因子(15);Mr 代表样品中主要花色苷矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的相对分子质量(449.2)。C_t代表 t 时刻花色苷浓度,C₀代表花色苷原始浓度。

2.2.4.5 蓝莓花色苷颜色变化的测定

$$\Delta E = \sqrt{(L_t - L_0)^2 + (a_t - a_0)^2 + (b_t - b_0)^2} \quad (3)$$

其中,L_t、a_t、b_t为一定时间后 MRJPs-BA 复合物溶液的颜色参数,L₀、a₀、b₀为原始 BA-MRJPs 复合物溶液的颜色参数。

2.2.4.6 ABTS⁺测定

先用 PBS 缓冲溶液 (0.1 mM) 将 ABTS 配制成 7 mmol/L 的 ABTS 溶液,然后将 ABTS⁺溶液与 4.95 mM 过硫酸钾溶液等比例混合,避光反应 14 h 后得 ABTS⁺溶液。在使用时需要用 PBS 缓冲液将 ABTS⁺继续进行稀释 (约 20 倍),当溶液在 734 nm 波长处的吸光值在 0.70 ± 0.02 范围内即可。

采用 96 孔板进行试验,每孔分别注入 20 μL 待测样本,随后添加 200 μL ABTS⁺试剂,充分混匀 30 s 后用酶标仪在 734 nm 波长处检测,记录吸光值 A_1 。以 20 μL 无水乙醇作空白对照,记录吸光值 A_0 。用 PBS 缓冲溶液代替 ABTS⁺ 试剂,记录吸光值 A_2 。

$$\text{ABTS}^+ \text{清除率} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (4)$$

2.2.4.7 花色苷在不同 pH 值条件下的热降解动力学

将浓度为 0.25 mg/mL 的蓝莓花色苷溶液与浓度为 0.1 mg/mL 的王浆主蛋白溶液等体积混合。取等量的 BA 及 BA-MRJP 复合物溶液于烧杯中,每个样品等分成 4 份,用盐酸和氢氧化钠溶液调节样品 pH 值至 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 四个梯度,再将每份样品等分成 3 份,装在 24 支带帽试管中。将试管分别放置在 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C 的恒温水浴锅中进行 5 h 避光加热处理,每隔 1 h 取样冷却后待测。

为探究 MRJP-BA 复合物的热稳定性特征,以花色苷保留率作为指标,分别代入零级、一级及二级降解动力学模型进行拟合分析,根据决定系数 R^2 的大小,确定其降解反应级数,相关动力学公式如下:

(1) 零级动力学方程:

$$C_t/C_0 = -K_0 t \quad (5)$$

(2) 一级动力学方程:

$$\ln(C_t/C_0) = -K_1 t \quad (6)$$

二级动力学方程:

$$1/C_t = K_2 t + 1/C_0 \quad (7)$$

其中: C_0 —花色苷最初的浓度

C_t —花色苷在 t 时刻的浓度

K_0 —零级反应的速率常数

K_1 —一级反应的速率常数

K_2 —二级反应速的率常数

2.2.4.8 体外模拟消化液的配置

口腔唾液:口腔中含有唾液淀粉酶,由 α -淀粉酶代替。 α -淀粉酶(30 mg)溶于 20 mL pH 7.0 的生理盐水中(0.9 g NaCl 溶于 100 mL 蒸馏水)。

模拟胃液：胃中有含大量胃蛋白酶，取 0.59 g 胃蛋白酶溶于 10 mL 0.01 mol/L HCl 溶液。

模拟肠液：肠液由 0.75 g 胰酶、1.9 g 胆盐溶于 60 mL 0.1 mol/L NaHCO₃ 缓冲溶液，6000 r/min 离心 5 min，取上清液。

（1）口腔消化模拟实验

分别取 2 mL BA 样品与 MRJPs-BA 样品各加入 3 mL 活化后的唾液，37°C 水浴下反应 10 min 后取出。

（2）胃消化模拟实验

将经唾液反应后的样品加入 15 mL 胃缓冲液（1.55 g NaCl、0.55 KCl、0.06 g CaCl₂、0.3 g NaHCO₃ 溶于 500 mL 蒸馏水中）。试验前先将溶液置于 37°C 恒温振荡器中水浴 10 min，进行活化处理；随后用 0.1 mol/L 的 HCl 将溶液 pH 值调为 3；加 4 mL 活化后的模拟胃液。最后，将混合液继续移至 37°C 的恒温水浴锅中以 120 rpm/min 的转速消化 2 h，期间每小时取样检测蓝莓花色苷的保留率，以此评估 MRJPs-BA 复合物的在胃模拟消化过程中的稳定性特征。并采用 ABTS⁺ 法分析 BA 和 MRJPs-BA 复合物中花色苷的 ABTS⁺ 自由基清除率，用以评估 MRJPs-BA 复合物在该环境下的抗氧化能力。

（3）肠消化模拟实验

经过胃消化模拟后的样品，用 1 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液将 pH 值调至 7.0，加入 4 mL 活化后的模拟肠液。混合好后将溶液继续转移至 37°C 的恒温水浴锅中以 120 rpm/min 的转速进行肠模拟消化。每小时取样检测花色苷保留率，2 h 后结束实验。最后以蓝莓花色苷保留率为标准，评估 MRJPs-BA 复合物在肠消化环境下的稳定性。并采用 ABTS⁺ 法分析 BA 和 MRJPs-BA 复合物中花色苷的自由基清除率，用来评估 MRJPs-BA 复合在该环境下的抗氧化能力。

2.3 结果与分析

2.3.1 不同加工条件下 MRJPs 对 BA 稳定性影响

蓝莓在加工和储存的过程中经常会暴露在光照、蔗糖、VC 和加热等环境中，这些因素都会不同程度的加速花色苷的降解^[128]。因此本文研究了这四种条件下花色苷含量及颜色的变化（图 2-1 至 2-4，表 2-3）。在加速试验中，样品的色度值可用于评价 ACNs 颜色稳定性。

表 2-3 MRJPs 对光照处理, 蔗糖处理, VC 处理和热处理后比色参数的影响
Table 2-3 Effect of MRJPs on the colorimetric parameters after illumination treatment, sucrose treatment, VC treatment and heat treatment

处理条件	蛋白浓度 (mg/mL)	L*	a*	b*	ΔE
未处理	0	28.50±0.14	12.33±0.17	0.37±0.05	
光照 (7 d)	0	31.07±0.26 ^a	12.50±0.22 ^a	9.60±0.16 ^a	9.59±0.14 ^a
	0.02	31.47±0.62 ^a	12.4±0.24 ^a	9.00±0.08 ^b	9.17±0.14 ^b
	0.1	29.63±0.21 ^b	10.83±0.25 ^c	6.97±0.09 ^d	6.87±0.17 ^e
	0.2	29.40±0.16 ^b	11.47±0.17 ^b	8.33±0.21 ^c	8.07±0.19 ^d
	0.3	30.10±0.16 ^b	12.03±0.12 ^a	8.93±0.12 ^b	8.72±0.11 ^c
	0.4	29.97±0.17 ^b	12.23±0.29 ^a	9.03±0.12 ^b	8.8±0.12 ^c
蔗糖 (7 d)	0	29.87±0.21 ^{ab}	12.73±0.17 ^a	8.77±0.12 ^a	8.53±0.15 ^a
	0.02	30.10±0.16 ^a	12.23±0.12 ^{bc}	7.93±0.05 ^c	7.74±0.09 ^{bc}
	0.1	29.73±0.17 ^{ab}	11.80±0.16 ^c	6.47±0.12 ^d	6.26±0.09 ^d
	0.2	29.47±0.21 ^b	11.33±0.21 ^b	7.77±0.09 ^c	7.54±0.09 ^c
	0.3	29.47±0.12 ^b	11.13±0.17 ^b	8.20±0.16 ^b	7.99±0.17 ^b
	0.4	29.50±0.22 ^b	12.53±0.33 ^{ab}	8.60±0.08 ^a	8.32±0.04 ^a
VC (7 d)	0	32.37±0.24 ^a	12.00±0.08 ^a	9.80±0.14 ^a	10.2±0.05 ^a
	0.02	32.47±0.12 ^a	11.93±0.12 ^a	9.53±0.09 ^a	10.00±0.08 ^a
	0.1	30.87±0.12 ^c	11.53±0.24 ^b	7.63±0.12 ^d	7.69±0.17 ^d
	0.2	32.1±0.16 ^a	11.57±0.12 ^b	8.63±0.12 ^c	9.05±0.14 ^c
	0.3	31.53±0.12 ^b	10.97±0.12 ^c	9.13±0.17 ^b	9.38±0.17 ^b
	0.4	31.73±0.17 ^b	10.73±0.12 ^c	8.67±0.12 ^c	9.05±0.15 ^c
70°C (2 h)	0	28.57±0.05 ^a	12.57±0.05 ^a	2.23±0.05 ^a	1.90±0.12 ^a
	0.1	28.27±0.05 ^b	12.03±0.05 ^b	1.43±0.05 ^b	1.17±0.01 ^b
80°C (2 h)	0	29.13±0.05 ^a	11.90±0.08 ^a	3.33±0.12 ^a	3.08±0.08 ^a
	0.1	28.70±0.00 ^b	12.23±0.05 ^a	2.47±0.05 ^b	2.13±0.07 ^b
90°C (2 h)	0	29.57±0.05 ^a	12.37±0.12 ^a	4.33±0.05 ^a	4.12±0.09 ^a
	0.1	29.10±0.00 ^b	12.87±0.05 ^a	3.2±0.08 ^b	2.95±0.07 ^b

2.3.1.1 光照处理下 MRJPs 对 BA 稳定性影响

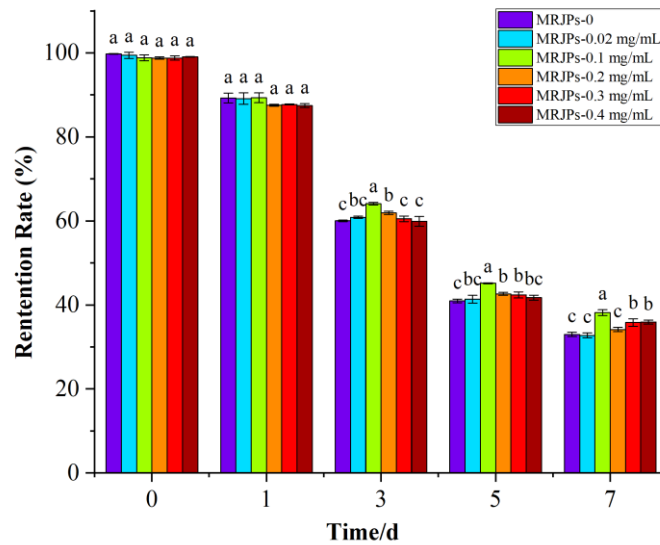


图 2-1 光照条件下不同浓度 MRJPs-BA 复合物的花色苷保留率

Fig.2-1 Anthocyanin retention rate of MRJPs-BA complexes at different concentrations under light conditions.

由表 2-3 可知, 对照组 BA 样品的 L^*_0 、 a^*_0 、 b^*_0 值分别为 28.5 ± 0.14 , 12.33 ± 0.17 , 0.37 ± 0.05 。经光照处理 7 d 后, L^* 和 b^* 值升高, a^* 值变化不大, ΔE 值变化。这表明 BA 样品在加工过程中颜色发生了变化。如图 2-1 所示, 为花色苷的保留率。结果显示, 在光照条件下, 不同浓度的 MRJPs 对蓝莓花色苷的保护作用在第 3 d 开始表达, 7 d 后可以看到 0.1 mg/mL 的 MRJPs 对花色苷的保护作用最为显著, 比未添加 MRJPs 的对照组提高了 15.76%。而 0.2、0.3、0.4 mg/mL 时的保留率却低于 0.1 mg/mL 的, 这可能是由于高浓度的 MRJPs 可能导致其自聚集并减少其与蓝莓花色苷的接触^[129]。从以上结果可以看出, MRJPs 抑制了光照处理下花色苷的褪色和含量损失^[130]。

2.3.1.2 蔗糖处理下 MRJPs 对 BA 稳定性影响

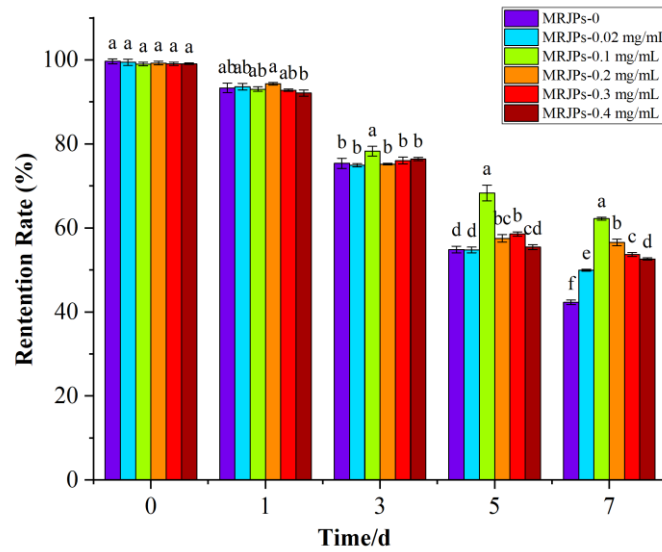


图 2-2 蔗糖处理下不同浓度 MRJPs-BA 复合物的花色苷保留率

Fig.2-2 Anthocyanin retention rate of MRJPs-BA complex at different concentrations under sucrose treatment.

蔗糖在食品加工中是不可避免的,研究表明低分子蔗糖会加速 BA 的降解^[98]。如图 2-2 所示,经 0.25 mg/mL 蔗糖浓度处理后,六组样品中花色苷含量均发生显著下降,第 7 d 天时蔗糖对照组蓝莓花色苷的残留率为 42.28%,而加了 0.02, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL 的 MRJPs 后蓝莓花色苷残留率分别为 49.92%、62.21%、56.56%、53.68%、52.62%,对比对照组,可以看出 MRJPs 对花色苷有显著保护效果。显著性分析显示,0.1 mg/mL 的 MRJPs 对蓝莓花色苷稳定性效果是最显著的,大约保护了 20%花色苷免于降解。同时可以发现蔗糖处理 7 d 后,样品的 L* 和 b* 值增加,而 a* 值无明显变化(表 2-3)。此外,所有样品的 ΔE 变化都很明显,特别是在只含蔗糖而不含 MRJPs 的对照组。由此可知,经过蔗糖处理后 MRJPs 的加入可以维持蓝莓花色苷的稳定性。

2.3.1.3 VC 处理下 MRJPs 对 BA 稳定性影响

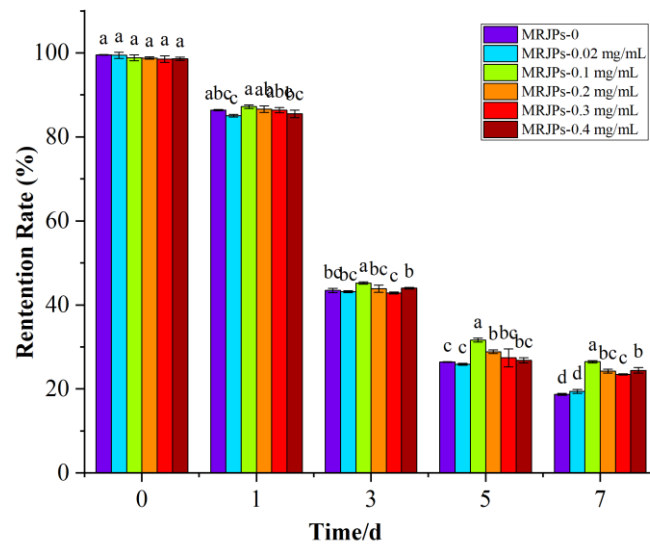


图 2-3 VC 处理下不同浓度 MRJPs-BA 复合物的花色苷保留率

Fig. 2-3 Anthocyanin retention rate of MRJPs-BA complex at different concentrations under VC treatment.

