

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

李依云¹, 刘政佳¹, 王国珍^{1,2}, 常宪辉^{1,2}, 丁文平^{1,2}, 陈曦^{1,2,*}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023;

2. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 农产品加工与转化湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430023)

摘要: 利用超声波辅助酶法从黑麦麸中提取阿魏酰基阿拉伯木聚糖 (feruloylated arabinoxylan, F-AX), 并以碱法提取作为对照, 探究提取物中结合态阿魏酸的含量及键连方式, 同时研究其体外消化特性和抗氧化性。结果表明, 酶法提取物相较于碱法相对分子质量更低且分布范围更广, 二者在单糖组成、糖苷键连接方式上存在一定差异; 酶法提取物中阿魏酸含量 (13.11 ± 0.19 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 高于碱法提取物 (0.05 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$); 在对酶提F-AX进行模拟体外消化后, 发现酶提F-AX在各消化阶段阿魏酸的释放量极少 (口腔: 0.06 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$; 胃: 0.60 ± 0.02 $\mu\text{g}/\text{mg}$; 小肠: 0.14 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$); 此外, 酶法提取物抗氧化性较碱法更强。本研究结果为以黑麦麸为原料提取F-AX过程充分保留小分子阿魏酸及其功能活性, 挖掘其生理功效、发挥谷物资源营养价值提供了理论依据。

关键词: 黑麦麸; 阿魏酸; 功能特性

Identification and *in Vitro* Digestion Characteristics of Bound Ferulic Acid in Feruloylated Arabinoxylan from Jizi439 Black Wheat Bran

LI Yiyun¹, LIU Zhengjia¹, WANG Guozhen^{1,2}, CHANG Xianhui^{1,2}, DING Wenping^{1,2}, CHEN Xi^{1,2,*}

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Key Laboratory of Deep Processing of Major Grain and Oil, Ministry of Education, Hubei Key Laboratory for Processing and Transformation of Agricultural Products, Wuhan 430023, China)

Abstract: Feruloylated arabinoxylan (F-AX) was extracted from black wheat bran by either of two methods: ultrasonic-assisted enzymatic extraction or alkaline extraction as control. The content and linkage of bound ferulic acid in the extract were investigated, and its antioxidant and *in vitro* digestive properties were studied. Our results showed that the enzymatic extract possessed lower relative molecular mass in a wider range when compared with the alkaline extract. They differed in monosaccharide composition and glycosidic linkage. The amount of ferulic acid in the enzymatic extract, 13.11 ± 0.19 $\mu\text{g}/\text{mg}$, was significantly higher than that of the alkaline extract, 0.05 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$. During the *in vitro* digestion of the enzymatic extract, the release of ferulic acid was very low at various digestion stages (oral: 0.06 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$, gastric: 0.60 ± 0.02 $\mu\text{g}/\text{mg}$, intestinal: 0.14 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$). In addition, the enzymatic extract possessed higher antioxidant activity than the alkaline extract. Our results provide a theoretical basis to fully preserve ferulic acid and its bioactivity during F-AX extraction from wheat bran, to explore its physiological effects, and to unleash the nutritional value of grain resources.

Keywords: black wheat bran; ferulic acid; functional characteristics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20231227-239

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 23-0046-08

引文格式:

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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20231227-239. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-12-27

基金项目: 湖北省中央引导地方科技发展专项 (2022BGE247); 大宗粮油精深加工教育部重点实验室开放课题 (DZLY2023009)

第一作者简介: 李依云 (1998—) (ORCID: 0009-0001-1949-5715), 男, 硕士研究生, 研究方向为谷物资源与开发。

E-mail: 1228111353@qq.com

*通信作者简介: 陈曦 (1988—) (ORCID: 0000-0002-7334-2808), 女, 副教授, 博士, 研究方向为谷物营养与全谷物健康食品研制。E-mail: xchen@whpu.edu.cn

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. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20231227-239. <http://www.spkx.net.cn>

