



# 黑豆皮花青素抑制酪氨酸酶催化反应动力学研究

褚盼盼

(吕梁学院 生命科学系,山西 吕梁 033000)

**摘要:**为研究黑豆皮花青素抑制酪氨酸酶催化反应的动力学机制,在不同条件下研究黑豆皮花青素对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的抑制特性,确定最佳抑制条件、抑制类型和半抑制浓度( $IC_{50}$ ),并使用紫外和荧光光谱分析二者的相互作用机制。正交试验分析表明:黑豆皮花青素对酪氨酸酶单酚酶的最佳作用条件为黑豆皮花青素浓度  $0.6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、L-酪氨酸浓度  $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、温度  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、时间  $15\text{ min}$ ,此时抑制率高达  $50.37\%$ ;对二酚酶的最佳作用条件为黑豆皮花青素浓度  $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、L-多巴浓度  $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、温度  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、时间  $10\text{ min}$ ,此时抑制率  $52.45\%$ 。与 VC 相比,黑豆皮花青素对酪氨酸酶单、二酚酶的抑制作用更强。动力学试验表明,黑豆皮花青素对酪氨酸酶单、二酚酶活性有抑制作用, $IC_{50}$  分别为  $1.03$  和  $0.82\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对酪氨酸酶有可逆的混合型抑制作用,其抑制常数  $K_i$  为  $0.61\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。紫外光谱分析表明,黑豆皮花青素使酪氨酸酶发生蓝移,表明此酶构象改变。荧光光谱分析表明,黑豆皮花青素对酪氨酸酶有静态猝灭作用, $298,303$  和  $308\text{ K}$  时其结合位点数分别为  $0.76,0.71$  和  $0.65$ ,结合常数  $K_A$  分别为  $159.66,94.23$  和  $54.89\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。研究结果说明黑豆皮花青素可以有效抑制酪氨酸酶活性,是天然植物来源的酪氨酸酶抑制剂。

**关键词:**黑豆皮花青素;酪氨酸酶;抑制率;动力学;紫外光谱;荧光光谱

## Kinetics of Tyrosinase Inhibition Catalyzed by Black Bean Skin Anthocyanins

CHU Pan-pan

(Life Science Department of Lvliang University, Lvliang 033000, China)

**Abstract:** In order to study the kinetic mechanism of black bean skin anthocyanins inhibiting tyrosinase catalytic reaction, we studied the inhibitory properties of black bean skin anthocyanins on tyrosinase monophenolase and diphenolase under different conditions, and determined the optimal inhibitory conditions, inhibitory types and the semi-inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ). The UV and fluorescence spectra were used to analyze the interaction mechanism. The orthogonal analysis showed that the optimal conditions of anthocyanins on tyrosinase monophenol were as follows,  $0.6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  anthocyanins concentration,  $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  L-tyrosine concentration,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $15\text{ min}$ , and the inhibition rate was  $50.37\%$ . The optimal action conditions of diphenol enzyme were as follows,  $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  anthocyanin concentration,  $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  L-dopa concentration,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\text{ min}$ , the inhibition rate of diphenolase was  $52.45\%$ . Compared with VC, black bean skin anthocyanins had stronger inhibitory effect on tyrosinase monophenolase and diphenolase. The kinetic experiments showed that anthocyanins from black seed could inhibit tyrosinase mono phenolase and diphenolase activities with  $IC_{50}$  of  $1.03$  and  $0.82\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. It was a reversible mixed inhibition of tyrosinase, and the inhibition constant  $K_i$  was  $0.61\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The ultraviolet spectrum analysis showed that the anthocyanins in black bean skin caused the blue shift of tyrosinase, indicating that the conformation of tyrosinase was changed. The fluorescence spectra showed that the binding-site number was  $0.76, 0.71$  and  $0.65$  at  $298, 303$  and  $308\text{ K}$ , and the binding constant  $K_A$  was  $159.66, 94.23$  and  $54.89\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectively. The result shows that black bean skin anthocyanins can effectively inhibit the activity of tyrosinase as a natural plant origin tyrosinase inhibitor.

**Keywords:** Black bean skin anthocyanins; Tyrosinase; Inhibition rate; Kinetics; Ultraviolet spectrum; Fluorescence spectrum

酪氨酸酶(EC,1.14.18.1,Tyrosinase)又称多酚氧化酶,是生物体合成黑色素的关键酶<sup>[1-3]</sup>。在植物中,酪氨酸酶能够使果蔬发生酶促褐变<sup>[4]</sup>。在人体内,酪氨酸酶主要存在于人体的胚胎神经鞘细胞中,其异常的过量表达会导致黑色素合成增多,进而引起皮肤黑色素沉积。由于黑色素合成与酪氨酸酶有很大关系,因此,通过抑制酪氨酸酶活性的方法可以预防和治疗色素疾病以及防止果蔬褐变的发生。

目前,对酪氨酸酶抑制剂的研究很多,如 VC、

VC 衍生物、曲酸和氢醌等。但是,VC 不稳定易氧化;而曲酸则对皮肤有刺激作用,容易导致皮肤过敏;氢醌则具有很多细胞毒性的物质,已很少使用;但天然植物活性物质成分的负面报道很少<sup>[5-6]</sup>。因此,近年来从植物中筛选新的、副作用更小的酪氨酸酶抑制剂已成为研究热点。

大多数天然黄酮类化合物可以作为良好的酪氨酸酶抑制剂<sup>[7-9]</sup>。黑豆皮花青素是黑大豆皮中的次生代谢物质,主要成份为飞燕草素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-半乳糖苷。其

色泽鲜艳、着色自然,还具有抗氧化<sup>[10]</sup>、抗菌<sup>[11]</sup>、抗肥胖<sup>[12]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[13]</sup>、保护肝脏、延缓衰老、降血脂<sup>[14]</sup>、降血糖<sup>[15]</sup>等生理功能,是一种非常重要的天然水溶性色素(黑豆红色素)<sup>[16]</sup>和理想的食物添加剂。本研究以黑豆皮花青素作为效应物,采用紫外、荧光光谱法探究其对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶催化性能的影响及抑制作用动力学,确定黑豆皮花青素与酪氨酸酶相互作用的最佳条件以及作用机制。研究旨在为黑豆皮花青素在医药、保健食品和美白化妆品等领域的开发利用提供理论基础,为黑豆皮的高附加值的综合加工拓宽思路,同时为新型高效的植物源天然酪氨酸酶抑制剂的开发提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

黑豆皮花青素,西安圣青生物科技有限公司。

1.2 主要仪器与试剂

UV-1601 紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器有限公司;XMTD-6000 电子恒温不锈钢水浴锅,上海宜昌仪器纱筛厂;BSA224S 电子天平,启东友铭衡器有限公司有限公司;C6CKLVJ475 荧光分

光光度计,广东天瑞仪器有限公司。

酪氨酸酶( $\geq 1\ 000\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ),Sigma-Aldrich 公司;L-酪氨酸和 L-多巴为生化试剂;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、亚硝酸钠、抗坏血酸和氢氧化钠等均为国产分析纯。

1.3 试验设计

通过单因素试验和正交试验,研究不同花青素浓度、底物浓度、温度、时间等因素下,黑豆皮花青素对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的抑制特性,分析最佳抑制条件;通过分析黑豆皮花青素对酪氨酸酶的抑制动力学确定抑制作用类型以及抑制常数;采用紫外光谱法研究黑豆皮花青素对酪氨酸酶构象的影响;采用荧光光谱法研究不同条件下黑豆皮花青素与酪氨酸酶的相互作用,分析两者之间的结合机制、结合位点数  $n$ 、结合常数  $K_A$  以及热力学参数等。

