周琬蕊, 黄方鑫, 马哲豪, 等. 阿魏酸与麦麸阿拉伯木聚糖的共价结合对其结构、抗氧化活性和肠道酵解特性的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(14): 54−63. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060110
ZHOU Wanrui, HUANG Fangxin, MA Zhehao, et al. Effects of Covalent Binding of Ferulic Acid to Arabinoxylan from Wheat Bran on Its Structure, Antioxidant Activity, and *in Vitro* Fermentation Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(14): 54−63. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060110

·研究与探讨·

阿魏酸与麦麸阿拉伯木聚糖的共价结合对其结构、抗氧化活性和肠道酵解特性的影响

周琬蕊[1,2], 黄方鑫[1,2], 马哲豪[1,2], 应阳杰[1,2], 周晋宇[1,2], 王静雯[1,2], 郭庆彬[3], 刘　妍[1,2,*]
（1.浙江农林大学森林食物资源挖掘与利用全国重点实验室, 浙江杭州 311300;
2.浙江农林大学食品与健康学院, 浙江杭州 311300;
3.天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457）

摘　要: 为探究阿魏酸（Ferulic Acid，FA）与阿拉伯木聚糖（Arabinoxylan，AX）共价结合后对 AX 结构与生物活性的影响，采用 N,N'-羰基二咪唑（CDI）催化法制备阿拉伯木聚糖-阿魏酸共价复合物，通过福林酚法和离心沉淀法分析 FA 取代度和 AX 溶解度变化，通过酸水解结合 GC-MS 法测定 AX 单糖结构变化，利用 HPSEC-MALLS 系统表征 AX 构象特征变化。同时，以秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*，*C.elegans*）为模型研究复合物抗氧化特性，采用猪结肠消化物的体外发酵实验比较复合物与 FA 和 AX 单体的结肠酵解特性。结果表明，CDI 诱导法使 FA 取代度达到 68.1±0.6 mg FA/g，但会显著降低 AX 溶解度（$P<0.001$）。催化过程中不会破坏 AX 的单糖组成和构象特征，但会造成 AX 的分子降解，使其分子量由 505.9 kDa 降至 51.83 kDa。生物活性分析表明，FA 的共价结合会提高线虫抗氧化活性，使线虫体内超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase，SOD）和过氧化氢酶（Catalase，CAT）活性分别提升 5.2% 和 6.7%，活性氧（Reactive Oxygen Species，ROS）含量降低了 5.7%。FA 的共价结合会部分弱化 AX 的肠道益生活性，但复合物依然具有促进肠道内有益菌 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 增殖、抑制有害菌 *Escherichia-Shigella* 和 *Streptococcus* 增殖的功效。因此，相比于 FA 和 AX 单体，AX-FA 共价复合物兼具抗氧化和肠道益生功能。该研究可为多糖-多酚复合物的制备和产品开发提供参考。

关键词: 阿拉伯木聚糖, 阿魏酸, 共价复合物, 结构, 抗氧化, 体外酵解
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)14−0054−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060110
本文网刊:

Effects of Covalent Binding of Ferulic Acid to Arabinoxylan from Wheat Bran on Its Structure, Antioxidant Activity, and *in Vitro* Fermentation Properties

ZHOU Wanrui[1,2], HUANG Fangxin[1,2], MA Zhehao[1,2], YING Yangjie[1,2], ZHOU Jinyu[1,2], WANG Jingwen[1,2], GUO Qingbin[3], LIU Yan[1,2,*]
（1.National Key Laboratory of Forest Food Resource Mining and Utilization, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China;
2.College of Food and Health, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China;
3.College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China）

Abstract: This study investigated the effects of covalent binding of ferulic acid (FA) on the structure and bioactivity of ara-

收稿日期: 2025−06−11
基金项目: 国家自然科学基金项目（C 类）（22508364）; 浙江农林大学科研发展基金（2024LFR022）; 江省大学生科技活动计划暨新苗人才计划资助项目（2024R412A034）。
作者简介: 周琬蕊（2004−）, 女, 本科, 研究方向: 食源性多糖结构与功能, E-mail: id_08061696@qq.com。
*** 通信作者:** 刘妍（1992−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食源性多糖结构与功能, E-mail: liuyan19946006@163.com。

binoxylan (AX). The AX-FA conjugates were prepared using the N,N'-carbonyldiimidazole (CDI) catalysis method. The degree of FA substitution and AX solubility were measured by the Folin-Ciocalteu method and centrifugal precipitation, respectively. The monosaccharide composition of AX was analyzed via acid hydrolysis combined with GC-MS, while its conformational changes were characterized by HPSEC-MALLS. Antioxidant activity was assessed in *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), and intestinal fermentation characteristics were evaluated using an *in vitro* pig colon digesta model. The results showed that the CDI method achieved a FA substitution degree of 68.1±0.6 mg FA/g, while significantly decreased the solubility of AX (P<0.001). The catalysis process did not alter the monosaccharide composition and the conformation of AX, but caused molecular degradation, reducing its molecular weight from 505.9 kDa to 51.83 kDa. Bioactivity analysis indicated that FA binding enhanced the antioxidant activity of AX in *C. elegans*, increasing the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) by 5.2% and 6.7%, respectively, and reducing reactive oxygen species (ROS) levels by 5.7%. Although FA covalent binding partially weakened AX's intestinal health benefits, the AX-FA complex still promoted the growth of beneficial gut bacteria, including *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, while inhibiting harmful bacteria such as *Escherichia-Shigella* and *Streptococcus*. Thus, compared to FA and AX monomers, the AX-FA covalent complex possesses both antioxidant and probiotic properties. This study provides valuable insights for the preparation and application of polysaccharide-polyphenol conjugates in product development.

Key words: arabinoxylan; ferulic acid; covalent complex; structure; antioxidant; *in vitro* fermentation

近年来，多糖-多酚共价复合物由于其广泛的降血糖、抗癌、抗菌、抗炎、肠道益生活性等已成为研究热点[1]。其中，麦麸中的阿拉伯木聚糖（AX）-阿魏酸（FA）是多糖-酚酸共价复合物的典型代表[1]。AX 约占麸皮干重的 10%~26%，是由吡喃木糖通过 β-1,4 糖苷键连接成主链，呋喃阿拉伯糖通过 C(O)-2、C(O)-3 或 C(O)-2,3 连接于木糖而构成的中性多糖[2]。阿魏酸（Ferulic Acid, FA）是麦麸中含量最高的膳食多酚，研究显示，超过 90% 的阿魏酸通过酯键或醚键与细胞壁中的阿拉伯木聚糖相连，形成 AX-FA 共价复合物（图 1）[3]。近年来，麦麸 AX 中结合态多酚对其功能活性的影响已逐渐被报道，例如，报道了结合态阿魏酸可提升 AX 在调节Ⅱ型糖尿病大鼠餐后血糖、胰岛素抵抗等方面的生理功能[4]。因此，随着 AX 在 2024 年获批“三新食品”原料，对于 FA-AX 共价复合物的提取制备逐渐受到关注。