麦麸是小麦加工过程中的一种重要副产物, 约占小麦籽粒质量的25%, 其中含有大量膳食纤维和多酚^[1-2]。阿魏酸属于酚酸类化合物, 是麦麸中含量最高的膳食多酚, 超过90%的阿魏酸通过酯键或醚键与细胞壁中的膳食纤维阿拉伯木聚糖相连, 形成的阿魏酰基阿拉伯木聚糖(feruloylated arabinoxylan, F-AX)是典型的“酚酸-膳食纤维”复合物。由于阿魏酸具有多种生理活性(如抗氧化、抗菌、抗炎、抗血栓、抗癌以及预防冠状动脉疾病等)而受到广泛关注^[3-5]。现阶段对于谷物膳食酚酸的健康效用研究多基于较易提取的游离态酚酸而忽略了其天然结合态。

研究表明, F-AX的抗氧化性与其结构中存在的阿魏酸密切相关, 阿魏酸在消化道中的释放程度也影响着F-AX生理功效的发挥^[6]。由于人类胃肠道中的缺乏水解F-AX的酶, 因此理论上结合态阿魏酸在上消化道的释放率极低^[7], 而现阶段对这一理论尚缺乏针对性的验证实验, 麦麸结合态阿魏酸在上消化道的释放规律仍有待进一步研究。

研究发现黑麦麸中阿魏酸含量显著高于其他品种小麦^[8], 采用合适方法的提取结合态阿魏酸是研究其功能特性和营养本质的基础, 对人类健康有着重要意义^[9-10]。常用的提取方式有碱处理法、超声波/微波辅助酶法等^[11]。使用碱性试剂处理麦麸, 可以显著提高半纤维素的溶解度, 但提取过程中会造成阿魏酸的大量损失; 采用较温和的酶法提取可有效保护阿魏酸, 获得F-AX^[12]。

基于以上研究现状, 本研究采用黑麦麸作为天然结合态阿魏酸的来源, 利用超声波辅助酶法提取F-AX, 并以碱法提取作为对照, 探究麦麸及酶提物中结合态阿魏酸的分布、其与膳食纤维的键连方式及抗氧化活性, 同时研究其在“口腔-胃-小肠”的上消化道释放水平, 以期为进一步探究天然“酚酸-膳食纤维”复合物的结构特性、生理功能及营养本质提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Jizi439黑麦麸 河北邯郸月清农业科技有限公司。

阿魏酸标准品、甘露糖、氨基葡萄糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、氨基半乳糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖(HPLC级) 上海源叶生物科技有限公司; α -淀粉酶(分析纯) 美国Sigma-Aldrich公司; 中性蛋白酶、木聚糖酶、三氯甲烷(分析纯) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲醇、乙腈(HPLC级) 美国赛默飞公司; 碘甲烷

(分析纯) 安徽泽升科技股份有限公司; 氢氧化钠、正己烷、二氯甲烷(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 人工唾液、人工胃液、人工小肠液 北京雷根生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

JXFM110锤式旋风磨 上海嘉定粮油仪器有限公司; THC型超声波提取机 济宁天华超声电子有限公司; TDZS-WS医用离心机 长沙平凡仪器仪表有限公司; 7890A-5975C气相色谱-质谱联用仪、PL-GPC50凝胶渗透色谱仪(配有Agilent 1260 Infinity II示差折光检测器、PL aquagel-OH MIXED-M色谱柱(300 mm×7.5 mm, 8 μ m)) 美国Agilent公司; RE-52A旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; EnSpire™多功能酶标仪 美国PerkinElmer公司; Avance NEO 600核磁共振波谱仪 德国Bruker公司; IRTracer-100傅里叶变换红外光谱仪 日本岛津公司; LSM 880激光共聚焦显微镜 德国蔡司公司; TS2倒置荧光显微镜 日本尼康公司; e2695高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪(配有2998光电二极管阵列检测器、Empower自动化系统检定工具、ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)) 美国沃特世公司。