VC 作为一种食品添加剂，除了可以增强产品风味和提高其抗氧化性能外，还具有有益健康的作用，因此在食品中得到了广泛的应用^[131]；然而，研究表明 VC 可以加速花色苷的降解^[2]。如图 2-3 所示，与最初花色苷含量相比（第 0 d），经 VC 处理 7 d 后的花色苷均发生显著降解，其中对照组第 7 d 的保留率为 18.7%，低于光照组（32.99%）和蔗糖组（42.88%），说明相对于光照和蔗糖处理，VC 对花色苷的降解程度最大。这可能与 VC 降解花色苷的两种机制有关：(a) 花色苷和 VC 之间的缩合反应，以及(b) VC 氧化形成的过氧化氢的降解^[132]。同时与对照组相比，浓度为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL 的 MRJPs 显著提高了花色苷的保留率，通过显著性分析发现，0.1 mg/mL 的 MRJPs 在 VC 作用下对花色苷的保护作用最显著，保留率为 26.46%。另外，VC 处理后，L*和 b*值升高，而 a*值变化不大（表 2-3），且与对照组相比，经 0.1 mg/mL MRJPs 混合后的 ΔE 值最小，说明 MRJPs 抑制了花色苷颜色的降解。以上结果说明 MRJPs 对花色苷颜色和含量的损失具有预防作用。

2.3.1.4 加热处理下 MRJPs 对 BA 稳定性影响

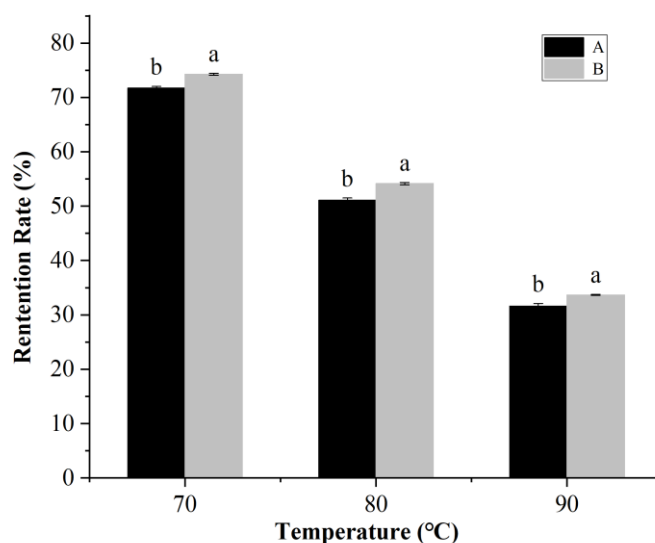


图 2-4 不同温度加热下 MRJPs-BA 复合物的保留率

(注: A 为 pH=6.6 柠檬酸缓冲液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液

B 为 0.10 mg/mL MRJPs 溶液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液)

Fig.2-4 Retention Rate of MRJPs-BA Complex under Heating at Different Temperatures

(Note: A is an equal volume mixture of pH=6.6 citric acid buffer and 0.25 mg/mL blueberry suit solution and B is an equal volume mixture of 0.10 mg/mL MRJPs solution and 0.25mg/mL blueberry side solution)

高温杀菌是食品加工中常用到的方式,但是高温往往会破坏花色苷的化学结构,从而导致蓝莓花色苷含量减少和颜色丧失^[59]。如图 2-4 和表 2-3 所示,随着温度的升高,花色苷的降解率和色差值 ΔE 均增加,且 90°C 时花色苷降解和 ΔE 明显高于其他温度,表明高温破坏了花色苷的稳定性,而不同温度下 MRJPs 的加入明显缓解了花色苷的降解。同时相对于对照组而言,添加 MRJPs 组的花色苷 ΔE 变化显著减小,说明 MRJPs 可以保护花色苷颜色稳定性。以上结果表明,高温下 MRJPs 的存在增强了 BA 的稳定性。

2.3.2 不同加工条件下 MRJPs 对 BA 抗氧化性影响

2.3.2.1 光照、蔗糖和 VC 条件下 MRJPs 对 BA 抗氧化影响

图 2-5 表示不同加工条件下处理 7 d 后,MRJPs 对蓝莓花色苷抗氧化能力的影响结果。由图所知,在经过光照、蔗糖、VC 处理后,B 组(添加 MRJPs 组)的抗氧化能力均显著高于 A 组,说明 MRJPs 与蓝莓花色苷结合可以有效的抑制花色苷抗氧化能力的下降。同时由图中还可以看出,不同处理条件下的抗氧化能

力强弱为 VC 组>蔗糖组>光照组，相对于光照组和蔗糖组，VC 组表现出较高的抗氧化能力可能归因于 VC 本身的抗氧化性。

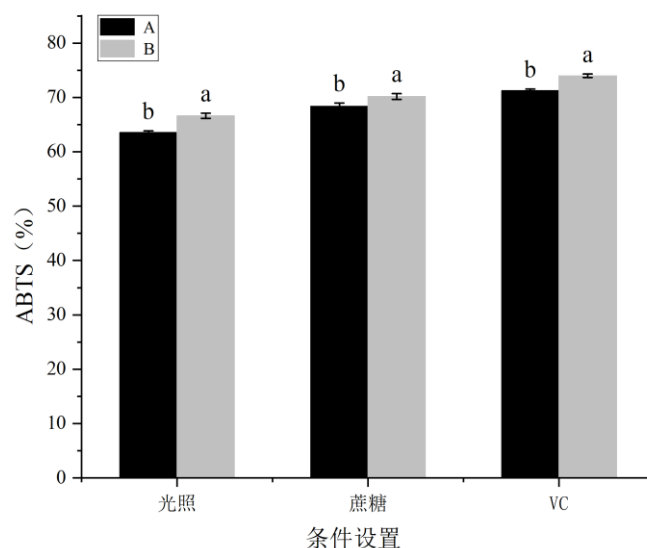


图 2-5 不同加工条件下 MRJPs-BA 复合物的抗氧化能力

(注: A 为 pH=6.6 柠檬酸缓冲液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液
B 为 0.10 mg/mL MRJPs 溶液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液)

Figure 2-5 Antioxidant capacity of MRJPs-BA under different processing conditions

(Note: A is an equal volume mixture of pH=6.6 citric acid buffer and 0.25 mg/mL blueberry suit solution and B is an equal volume mixture of 0.10 mg/mL MRJPs solution and 0.25 mg/mL blueberry side solution)

2.3.2.2 不同加热温度下 MRJPs 对 BA 抗氧化影响

温度不但破坏了花色苷的稳定性，还会影响花色苷的抗氧化性。如图 2-6 所示，是花色苷在 70℃，80℃，90℃下加热 2 h 后的自由基清除率。由图可知，随着温度的升高，BA 及 MRJPs-BA 复合物的自由基清除率都呈下降趋势，说明高温破坏了蓝莓花色苷的抗氧化性。然而通过对比可以发现，MRJPs-BA 复合物的自由基清除率在 70℃，80℃，90℃加热条件下均显著高于对照组 BA，表明 MRJPs 的加入在保护蓝莓花色苷的抗氧化性方面效果显著。另外，90℃处理下 MRJPs-BA 复合物对蓝莓保护效果小于 70℃和 80℃，这种结果可能是因为高温破坏了蛋白及花色苷的稳定性，从而加速了花色苷的降解。

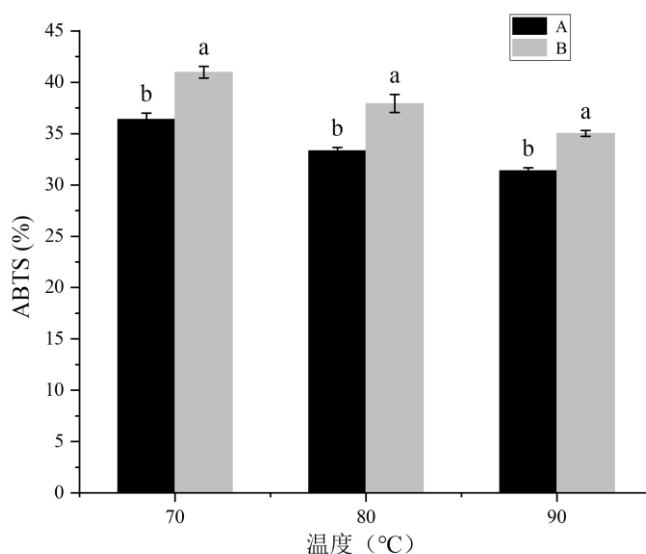


图 2-6 不同温度加热条件下 MRJPs-BA 复合物的抗氧化能力

(注: A 为 pH=6.6 柠檬酸缓冲液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液
B 为 0.10 mg/mL MRJPs 溶液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液)

Figure 2-6 Antioxidant capacity of MRJPs-suit complexes under heating conditions at different temperatures

(Note: A is an equal volume mixture of pH=6.6 citric acid buffer and 0.2 5mg/ m blueberry suit solution and B is an equal volume mixture of 0.10 mg/mL MRJPs solution and 0.25 mg/mL blueberry side solution)

2.3.3 MRJPs-BA 复合物的热降解动力学分析结果

通过将 BA 和 MRJPs-BA 复合物在不同温度 (50 - 90°C) 和 pH (3-6) 下进行加热实验, 将实验的降解数据分别代入三种动力学模型进行拟合分析, 获得各试验条件下花色苷的降解速率 k 以及相应的关联系数。

如表 2-4 所示, 随着温度和 pH 的增加, 花色苷热降解反应速率逐渐增加, 说明高温和高 pH 加速了花色苷的降解。蓝莓花色苷的热降解行为在 pH 值为 3.0-6.0 范围内, 采用一级动力学模型可得到最优拟合结果, 决定系数 R_1^2 的值均超过 0.9, 且反应常数随着温度上升而递增。表 2-4 详细呈现的结果表明, 高温和碱性环境促进了花色苷降解。这一发现与既有研究结论相符, 进一步证实了蓝莓花色苷符合一级动力学规律 [133-134]。

表 2-4 蓝花色苷的热降解动力学分析
Table 2-4 Kinetics of thermal degradation in blueberry

pH	T/ (°C)	Zero level		First level		Second level	
		K_0/min^{-1}	R_0^2	K_1/min^{-1}	R_1^2	K_2/min^{-1}	R_2^2
3	50	0.00066	0.9823	0.00074	0.9756	0.01766	0.9678
	60	0.00097	0.9774	0.00121	0.9727	0.03209	0.9654
	70	0.00099	0.9643	0.00129	0.9618	0.03608	0.9566
	80	0.00102	0.9861	0.00142	0.9860	0.04251	0.9823
	90	0.00163	0.8771	0.00271	0.9336	0.09971	0.9670
4	50	0.00089	0.9981	0.00190	0.9636	0.03230	0.9968
	60	0.00091	0.9775	0.00124	0.9856	0.03448	0.9912
	70	0.00927	0.9339	0.00130	0.9412	0.03944	0.9476
	80	0.00159	0.9833	0.00273	0.9941	0.10258	0.9919
	90	0.00273	0.8985	0.00802	0.9838	0.64780	0.9535
5	50	0.00069	0.9403	0.00092	0.9311	0.02548	0.0918
	60	0.00110	0.8860	0.00262	0.9639	0.05100	0.8100
	70	0.00126	0.9509	0.00215	0.9323	0.06400	0.8986
	80	0.00220	0.9705	0.00578	0.9976	0.34130	0.9401
	90	0.00210	0.8995	0.01063	0.9891	1.6280	0.8027
6	50	0.01570	0.9775	0.00341	0.9244	0.1641	0.8467
	60	0.00171	0.9799	0.00410	0.9208	0.2223	0.8284
	70	0.00200	0.9950	0.00596	0.9674	0.4380	0.8821
	80	0.00178	0.9231	0.00809	0.9981	1.0154	0.9493
	90	0.00677	0.9826	0.00837	0.9787	2.9533	0.8215

根据表 2-5 数据, MRJPs-BA 复合物在不同的 pH 值和温度下的热降解动力学参数及相关系数得以呈现。实验数据表明, MRJPs-BA 复合物的热降解速率常数与 BA 趋势一致, 同样会随着温度及 pH 的增加而上升, 但热降解速率常数小于 BA 组, 说明 MRJPs 的添加缓解了花色苷的热降解。此外, MRJPs-BA 复合物的热降解行为遵循一级降解动力学规律, 其决定系数 R_1^2 的值均超过了 0.9, 表示复合物没有影响花色苷的降解动力学机制, 这种结果可能与高温环境中花色苷

降解特性有关，复合物没有直接参与降解反应，所以没有对降解动力学模型产生显著影响。

表 2-5 MRJPs-BA 复合物热降解动力学
Table 2-5 Thermal degradation kinetics of the MRJPs-BA complexes

pH	T/ (°C)	Zero level		First level		Second level	
		K_0/min^{-1}	R_0^2	K_1/min^{-1}	R_1^2	K_2/min^{-1}	R_2^2
3	50	0.00062	0.9459	0.00068	0.9345	0.01591	0.9223
	60	0.00095	0.9562	0.00112	0.9511	0.02807	0.9451
	70	0.00098	0.9899	0.00121	0.9904	0.03200	0.9878
	80	0.00112	0.9865	0.00141	0.9869	0.03943	0.9887
	90	0.00173	0.8987	0.00273	0.9521	0.09971	0.9845
4	50	0.00088	0.9915	0.00105	0.9843	0.02554	0.9748
	60	0.00088	0.9918	0.00108	0.9891	0.02687	0.9846
	70	0.00110	0.9683	0.00144	0.9641	0.040335	0.9577
	80	0.00171	0.9761	0.00300	0.9900	0.11211	0.9938
	90	0.00271	0.8863	0.00643	0.9504	0.37830	0.9795
5	50	0.00078	0.9954	0.00099	0.9895	0.02553	0.9809
	60	0.00115	0.8989	0.00172	0.9250	0.04750	0.8181
	70	0.00131	0.9753	0.00211	0.9533	0.05855	0.9169
	80	0.00230	0.9718	0.00541	0.9992	0.27078	0.9533
	90	0.00220	0.8982	0.01046	0.9884	1.36660	0.8070
6	50	0.00145	0.9749	0.00271	0.9433	0.10940	0.8914
	60	0.00147	0.9695	0.0030	0.9322	0.13710	0.8696
	70	0.001768	0.9926	0.004413	0.9468	0.25630	0.8644
	80	0.001725	0.9392	0.00700	0.9993	0.73713	0.9565
	90	0.007166	0.9954	0.00685	0.9513	1.72730	0.8073

2.3.4 体外模拟消化条件下 MRJPs 对 BA 的影响

2.3.4.1 体外胃消化下 MRJPs 对 BA 稳定性影响

蓝莓花色苷在食用后要经过胃部消化。花色苷在进入胃环境后，由于胃中含有大量胃酸，使得整体环境呈酸性状态，所以此时花色苷主要以黄烺盐离子形式

存在^[135]。如图 2-7 所示，为模拟胃消化 1-2 h 后花色苷的保留率。从图 2-7 中可知，胃模拟消化 2 h 后，BA 和 MRJPs-BA 复合物中花色苷的稳定性基本不受影响。胃消化 1 h 时，BA 中蓝莓花色苷保留率为 $94.15 \pm 0.39\%$ ，MRJPs-BA 复合物中蓝莓花色苷保留率为 $97.58 \pm 0.09\%$ ；2 h 后，BA 中蓝莓花色苷的保留率为 $95.39 \pm 0.23\%$ ，MRJPs-BA 复合物中蓝莓花色苷保留率为 $99.61 \pm 0.16\%$ 。经比较可以发现，花色苷在胃环境消化 1-2 h 过程中的保留率表现出 $BA_{2h} > BA_{1h}$ ， $MRJPs-BA_{2h} > MRJPs-BA_{1h}$ 的趋势。出现这种现象的原因可能是在胃中酸性环境消化 2 h 后花色苷全部由半酮缩醇形式转化为稳定的黄烺盐离子形式。另外可以发现，在消化 1-2 h 中，MRJPs-BA 复合物的保留率始终表现出大于 BA 组现象，说明复合物可保护花色苷，且效果显著（ $P < 0.05$ ）。

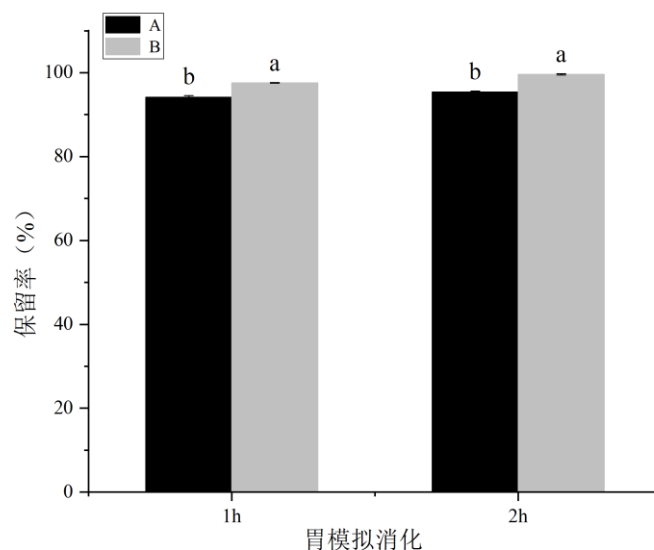


图 2-7 MRJPs-BA 复合物在模拟胃消化的保留率

（注：A 为 PH=6.6 柠檬酸缓冲液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液
B 为 0.10 mg/mL MRJPs 溶液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液）

Figure 2-7 Retention rates of MRJPs-BA complexes in simulated gastric digestion
(Note: A is an equal volume mixture of pH=6.6 citric acid buffer and 0.25 mg/mL blueberry suit solution and B is an equal volume mixture of 0.15 mg/mL MRJPs solution and 0.25 mg/mL blueberry side solution)

2.3.4.2 体外胃消化下 MRJPs 对 BA 抗氧化性影响

如图 2-8 所示，经过 1 h 的胃消化后，BA 的 ABTS 自由基清除率为 $82.58 \pm 0.09\%$ ，MRJPs-BA 复合物中 ABTS 自由基清除率为 $86.11 \pm 0.187\%$ ；经过 2 h 的胃消化后，BA 中 ABTS 自由基清除率为 $78.66 \pm 0.272\%$ ，MRJPs-BA 复合物中

ABTS 自由基清除率 $82.87 \pm 0.156\%$ 。经比较分析发现,MRJPs-BA 复合物的 ABTS 自由基清除率显著高于 BA 组,说明 MRJPs 的加入对花色苷的抗氧化活性同样具积极影响。

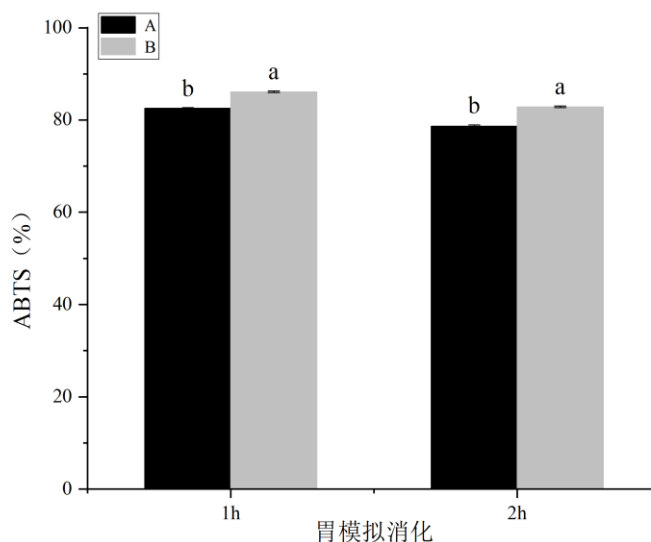


图 2-8 MRJPs-BA 复合物在模拟胃消化的抗氧化能力

(注: A 为 PH=6.6 柠檬酸缓冲液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液
B 为 0.10 mg/mL MRJPs 溶液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液)

Figure 2-8 Antioxidant capacity of the MRJPs-BA complex in mimicking gastric digestion

(Note: A is an equal volume mixture of pH=6.6 citric acid buffer and 0.25 mg/mL blueberry suit solution and B is an equal volume mixture of 0.10 mg/mL MRJPs solution and 0.25 mg/mL blueberry side solution)

2.3.4.3 体外肠消化下 MRJPs 对 BA 稳定性影响

蓝莓花色苷在经过胃消化结束后会进入小肠进一步消化,小肠是营养物质吸收的主要场所,但小肠环境偏中性,因此花色苷在该环境中多以结构不稳定的醌型碱形式存在。从图 2-9 蓝莓花色苷溶液在模拟肠消化 2 h 后的保留率可以看出,进入肠消化后,BA 和 MRJPs-BA 复合物中蓝莓花色苷均发生了显著性的降解。发生这种严重的降解的原因可能是在小肠的温度和 pH 下,花色苷转变为查尔酮或查尔酮糖苷形式^[136]。在经过 1 h 的肠模拟消化后,BA 组的保留率仅为 $11.31 \pm 0.79\%$,而 MRJPs-BA 组保留率也下降为 $15.83 \pm 0.80\%$ 。肠消化 2 h 结束后,BA 的保留率仅剩 $7.35 \pm 0.80\%$,而 MRJPs-BA 复合物中的保留率为 $13.55 \pm 0.77\%$,相比于 BA 组可看出,在经肠消化 1-2 h 后,MRJPs-BA 复合物花色苷保留率始终显著大于 BA 组。说明 MRJPs 的参与对肠消化条件下的花色苷具有保护作用。