单因素试验:以底物浓度  $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、温度  $30\ ^\circ\text{C}$ 、反应时间  $15\ \text{min}$  为初始条件下,设置黑豆皮花青素浓度、底物浓度、温度、时间 4 个因素(表 1),以 VC 作为对照,分析不同条件下黑豆皮花青素对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活性的抑制特性。单酚酶和二酚酶的底物分别为 L-酪氨酸和 L-多巴。

表 1 单因素试验因素与水平

Table 1 The factors and levels of single factor test

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	黑豆皮花青素浓度	底物浓度	温度	时间
	Anthocyanins concentration in black bean skin/( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Concentration of substrate/( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Temperature/ $^\circ\text{C}$	Time/min
1	0.2	0	25	5
2	0.4	2	30	10
3	0.6	4	35	15
4	0.8	6	37	20
5	1.0	8	40	25

根据单因素试验结果,选取 3 个最优水平进行正交试验,分析黑豆皮花青素对单酚酶和二酚酶的最佳作用条件。

1.4 方法

1.4.1 酪氨酸酶活力及其抑制率测定 由  $\text{OD}_{475}$  随时间的增长曲线求得酪氨酸酶活力( $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ ),在  $\text{OD}_{475}$  时,多巴色素每分钟增加 0.001 为 1 个酶活单位<sup>[17]</sup>。

单酚酶活力测定:在试管中加  $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 L-酪氨酸  $1.5\ \text{mL}$ ,再加  $3.1\ \text{mL}$  磷酸盐缓冲液,在  $30\ ^\circ\text{C}$  保温  $10\ \text{min}$ ,加入  $0.2\ \text{mL}$  不同浓度的黑豆皮花青素溶液和  $0.2\ \text{mL}$  酪氨酸酶,用 VC 作为对照,

$15\ \text{min}$  后测定  $\text{OD}_{475}$ <sup>[18]</sup>。

二酚酶活力测定:在试管中加  $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 L-多巴  $1.0\ \text{mL}$ ,再加  $3.6\ \text{mL}$  磷酸盐缓冲液,在  $30\ ^\circ\text{C}$  保温  $10\ \text{min}$ ,加入  $0.2\ \text{mL}$  不同浓度的黑豆皮花青素溶液和  $0.2\ \text{mL}$  酪氨酸酶,用 VC 作为对照, $15\ \text{min}$  后测定  $\text{OD}_{475}$ <sup>[18]</sup>。

抑制率计算:一定的抑制剂浓度下,用  $\text{ACT}_i$  表示酶反应活性;没有抑制剂时,用  $\text{ACT}_0$  表示酶反应活性。黑豆皮花青素对酶的抑制率定义为: $I(\%) = \left(1 - \frac{\text{ACT}_i}{\text{ACT}_0}\right) \times 100 = \left(1 - \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_3}{\text{OD}_2 - \text{OD}_4}\right) \times 100$ , 式中,  $\text{OD}_1$  为测活体系(含黑豆皮花青素、底物、酪氨酸酶)

的吸光度值;OD<sub>2</sub>为测活体系(含酪氨酸酶、底物,但不含黑豆皮花青素)的吸光度值;OD<sub>3</sub>为测活体系(含黑豆皮花青素、底物,但不含酪氨酸酶)的吸光度值;OD<sub>4</sub>为测活体系(含底物,但不含酪氨酸酶、黑豆皮花青素)的吸光度值。其中,I<sub>M</sub>为单酚酶的抑制率,I<sub>D</sub>为二酚酶的抑制率。

1.4.2 黑豆皮花青素对酪氨酸酶催化反应动力学分析 半抑制剂浓度(IC<sub>50</sub>)测定:根据单酚酶和二酚酶活力的测定方法,通过测定 OD<sub>475</sub> 随时间的增长曲线来判断黑豆皮花青素对酪氨酸酶单、二酚酶有无抑制作用;根据抑制率的计算方法,结合不同反应条件下黑豆皮花青素对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的抑制特性结果,选择最佳酪氨酸酶单、二酚酶抑制率(I<sub>M</sub>、I<sub>D</sub>)条件,以黑豆皮花青素浓度为横轴,抑制率为纵轴,计算 IC<sub>50</sub>。

黑豆皮花青素对酪氨酸酶二酚酶抑制作用类型的判断及抑制常数的测定:根据单酚酶和二酚酶活力的测定方法,选择最佳酪氨酸酶单、二酚酶条件,以酶活力为纵轴,酪氨酸酶质量浓度为横轴作图,判断黑豆皮花青素对酪氨酸酶的抑制作用。改变 L-多巴浓度(Cs),以 1/V 为纵轴、1/Cs 为横轴作图,计算米氏常数 Km 和 Vmax,判断抑制作用类型。同时,以 1/V 为纵轴、花青素浓度 C<sub>i</sub>为横轴作图,计算抑制常数 Ki。

1.4.3 紫外吸收光谱法 称取 0.1 g 酪氨酸酶,用蒸馏水配置成 2 mg·mL<sup>-1</sup> 溶液,稀释为质量浓度为 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.6 和 2.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的一系列酪氨酸酶溶液,分别滴加 2 mL,测量 OD<sub>475</sub>。横轴为酪氨酸酶浓度,纵轴为 OD<sub>475</sub>,绘制酪氨酸酶催化反应的标准曲线。

酪氨酸酶和黑豆皮花青素在紫外区都有吸收

表 2 不同反应条件下黑豆皮花青素对酪氨酸酶单酚酶的抑制率

Table 2 The inhibition rate of black bean skin anthocyanins on tyrosinase monophenase under different reaction conditions

单位: %

因素 Factor									
水平 Level	A		B		C		D		
	黑豆皮花青素 Anthocyanins	VC	黑豆皮花青素 Anthocyanins	VC	黑豆皮花青素 Anthocyanins	VC	黑豆皮花青素 Anthocyanins	VC	
	concentration in black bean skin		concentration in black bean skin		concentration in black bean skin		concentration in black bean skin		
1	15.91 ± 4.97 c	11.58 ± 3.00 c	19.74 ± 6.69 c	14.67 ± 3.27 c	26.09 ± 2.05 c	23.88 ± 2.13 c	27.42 ± 5.95 b	26.88 ± 3.92 c	
2	25.24 ± 3.71 b	17.89 ± 2.92 b	25.61 ± 6.37 bc	24.69 ± 4.38 b	27.12 ± 3.44 bc	24.80 ± 2.93 bc	44.87 ± 5.77 a	36.99 ± 1.96 b	
3	33.98 ± 3.44 a	28.96 ± 3.89 a	34.62 ± 6.16 ab	27.88 ± 3.59 ab	28.08 ± 5.97 bc	24.87 ± 1.72 bc	49.76 ± 3.14 a	44.26 ± 2.86 a	
4	24.24 ± 1.11 b	21.17 ± 1.40 b	41.51 ± 4.90 a	32.69 ± 2.53 a	48.50 ± 5.47 a	40.13 ± 1.81 a	33.02 ± 6.15 b	31.78 ± 4.19 bc	
5	10.97 ± 2.55 c	9.15 ± 3.67 c	29.52 ± 6.19 abc	26.67 ± 3.48 ab	35.62 ± 5.63 b	30.00 ± 4.96 b	32.33 ± 3.74 b	29.77 ± 2.64 c	

同列不同小写字母表示在 5% 水平差异显著。下同。  
The lowercase in the same column indicate significant difference at 5% level. The same below.