1.3 方法

1.3.1 技术路线

技术路线如图1所示。

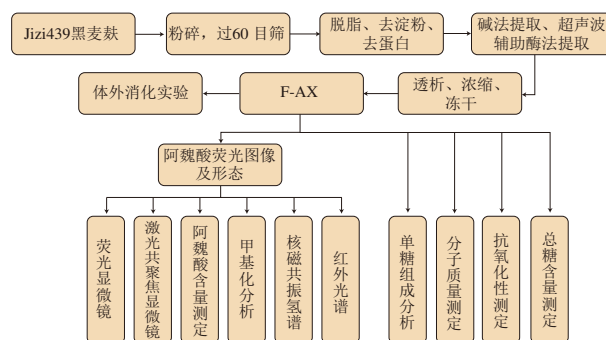


图1 F-AX提取、鉴定及体外消化流程图

Fig. 1 Flow chart for the extraction, identification and *in vitro* digestion of F-AX

1.3.2 F-AX提取

使用碱法和超声波辅助酶法提取黑麦麸中的F-AX。

黑麦麸预处理: 使用锤式旋风磨将黑麦麸粉碎后过60目筛, 50℃条件下过夜烘干。将烘干的黑麦麸使用

正己烷脱脂后按料液比1:20浸入去离子水中。加入1% (以黑麦麸质量计,下同)的中性蛋白酶,在40℃水浴1.5 h。加入4%的 α -淀粉酶,在60℃条件下水浴2 h^[13]。然后在95℃水浴20 min灭酶,5 000 r/min离心15 min,取沉淀烘干待用。

F-AX的碱法提取:按料液比1:8将预处理麦麸浸入0.5 mol/L NaOH水溶液中,在80℃水浴16 h。4 500 r/min离心15 min,取上清液用乙酸调至pH 5,8 000~14 000 Da透析48 h,旋转蒸发浓缩后,冷冻干燥^[14]。

F-AX的超声波辅助酶法提取:将预处理麦麸按料液比1:20浸入去离子水中,加入0.04%的木聚糖酶,在56℃、160 W、50 kHz条件下超声90 min,在95℃水浴20 min以灭酶。4 500 r/min离心15 min取上清液,3 500 Da透析48 h浓缩,冷冻干燥^[13]。

1.3.3 F-AX提取物总糖含量测定

参考文献[15],使用苯酚-硫酸法测定2种提取物的总糖含量。

1.3.4 阿魏酸荧光图像及形态

1.3.4.1 阿魏酸荧光图像观察

使用TS2倒置荧光显微镜在紫外光、380 nm波长附近条件下,拍摄黑麦麸、碱法提取F-AX以及酶法提取F-AX中阿魏酸的荧光图像。

在室温下使用LSM 880激光共聚焦显微镜,使用10×物镜、405 nm氩光源,在440~470 nm波长范围内拍摄黑麦麸、碱法提取F-AX以及酶法提取F-AX中阿魏酸的荧光图^[16]。

1.3.4.2 阿魏酸含量测定

用2 mol/L的NaOH溶液按料液比1:10过夜处理F-AX,37%的HCl溶液调pH值至3,乙酸乙酯萃取3次后再4 000 r/min离心10 min,取上清液旋转蒸发干,甲醇复溶,过0.45 μ m滤膜后用HPLC仪进行阿魏酸含量测定。HPLC条件^[17]:使用Waters XSelect HSS T3色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),流动相A液为乙腈,B液为2%乙酸溶液,流速为1 mL/min,柱温30℃,进样量10 μ L,检测波长280 nm。洗脱梯度为:0~30 min,0%~15% A、100%~85% B;30~50 min,15%~50% A、85%~50% B;50~55 min,50%~100% A、50%~0% B;55~60 min,100%~0% A、0%~100% B;60~70 min,0% A、100% B。

1.3.5 F-AX甲基化分析

取3 mg F-AX在80℃烘干,烘干后的样品溶解于0.5 mL二甲基亚砜中,85℃条件下水浴1 h,加入20 mg NaOH后振荡2 h,在避光环境中加入0.5 mL碘化钾后振荡5 h,用2 mL二氯甲烷萃取2次,合并二氯甲烷层,用5 mL去离子水洗涤二氯甲烷层3次,有机相过无

