

荧光光谱法研究咖啡酸与胰脂肪酶相互作用

范金波¹, 王晓露¹, 姜海静², 周素珍¹

(1. 渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁省食品安全重点实验室, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁锦州 121013;
2. 唐山市丰润区综合职业技术教育中心, 河北唐山 064000)

摘要: 采用荧光光谱法研究了咖啡酸与胰脂肪酶的相互作用, 主要包括荧光猝灭特性及结合常数、结合位点数的计算, 抑制酶类型及抑制活性, 金属离子对相互作用的影响。结果表明: 咖啡酸加入后胰脂肪酶产生了规律性的荧光猝灭, 最大吸收波长出现红移现象, 主要属于静态猝灭。25 °C 和 37 °C 下结合常数分别为 6.48×10^4 L/mol 和 1.38×10^5 L/mol, 热力学参数 $\Delta H > 0$ 且 $\Delta S > 0$, 表明结合反应是自发进行的吸热反应, 相互作用主要表现为疏水作用力。咖啡酸对胰脂肪酶的抑制类型为非竞争性抑制, 抑制活性 IC_{50} 为 (0.88 ± 0.07) mg/mL。四种金属离子 (Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+}) 一定程度上增加结合常数和结合位点数, 说明四种金属离子促进了咖啡酸与胰脂肪酶的结合。

关键词: 胰脂肪酶, 咖啡酸, 荧光猝灭, 金属离子, 抑制活性

Study on the interaction between caffeic acid and pancreatic lipase by fluorescence spectroscopy

FAN Jin-bo¹, WANG Xiao-lu¹, JIANG Hai-jing², ZHOU Su-zhen¹

(1. College of Food Science and Technology, Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, China;
2. The Center of Comprehensive Occupation Technology Education in Fengrun District of Tangshan City, Tangshan 064000, China)

Abstract: The interaction between chlorogenic acid and porcine pancreas lipase (PPL) was researched by fluorescence spectrophotometer, including the fluorescence quenching properties, calculating the binding constants and binding sites, inhibitory activity and inhibitory type of caffeic acid on porcine pancreatic lipase, effect of metal ions on the interaction. Experimental results showed that caffeic acid had strong fluorescence quenching effect on porcine pancreas lipase, maximum absorption wavelength redshift, mainly belongs to static quenching. Binding constant under 25 °C and 37 °C 6.48×10^4 L/mol and 1.38×10^5 L/mol respectively, and the thermodynamic parameters $\Delta H > 0$ and $\Delta S > 0$, showed that combination was a spontaneous endothermic reaction, the main force of hydrophobic forces. Inhibitory type of caffeic acid on pancreatic lipase was noncompetitive inhibition, inhibitory activity was IC_{50} (0.88 ± 0.07) mg/mL. When there were four kinds of metal ion (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+}) binding constant and binding points were increased, that metal ions, to a certain extent, promoted the combination of caffeic acid and pancreatic lipase.

Key words: pancreas lipase; caffeic acid; fluorescence quenching; metal ion; inhibitory activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)02-0152-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.020

肥胖被认为主要是一种脂肪代谢紊乱疾病, 肥胖的盛行已经危害到人们的健康, 研究表明肥胖是导致心血管疾病、癌症和糖尿病的关键因素^[1-4]。抗肥胖药物的研发主要集中于对脂肪代谢过程酶选择性控制, 有效抑制胰脂肪酶活性可以起到减肥作用。研究报道茶多酚、苹果多酚、浆果来源多酚都具有较强的抑制胰脂肪酶活性, 通过控制脂肪代谢起到减

肥作用^[5-7]。咖啡酸是常见的酚酸类物质, 在植物中广泛存在, 通过动物实验研究其调节脂肪代谢抗肥胖作用已有报道^[8-9], 探讨植物来源的多酚成分与胰脂肪酶的相互作用机理, 对于了解减肥机制和多酚成分的应用具有重要意义。

