doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2025.11.070

# 碧根果乳酸菌发酵液中酚类 α-葡萄糖苷酶抑制剂筛选

潘利华[1,2]　陈路平[1]　袁　雪[1]　罗水忠[1,2]　郑　志[1,2]
(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230009; 2. 安徽省农产品现代加工重点实验室, 合肥 230009)

**摘要**: 本文联合超滤亲和-液质联用、发酵液组分差异分析、分子对接及酶抑制动力学的方法,探寻乳酸菌发酵对碧根果酚类 α-葡萄糖苷酶抑制活性的影响。结果表明,1% 碧根果果仁浆经过植物乳杆菌发酵 36 h,碧根果游离酚含量增加 18.48%,α-葡萄糖苷酶 $IC_{50}$ 值降低 57.39%,发酵液中木聚糖酶、纤维素酶、β-葡萄糖苷酶的酶活性与游离酚含量呈正相关。组分差异分析表明,发酵液中鉴定出 35 种游离酚,其中 9 种含量上调、5 种下调,发酵后儿茶素、表儿茶素、甲基鞣花酸和表儿茶素没食子酸酯相对含量的增加可能是碧根果游离酚 α-葡萄糖苷酶抑制活性增强的主要原因。通过超滤亲和-液质联用技术,从 35 种碧根果游离酚中筛选出 8 种潜在酚类 α-葡萄糖苷酶抑制剂。分子对接分析表明,碧根果游离酚与 α-葡萄糖苷酶的结合能与阿卡波糖相当甚至更低,它们与 α-葡萄糖苷酶的结合位点主要为 Asp609、Asp215、Glu277、Glu411 和 His280,分别属于竞争性、非竞争性和混合性 α-葡萄糖苷酶抑制剂。本研究结果可为碧根果的高值化加工利用、酚类 α-葡萄糖苷酶抑制剂设计、酚类降血糖保健品的研发提供理论依据。

**关键词**: 碧根果; α-葡萄糖苷酶; 酚类化合物; 植物乳杆菌; 超滤亲和
**中图分类号**: TS255.1　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-1298(2025)11-0716-10　　**OSID**:

# Screening of Phenolic Inhibitors against α-glucosidase from Fermented Pecan Kernels by Lactic Acid Bacteria

PAN Lihua[1,2]　CHEN Luping[1]　YUAN Xue[1]　LUO Shuizhong[1,2]　ZHENG Zhi[1,2]
(1. *School of Food and Biological Engineering*, *Hefei University of Technology*, *Hefei* 230009, *China*
2. *Anhui Province Key Laboratory of Agricultural Products Modern Processing*, *Hefei* 230009, *China*)

**Abstract**: Effects of the biogenic transformation and α-glucosidase inhibitory activity of phenolics in pecan kernels by lactic acid bacteria fermentation were explored by combining the methods of ultrafiltration affinity-LC－MS, component difference analysis of fermentation broth, molecular docking and enzyme inhibition kinetics. The results showed that the content of free phenols in the fermented pecan broth was increased by 18.48%, and the $IC_{50}$ of α-glucosidase was decreased by 57.39% after 1% pecan nut pulp was fermented by *Lactobacillus plantarum* for 36 h. The enzyme activities of xylanase, cellulase and β-glucosidase in the fermented broth were positively correlated with the contents of free phenols. The results of component difference analysis showed that the contents of nine free phenols were up-regulated and those of five free phenols were down-regulated. The increased relative contents of catechin, epicatechin, methyl ellagic acid and epicatechin gallate after fermentation may be the main reason for the enhancement of α-glucosidase inhibitory activity of the free phenols in pecan broth. Eight potential α-glucosidase inhibitors were screened out from the 35 free phenols in the fermented pecan broth by ultrafiltration affinity screening and liquid chromatography-mass spectrometry. The results of molecular docking analysis showed that the binding energy of free phenolic compounds with α-glucosidase was equal to or even lower than that of acarbose, and their binding sites with α-glucosidase were mainly Asp609, Asp215, Glu277, Glu411 and His280. The screened free phenolics were competitive, non-competitive or mixed α-glucosidase inhibitors. The research result can provide a theoretical basis for the high-value processing and utilization of pecans, the design of phenolic α-glucosidase inhibitors and the research and development of phenolic hypoglycemic health products.

**Key words**: pecans; α-glucosidase; phenolics; *Lactobacillus plantarum*; ultrafiltration affinity

收稿日期: 2024－07－20　修回日期: 2024－11－06
**基金项目**: 安徽省科技创新攻坚计划项目(202423110050025)和国家重点研发计划项目(2023YFD2100400)
**作者简介**: 潘利华(1972—),女,副教授,博士,主要从事食品加工与贮藏研究,E-mail: panlihua@hfut.edu.cn
**通信作者**: 罗水忠(1975—),男,教授,博士,主要从事功能性食品加工研究,E-mail: luoshuizhong@hfut.edu.cn

## 0　引言

α-葡萄糖苷酶抑制剂通过干扰小肠中 α-葡萄糖苷酶与低聚糖结合，阻止淀粉分解的低聚糖裂解为葡萄糖等单糖，进而有效降低餐后血糖峰值、调整血糖至正常水平[1-2]。目前，临床上治疗糖尿病的阿卡波糖、伏格列波糖等 α-葡萄糖苷酶抑制剂类药物虽然有效，但易引发如胃肠胀气、肾功能损伤等不良反应[3]。因此，寻找降糖功效好、毒副作用小、丰富易得的 α-葡萄糖苷酶抑制剂具有实践意义。

酚类物质是一种具有广阔前景的 α-葡萄糖苷酶抑制剂[3-5]。研究表明，碧根果（*Carya Illinoinensis*（Wangenh.）K. Koch）酚类提取物具有良好的 α-葡萄糖苷酶抑制活性，通过抑制 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶活性、阻止淀粉消化等途径预防糖尿病的发生与发展[6-7]。本课题组前期研究发现，碧根果果仁中游离酚和结合酚含量（质量比）分别约为 60 mg/（100 g）和 45 mg/（100 g），且游离酚对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性比结合酚更强[8]。可见，将碧根果内源性结合酚释放出来，转化为游离酚，将有助于提高碧根果的抗高血糖活性。研究证明，乳酸菌发酵能够将植物性食物如苹果[9]、鳄梨[10]、樱桃[11]中的结合酚转变为游离酚，进而提高这些食物中游离酚含量和抗糖尿病等生理活性[9-12]。但尚未见乳酸菌发酵转化碧根果果仁结合酚为游离态酚、提高其 α-葡萄糖苷酶抑制活性的报道。

超滤亲和-液质联用（UF-LC-MS）技术利用亲和原理，将具有潜在活性的小分子化合物（配体，如酚类物质、药物等）与目标蛋白提取液（受体，如 α-葡萄糖苷酶）混合，得到受体-配体复合物和未结合的小分子，通过超滤膜滤除未结合的小分子后，利用有机溶剂处理受体-配体复合物，使配体释放，再通过超高液相色谱-四级杆飞行质谱联用技术（UPLC-Q-TOF/MS），对释放出的配体做进一步的分析和鉴定[13]。分子对接是一种计算理论模拟方法，它通过研究受体的特征以及受体和配体之间的相互作用模式，预测其结合模式和亲合力，揭示受体与配体之间的相互作用机制，为药物筛选和设计提供依据[14]。通过 UF-LC-MS 从青钱柳提取物中鉴定出了 10 种 α-葡萄糖苷酶抑制剂，进一步的分子对接结果显示，熊果酸内酯与 α-葡萄糖苷酶的结合能最低，是青钱柳提取物中最具潜力的 α-葡萄苷酶抑制剂[15]。通过 UF-LC-MS 联合分子对接技术，从紫荆果实[16]、鹧鸪茶[17]和毛菊苣根[13]提取物中筛选到没食子酸甲酯、儿茶素、黄芩苷等 α-葡萄糖苷酶抑制剂，并揭示了这些抑制剂与 α-葡萄糖苷酶活性中心的结合位点。碧根果是油性坚果，具有较高含量的油脂（质量分数约 70%）和蛋白质（质量分数约 10%）、较低含量的糖（质量分数约 3%）以及丰富的酚类物质[8]。与植物提取物相比，碧根果乳酸菌发酵液的物质组成更加复杂，因此，需要 UF-LC-MS 特异性地、快速地筛选、鉴定出其中的 α-葡萄糖苷酶抑制剂，再联合分子对接分析，揭示碧根果酚类物质对 α-葡萄糖苷酶的抑制机理，为以碧根果为来源的酚类 α-葡萄糖苷酶抑制剂设计提供支持。