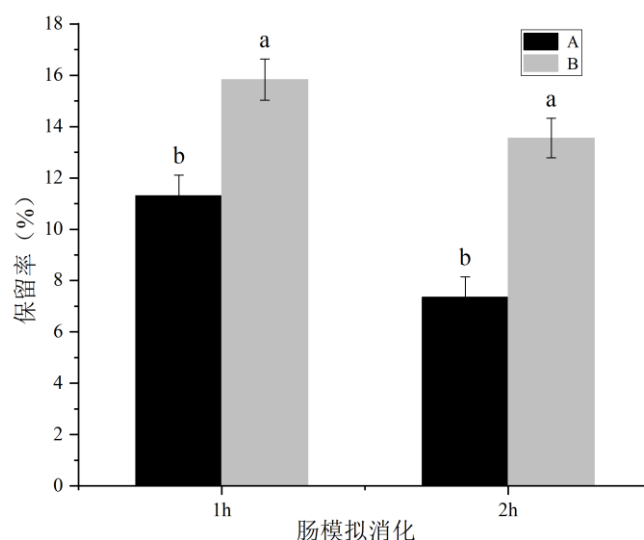


图 2-9 MRJPs-BA 复合物在模拟肠消化的保留率

(注: A 为 Ph=6.6 柠檬酸缓冲液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液
B 为 0.10 mg/mL MRJPs 溶液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液)

Figure 2-9 Retention rates of MRJPs-BA complexes in simulated intestinal digestion

(Note: A is an equal volume mixture of pH=6.6 citric acid buffer and 0.25 mg/mL blueberry suit solution and B is an equal volume mixture of 0.10 mg/mL MRJPs solution and 0.25 mg/mL blueberry side solution)

2.3.4.4 体外肠消化下 MRJPs 对 BA 抗氧化性影响

如图 2-10 所示,为模拟肠消化 1-2 h 后蓝莓花色苷抗氧化活性,以 ABTS 为指标表示花色苷的自由基清除率。经过 1 h 的肠消化条件下,BA 组的自由基清除率测定值为 $35.58 \pm 0.299\%$,而 MRJPs-BA 复合物组清除率达到 $39.40 \pm 0.095\%$;经消化时间延长到 2 h 后,BA 组的自由基清除率下降至 $26.66 \pm 0.356\%$,MRJPs-BA 复合物组清除率则维持在 $30.30 \pm 0.144\%$ 。实验数据表明,相对于单一组分的 BA,MRJPs-BA 复合物在整个消化周期内均表现出更强的自由基清楚能力,这证实了 MRJPs 能够维持花色苷的抗氧化性能。

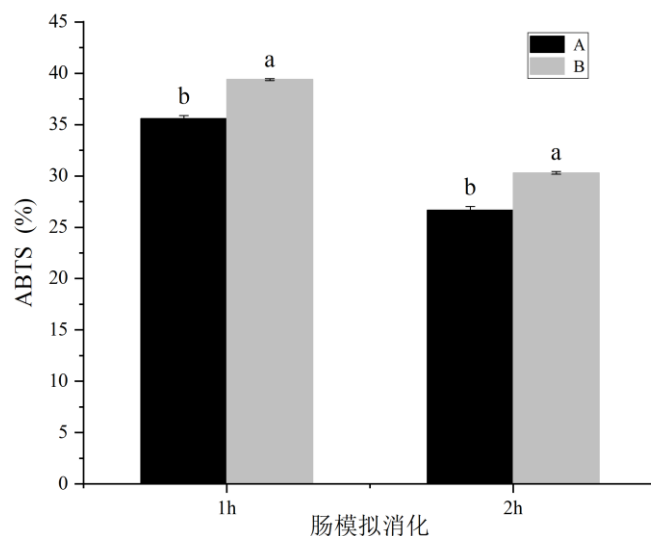


图 2-10 MRJPs-BA 复合物在模拟肠消化的抗氧化能力

(注: A 为 Ph=6.6 柠檬酸缓冲液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液
B 为 0.10 mg/mL MRJPs 溶液与 0.25 mg/mL 蓝莓花色苷溶液等体积混合液)

Figure 2-10 Antioxidant capacity of MRJPs-BA complexes in simulated intestinal digestion.

(Note: A is an equal volume mixture of pH=6.6 citric acid buffer and 0.25 mg/mL blueberry suit solution and B is an equal volume mixture of 0.10 mg/mL MRJPs solution and 0.25 mg/mL blueberry side solution)

2.4 讨论

2.4.1 蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷的保护作用

本实验研究了 MRJPs 对 BA 在光照、蔗糖、VC 和热处理及体外模拟消化条件下稳定性及抗氧化能力的影响。如图 2-1 到 2-4 和表 2-3 所示,光照、蔗糖、VC 和加热处理后蓝莓花色苷颜色褪色,花色苷含量显著降低。然而,当与 MRJPs 混合时,MRJPs-BA 复合物样品在稳定性测试中表现出颜色变化和花色苷损失减少,表明 MRJPs 有效防止了光照、蔗糖、VC 和热处理下 BA 的颜色损失和花色苷降解。而图 2-5 到 2-6 研究了 MRJPs 对蓝莓花色苷自由基清除率的影响,结果表明,MRJPs 的加入可有效保护对蓝莓花色苷的抗氧化能力。最后经体外模拟消化实验表明,MRJPs 可以缓解肠模拟条件下花色苷的降解。对于 MRJPs 对蓝莓花色苷的保护作用可以从以下几个方面进行探讨:

2.4.1.1 蛋白对多酚保护作用的相关研究

先前的研究表明,蛋白质以载体的形式保护多酚^[137]。几种膳食蛋白质可以保护花青素免受光、热、抗坏血酸、过氧化氢和蔗糖添加引起的降解和颜色和抗氧化活性的损失^[118,138]。同时,某些蛋白质复合物和偶联物对多酚化合物表现出显著的保护作用^[69,139]。Fang 等人^[140]的研究发现,糖化乳清蛋白浓缩物可显著提高花青素在储存过程中(包括对热、轻、金属离子和过氧化氢条件)的稳定性。Wu 等人^[119]报道,酵母甘露糖蛋白将花青素的热稳定性提高了 4 到 5 倍,同时保持了其抗氧化特性。此外,Fu 等人^[141]发现糖化牛血清白蛋白表现出更高的结合亲和力、包封效率和姜黄素的负载能力。

2.4.1.2 蜂王浆主蛋白自身结构的影响

研究表明,MRJPs 是与 N 末端残基处的寡糖共价结合的糖蛋白^[81],所有 MRJP 都具有 1-8 个预测的 N-糖基化位点^[85]。其中,MRJP1、MRJP2 和 MRJP3 在天冬酰胺(N)残基处被糖基化,与 MRJP2 和 MRJP3 相比,MRJP1 表现出更多的糖基化位点^[85,142]。MRJPs 对 BA 的保护作用可能归因于花色苷整合到接枝在致密蛋白质表面的亲水性糖类形成了保护层。这些接枝的糖基提供空间位阻,抑制热处理过程中的蛋白质折叠^[143,144],从而减少了花色苷的降解,保留了稳定性和抗氧化活性。

此外,有研究表明,相对于具有规则结构的球状蛋白,无序蛋白与酚类物质之间往往呈现出更为显著的结合作用^[145]。已知 MRJPs 是热稳定蛋白,尤其是含量最丰富的蛋白 MRJP1,表现出相对高度的无序性^[146],这可能进一步促进花色苷在热环境中的稳定性。

2.4.1.3 pH 值的影响

多糖-蛋白质复合物的形成和性质与 pH 值高度相关^[69]。Muresan 等人^[89]使用示差扫描荧光法(DSF)证明,MRJP1、MRJP2 和 MRJP3 对 pH 依赖的稳定性。他们的研究表明,与中性相比,所有 MRJP 在酸性 pH 值下表现出显著较高的稳定性,在 pH 4.0 或 4.5 时观察到峰值稳定性。此外,研究表明,MRJPs 中 N-连接糖基化位点的序列基序由 N-X-S/T 主导(其中 X 代表除脯氨酸以外的任何氨基酸)^[147],并且 MRJP1 被鉴定为酸性蛋白^[148]。因此,氨基酸在酸性条件下可能带有大量电荷,导致多酚上带负电的

基团可能与蛋白质上带正电的基团结合以形成静电相互作用^[69]。另外，Mattei 等人^[149]通过结构分析全面描述了糖脂蛋白 RJ 细丝的结构，并表明静电相互作用在低 pH 值下起作用。MRJPs 与 BA 之间的这种相互作用力促进了 MRJPs-BA 的稳定性。

2.5 本章小结

本章通过设置加速实验（如光照、蔗糖、VC、加热及体外模拟消化）研究了蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷的稳定性及热降解动力学的影响，实验结果表明：

1.蜂王浆主蛋白在光照、蔗糖、VC、加热条件下可以缓解蓝莓花色苷降解。其中 0.1 mg/mL 的 MRJPs 对花色苷稳定性最为显著，特别是光照、蔗糖条件下 MRJPs-BA 复合物中花色苷的含量比 BA 组分别提高了 15.76%、20%。实验表明，VC 和高温加工下虽然加速了蓝莓花色苷的降解，但 MRJPs 的添加可在一定程度上保护蓝莓花色苷的稳定性。同时，实验通过对蓝莓花色苷的色值进行检测，发现在光照、蔗糖、VC、加热条件下，添加 MRJPs 的实验组比 BA 组表现出较小的 ΔE ，说明 MRJPs 同时可以保护蓝莓花色苷的颜色稳定性。

2.热降解动力学实验通过在不同 pH（3-6）和温度下（50-90℃）对 BA 和 MRJPs-BA 复合物进行加热，得出不同 pH 范围和温度下的热降解速率。结果表明，BA 和 MRJPs-BA 复合物的热降解率在加热过程中都随着 pH 和温度的升高而加快，但 MRJPs-BA 复合物的降解率小于 BA 组，说明 MRJPs 的加入减缓了花色苷的降解。同时经过计算发现，BA 和 MRJPs-BA 复合物的热降解速率常数均符合一级热降解动力学，表明 MRJPs 的添加没有改变花色苷的热降解动力学。

3.体外模拟消化发现，胃消化过程中蓝莓花色苷主要以黄烺盐离子形式存在，因此 BA 和 MRJPs-BA 复合物在胃中消化 2 h 的保留率没有发生显著变化。而在肠消化过程，由于温度和 pH 的变化，则使得 BA 和 MRJPs-BA 复合物都发生了极其显著的降解。但经过 2 h 肠消化后，依旧可以发现，MRJPs-BA 复合物的花色苷保留率显著大于 BA 组，说明 MRJPs 在模拟消化过程中可以减轻花色苷的降解。

第3章 蜂王浆主蛋白与花色苷的相互作用机理研究

3.1 引言

蓝莓因花色苷含量丰富、有抗衰老、抗氧化、清除自由基、保护视力等多种功效而备受当代消费者青睐。但是蓝莓花色苷备受环境因素限制，特别是在加工条件下容易发生降解。为解决这一难题，多种针对蓝莓花色苷稳定性的措施已经在现实中被研究和应用。一些生物大分子（如蛋白质）与天然小分子之间相互作用是近年来常见的用于保护花色苷稳定性的研究，其中蛋白质与花色苷之间的研究较为常见。

蜂王浆主蛋白是蜂王浆具备抗炎、抗氧化活性、抗菌活性以及增强免疫活性等多种保健功效关键物质。蜂王浆及相关产品作为纯天然保健品在当代消费者中也极受欢迎，但蜂王浆口感差、产品单一，让人难以选择，因此本研究将蜂王浆主蛋白与蓝莓花色苷稳定性相关联，既可以保护蓝莓花色苷稳定性又可以改善蜂王浆主蛋白口感体验。

由前一章研究可知，不同加工条件下蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷具有保护作用，但二者之间的作用机制尚未明确。因此本章内容主要是探索蜂王浆主蛋白对蓝莓花色苷的保护机制。蓝莓中花色苷种类多样，其中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷（C3G）作为浆果和水果中含量最丰富的花色苷之一，常用于探讨与蛋白质之间的相互反应^[116]。如 Zheng^[150]发现酪蛋白-葡聚糖和乳清蛋白-葡聚糖偶联物可有效稳定富含 C3G 的越橘花青素提取物。同样，Cheng 等人^[151]探讨了 C3G 与乳清蛋白的相互作用，而 Attaribo 等人^[152]研究了预热的蚕蛹蛋白（SPP）如何增强 C3G 的稳定性。了解这些多酚-蛋白质相互作用对于在食品和健康应用中释放其全部生理潜力至关重要。

为探究 C3G 与蜂王浆主蛋白的相互作用机制，本研究综合运用了多种光谱分析手段。在实验过程中，通过 UV-Vis 光谱、荧光光谱、FT-IR 光谱及 CD 光谱等技术对二者相互作用进行系统表征。同时借助分子对接方法，对 MRJPs 与 C3G 的结合模式进行预测分析。这些研究结果将会为花色苷在食品工业加工中的现实应用奠定一定的理论依据。

3.2 材料试剂与设备

3.2.1 实验材料

同 2.2.1

3.2.2 实验试剂

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G): 纯度大于 98%, 购于中原植提标准品公司; 蜂王浆主蛋白由第二章实验所得(MRJP_s, 纯度大于 96%); 磷酸氢二钠、柠檬酸和磷酸二氢钠等其他试剂均为国产分析纯。

3.2.3 仪器设备

表 3-1 实验设备
Table 3-1 Experimental equipment

仪器名称	型号	生产厂家
分析天平	JY1002	上海精密科学仪器有限公司
水浴锅	DK-S26	上海三发科学仪器有限公司
全波长紫外分光光度计	UH5700	日本岛津
荧光分光光度计	F-7100	日本岛津
圆二色谱仪	JASCO J-1500	日本岛津
傅里叶红外光谱仪	R Prestige-21, Shimadzu Crop	日本岛津
蛋白凝胶电泳装置	042BR32301	Singapore
凝胶成像系统	G: BOX iChemiXR	Syngene

3.2.4 实验方法

3.2.4.1 试剂配置

将 MRJP_s 用磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L PBS, pH 7.0) 配制成 0.5 mg/mL 溶液, 4°C 下保存备用。用去离子水配置 C3G 溶液, 浓度分别为 0、10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L、40 μmol/L 和 50 μmol/L, 放置在 4°C 下备用。

3.2.4.2 紫外可见吸收光谱

采用体积比 1:1 的比例, 将预先制备的 0.5 mg/mL MRJP_s 溶液分别与不同浓度的 C3G (0、10、20、30、40、50 μmol/L) 水溶液充分混匀。随后, 使用分光光度计在 300-400 nm 波长区间进行吸收光谱测定。

3.2.4.3 荧光光谱

将配制好的 0.5 mg/mL MRJPs 溶液分别与各浓度的 C3G (0、10、20、30、40 和 50 μmol/L) 水溶液以体积比 1:1 充分混合。随后, 分别在 25°C、45°C、65°C 的水浴中加热 15 min, 完成后将样品迅速移至 1 cm 石英比色皿中, 在荧光检测荧光条件为激发波长 280 nm, 狭缝宽度 5 nm, 波长范围 300 - 400 nm 下测定不同温度下的荧光发射光谱。另外, 同步荧光的检测分别在 $\Delta\lambda=15$ nm (激发波长 265 - 325 nm) 和 $\Delta\lambda=60$ nm (激发波长 220 - 320 nm) 条件下进行。所有实验均进行三次, 通过软件 Origin 2021 对数据进行作图, 用 IBM SPSS Statistics 26 进行数统计分析。

3.2.4.4 傅里叶红外光谱

MRJPs 和 MRJP-C3G 配合物的红外光谱使用 IR Prestige-21 光谱仪记录。将样品 (MRJPs 和 MRJPs-C3G) 分别与 KBr 按 1:100 (mL:g) 的比例混合, 压成片剂进一步测定。在 400 到 4000 cm^{-1} 的吸光度模式下测量 FTIR 光谱。

3.2.4.5 圆二色谱

通过圆二色谱可以比较加入 C3G 前后 MRJPs 的二级结构。CD 光谱根据文献^[130,158]制备的样品为 0.25 mg/mL MRJPs 和 0.25 mg/mL MRJPs + 20 μM C3G。用 JASCO J-1500 分光偏振仪在远紫外区 190 ~ 250 nm 范围内对其进行监测。扫描速率设为 100 nm/min, 狭缝宽度值定为 1 nm, 光程设为 0.1 cm。然后, 利用 CDpro 软件和 bestsel 平台评估二级结构相对含量。

3.2.4.6 荧光淬灭机理

在进行实验研究时, 内滤效应—花色苷在蛋白质激发 (280 nm) 和发射 (340 nm) 波长处吸收能量—应进行消除。方程 (8) 用于校正由蛋白质和花色苷之间的相互作用引起的内部过滤效应:

$$F = F_u \cdot 10^{QL(\varepsilon_{\lambda_{ex}} + \varepsilon_{\lambda_{em}})} \quad (8)$$

式中, F 代表样品真实的荧光强度, F_u 是发射荧光强度, Q 是 C3G 的浓度, L 是单元路径长度, $\varepsilon_{\lambda_{ex}}$ 和 $\varepsilon_{\lambda_{em}}$ 分别代表 C3G 处于激发波长 (280 nm) 和发射波长 (340 nm) 处的摩尔消光系数^[151]

荧光淬灭遵循 Stern-Volmer 方程 (9):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}C_q = 1 + K_q\tau_0C_q \quad (9)$$

式中 F_0 为对照组（无 C3G 时）MRJPs 的荧光强度， F 代表实验组（加入 C3G 后）MRJPs 的荧光强度， K_q 代表生物大分子在淬灭过程中的淬灭速率常数， K_{sv} 代表 Stern-Volmer 淬灭常数， c_q 代表淬灭剂浓度， τ_0 代表淬灭剂不存在时荧光分子的寿命（ 10^{-8} s）。

3.2.4.7 SDS-PAGE 凝胶电泳

制备浓度为 12% 的分离胶，加载 20 μ g 蛋白质的样品进行 SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳）。在电泳完成后，显色处理采用考马斯亮蓝染色剂对样品进行染色，以便清晰地观察和比较不同样品中的蛋白条带。