2.1.2 正交试验 根据黑豆皮花青素浓度、L-酪氨酸浓度、温度和时间的单因素结果,选择每个因素的 3 个最佳值设计 4 因素 3 水平正交试验,具体设计详见表 3。

表 3 单酚酶正交试验因素与水平

Table 3 The factors and levels of monophenase orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	黑豆皮花青素浓度	L-酪氨酸浓度	温度	时间
	Anthocyanins concentration in black bean skin/(mg·mL <sup>-1</sup> )	L-tyrosine concentration/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Temperature/℃	Time/min
1	0.4	4	35	10
2	0.6	6	37	15
3	0.8	8	40	20

如表 4 所示,影响程度顺序为 B>C>A>D,最优组合方案为 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即黑豆皮花青素浓度为 0.4 mg·mL<sup>-1</sup>、L-酪氨酸浓度为 6 mmol·L<sup>-1</sup>、37 ℃反应 15 min。在此条件下,抑制率可达 50.37%。

表 4 单酚酶正交试验结果

Table 4 The monophenase orthogonal test results

试验编号 Test number	因素 Factor				抑制率 Inhibition rate/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	36.23
2	1	2	2	2	50.37
3	1	3	3	3	29.29
4	2	1	2	3	36.23
5	2	2	3	1	40.28
6	2	3	1	2	31.14
7	3	1	3	2	33.29
8	3	2	1	3	44.10
9	3	3	2	1	35.51
K <sub>1</sub>	115.89	105.75	111.47	112.02	
K <sub>2</sub>	107.65	134.75	122.11	114.80	
K <sub>3</sub>	112.90	95.94	102.86	109.62	
k <sub>1</sub>	38.63	35.25	37.16	37.34	
k <sub>2</sub>	35.88	44.92	40.70	38.27	
k <sub>3</sub>	37.63	31.98	34.29	36.54	
极差 Range	2.75	12.94	6.42	1.73	
因素主次 Primary and secondary factors	B>C>A>D				
最优组合 Optimal combination	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>				

由表5正交试验的方差分析结果可知,底物浓度、青素浓度、温度、时间对单酚酶抑制率影响不显著度对单酚酶抑制率影响显著( $P<0.05$ ),黑豆皮花青素浓度对单酚酶抑制率影响不显著( $P>0.05$ )。

表5 单酚酶正交试验方差分析

Table 5 The analysis of variance of monophenase orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比值	F 临界值	显著性
Soruce of variation	Sum of squares of deviations	Degree of freedom	F ratio	F critical-value	Significance
A	11.600	2	2.589	19.000	
B	271.495	2	60.602	19.000	*
C	61.989	2	13.837	19.000	
D	4.480	2	1.000	19.000	
误差 Error	4.480	2			

\*表示具有差异显著性( $\alpha=0.05$ )。下同。  
\* indicates significant difference( $\alpha=0.05$ ). The same below.

2.2 黑豆皮花青素对酪氨酸酶二酚酶的抑制特性

2.2.1 单因素试验 结果表明,在试验设定的水平值范围内,黑豆皮花青素浓度、底物(L-多巴)浓度、温度和时间等4个因素对酪氨酸酶单酚酶的抑制率均呈现先上升后下降的趋势。当黑豆皮花青素浓度为0.8 mg·mL<sup>-1</sup>、研究发现底物(L-多巴)浓度为6 mmol·L<sup>-1</sup>、35 ℃、反应15 min时,抑制率最高,可达51.15%。同时,同一条件下黑豆皮花青素对酪氨酸酶二酚酶的抑制率均高于对照VC(表6)。

表6 不同反应条件下黑豆皮花青素对酪氨酸酶二酚酶的抑制率

Table 6 The inhibition rate of black bean skin anthocyanins to tyrosinase diphenolase under different reaction conditions

单位: %

水平 Level	因素 Factor							
	A		B		C		D	
	黑豆皮花青素 Anthocyanins concentration in black bean skin	VC	黑豆皮花青素 Anthocyanins concentration in black bean skin	VC	黑豆皮花青素 Anthocyanins concentration in black bean skin	VC	黑豆皮花青素 Anthocyanins concentration in black bean skin	VC
1	27.64 ± 4.21 bc	23.58 ± 2.38 bc	32.99 ± 6.55 ab	30.93 ± 3.59 ab	24.42 ± 4.57 b	19.28 ± 3.08 b	28.46 ± 4.99 d	24.60 ± 2.15 d
2	28.57 ± 5.03 bc	25.41 ± 3.53 bc	36.14 ± 3.11 ab	33.76 ± 0.68 a	25.00 ± 4.85 b	22.29 ± 5.45 b	29.25 ± 2.98 cd	26.00 ± 0.31 cd
3	33.33 ± 2.61 ab	28.44 ± 4.10 b	37.93 ± 2.99 a	33.77 ± 1.68 a	40.80 ± 6.04 a	34.96 ± 5.73 a	51.15 ± 5.90 a	42.74 ± 2.89 a
4	37.14 ± 2.88 a	36.00 ± 1.38 a	40.67 ± 2.18 a	33.88 ± 2.47 a	32.18 ± 6.37 ab	26.44 ± 2.82 b	39.90 ± 4.10 b	35.68 ± 2.94 b
5	25.81 ± 5.42 c	21.95 ± 4.24 c	28.19 ± 5.17 c	28.18 ± 4.72 b	28.11 ± 5.23 b	23.46 ± 5.34 b	37.84 ± 5.69 bc	30.77 ± 5.21 bc

2.2.2 正交试验 根据黑豆皮花青素浓度、L-多巴浓度、温度和时间单因素结果,选择每个因素的3个最佳值设计4因素3水平正交试验,具体设计详见表7。

表7 二酚酶正交试验因素与水平

Table 7 The factors and level of orthogonal test of diphenolase

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	黑豆皮花青素浓度 Anthocyanins concentration in black bean skin/(mg·mL <sup>-1</sup> )	L-多巴浓度 L-dopa concentration/(mmol·L <sup>-1</sup> )	温度 Temperature/℃	时间 Time/min
1	0.6	4	30	10
2	0.8	6	35	15
3	1.0	8	37	20

如表 8 所示,影响顺序为 A > C > B > D,最优方案 L-多巴浓度为 6 mmol·L<sup>-1</sup>,温度35 ℃,时间 10 min。在 为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>,即黑豆皮花青素浓度为0.8 mg·mL<sup>-1</sup>, 此条件下,抑制率可高达 52.45%。

表 8 二酚酶正交试验结果

Table 8 The diphenolase orthogonal test results

试验编号 Test number	因素 Factor				抑制率 Inhibition rate/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	29.55
2	1	2	2	2	46.88
3	1	3	3	3	36.00
4	2	1	2	3	41.73
5	2	2	3	1	51.80
6	2	3	1	2	31.82
7	3	1	3	2	31.17
8	3	2	1	3	27.55
9	3	3	2	1	30.40
K <sub>1</sub>	112.43	102.45	88.92	111.75	
K <sub>2</sub>	125.35	126.23	119.01	109.87	
K <sub>3</sub>	89.12	98.22	118.97	105.28	
k <sub>1</sub>	37.48	34.15	29.64	37.25	
k <sub>2</sub>	41.78	42.08	39.67	36.62	
k <sub>3</sub>	29.71	32.74	39.66	35.09	
极差 Range	12.08	9.34	10.03	2.16	
因素主次 Primary and secondary factors	A > C > B > D				
最优组合 Optimal combination	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub>				

由表 9 正交试验的方差分析结果可知,黑豆 影响差异显著( $P < 0.05$ ),反应时间对二酚酶抑制 皮花青素浓度、底物浓度、温度对二酚酶抑制率 率影响差异不显著( $P > 0.05$ )。

表 9 二酚酶正交试验方差分析

Table 9 The variance analysis of diphenolase orthogonal test

方差来源 Source of variation	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Degree of freedom	F 比值 F ratio	F 临界值 F critical-value	显著性 Significance
A	224.766	2	30.435	19.000	*
B	151.993	2	20.581	19.000	*
C	200.935	2	27.209	19.000	*
D	7.385	2	1.000	19.000	
误差 Error	7.380	2			