本文首先基于 UF-LC-MS 和 UPLC-Q-TOF/MS 技术，快速筛选碧根果植物乳杆菌发酵液中具有 α-葡萄糖苷酶抑制活性的活性游离酚；再以 α-葡萄糖苷酶为分子对接中的受体，以碧根果活性游离酚为配体，通过 Autodock tools 中的 vina 函数进行半柔性分子对接分析，以揭示 α-葡萄糖苷酶与碧根果游离酚之间的相互作用模式、探究碧根果酚类物质对 α-葡萄糖苷酶的抑制机制；最后通过体外试验验证所筛选的碧根果活性游离酚对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性，获得高效的碧根果酚类 α-葡萄糖苷酶抑制剂，以期为碧根果的提质增效加工和碧根果酚类抗糖尿病功能食品的设计与研发提供基础数据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与试剂

碧根果（波尼栽培种），坚果派农业有限公司提供；芦丁、没食子酸、α-葡萄糖苷酶，源叶生物科技有限公司；4-硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷（*p*NPG）、3,5-二硝基水杨酸（DNS）、阿卡波糖，北京索莱宝科技有限公司；植物乳杆菌 HH-LP56，郑州和合生物工程技术有限公司。

### 1.2　仪器与设备

电子天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；FW-100 型高速万能粉碎机，北京市永明医疗仪器有限公司；ZHWY-211B 型摇床，上海智城分析仪器制造有限公司；Avanti JXN-30 型高速冷冻离心机，贝克曼库尔特国际贸易（上海）有限公司；Microcon YM-30 型超滤离心管，Millipore 公司，美国；Acquity 型超高效液相色谱系统、Vanquish Q Exactive Plus 型液相色谱-四级杆静电场轨道阱质谱联用仪，Thermo Fisher Scientific 公司，美国；Gen5 型多功能酶标仪，BioTek 公司，美国。

### 1.3　方法

#### 1.3.1　碧根果乳酸菌发酵工艺

基于碧根果果仁油脂和蛋白含量高、糖分含量

低、酚类物质丰富的特点[8],发酵过程参考文献[18],稍有修改。根据预试验优化工艺参数,将新鲜碧根果仁加蒸馏水(液料比 100 mL/g)磨成浆,浆液通过 120 目不锈钢筛过滤取滤液。每 100 mL 滤液中加入 3 g 葡萄糖并混合均匀,再于 75℃巴氏杀菌15 min,灭菌后用流动水冷却至室温(20℃),然后按3%体积比接种事先活化的植物乳杆菌 HH - LP56 菌液(菌体浓度 8 ~ 9 lgCFU/mL),置于 37℃、150 r/min 摇床中培养,培养期间每隔 6 h(0、6、12、18、24、30、36、42、48 h 时)取样,分析发酵液中 pH 值、乳酸菌活菌数、游离酚和结合酚含量、游离酚对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性,以及木聚糖酶、纤维素酶和 β-葡萄糖苷酶的比活力。

植物乳杆菌 HH - LP56 活化参考文献[18]的方法,但稍有修改。将植物乳杆菌 HH - LP56 冻干粉分散在 MRS 培养基中,于 30℃静置培养 24 h,再转入 MRS 肉汤培养基中于 37℃静置培养 24 h,在 MRS 肉汤培养基中连续传代 2 次;将最后一次培养液于6 000 r/min 离心 10 min,收集细胞沉淀,重溶于 0.9% NaCl 灭菌溶液中,得到活化的植物乳杆菌 HH - LP56。

**1.3.2** 碧根果乳酸菌发酵液中 pH 值和活菌数的测定

取发酵液于6 000 r/min 离心 10 min,用 pH 计测定上清液 pH 值,采用 GB 4789.35—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》中的倾注平板计数法测定沉淀中乳酸菌活菌数。

**1.3.3** 碧根果乳酸菌发酵液中酚类物质的提取与含量测定

发酵液中游离酚和结合酚的提取参考文献[18]进行。

游离酚的提取:取发酵液,于 8 000 r/min、4℃离心 15 min,收集上清液 1;量取 25 mL 上清液 1,加入 100 mL 丙酮,超声处理 30 min 后,于 15 000 r/min、4℃离心 10 min,收集上清液 2,合并上清液 2 并在 45 ~ 50℃旋转蒸发仪中减压蒸发除去丙酮得到水溶液;向水溶液中缓慢加入 2 mol/L HCl 使 pH 值调至 2.0,再加入等体积的乙酸乙酯以萃取水溶液中的游离酚,萃取重复 3 次;收集并合并乙酸乙酯萃取液,在 45 ~ 50℃减压蒸干,残余物冷冻干燥后于 -40℃保存备用。

结合酚的提取:游离酚提取过程中收集的离心沉淀物用于提取结合酚。沉淀物按照液料比 10 mL/g 加入 4 mol/L NaOH,并在黑暗环境下碱解 4 h,然后离心取上清液 3;上清液 3 中结合酚的提取步骤同游离酚的提取步骤,即加入丙酮、超声处理、离心取上清、减压蒸发除去丙酮、调节 pH 值至 2.0、乙酸乙酯萃取、减压蒸干、冷冻干燥、低温储藏备用。

游离酚、结合酚总含量采用 Folin - Ciocalteu 法测定,以每毫升发酵液中没食子酸等效质量浓度表示。分别取游离酚和结合酚冷冻干燥粉末,用 80% 丙酮水溶液配置 1% 溶液,再以 10 倍稀释法制备适当浓度的样品稀释液。将 1.5 mL Folin - Ciocalteu 加入到 0.1 mL 样品稀释液中,室温下振荡 3 min。再加入 7.5 mL 蒸馏水和 1 mL 饱和碳酸钠溶液,于室温、黑暗环境孵育 1 h,然后测定 760 nm 处吸光度。以接种灭活菌种的发酵液为对照、80% 丙酮水溶液为参比;以没食子酸为标准品制作标准曲线。

**1.3.4** 碧根果游离酚的 α-葡萄糖苷酶抑制活性分析

单体酚和发酵液中总游离酚对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性参考文献[16]的方法测定。将溶解于磷酸缓冲液(0.01 mol/L、pH 值 6.8)中的 200 μL α-葡萄糖苷酶溶液(1.0 U/mL)与 100 μL 样品溶液(终质量浓度 0 ~ 500 mg/mL)涡旋混匀后,37℃孵化 15 min,接着加入 100 μL *p*NPG(5 mmol/L 对硝基苯酚-β-D-半乳糖苷,0.01 mol/L、pH 值 6.8 磷酸缓冲液溶解),并在 37℃继续孵化 30 min,再加入 40 μL $Na_2CO_3$ 溶液(0.1 mol/L)终止反应,立即测定 405 nm 处的光密度,抑制率 $I$ 计算公式为

$$I = (A_c - A_s)/A_c \times 100\% \quad (1)$$

式中 $A_c$——反应体系中不含酚类物质的光密度(OD 值)