3.2.4.8 分子模拟对接

C3G 结构由 PubChem 生成，MRJP1 的结构从 RCSB (PDB ID: 5YYL) 中下载。（<https://www.rcsb.org/>）。在分子结构的能力优化过程中，Spartan 软件被用于构建低能态的稳定分子构型。随后，分子对接实验采用 Molegro Virtual Docker 4.0 平台开展。对接参数设置如下：中心坐标 $x = -19.4$, $y = -22.6$, $z = -23.4$ ，半径 $R = 15$ Å (1 Å = 10^{-10} m)。研究采用 MolDock 评分、Rerank Score 和 RMSD 值等多重指标综合评估，筛出最优对接模式。在此基础上，运用 Discovery Studio 4.5 软件进行可视化处理，获得蛋白与 C3G 相互作用的二维和三维空间结构特征。

3.2.4.9 数据统计与分析

显著性分析的进行采用 IBM SPSS Statistics 26 软件包，实验数据的呈现形式均以均数 $\pm$ 标准偏差（Mean $\pm$ SD）表示，所有实验进行 3 次，设定 3~5 个平行。对单因素方差分析进行组间数据分析比较（one-way ANOVA., $P < 0.05$ 代表有显著性差异， $P < 0.01$ 代表有极显著性差异），使用 Origin 2021 软件绘图。

3.3 结果与分析

3.3.1 MRJPs 与 C3G 相互作用的紫外可见吸收光谱

实验记录了 MRJPs 与不同浓度 C3G 在外-可见吸收光谱。如图 3-1 所示，MRJPs 在 285-287.5 nm 处表现出特征吸收峰，表明蛋白中主要含有色氨酸或酪氨酸。随着 C3G 浓度的增加，吸收峰强度增加，并且从 285 nm 红移到 287.5 nm，这表明添加高浓度的 C3G 后，MRJPs 的氨基酸残基的微环境向更疏水的方向转变。

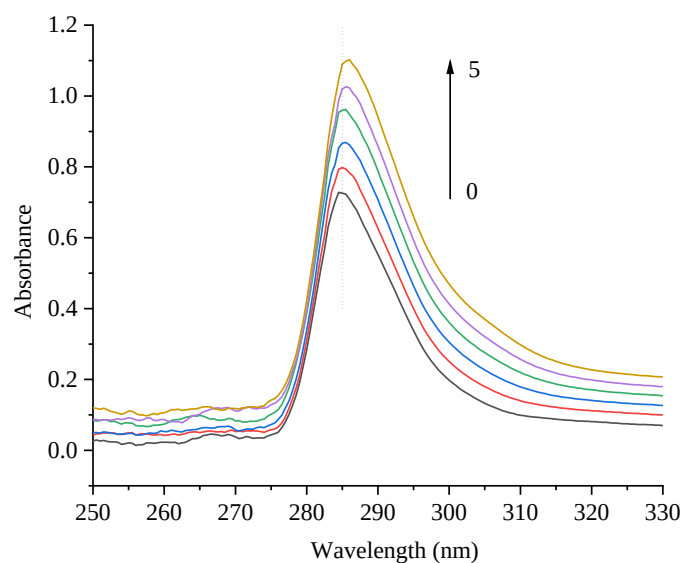


图 3-1 MRJPs-C3G 复合物的紫外可见光谱图
(注: C3G 浓度为 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$, 0-5)

Figure 3-1 UV-Vis spectra of MRJPs-C3G complexes

(Note: The C3G concentrations were 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$, 0-5)

3.3.2 MRJPs 与 C3G 相互作用的荧光光谱

特定氨基酸残基在蛋白质结构中释放的固定荧光构成了蛋白质荧光的机制原理。如蛋白质中的酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸, 这些氨基酸在 280 nm 波长处具有特征性荧光发射, 这一特性为探索蛋白质-多酚之间的相互作用提供了有效手段。联合荧光光谱可以观察蛋白质结构以及荧光团周围的物理和化学环境发生的变化, 这些变化导致了发射峰的变化^[153]。根据图 3-2 所示, 蜂王浆主蛋白在 333 nm 处呈现最大荧光发射波长(λ_{max})。当引入花色苷后, 其荧光强度显著降低, 且该变化与 C3G 浓度呈负相关, 数值由最初的 54 降到了 29。这一现象表明, 氨基酸残基在花色苷作用下产生了内源性荧光淬灭效应, 证实了蜂王浆主蛋白和 C3G 之间存在分子间的相互作用。值得注意的是, λ_{max} 表现出微小红移 (331.6-333.4 nm), 这反映出蜂王浆主蛋白内的氨基酸(色氨酸与酪氨酸)残基附近微环境的极性发生了变化。

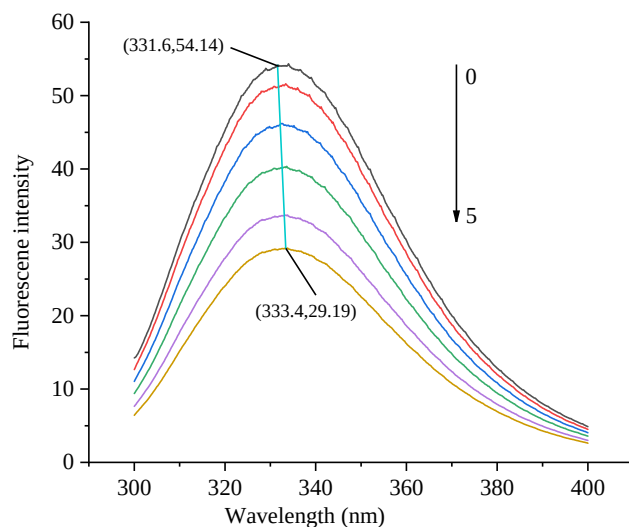


图 3-2 MRJPs-C3G 复合物在 280 nm 激发波长下的荧光发射光谱

(注: C3G 浓度为 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$, 0-5)

Figure 3-2 Fluorescence emission spectra at excitation wavelength of 280 nm of MRJPs-C3G complexes

(Note: The C3G concentrations were 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$, 0-5)

3.3.3 MRJPs 与 C3G 相互作用的荧光淬灭机理

荧光淬灭的衰弱现象源于荧光分子(荧光体)与溶剂或溶质分子之间物理或化学作用, 这一过程称为荧光淬灭。该过程主要涉及到激发态反应、能量转移、复合物的形成以及碰撞淬灭四种机制, 在研究蛋白质荧光淬灭中, 其机理可通过温度变化的特征进行判别。若淬灭常数高于 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 可判为静态淬灭; 若淬灭常数低于 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 则归于动态淬灭。静态淬灭是由于分子间相互作用而导致新型配合物的形成, 且淬灭常数 K_{sv} 与温度呈负相关关系, 即随温度升高而降低。动态淬灭是通过分子间的碰撞和扩散引起的。分子的扩散效应会影响这一过程, 导致 K_{s} 随温度升高而增加^[154]。

由图 3-3 和表 3-2 可以看出, Stern-Volmer 曲线在三种温度下呈现出良好的线性关系, 说明 MRJPs 的淬灭只通过一种淬灭机制发生^[155]。淬灭速率常数 K_{sv} 随温度升高而升高, 但其 K_{q} 数量级约为 $2 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 远高于 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 不符合动态淬灭机理, 综上初步判定, C3G 与 MRJPs 之间的淬灭机制不是由于动态淬灭引起的扩散和碰撞, 而是由于 C3G 与 MRJPs 之间形成新的非发光配合物引起的静态淬灭^[156]。

表 3-2 蜂王浆主要蛋白 (MRJPs) 系统中 C3G 的 Stern-Volmer 淬灭常数。

Table 3-2 Stern-Volmer quenching constant of C3G in royal jelly major protein (MRJPs) system.

T(R ²)	K _{sv} (×10 ³ L·mol ⁻¹)	K _q (×10 ¹¹ L·mol ⁻¹ s ⁻¹)
298(0.9967)	17.6±0.16	17.6±0.16 ^c
318(0.9888)	20.4±0.22 ^b	20.4±0.22 ^b
338(0.9968)	22.9±0.24 ^a	22.9±0.24 ^a

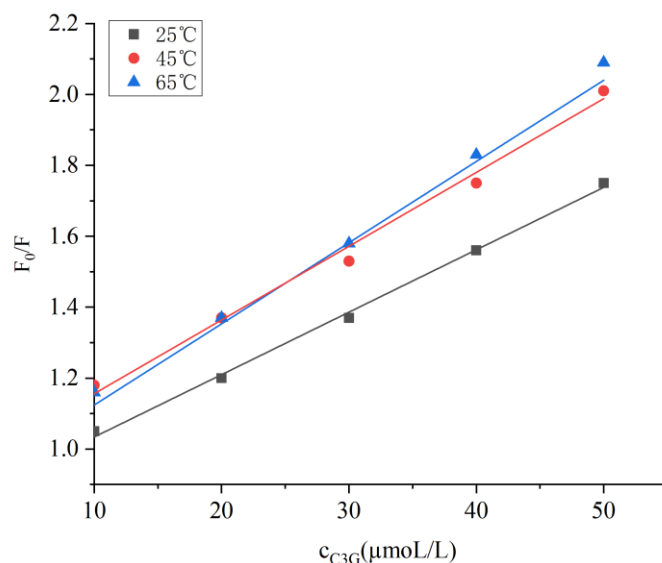


图 3-3 在 298、318 和 338 K 处添加 C3G 的 MRJPs 的 Stern-Volmer 图。

Figure 3-3 The Stern-Volmer plots of MRJPs with the addition of C3G at 298, 318, and 338 K.

3.3.4 MRJPs 与 C3G 相互作用的同步荧光光谱

同步荧光光谱作为一种高校分析手段,可用于探究发色团微环境构象的动态变化。该技术特别适用于探究小分子化合物与蛋白质二级结构间的相互作用机制。在实验参数设置为 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 探究下,所得同步荧光光谱图反映色氨酸残基周围环境的变化特征,而 $\Delta\lambda$ 调整为 15 nm 时,所获取的谱图则主要表征酪氨酸残基附近微环境的变化。通过观察 λ_{max} 的位移方向,可进一步推断氨基酸残基为环境性质的变化:当 λ_{max} 呈现蓝移现象时,表明氨基酸残基在该环境下疏水性增强,同时极性减小;当同步荧光光谱图的 λ_{max} 出现红移时,表明氨基酸残基微环境疏水性减弱,极性增强^[157]。

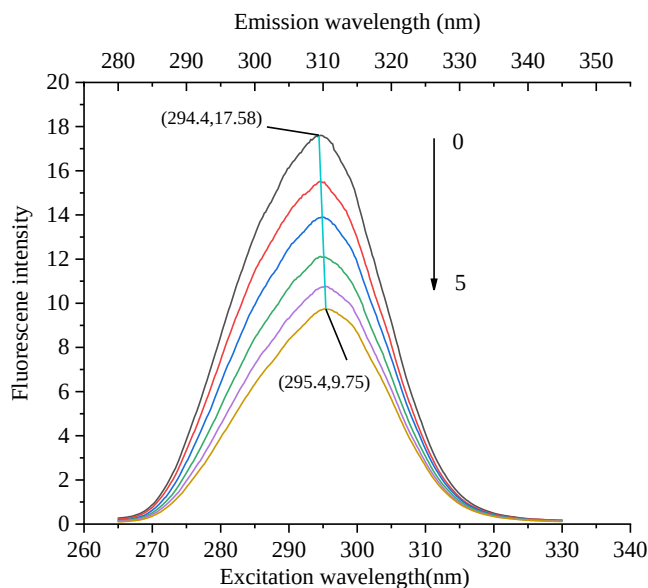


图 3-4 当 $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$ 时，在 298K 处添加 C3G 的 MRJPs 的同步荧光光谱
(注：C3G 浓度为 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$, 0-5)

Figure 3-4 Synchronous fluorescence spectra of MRJPs with the addition of C3G at 298 K when $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$. (Note: The C3G concentrations were 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$, 0-5)

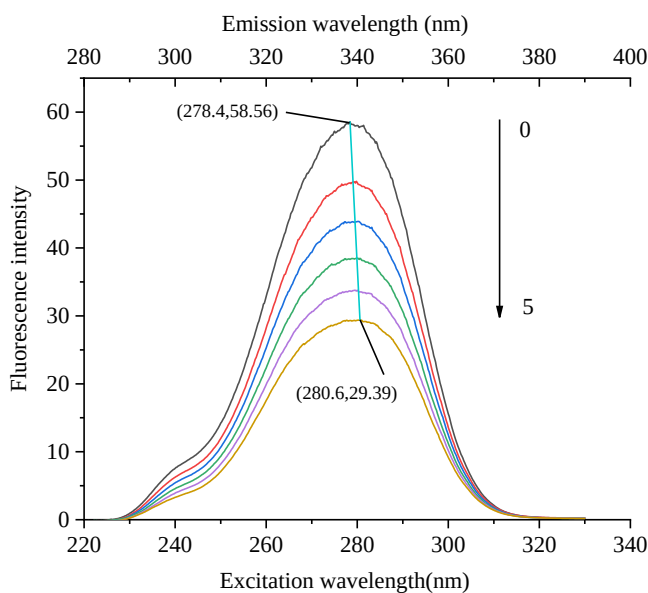


图 3-5 当 $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$ 时，在 298K 处添加 C3G 的 MRJPs 的同步荧光光谱
(注：C3G 浓度为 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$, 0-5)

Figure 3-5 Synchronous fluorescence spectra of MRJPs with the addition of C3G at 298 K when $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$.

(Note: The C3G concentrations were 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$, 0-5)

从图 3-4 和 3-5 可知，在 C3G 浓度的增加的过程中，两种氨基酸荧光强度发生下降，说明 C3G 的加入对两种氨基酸的残基荧光强度产生了影响，且可明显看出，色氨酸强度大于酪氨酸，则表明色氨酸是 MRJPs 中主要荧光来源。当 $\Delta\lambda = 15$

nm, $\Delta\lambda=60$ nm, 两种氨基酸残基的 $\lambda_{\max}$ 均发生了红移, 这种现象说明酪氨酸残基和色氨酸残基处于疏水性减弱, 极性增强的环境。这种微环境的变化表明他们的构象也发生了改变。即 C3G 与 MRJPs 反应后改变了 MRJPs 的二级结构。

3.3.5 MRJPs 与 C3G 相互作用的傅里叶红外光谱

通过红外光谱分析可以进一步探究蛋白质构象的动态变化。在 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内, 主要源于 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动的酰胺 I 带呈现特征吸收峰; 与此同时, 位于 $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 范围内的酰胺 II 带则表现为 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动和 $\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动的综合吸收效应。这些波段与蛋白质二级结构有关^[36]。如图 3-6 所示, C3G 的加入引起了 MRJPs 酰胺 I 带从 1628.793 cm^{-1} 移至 1630.9 cm^{-1} , 酰胺 II 带的波数从 1591.7 cm^{-1} 转至 1597.561 cm^{-1} , 该现象说明 C3G 的参与引起了 MRJPs 二级结构的变化。同时, C3G 的加入引起 MRJPs 的酰胺 I 强度出现减弱, 表明 MRJPs 的 α -螺旋减少。此外, 还可以通过 $3300\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ 波段酰胺 A 带($\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动)改变来验证蛋白质二级结构中 α -螺旋构象变化的改变^[88,130,158]。如图 3-6 所示。该波段呈现一个显著宽峰, 这对应于蛋白质的酰胺 A 带的特征吸收。实验数据显示, 引入 C3G 后, MRJPs 的酰胺 A 带吸收峰由 3444.75 cm^{-1} 偏移至 3451.202 cm^{-1} , 这种波数位移表明, C3G 的引入导致了蛋白二级结构中氢键网络的重排与重构。

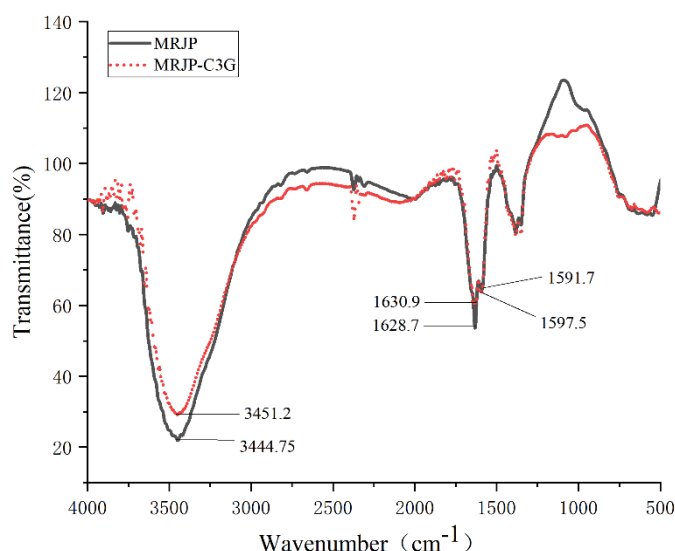


图 3- 6 MRJPs-BA 的傅里叶变换红外光谱

Figure 3-6 Fourier transform infrared (FTIR) spectra of MRJPs-BA

3.3.6 MRJPs 与 C3G 相互作用的圆二色谱

表 3-3 MRJPs 和 MRJPs-C3G 的二级结构含量 (%)。

Table 3-3 The secondary structure content of MRJPs and MRJPs-C3G (%).

Samples	α -Helix	β -Sheet	β -Turns	Random coils
MRJPs	21.1 $\pm$ 0.2 ^a	16.5 $\pm$ 0.5 ^b	14.5 $\pm$ 0.4 ^a	48.0 $\pm$ 0.2 ^a
MRJPs-C3G	13.3 $\pm$ 0.3 ^b	26.3 $\pm$ 0.3 ^a	12.9 $\pm$ 0.2 ^b	47.4 $\pm$ 0.4 ^a

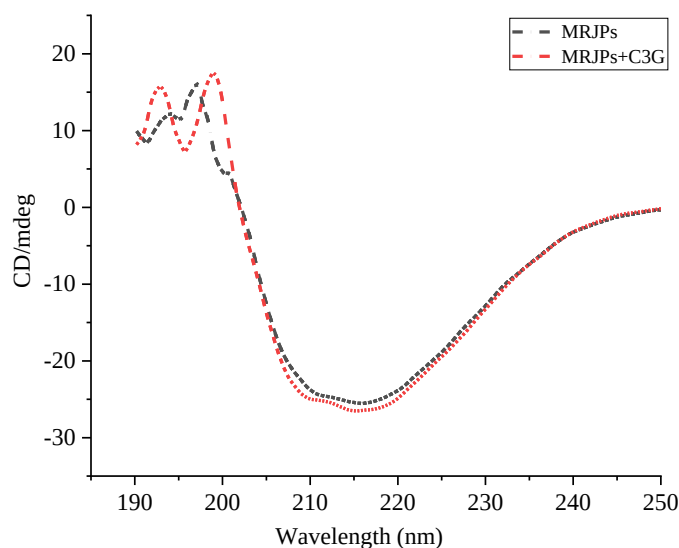


图 3-7 MRJPs 的 CD 图谱

Figure 3-7 The CD spectra of MRJPs in absence and presence of C3G.