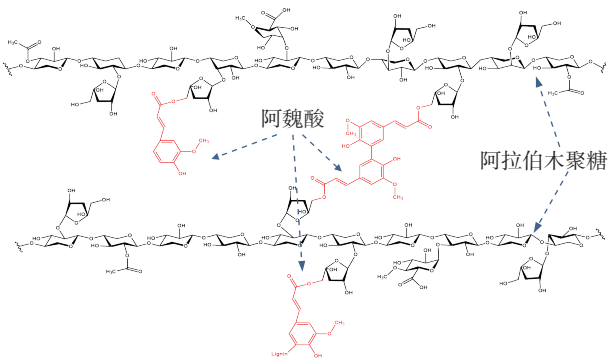


图 1　麦麸中天然 AX-FA 共价复合物

Fig.1　Natural AX-FA covalent complex in wheat bran

由于 AX 在麦麸中与纤维素等成分结合紧密，常采用碱提法进行提取分离。碱处理过程会大量破坏 AX 与 FA 共价结合的酯键，导致 FA 的大量流失，据报道，碱提取 AX 几乎不含有共价结合的 FA[5]。利用生物酶法提取 AX 可部分保留其中的 FA，但是，相比于碱提法，酶提取法依然存在提取率低等问题[6]。近年来，研究人员开发了不同物理、化学法制备多糖-多酚复合物。其中 N,N'-羰基二咪唑（CDI）催化法由于其高效、简便等优点被广泛用于多糖与多酚的接枝反应[1,7]。目前，多数研究仍集中于对复合物生物活性的研究。而对于共价结合反应是否会影响多糖的结构与构象等分子特征鲜有报道，以及复合物的生物活性是否与反应过程中多糖结构改变是否有关也尚为未知。

因此，本研究采用 CDI 催化法制备 AX-FA 共价复合物，分析反应过程中 AX 的分子量、单糖组成、构象特征变化。并选择 FA 单体显著的抗氧化性和 AX 单体显著的肠道益生活性为代表，分析 FA 的共价结合对 AX 生物活性的影响，以期为 AX-FA 共价复合物的制备和应用方向提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

麦麸　购自三门峡中普小麦科技有限公司；阿魏酸（FA）　购自北京太阳生物科技有限公司，纯度 99%；CDI　购自南京蓝碧安生化科技有限公司，纯度 99%；混合脂肪酸标准品、二乙基丁酸　购自 Sigma-Aldrich 公司；单糖标准品（甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、木糖）、菊粉　购自北京索莱宝科技有限公司；N2 野生型秀丽隐杆线虫　天津科技大学保存；SOD 活性测定试剂盒、CAT 活性测定试剂盒、ROS 水平测定试剂盒　购自上海碧云天生物技术有限公司；猪结肠内容物　取自市场体重在 100~120 kg 之间的长白猪（5 个月龄左右）　天津市广华肉类有限公司；其余试剂均为分析纯。

Infinite M200 PRO 型酶标仪　瑞士 Tecan 公司；J-26XP 型台式高速冷冻离心机；CV100-DNA 型真空浓缩仪　北京吉艾姆仪器有限公司；美国 Beckman Coulter 公司；6890N 型气相色谱质谱联用仪　美国 Agilent 公司；GC2010 Plus 型热脱附气相色谱仪　日本岛津公司；安捷伦 1260 Infinity II HPLC 系

统　美国 Wyatt 公司; YOX-Ⅱ型厌氧培养箱　上海新苗医疗器械制造有限公司; LS-B50L 型立式压力蒸汽灭菌锅　上海博讯实业有限公司医疗设备厂; HNY 型恒温振荡培养箱　天津市欧诺仪器仪表有限公司; FLX800 型荧光酶标仪　美国 Bio Tek 公司; JY92-IIN 型超声波细胞破碎仪　宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　AX 的提取及化学组成分析　采用碱提法从麦麸中提取 AX[8], 采用苯酚硫酸法测定 AX 的总糖含量[9], 采用间羟基联苯法测定 AX 糖醛酸含量[10], 采用 BCA 法测定 AX 蛋白含量[11]。以没食子酸为标准品, 采用福林-酚法测定 AX 中酚类化合物质量分数[12]。

1.2.2　AX-FA 共价复合物的制备

1.2.2.1　FA 的激活　将相同质量的 FA(4、8、12 mg)和 CDI(4、8、12 mg)共同溶解在 20 mL DMSO 中, 在 N_2 氛围保护下于 60 ℃ 搅拌 16 h, 将只加入 4 mg FA, 不加入 CDI 的样品作为空白对照组 1, 将不加入 FA 只加入 4 mg CDI 的样品作为空白对照组 2。

1.2.2.2　FA 与 AX 共价结合　将 1.0 g AX 溶解在 60 mL 无水 DMSO 中, 缓慢加入 1.2.2.1 中激活的 FA 溶液, 60 ℃ 连续搅拌 6 h。用 4 倍体积的无水乙醇中反复沉淀 5 次, 沉淀物复溶在 100 mL 去离子水中, 并用截留分子量为 3500 Da 的透析袋透析 48 h, 去除未反应的 FA、CDI 和中间产物咪唑, 冻干后得到 AX 和 FA 共价结合物, 命名为 AX-FAL、AX-FAM、AX-FAH、空白-1 和空白-2。

1.2.3　取代度(DS)的测定　采用福林-酚法测定 FA 在 AX 分子中的取代度[12]。将 3 mg 样品溶解于 1 mL DMSO 溶液中。取 50 μL 样品溶液与 1 mL 去离子水和 375 μL Folin-Ciocalteu 试剂混合, 在 30 ℃ 下避光反应 5 min, 随后加入 375 μL 的 Na_2CO_3 (7%), 混合物避光静置 2 h, 使用酶标仪测定 760 nm 处的吸光度。以不同浓度的阿魏酸为标准品绘制标准曲线。取代度以每克复合物中阿魏酸当量毫克表示(mg FA/g)。

1.2.4　溶解度(SI)的测定　将 100 mg 样品溶解于 10 mL 去离子水中, 在 25 ℃ 下搅拌 5 h。以 12000×g 的离心速率离心 25 min。上清液经过冷冻干燥并称重。样品溶解度根据以下公式进行计算[8]:

$$SI(\%) = \frac{W_i - W_p}{W_i} \times 100$$

式中: SI 表示溶解度, %; w_i 表示样品总重量, mg; w_p 表示沉淀重量, mg。

1.2.5　单糖组成测定　称取 1 mg 样品, 加入 1 mL 浓度为 2 mol/L 的三氟乙酸(Trifluoroacetic Acid, TFA), 在 120 ℃ 下水解 2 h。利用真空浓缩仪于 50 ℃ 干燥水解物。干燥水解物中加入 0.5 mL 甲醇后 N_2 吹干, 重复 3 次以去完全去除 TFA。随后加入 5 mg 盐酸羟胺、1 mg 肌醇和 0.5 mL 吡啶, 90 ℃ 反应 0.5 h, 室温冷却后加入 0.5 mL 醋酸酐, 90 ℃ 反应 0.5 h 后 N_2 吹干, 得到 AX 及 AX-FA 共价复合物的糖晴乙酸酯衍生物。衍生物溶解于 1 mL CH_2Cl_2 中, 使用气相色谱质谱联用仪进行检测, 采用 5% 苯甲基硅烷氧烷毛细管色谱柱, 火焰离子检测器(FID), 色谱柱升温程序: 120 ℃ 保持 3 min, 以 3 ℃/min 速度升温至 210 ℃, 210 ℃ 再保持 4 min。色谱柱流速 1.0 mL/min, 进样口温度 280 ℃, 进样体积 1.0 μL, 氦气、氢气和空气流速分别为 25、30、400 mL/min。称取标准单糖(鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖)1.5 mg, 同样进行糖晴乙酸酯衍生化, 过膜后分别取 0.45 mL 鼠李糖、0.3 mL 阿拉伯糖、0.15 mL 木糖、0.45 mL 甘露糖、0.3 mL 葡萄糖、0.15 mL 半乳糖加入其中混匀, 形成混合标准单糖简称混标, 用于气相色谱分析[9]。