水硫酸钠柱后氮气吹干,得到甲基化样品。将甲基化的F-AX溶解在0.5 mL 4 mol/L三氟乙酸溶液中,在100℃水浴6 h,冷却后的样品氮气吹干,加入0.3 mL去离子水、1滴5%氨水溶液和3 mg硼氰化钠后振荡12 h并用氮气吹干。加入0.5 mL醋酸、甲醇混合液(1:19, V/V)后氮气吹干,重复3次。加入0.5 mL乙酸酐,100℃水浴2 h后氮气吹干,吹干后的样品用二氯甲烷复溶,过0.22 μ m滤膜后使用7890A-5975C气相色谱-质谱联用仪分析^[18]。

1.3.6 F-AX一维核磁共振氢谱(¹H nuclear magnetic resonance spectra, ¹H NMR)分析

取3 mg F-AX溶解在0.5 mL D₂O中,60℃水浴3 h,4℃条件下过夜后冻干,重复3次。冻干后的F-AX在60℃溶解于0.5 mL D₂O中,水浴3 h。使用Avance NEO 600核磁共振波谱仪检测以获得F-AX样品的¹H NMR谱图^[18]。

1.3.7 F-AX红外光谱分析

将F-AX与KBr一起进行研磨、压片后,在4 000~400 cm⁻¹范围内使用IRTracer-100傅里叶变换红外光谱仪进行扫描。扫描分辨率为2 cm⁻¹,扫描次数为32次^[19]。

1.3.8 F-AX单糖组成分析

单糖标准品衍生以及样品制备参照戴军等^[20]的方法,处理后的样品过0.45 μ m微孔膜后进行HPLC分析。HPLC条件:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相A液为0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.7),B液为乙腈;洗脱参数设置为83% A与17% B等度洗脱,柱温30℃,流速1 mL/min,进样量20 μ L,检测波长为250 nm。

1.3.9 F-AX分子质量的测定

取1 mg F-AX溶解于10 mL去离子水中,使用配有PL aquagel-OH MIXED-M色谱柱(300 mm×7.5 mm, 8 μ m)的PL-GPC50凝胶渗透色谱仪在0.9 mL/min流速下测定F-AX分子质量,进样量为100 μ L。

1.3.10 F-AX抗氧化性测定

参考Chen Xi等^[17]的方法测定F-AX抗氧化性。

1.3.10.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力

在96孔板中分别加入20 μ L F-AX溶液、80 μ L Tris-HCl缓冲液(0.1 mol/L)以及100 μ L DPPH溶液(0.1 mmol/L),避光反应30 min后使用酶标仪在515 nm测定吸光度,按下式计算DPPH自由基清除率:

$$\text{DPPH/ABTS阳离子自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100$$

式中: A_1 为样品吸光度; A_2 为对照组吸光度(去离子水代替DPPH自由基溶液或2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-

sulfonic acid), ABTS) 阳离子自由基溶液); A_3 为空白组吸光度 (去离子水代替样品)。

1.3.10.2 ABTS阳离子自由基清除能力

将2.6 mmol/L过硫酸钾溶液与7.4 mmol/L ABTS溶液按照体积比1:1混合, 在黑暗环境下反应12~16 h备用。使用pH 7.4的磷酸盐缓冲液将ABTS阳离子自由基溶液稀释至734 nm时吸光度为 0.7 ± 0.02 , 在96孔板中分别加入10 μ L F-AX溶液与190 μ L稀释后的ABTS阳离子自由基溶液, 避光反应20 min后在734 nm测定吸光度, 按1.3.10.1节中的公式计算清除率。

1.3.11 酶法提取F-AX体外消化实验

酶提F-AX体外消化实验方法参考Li Yang等^[21]的方法并略作修改。

模拟口腔消化: 称取0.2 g酶提F-AX样品, 加入5 mL含7.5 mg α -淀粉酶和25 μ L $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (0.3 mol/L) 的口腔消化液, 调节pH值至7.0, 在37 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌水浴锅中模拟口服消化2 min, 5 000 r/min离心15 min, 取上清液沸水浴灭酶3 min。

模拟胃消化: 称取0.2 g酶提F-AX样品, 加入5 mL含7.5 mg α -淀粉酶和25 μ L $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (0.3 mol/L) 的口腔消化液, 调节pH值至7.0, 在37 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌水浴锅中模拟口服消化2 min; 加入5 mL含20 mg胃蛋白酶和2.5 μ L $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ 的胃消化液, 用6 mol/L HCl溶液调节pH值至2.5~3, 在37 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌水浴锅中反应120 min, 5 000 r/min离心15 min, 取上清液沸水浴灭酶3 min。