$A_s$——反应体系中含有酚类物质的光密度(OD 值)

通过抑制率与酚类物质浓度的关系图求出相应酚类物质的半抑制质量浓度($IC_{50}$值)。

**1.3.5** 发酵液中木聚糖酶、纤维素酶和 β-葡萄糖苷酶活性测定

参考文献[19]的方法提取发酵液中木聚糖酶、纤维素酶和 β-葡萄糖苷酶的粗酶液,活性测定结果以酶的比活力(U/g)表示。向发酵液中缓慢加入柠檬酸至柠檬酸浓度为 0.02 mol/L(pH 值 4.8),再置于 30℃、180 r/min 摇床中 30 min,然后在 4℃、10 000 *g* 下离心 15 min,上清液为粗酶液。粗酶液储存在 -20℃冰箱备用,用灭活的粗酶溶液作为对照。酶蛋白含量采用考马斯亮蓝 G - 250(Bradford)方法测定,标准牛血清白蛋白质量浓度与吸光度线性方程 $y = 0.894\,1x + 0.012\,2$,$R^2 = 0.999\,8$。

纤维素酶酶活力的测定:于试管内加入 0.5 mL

粗酶液和 2 mL 柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L、pH 值 4.8)溶解的 1% 羧甲基纤维素钠溶液,充分混匀。将试管置于 50℃ 反应 20 min,然后加入 1 mL DNS 试剂,再沸水浴 5 min,用流动自来水冷却试管至室温后,向试管内加入 5 mL 蒸馏水,混匀,测定 540 nm 波长处吸光度。1 mL 粗酶液每分钟产生 1 μmol 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

木聚糖酶活力的测定:参照纤维素酶酶活力的测定方法进行,1% 羧甲基纤维素钠溶液替换为 1% 木聚糖溶液。

β-葡萄糖苷酶活力的测定:取 0.1 mL 粗酶液置于 10 mL 试管中,向试管内加入 0.5 mL 磷酸缓冲溶液(0.05 mol/L、pH 值 5.0)、0.1 mL *p*NPG(0.05 mol/L、pH 值 5.0 磷酸缓冲液溶解),均匀混合后,在 45℃ 反应 10 min,迅速加入 1 mL 20% $Na_2CO_3$ 溶液终止反应,然后用蒸馏水将试管内溶液定容至 5 mL,测量 405 nm 波长处溶液吸光度。定义 50℃、pH 值 5.0 条件下,1 mL 粗酶液在 1 min 内水解 *p*NPG 产生 1 μmol pNP 定义为一个酶活力单位(U)。

**1.3.6**　具有 α-葡萄糖苷酶抑制活性的游离酚筛选

参考文献[16]筛选具有 α-葡萄糖苷酶抑制活性的游离酚。分别将 500 μL 发酵 0 h 和 36 h 的碧根果游离酚(1.0 mg/mL)与 500 μL α-葡萄糖苷酶(5.0 U/mL)在 37℃ 下孵育 30 min,然后转至超滤离心管中,12 000 *g* 离心 10 min;向超滤离心管加入 200 μL 磷酸缓冲液(0.01 mol/L,pH 值 6.8),12 000 *g* 离心 10 min;再加磷酸缓冲液、离心,如此重复 3 次,除去未结合的化合物。为释放与 α-葡萄糖苷酶结合的配体酚类物质,再向超滤离心管中加入 200 μL 甲醇水溶液(甲醇体积分数 50%,pH 值 3.3),12 000 *g* 离心 15 min,重复 3 次;收集甲醇水溶液透过液,用于 HPLC－ESI－qTOF－MS/MS(高效液相色谱-电喷雾离子化飞行时间质谱/质谱)分析[13,16]。

HPLC 条件:色谱柱为 Acclaim RSLC 120 C18 色谱柱(2.2 μm,100 mm × 2.1 mm);流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液,流动相 B 为乙腈。梯度洗脱:0 ~ 5 min,10% B;5 ~ 10 min,10% ~ 30% B;10 ~ 15 min,30% ~ 90% B;15 ~ 20 min,90% B;20 ~ 25 min,90% ~5% B;流速 0.50 mL/min。检测波长 254 nm;进样量 20 μL。

质谱条件:离子源,ESI;扫描方式,负离子模式;全扫描质荷比(m/z)范围 100 ~ 1 000;毛细管电压 3 200 kV;去溶剂温度 320℃;鞘气压强 35 arb;气帘气压强 10 arb。

**1.3.7**　碧根果游离酚与 α-葡萄糖苷酶的分子对接分析

参考文献[4]的方法,从 RCSB 蛋白质数据库下载 α-葡萄糖苷酶(ID:3A4A)的晶体三维(3D)结构,并使用 Autodock Tools 1.5.7 对酶晶体进行加氢原子、去除水分子处理;从 PubChem 数据库下载基于亲和超滤中筛选出的碧根果酚类物质的 3D 结构,并使用 Autodock Tools 1.5.7 软件建立其能量最低的 3D 结构。设定以酶活性位点为中心、尺寸为 80 × 80 × 80 的网格框(网格框的坐标轴中心为(21.282, －7.422, 23.605)),用 Autodock Vina 1.1.2 模拟碧根果酚类化合物(配体)与 α-葡萄糖苷酶(受体)活性位点的对接构象,并记录亲和力、结合能和评分,使用 Discovery Studio 2021 对碧根果酚类物质与 α-葡萄糖苷酶(受体-配体)的结构域进行可视化作图。

**1.3.8**　筛选出的游离酚对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用分析

(1)生物亲和度[20]:以 100℃ 钝化 5 min 的失活 α-葡萄糖苷酶为阴性对照,对筛选出的游离酚进行超滤亲和筛选验证,计算筛选的游离酚与 α-葡萄糖苷酶的生物亲和度 *B* 公式为

$$B = (C_a - C_b)/C_0 \times 100\% \quad (2)$$

其中 $C_a$、$C_b$ 和 $C_0$ 分别表示与活性 α-葡糖苷酶、失活 α-葡糖苷酶和没有 α-葡糖苷酶进行超滤亲和筛选的游离酚浓度。

(2)对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用:按照 1.3.4 节的方法,测定筛选出的游离酚对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性,计算其对 α-葡萄糖苷酶的半抑制质量浓度($IC_{50}$值)。

(3)对 α-葡萄糖苷酶的抑制类型及抑制常数[21]:将终质量浓度分别为 0、400 mg/mL 的各筛选游离酚与终浓度分别为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0、25.0 mmol/L 的 *p*NPG 底物溶液混匀,按 1.3.4 节方法测出不同浓度的 *p*NPG 吸光度 *A* 随时间 *t* 变化图,并以直线部分求反应速率 *V*。根据 Lineweave－Burk 方程,以 $1/S$($S$ 表示底物浓度)为横坐标,$1/V$ 为纵坐标作图,求出表观最大反应速率 $V_{max}$($A_{405}$/min)、表观米氏常数 $K_m$(mmol/L),确定抑制类型,并计算抑制常数 $K_i$(mg/mL)和 $K_i'$(mg/mL)。

## 1.4　数据处理

所有试验均重复 3 次,采用 IBM SPSS 23 对数据进行统计分析,$P < 0.05$ 表示差异显著,采用 Origin 2021 对数据绘图。采用 Xcalibur 4.2 分析质谱数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌发酵对碧根果游离酚、结合酚、α-葡萄糖苷酶活性及相关酶活性的影响