2.3 黑豆皮花青素对酪氨酸酶的抑制动力学分析

2.3.1 对酪氨酸酶单酚酶活力的影响 如图 1 所示, 增加黑豆皮花青素浓度能延长迟滞时间。 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>开始,同一时间下增大黑豆皮花青素浓 度,吸光度下降,说明黑豆皮花青素可抑制酪氨酸 酶单酚酶,该抑制作用主要通过 2 种途径实现,即降

低酶的稳态活力和延长迟滞时间。  
黑豆皮花青素浓度由 0 mg·mL<sup>-1</sup> 增加到 1.2 mg·mL<sup>-1</sup>,单酚酶的抑制率 I<sub>M</sub>由 0% 增加到 50% 以上(图 2),稳态酶的活力有所下降,迟滞时间明显 延长,由 20 s 增加到 178 s(图 3),计算得出黑豆皮 花青素对酪氨酸酶单酚酶的 IC<sub>50</sub>为 1.03 mg·mL<sup>-1</sup>。

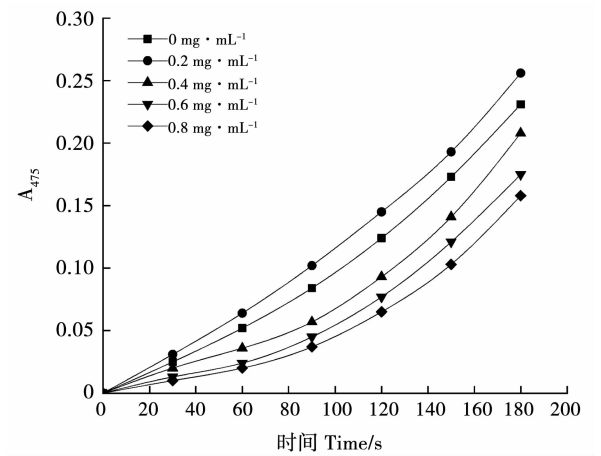


图1 黑豆皮花青素对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线  
Fig. 1 The progress curve of black bean skin anthocyanins inhibiting tyrosinase monophenolase

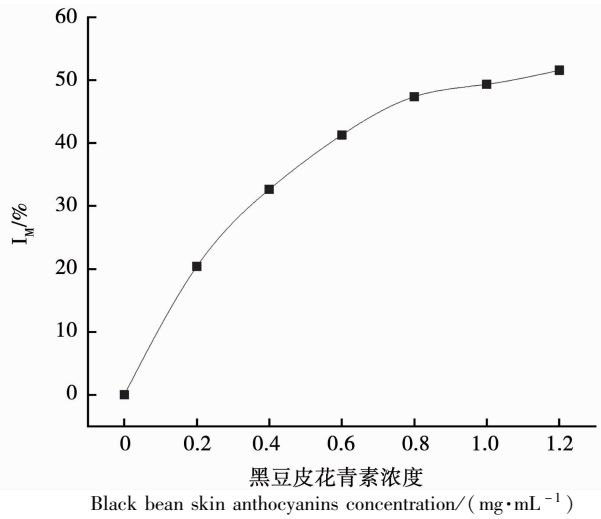


图2 黑豆皮花青素对酪氨酸酶单酚酶的抑制率  
Fig. 2 The inhibition rate of black bean skin anthocyanins on tyrosinase monophenolase

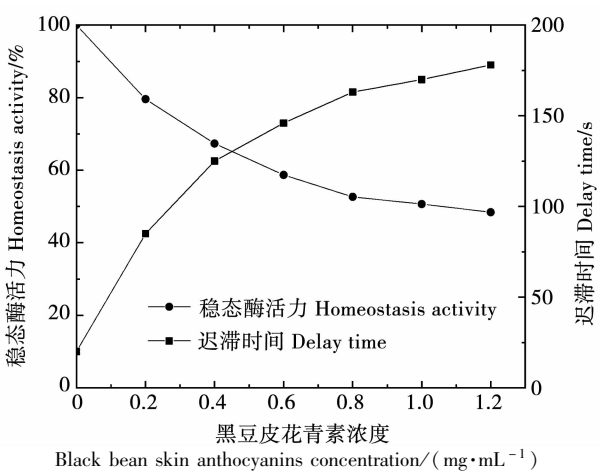


图3 黑豆皮花青素对酪氨酸酶单酚酶的稳定态和迟滞时间的影响  
Fig. 3 The effects of black bean skin anthocyanins on the stable state and hysteresis time of tyrosinase monophenolase

2.3.2 对酪氨酸酶二酚酶活力的影响 如图4所示,相同时间增加黑豆皮花青素浓度,吸光度值减小,二酚酶催化氧化速率不断降低且不存在迟滞效应,说明黑豆皮花青素可抑制二酚酶活性。

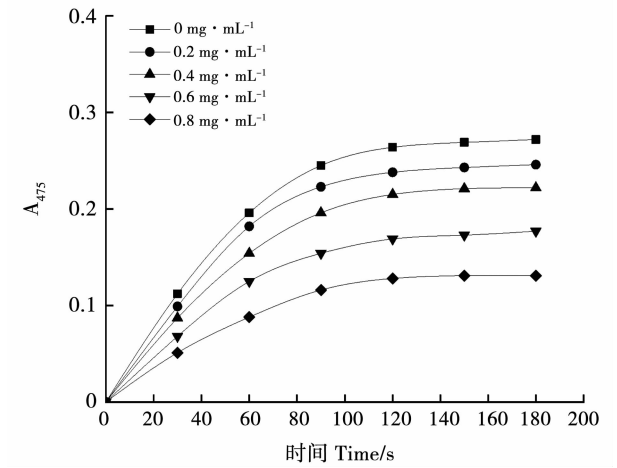


图4 黑豆皮花青素对酪氨酸酶二酚酶抑制作用的进程曲线  
Fig. 4 The progress curve of black bean skin anthocyanins inhibiting tyrosinase diphenolase

如图5所示,增加黑豆皮花青素浓度,相对抑制率增加,抑制率达50%时黑豆皮花青素浓度为0.82 mg·mL<sup>-1</sup>。经计算黑豆皮花青素对酪氨酸酶二酚酶的IC<sub>50</sub>为0.82 mg·mL<sup>-1</sup>。

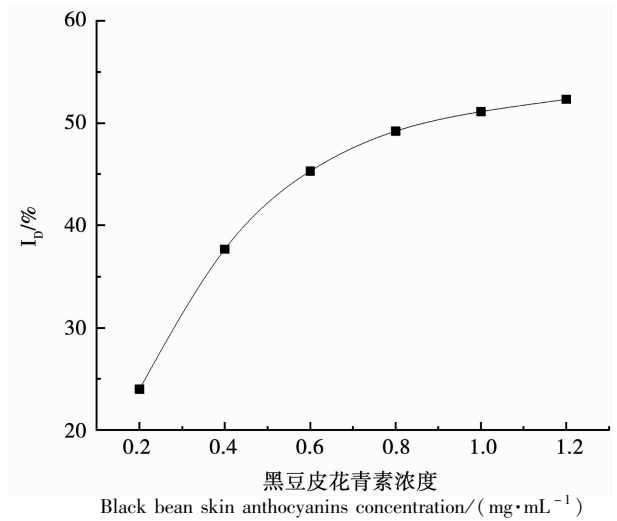


图5 黑豆皮花青素浓度对二酚酶的抑制率的影响  
Fig. 5 The effect of black bean skin anthocyanins concentration on the inhibition rate of diphenolase