1.2.6　分子量分布和分子链构象测定　采用安捷伦 1260 Infinity II HPLC 系统分析样品的分子质量与构象参数。检测器包括: 多角度激光光散射检测器(DAWN HELEOS-II, MALLS)、差压粘度计检测器(ViscoStar III, DP)和示差折射率检测器(Optilab T-Rex, RI)。色谱条件为: OHpak SB-803 HQ 柱(8.0 mm×300 mm)和 OHpak SB-805 HQ 柱(8 mm×300 mm)串联, 进样体积 100 μL, 流动相为 0.2 mol/L $NaNO_3$。采用流动相配制样品溶液, 浓度为 2.0 mg/mL, 过 0.22 μm 水系滤膜进行测定。使用 ASTRA 7.1.3 软件进行数据分析, dn/dc 值为 0.146 mL/g, Mw、Mn、Rg 和 Rh 均由软件计算[8]。

1.2.7　抗氧化活性测定

1.2.7.1　秀丽隐杆线虫同期化和培养　将仅含有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基的线虫作为对照组, 将 AX、FA 和 AX-FAM 与大肠杆菌 OP50 混合后加入 NGM 培养基, 使样品终浓度为 1 mg/mL, 添加各样品培养的线虫作为给药组。每组线虫在 20 ℃ 培养箱中进行培养至 L4 期[13]。

1.2.7.2　线虫体内抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性测定　随机选择 L4 期同步线虫, 使用 M9 缓冲液收集并清洗线虫 3 次, 使用细胞破碎仪制备裂解液, 按照试剂盒说明书测定裂解液中 SOD 和 CAT 活性[13]。

1.2.7.3　线虫体内活性氧(ROS)水平测定　随机挑取同期化 L4 期线虫, 转移到含有 1 mg/mL AX、FA 和 AX-FAM 的 NMG 平板培养上于 20 ℃ 培养 72 h 后, 首先转移到 30 ℃ 培养 30 min, 再转移到 35 ℃ 培养 4 h, 恢复 20 ℃ 培养 30 min 后收集线虫。使用 M9 缓冲液收集并清洗线虫 3 次, 使用细胞破碎仪制备裂解液。裂解液中加入 50 μL 浓度为 100 μmol/L 的 DCFH-DA 溶液在 20 ℃ 下黑暗孵育 2 h, 通过荧光酶标仪进行检测(激发波长为 485 nm, 发射波长

为 530 nm)[13]。

1.2.8　体外模拟发酵实验

1.2.8.1　AX、FA 及复合物的体外发酵　参照 Ding 等[14] 的方法配制不含碳源的厌氧培养基。称取 0.02 g AX、FA 或 AX-FAM 样品，60 ℃ 加热搅拌溶解于 2 mL 厌氧培养基中，在厌氧培养箱中(80% N_2，10% CO_2 和 10% H_2)称取 0.2 g 猪结肠内容物，与含有样品的厌氧培养基混合，将猪结肠内容物与培养基的混合物作为空白对照组。将各组混合物置于 37 ℃，于 250 r/min 的振荡摇床中进行厌氧酵解。在培养的 0、6、12 和 24 h 取样，于 11000 r/min 4 ℃ 离心 10 min，上清液过 0.22 μm 水系膜过滤后用于短链脂肪酸(Short Chain Fatty Acids, SCFAs)测定，沉淀用于肠道菌群测定[15]。

1.2.8.2　SCFAs 含量测定　采用热脱附气相色谱仪测定 SCFAs 含量。色谱条件为：Nukol™熔融硅毛细管柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm)色谱柱，注射体积为 1 μL；注射温度为 200 ℃，检测器温度为 250 ℃，H_2 流量为 40 mL/min，气流速率为 400 mL/min。以二乙基丁酸作为内标(0.5 μL)。采用乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸、庚酸混合标准品，绘制标准曲线[15]。

1.2.9　猪结肠内容物肠道菌群分析　将不同发酵时间点的猪结肠内容物离保存至−80 ℃ 冰箱，肠道菌群分析由百迈克生物科技有限公司(北京，中国)完成。

1.2.9.1　基因组 DNA 的提取　使用 CTAB 法从样品中提取基因组 DNA，随后通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。取适量样品、使用无菌水将其稀释至 1 ng/μL。

1.2.9.2　PCR 扩增　以稀释后的基因组 DNA 为模板，根据目标测序区域选择特异性引物(带 Barcode)，使用 New England Biolabs 提供的 Phusion®高保真度 PCR 酶及 GC Buffer 预混液进行扩增。反应体系及程序见表 1，程序设置为：98 ℃，预变性 1 min；30 个循环(98 ℃，10 s；50 ℃，30 s；72 ℃，30 s)；最后在 72 ℃ 下延伸 5 min。

表 1　PCR 反应体系
Table 1　Reaction system of PCR

PCR反应体系	30 μL体系
Phusion Master Mix(2×)	15 μL
Primer (2 μmol/L)	3 μL
gDNA (1 ng/μL)	10 μL
H_2O	2 μL

1.2.9.3　PCR 产物的混样与纯化　根据 PCR 产物的浓度，等量混合各样本的 PCR 产物。混合均匀后，使用 1×TAE 缓冲液准备 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳纯化，随后利用 Thermo Scientific 的 GeneJET 凝胶回收试剂盒进行 PCR 产物的回收。

1.2.9.4　文库构建与测序　文库构建采用 Thermo Fisher 提供的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 试剂盒，构建完成后，使用 Qubit 进行文库定量检测，确保其质量合格后，采用 IonS5™ XL 平台进行测序。有效数据经过 OTUs(操作分类单元)聚类、物种分类、群落结构统计分析(包括多样性指数、PCoA 和 PCA 等统计方法)。

1.3　数据处理

采用 SPSS 24.0 软件进行数据统计分析，所有实验均进行 3 次独立重复，结果以均数±标准差表示，单因素方差分析数据的显著性差异，不同字母表示具有显著性差异(P<0.05)。

2　结果与分析

2.1　AX 的化学组成及单糖组成分析

如图 2 所示，根据各标准曲线，计算 AX 中各化学组成含量，结果表明，碱提 AX 总糖含量为 86.13±5.36 g/100 g，不含有糖醛酸，蛋白质含量为 2.61±0.06 g/100 g，酚类化合物含量为 0.34±0.03 g/100 g，单糖组成分析结果表明，AX 主要由阿拉伯糖(52.3%)和木糖(47.7%)组成，并且阿拉伯糖含量较高，表明 AX 的支链度较高，有利于其在水溶液中的溶解[16]。这与 Liu 等[9] 报道的结果一致，也表明本研究中所采用的碱提取法可获得较高纯度的 AX。

2.2　AX-FA 共价复合物的制备及理化性质分析

2.2.1　DS 和 SI 测定结果　根据标准曲线可计算阿魏酸的取代度(图 3)，如表 2 所示，随着 FA 和 CDI 添加量的增加，AX 分子中 FA 的取代度逐渐增加。对于空白组-1，当不添加 CDI 时，未检测到反应体系中 FA 的存在，这表明在本研究所采用的 CDI 介导的共价结合反应条件下，FA 无法通过非共价作用力(范德华力、静电相互作用、氢键和配位作用等)物理吸附于 AX 中，也表明在共价反应过程中，通过醇沉和透析处理未结合的 FA 几乎被完全去除[1]。但是，随着 FA 取代度的增加，AX 分子中大量的氢键被共价结合的 FA 占用，导致其溶解度急剧降低，当 FA 的结合量达到 68.1±0.6 mg FA/g 时，复合物(AX-FAH)的溶解度仅为 6.2%，这与 Liu 等[8] 的报

表 2　AX 及 AX-FA 共价复合物的取代度(DS)和溶解度(SI)
Table 2　Degree of substitution (DS) and solubility index (SI) values of native and AX-FA conjugates

样品	DS(mg FA/g)	SI(%)
AX	−	90.2±1.21^a
空白-1	N.D.	87.4±2.23^b
空白-2	N.D.	89.4±0.91^a
AX-FAL	20.1±0.3^c	83.4±0.45^c
AX-FAM	59.8±0.4^b	76.2±0.35^d
AX-FAH	68.1±0.6^a	6.2±0.45^e