表 1 显示了碧根果乳酸菌发酵液中活菌数、游离酚含量及其对 α-葡萄糖苷酶活性、总结合酚含量以及与结合酚释放有关的水解酶活性的变化。植物乳杆菌 HH-LP56 经过 18 h 的生长迟缓期,进入快速生长期,此后稳定生长直至 42 h,活菌菌体浓度从培养初期的 8.76 lgCFU/mL 增加至 14.03 lgCFU/mL(36 h),此后逐渐衰退。发酵液中 pH 值在培养至 18 h 快速下降,pH 值的变化与乳酸菌产生的有机酸相关[18]。发酵液中游离酚含量从 12 h 时持续增长,直至 36 h 达到最高值 29.42 μg/mL,增幅为 18.48%,然后开始下降。结合酚质量浓度在整个培养期间持续降低,从初始的 8.39 μg/mL 降至 7.60 μg/mL,降幅为 9.42%,α-葡萄糖苷酶 $IC_{50}$ 值降低 57.39%。这些结果表明,乳酸菌活菌数与游离酚含量呈正相关,而与结合酚含量呈负相关,这与发酵液中木聚糖酶、纤维素酶和 β-葡萄糖苷酶的活性增强有关,因为乳酸菌产生的木聚糖酶等水解酶将植物纤维等细胞壁结构降解[19],从而促进结合酚的释放和游离酚的积累[10-12]。发酵液中游离酚对 α-葡萄糖苷酶的半抑制浓度降低,表明发酵液中游离酚对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用增强,这可能与乳酸菌发酵改变了游离酚的含量与组成(表 2)有关[10]。碧根果游离酚比结合酚具有更强的 α-葡萄糖苷酶抑制作用[8],因此,后续以培养 0 h 和 36 h 发酵液中的游离酚为研究对象开展研究。

**表 1 乳酸菌发酵过程中活菌数、酚类物质含量,游离酚的 α-葡萄糖苷酶抑制活性及酚类释放相关酶活性变化**

**Tab.1 Changes in viable counts, phenol contents, α-glucosidase inhibitory activity of free phenols, and activities of enzymes related to phenolic release during *Lactobacillus plantarum* transformation**

| 时间/h | pH 值 | 乳酸菌菌体浓度/(lgCFU·mL$^{-1}$) | 游离酚质量浓度/(μg·mL$^{-1}$) | 结合酚质量浓度/(μg·mL$^{-1}$) | $IC_{50}$值/(μg·mL$^{-1}$) | 木聚糖酶活力/(U·g$^{-1}$) | 纤维素酶活力/(U·g$^{-1}$) | β-葡萄糖苷酶活力/(U·g$^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | (6.32±0.27)$^{a}$ | (8.76±0.45)$^{e}$ | (24.83±0.44)$^{e}$ | (8.39±0.35)$^{a}$ | (1.15±0.06)$^{ab}$ | (29.46±0.99)$^{bc}$ | Nd$^{g}$ | Nd$^{h}$ |
| 6 | (6.13±0.28)$^{a}$ | (8.81±0.51)$^{e}$ | (24.83±0.20)$^{e}$ | (8.34±0.31)$^{a}$ | (1.16±0.09)$^{ab}$ | (28.96±1.13)$^{c}$ | Nd$^{g}$ | (16.95±2.31)$^{g}$ |
| 12 | (5.86±0.21)$^{ab}$ | (8.95±0.52)$^{de}$ | (25.24±0.25)$^{e}$ | (8.22±0.22)$^{ab}$ | (1.27±0.07)$^{a}$ | (29.43±0.11)$^{bc}$ | (14.62±1.77)$^{f}$ | (27.50±0.99$^{f}$ |
| 18 | (5.67±0.23)$^{b}$ | (9.26±0.52)$^{d}$ | (26.46±0.29)$^{d}$ | (8.17±0.22)$^{ab}$ | (1.03±0.07)$^{b}$ | (30.26±1.25$^{abc}$ | (26.36±1.99)$^{e}$ | (44.40±1.78)$^{e}$ |
| 24 | (4.54±0.17)$^{c}$ | (12.06±0.69)$^{bc}$ | (27.59±0.58)$^{c}$ | (8.22±0.28)$^{ab}$ | (0.88±0.12)$^{c}$ | (32.12±1.10)$^{a}$ | (39.51±0.37)$^{d}$ | (72.56±2.58)$^{c}$ |
| 30 | (4.45±0.18)$^{cd}$ | (13.64±0.81)$^{a}$ | (29.02±0.22)$^{a}$ | (8.13±0.27)$^{abc}$ | (0.64±0.08)$^{d}$ | (31.29±1.32)$^{abc}$ | (50.22±1.11)$^{c}$ | (92.28±4.46)$^{a}$ |
| 36 | (4.31±0.17)$^{d}$ | (14.03±0.89)$^{a}$ | (29.42±0.71)$^{a}$ | (7.89±0.21)$^{abc}$ | (0.49±0.04)$^{e}$ | (30.83±1.17)$^{abc}$ | (69.64±2.57)$^{a}$ | (80.99±4.31)$^{b}$ |
| 42 | (4.22±0.12)$^{de}$ | (13.11±0.85)$^{ab}$ | (28.64±0.25)$^{ab}$ | (7.76±0.14)$^{bc}$ | (0.55±0.05)$^{de}$ | (31.54±1.29)$^{ab}$ | (61.53±1.63)$^{b}$ | (69.62±2.64)$^{c}$ |
| 48 | (4.19±0.13)$^{e}$ | (11.02±0.73)$^{c}$ | (27.99±0.32)$^{bc}$ | (7.60±0.34)$^{c}$ | (0.62±0.06)$^{de}$ | (30.61±1.46)$^{abc}$ | (60.49±1.79)$^{b}$ | (57.53±2.18)$^{d}$ |

注:同列数据不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

### 2.2 乳酸菌发酵对碧根果游离酚组成的影响

碧根果乳酸菌发酵前后游离酚组成和相对含量见表 2,上标“▲”和“▼”分别表示该化合物为上调差异游离酚和下调差异游离酚,没有上标符号的为发酵前后含量变化不明显($P>0.05$)的游离酚。如表 2 所示,从碧根果乳酸菌发酵前后都鉴定出 35 种游离酚,这与文献[22-23]研究结果相似。培养初期(0 h 组),鞣花酸相对含量最高(29.68%),其次相对含量从高到低的游离酚依次为没食子酸己糖苷(13.79%)、鞣花酸鼠李糖苷(10.79%)、六羟基二苯酰-葡萄糖(HHDP-葡萄糖)(6.44%)、鞣花酸己糖苷(6.04%)和鞣花酸戊糖(4.91%);鞣花酸及其衍生物是碧根果中主要的游离酚,占总含量的 55.89%,与文献[20]的报道相符。培养 36 h,游离酚的组成没有发生改变,但某些单体游离酚的含量发生显著变化,相对含量最高依然是鞣花酸(20.87%),紧跟其后的是 HHDP-葡萄糖(14.63%)、儿茶素(14.45%)、没食子酸(10.09%)、鞣花酸鼠李糖苷(6.66%)和表儿茶素(5.54%)。

从图 1 可以看出,35 种游离酚中,14 种发生了显著的差异变化,其中 9 种含量上升,5 种含量下降。这些差异游离酚主要为单宁类和黄酮类化合物。发酵后,上调的主要是一些低分子量的酚类化合物如没食子酸、儿茶素和表儿茶素,这可能是在乳酸菌发酵过程中,一方面,乳酸菌分泌的木聚糖酶、纤维素酶、β-葡萄糖苷酶的降解作用,使与细胞壁组分结合的结合酚释放,另一方面,高分子量的酚类聚合物如类黄酮、木质素和单宁类在多酚氧化酶、过氧化物酶、单宁水解酶的作用下断裂、水解所致[12,24]。下调的主要是糖苷类游离酚,其中鞣花酸戊糖和甲基鞣花酸葡萄糖苷的含量分别下降了 47.45% 和 70.83%,它们去糖基化和去甲基化的产物鞣花酸相对含量也降低了 29.68%。这可能是因为在培养过程中,一方面,鞣花酸单宁酶的作用下解聚成没食子酸,另一方面,芦丁水解酶将酚类物质芦丁水解成槲