蛋白质二级结构的规律与肽键的排列有关,这种排列主要靠分子间的氢键维系,当分子间作用力发生变化后,会影响到蛋白质的二级结构,其 CD 谱峰也会随之改变。由下图 3-7 可知,蜂王浆主蛋白 CD 图谱在 190~202 nm 波段存在一个明显的正峰,峰的最大值(mdeg 极大值)位于 197 nm 附近;在 202~250 nm 波段存在一个明显的负峰,峰的最大值(mdeg 极小值)位于 216 nm 附近。MRJPs 的拟合实验数据表明,其 α -helix、 β -sheet、 β -turn 和 Random 的相对含量分别为 21.1%、16.5%、14.5%和 48.0% (表 3-3)。当 MRJPs 和 C3G 反应后 CD 谱图发生变化,主要是 197 nm 附近正峰发生偏移,分裂成两个完整的峰形,表明 C3G 成功与 MRJPs 相结合,并影响了 MRJPs 的空间结构。根据表 3-3 中结构分析数据,拟合结果显示,复合物的二级结构中 α -helix、 β -sheet、 β -turn 和 Random 相对含量分别为 13.3%、26.3%、12.9%和 47.4% (表 3-3),蛋白质二级构象的变化趋势验证了 FTIR 实验结果。这表明 C3G 作用于蛋白时诱导了 MRJPs 分子的

极化, 疏水相互作用、范德华力、静电相互作用及氢键 (主要是氢键) 等维持蛋白空间结构的非共价键作用力等被打破, 从而发生 α -helix 向 β -sheet 结构的转化。

3.3.7 MRJPs 的 SDS-PAGE 凝胶电泳

基于图 3-8 中 MRJPs 的 SDS-PAGE 电泳结构, 通过蛋白质分子量标准物质的对比分析, 可观察到 MRJPs 的蛋白条带主要分布范围在 49~77 kD 区间内。图 3-8 的电泳图谱显示三条明显的蛋白质条带, 依据现有文献对 MRJPs 分子量的描述, 自上而下分别对应着分子量为 49 kD 的 MRJP3, 57 kD 的 MRJP1 以及 64 kD 的 MRJP2^[159]。其中分子量为 57 kD 的条带表现的最明显, 该结构与 Kamakura 等报道的 MRJP1 分子量一致^[160], 验证了 MRJP1 是 MRJPs 中的最丰富蛋白^[91,161]。

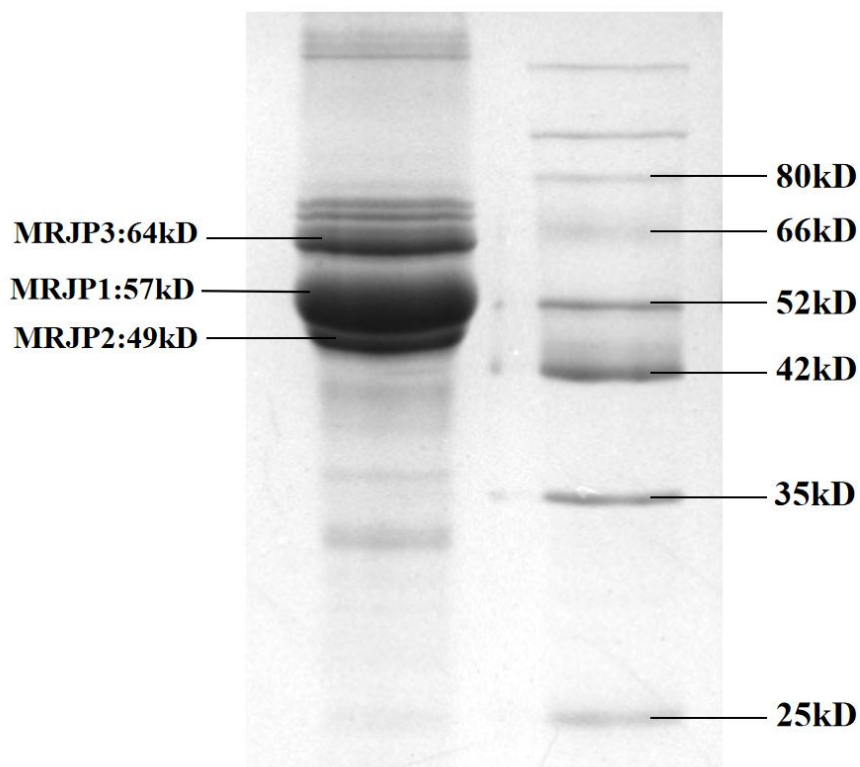


图 3-8 MRJPs 组分的 SDS-PAGE 鉴定结果

Figure 3-8 SDS-PAGE identification results of MRJPs components.

3.3.8 计算机分子模拟对接

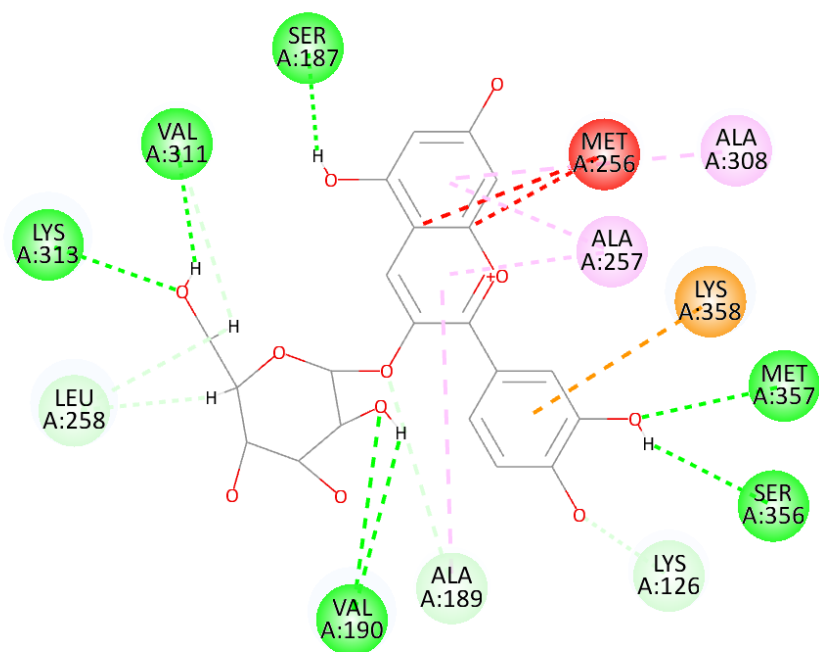


图 3-9 MRJP1-C3G 复合物分子对接 2D 示意图

Figure 3-9 2D schematic diagram of molecular docking of MRJP1-C3G complexes

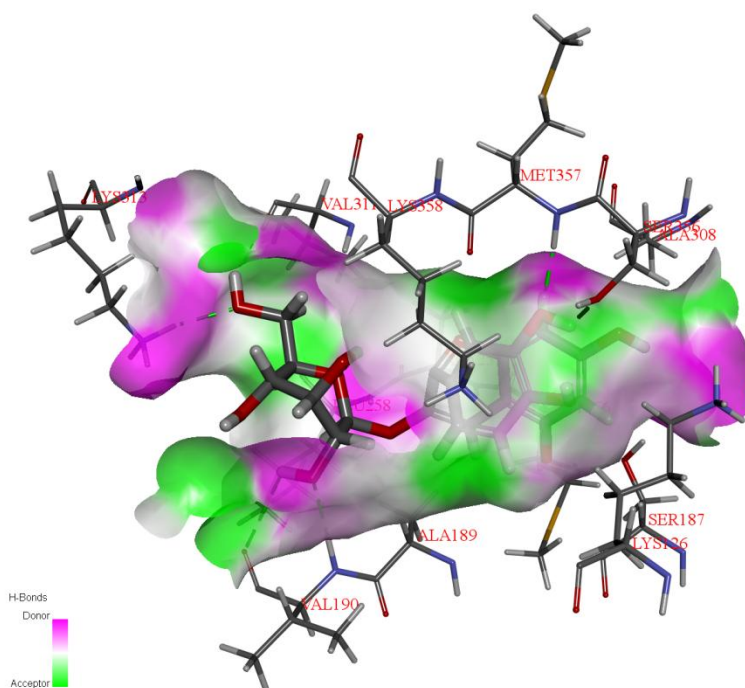


图 3-10 MRJP1-C3G 复合物在模拟分子对接中的 3D 示意图

Figure3-10 Molecular docking of MRJP1-C3G complexes in 3D docking model

C3G 与 MRJPs 之间相互作用可通过分子模拟对接得到更直接的解释。如图 3-9 和图 3-10 可知, MRJP1 可以包裹 C3G 分子, C3G 与 MRJP1 的结合主要依赖于其 II、III 结构域。在分子对接过程中, Ser 187、Val 311、Lys 313、Met 357、Ser 356、Val 190 这 6 个氨基酸残基过氢键与 C3G 相互作用, 这些氢键是 MRJP1-C3G 复合物形成的关键因素; 此外, Leu 258、Lys 126 和 Ala 189 与 C3G 分子之间形成氢键, 因此氢键与静电作用共同主导了 C3G 与 MRJP1 的结合。另外, 可以观察到, 除了以上氢键, Ala 257 和 Ala 308 通过 Pi-Cation 连接到 C3G 的 A 环和 C 环, Lys 358 通过 Pi-Alkyl 连接到 C3G 分子中的 B 环, 因此 MRJP1 可以与 C3G 的 A、B、C 三个环相互作用。这些相互作用力和蛋白对花色苷的包裹作用, 可能使 MRJPs 结合 C3G 并形成了紧密保护层, 从而屏蔽水分子对花色苷分子的亲核攻击, 进而解释了蛋白保护花色苷稳定性的原因^[162]。

3.4 本章小结

本章主要是通过光谱分析技术探究了蜂王浆主蛋白与矢车菊素-3-O-葡萄糖苷之间相互作用的机制。根据荧光淬灭机制研究, 得出 MRJPs-BA 之间的荧光淬灭速率常数 K_q 数量级约为 $2 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 远大于 $2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 表明 C3G 和 MRJPs 之间的淬灭现象并非源于动态过程中的分子扩散与碰撞, 而是由 C3G 和 MRJPs 特异性结合并形成了非荧光性质的稳定性复合物。傅里叶红外光谱结果发现 C3G 改变了酰胺带的强度, 同时酰胺带波数范围发生移动, 表明蛋白质中二级构象发生改变。此外, CD 谱图证明, C3G 的加入改变了 MRJPs 二级结构中 α -helix、 β -sheet、 β -turn 和 Random 的含量, 主要表现为 α -helix 的减少和 β -sheet 的增加, 这一结果与 FTIR 的图谱结果一致。最后, 分子模拟对接结果显示, MRJP1 可以结合和包裹 C3G。两者之间的结合力主要是氢键和静电相互作用, MRJP1 可以与花色苷的 A、B 和 C 环相互作用。MRJPs 与 C3G 的结合解释了 MRJPs 保护花色苷稳定性的原因。

第4章 添加蜂王浆主蛋白的蓝莓花色苷口服液的制备

4.1 引言

近年来，随着科学技术的突飞猛进，物质发展极为丰富，人们在各种享受物质生活的同时也被一些随之而来的疾病困扰。因此随着时代的变迁，人们的饮食结构和健康理念也发生了转变。一些更为健康、合理、纯天然、具有保健功能的产品正快速融入大众的视野中并受到大众的好评。其中以预防疾病、增强机体免疫、抗衰老、抗氧化及美容美肤等功效的口服液产品被人们广为推崇。

蓝莓花色苷（Blueberry Anthocyanins）作为天然水溶性多酚类化合物，因其强效的抗氧化、抗炎及视网膜保护功能，近年来在功能性食品与保健品领域成为研究的热点。但是，花色苷在加工与储存过程中面临稳定性挑战，其生物活性在受光照、温度及食品添加剂等影响下大幅降低，制约了商业化发展。蜂王浆主蛋白（Major Royal Jelly Proteins, MRJPs）作为纯天然保健功能产品，在本研究中被证实可以保护花色苷稳定性。基于此，本章研究聚焦于探索天然蛋白基质对蓝莓花色苷的保护作用，并开发一种稳定性口服液。

本文创新性地将蜂王浆主蛋白与蓝莓花色苷复合，通过添加一定含量的营养强化剂，辅以风味调配，从而构建一款富含蜂王浆主蛋白和蓝莓花色苷的复合口服液饮品，旨在实现对活性成分的高效保护。该研究不仅为天然色素稳定化提供了新策略，也为开发兼具功能性与安全性的蓝莓衍生保健品奠定了技术基础。

4.2 材料试剂与设备

4.2.1 材料

材料同 2.2.1

4.2.2 试剂

表 4-1 实验试剂
Table 4-1 Experimental reagent

材料和试剂名称	规格	生产厂家
氢氧化钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
浓盐酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
碳酸氢钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
ABTS	98%	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
柠檬酸	食品级	浙江金和生物科技有限公司
木糖醇	食品级	江苏白马生物科技有限公司
牛磺酸	食品级	潜江永安药业股份有限公司
葡萄糖酸铜	食品级	上海鑫泰实业有限公司

4.2.3 设备

表 4-2 实验设备
Table 4-2 Experimental equipmen

仪器名称	型号	生产厂家
分析天平	JY1002	上海精密科学仪器有限公司
全波长紫外分光光度计	UH5700	日本岛津
便携式数显折光仪	PAL-1	日本
桌上式洁净工作台	VD-850	苏州净化设备有限公司

4.3 蜂王浆主蛋白与蓝莓花色苷口服液的制作工艺

4.3.1 工艺流程

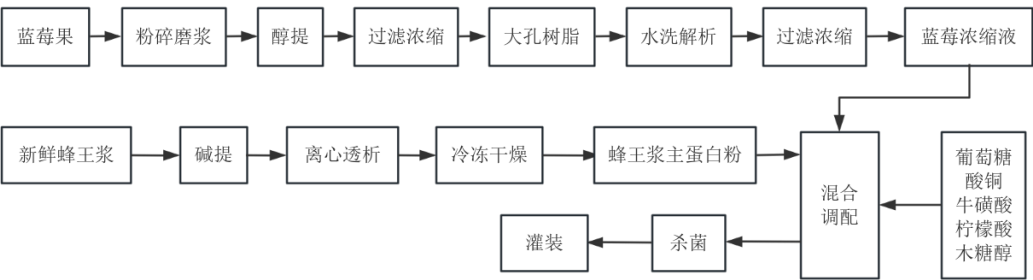


图 4-1 口服液工艺流程图
Figure 4-1 Oral liquid process flow chart.

4.4 蜂王浆主蛋白与蓝莓花色苷口服液的工艺研究

4.4.1 口服液的基液组成成分

口服液以 70%蓝莓花色苷浓缩液(86 mg/100 mL)调配, 添加蜂王浆主蛋白、葡萄糖酸铜、牛磺酸。葡萄糖酸铜和牛磺酸是常见的食品营养强化剂, 其中葡萄糖酸铜可以补充人体多种酶促反应所需的铜元素, 通过促进机体常量元素铁的吸收和利用, 从而促进中枢神经系统的正常运行; 而牛磺酸在保护视觉、提高记忆力及缓解疲劳等方面具有一定功效。

4.4.2 单因素实验用量的探究

从第二章可知, 蜂王浆主蛋白对花色苷有保护作用, 且葡萄糖酸铜和牛磺酸也证明对蓝莓花色苷稳定性有显著作用^[106], 为此, 本研究依据各成分的标准剂量范围, 设计了梯度单因素实验。在实验过程中将样品置于 90℃环境中加热 2 h, 以蓝莓花色苷保留率作为指标, 系统研究了各因素在不同用量条件下确定各单蓝莓花色苷稳定性影响的程度, 从而选出各单因素中最佳使用剂量。

4.4.3 多因素的正交实验设计

依据单因素的实验分析结果, 考察因素有蜂王浆主蛋白、葡萄糖酸铜、牛磺酸的使用量, 根据花色苷保留率, 用 $L_9(3^4)$ 正交实验方案对显著影响花色苷稳定性的各因子及其适宜浓度进行实验优化设计。正交实验设计如下。

表 4-3 $L_9(3^4)$ 正交实验设计表
Table 4-3 $L_9(3^4)$ Orthogonal experiment design table

水平	因素		
	MRJPs(A)	牛磺酸(B)	葡萄糖酸铜(C)
	(mg/100 mL)	(g/100 mL)	(mg/100 mL)
1	15	0.15	1.0
2	20	0.20	1.5
3	25	0.25	2.0

4.5 口服液的风味调配

蓝莓花色苷浓缩液在提取过程中经大孔树脂吸附, 去除了蓝莓中的糖分, 后又经水洗去除了酸性物质, 因此得到的蓝莓花色苷是无味的。研究调查发现, 患有慢性疾病特别是糖尿病的人群在我国的发病率呈上升趋势^[163]。因此, 为了让

糖尿病患者也能受益于该产品，本研究考虑选用不经糖代谢途径的木糖醇来调配口服液的甜味，用柠檬酸调配酸味。根据不同配比的木糖醇和柠檬酸，对产品的风味如口感、状态进行模糊感官评价，确认出一款最佳口感的蜂王浆主蛋白蓝莓花色苷口服液。木糖醇及柠檬酸的调配比如下表所示。

表 4-4 口服液风味调配表
Table 4-4 Oral liquid flavor blending table

实验号	木糖醇	柠檬酸
1	3%	0.3%
2	3%	0.4%
3	3%	0.5%
4	4%	0.3%
5	4%	0.4%
6	4%	0.5%
7	5%	0.3%
8	5%	0.4%
9	5%	0.5%

4.5.1 感官评价指标

表 4-5 口服液感官评价表
Table 4-5 Oral liquid sensory evaluation form

感官指标	很好	好	一般	差
色泽	色泽良好，澄清透明，显紫红色	色泽良好，澄清透明，显暗红色	色泽一般，透明，显暗红色	色泽较差，不透明，显棕红色
风味	无异味，有蓝莓果香	无异味，蓝莓果香较淡	轻微异味，无果香	有异味，无果香
口感	酸甜合适	酸甜感较好	酸甜感一般	酸甜感失衡，有涩味
状态	均匀，无沉淀	均匀，微量沉淀	不均匀，稍有沉淀	不均匀，有明显沉淀

为提升产品品质评估的准确性，研究采用多维度感官分析法，实验过程中，随机选取 10 名成员组成评审小组，要求评审小组成员在评审前不可有饮酒、抽烟、食用刺激性食物及其他影响正常味觉的不良行为。在完成单一样品评估后，

测评人员需使用清水进行口腔清洁,方可继续样品检测工作,具体评估体系详见表 4-5。

4.5.2 模糊感官评价法

建立模糊评价数学法模型

确定因素集、评语集、权重集、综合评分 S 值

因素集 $D = \{D_1, D_2, D_3, D_4\} = \{\text{色泽, 风味, 口感, 状态}\}$;

评语集 $E = \{E_1, E_2, E_3, E_4\} = \{\text{很好, 好, 一般, 差}\} = \{100, 85, 65, 50\}$

即很好占得分为 100, 好得分为 85, 一般得分 65, 差得分 50。

因素权重集 $W_F = \{F_1, F_2, F_3, F_4\} = \{0.25, 0.15, 0.50, 0.10\}$ 即 100 分中色泽占 25%, 风味 15%, 口感占 50%, 状态占 10%。

模糊数学综合评定集 $Y = W_F \times R$,

其中, W_F 为 F 权重, R 为模糊数学矩阵, Y' 为归一化后的模糊矩阵。

模糊数学综合评价值 $S = E \cdot Y'$

4.5.3 柠檬酸和木糖醇用量的确定

通过调整柠檬酸浓度梯度 (0.3%、0.4%、0.5%) 与木糖醇的含量变化 (3%、4%、5%) 设计了九种不同的实验组合。评价体现以产品的以色泽、风味、口感和状态为核心指标,运用模糊评判矩阵 R 实现隶属度的标准化处理。评估过程的具体实施方式如下所示。

表 4-6 口服液模糊评定表
Table 4-6 Oral liquid fuzzy evaluation form.