注：同列不同小写字母表示差异具有显著性(P< 0.05)；“−”表示未测定，N.D.(Not Detected)表示未检测到。

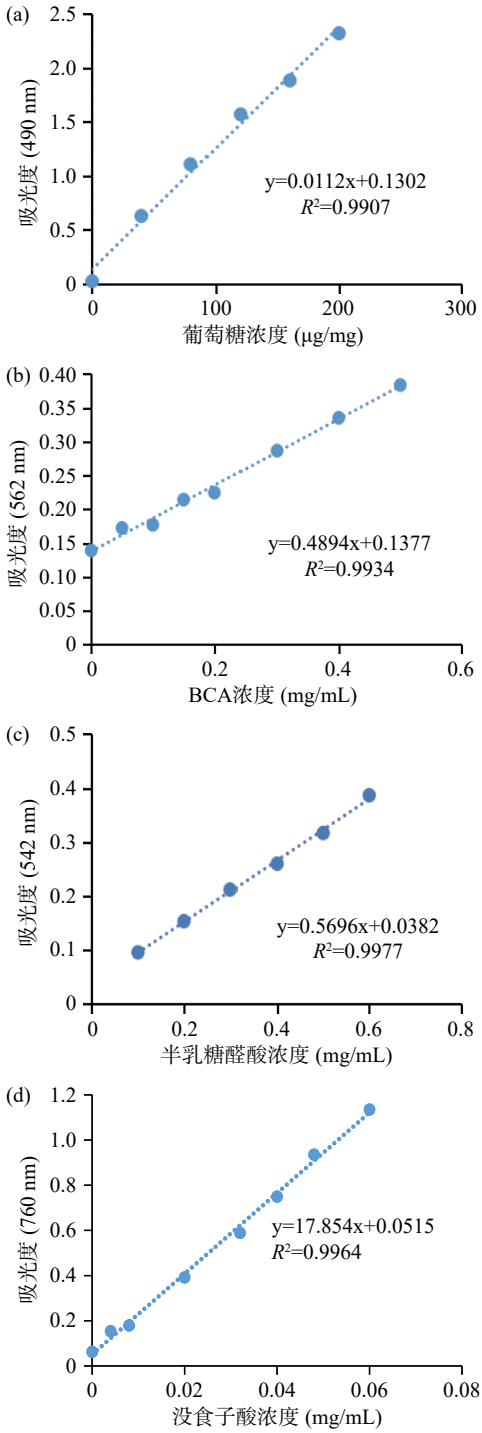


图 2 总糖含量(a)、蛋白含量(b)、糖醛酸含量(c)和酚类化合物含量(d)的标准曲线

Fig.2 Standard curves of total sugar content (a), protein content (b), uronic acid content (c), and phenolic compounds content (d)

道结果一致，当 AX 的羟基被一些溶解度较低的小分子化合物共价结合所取代后，会导致 AX 的溶解度显著降低。

2.3 AX-FA 共价复合物的结构表征

2.3.1 单糖组成分析 如表 3 所示，AX 及 AX-FA 共价复合物均由阿拉伯糖和木糖组成。与 AX 相比，在共价结合 FA 反应后，AX 的单糖组成并未发生明显变化，这表明 CDI 介导的共价结合反应依然

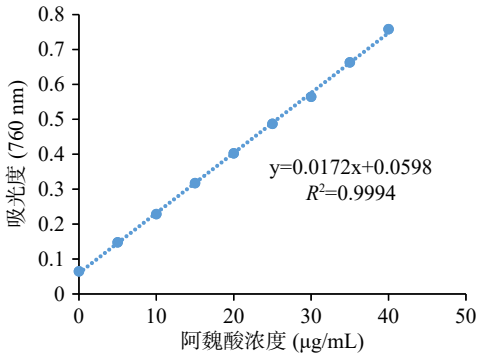


图 3 阿魏酸含量标准曲线

Fig.3 Standard curve of ferulic acid content

表 3 AX 及 AX-FA 共价复合物的单糖组成

Table 3 Monosaccharide composition of AX and AX-FA covalent complexes

样品	单糖(mol%)	
	Xyl	Ara
AX	52.3	47.7
空白-1	51.6	48.4
空白-2	52.0	48.0
AX-FAL	51.2	48.8
AX-FAM	51.2	48.8
AX-FAH	52.9	47.1

可以保持 AX 分子基本结构单元，与 Wen 等[17] 的研究结果一致。Yong 等[18] 的研究表明，此类共价结合反应不会改变淀粉的分子结构。Guo 等[19] 的研究结果也证实，在 AX 与和儿茶素的共价结合过程中，并未改变 AX 的单糖组成。这进一步证明了 CDI 介导的亲核反应可用于多糖、多酚共价复合物的制备。

2.3.2 AX 分子量分布与链构象变化 利用多检测器凝胶排阻色谱系统(SEC-MALL)对 AX 及其共价复合物的绝对分子量(Mw)、均方根旋转半径(Rg)、流体力学半径(Rh)等参数进行测定。由于 FA 的共价结合量过高导致样品 AX-FAH 几乎不溶，因此无法通过 SEC-MALL 系统表征其结构性质。图 4 为 SEC-MALL 系统中 RI 和 UV 检测器检出的样品(AX, AX-FAL 和 AX-FAM)原始淋出曲线。通过样品的光散射检测器(Light Scattering Detector, LS)和示差折光检测器(Refractive Index Detector, RI)检测曲线可知，AX 分子量呈多分散分布，经过共价结合反应后，AX 的分子量降低，可能是由于反应体系中存在过量的 CDI，其分子中的亲核氮原子攻击 AX 主链糖苷键上的氧原子，导致 AX 主链断裂，引起其分子量显著下降，且随着 CDI 添加的增加，AX 的分子降解越剧烈，在壳聚糖与原花青素复合物的制备中也报道了这一现象[20]。此外，Rgz 与 Rhz 的比值 ρ 可反映多糖的构象特性。通常，当 ρ>2 时，分子为刚性圆筒状构象，1.5<ρ<1.8 时，为线性柔性链，1.0<ρ<1.1 时，分子为松散的高支化聚合物，ρ=0.778 时，分子为紧密的球状构象[15]。由表 4 可知，AX 及其与 FA 的共价复合物的 ρ 值均接近 1，因此均接近松

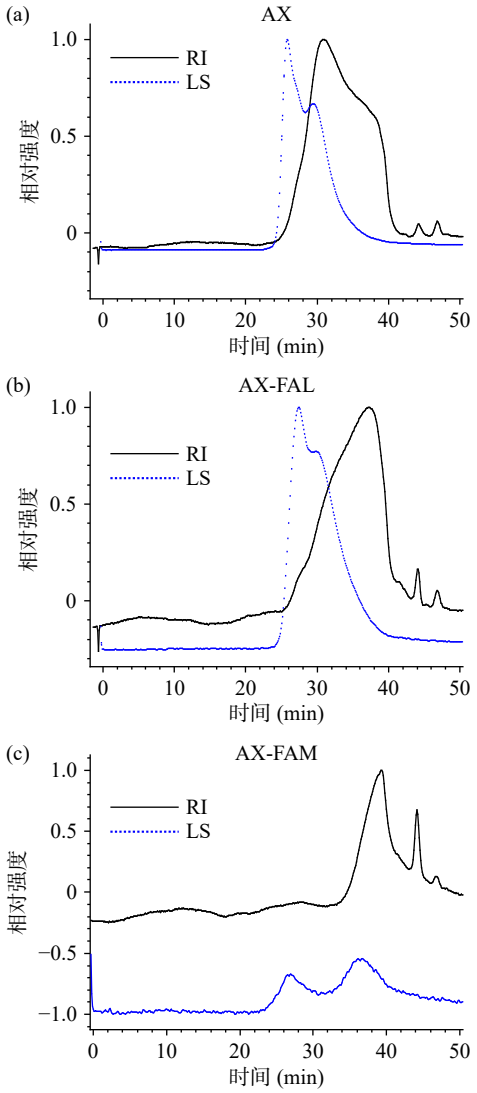


图 4　AX 与 AX-FA 共价复合物在高效凝胶渗透色谱仪的激光光散射检测器(LS)(检测角度 90°)和折光检测器(RI)中的洗脱曲线

Fig.4　Elution files of AX and AX-FA conjugates from LS and RI from HPSEC-MALLS system (detection angle 90°)