**表 2　培养 0 h 和 36 h 发酵液中游离酚的组成及其相对含量**

**Tab. 2　Composition and relative contents of free phenols in fermentated broth cultured for 0 h and 36 h**

| 峰序号 | 保留时间/min | 化合物 | [M－H]⁻ (m/z) | MS/MS (m/z) | 相对含量/% | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 0 h | 36 h |
| 1 | 1. 56 | HHDP－葡萄糖▲ | 481 | 301 | 6. 44 | 14. 63 |
| 2 | 1. 86 | 没食子酸▲ | 169 | 125 | 3. 81 | 10. 09 |
| 3 | 2. 14 | 没食子酸甲酯▼ | 183 | 124 | 1. 50 | 0. 31 |
| 4 | 2. 33 | 没食子酸葡萄糖苷▼ | 331 | 169 | 13. 79 | 4. 16 |
| 5 | 2. 63 | 双－HHDP－葡萄糖▲ | 783 | 481,301 | 0. 16 | 0. 22 |
| 6 | 3. 33 | 没食子糖－HHDP－葡萄糖 | 633 | 301 | 2. 70 | 2. 72 |
| 7 | 3. 72 | 儿茶素葡萄糖苷 | 451 | 280 | 2. 96 | 2. 06 |
| 8 | 3. 82 | 原花青素二聚体▲ | 577 | 425 | 1. 45 | 4. 16 |
| 9 | 3. 90 | 儿茶素▲ | 289 | 245,179 | 3. 84 | 14. 45 |
| 10 | 4. 15 | 双没食子酰–葡萄糖 | 483 | 301 | 0. 45 | 0. 43 |
| 11 | 4. 27 | 双没食子酰－HHDP－葡萄糖 | 785 | 481,301 | 0. 01 | 0. 10 |
| 12 | 4. 39 | 对羟基苯甲酸 | 137 | 107 | 1. 37 | 0. 60 |
| 13 | 4. 42 | 咖啡酸葡萄糖苷 | 341 | 179 | 0. 08 | 0. 07 |
| 14 | 4. 54 | 表儿茶素▲ | 289 | 245,179 | 1. 28 | 5. 54 |
| 15 | 4. 56 | 原花青素三聚体 | 865 | 577,289 | 0 | 0 |
| 16 | 5. 78 | 鞣花酸葡萄糖苷▼ | 463 | 301,217 | 6. 04 | 0. 31 |
| 17 | 5. 92 | 鞣花酸芸香糖苷 | 609 | 301,217 | 0. 01 | 0. 01 |
| 18 | 6. 93 | 鞣花酸戊糖 | 433 | 301,217 | 4. 91 | 2. 58 |
| 19 | 7. 04 | 槲皮素-3-鼠李糖苷 | 447 | 301 | 0. 20 | 0. 18 |
| 20 | 7. 12 | Glansreginin B | 565 | 403 | 0. 10 | 0. 06 |
| 21 | 7. 14 | 甲基鞣花酸没食子酰戊糖苷 | 599 | 447,315 | 0. 55 | 0. 49 |
| 22 | 7. 37 | 双没食子酰鞣花酸 | 615 | 463,301 | 0. 01 | 0. 01 |
| 23 | 7. 41 | 甲基鞣花酸葡萄糖苷▼ | 477 | 301,315 | 0. 72 | 0. 21 |
| 24 | 7. 49 | 鞣花酸 | 301 | 217 | 29. 68 | 20. 87 |
| 25 | 7. 54 | 芦丁▼ | 610 | 449,301 | 0. 02 | 0. 01 |
| 26 | 7. 73 | 表没食子儿茶素没食子酸酯 | 457 | 293 | 2. 09 | 1. 25 |
| 27 | 7. 98 | 甲基鞣花酸▲ | 315 | 301 | 0. 53 | 2. 57 |
| 28 | 8. 73 | 鞣花酸鼠李糖苷 | 447 | 315,300 | 10. 79 | 6. 66 |
| 29 | 8. 77 | 鞣花酸没食子糖戊糖 | 585 | 433,301 | 0. 95 | 0. 59 |
| 30 | 9. 16 | Glansreginin A | 592 | 403,343 | 0. 32 | 0. 18 |
| 31 | 10. 30 | 甲基鞣花酸没食子糖戊糖 | 599 | 447,315 | 0. 23 | 0. 30 |
| 32 | 11. 74 | 二甲基鞣花酸▲ | 329 | 314 | 0. 20 | 0. 53 |
| 33 | 13. 64 | 表儿茶素没食子酸酯▲ | 441 | 289,245 | 0. 70 | 2. 58 |
| 34 | 13. 65 | 二甲基鞣花酸葡萄糖苷 | 491 | 328,315 | 1. 09 | 0. 40 |
| 35 | 14. 88 | 缬氨酸二内酯水合物 | 487 | 469,301 | 1. 02 | 0. 69 |

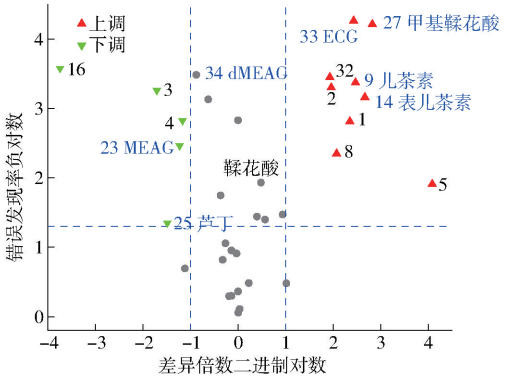


图 1　乳酸菌发酵前后差异酚类物质火山图

Fig. 1　Volcano plots comparing differential phenolics before and after *Lactobacillus* transformation

皮素，槲皮素在发酵液酸性环境降解成原儿茶素和儿茶素[12,25]。低分子量游离酚通常比高分子量的糖苷类游离酚具有更强的抗氧化活性等生理活性[24]，因此，高含量、高活性的没食子酸、儿茶素和表儿茶素等低分子量游离酚以及它们之间的协同作用，可能是增强发酵液中游离酚对 α-葡萄糖苷酶抑制活性（表 1）的主要原因。可见，乳酸菌发酵有助于提升碧根果的营养品质。

### 2. 3　碧根果游离酚 α-葡萄糖苷酶潜在抑制剂的筛选

图 2 为碧根果中潜在 α-葡萄糖苷酶抑制剂的超滤亲和筛选液质总离子色谱图。经过超滤前后峰面积对比，从碧根果乳酸菌发酵液中筛选出 8 种潜

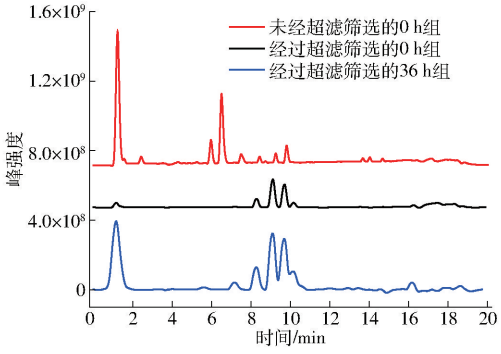


图 2 碧根果游离酚 α-葡萄糖苷酶抑制剂筛选的总离子色谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram of screened α-glucosidase inhibitor of free phenols in pecans