荧光光谱法已经广泛用于小分子与蛋白质相互作用的研究, 其中关于咖啡酸与蛋白质相互作用的

收稿日期: 2016-06-30

作者简介: 范金波(1977-), 男, 博士, 副教授, 主要从事食品生物化学方面的研究, E-mail: jinbo_fan@hotmail.com。

报道较少。龙梅等^[14]研究了咖啡酸及其衍生物与溶菌酶的相互作用,结果表明咖啡酸与溶菌酶的结合对其内源荧光产生静态猝灭,咖啡酸中的羧基对结合位点数起主要作用。余丹丹等^[15]研究表明咖啡酸使乳蛋白发生内源性荧光猝灭,与蛋白结合导致咖啡酸抗氧化活性显著降低。柳全文等^[13]研究报道咖啡酸与牛血清白蛋白有强的结合,结合通过影响色氨酸的微环境影响了牛血清白蛋白的构象。通过荧光光谱法研究咖啡酸与胰脂肪酶相互作用鲜见报道,本文主要以具有良好抗氧化活性的酚酸化合物咖啡酸为研究对象,通过荧光光谱法探索其与胰脂肪酶相互作用及作用机理,为小分子植物性胰脂肪酶抑制剂的开发利用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

咖啡酸 CAS: 331-39-5, 99%, 北京百灵威科技有限公司; 猪胰脂肪酶 CAS: 9001-62-1, 99%, 西格玛奥德里奇贸易有限公司; 橄榄油 品利(上海)食品有限公司; TRIS 北京索莱宝科技有限公司; 聚乙烯醇 天津博迪化工股份有限公司; 苯、吡啶、醋酸铜、氯化铁、氯化亚铁、氯化钙、硫酸铜、无水乙醇、浓盐酸等 均为分析纯。

F-7000 荧光分光光度计 日本日立高新技术公司; KQ-500DE 数控超声清洗仪 昆山市超声仪器有限公司; KJ-5A 多头磁力搅拌器 金坛市科析仪器有限公司; HH-6 数显电子恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; ML104/02 电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; FE20 实验室 PH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; TDL-5-A 低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂; UV-2700 紫外-可见分光光度计 日本 SHIMADZU 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 咖啡酸与胰脂肪酶相互作用的荧光分析

1.2.1.1 荧光光谱的测定 准确移取 0.30 mL 咖啡酸溶液(0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液调 pH7.7)与 3 mL 质量浓度为 0.5 mg/mL 的胰脂肪酶(0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液调 pH7.7)溶液于 1 cm 的荧光比色皿中并将其混匀,使咖啡酸最终浓度达到 0.909×10^{-6} 、 1.8182×10^{-5} 、 2.7273×10^{-5} 、 3.6364×10^{-5} 、 4.5455×10^{-5} 、 5.4545×10^{-5} 、 6.3636×10^{-5} 、 7.2727×10^{-5} 、 8.1818×10^{-5} 、 9.0909×10^{-5} mol/L,在 25 °C 和 37 °C 的条件下静置 5 min 后,放入荧光分光光度计于激发波长为 290 nm,狭缝均为 5 nm,发射波长为 290~450 nm 条件下测定荧光光谱。

1.2.1.2 咖啡酸对胰脂肪酶的荧光猝灭特性 荧光分子与猝灭剂之间的猝灭效率服从 Stern-Volmer 方程:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 c$$

式中: F_0 是不存在猝灭剂时荧光分子的荧光强度; F 是加入猝灭剂后荧光分子的荧光强度; K_q 是猝灭常数(该数值越大猝灭效果越明显); τ_0 是荧光分子的初始平均寿命(生物大分子约为 10^{-8} s); c 为咖

啡酸浓度(mol/L)。用 F_0/F 对 c 作图,可以求得 K_q 值,从而得到不同温度条件下的 Stern-Volmer 方程。

1.2.1.3 咖啡酸与胰脂肪酶的结合常数(K_a)与结合位点(n)的计算 猝灭剂与荧光物质的结合常数(K_a)与结合位点数(n)符合的方程:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg c$$