如图6所示,黑豆皮花青素浓度增大,催化效率降低,斜率降低,说明其抑制作用是可逆的,这是由于酶活力受到了抑制引起的。

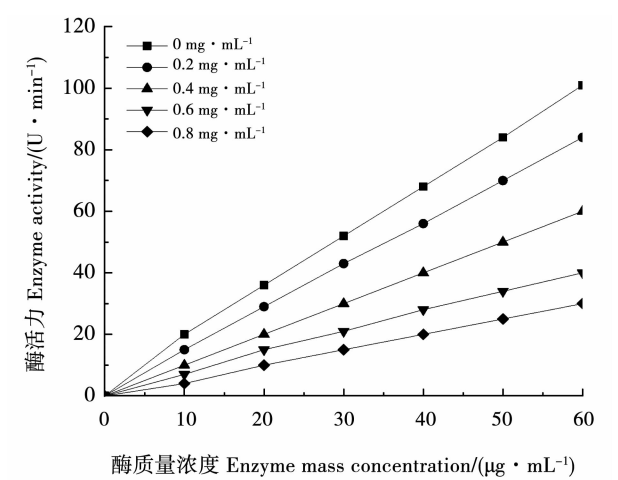


图 6 在不同黑豆皮花青素质量浓度下酶活力和酶量的关系

Fig.6 The relationship between black bean skin activity and enzyme amount under different anthocyanins mass concentration of

如图 7 所示,增大黑豆皮花青素浓度,反应直线斜率增大且交于第二象限,由直线的斜率和截距计算得出  $K_m$ 、 $V_{max}$  值,随  $K_m$  值增大  $V_{max}$  值减小,说明黑豆皮花青素对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制类型是混合型。

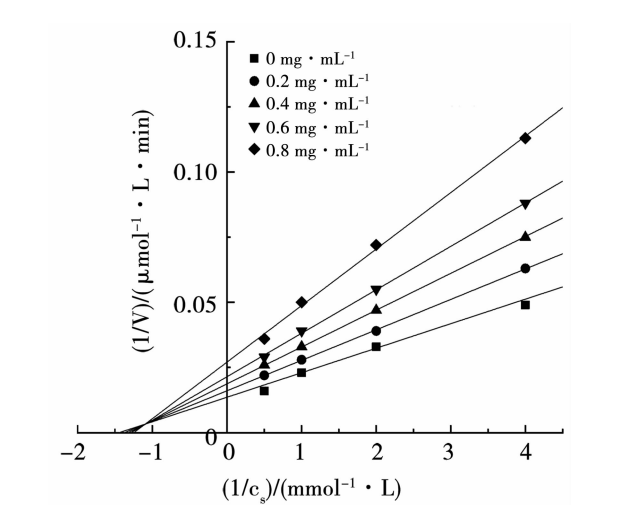


图 7 黑豆皮花青素对酪氨酸酶催化氧化 L-dopa 的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.7 The Lineweaver-Burk curve of the inhibition effect of black bean skin anthocyanins on tyrosinase-catalyzed oxidation of L-dopa

根据  $C_1$  计算米氏方程、 $K_m$  和  $V_{max}$  (表 10)。由 Dixon 曲线可知,直线交于第二象限,由直线和截距计算得拟合方程,由直线交点的横坐标的绝对值得出黑豆皮花青素对酪氨酸酶的抑制常数  $K_i$  为  $0.61 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (图 8 和表 11)。

表 10 黑豆皮花青素对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制动力学参数

Table 10 The kinetic parameters of inhibition of tyrosinase diphenolase activity by black bean skin anthocyanins

$C_1/$ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	米氏方程 Michaelis-Menten equation	$K_m/$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$V_{max}/$ ( $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ )
0	$1/V = 0.0092/C_s + 0.0130$	0.70	76.92
0.2	$1/V = 0.0117/C_s + 0.0161$	0.73	62.11
0.4	$1/V = 0.0140/C_s + 0.0190$	0.74	52.63
0.6	$1/V = 0.0165/C_s + 0.0221$	0.75	45.25
0.8	$1/V = 0.0217/C_s + 0.0271$	0.80	36.90

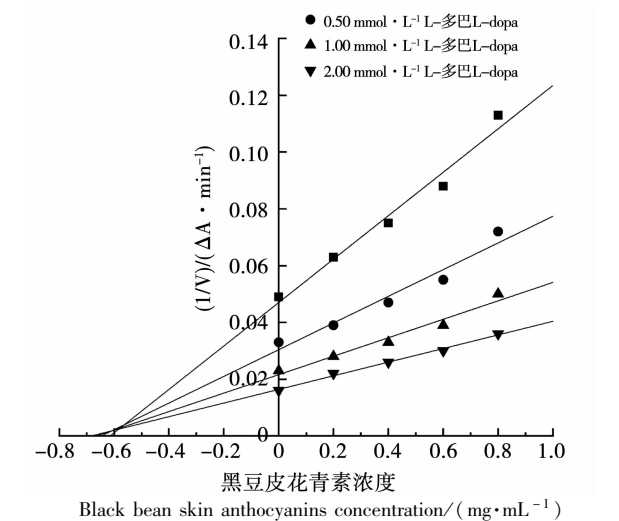


图 8 不同浓度黑豆皮花青素对酪氨酸酶二酚酶作用的 Dixon 曲线

Fig.8 The Dixon curve of different concentrations of black bean skin anthocyanins on tyrosinase diphenolase

表 11 黑豆皮花青素抑制酪氨酸酶二酚酶活性的抑制常数

Table 11 The inhibition constants of black bean skin anthocyanins to tyrosinase diphenolase activity

$C_s/$ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	拟合方程 Fitted equation	$K_i/$ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
0.25	$1/V = 0.0765/C_1 + 0.0470$	0.61
0.50	$1/V = 0.0470/C_1 + 0.0304$	
1.00	$1/V = 0.0325/C_1 + 0.0216$	
2.00	$1/V = 0.0240/C_1 + 0.0164$	

## 2.4 紫外光谱法研究黑豆皮花青素与酪氨酸酶的相互作用

2.4.1 酪氨酸酶标准曲线 如图 9 所示,酪氨酸酶质量浓度为  $0 \sim 100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,与酶活性线性相关,其拟合方程为  $A = 0.0058C_{\text{酪氨酸酶}} + 0.0037$ ,  $R^2 = 0.9998$ 。



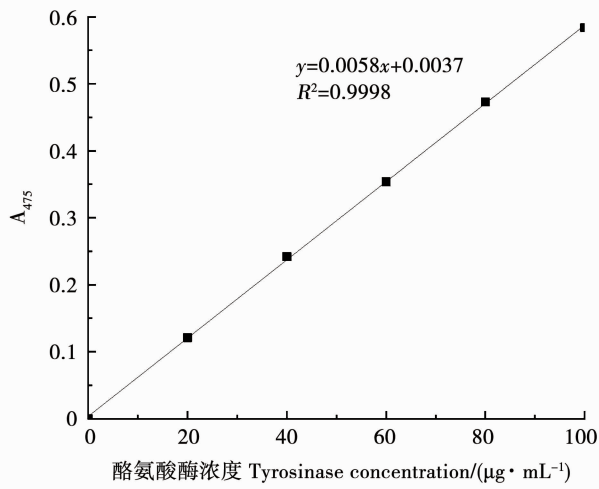


图9 酪氨酸酶标准曲线

Fig. 9 The standard curve of tyrosinase

2.4.2 黑豆皮花青素与酪氨酸酶相互作用的验证  
黑豆皮花青素、黑豆皮花青素与酪氨酸酶配合物、酪氨酸酶在 250 ~ 400 nm 的紫外吸收光谱如图 10 所示,加入黑豆皮花青素,配合物吸光度略有下降,而黑豆皮花青素明显增强,并伴有蓝移(317 nm→310 nm),推断二者发生了相互作用,并且在相互作用前后酪氨酸酶的构象发生了明显的变化,其酶活力降低。