感官指标	权重	评语集			
		很好	好	一般	差
色泽	0.25	e			
风味	0.15	f			
口感	0.5	g			
状态	0.1	h			

$Y = (a, b, c, d)$

$a = (0.25e + 0.15f + 0.50g + 0.10h) / K$,

归一化后 $a' = a / (a + b + c + d)$

$Y' = (a', b', c', d')$

e, f, g, h 分别为不同因素所占人数,

$$K=e+f+g+h$$

$$S=E \cdot Y'=100a'+85b'+65c'+50d'$$

4.6 灭菌消毒处理

花色苷和蛋白的活性均与温度有关, 高温会破坏花色苷的稳定性和蛋白的活性, 因此杀菌温度不超过 50°C 和 41°C, 不能使用高温高压灭菌。故选择紫外灭菌处理^[104]。将产品转入 A 型锥形瓶后, 置于紫外光灯下进行密闭紫外杀菌处理 48 h, 期间以匀速搅拌器不断对样品进行匀速搅拌。将杀菌后的口服液在无菌环境下分装在 10 mL 的棕色玻璃瓶内, 密封后一部分放置在常温下, 一部分放置在冷藏环境下 (4°C), 每隔一段时间进行微生物检测。

4.7 口服液相关理化指标及微生物检测

蓝莓花色苷含量的测定方法同 2.2.1。

总酸度的测定采用标准碱溶液滴定, 以酚酞为指示剂, 用标准碱溶液进行滴定, 滴到微红色 30 s 内不变色为止。根据耗的标准碱溶液换算出样品中酸的含量。

总酸度由公式 (10) 计算:

$$\text{总酸度 (g/100 g)} = \frac{V \times C \times K}{m} \times 100 \quad (10)$$

式中, V 表示实验所消耗的标准碱溶液体积 (mL); C 表示使用的标准碱溶液的物质的量浓度 (mol/L), m 表示的样品质量; K 表示主要酸的换算系数, 即 1 mol/L 氢氧化钠需要消耗的主要酸的克数, 蓝莓口服液中的酸主要以柠檬酸为主要酸, 即其换算系数 K=0.070。

4.8 结果与分析

4.8.1 单因素实验结果与分析

本研究选取 MRJPs、葡萄糖酸铜以及牛磺酸作为影响因子, 通过使用优化其添加量, 在加速实验 90°C 高温加速实验条件下, 样品经 2 h 热处理后, 以蓝莓花色苷保留率为评价指标, 具体结果如下表及图所示。

表 4-7 MRJPs 对蓝莓花色苷保留率影响

Table 4-7 The effect of MRJPs on the retention rate of blueberry anthocyanins

使用量 (mg/100 mL)	蓝莓花色苷保留率 (%)
5	59.58
10	62.13
15	64.19
20	65.36
25	64.09

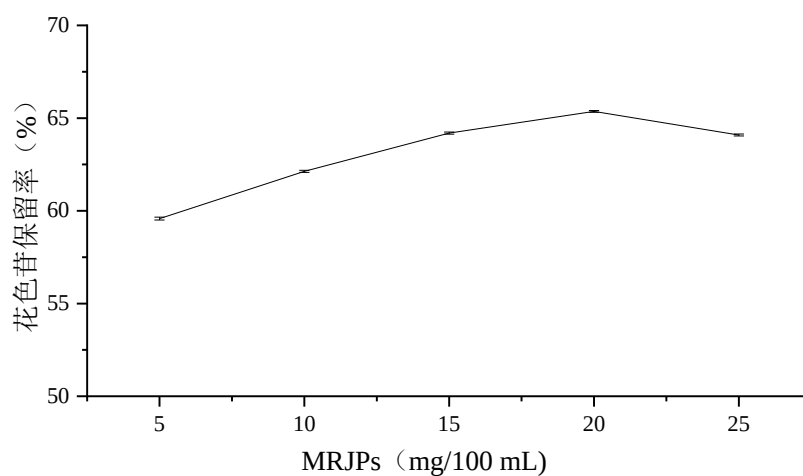


图 4-2 MRJPs 对蓝莓花色苷保留率影响

Figure 4-2 The effect of MRJPs on the retention rate of blueberry anthocyanins

如表 4-7 及图 4-2 可知, 不同含量的 MRJPs 对蓝莓花色苷稳定性有保护作用, 其中以含量 20 mg/100 mL 最为显著, 在 90℃加热 2 h 后花色苷的保留率为 65.36%, 其次是 15 mg/100 mL 和 25 mg/100 mL 的 MRJPs, 保留率分别为 64.19% 和 64.09%。因此选择含量为 20 mg/100 mL 左右的 MRJPs 较为合适。

表 4-8 牛磺酸对蓝莓花色苷保留率影响

Table 4-8 The effect of taurine on the retention rate of blueberry anthocyanins

使用量 (g/100 mL)	蓝莓花色苷保留率(%)
0.05	57.62
0.10	58.11
0.15	61.05
0.20	62.23
0.25	61.54

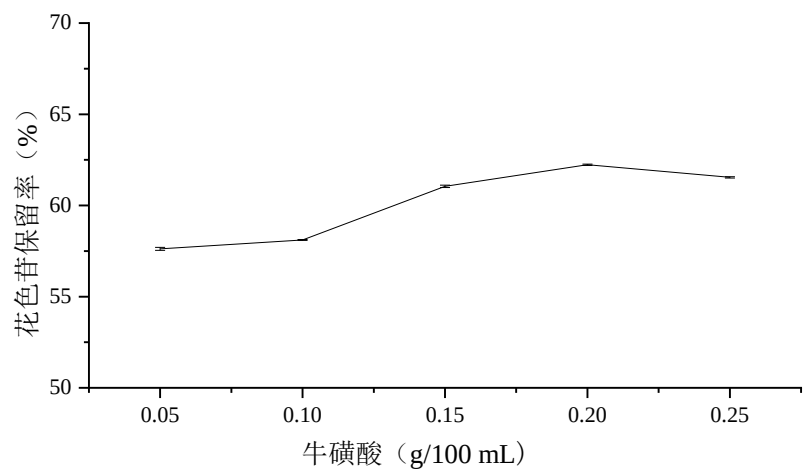


图 4-3 牛磺酸对蓝莓花色苷保留率影响

Figure 4-3 The effect of taurine on the retention rate of blueberry anthocyanins

如表 4-8 及图 4-3 所示，不同含量的牛磺酸的使用对蓝莓花色苷具有显著保护作用，其中 0.20 g/100 mL 的牛磺酸对蓝莓花色苷的保护作用最显著，在 90℃ 加热 2 h 后花色苷的保留率为 62.23%，其次是 0.15 g/100 mL 和 0.25 g/100 mL，对应的花色苷保留率分别为 61.05%，61.54%。因此选择含量为 0.20 g/100 mL 的牛磺酸较为合适。

表 4-9 葡萄糖酸铜对蓝莓花色苷保留率影响

Table 4-9 The effect of copper gluconate on the retention rate of blueberry anthocyanins

使用量 (mg/100mL)	蓝莓花色苷保留率(%)
0.5	57.72
1.0	60.23
1.5	61.88
2.0	61.56
2.5	60.07

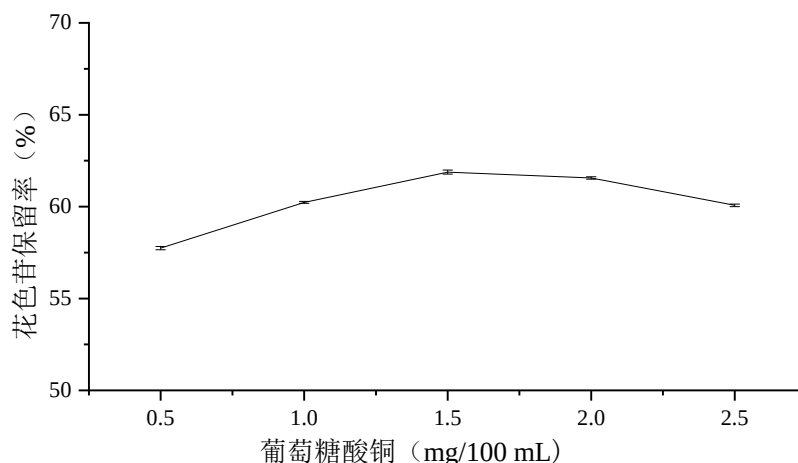


图 4-4 葡萄糖酸铜对 MRJPs-BA 复合物保留率影响

Figure 4-4 The effect of copper gluconate on the retention rate of MRJPs-BA complex

如表 4-9 及图 4-4 所示,不同含量的葡萄糖酸铜对蓝莓花色苷具有保护作用,其中,葡萄糖酸铜使用量为 1.5 mg/100 mL 对蓝莓花色苷保护作用最显著,在经 90℃加热 2 h 后花色苷的保留率为 61.88%,其次是 1.0 mg/100 mL 和 2.0 mg/100 mL,对应的花色苷保留率分别为 60.23%, 61.56%。因此选择含量为 1.5 mg/100 mL 的葡萄糖酸铜较为合适。

4.8.2 正交实验结果与分析

研究在单因素实验结果基础上进行,将 MRJPs、葡萄糖酸铜、牛磺酸及其用量进行正交实验,结果如表 4-10 所示。由表 4-10 数据计算分析可知:各影响因素水平的极差 R 分别为 $R_A=4.577$, $R_B=4.117$, $R_C=1.467$, A、B 和 C 对花色苷保留率影响大小的排序是 A、B、C。基于这一分析,蓝莓花色苷最佳保留条件确定为 $A_2B_3C_1$ 。运用 IBM SPSS Statistics 26 软件分析,进一步对蓝莓花色苷的保留率的三个关键因素进行了方差分析,所得结果详见表 4-11。

由表 4-11 数据,不同因素水平在等条件下对蓝莓花色苷的保存率存在显著差异。统计分析显示,蜂王浆主蛋白($P_A=0.042<0.05$)对蓝莓花色苷稳定具有显著影响,而牛磺酸和葡萄糖酸铜的影响则未达到显著水平。基于各因素水平分析,确定最有组合为 $A_2B_3C_1$,即 MRJPs 为 20 mg/100 mL、牛磺酸为 0.25 g/100 mL、葡萄糖酸铜为 1.0 mg/100 mL。

表 4-10 正交 $L_9(3^4)$ 实验结果表
Table 4-10 Experimental Result of Orthogonal $L_9(3^4)$

试验号	列号				花色苷保 留率(%)
	MRJPs(A)	牛磺酸(B)	葡萄糖酸铜(C)	D(空列)	
1	1	1	1	1	60.66
2	1	2	2	2	62.35
3	1	3	3	3	65.35
4	2	1	2	3	64.29
5	2	2	3	1	67.79
6	2	3	1	2	69.85
7	3	1	3	2	62.28
8	3	2	1	3	61.54
9	3	3	2	1	64.38
K1	188.360	187.23	192.05	192.83	
K2	201.93	191.68	191.02	194.48	
K3	188.2	199.58	195.42	191.18	
k1	62.787	62.410	64.017	64.277	
k2	67.310	63.893	63.673	64.827	
k3	62.733	66.527	65.140	63.727	
极差 R	4.577	4.117	1.467	1.100	
A>B>C					
因素主次					
A ₂ B ₃ C ₃					
优水平					

表 4-11 方差分析表
Table 4-11 Table of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	Sig.
A	41.41	2	20.70	22.82	0.042
B	26.08	2	13.04	14.37	0.065
C	3.53	2	1.76	1.95	0.339
D (误差)	1.82	2	0.91		

4.8.3 感官评价结果

表 4-12 口服液的感官评定结果

Table 4-12 Oral liquid sensory evaluation results.

组别	感官指标	很好	好	一般	差
1	色泽	6	3	1	0
	风味	6	3	1	0
	口感	4	4	1	1
	状态	6	4	0	0
2	色泽	5	4	1	0
	风味	4	5	1	0
	口感	5	3	1	1
	状态	6	3	1	0
3	色泽	6	3	1	0
	风味	6	4	0	0
	口感	3	1	3	3
	状态	6	4	0	0
4	色泽	5	2	2	1
	风味	5	5	0	0
	口感	5	2	2	1
	状态	5	3	2	0
5	色泽	6	1	3	0
	风味	5	2	2	1
	口感	5	2	2	1
	状态	4	3	3	0
6	色泽	6	2	2	0
	风味	5	2	2	1
	口感	6	2	2	0
	状态	5	4	1	0
7	色泽	6	3	1	0
	风味	6	4	0	0

组别	感官指标	很好	好	一般	差
8	口感	6	3	1	0
	状态	5	4	1	0
	色泽	6	3	1	0
	风味	7	3	0	0
9	口感	6	2	2	0
	状态	6	4	0	0
	色泽	6	3	1	0
	风味	6	2	2	0
	口感	6	2	1	1
	状态	4	4	1	1

不同调配方案调配出的口服液经评审得到不同的得分，其中第一组调配方案得到的 R_1 的矩阵如下所示：

$$R_1 = \begin{bmatrix} 6 & 3 & 1 & 0 \\ 6 & 3 & 1 & 0 \\ 4 & 4 & 1 & 1 \\ 6 & 4 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

带入模糊综合评价分析得 Y_1 ：

$$Y_1 = W_F \times R_1 \div K_1 = (0.25, 0.15, 0.50, 0.10) \cdot \begin{bmatrix} 6 & 3 & 1 & 0 \\ 6 & 3 & 1 & 0 \\ 4 & 4 & 1 & 1 \\ 6 & 4 & 0 & 0 \end{bmatrix} \div 22 = (0.23, 0.26, 0.3, 0.5)$$

将 Y_1 进行归一化后得到 $Y_1' = (0.18, 0.20, 0.23, 0.39)$

计算综合评定向量 $S = EY'$ 。

得 $S_1 = EY_1' = 100 \times 0.18 + 85 \times 0.20 + 65 \times 0.23 + 50 \times 0.39 = 69.36$

同理得出其他组别的 S 值。

$Y_2' = \{0.20, 0.19, 0.20, 0.41\}$, $S_2 = 69.68$

$Y_3' = \{0.16, 0.14, 0.33, 0.37\}$, $S_3 = 67.80$

$Y_4' = \{0.22, 0.19, 0.25, 0.33\}$, $S_4 = 71.58$

$Y_5' = \{0.25, 0.22, 0.22, 0.31\}$, $S_5 = 73.36$

$Y_6' = \{0.29, 0.24, 0.30, 0.17\}$, $S_6 = 77.51$

$Y_7' = \{0.33, 0.30, 0.37, 0.00\}$, $S_7 = 82.64$

$$Y_8' = \{0.28, 0.25, 0.47, 0.00\}, S_8 = 79.72$$

$$Y_9' = \{0.26, 0.22, 0.23, 0.30\}, S_9 = 74.03$$

由计算结果可知,所有方案中 $S_7=82.64$,是所有方案中的最大值,其次是 $S_8=79.72$,即第七号实验在综合评中色泽、风味、口感、状态都是处于一个最好状态,所以七号为最优选择。方案的配方为:100 mL 口服液中蓝莓花色苷浓缩液(86 mg/100 mL)为 70%,蜂王浆主蛋白使用量 20 mg(即 0.02%),牛磺酸使用量 0.25 g(即 0.25%),葡萄糖酸铜使用量 1.0 mg(即 0.001%),木糖醇使用量 5%,柠檬酸使用量 0.3%。

4.8.4 产品微生物检测结果

表 4-13 口服液中微生物检测结果

Table 4-13 Microbiological test results of oral liquid

条件	微生物	
	菌落	霉菌
4℃	未检出	未检出
常温	检出	未检出

如表 4-13 所示,为产品在 4℃和常温下放置 6 周后微生物检测结果。口服液在 4℃下放置 6 周后菌落总数和霉菌检测均为显示未检出,而常温下检测出菌落数。说明冷藏环境有助于口服液的保存,除了温度较低外,这种结果可能也与实验阶段样品量少杀菌充分有关,而对于大批量生产为保证安全可选择添加符合标准范围内的防腐剂^[104]。

4.8.5 产品理化指标检测结果

表 4-14 口服液的理化指标检测结果

Table 4-14 Physical and chemical index detection results of oral liquid

指标	对照组	实验组
可溶性固形物	5.7%	6.2%
总酸度	0.35%	0.37%
花色苷含量	47 mg/100 g	60 mg/100 g

4.9 口服液成品展示



图 4-5 口服液产品图

Figure 4-5 Oral liquid product picture.