式中, F_0 和 F 分别为加入咖啡酸前后荧光强度, c 为咖啡酸浓度(mol/L)。

根据方程可以作出 $\lg [(F_0 - F)/F]$ 与 $\lg c$ 之间的直线图,由拟合出的直线斜率和截距便可以求出结合常数以及结合位点数。

1.2.1.4 咖啡酸与胰脂肪酶作用力类型的计算 不同种类的小分子与蛋白质等生物大分子结合力的类型是不一样的,焓变(ΔS)和焓变(ΔH)是判断二者作用类型的主要依据。根据如下热力学参数方程可以计算出咖啡酸和胰脂肪酶之间相互作用的热力学参数。

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

$$\Delta H = \frac{RT_1 T_2 \ln \left(\frac{(K_a)_2}{(K_a)_1} \right)}{T_2 - T_1}$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$$

式中: ΔG 、 ΔH 和 ΔS 分别是吉布斯自由能、焓变和熵变; R 为气体常数($R = 8.314$); $(K_a)_1$ 和 $(K_a)_2$ 分别是温度 T_1 和 T_2 条件下的结合常数。

1.2.2 咖啡酸对胰脂肪酶抑制活性 胰脂肪酶活性测定具体方法参照文献方法^[13]。

$$\begin{aligned} \text{酶活力} (\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{L} \cdot \text{g}) \\ = \frac{(V_{\text{样}} - V_{\text{空}}) \times c \times 1000000}{t} \times N \end{aligned}$$

式中: $V_{\text{样}}$ 为消耗 NaOH 的体积(mL); $V_{\text{空}}$ 为空白管消耗 NaOH 的体积(mL); c 为 NaOH 浓度(mol/L); t 为反应时间(min); N 为酶液稀释倍数。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{抑制后脂肪酶活力}}{\text{抑制前脂肪酶活力}} \right) \times 100$$

1.2.3 咖啡酸对胰脂肪酶抑制类型 测定咖啡酸抑制酶的作用类型,可以通过改变底物浓度而保持其他抑制剂和其他组分不变的方法。加入橄榄油的体积分别为 1、2、3、4 mL 测定酶促反应的初速率。在保持实验溶液总体积不变的条件下,加入橄榄油的体积差用 Tris-HCl 缓冲溶液补充。然后采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,将反应初速率的倒数 $1/V$ 作为纵坐标,底物浓度的倒数 $1/[S]$ 作为横坐标作图,判断咖啡酸对胰脂肪酶的抑制作用类型。

1.2.4 金属离子对于咖啡酸与胰脂肪酶相互作用的影响 在探究金属离子对咖啡酸脂肪酶相互作用影响时,实验条件同 1.2.1.1,用移液枪在咖啡酸-胰脂肪酶混合溶液中分别加入 0.3 mL 浓度为 4×10^{-4} mol/L 的 CaCl_2 、 FeCl_3 、 CuSO_4 、 FeCl_2 溶液,混匀,在 37 °C 温度条件下静置 5 min 后进行分析。

2 结果与讨论

2.1 咖啡酸与胰脂肪酶相互作用的荧光分析

2.1.1 荧光光谱分析 图 1 表示 25 °C 和 37 °C 条件

表1 咖啡酸对胰脂肪酶荧光猝灭 Stern-Volmer 方程和猝灭常数

Table 1 Stern-Volmer equation and constant of fluorescence disappearance of caffeic acid on PPL

猝灭剂	温度(℃)	Stern-Volmer 方程	K_q (L/(mol·s))	线性范围 (mol/L)
咖啡酸	25	$y = 1 + 1.235 \times 10^4 x$	$(1.24 \pm 0.10) \times 10^{12}$	$0 \sim 7 \times 10^{-5}$
咖啡酸	37	$y = 1 + 1.881 \times 10^4 x$	$(1.88 \pm 0.12) \times 10^{12}$	$0 \sim 7 \times 10^{-5}$