注：(a)AX；(b)AX-FAL；(c)AX-FAM。

表 4　在 HPSEC-MALLS-RI-UV 系统中直接测得的 AX 与 AX-FA 共价复合物的结构参数

Table 4　Macromolecular and conformational characterisations of AX and AX-FA conjugates by using HPSEC-MALLS system

参数	AX-peak1	AX-peak2	AX-FAL	AX-FAM
Mn(kDa)	226.5	57.63	65.26	33.83
Mw(kDa)	505.9	66.09	130.3	51.83
Rg	31.6	39.2	32.4	21.8
Rh	32	38.6	32.1	21.9
ρ=(Rg/Rh)	0.99	1.01	1.01	1.00

散的高支化聚合物构象，表明虽然 AX 分子被部分降解，但其高级结构未发生显著变化。

2.4　AX 及 AX-FA 共价复合物对线虫抗氧化能力的影响

在生理条件下，细胞内的抗氧化酶如 SOD 和 CAT，可以消除 ROS，从而在细胞的抗氧化应激防御中发挥不可或缺的作用。SOD 是催化超氧阴离子歧化最重要的酶之一，超氧阴离子是 ROS 的主要来源，SOD 可以将高活性的超氧阴离子转化为过氧化氢，CAT 可以将过氧化氢转化为水。因此，这些抗氧化酶可以减轻 ROS 的毒性作用[13]。

FA 是谷物、蔬菜和水果中广泛存在的酚类化合物，以其强大的抗氧化特性著称[21]，因此，在线虫模型中初步测定了 FA 单体、AX 单体及 AX-FA 共价复合物的抗氧化活性。由于 AX-FAM 具有较高的 FA 结合量及较高的溶解性，因此，选择 AX-FAM 与 AX 和 FA 单体进行抗氧化特性的比较。AX、AX-FAM 和 FA 对线虫 SOD 和 CAT 活性的影响如图 5。在给药量为 1.00 mg/mL 时，FA 的抗氧化活性最强。与空白组相比，各样品干预组线虫的 SOD 活性分别提高了 2.6%、5.2% 和 16.0%，CAT 活性分别增加了 1.2%、6.7% 和 23.7%。AX 可显著提高线虫 SOD

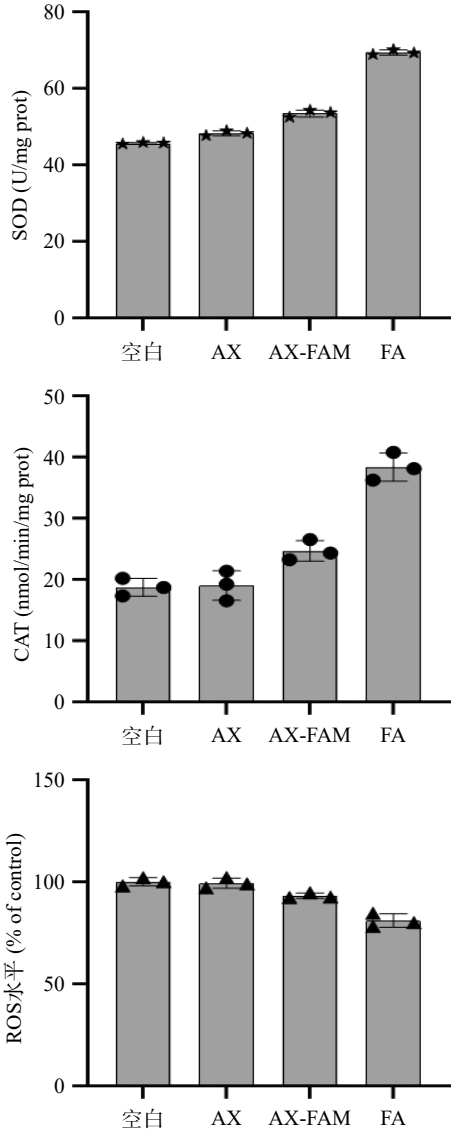


图 5　AX、AX-FAM 和 FA 处理对线虫体内 SOD、CAT 活性及 ROS 水平的影响

Fig.5　SOD, CAT activity and relative levels of ROS in *C. elegans* following the treatment with AX, AX-FAM, and FA

活性(P<0.05)。在共价结合 FA 后,AX 的抗氧化能力显著提高(P<0.05),这表明共价结合的 FA 依然具有抗氧化活性。Rui 等[22] 的研究也报道了共价结合绿原酸后,可提高壳聚糖的抗氧化活性。但与 FA 单体相比,复合物的抗氧化活性较弱,这是由于其分子中 FA 结合量有限所致。此外,为了评估样品的抗氧化特性是否反映在 ROS 水平的减少上,在热应激诱导 ROS 水平升高线虫模型中测量了其细胞内 ROS 水平。如图 5 所示,与对照组相比,AX-FAM 和 FA 干预的线虫体内 ROS 水平分别降低了 5.7% 和 20.7%,这可能归因于抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性的升高。

2.5 AX 及 AX-FA 共价复合物的体外肠道酵解特性分析

2.5.1 酵解过程中 SCFAs 的测定 作为谷物中主要的可溶性膳食纤维,AX 具有调节肠道菌群,促进菌群有益代谢产物 SCFAs 产生的功效。采用猪结肠消化物的体外发酵实验比较了 AX-FAM 与 AX 和 FA 单体的结肠酵解特性。乙酸、丙酸、丁酸是机体肠道菌群利用肠道碳水化合物所产生的主要 SCFAs,广泛参与机体的生理生化反应。不同 SCFA 的生理功能不同,例如,乙酸的产量最高,可促进乳酸菌、双歧杆菌等的增殖[23];丙酸可以提高机体胰岛素敏感性[24];丁酸是肠上皮细胞的主要能量来源[25]。

根据表 5 中的标准曲线计算各 SCFA 含量。如图 6 所示,在培养的 24 h 内,随着培养时间的增加,各组乙酸、丙酸、丁酸和总 SCFAs 含量均显著增加(P<0.05),表明肠道微生物在持续利用结肠内容物中残留和添加的碳水化合物。培养 24 h 后,与空白组相比,AX 可显著促进乙酸(12.00±6.13 mmol/L)、丙酸(6.92±1.75 mmol/L)、丁酸(2.93±0.87 mmol/L)和总 SCFAs(27.75±1.00 mmol/L)的产生,AX-FAM 可显著促进乙酸(7.38±0.75 mmol/L)、丁酸(2.47±0.30 mmol/L)和总 SCFAs(22.00±1.75 mmol/L)的产生,而 FA 组与空白组无显著差异。这表明 AX 具有良好的益生活性,而 FA 不利于菌群 SCFAs 的产生,这可能与酚类化合物普遍具有的抑菌特性有关。与