在的游离酚 α-葡萄糖苷酶抑制剂,包括甲基鞣花酸葡萄糖苷(MEAG)、芦丁、甲基鞣花酸、儿茶素、表儿茶素、鞣花酸、二甲基鞣花酸葡萄苷(dMEAG)和表儿茶素没食子酸酯(ECG)。这与文献[17,26]得出儿茶素、表儿茶素、鞣花酸和芦丁具有良好的 α-葡萄糖苷酶抑制活性的结果相一致。文献[27]显示 ECG 具有比阿卡波糖更强烈的 α-葡萄糖苷酶抑制活性。文献[28]也证实了鞣花单宁呈现不同程度的 α-葡萄糖苷酶抑制活性。

从图 1 可知,筛选出的 8 种游离酚中,儿茶素、表儿茶素、甲基鞣花酸和 ECG 是发酵后含量上调的游离酚($P<0.05$),芦丁和甲基鞣花酸为发酵后含量下调的游离酚($P<0.05$),而 MEAG 和 dMEAG 的含量发酵后变化不明显。另外,筛选出的游离酚的总相对含量从 0 h 的 37.86% 增加至 36 h 的 46.63%。由此推测,乳酸菌发酵后,碧根果游离酚对 α-葡萄糖苷酶抑制活性的增强(表 1)可能与儿茶素、表儿茶素、甲基鞣花酸和 ECG 相对含量的提高有关。

### 2.4 筛选出的碧根果游离酚与 α-葡萄糖苷酶的分子对接

Autodock 分析结果如表 3 所示,筛选出的 8 种游离酚中,除了儿茶素和鞣花酸外,其他 6 种游离酚的结合能与阿卡波糖的相同或更低,其中,芦丁、ECG、MEAG 的结合能分别为 -42.68、-41.84、-40.00 kJ/mol,表明它们与 α-葡萄糖苷酶结合能力比阿卡波糖的更强[4]。对接模型的 C-score 值均在 4 以上,表明对接结果可靠性高[17]。图 3 为筛选出的 8 种游离酚与 α-葡萄糖苷酶的分子对接模型。8 种游离酚与 α-葡萄糖苷酶之间的分子间相互作用力数量见表 3,其中,dMEAG 与 α-葡萄糖苷酶的分子间相互作用力数量为 16,高于阿卡波糖的 14。氢键是影响配体与酶受体之间亲和力,以及影响配体对酶的抑制活性的主要因素,更多氢键的形成可以降低配体-酶复合物的亲水性,从而增加配体-酶复合物的亲和力[29-30]。8 种游离酚参与氢键形成的氨基酸残基数为 3~8 个,其中,dMEAG 参与氢键形成的氨基酸残基数为 8 个,比阿卡波糖多 1 个(表 3),更多的氢键和更低的结合能,使 dMEAG 比阿卡波糖具有更强的 α-葡萄糖苷酶亲和力。氨基酸残基 Asp69、Asp215、Arg442、Glu277、Glu411 和 His280 是 α-葡萄糖苷酶的重要活性催化位点[17],对接结果显示,阿卡波糖可与 α-葡萄糖苷酶活性位点中的 Asp215 和 Glu277 形成氢键。筛选出的游离酚,包括儿茶素(Asp609、Asp215)、表儿茶素(Glu277)、甲基鞣花酸(His280)、鞣花酸(Glu411、His280)、dMEAG(His280、Glu277)和 ECG(Glu411),同样可与 α-葡萄糖苷酶活性催化位点中的部分氨基酸残基形成氢键,表明这些游离酚可通过与 α-葡萄糖苷酶底物竞争活性位点,从而抑制酶对底物的催化作用,改变酶促反应的 $V_{max}$ 或 $K_m$。

**表 3 碧根果游离酚与 α-葡萄糖苷酶的分子相互作用**

**Tab. 3 Molecular interactions between pecan free phenols and α-glucosidase**

| 序号 | 化合物 | 结合能/(kJ·mol⁻¹) | C-score 值 | 分子间相互作用力数量 | 参与氢键形成的氨基酸残基 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 儿茶素 | -33.05 | 5 | 8 | Asp352、Asp215、Asp69 |
| 2 | 表儿茶素 | -35.15 | 5 | 5 | Arg315、Glu277、Arg442 |
| 3 | 甲基鞣花酸 | -35.15 | 4 | 9 | Arg315、Ser311、Tyr158、His280 |
| 4 | MEAG | -40.00* | 4 | 7 | Asp352、Arg315、Gln353、Tyr158、Ser240、Pro312 |
| 5 | 鞣花酸 | -34.31 | 4 | 6 | Glu411、His280、Gln279、Pro312 |
| 6 | 芦丁 | -42.68* | 5 | 8 | Pro312、Asp242、Asp307、Arg315 |
| 7 | dMEAG | -38.07 | 4 | 16 | Lys156、Leu313、Ser240、His280、Asp352、Glu277、Gln353、Gln279 |
| 8 | ECG | -41.84* | 5 | 10 | Arg442、Glu411、Asp242、Ser240、Ser241、Pro312 |
| 9 | 阿卡波糖 | -35.15 | 4 | 14 | Arg213、Asp215、Glu277、Gln279、His112、Tyr158、Asp307 |

注:* 表示与阿卡波糖比有显著差异($P<0.05$)。

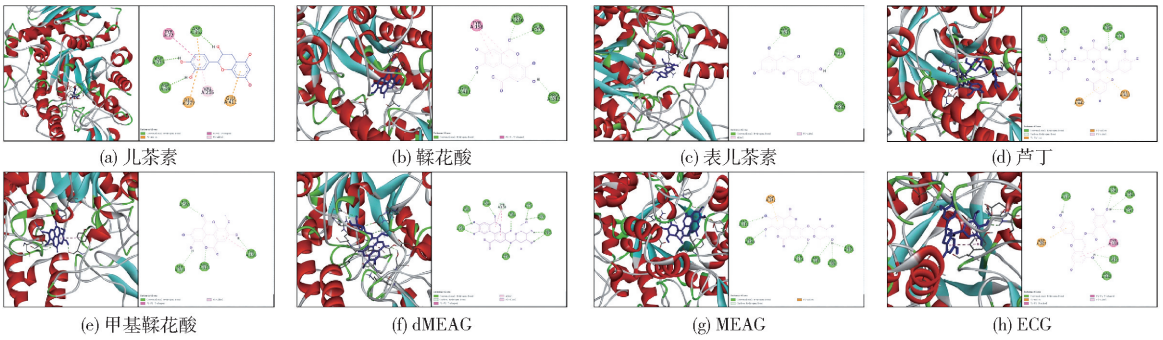


图 3　筛选出的 8 种抑制剂与 α-葡萄糖苷酶的分子对接模型

Fig. 3　Molecular docking models of screened eight inhibitors with α-glucosidase

### 2.5　筛选的游离酚对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用验证

表 4 显示了筛选的 8 种游离酚对 α-葡萄糖苷酶的生物亲和度 $B$、$IC_{50}$ 值和抑制作用类型，验证并表明了筛选的这些游离酚是潜在的 α-葡萄糖苷酶抑制剂。游离酚对 α-葡萄糖苷酶的生物亲和度与其半抑制浓度成反比，这与文献[20]的报道相同。从 Lineweaver－Burk 方程中可见，儿茶素和表儿茶素的表观 $K_m$ 与无抑制剂时没有显著影响，且表观 $V_{max}$ 降低，因此属于非竞争性可逆抑制剂；芦丁的表观 $V_{max}$ 与无抑制剂时大小相似，且表观 $K_{max}$ 增大，属于竞争性可逆抑制剂；ECG 和鞣花酸及其衍生物的双倒数曲线与无抑制剂时相较于第二象限，$K_i'$ 大于 $K_i$，因此，抑制类型为混合型中的非竞争-竞争性抑制剂[21]。