下,咖啡酸浓度微量变化对于胰脂肪酶荧光强度的影响,可以看出,随着咖啡酸浓度的增大荧光强度有规律的降低,发生了荧光猝灭,两种温度下表现出相同的趋势,最大发射波长均红移 7 nm。结果表明微量咖啡酸的加入迅速与胰脂肪酶结合导致胰脂肪酶构象的改变。胰脂肪酶在 340 nm 处呈现最大荧光发射峰,说明荧光主要来源于色氨酸残基,Burstein^[14]认为色氨酸残基部分暴露于水相中最大峰位为 340~342 nm,而完全暴露于水中最大峰位为 350~352 nm,咖啡酸的加入使胰脂肪酶最大峰位发生红移说明咖啡酸的加入改变了色氨酸的微环境,使色氨酸从部分暴露向完全暴露转变。实验室研究表明芦丁和绿原酸同样具有荧光猝灭作用,文献报道茶叶儿茶素、表没食子儿茶素对胰脂肪酶具有荧光猝灭作用^[15-16]。

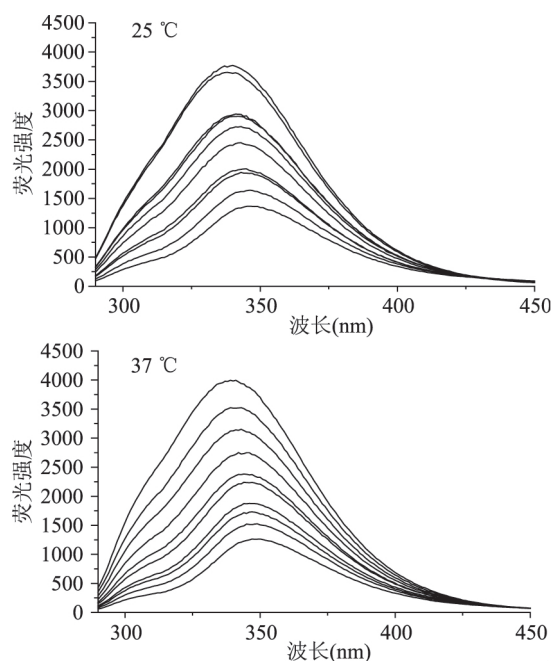


图1 咖啡酸对胰脂肪酶荧光作用的影响

Fig.1 Effect of caffeic acid concentration on fluorescence spectrum of PPL

注: 图中曲线由上到下的咖啡酸浓度依次为 0 、 0.909×10^{-5} 、 1.818×10^{-5} 、 2.727×10^{-5} 、 3.636×10^{-5} 、 4.545×10^{-5} 、 5.455×10^{-5} 、 7.273×10^{-5} 、 8.182×10^{-5} 、 9.091×10^{-5} mol/L。

2.1.2 咖啡酸对胰脂肪酶的荧光猝灭特性 荧光猝灭主要有动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移 3 种,荧光分子与猝灭剂之间的猝灭效率服从 Stern-Volmer 方程,不同温度下 Stern-Volmer 方程和猝灭常数见表 1。由表 1 可知,25 °C 时, K_q 值为 $(1.24 \pm 0.10) \times 10^{12}$ L/(mol·s), 37 °C 时 K_q 值为 $(1.88 \pm$

$0.12) \times 10^{12}$ L/(mol·s), 所得 K_q 远高于由碰撞引起的最大猝灭效应常数 (2×10^{10} L/(mol·s)), 这表明在低浓度时,咖啡酸对胰脂肪酶的荧光猝灭不是由碰撞造成的,而是由于静态猝灭造成的^[17]。

2.1.3 咖啡酸与胰脂肪酶的结合常数 (K_a) 与结合位点 (n) 静态猝灭中,结合常数 (K_a) 与结合位点 (n) 计算结果见表 2。由表 2 可知,两种温度下咖啡酸与胰脂肪酶的相互作用均表现出较强的结合力,而且随着温度的升高,结合力增强,结合位点数也增大,说明结合反应是吸热反应。

表2 咖啡酸与胰脂肪酶的结合常数和结合位点数

Table 2 Binding constant and site of caffeic acid with PPL

猝灭剂	温度(℃)	回归方程	n	K_a (L/mol)
咖啡酸	25	$y = 1.2197x + 5.1399$	1.2197	6.48×10^4
	37	$y = 1.1307x + 4.8112$	1.1307	1.38×10^5