表 5 混合酸标准品中短链脂肪酸的标准曲线

Table 5 Standard curve of short-chain fatty acid in mixed acid standards

短链脂肪酸	标准曲线	决定系数R^2
乙酸	y=0.2716x+0.0012	0.9960
丙酸	y=0.4417x+0.0075	0.9945
异丁酸	y=0.5513x−0.026	0.9931
丁酸	y=0.5549x+0.0096	0.9964
异戊酸	y=0.7021x−0.0184	0.9966
戊酸	y=0.7365x−0.0431	0.9916
异己酸	y=0.7384x−0.005	0.9968
己酸	y=0.7405x−0.0287	0.9955
庚酸	y=0.6072x−0.0081	0.9933

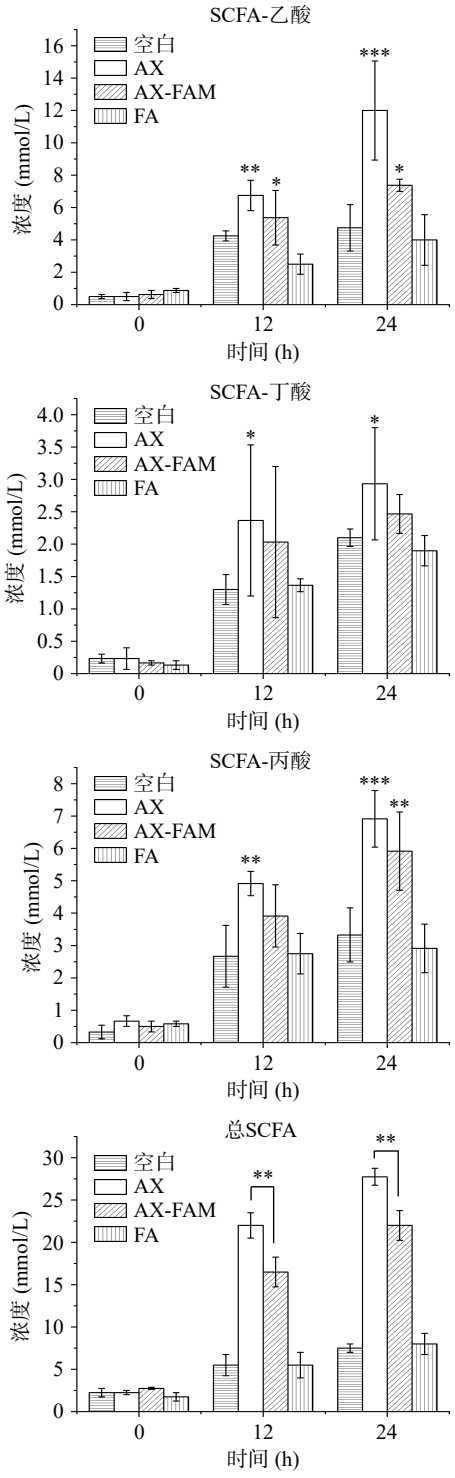


图 6 不同多糖样品组体外发酵过程中不同时间点短链脂肪酸的(SCFAs)变化

Fig.6 Changes in short chain fatty acids (SCFAs) at different time points during in vitro fermentation of different polysaccharide sample group

注:*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001;图 A~图 C 为与空白组相比,其他组的显著性情况,图 D 为与 AX 组相比,AX-FAM 组的显著性情况。

AX 相比,AX-FAM 组的乙酸(7.38±0.75 mmol/L)、丙酸(5.92±2.42 mmol/L)、丁酸(2.47±0.30 mmol/L)和总 SCFAs(22.00±1.75 mmol/L)均降低,这也表明在共价复合物中,FA 依然具有一定的抑菌特性,会

降低 AX 在肠道微生物的酵解速率。即使 AX 的分子降解被证实可以提高其作为益生元的肠道益生活性，但依然无法弥补 FA 的削弱作用。Guo 等[19] 也报道了相似的结论，在与儿茶素共价结合后，会减缓 AX 在结肠内的酵解速率，降低肠道微生物产 SCFAs 能力。

2.5.2　酵解过程中肠道微生物的测定　由图 6 可知，体外培养的 24 h，各组短链脂肪酸含量最高，代表此时微生物活跃度较高，因此选择此时间点对肠道微生物进行 16S rDNA 基因高通量测序，分析 AX、FA 和 AX-FAM 对肠道微生物群落组成和分布结构的影响，并以菊粉作为阳性对照，以初始猪结肠内容物作为空白对照。

2.5.2.1　肠道菌群的 α-多样性和 β-多样性　图 7(a)~图 7(d)为 AX、FA、AX-FAM、菊粉和对照实验组发酵样品中菌体群落 α-多样性指数，包括 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数。α-多样性分析可以表明肠道微生物的多样性和丰富度，其中，Simpson 指数和 Shannon 指数代表群落的多样性和均匀性，Chao1 指数和 ACE 指数代表群落的丰富度。Chao1 指数和 ACE 指数越高，物种丰富度越高；Shannon 指数越高，Simpson 指数越低，代表物种多样性越高[15]。如图 7 所示，与空白组相比，AX、FA 和 AX-FAM 均显著降低了肠道微生物的多样性和丰富度。β-多样性表示样本微生物群落组成的相似性或差异性，可通过主成分分析(PCA)可视化。如图 7(e)所示，在 PCA 分析中，AX 组与 AX-FAM 组距离较近且有重叠，FA 组与空白组距离较近且有重叠，表明 AX 与 AX-FAM 具有相似的菌群结构，而 FA 组与空白组具有相似的菌群结构。

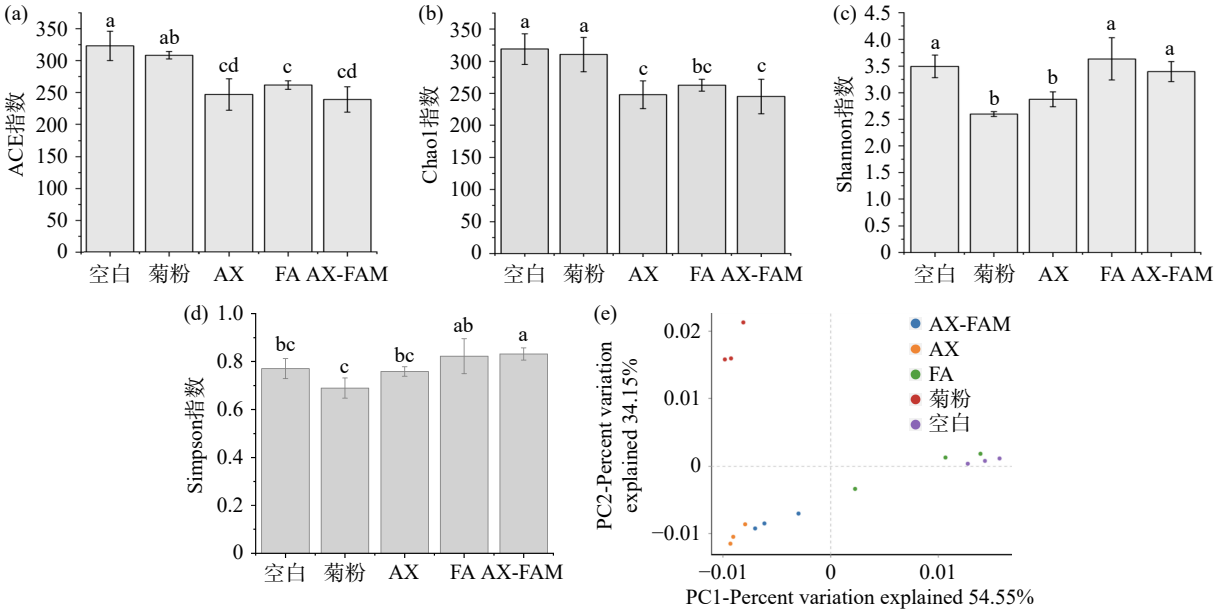
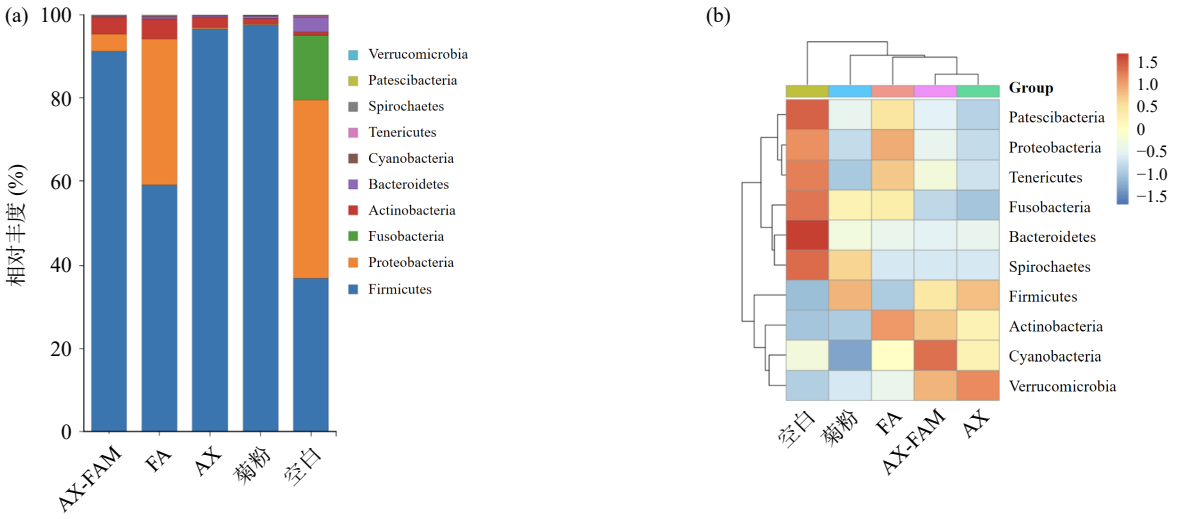