模拟小肠消化: 称取0.2 g酶提F-AX样品, 加入5 mL含7.5 mg α -淀粉酶和25 μ L $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (0.3 mol/L) 的口腔消化液, 调节pH值至7.0, 在37 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌水浴锅中模拟口服消化2 min; 加入5 mL含20 mg胃蛋白酶和2.5 μ L $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ 的胃消化液, 用6 mol/L HCl溶液调节pH值至2.5~3, 在37 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌水浴锅中反应120 min; 然后加入10 mL模拟肠液, 同时加入40 mg胆盐、37.5 mg胰酶, 用1 mol/L NaOH溶液将混合物的pH值调至7.0, 在37 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌水浴锅中消化反应120 min, 5 000 r/min离心15 min, 取上清液沸水浴灭酶3 min。

经过模拟口腔、胃、小肠阶段消化之后的消化液冻干后用甲醇复溶, 过0.45 μm 滤膜后使用HPLC测定阿魏酸含量, HPLC条件同1.3.4.2节。

1.4 数据分析

采用SPSS 26.0统计软件对实验数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 表明具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 F-AX总糖含量

使用苯酚-硫酸法测定2种F-AX的总糖含量, 发现使用碱法和超声波辅助酶法提取所得F-AX的

总糖含量比较接近, 其中碱提F-AX总糖质量分数为 $(69.17 \pm 1.10)\%$, 而酶提F-AX总糖质量分数为 $(68.35 \pm 1.69)\%$ 。

2.2 阿魏酸的荧光图像及形态

2.2.1 阿魏酸的荧光图像

阿魏酸是一种自荧光酚酸, 通过阿魏酸的自荧光发射可以鉴别其在麦麸和其他谷物中的存在和位置, 通过激光共聚焦显微镜在405 nm的激发波长处可以观察到其显示出明亮的绿光^[16], 在荧光显微镜下使用蓝色滤光片可以看到蓝色荧光^[22]。如图2所示, 未处理的黑麦麸和酶提F-AX中可以观测到大量阿魏酸荧光, 而碱提F-AX中只能观测到极少量的荧光, 这表明在使用强碱提取F-AX的过程中损失了大部分阿魏酸, 这可能是因为强碱会打破阿魏酸与细胞壁中阿拉伯木聚糖连接的酯键^[23]。