2.1.4 咖啡酸与胰脂肪酶作用力类型 根据热力学方程分别计算不同温度下热力学参数,具体结果见表 3。

表3 咖啡酸与胰脂肪酶结合的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of interaction between PPL and caffeic acid

猝灭剂	温度(℃)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/(mol·K))
咖啡酸	25	-29.34	48.43	0.2608
	37	-28.57		0.2483

由表 3 可知,两种温度下 $\Delta G < 0$,表明咖啡酸与胰脂肪酶的结合是自发进行的; $\Delta H > 0$,说明咖啡酸与胰脂肪酶的结合反应是吸热过程,升温将有利于反应进行,结合常数 K_a 将变大,这与表 2 结果一致;当 $\Delta H > 0$ 且 $\Delta S > 0$ 时,作用力主要表现为疏水作用力^[18],表明咖啡酸与胰脂肪酶结合主要靠疏水作用力。Haslam 等研究多酚与蛋白质作用机理,认为多酚先通过疏水作用向蛋白质分子表面聚集,进行疏水区然后再发生多点氢键结合^[19]。

2.2 咖啡酸对胰脂肪酶抑制类型及抑制活性

由图 2 可知,咖啡酸加入后使得胰脂肪酶的 K_m 值无变化, V_{max} 值下降,所以其抑制类型表现为非竞争性抑制。咖啡酸不仅能与游离胰脂肪酶 (E) 结合,而且与酶-底物络合物 (ES) 结合,但结合常数不同。因此可以得出结论:咖啡酸对胰脂肪酶的抑制类型为非竞争性抑制作用,但抑制作用容易受到外界条件、微环境的影响,较不稳定。相同条件下,随着咖啡酸浓度的增加抑制活性逐渐增强,其 IC_{50} 为 (0.88 ± 0.07) mg/mL,其活性显著的强于绿原酸,与文献报道一致^[20]。研究报道了燕麦的乙醇提取物具有较

强的胰脂肪酶抑制活性,与酚酸存在着协同效应^[1]。

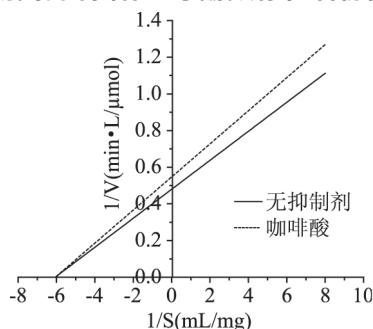


图2 咖啡酸对胰脂肪酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 图

Fig.2 Lineweaver-Burk curve

for the inhibition of caffeic acid on pancreatic lipase

2.3 金属离子对于咖啡酸与胰脂肪酶相互作用的影响

金属离子往往会参加机体的生化反应,进一步研究金属离子存在条件下咖啡酸与胰脂肪酶的结合特性更有实际意义。由表4可知,金属离子存在条件下咖啡酸与胰脂肪酶的结合特性受到影响。结果表明:四种金属离子的存在结合常数和结合位点数均增加,说明四种金属离子都一定程度上促进了咖啡酸与胰脂肪酶的结合,其中 Fe^{3+} 的作用最显著,强度大小为 $\text{Fe}^{3+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ 。然而,这种作用源于多方面影响的综合作用,它们可以通过改变酶的微环境及改变抑制剂与酶的结合等多种方式来影响酶的催化特性。

表4 金属离子对于咖啡酸与胰脂肪酶相互作用的影响

Table 4 Effect of the interaction between caffeic acid and PPL by metal ion

猝灭剂	离子	结合常数(L/mol)	结合位点数
咖啡酸	无	1.38×10^5	1.1307
	Cu^{2+}	3.87×10^5	1.3132
	Ca^{2+}	2.41×10^5	1.2735
	Fe^{3+}	1.28×10^6	1.3889
	Fe^{2+}	8.73×10^5	1.3404