**表 4　筛选的游离酚对 α-葡萄糖苷酶的作用**

**Tab. 4　Effects of screened free phenols on α-glucosidase**

| 游离酚 | $B$/% | $IC_{50}$ 值/(mg·mL$^{-1}$) | Lineweaver－Burk 方程 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 方程式 | 表观 $V_{max}$/($A_{405}$·min$^{-1}$) | 表观 $K_m$/(mmol·L$^{-1}$) | $K_i$/(mg·mL$^{-1}$) | $K_i'$/(mg·mL$^{-1}$) | 抑制类型 |
| 儿茶素 | (1.3 ± 0.04)$^{f}$ | ND | $1/V = 208.42/S + 52.63$ | 0.021 8 * | 4.346 | 2 360.86$^{a}$ | | 非竞争性 |
| 表儿茶素 | (2.1 ± 0.06)$^{f}$ | ND | $1/V = 199.49/S + 50.28$ | 0.019 7 * | 4.248 | 1 361.15$^{b}$ | | 非竞争性 |
| ECG | (20.54 ± 0.84)$^{b}$ | (553.93 ± 13.23)$^{c}$ | $1/V = 655.97/S + 89.36$ | 0.011 2 * | 7.341 * | 102.64$^{g}$ | 321.83$^{d}$ | 混合型 |
| 鞣花酸 | (12.39 ± 0.51)$^{e}$ | (978.66 ± 41.01)$^{a}$ | $1/V = 252.51/S + 47.97$ | 0.020 9 * | 5.264 * | 786.41$^{c}$ | 1 794.77$^{a}$ | 混合型 |
| 甲基鞣花酸 | (17.14 ± 0.69)$^{d}$ | (695.75 ± 27.52)$^{b}$ | $1/V = 303.53/S + 53.20$ | 0.018 8 * | 5.704 * | 491.75$^{d}$ | 1 121.83$^{b}$ | 混合型 |
| MEAG | (19.85 ± 0.82)$^{bc}$ | (438.51 ± 18.08)$^{d}$ | $1/V = 543.41/S + 78.81$ | 0.012 9 * | 6.895 * | 174.78$^{f}$ | 406.58$^{c}$ | 混合型 |
| dMEAG | (22.87 ± 0.87)$^{b}$ | (421.87 ± 17.44)$^{d}$ | $1/V = 453.17/S + 68.55$ | 0.014 6 * | 6.610 * | 234.29$^{e}$ | 534.93$^{c}$ | 混合型 |
| 芦丁 | (27.66 ± 1.28)$^{a}$ | (407.32 ± 10.08)$^{e}$ | $1/V = 272.38/S + 39.85$ | 0.025 1 | 6.835 * | 736.35$^{e}$ | | 竞争性 |
| － | － | － | $1/V = 167.36/S + 39.22$ | 0.025 5 | 4.293 | | | |

注：* 表示与无抑制剂比有显著差异（$P < 0.05$）。

## 3　结论

（1）植物乳杆菌 HH－LP56 能够在 1% 碧根果果仁浆 +3% 葡萄糖的培养基中生长，并分泌木聚糖酶、纤维素酶和 β-葡萄糖苷酶等水解酶，使结合酚释放，从而提高发酵液中游离酚总含量、增强游离酚的 α-葡萄糖苷酶抑制活性。

（2）乳酸菌发酵没有改变碧根果游离酚的组成，但改变了部分游离酚单体的含量。碧根果乳酸菌发酵前后均鉴定出 35 种游离酚，其中 9 种发酵后含量上调，包括 HHDP－葡萄糖、没食子酸、双-HHDP－葡萄糖、原花青素二聚体、儿茶素、表儿茶素、甲基鞣花酸、二甲基鞣花酸和 ECG；5 种含量下调，包括没食子酸甲酯、没食子酸葡萄糖苷、鞣花酸葡萄糖苷、甲基鞣花酸葡萄糖苷和芦丁。

（3）从碧根果乳酸菌发酵液中筛选出 8 种具有较强 α-葡萄糖苷酶抑制活性的游离酚，包括甲基鞣花酸葡萄糖苷、芦丁、甲基鞣花酸、儿茶素、表儿茶素、鞣花酸、二甲基鞣花酸葡萄苷和 ECG，其中，儿茶素、表儿茶素、甲基鞣花酸和 ECG 含量在乳酸菌发酵后显著增加。这些游离酚与 α-葡萄糖苷酶有较低的结合能和 5 个以上的分子间作为位点，它们与 α-葡萄糖苷酶的活性催化位点中的部分氨基酸残基形成氢键，进而抑制 α-葡萄糖苷酶的活性。芦丁是 α-葡萄糖苷酶潜在的竞争性抑制剂，儿茶素和表儿茶素是非竞争性抑制剂，而筛选出的其他 5 种游离酚为 α-葡萄糖苷酶的混合型抑制剂。

## 参 考 文 献


[1] HOSSAIN U, DAS A K, GHOSH S, et al. An overview on the role of bioactiveα-glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 145: 111738.

[2] RAINA J, FIRDOUS A, SINGH G, et al. Role of polyphenols in the management of diabetic complications[J]. Phytomedicine, 2024, 122: 155155.

[3] 熊能,韦圣,胡忠策. α-葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展和趋势[J]. 发酵科技通讯,2018,47(1): 58-64.
XIONG Neng, WEI Sheng, HU Zhongce. The research progress and trends of α-glucosidase inhibitors[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2018, 47(1): 58-64. (in Chinese)

[4] SWARGIARY A, ROY M K, MAHMUD S. Phenolic compounds as α-glucosidase inhibitors: a docking and molecular dynamics simulation study[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2023, 41(9): 3862-3871.

[5] JAKOBEK L, BLESSO C. Beneficial effects of phenolic compounds: native phenolic compounds vs metabolites and catabolites[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 4: 1-19.

[6] FENG J, KONG F. Enzyme inhibitory activities of phenolic compounds in pecan and the effect on starch digestion[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 220: 117-123.

[7] DELGADILLO-PUGA C, TORRE-VILLALVAZO I, NORIEGA L G, et al. Pecans and its polyphenols prevent obesity, hepatic steatosis and diabetes by reducing dysbiosis, inflammation, and increasing energy expenditure in mice fed a high-fat diet[J]. Nutrients, 2023, 15(11): 2591.

[8] 孙烨. 红外-热风干燥对碧根果品质及贮藏稳定性的影响研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2023.
SUN Ye. Effects of infrared-hot air drying on quality and storage stability of pecans[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2023. (in Chinese)

[9] 高振鹏,宋杨,张美娜,等. 益生菌发酵苹果汁过程中总酚酸变化与动力学研究[J]. 农业机械学报,2019,50(11): 350-356.
GAO Zhenpeng, SONG Yang, ZHANG Meina, et al. Changes and kinetics of total phenolic acids of apple juice fermented by probiotics[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2019, 50(11):350-356. (in Chinese)

[10] DEL RAZOLA-DÍAZ M C, DE MONTIJO-PRIETO S, AZNAR-RAMOS M J, et al. Effect of lactic acid bacteria fermentation on the polar compounds content with antioxidant and antidiabetic activity of avocado seed extracts[J]. Fermentation, 2023, 9(5): 420.

[11] ANKOLEKAR C, PINTO M, GREENE D, et al. Phenolic bioactive modulation by *Lactobacillus acidophilus* mediated fermentation of cherry extracts for anti-diabetic functionality, helicobacter pylori inhibition and probiotic *Bifidobacterium longum* stimulation[J]. Food Biotechnology, 2011, 25(4): 305-335.