图 7　不同样品组体外发酵 24 h 后肠道菌群的 α-多样性指数(a~d)和 β-多样性指数的 PCA 评分二维图(e)

Fig.7　α-Diversity index (a~d) and β-diversity index PCA score plot (e) of gut microbiota after 24 h *in vitro* fermentation of different sample groups

注：不同小写字母表示数据差异显著，P<0.05。



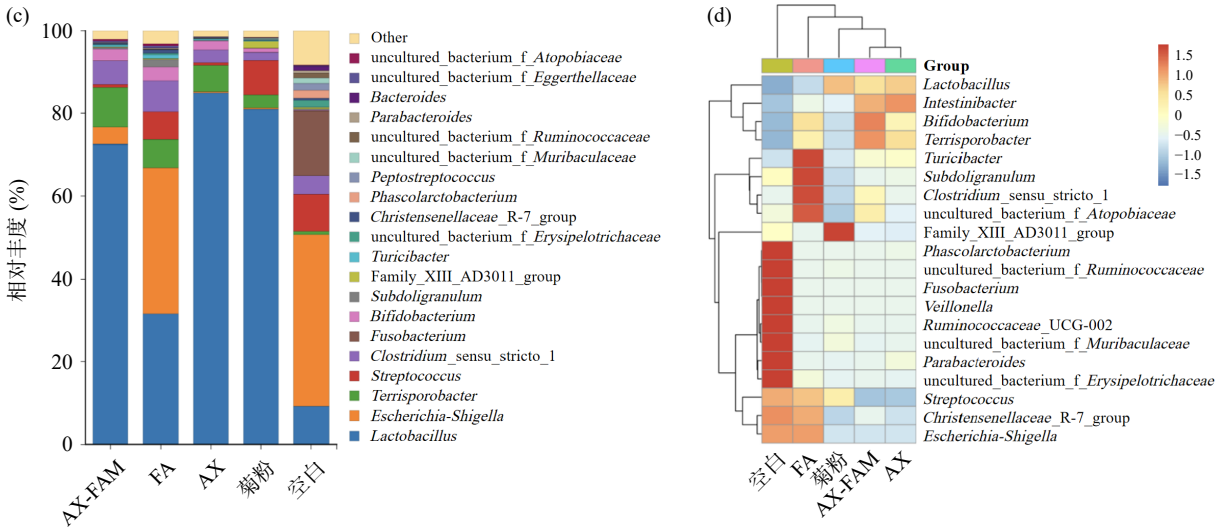


图 8 发酵 24 h 后肠道菌群在门水平(a, b)和属水平(c, d)的组成

Fig.8 Composition of gut microbiota at phylum level (a, b) and the genus level (c, d) after 24 hours of fermentation

2.5.2.2 肠道菌群物种相对丰度 由图 8 可知, 在门水平上, 猪结肠内容物主要由厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、梭状芽胞杆菌门(Fusobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)组成。与空白组相比, AX、FA 和菊粉都可促进 Firmicutes 和 Actinobacteria 的增殖, 抑制 Proteobacteria、Fusobacteria、Bacteroides 的增殖, 但 AX 和菊粉的作用远高于 FA。AX-FAM 对 Firmicutes 和 Actinobacteria 的促增殖和对 Proteobacteria、Fusobacteria、Bacteroides 的抑制作用介于 AX 和 FA 之间。

在属水平上, AX、菊粉、FA 和 AX-FAM 均可以促进乳酸菌(*Lactobacillus*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)的增殖。据报道, *Lactobacillus* 主要通过发酵糖类产生乳酸、乙酸和丙酸等[26]。*Bifidobacterium* 有助于分解膳食纤维, 与乙酸和乳酸的生长有关[27]。因此, AX 和 AX-FAM 可能通过促进这些有益微生物的增殖促进肠道内 SCFAs 的产生。同时, 在属水平上, AX、菊粉、FA 和 AX-FAM 均可以抑制大肠杆菌-志贺菌(*Escherichia-Shigella*)和链球菌(*Streptococcus*)的增殖。据报道 *Escherichia-Shigella* 和 *Streptococcus* 在肠道中可能会造成炎症和感染等[28−30]。因此, AX、菊粉、FA 和 AX-FAM 对这些潜在的致病微生物具有一定的抑制作用。因此, 从肠道菌群的变化来看, 即使共价结合造成了 AX 的分子降解, 但并未提高其调节肠道菌群功能, 而是 FA 的共价结合作用对 AX 肠道益生活性的弱化程度更为显著。

3 结论

通过 CDI 介导的亲核反应制备了不同 AX-FA 共价结合物, 随着反应体系中 FA 添加量的增加, FA 在 AX 分子中的取代度逐渐增加, 当 FA 添加量为 1.2% 时, 取代度可达 68.1±0.6 mg FA/g。但是, 由于 FA 主要共价连接于 AX 分子的羟基, 导致 AX 溶解度剧烈降低, 在取代度为 68.1±0.6 mg FA/g 时, 获得的复合物(AX-FAH)溶解度仅为 6.2%±0.45%。在共价结合反应前后对 AX 的初级和高级结构进行了初步分析, 结果表明, 共价结合反应不会改变 AX 的单糖组成和在溶液中的链构象, 但会造成 AX 的分子降解, 这可能是反应体系中过量的 CDI 攻击 AX 主链中的氧原子所致。对复合物的抗氧化性和结肠酵解特性进行了分析, 结果表明, 共价结合 FA 后, 会显著提升 AX 的抗氧化活性, 体现在对线虫体内 SOD 和 CAT 活性水平提升和 ROS 水平的下降。同时, 虽然 FA 在结肠内促进 SCFAs 和有益菌增殖的能力较弱, 但 AX 与 FA 的共价结合物依然具有促进乙酸、丁酸、总 SCFAs 产生、促进肠道有益微生物 *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 的增殖, 抑制有害微生物 *Escherichia-Shigella* 和 *Streptococcus* 增殖的功能, 但复合物在肠道的益生活性略弱于 AX。与已有的研究相比, 本研究系统评估了 FA 和 AX 的共价结合反应对 AX 结构、抗氧化活性和肠道益生活性的影响。尽管 AX-FA 复合物在抗氧化、调节肠道菌群等方面展现出潜在益处, 但其长期稳定性和在实际应用中的效果仍需进一步验证。未来的研究将通过优化合成条件提高复合物的益生活性, 并在动物和临床水平对其生物活性进行验证, 以期为其在功能性食品中的应用提供更多理论支持。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] GUO Qingbin, XIAO Xingyue, LU Laifeng, et al. Polyphenol-polysaccharide complex: Preparation, characterization, and potential utilization in food and health[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2022, 13: 59−87.