3 结论

荧光光谱法研究表明咖啡酸与胰脂肪酶存在相互作用,荧光光谱分析可知,咖啡酸的加入产生了荧光猝灭现象,最大发射波长略微红移,而且猝灭呈现规律性的变化,说明咖啡酸与胰脂肪酶的结合改变了酶的结构,从而抑制了胰脂肪酶活性,金属离子在一定程度上增强了咖啡酸与胰脂肪酶的结合。通过计算分析得知猝灭主要为静态猝灭,热力学常数计算表明咖啡酸与胰脂肪酶相互作用是自发进行的吸热过程,主要作用力为疏水作用力。

参考文献

- [1] Rahul B Birari, Kamiesh K Bhutani. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential [J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(19-20): 879-889.
- [2] Ivana Vucenik, Joseph P Stains. 'Obesity and cancer risk:

evidence, mechanisms, and recommendations' [J]. Full Publication History, 2012(10): 37-43.

[3] Mario Kratz, Ton Baars, Stephan Guyenet. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease [J]. European Journal of Nutrition, 2013, 52(1): 1-24.

[4] Marjorie Bastien, Paul Poirier, Isabelle Lemieux, et al. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease [J]. Progress in Cardiovascular Diseases, 2014, 56(4): 369-381.

[5] Hiroshi Sugiyama, Yoko Akazome, Toshihiko Shoji, et al. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(11): 4604-4609.

[6] Gordon J McDougall, Nimish N Kulkarni, Derek Stewart. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro* [J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 193-199.

[7] Satoshi Uchiyama, Yoshimasa Taniguchi, Akiko Saka, et al. Prevention of diet - induced obesity by dietary black tea polyphenols extract *in vitro* and *in vivo* [J]. Nutrition, 2011, 27(3): 287-292.

[8] Chung-Chia Liao, Ting-Tsz Ou, Cheng-Hsun Wu, et al. Prevention of Diet - Induced Hyperlipidemia and Obesity by Caffeic Acid in C57BL/6 Mice through Regulation of Hepatic Lipogenesis Gene Expression [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(46): 11082-11088.

[9] Seung Ho Shin, Sang Gwon Seo, Soyun Min, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Major Component of Propolis, Suppresses High Fat Diet-Induced Obesity through Inhibiting Adipogenesis at the Mitotic Clonal Expansion Stage [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(19): 4306-4312.

[10] 龙梅, 谢孟峡, 刘媛. 荧光法研究咖啡酸及其衍生物与溶菌酶的相互作用 [J]. 北京师范大学学报, 2010, 46(6): 704-708.

[11] 余丹丹, 张昊, 丁庆波, 等. 咖啡酸与乳蛋白结合的光谱特性及结合物抗氧化活性变化 [J]. 光谱学与光谱分析, 2012, (4): 1061-1067.

[12] 柳全文, 徐慧, 李桂华, 等. 咖啡酸与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱法研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(1): 24-28.

[13] Yun Liu, Dawei Chen, Li Xu, et al. Evaluation of structure and hydrolysis activity of Candida rugosa Lip7 in presence of sub-/super-critical CO_2 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(6-7): 354-358.

[14] 杨频, 杨斌盛. 离子探针导论 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.

[15] 范志飞, 曾维才, 戴吉领, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯与猪胰脂肪酶的相互作用 [J]. 食品科学, 2013, 34(7): 20-23.

[16] 王诗卉, 刘云. 茶叶儿茶素抑制剂对胰脂肪酶构效关系的影响 [J]. 食品科学, 2013, 34(9): 104-107.

[17] 许金钧. 荧光分析法 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.