4.10 本章小结

本章通过建立多因素分析正交实验,以加速实验 90℃加热 2 h 后花色苷保留率为指标,确定了口服液中 MRJPs、牛磺酸和葡萄糖酸铜对蓝莓花色苷保护作用最适用量。选择木糖醇、柠檬酸作为风味调配剂,建立模糊综合评价,主要以色泽、风味、口感和状态四个指标进行感官评价,确定了以 5%木糖醇和 0.3%柠檬酸为使用量。得出口服液各组分和调配剂的最终配比为:蓝莓花色苷浓缩液(86 mg/100 mL)为 70%,蜂王浆主蛋白使用量为 0.02%,牛磺酸使用量为 0.25%,葡萄糖酸铜使用量为 0.001%,木糖醇使用量为 5%,柠檬酸使用量为 0.3%(以 100 mL 口服液为标准)。经此配方调配的口服液颜色鲜亮,状态均匀、透明,口感酸甜适中。经紫外杀菌处理及不同温度储存下,确定了冷藏储存对口服液的保存更有利。更重要的是该产品不含糖,慢性疾病患者,特别是糖尿病患者同样可以选择。本章实验所得数据可为与蓝莓相关产品中口服液的制备提供有限参考,一些更为具体与优化的方案还需进一步继续研究探索。

第5章 结论与展望

5.1 结论

(1) 蜂王浆主蛋白在光照、蔗糖、VC、加热条件下对蓝莓花色苷稳定性和抗氧化性具有保护作用。其中 0.1 mg/mL 的 MRJPs 对花色苷稳定性最为显著，特别是光照、蔗糖条件下 MRJPs-BA 复合物中花色苷的含量比 BA 组分别提高了 15.76%、20%。同时对蓝莓花色苷的颜色稳定性进行检测，发现在光照、蔗糖、VC、加热条件下，MRJPs 可以减缓颜色损失。热降解动力学表明了 BA 和 MRJPs-BA 复合物的热降解动力学均符合一级热降解动力学，MRJPs 没有改变花色苷的热降解动力学，但 MRJPs 的加入缓解了 BA 的热降解速率。体外模拟消化表明胃模拟环境下消化 2 h 后花色苷稳定性无明显变化，而肠模拟环境下 BA 和 MRJPs-BA 复合物都发生了及其显著的降解。但在 2 h 肠消化后依然可以发现，MRJPs-BA 复合物的花色苷保留率显著大于 BA 组，表明 MRJPs 在模拟消化过程中可以减缓了花色苷的降解。

(2) MRJPs 与 C3G 之间的作用机制研究中，荧光结果表明，MRJPs 和 C3G 之间的相互作用是静态淬灭反应。FTIR 光谱分析进一步表明 C3G 结合诱导 MRJPs 二级结构的构象变化，CD 光谱研究证明了二级构象的变化特征是 α -helix 含量的降低和 β -sheet 含量的增加。此外，分子模拟对接表明 MRJPs 可以与 C3G 之间通过氢键连接。另外，MRJPs 可以与 C3G 结合并封装 C3G 分子，从而为 MRJPs 增强蓝莓花色苷的稳定性提供基础。

(3) 制备了一款含蜂王浆主蛋白的蓝莓花色苷口服液。经单因素分析及多因素正交实验、风味调配及模糊综合感官评价得出口服液最佳调配方案为：蓝莓花色苷浓缩液（86 mg/100 mL）为 70%，蜂王浆主蛋白使用量为 0.02%，牛磺酸使用量为 0.25%，葡萄糖酸铜使用量为 0.001%，木糖醇使用量为 5%，柠檬酸使用量为 0.3%（以 100 mL 口服液为标准）。

5.2 创新点

(1) 王浆主蛋白作为蜂王浆的功能性活性成分，其在保护花色苷方面的研究还未见报道，此研究将功能性纯天然保健品中的蛋白与花色苷的相互结合，保

护了花色苷的稳定性，为食品工业中含花色苷蓝莓产品的加工和储存提供了便利。

(2) 蜂王浆蛋白的加工及食用方式单一且口感较差，产品主要以未加工形态或冻干粉形式出现。此研究在保护花色苷稳定性的同时也开发了蜂王浆蛋白的加工方向，为改善蜂王浆蛋白口感和多功能产品的研发提供了理论基础，进一步促进蜂王浆产品及花色苷产品的多样性。

5.3 展望

(1) 该研究主要研究了 MRJPs 对 BA 稳定性影响及作用机制等内容。根据凝胶电泳结果可以看出本实验制备的 MRJPs 是一种主要包含 MRJP1、MRJP2 和 MRJP3 的混合蛋白，对于 MRJPs 与 C3G 之间的具体作用力需要进一步探究。后续研究中可以继续将 MRJPs 分离纯化，分别研究 MRJP1、MRJP2 和 MRJP3 与 C3G 之间的作用机制。

(2) 本研究在加速实验和体外模拟消化过程中均表明 MRJPs 对 BA 的稳定性具有保护作用，这些研究结果主要在体外实验下完成的。根据这些研究结果，可以进一步进行体内实验研究，探究 MRJPs 与 BA 结合后在体内是否同样有作用或者二者之间可以发挥更好的协同作用。

参考文献

- [1] 张昌容, 李志, 何永福, 等. 蓝莓果渣主要功能性成分及综合利用研究进展[J]. 食品科技. 2021, 46(06): 110-114.
- [2] Zhang W, Shen Y, Li Z, et al. Effects of high hydrostatic pressure and thermal processing on anthocyanin content, polyphenol oxidase and β -glucosidase activities, color, and antioxidant activities of blueberry (*Vaccinium Spp.*) puree[J]. Food Chemistry, 2021, 342: 128564
- [3] Tian J-L, Si X, Wang Y-H, et al. Bioactive flavonoids from *Rubus corchorifolius* inhibit α -glucosidase and α -amylase to improve postprandial hyperglycemia[J]. Food Chemistry, 2021, 341 128149.
- [4] Si X, Bi J, Chen Q, et al. Effect of Blueberry Anthocyanin-Rich Extracts on Peripheral and Hippocampal Antioxidant Defensiveness: The Analysis of the Serum Fatty Acid Species and Gut Microbiota Profile[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(12): 3658-3666.
- [5] Li B, Cheng Z, Sun X, et al. Polyphenols Alleviate Oxidative Stress-Induced Intestinal Environment Imbalance and Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury in HFD-Fed Rats by Regulating the Nrf2/HO-1/NQO1 and MAPK Pathways[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2020, 64(10): 1901315.
- [6] Wang Y, Lin J, Tian J, et al. Blueberry Malvidin-3-galactoside Suppresses Hepatocellular Carcinoma by Regulating Apoptosis, Proliferation, and Metastasis Pathways In Vivo and In Vitro[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(2): 625-636.
- [7] 李恩惠, 矫馨瑶, 王晨歌, 等. 蓝莓花色苷降解动力学及稳定性[J]. 食品科学, 2018, 39(05): 1-7.
- [8] 申芮萌. 蓝莓花色苷提取纯化、结构鉴定及体外抗氧化活性研究[D]. 北京林业大学, 2016.
- [9] 矫馨瑶, 田金龙, 司旭, 等. 蓝莓花青素的研究进展[J]. 中国果菜, 2020, 40(05): 26-31.
- [10] 张淑淑, 吕想, 刘伟, 等. 果蔬花色苷的理化特性、提取技术及功能活性研

- 究进展[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(02): 360-371.
- [11] 周萍, 吴仲君, 黄才欢, 等. 花色苷提取及纯化研究进展[J]. 精细化工. 2020, 37(08): 1513-1523.
- [12] Xu X-J, Fang, S, Li Y-H, et al. Effects of low acyl and high acyl gellan gum on the thermal stability of purple sweet potato anthocyanins in the presence of ascorbic acid[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 86 116-123.
- [13] Pojer E, Mattivi F, Johnson D, et al. The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2013, 12, 483–508.
- [14] Lourith N, Kanlayavattanukul M. Sustainable approach to natural makeup cosmetics containing microencapsulated butterfly pea anthocyanins[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2023, 32.
- [15] Jiao X, Wang Y, Lin Y, et al. Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2019, 64, 88–100.
- [16] Krga I, Milenkovic D, Morand C, et al. An Update on the Role of Nutrigenomic Modulations in Mediating the Cardiovascular Protective Effect of Fruit Polyphenols[J]. Food & Function, 2016, 7 (9), 3656–3676.
- [17] Krga I, Tamaian R, Mercier S, et al. Anthocyanins and Their Gut Metabolites Attenuate Monocyte Adhesion and Transendothelial Migration through Nutrigenomic Mechanisms Regulating Endothelial Cell Permeability[J]. Free Radical Biology Medicine, 2018, 124, 364–379.
- [18] Yi L, Chen C Y, Jin X, Zhang T, et al. Differential Suppression of Intracellular Reactive Oxygen Species-Mediated Signaling Pathway in Vascular Endothelial Cells by Several Subclasses of Flavonoids[J]. Biochimie, 2012, 94 (9), 2035–2044.
- [19] Wu Y, Han T, Yang H, et al. Known and potential health benefits and mechanisms of blueberry anthocyanins: A review[J]. Food Bioscience, 2023, 55, 103050.
- [20] Xu M, Bower K A, Wang S, et al. Cyanidin-3-Glucoside inhibits ethanol-induced invasion of breast cancer cells overexpressing ErbB2 [J]. Molecular Cancer, 2010, 9(1): 1-14.

-
- [21] Mazewski C, Liang K, Gonzalez de Mejia E, et al. Inhibitory potential of anthocyanin-rich purple and red corn extracts on human colorectal cancer cell proliferation in vitro[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017,34: 254-265.
- [22] García-Conesa M T, Chambers K, Combet E, et al. Meta-Analysis of the Effects of Foods and Derived Products Containing Ellagitannins and Anthocyanins on Cardiometabolic Biomarkers: Analysis of Factors Influencing Variability of the Individual Responses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (3), E694.
- [23] Luis Â, Domingues F, Pereira L. Association between Berries Intake and Cardiovascular Diseases Risk Factors: A Systematic Review with Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis of Randomized Controlled Trials[J]. *Food & Function*, 2018, 9 (2), 740–757.
- [24] Aboonabi A, Meyer R R, Gaiz A, et al. Anthocyanins in berries exhibited anti-atherogenicity and antiplatelet activities in a metabolic syndrome population[J]. *Nutrition Research*: Available online, 2020, 76, 82-93.
- [25] Wong M K, Takei Y. 2013. Lack of plasma kallikrein—kinin system cascade in teleosts[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81057.
- [26] 尤丽, 党娅, 杨彬彦. 蓝莓花青素对2型糖尿病小鼠糖脂代谢的调节作用[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(9): 381-388.
- [27] Rozanska D., Regulska-ilow B. The significance of anthocyanins in the prevention and treatment of type 2 diabetes[J]. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2022, 27, 135–142.
- [28] Tian J L, Liao X J, Wang Y H, et al. Identification of Cyanidin-3-arabinoside Extracted from Blueberry as a Selective Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(49): 13624-13634.
- [29] 范铭. 基于桑葚渣中 α -淀粉酶抑制物成分分析及其降糖降脂功能研究[D]. 浙江师范大学, 2019.
- [30] Boespflug E L, Eliassen J C, Duodley J A, et al. Enhanced neural activation with blueberry supplementation in mild cognitive impairment[J]. *Nutritional*

- Neuroscience, 2018, 21(4): 297-305.
- [31] Miller, M. G., Hamilton, D. A., Joseph, J. A., et al. Dietary blueberry improves cognition among older adults in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. European Journal of Nutrition, 2018, 57(3), 1169-1180.
- [32] Rendeiro, C., Vauzour, D., Kean, R. J., et al. Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats[J]. Psychopharmacology, 2012, 223(3), 319-330.
- [33] Williams, C. M., El Mohsen, M. A., Vauzour, D., et al. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 45(3), 295-305.
- [34] Wang Y, Guo X X, Sun H, et al. Bilberry anthocyanin-rich extract protects against retinal photooxidative damage via activation of HO-1 and inhibition of NF-kappa B[J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 829-840.
- [35] 钟绍金, 韩珊颖, 黄裕昌. 花色苷对糖尿病视网膜病变模型大鼠视网膜氧化应激损伤拮抗作用研究[J]. 现代中药研究与实践, 2023, 37(3): 21-25.
- [36] 杨丹, 包玉龙, 张世良, 等. 蓝莓花青素对糖尿病视网膜病变模型大鼠氧化损伤的修复作用及机制[J]. 河北医药, 2023, 45(1): 44-47.
- [37] Ghosh D, Konishi T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function[J]. Asia Pacific journal of clinical nutrition, 2007, 12(2): 200-208.
- [38] 李敏. 不同花青素提取物的组成、稳定性及抗氧化性比较研究[D]. 南京财经大学, 2013.
- [39] 陈明舜. 黄烷三醇的酯化修饰和脂溶性葡萄籽原花青素的性能研究[D]. 华南理工大学, 2019.
- [40] 梁泽明, 余祥雄, 余以刚. 玫瑰茄花色苷的降解动力学及抗氧化性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 39-47, 53.
- [41] Ma Q T, Li Y Q, Li P F, et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019,

- 117: 109138.
- [42] 潘颖, 梁颖, 马蓉, 等. 紫甘蓝花色苷稳定性及热降解动力学研究[J]. 食品工业科技, 2020, 8(3): 1-10.
- [43] Jiménez N, Bassama J, Bohuon P. Estimation of the kinetic parameters of anthocyanins degradation at different water activities during treatments at high temperature (100~140°C) using an unsteady-state 3D model[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 279(10):109951.
- [44] 张锦钰, 郑棉文, 王锋, 等. 辅色剂对紫淮山花色苷稳定性的影响及其热降解动力学研究[J]. 激光生物学报, 2020, 29(1): 80-86.
- [45] 余以刚, 梁泽明, 万志超, 等. 2018.玫瑰茄花色苷的纯化及其热降解稳定性[J]. 现代食品科技, 34(12): 58-66.
- [46] 周笑犁, 夏雪冰, 王瑞, 等. 不同条件对蓝莓皮渣花色苷稳定性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(04): 192-196.
- [47] 张磊, 许静, 魏佳, 等. 二氧化硫(SO₂)熏蒸对葡萄果实结构和花色素苷含量的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(10): 292-297.
- [48] 李斌. 蓝莓汁花色苷稳定性研究[C]. 中国食品科学技术学会第十三届年会论文摘要集, 中国食品科学技术学会: 2016, 188.
- [49] Cao S Q, Liu L, Lu Q, et al. Integrated effects of ascorbic acid, flavonoids and sugar on thermal degradation of anthocyanins in blood orange juice[J]. European Food Research and Technology, 2009, 228(6): 975-983.
- [50] 江玉婷, 秦昉, 陈洁, 等. 天然花色苷色素稳定化研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(05): 213-218.
- [51] 李颖畅, 孟宪军, 周艳, 等. 金属离子和食品添加剂对蓝莓花色苷稳定性的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(09): 80-84.
- [52] Han F L, Yang P, Wang H, et al. Digestion and absorption of red grape and wine anthocyanins through the gastrointestinal tract[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 83: 211-224.
- [53] Yang W, Kortensniemi M, Yang B, et al. Enzymatic Acylation of Anthocyanins Isolated from Alpine Bearberry (*Arctostaphylos alpina*) and Lipophilic Properties, Thermostability, and Antioxidant Capacity of the Derivatives[J]. Journal

- Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(11): 2909-2916.
- [54] Yang W, Luan H, Tang C, et al. Enzymatic acylation of blueberry (*Vaccinium ashei*) pomace anthocyanins and determination of their cytotoxic properties[J]. Process Biochemistry, 2023, 130 705-714.
- [55] 谢凤英, 李凤凤, 张爽, 等. 黑米花色苷酰化修饰红外光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(8): 2386-2389.
- [56] Luo C L, Zhou Q, Yang Z W, et al. Evaluation of structure and bioprotective activity of key high molecular weight acylated anthocyanin compounds isolated from the purple sweet potato (*Ipomoea batatas*, L. cultivar Eshu No.8) [J]. Food Chemistry, 2018, 241:23-31
- [57] Zhao L, Pan F, Mehmood A, et al. Protective effect and mechanism of action of xanthan gum on the color stability of black rice anthocyanins in model beverage systems[J]. International Journal of Biology Macromolecules, 2020, 164 3800-3807.
- [58] Chen X, Guan Y M, Zeng M M, et al. Effect of whey protein isolate and phenolic copigments in the thermal stability of mulberry anthocyanin extract at an acidic pH[J]. Food Chemistry, 2022, 377,132005.
- [59] Fan L L, Wang Y, Xie P J, et al. Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation[J]. Food Chemistry, 2019, 275, 299–308.
- [60] Huang J, Hu Z, Chin Y, et al. Improved thermal stability of roselle anthocyanin by co-pigmented with oxalic acid: Preparation, characterization and enhancement mechanism[J]. Food Chemistry, 2023, 410 135407.
- [61] Lv X, Li L, Lu X, et al. Effects of organic acids on color intensification, thermodynamics, and copigmentation interactions with anthocyanins[J]. Food Chemistry, 2022, 396 133691.
- [62] Otalora M C, Wilches-Torres A, Gomez Castano J A. Spray-Drying Microencapsulation of Andean Blueberry (*Vaccinium meridionale* Sw.) Anthocyanins Using Prickly Pear (*Opuntia ficus indica* L.) Peel Mucilage or Gum Arabic: A Comparative Study[J]. Foods, 2023, 12(9), 1811.

-
- [63] Zhang L, Yao L, Zhao F, et al. Protein and Peptide-Based Nanotechnology for Enhancing Stability, Bioactivity, and Delivery of Anthocyanins[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12(25): e2300473.
- [64] Candido S L, Siri M, Achilli E, et al. Rheological, Physical, and Spectroscopical Characterization of Gamma-Irradiated Albumin Nanoparticles Loaded with Anthocyanin[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2023, 127(24): 5432-5444.
- [65] Xie C, Wang Q, Ying R, et al. Huang. Binding a chondroitin sulfate-based nanocomplex with kappa-carrageenan to enhance the stability of anthocyanins[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100.
- [66] 洪森辉, 杨秀雯, 黄晓雪, 等. 蓝莓花色苷的酶法酰化修饰及其疏水性改善研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(19): 78-83.
- [67] Wei Q, Wang QY, Feng ZH, et al. Increased accumulation of anthocyanins in transgenic potato tubers by overexpressing the 3GT gene[J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2012, (6):69-75.
- [68] Mackon E, Jeazet Dongho Epse Mackon G C, Guo Y, et al. Development and application of CRISPR/Cas9 to improve anthocyanin pigmentation in plants: Opportunities and perspectives[J]. *Plant Science*, 2023, 333 111746.
- [69] Liu F, McClements D J, Ma C, et al. Novel Colloidal Food Ingredients: Protein Complexes and Conjugates[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2023, 14 35-61.
- [70] Buttstedt A, Ihling CH, Pietzsch M, et al. Royalactin is not a royal making of a queen[J]. *Nature*, 2016;537: E10–2.
- [71] Fratini F, Cilia G, Mancini S, et al. Royal jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties[J]. *Microbiological Research*, 2016, 192: 130–141.
- [72] 邵琪琪, 林焱, 张以宏, 等. 蜂王浆中活性成分的药理作用研究进展[J]. *食品工业*, 2018, 39(4): 276–279.
- [73] Kokotou M G, Mantzourani C, Babaiti, et al. Study of the royal jelly free fatty acids by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS)[J]. *Metabolites*, 2020, 10(1): 40.