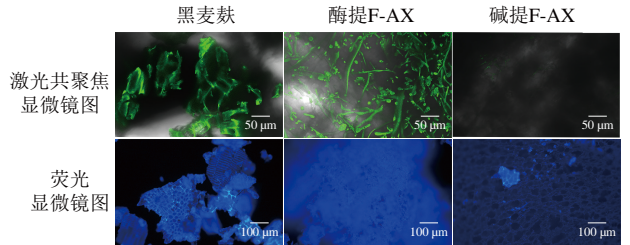


图2 黑麦麸与F-AX样品的荧光图像

Fig. 2 Fluorescence images of black wheat bran and F-AX samples

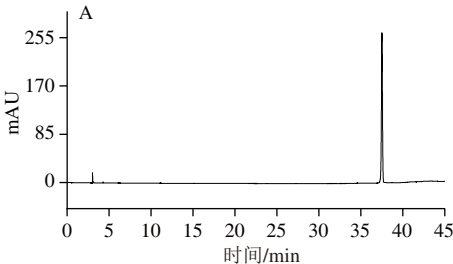
2.2.2 阿魏酸含量

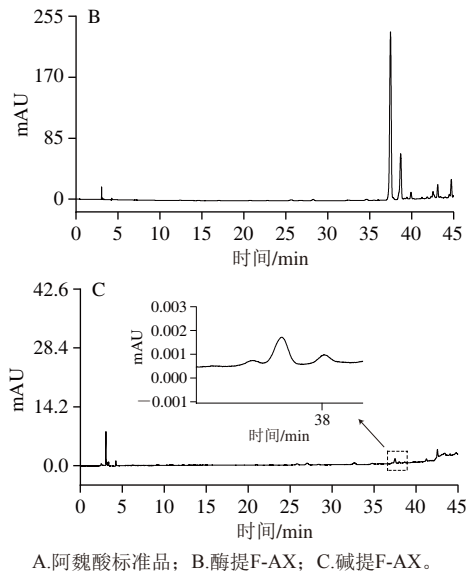
采用HPLC测定了两种提取方式所得F-AX中阿魏酸的含量, 如表1所示。根据本课题组前期研究, Jizi439黑麦麸中阿魏酸含量为 $(3.10 \pm 0.01) \mu\text{g}/\text{mg}$ ^[17]。酶提F-AX中阿魏酸的含量为 $(13.11 \pm 0.19) \mu\text{g}/\text{mg}$, 而碱提F-AX中阿魏酸含量仅为 $(0.05 \pm 0.01) \mu\text{g}/\text{mg}$, 验证了碱法提取相较于超声波辅助酶法提取会导致阿魏酸单体从F-AX上大量脱落, HPLC结果 (图3) 进一步证实了荧光显微镜和激光共聚焦显微镜拍摄所得结果的准确性。

表1 黑麦麸与F-AX样品中阿魏酸含量

样品	Jizi439黑麦麸	酶提F-AX	碱提F-AX
阿魏酸含量/ $(\mu\text{g}/\text{mg})$	$3.10 \pm 0.01^*$	13.11 ± 0.19	0.05 ± 0.01

注: *.数据引用自文献[17]。





A.阿魏酸标准品; B.酶提F-AX; C.碱提F-AX。
图3 F-AX样品HPLC图
Fig. 3 HPLC chromatograms of F-AX samples

2.3 F-AX甲基化分析

酶提和碱提F-AX的甲基化分析结果如表2所示，其中主要检测到11种单糖衍生物，它们分别证明了F-AX中主要存在T-linked Araf、1,3-linked Araf、1,5-linked Araf、T-linked Xylp、1,4-linked Xylp、1,3,4-linked Xylp、1,2,4-linked Xylp、1,2,3,4-linked Xylp、1,4-linked Galp、T-linked Glup以及1,2-linked Glup 11种糖苷键结构。阿魏酸被认为连接在细胞壁阿拉伯木聚糖链上阿拉伯糖残基O5位上^[6]，酶提F-AX中的2,3-Me₂-1,4,5-Ac₃-Arabinitol远多于碱提F-AX，说明碱法提取会导致连接在阿拉伯糖残基的O5上的阿魏酸损失，2种F-AX的糖苷键中T-linked Araf的物质的量分数都远高于其他类型的阿拉伯糖残基，说明只有少量的阿拉伯糖残基的O5位置被阿魏酸所取代。F-AX主链上存在着未取代、单取代和双取代的木糖残基，T-linked Xylp一般被认为是木聚糖主链的非还原性末端^[24]。相较于碱提F-AX，酶提F-AX的木糖残基比例明显更低，这可能是由于使用木聚糖酶提取F-AX时主链上大量的β-1,4-糖苷键被破坏。使用碱法和酶法提取所得到的F-AX在糖苷键种类上大致相同，而不同糖苷键的物质的量分数有很大差别。

表2 F-AX样品甲基化分析结果
Table 2 Methylation analysis results of F-AX samples

甲基类型	连接方式	物质的量分数/%	
		碱提F-AX	酶提F-AX
2,3,5-Me ₃ -1,4-Ac ₂ -Arabinitol	T-linked Araf	32.34	53.23
2,5-Me ₂ -1,3,4-Ac ₃ -Arabinitol	1,3-linked Araf	5.32	10.57
2,3-Me ₂ -1,4,5-Ac ₃ -Arabinitol	1,5-linked Araf	1.05	7.27
2,3,4-Me ₃ -1,5-Ac ₂ -Xylitol	T-linked Xylp	2.45	1.61
2,3-Me ₂ -1,4,5-Ac ₃ -Xylitol	1,4-linked Xylp	25.49	7.82
2-Me-1,3,4,5-Ac ₄ -Xylitol	1,3,4-linked Xylp	10.21	2.64
3-Me-1,2,4,5-Ac ₄ -Xylitol	1,2,4-linked Xylp	3.32	0.75
1,2,3,4,5-Ac ₅ -Xylitol	1,2,3,4-linked Xylp	6.01	2.33
2,3,6-Me ₃ -1,4,5-Ac ₂ -Galactitol	1,4-linked Galp	2.12	1.68
2,3,4,6-Me ₄ -1,5-Ac ₂ -Glucitol	T-linked Glup	6.92	8.94
3,4,6-Me ₃ -1,2,5-Ac ₃ -Glucitol	1,2-linked Glup	4.77	3.16