[12] LEONARD W, ZHANG P Z, YING D Y, et al. Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods[J]. Biotechnology Advances, 2021, 49: 107763.

[13] 陈海君,马尚智,江敏,等. 超滤亲和-液质联用和分子对接技术筛选毛菊苣根中 α-葡萄糖苷酶抑制剂[J]. 中草药, 2019,50(2):344-451.
CHEN Haijun, MA Shangzhi, JIANG Min, et al. Screening of α-glucosidase inhibitors from roots of *Cichorium glundulosum* by UF-LC-MS and molecular docking[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(2): 344-451. (in Chinese)

[14] PINZI L, RASTELLI G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(18): 4331.

[15] 陈祖德,马博稷,肖岩,等. 基于亲和超滤-液质联用结合相关性分析方法筛选青钱柳提取物中 α-葡萄糖苷酶抑制剂[J]. 食品工业科技, 2024, 45(23): 290-299.
CHEN Zude, MA Boji, XIAO Yan, et al. Screening of α-glucosidase inhibitors in cyclocarya paliurus extracts based on affinity ultrafiltration-liquid chromatography-mass spectrometry combined with correlation analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(23): 290-299. (in Chinese)

[16] HONG Y, LIAO X, CHEN Z. Screening and characterization of potential α-glucosidase inhibitors from *Cercis chinensis* Bunge fruits using ultrafiltration coupled with HPLC-ESI-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131316.

[17] LI S, ZHANG W, WANG R, et al. Screening and identification of natural α-glucosidase and α-amylase inhibitors from partridge tea (*Mallotus furetianus* Muell-Arg) and in silico analysis[J]. Food Chemistry, 2022, 388: 133004.

[18] KHAN S A, LIU L, LAI T, et al. Phenolic profile, free amino acids composition and antioxidant potential of dried longan fermented by lactic acid bacteria[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(12): 4782-4791.

[19] XUE P, LIAO W, CHEN Y, et al. Release characteristic and mechanism of bound polyphenols from insoluble dietary fiber of navel orange peel via mixed solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* [J]. LWT—Food Science and Technology, 2022, 161: 113387.

[20] LI S, WANG R, HU X, et al. Bio-affinity ultra-filtration combined with HPLC-ESI-qTOF-MS/MS for screening potential α-glucosidase inhibitors from *Cerasus humilis* (Bge.) Sok. leaf-tea and in *silico* analysis[J]. Food Chemistry, 2022, 373:

131528
[21] 朱圣庚,徐长法.生物化学(上册)[M]. 4 版.北京：高等教育出版社,2017：259 – 266.
[22] JIA X, LUO H, XU M, et al. Dynamic changes in phenolics and antioxidant capacity during pecan (*Carya illinoinensis*) kernel ripening and its phenolics profiles[J]. Molecules, 2018, 23(2): 435.
[23] GONG Y, PEGG R B. Separation of ellagitannin-rich phenolics from U. S. pecans and Chinese hickory nuts using fused-core HPLC columns and their characterization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(28): 5810 – 5820.
[24] MUÑOZ R, DE LAS RIVAS B, LÓPEZ DE FELIPE F, et al. Biotransformation of phenolics by *Lactobacillus plantarum* in fermented foods[J]. Fermented Foods in Health and Disease Prevention, 2017, 4: 63 – 83.
[25] VALERO-CASES E, NUNCIO-JÁUREGUI N, FRUTOS M J. Influence of fermentation with different lactic acid bacteria and in vitro digestion on the biotransformation of phenolic compounds in fermented pomegranate juices[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(31): 6488 – 6496.
[26] SHEN H, WANG J, AO J, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of active compounds in green walnut husk against α-glucosidase: spectroscopy and molecular docking analyses[J]. LWT, 2022, 172: 114179.
[27] ESPOSITO F, PALA N, CARCELLI M, et al. α-Glucosidase inhibition by green, white and oolong teas: in vitro activity and computational studies[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2023, 38(1): 2236802.
[28] CARDULLO N, MUCCILLI V, PULVIRENTI L, et al. C-glucosidic ellagitannins and galloylated glucoses as potential functional food ingredients with anti-diabetic properties: a study of α-glucosidase and α-amylase inhibition[J]. Food Chemistry, 2020, 313: 126099.
[29] XIE X, CHEN C, FU X. Screening α-glucosidase inhibitors from four edible brown seaweed extracts by ultra-filtration and molecular docking[J]. LWT, 2021, 138: 110654.
[30] 王中江,孙福伟,任双鹤,等. 不同空化射流条件下大豆蛋白-白藜芦醇互作与抗氧化活性研究[J]. 农业机械学报, 2024,55(6):353 – 364.
WANG Zhongjiang, SUN Fuwei, REN Shuanghe, et al. Effect of cavitation jet on interaction and antioxidant activity of soybean protein-resveratrol[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2024, 55(6): 353 – 364. (in Chinese)

(上接第 715 页)

[24] GERVILLIÉ C, BOISARD A, LABBÉ J, et al. Relationship between tin environment of $SnO_2$ nanoparticles and their electrochemical behaviour in a lithium ion battery[J]. Materials Chemistry and Physics, 2020, 257: 123461.
[25] SUNDRAMOORTHY K A, VIJAYALAKSHMI K, ATCHUDAN R, et al. Electrochemical sensing of vitamin C using graphene/poly-thionine composite film modified electrode[J]. Micro and Nanosystems, 2024, 16(1): 57 – 64.
[26] SONG Y, SHA J, WANG C, et al. Bienzyme photoelectrochemical biosensor for the sensitive determination of phosphatidylcholine in vegetable oil[J]. LWT—Food Science and Technology, 2024, 191: 115603.
[27] MAO L, LIU H, YAO L, et al. Construction of a dual-functional CuO/BiOCl heterojunction for high-efficiently photoelectrochemical biosensing and photoelectrocatalytic degradation of aflatoxin B1[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 429: 132297 – 132306.
[28] CHENG W, PAN J, YANG J, et al. A photoelectrochemical aptasensor for thrombin based on the use of carbon quantum dot-sensitized $TiO_2$ and visible-light photoelectrochemical activity[J]. Microchimica Acta, 2018,185(5):1 – 10.
[29] SUN M, ZHAO Q, DU C, et al. Enhanced visible light photocatalytic activity in BiOCl/$SnO_2$: heterojunction of two wide band-gap semiconductors[J]. RSC Advances, 2015, 5(29): 22740 – 22752.
[30] 赵常志, 孔燕云, 何艳艳, 等. 基于对烟酰胺腺嘌呤二核苷酸光致电化学响应的胆汁酸传感器[J]. 应用化学, 2016, 33(1):116 – 122.
ZHAO Changzhi, KONG Yanyun, HE Yanyan, et al. Bile acid sensor based on photoelectrochemical response to nicotinam ide adenine dinucleotide[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2016, 33(1):116 – 122. (in Chinese)
[31] 刘翠玲, 殷莺倩, 张善哲, 等. 花生油中黄曲霉毒素 B1 含量的荧光光谱表征[J]. 农业机械学报, 2023, 54(12): 389 – 396,430.
LIU Cuiling, YIN Yingqian, ZHANG Shanzhe, et al. Characterization of aflatoxin B1 in peanut oil by fluorescence spectrum [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2023, 54(12): 389 – 396,430. (in Chinese)
[32] JI Y, CHEN H, SHI X W. Industrial boiler intelligent monitoring system based on LabVIEW[J]. Journal of Physics: Conference Series, 2023, 2450(1): 012075.