［2］ KULATHUNGA J, ISLAM S. Wheat Arabinoxylans: Insight into structure-function relationships[J]. Carbohydrate Polymers, 2025, 348: 122933.
［3］ 李依云, 刘政佳, 王国珍, 等. Jizi439 黑麦麸阿魏酰基阿拉伯木聚糖中结合态阿魏酸的表征和体外消化特性[J]. 食品科学, 2024, 45(23): 46−53. ［LI Yiyun, LIU Zhengjia, WANG Guozhen, et al. Identification and *in vitro* digestion characteristics of bound ferulic acid in feruloylated Arabinoxylan from Jizi439 black wheat bran[J]. Food Science, 2024, 45(23): 46−53.］
［4］ ZHANG Xinwen, DONG Lihong, JIA Xuchao, et al. Bound phenolics ensure the antihyperglycemic effect of rice bran dietary fiber in db/db mice via activating the insulin signaling pathway in skeletal muscle and altering gut microbiota[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(15): 4387−4398.
［5］ HE Hongju, QIAO Jinli, LIU Yan, et al. Isolation, structural, functional, and bioactive properties of cereal Arabinoxylan-A critical review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(51): 15437−15457.
［6］ 张秀敏, 周增超, 乔晋丽, 等. 麦麸品种与提取方式对阿拉伯木聚糖结构及抗氧化性的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(3): 31−40. ［ZHANG Xiumin, ZHOU Zengchao, QIAO Jinli, et al. Effects of wheat bran varieties and extraction methods on the structure and antioxidant activity of Arabinoxylan[J]. Food Science, 2023, 44(3): 31−40.］
［7］ ZHANG Wenting, SUN Jian, LI Qiang, et al. Free radical-mediated grafting of natural polysaccharides such as chitosan, starch, inulin, and pectin with some polyphenols: Synthesis, structural characterization, bioactivities, and applications: A review[J]. Foods, 2023, 12(19): 3688.
［8］ LIU Yan, XIAO Meng, ZHAO Juan, et al. Fluorescent labeling affected the structural/conformational properties of Arabinoxylans[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 265: 118064.
［9］ LIU Yan, WANG Shaowei, KANG Ji, et al. Arabinoxylan from wheat bran: Molecular degradation and functional investigation[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 107: 105914.
［10］ BLUMENKRANTZ N, ASBOE-HANSEN G. New method for quantitative determination of uronic acids[J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54(2): 484−489.
［11］ LI Qiangming, WANG Jingfei, ZHA Xueqiang, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a new polysaccharide from jellyfish[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 159: 188−194.
［12］ HROMÁDKOVÁ Z, PAULSEN B S, POLOVKA M, et al. Structural features of two heteroxylan polysaccharide fractions from wheat bran with anti-complementary and antioxidant activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 93(1): 22−30.
［13］ 司茜媛. 白灵菇多糖抗衰老活性及其机制的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022. ［SI Qianyuan. Study on anti-aging activity and mechanism of *Pleurotus nebrodensis* polysaccharide[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2022.］
［14］ DING Yu, YAN Yamei, PENG Yujia, et al. *In vitro* digestion under simulated saliva, gastric and small intestinal conditions and fermentation by human gut microbiota of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 125: 751−760.
［15］ LIU Yan, LI Yanmei, SUN Bo, et al. Glucans from *Armillaria luteo-virens*: Structural characterization and *in vivo* immunomodulatory investigation under different administration routes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(11): 6006−6018.
［16］ JIKEI M, KAKIMOTO M A. Hyperbranched polymers: A promising new class of materials[J]. Progress in Polymer Science, 2001, 26(8): 1233−1285.
［17］ WEN Yu, YE Fayin, ZHU Jianfei, et al. Corn starch ferulates with antioxidant properties prepared by N, N′-carbonyldiimidazole-mediated grafting procedure[J]. Food Chemistry, 2016, 208: 1−9.
［18］ YONG Huimin, BAI Ruyu, BI Fengyu, et al. Synthesis, characterization, antioxidant and antimicrobial activities of starch aldehyde-quercetin conjugate[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 156: 462−470.
［19］ GUO Qingbin, XIAO Xingyue, LI Chunrong, et al. Catechin-grafted arabinoxylan conjugate: Preparation, structural characterization and property investigation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182: 796−805.
［20］ JING Yingjun, HUANG Jianghao, YU Xueqing. Preparation, characterization, and functional evaluation of proanthocyanidin-chitosan conjugate[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 194: 139−145.
［21］ ALI KHAN K, SALEEM M H, AFZAL S, et al. Ferulic acid: Therapeutic potential due to its antioxidant properties, role in plant growth, and stress tolerance[J]. Plant Growth Regulation, 2024, 104(3): 1329−1353.
［22］ RUI Liyun, XIE Minhao, HU Bing, et al. Enhanced solubility and antioxidant activity of chlorogenic acid-chitosan conjugates due to the conjugation of chitosan with chlorogenic acid[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 170: 206−216.
［23］ KHODAEI N, FERNANDEZ B, FLISS I, et al. Digestibility and prebiotic properties of potato rhamnogalacturonan I polysaccharide and its galactose-rich oligosaccharides/oligomers[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 1074−1084.
［24］ FU Yousi, ZHANG Junnan, CHEN Kainan, et al. An *in vitro* fermentation study on the effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on human intestinal microbiota from fecal microbiota transplantation donors[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 53: 44−53.
［25］ SMIRICKY-TJARDES M R, FLICKINGER E A, GRIESHOP C M, et al. *In vitro* fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora1[J]. Journal of Animal Science, 2003, 81(10): 2505−2514.
［26］ ÖZCELIK S, KULEY E, ÖZOGUL F. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria[J]. LWT, 2016, 73: 536−542.
［27］ ZHANG Xueliang, ZHANG Changliang, XIAO Luyao, et al. Digestive characteristics of extracellular polysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* T1 and its regulation of intestinal microbiota[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259: 129112.
［28］ WANG Yulu, ZHANG Man, WU Yating, et al. Changes in antioxidant properties and structure of *Pediococcus acidilactici*'s polysaccharide: *In vitro* simulated digestion[J]. LWT, 2024, 205: 116415.
［29］ XIAN Jing, CHEN Quanlong, ZHANG Chen, et al. Polygonati rhizoma polysaccharides relieve exercise-induced fatigue by regulating gut microbiota[J]. Journal of Functional Foods, 2023, 107: 105658.
［30］ 刘晓雨, 刘利平, 刘艳芳, 等. 不同处理金耳水提物的制备、理化性质分析及肠道菌群活性[J]. 食品科学, 2025, 46(11): 180−189. ［LIU Xiaoyu, LIU Liping, LIU Yanfang, et al. Preparation, physicochemical properties and intestinal flora regulatory activity of aqueous extracts from differently pretreated *Naematelia aurantialba*[J]. Food Science, 2025, 46(11): 180−189.］