注：物质的量分数由峰面积比例得出。

2.4 F-AX ¹H NMR分析

使用超声波辅助酶法和碱法提取所得F-AX的¹H NMR谱图如图4所示。其中δ 6.4~7.8区间的质子信号由F-AX中的阿魏酸所产生^[25]，而酶提F-AX的峰远高于碱提F-AX，说明酶提F-AX中阿魏酸的含量远高于碱提F-AX。F-AX的主干结构有4种主要连接方式，分别是阿拉伯糖残基在木糖主链上C2和C3的单取代、二取代以及未取代的木糖残基^[14]。其中δ 5.6~5.0区间的质子信号代表着阿拉伯糖残基在木糖主链C3的单取代、C2和C3上的二取代，而δ 4.4~4.6区间的质子信号代表着单取代、二取代以及未被取代的木糖残基^[18]。

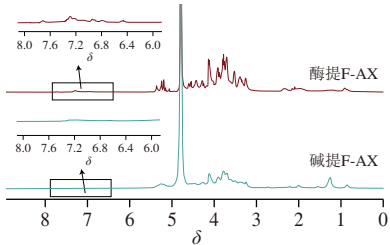


图4 F-AX样品¹H NMR谱图
Fig. 4 ¹H NMR spectra of F-AX samples

2.5 F-AX红外光谱分析

使用酶法和碱法提取所得的F-AX的红外光谱图如图5所示。3 410 cm⁻¹处的宽吸收是由于O—H的拉伸振动（3 600~2 500 cm⁻¹），2 928 cm⁻¹处的峰代表不对称—CH₂中C—H的拉伸振动（2 940~2 920 cm⁻¹），它们表明F-AX网络中存在氢键间与氢键内的相互作用^[26]。根据之前的研究，不对称—COO⁻在1 658 cm⁻¹处的拉伸振动（1 700~1 600 cm⁻¹）和对称—COO⁻在1 410 cm⁻¹处的拉伸振动（1 400~1 300 cm⁻¹），导致F-AX提取物中容易存在糖醛酸^[27]。此外，1 200~800 cm⁻¹是多糖的指纹区，包含了C—C、C—O、C—O—H的弯曲振动，其中在1 042 cm⁻¹处有强峰是F-AX中阿拉伯木聚糖的典型特征，并且该峰随着F-AX支链增多而增强^[19,28]。其中1 532 cm⁻¹处的吸收峰表明酚环（1 450~1 650 cm⁻¹）的存在，说明了F-AX样品中存在少量酚类物质^[19]，主要是由于阿魏酸的存在。碱提F-AX在1 042 cm⁻¹处的峰强度大于酶提F-AX，可能是由于酶提F-AX提取过程中木聚糖酶的随机剪切导致其支链数量减少。