-
- [74] Papk M J, Kim B Y, Papk H G, et al. Major royal jelly protein 2 acts as an antimicrobial agent and antioxidant in royal jelly[J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2019, 22(3): 684–689.
- [75] Ahmad S, Campos M G, Fratini F, et al. New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2), 382.
- [76] Collazo N, Carpena M, Nunez-Estevez B, et al. Health Promoting Properties of Bee Royal Jelly: Food of the Queens[J]. *Nutrients*, 2021, 13(2), 543.
- [77] 刘一冰, 吴德群, 蔺哲广, 等. 蜂王浆生物学功能研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(6): 1498–1510.
- [78] Chi X P, Liu Z G, Wei W, et al. Selenium-rich royal jelly inhibits hepatocellular carcinoma through PI3K/AKT and VEGF pathways in H22 tumor-bearing mice[J]. *Food & Function*, 2021, 12(19): 9111–9127.
- [79] Bayram N E, Cebi N, Celik S, et al. Turkish royal jelly: Amino acid, physicochemical, antioxidant, multi-elemental, antibacterial and fingerprint profiles by analytical techniques combined with chemometrics[J]. *Journal of Apicultural Research*, 2021, 60(5): 751–764.
- [80] Shorter J R, Geisz M, Ozsoy E, et al. The effects of royal jelly on fitness traits and gene expression in *Drosophila melanogaster*[J]. *Plos One*, 2015, 10(7), e0134612.
- [81] Schmitzova J, Klaudivy J, Albert Š, et al. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1998, 54: 1020-1030.
- [82] Helbing S, Lattorff H M G, Moritz R F A, et al. Comparative analyses of the major royal jelly protein gene cluster in three *Apis* species with long amplicon sequencing[J]. *DNA Research*, 2017, 24(3), 279–287.
- [83] Lin N, Chen S, Zhang H, et al. Quantification of Major Royal Jelly Protein 1 in Fresh Royal Jelly by Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *J. Agric. Food Chemistry*. 2018, 66, 1270–1278.
- [84] Bílikov'a K, Šimůth J. New criterion for evaluation of honey: Quantification of

- royal jelly protein apalbumin 1 in honey by ELISA[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 15, 8776–8781.
- [85] Buttstedt A, Moritz R F A, Erler S. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family[J]. *Biological Reviews*, 2014, 89(2), 255–269.
- [86] Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4:39-52.
- [87] Jiang C M, Liu X, Li C X, et al. Anti-senescence effect and molecular mechanism of the major royal jelly proteins on human embryonic lung fibroblast (HFL-I) cell line[J]. *Jouranal of Zhejiang University -SCIENCE B*, 2018, 19:960-972.
- [88] Chen Z, Wang C, Gao X, et al. Interaction characterization of preheated soy protein isolate with cyanidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of black soybean seed coat anthocyanins extracts[J]. *Food Chemistry*, 2019, 271 266-273.
- [89] Muresan C I, Buttstedt A. pH-dependent stability of honey bee (*Apis mellifera*) major royal jelly proteins[J]. *Science Reports*, 2019, 9(1): 9014.
- [90] Moriyama T, Ito A, Omote S, et al. Heat Resistant Characteristics of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) Oligomer[J]. *PLoS One*, 2015, 10:e0119169.
- [91] Cruz GCN, Garcia L, Silva AJ, et al. Calcium effect and pH-dependence on self-association and structural stability of the *Apis mellifera* major royal jelly protein 1[J]. *Apidologie*, 2011, 42:252-269.
- [92] 张莉, 刘倩倩, 吴长玲, 等. 2018.多酚与蛋白质相互作用研究方法进展[J]. *食品工业科技*, 39(24): 340-345.
- [93] Castell O K, Dijkman P M, Wiseman D N. Single molecule fluorescence for membrane proteins[J]. *Methods*, 2018, 147(1): 221-228.
- [94] Bakar K A, Feroz S R. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 223(5): 117337.
- [95] Wang Z, Chen J, Wang S, et al. 2013. Characterizing the interaction between oridonin and bovine serum albumin by a hybrid spectroscopic approach[J]. *Journal*

- of Luminescence, 2013, 134: 863-869.
- [96] Bobone S, de Weert M, Stella L. A reassessment of synchronous fluorescence in the separation of Trp and Tyr contributions in protein emission and in the determination of conformational changes[J]. Journal of Molecular Structure, 2014, 1077(5): 68-76.
- [97] Shi H T, Lei Y G, Prates L L, et al. Evaluation of near-infrared (NIR) and Fourier transform mid-infrared (ATR-FT/MIR) spectroscopy techniques combined with chemometrics for the determination of crude protein and intestinal protein digestibility of wheat[J]. Food Chemistry, 2019, 272: 507-513.
- [98] Lang Y X, Li E, Meng X J, et al. Protective effects of bovine serum albumin on blueberry anthocyanins under illumination conditions and their mechanism analysis[J]. Food Research International, 2019, 122: 487-495.
- [99] 赵焕焦. 黑米花色苷与三种蛋白质相互作用的研究. 天津科技大学, 2017.
- [100] 李亚东, 盖禹含, 王芳, 等. 2021 年全球蓝莓产业数据报告[J]. 吉林农业大学学报, 2022, 44(1): 1-12.
- [101] Bao Y, Wang M, Si X, et al. Customized development of 3D printed anthocyanin-phycocyanin polychromatic oral film via chondroitin sulfate homeostasis: A platform based on starch and kappa-carrageenan[J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 330 121817
- [102] 吴明轩, 于力. 口服液刍议[J]. 河南中医药学刊, 1994, (03): 12-14.
- [103] 金国泰, 李博, 代龙. 改善中药口服液澄清度工艺研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, (12): 245-247.
- [104] 郑斌, 张晨, 董华泽, 等. 蓝莓复方口服液的制备方法[J]. 园艺与种苗, 2018, 38(10): 12-15.
- [105] 高岩松. 黑豆多肽-蓝莓复合饮料研制及抗氧化活性的研究[D]. 吉林农业大学, 2019.
- [106] 毕远林. 蓝莓花青素口服液制剂的制备工艺及稳定性研究[D]. 贵州大学, 2017.
- [107] 吴元宏, 毛迪锐, 武玉莹, 等. 蓝莓红景天复合口服液的研制及抗疲劳活

- 性评价[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(14): 81-85.
- [108] Yousuf B, Gul K, Wani A A, et al. Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(13): 2223-2230.
- [109] Bornsek S M, Ziberna L, Polak T, et al. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry*, 2012, 134(4), 1878–1884.
- [110] Hazas M, Mosele J I, Macia A, et al. Exploring the colonic metabolism of grape and strawberry anthocyanins and their in vitro apoptotic effects in HT-29 colon cancer cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 65(31): 6477-6487.
- [111] Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, et al. Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins[J]. *Phytotherapy Research*, 2016, 1286: 1265-1286.
- [112] Cavalcanti R N, Santos D T, Meireles M A A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview[J]. *Food Research International*, 2011, 44(2), 499–509.
- [113] Qin X, Yuan D, Wang Q, et al. Maillard-reacted whey protein isolates enhance thermal stability of anthocyanins over a wide pH range[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(36), 9556–9564.
- [114] Cui H, Si X, Tian J, et al. Anthocyanins-loaded nanocomplexes comprising casein and carboxymethyl cellulose: Stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 122, 107073.
- [115] Yin Z, Wu Y, Chen Y, et al. Analysis of the interaction between cyanidin-3-O-glucoside and casein hydrolysates and its effect on the antioxidant ability of the complexes[J]. *Food Chemistry*, 2020, 340, Article 127915.
- [116] Fu X, Belwal T, He Y, et al. Interaction and binding mechanism of cyanidin-3-O-glucoside to ovalbumin in varying pH conditions: A spectroscopic and molecular docking study[J]. *Food Chemistry*, 2020, 126616.
- [117] Wang C, Xie Y. Interaction of protein isolate with anthocyanin extracted from black soybean and its effect on the anthocyanin stability[J]. *Journal of Food*

- Science, 2019, 84(11), 3140–3146
- [118] Zang Z, Chou S, Geng L, et al. Interactions of blueberry anthocyanins with whey protein isolate and bovine serum protein: Color stability, antioxidant activity, in vitro simulation, and protein functionality[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 152, 112269.
- [119] Wu J, Guan Y, Zhong Q. Yeast mannoproteins improve thermal stability of anthocyanins at pH 7.0[J]. Food Chemistry, 2015, 172, 121–128.
- [120] Tsopmo A, Hosseinian F. Antioxidants in functional foods[J]. Jouranl of Food Biochemistry, 2022, 46, e14167.
- [121] Cao L-F, Zheng H-Q, Pirk C W W, et al. High Royal JellyProducing Honeybees (*Apis mellifera ligustica*) (Hymenoptera: Apidae) in China[J]. Journal of Economic Entomology, 2016, 109(2), 510-514.
- [122] 常丹. 蜂王浆蛋白抑菌、抗氧化活性及其在肉品保鲜中的应用[D]. 西安: 西北大学, 2011.
- [123] Sabatini A G, Marcazzan G L, Fiorenza Caboni M, et al. Quality and standardisation of Royal Jelly[J]. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 2009, 1(1), 1-6.
- [124] Ren S, Giusti MM. Comparing the effect of whey protein preheating temperatures on the color expression and stability of anthocyanins from different sources[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124, 107273.
- [125] Rodriguez-Saona LE, Wrolstad R E. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins[J]. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001, F1.1.1-F1.1.11.
- [126] Salazar-Olivo LA, Paz-González V. Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly[J]. Toxicology in Vitro, 2005, 19:645-651.
- [127] Tamura S, Kono T, Harada C, et al. Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis merifera*[J]. Food Chemistry, 2009, 114:1491-1497.
- [128] Qin Y, Zhang Y, Yan S, et al. A comparison study on the interaction of hyperoside and bovine serum albumin with Tachiya model and Stern-Volmer equation[J].

- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010, 75(5): 1506-1510.
- [129] Lang Y, Gao H, Tian J, et al. Protective effects of α -casein or β -casein on the stability and antioxidant capacity of blueberry anthocyanins and their interaction mechanism[J]. LWT - Food Science and Technology, 2019, 115, 108434.
- [130] He Z, Xu M, Zeng M, et al. Interactions of milk α -and β -casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin[J]. Food Chemistry, 2016, 199, 314-322.
- [131] Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W, et al. Enhanced stability of anthocyanin-based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation[J]. Food Research International, 2015, 76, 761–768.
- [132] Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W, et al. Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum Arabic addition[J]. Food Chemistry, 2016, 201, 14–22.
- [133] 曹雪丹, 方修贵, 赵凯, 等. 蓝莓汁花色苷热降解动力学及抗坏血酸对其热稳定性的影响[J]. 中国食品学报, 2013, 13(3): 47-54.
- [134] 薛宏坤, 韩茜宇, 谭佳琪, 等. 黑加仑花色苷的分离纯化及其热降解动力学[J]. 精细化工, 2019, (04): 721-729.
- [135] Koh J, Xu Z, Wicker L. Blueberry pectin and increased anthocyanins stability under in vitro digestion[J]. Food Chemistry, 2020, 302, 125343.
- [136] Han F, Yang P, Wang H, et al. Digestion and absorption of red grape and wine anthocyanins through the gastrointestinal tract[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 83, 211–224
- [137] Jakobek L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins[J]. Food Chemistry, 2015, 175:556-567.
- [138] Ren S, Giusti MM. Monitoring the Interaction between Thermally Induced Whey Protein and Anthocyanin by Fluorescence Quenching Spectroscopy[J]. Foods, 2021, 10(2), 310.
- [139] Wang YR, Yang Q, Li-Sha YJ, et al. Structural, gelation properties and microstructure of rice glutelin/sugar beet pectin composite gels: Effects of ionic

- p>strengths[J]. Food Chemistry, 2021, 346:128956.
- [140] Fang W, Shuo Z, Qin L, et al. Glycated whey protein concentrate for purple sweet potato anthocyanins delivery: Physicochemical stability and in vitro digestion characteristics[J]. Journal of Functional Foods, 2024, 114, 106059.
- [141] Fu J-j, Sun C, Tan Z-f, et al. Nanocomplexes of curcumin and glycated bovine serum albumin: The formation mechanism and effect of glycation on their physicochemical properties[J]. Food Chemistry 2022, 368:130651.
- [142] Kimura Y, Washino N, Yonekura M. N-Linked Sugar Chains of 350-kDa Royal Jelly Glycoprotein[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59:507-509.
- [143] Liu G, Zhong Q. Thermal aggregation properties of whey protein glycated with various saccharides[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32:87-96.
- [144] Liu G, Zhong Q. High temperature-short time glycation to improve heat stability of whey protein and reduce color formation[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 44:453-460.
- [145] Mandacaru SC, do Vale LH, Vahidi S, et al. Characterizing the Structure and Oligomerization of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) by Mass Spectrometry and Complementary Biophysical Tools[J]. Biochemistry, 2017, 56:1645-1655.
- [146] Tian W, et al. Architecture of the native major royal jelly protein 1 oligomer[J]. Nature Communications, 2018, 9:3373.
- [147] Lin N, Li J, Shao R, et al. Site-Specific Analysis of N-Linked Glycosylation Heterogeneity from Royal Jelly Glycoproteins[J]. Journal Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67:9411-9422.
- [148] Tamura S, Kono T, Harada C, et al. 2009. Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis mellifera*[J]. Food Chemistry, 2009, 114:1491-1497.
- [149] Mattei S, Ban A, Picononi A, et al. Structure of native glycolipoprotein filaments in honeybee royal jelly[J]. Nature Communications, 2020, 11:6267.
- [150] Zheng N, Bucheli P, Jing H. Effects of casein- and whey protein–dextran conjugates on the stability of bog bilberry anthocyanin extract[J]. International

- Journal of Food Science & Technology, 2009, 44:1452-1458.
- [151] Cheng J, Liu JH, Prasanna G, et al. Spectrofluorimetric and molecular docking studies on the interaction of cyanidin-3-O-glucoside with whey protein, beta-lactoglobulin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105:965-972.
- [152] Attaribo T, Jiang X, Huang G, et al. Studies on the interactional characterization of preheated silkworm pupae protein (SPP) with anthocyanins (C3G) and their effect on anthocyanin stability[J]. Food Chemistry, 2020, 326:126904.
- [153] Tang L, Zhang D, Xu S, et al. Different spectroscopic and molecular modeling studies on the interaction between cyanidin-3-O-glucoside and bovine serum albumin[J]. Luminescence, 2014, 29:168-175.
- [154] Mohammadzadeh-Aghdash H, Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Dehghan P, et al. Multi-spectroscopic and molecular modeling studies of bovine serum albumin interaction with sodium acetate food additive[J]. Food Chemistry, 2017, 228:265-269.
- [155] Ni Y, Zhu R, Kokot S. Competitive binding of small molecules with biopolymers: a fluorescence spectroscopy and chemometrics study of the interaction of aspirin and ibuprofen with BSA[J]. Analyst, 2011, 136:4794-4801.
- [156] Jahanban-Esfahlan A, Panahi-Azar V. Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking[J]. Food Chemistry, 2016, 202:426-431.
- [157] Zuo H, Tang L, Li S, et al. Combined multispectroscopic and molecular docking investigation on the interaction between delphinidin-3-O-glucoside and bovine serum albumin[J]. Luminescence, 2015, 30:110-117.
- [158] He Z, Xu M, Zeng M, et al. Preheated milk proteins improve the stability of grape skin anthocyanins extracts[J]. Food Chemistry, 2016, 210, 221–227.
- [159] Tamura S, Kono T, Harada C, et al. Estimation and characterisation of major royl jelly proteins obtained from the honeybee *Apis merifera*[J]. Food Chemistry. 2009,114(4): 1491-1497.

- [160] Kamakura M, Suenobu N, Fukushima M. Fifty—seven—k Da protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2001, 282(4): 865—874.
- [161] Hanes J, Simuth J. Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.)[J]. *Journal of Apicultural Research*. 1992, 31(1):22-26.
- [162] Khalifa I, Nie R Z, Ge Z Z, et al. Understanding the shielding effects of whey protein on mulberry anthocyanins: Insights from multispectral and molecular modelling investigations[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 119, 116-124.
- [163] Liy Z, Guo C X, Cao Y L. Secular incidence trend sand effect of population aging on mortality due to type 1 and type 2 diabetes mellitus in China from 1990 to 2019: findings from the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2021, 9(2): e002529.

攻读学位期间发表的学术论文目录

Fangfang Ning, Mingxin Ma, Jie Huang, Xinhao Jiang, Wu sun, Guoqiang Zhang.
Studies on the interactional characterization of major royal jelly proteins with cyanidin-
3-O-glucoside and their effect on Blueberry anthocyanin extracts stability. LWT-Food
Science and Technology. 2025, 222: 117672. (SCI 一区, IF=6.0)

致谢

行文至此，便意味着三年的研究生生涯即将画上句点。回首这段时光，感激之情充盈于心。

首先要感谢我的导师张国强教授。感谢老师三年来对我实验的指导。每次组会老师都会对我的课题给予非常专业的提问与解答，能够让我直接看到问题的所在并对此做出相应的改正，最终在老师帮助下顺利完成实验。关于文章的撰写与发表，在如何构造论文框架、修改文章内容、补充实验数据方面，老师更是一遍一遍的给予积极的回复与鼓励。至此，我要对我的导师张国强教授致以最真诚的感谢！

三年学习，离不开朋友与同学的陪伴，特别是实验室的伙伴们，因为有你们，枯燥的实验室生活才多了些欢乐。在此，我要感谢师兄朱雪洋、李峥宏、廖薛羿，师姐徐宁莉、张莉方、陶瑾、郭玉峰，感谢你们在实验上给予我的帮助，教我实验仪器的操作与数据处理方法，每次对于我的提问都是有问必答；感谢同门黄杰、马明欣、姜心豪、孙武，谢谢你们在实验室对我的鼓舞与支持，让我一次次重拾信心；感谢师妹裴海汝、章佳欣、陈倩、孙雯婷、武菊，师弟钟诚、付爽、许誉籍、鲍鸣、黄栋，谢谢你们在我忙碌是时候给予我的帮助。

最后，我要感谢母校安徽工程大学，感谢学校为我提供科研实验的平台，让我不断的学习进步，完成了自己的课题研究，提升了自己的科研能力！

今当别离，谨以此文，献给所有让科学闪耀人性光辉的你们。