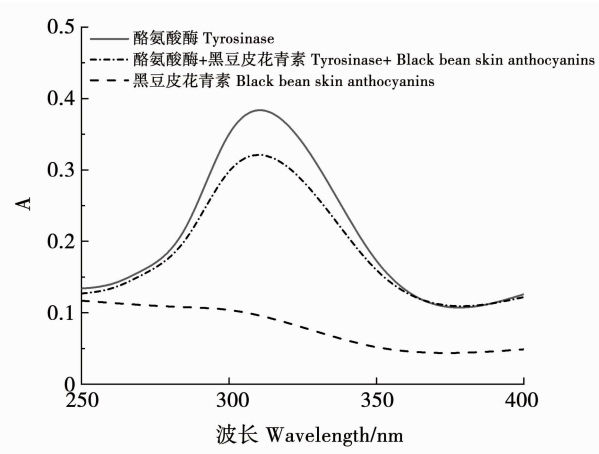


图10 黑豆皮花青素、黑豆皮花青素与酪氨酸酶配合物、酪氨酸酶的紫外吸收光谱

Fig. 10 The UV absorption spectra of black bean anthocyanins, black bean anthocyanin and tyrosinase complexes, and tyrosinase

2.5 荧光光谱法研究黑豆皮花青素与酪氨酸酶的相互作用

2.5.1 黑豆皮花青素与酪氨酸酶的荧光猝灭作用  
酪氨酸酶含有色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸等多种氨基酸残基。当温度 298 K 时,不同浓度黑豆皮花青素条件下酪氨酸酶的荧光发射光谱如图 11 所示,增大黑豆皮花青素浓度,荧光强度降低,说明产生荧光猝灭。加入黑豆皮花青素后,波长发生了红移(333.5 nm→336 nm),移动了 2.5 nm,说明氨基酸残基的疏水性环境发生改变。

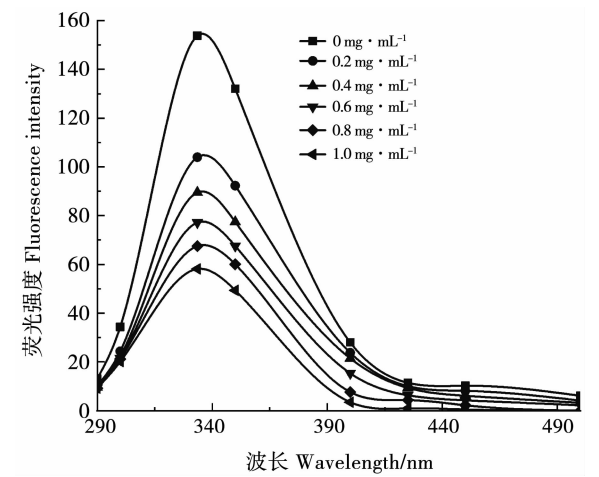


图11 不同浓度黑豆皮花青素条件下酪氨酸酶的荧光发射光谱

Fig. 11 The fluorescence emission spectra of tyrosinase under different concentrations of black bean skin anthocyanins

2.5.2 黑豆皮花青素与酪氨酸酶的荧光猝灭机理  
荧光猝灭分为静态和动态两种<sup>[20]</sup>。荧光强度可由 Stern-Volmer 方程表示: $\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv}$   
[Q],式中, $F_0$ 为酪氨酸酶的荧光强度; $F$ 为不同浓度配合物(黑豆皮花青素与酪氨酸酶)的荧光强度; $K_q$ 为二者猝灭的速率常数( $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ ); $K_{sv}$ 为 Stern-Volmer 方程的猝灭常数( $L \cdot mol^{-1}$ ); $\tau_0$ 为黑豆皮花青素不存在时酪氨酸酶的荧光平均寿命,一般为  $10^{-8} s$ ; [Q]为黑豆皮花青素的浓度。将黑豆皮花青素的浓度 [Q]对  $F_0/F - 1$  作 Stern-Volmer 图(图 12),线性拟合得到荧光猝灭常数  $K_{sv}$ (表 12),升高温度,  $K_{sv}$  减小,可判断黑豆皮花青素对酪氨酸酶的荧光猝灭属于静态猝灭。

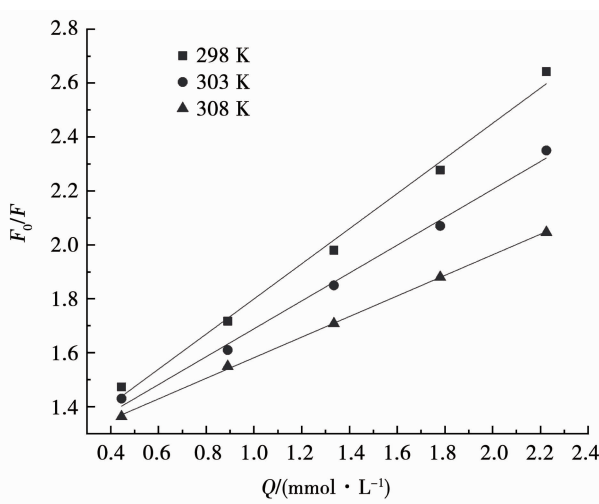


图12 黑豆皮花青素与酪氨酸酶猝灭的 Stern-Volmer 图  
Fig. 12 The Stern-Volmer diagram of black bean skin anthocyanins and tyrosinase

表 12 黑豆皮花青素与酪氨酸酶在不同温度下相互作用的荧光猝灭常数

Table 12 The fluorescence quenching constant Ksv of the interaction between black bean skin anthocyanins and tyrosinase at different temperatures

温度 Temperature/K	Stern-Volmer	Ksv/(L·mol <sup>-1</sup> )	Kq/(L·mol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
298	$\frac{F_0}{F} - 1 = 0.6512[Q] + 1.1484$	$10.64 \times 10^2$	$10.64 \times 10^{10}$	0.9933
303	$\frac{F_0}{F} - 1 = 0.5168[Q] + 1.1720$	$9.66 \times 10^2$	$9.66 \times 10^{10}$	0.9950
308	$\frac{F_0}{F} - 1 = 0.3816[Q] + 1.2000$	$5.17 \times 10^2$	$5.17 \times 10^{10}$	0.9995

根据得到的不同温度下的黑豆皮花青素猝灭常数 Ksv, 及其与 Kq 的关系, 可求得 298, 303 和 308 K 时黑豆皮花青素的 Kq 分别为  $1.06 \times 10^{11}$ ,  $0.97 \times 10^{11}$  和  $0.52 \times 10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 大于分子的最大扩散速率常数  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 由此判断此复合物荧光信号较弱。

2.5.3 黑豆皮花青素与酪氨酸酶的结合常数和结合位点数 根据双对数方程  $\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_A + n \log [Q]$ , 在温度 298, 303 和 308 K 时, 作图得到  $\log [Q]$  与  $\log [(F_0 - F)/F]$  的拟合曲线 (图 13), 得到方程的斜率和截距, 计算出  $n$  以及  $K_A$ 。298, 303 和 308 K 时黑豆皮花青素与酪氨酸酶的结合位点数  $n$  分别为 0.76, 0.71 和 0.65 (表 13), 表明二者的结合位点是独立的, 且只有一类<sup>[21]</sup>。结合常数  $K_A$  分别为 159.66, 94.23 和 54.89  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 温度升高,  $K_A$  减

小, 是由于静态猝灭使得温度高、不稳定。

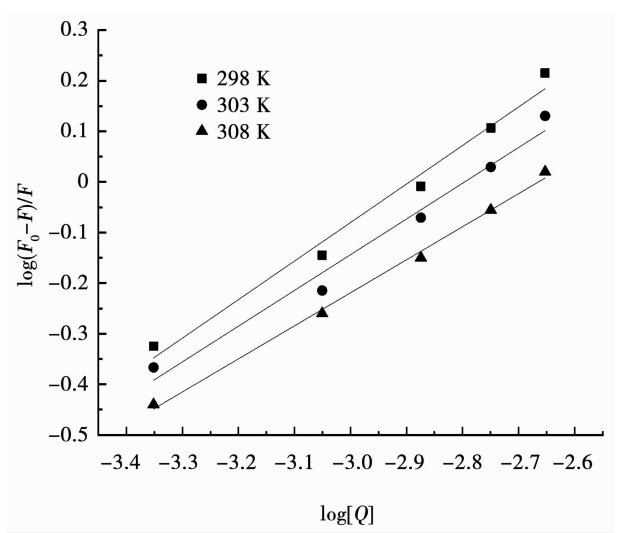


图 13  $\log [Q]$  与  $\log [(F_0 - F)/F]$  的拟合曲线  
Fig. 13 The fitting curves of Log[Q] and Log[(F<sub>0</sub> - F)/F]