(下转第161页)

山奈酚、咖啡酸、槲皮素等酚类化合物含量增加。在萌发后期,可能由于在呼吸作用下,更多的活性氧和羟基自由基被合成^[8,21],使膜脂质过氧化作用增强,导致含氧类黄酮增加,如芦丁、儿茶素、染料木素等。研究结果为常用药食同源植物绿豆中酚类化合物的含量提供了数据参考,具有较强的食用价值,也为研究绿豆种子萌发过程中的代谢组学提供了理论基础。

参考文献

- [1] Liu B, Guo X, Zhu K, et al. Nutritional evaluation and antioxidant activity of sesame sprouts [J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 799–803.
- [2] 王丽侠, 程须珍, 王素华. 绿豆种质资源、育种及遗传研究进展 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1519–1527.
- [3] Lee J H, Jeon J K, Kim S G, et al. Comparative analyses of total phenols, flavonoids, saponins and antioxidant activity in yellow soy beans and mung beans [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(12): 2513–2519.
- [4] 王明海, 徐宁, 包淑英, 等. 绿豆的营养成分及药用价值 [J]. 现代农业科技, 2012(6): 341–342.
- [5] Xu B J, Chang S K C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents [J]. Journal of Food Science, 2007, 72(2): S159–S166.
- [6] Przybylski A, Wrochna M, Malecka – Przybylski M, et al. Vegetable sprouts enriched with iron: Effects on yield, ROS generation and antioxidative system [J]. Scientia Horticulturae, 2016, 203: 110–117.
- [7] El – Adawy T A, Rahma E H, El – Bedawey A A, et al. Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2003, 58(3): 1–13.
- [8] HUANG X, CAI W, XU B. Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) with germination time [J]. Food Chemistry, 2014, 143: 268–276.
- [9] 郑丽娜, 赵莹. 绿豆发芽过程中营养成分的变化 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(2): 125–128.
- [10] TANG D, DONG Y, GUO N, et al. Metabolomic analysis of the polyphenols in germinating mung beans (*Vigna radiata*) seeds and sprouts [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(8): 1639–1647.
- [11] Cevallos – casals B A, Cisneros – zevallos L. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species [J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1485–1490.
- [12] Victor N E, Justina Y T, Sunday A M, et al. DPPH radical scavenging capacity of phenolic extracts from African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) [J]. Food and Nutrition Sciences, 2012, 2012.
- [13] Cao D, Li H, Yi J, et al. Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress [J]. PloS one, 2011, 6(6): e21071.
- [14] Zhang X, Shang P, Qin F, et al. Chemical composition and antioxidative and anti-inflammatory properties of ten commercial mung bean samples [J]. LWT – Food Science and Technology, 2013, 54(1): 171–178.
- [15] Kim J K, Kim E H, Lee O K, ET AL. Variation and correlation analysis of phenolic compounds in mungbean (*Vigna radiata* L.) varieties [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2988–2997.
- [16] Guo X, Li T, Tang K, et al. Effect of germination on phytochemical profiles and antioxidant activity of mung bean sprouts (*Vigna radiata*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(44): 11050–11055.
- [17] Barroga C F, Laurena A C, Mendoza E M T. Polyphenols in mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek): determination and removal [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1985, 33(5): 1006–1009.
- [18] Kou X, Zhou F. Bioactive compounds and antioxidant activity of mung bean (*Vigna radiata* L.), soybean (*Glycine max* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the germination process [J]. 2016.
- [19] López A, El – naggar T, Dueñas M, et al. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 547–555.
- [20] Xu B J, Chang S K C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents [J]. Journal of Food Science, 2007, 72(2): S159–S166.
- [21] Szöllösi R, Varga I S, Erdei L, et al. Cadmium – induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(5): 1337–1342.
- [8] Philip D Ross, S Subramanian. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096–3102.
- [9] E Haslam. Polyphenol – protein interactions [J]. The Biochemical Journal, 1974, 139(1): 285–288.
- [20] 刘天囡, 徐梦佳, 胡冰, 等. 茯砖茶多酚类物质对胰脂肪酶活性的抑制作用 [J]. 食品科学, 2015, 36(21): 46–49.
- [21] Shengbao Cai, Ou Wang, Mengqian Wang, et al. In Vitro Inhibitory Effect on Pancreatic Lipase Activity of Subfractions from Ethanol Extracts of Fermented Oats (*Avena sativa* L.) and Synergistic Effect of Three Phenolic Acids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(29): 7245–7251.

(上接第 155 页)