表 13 黑豆皮花青素与酪氨酸酶相互作用的结合常数  $K_A$ 、结合位点数  $n$

Table 13 The binding constant  $K_A$  and number of binding sites  $n$  of the interaction between black bean skin anthocyanins and tyrosinase

温度 Temperature/K	双对数方程 Double Logarithm equation	$K_A/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$	$R^2$
298	$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + 0.7612 \log [Q]$	159.66	0.76	0.9845
303	$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + 0.7060 \log [Q]$	94.23	0.71	0.9808
308	$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + 0.6529 \log [Q]$	54.89	0.65	0.9965

2.5.4 黑豆皮花青素与酪氨酸酶相互作用力类型 一般可通过结合自由能 ( $\Delta G$ )、焓变 ( $\Delta H$ ) 和熵变 ( $\Delta S$ ) 等热力学参数研究作用类型<sup>[22]</sup>。公式为

$$\log K_a = -\frac{\Delta H}{2.303RT} + \frac{\Delta S}{2.303R}, \Delta G = \Delta H - T\Delta S, \text{ 式中,}$$

$K_a$  为 298, 304 和 308 K 时的结合常数 ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ );  $R$  为理想气体常数, 值为  $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 。根据 298, 303 和 308 K 下得到的  $K_A$  以及公式可求得黑豆皮花青素与酪氨酸酶在不同温度下相互作用的热力学参数, 在 298, 304 和 308 K 下, 结合自由能分别为

-12.59, -11.43 和 -10.28 kJ·mol<sup>-1</sup>,  $\Delta G < 0$ , 说明黑豆皮花青素与酪氨酸酶键和反应是自发过程。 $\Delta S < 0$ ,  $\Delta H < 0$ , 说明黑豆皮花青素与酪氨酸酶结合类型主要为氢键和范德华力<sup>[23]</sup>(表 14)。

表 14 黑豆皮花青素与酪氨酸酶在不同温度下相互作用的热力学参数

Table 14 The thermokinetic parameters of the interaction between black bean skin anthocyanins and tyrosinase at different temperatures

温度 Temperature /K	$\Delta H$ /(kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ /(J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ /(kJ·mol <sup>-1</sup> )	$R^2$
298	-81.48	-231.18	-12.59	0.9997
303	-81.48	-231.18	-11.43	0.9997
308	-81.48	-231.18	-10.28	0.9997

2.5.5 同步荧光光谱 如图 14 所示,  $\Delta\lambda = 15$  nm 时, 黑豆皮花青素存在下酪氨酸酶的同步荧光光谱酪氨酸酶出现蓝移 (291 nm→289 nm), 移动了 3 nm, 当加入黑豆皮花青素时, 酪氨酸残基的峰位置发生了移动。

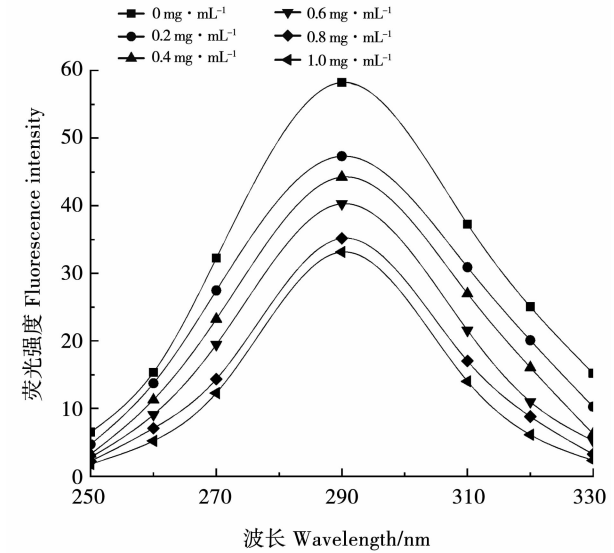


图 14 不同黑豆皮花青素浓度下酪氨酸酶的同步荧光光谱 ( $\Delta\lambda = 15$  nm)

Fig. 14 The synchronous fluorescence spectra of tyrosinase at different concentrations of black bean skin anthocyanins ( $\Delta\lambda = 15$  nm)

如图 15 所示, 当  $\Delta\lambda = 60$  nm 时, 黑豆皮花青素存在下酪氨酸酶的同步荧光光谱出现了红移 (285 nm→289 nm), 移动了 4 nm, 当加入黑豆皮花青素时, 转变了色氨酸的微环境, 体现在极性增强、疏水性降低。所以, 黑豆皮花青素改变了酶中色氨酸残基的构象, 但酪氨酸残基改变较小。

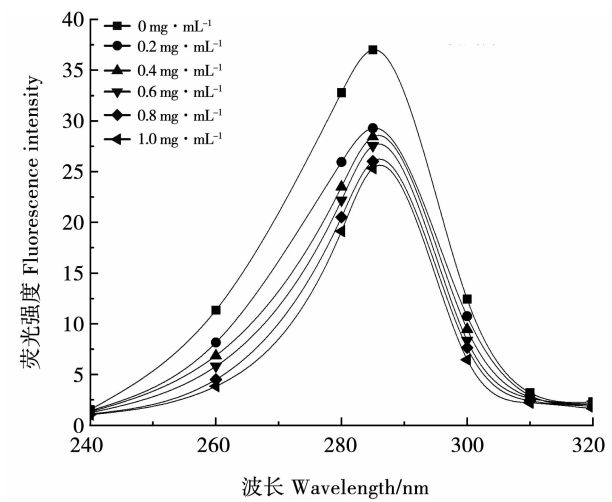


图 15 不同黑豆皮花青素浓度下酪氨酸酶的同步荧光光谱 ( $\Delta\lambda = 60$  nm)

Fig. 15 The synchronous fluorescence spectra of tyrosinase at different concentrations of black bean skin anthocyanins ( $\Delta\lambda = 60$  nm)

3 讨论

研究酶催化反应的动力学规律不仅有利于酶功能及酶作用机理的阐明, 而且在疾病诊断、药物设计与开发、食品工业以及农业病虫害防治方面具有重要的实际意义。本研究以黑豆皮花青素为试验材料, 研究其抑制酪氨酸酶催化反应动力学机制, 确定黑豆皮花青素与酪氨酸酶相互作用的最佳条件以及作用机制。通过研究黑豆皮花青素在不同黑豆皮花青素浓度、底物浓度、温度、时间等条件下对酪氨酸酶活性的影响, 确定了黑豆皮花青素对酪氨酸酶抑制的最佳条件。本研究发现, 酪氨酸酶单、二酚酶的活性受到黑豆皮花青素的抑制,  $IC_{50}$  分别为 1.03 和 0.82 mg·mL<sup>-1</sup>, 是可逆的混合型抑制,  $K_i$  为 0.61 mg·mL<sup>-1</sup>。这与崔萌<sup>[7]</sup>发现黄桢叶黄酮类提取物是可逆的混合型抑制,  $IC_{50}$  为 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>,  $K_i$  为 455.99 mmol·L<sup>-1</sup> 结果吻合; 而与樊美慧<sup>[8]</sup>发现槲皮素是可逆的竞争型抑制,  $IC_{50}$  为  $3.08 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>,  $K_i$  为  $6.41 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 的结果有差别。而 Chai 等<sup>[9]</sup>发现原花青素是可逆的竞争型抑制, 且羟基与铜离子发生结合。

目前, 市场上的绝大多数美白产品使用酪氨酸酶抑制剂, 美白剂来源主要有绿茶提取物、曲酸及其衍生物、熊果苷等, 它们都是通过抑制酶活性来达到美白功效的。另外, 引起蔬菜、水果发生酶促褐变的酶主要是酪氨酸酶, 它使果蔬发生褐变反应, 影响果蔬的风味、食用价值等。当前采用酪氨酸酶抑制剂 (如半胱氨酸、肉桂酸等) 处理果蔬已成为有效的保鲜手段之一。本研究以黑豆皮花青素为试验材料, 发现黑豆皮花青素是一种良好的酪氨

酸酶抑制剂。与市场上酪氨酸酶抑制剂相比,黑豆皮花青素价格较低,生产成本低,作为美白产品,不论从价格、安全还是性能上来说,都是一个不错的选择。本研究结果为进一步探讨黑豆红色素增白美容相关产品的研发奠定基础,为其在医药、保健食品、化妆品等领域的开发利用提供理论基础,也为黑豆皮的高附加值综合加工拓宽思路。

4 结 论

研究表明,与 VC 相比,黑豆皮花青素对酪氨酸酶单、二酚酶的抑制率均较高。单酚酶抑制率的最佳条件为:0.6 mg·mL<sup>-1</sup>黑豆皮花青素、6 mmol·L<sup>-1</sup> L-酪氨酸,37 ℃,反应 15 min,此时抑制率可高达 50.37%。酪氨酸酶二酚酶抑制的最佳条件为:0.8 mg·mL<sup>-1</sup>黑豆皮花青素、6 mmol·L<sup>-1</sup> L-多巴、35 ℃,反应 10 min,此时抑制率可高达 52.45%。黑豆皮花青素能有效抑制酪氨酸酶的活性。紫外光谱分析表明,黑豆皮花青素使酪氨酸酶发生蓝移,改变了其酶构象。荧光光谱分析表明,黑豆皮花青素对酪氨酸酶表现为静态猝灭,酶浓度增大,猝灭作用增强。同步荧光光谱分析表明,黑豆皮花青素对酪氨酸、色氨酸残基微环境均有影响,酪氨酸发生蓝移,色氨酸发生红移。因此,黑豆皮花青素可作为天然植物源的酪氨酸酶抑制剂。

参考文献

[1] Yokozawa T, Kim Y J. Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(11): 2007-2011.

[2] Lu Y H, Wang Z T, Wei D Z, et al. Mechanism and inhibitory effect of galangin and its flavonoid mixture from *Alpinia officinarum* on mushroom tyrosinase and B16 murine melanoma cells[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2007, 22(4): 433-438.

[3] Matsuura R, Ukeda H, Sawamura M. Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(6): 2309-2313.

[4] 邱凌. 天然植物活性物质对酪氨酸酶作用机理的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008. ( Qiu L. Study on the inhibition and activation kinetics to tyrosinase by active molecules from plants [D]. Xiamen: Xiamen University, 2008. )

[5] 陈艳梅. 酪氨酸酶新型抑制剂曲酸衍生物的合成及其抑制黑色素形成的作用机理[D]. 厦门: 厦门大学, 2019. ( Chen Y M. Synthesis of kojic acid derivatives as novel tyrosinase inhibitor and its mechanism of inhibiting mlanogenesis [D]. Xiamen: Xiamen University, 2019. )

[6] 何学民,秦德安. 黑色素与酪氨酸酶[J]. 中国化妆品, 1994(3): 32-33. ( He X M, Qin D A. Melanin and tyrosinase [J]. China Cosmetics, 1994(3): 32-33. )

[7] 崔萌. 黄槿叶黄酮类提取物对酪氨酸酶的活性影响[D]. 长春: 吉林大学, 2016. ( Cui M. Effect of extract of flavonoids from leaf of *Amur Berberry* on activity of tyrosinase [D]. Changchun: Jilin University, 2016. )

[8] 樊美慧. 黄酮类化合物对酪氨酸酶的抑制机制及其构效关系研

究[D]. 南昌:南昌大学, 2018. ( Fan M H. Study on the inhibitory mechanism and structure-activity relationship of flavonoids on tyrosinase [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018. )

[9] Chai W M, Wei M K, Wang R, et al. Avocado proanthocyanidins as a source of tyrosinaseinhibitors: Structure characterization, inhibitory activity, and mechanism [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(33): 7381-7387.

[10] Xu B, Chang S K C. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(18): 8365-8373.

[11] 褚盼盼,靳泽荣,乔元彪. 黑豆皮花青素不同提取方法及其体外抗菌活性研究[J]. 大豆科学, 2015, 34(4): 685-689. ( Chu P P, Jin Z R, Qiao Y B. Black soybean skin anthocyanin different extraction method and its antibacterial activity *in vitro* [J]. Soybean Science, 2015, 34(4): 685-689. )

[12] 褚盼盼,门玉倩,孔令悦,等. 黑豆红色素抑制胰脂肪酶催化反应动力学研究[J]. 食品科技, 2018, 43(5): 302-307. ( Chu P P, Men Y Q, Kong L Y, et al. Inhibition of the black beans red pigment on pancreatic lipase by catalysis reaction dynamics [J]. Food Sience and Tehcnology, 2018, 43(5): 302-307. )

[13] 张芳轩. 黑大豆种皮花色苷物质组成及其抗氧化活性与抗血管平滑肌细胞增生作用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010. ( Zhang F X. Studies on anthocyanin composition and antioxidant activity of black soybean seed coat and its anti-proliferative effect of vascular smooth muscle cells [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010. )

[14] Kwon S H. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins[J]. Journal of Medicinal Food, 2007, 10(3): 552-556.

[15] 张继曼. 黑豆红花色苷的优化提取及其降血糖作用的研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2010. ( Zhang J M. The optimum and hypoglycemic effect of anthocyanins in black soybeans [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2010. )

[16] 王金亭. 天然黑豆红色素的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2010(3): 171-174. ( Wang J T. Advances on research of natural red pigment from black beans [J]. China Food Additives, 2010(3): 171-174. )

[17] Xie L P, Chen Q X, Huang H, et al. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase[J]. Biochemistry (Moscow), 2003, 68(4): 487-491.

[18] 龚盛昭,杨卓如,程江. 肉桂酸抑制酪氨酸酶催化反应的动力学研究[J]. 高校化学工程学报, 2007(2): 345-349. ( Gong S Z, Yang Z R, Cheng J. Inhibitory kinetics of cinnamic acid on tyrosinase-catalyzing reaction [J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2007(2): 345-349. )

[19] Kim D, Park J, Kim J, et al. Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: A fluorescence quenching study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 935-941.

[20] 管骁,杨城,刘静,等. 槲皮素对酪氨酸酶的抑制作用与分子机理[J]. 现代食品科技, 2015, 31(8): 71-76, 109. ( Guan X, Yang C, Liu J, et al. Inhibition effect of quercetin on tyrosinase and its molecular mechanism [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(8): 71-76, 109. )

[21] 陈东平,牟光庆. 酪蛋白肽对小鼠抗氧化酶作用的研究[J]. 营养学报, 2010, 32(3): 242-244. ( Chen D P, Mou G Q. Effects of casein peptide on antioxidive enzymes in mice [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2010, 32(3): 242-244. )

[22] Pritchard S R, Phillipps M, Kailasapathy K, et al. Identification of bioactive peptides in commercial Australian organic cheddar cheeses [J]. Australian Journal of Dairy Technology, 2010, 65(3): 1545-1548.

[23] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102.