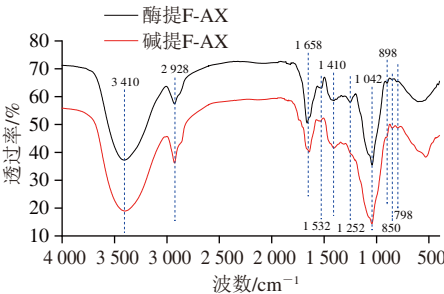


图5 F-AX样品的红外光谱
Fig. 5 Infrared spectra of F-AX samples

2.6 F-AX单糖组成分析

使用超声波辅助酶法和碱法提取所得F-AX的单糖组成分析结果如表3所示。F-AX中糖链主要由阿拉伯糖和木糖组成,主要杂质成分葡萄糖可能来自于未水解完全的淀粉,半乳糖可能是由黑麦麸中存在的半乳糖阿拉伯糖或阿拉伯半乳糖水解产生^[29]。其中超声波辅助酶提F-AX和碱提F-AX的阿拉伯糖与木糖比值(A/X值)分别为1.10和1.08, A/X值一般被用来表示阿拉伯木聚糖的支链化程度,其比值越大代表支链化程度越高,而支链化程度则影响阿拉伯木聚糖在水中的溶解度、黏度等理化性质,从而影响F-AX的生理功能, A/X值低的F-AX在水中的溶解度比较低^[30]。采用超声波辅助酶法与碱法提取所得的F-AX在A/X值上比较接近,这与张秀敏等^[25]的研究结果相近,这说明这两种提取方式在提取过程中对于F-AX从黑麦麸细胞壁中的剥离程度比较接近。

表3 F-AX样品单糖组成分析结果
Table 3 Monosaccharide compositions of F-AX samples

成分	物质的量分数/%	
	酶提F-AX	碱提F-AX
甘露糖	2.89±0.16	0.30±0.01
氨基葡萄糖	0.65±0.01	0.08±0.03
核糖	0.37±0.01	0.10±0.01
鼠李糖	0.80±0.02	0.32±0.01
葡萄糖醛酸	1.04±0.02	0.84±0.02
半乳糖醛酸	0.93±0.01	0.33±0.01
氨基半乳糖	0.31±0.01	/
葡萄糖	9.20±0.37	8.68±0.22
半乳糖	6.56±0.43	3.41±0.07
木糖	36.56±0.31	41.35±0.73
阿拉伯糖	40.39±0.52	44.60±0.49
岩藻糖	0.30±0.01	/
A/X	1.10	1.08

注: /未检测到其存在。

2.7 F-AX分子质量分析

使用超声波辅助酶法和碱法提取所得F-AX的分子质量分布如图6所示。酶提F-AX的分子质量主要分布在0~10 kDa范围内,其分子质量为10.67 kDa;而碱提F-AX的分子质量主要分布在10 kDa以上的区间,其分子质量为98.39 kDa。2种提取方式所得F-AX分子质量分布区间有很大差别,酶提F-AX的小分子质量多糖结构占比更大,这说明使用木聚糖酶提取F-AX会破坏其网状结构,从而在提取过程中产生了更多的短链F-AX片段。相较于碱提F-AX,酶提F-AX的分子质量分布范围更广,这可能是因为使用酶法提取F-AX时,木聚糖酶在F-AX中阿拉伯木聚糖主链上进行随机剪切,所以导致了更多不同质量的分子片段的出现^[23]。Liu Yan等^[31]的研究显示超声处理与木聚糖酶处理都会导致F-AX中阿拉伯木聚糖链裂解生成更多的小分子片段。

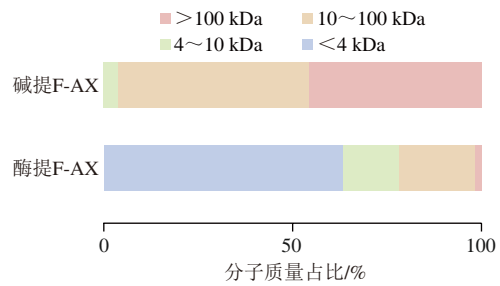


图6 F-AX样品分子质量分布

Fig. 6 Molecular mass distribution of F-AX samples

2.8 F-AX抗氧化性

使用超声波辅助酶法和碱法提取所得F-AX的抗氧化活性如图7所示,质量浓度在0.25~4 mg/mL范围内,酶提F-AX的DPPH自由基、ABTS阳离子自由基清除能力都强于碱提F-AX,这可能是由于酶提F-AX中含有更多的阿魏酸,阿魏酸因其具有破坏含氧自由基、破坏自由基链式反应以及螯合金属离子的能力,被认为能够为F-AX提供抗氧化活性^[14]。F-AX的ABTS阳离子自由基清除能力在0.25~4 mg/mL范围内与质量浓度呈正相关。质量浓度4 mg/mL时,酶提F-AX的DPPH自由基清除能力显著强于碱提F-AX。

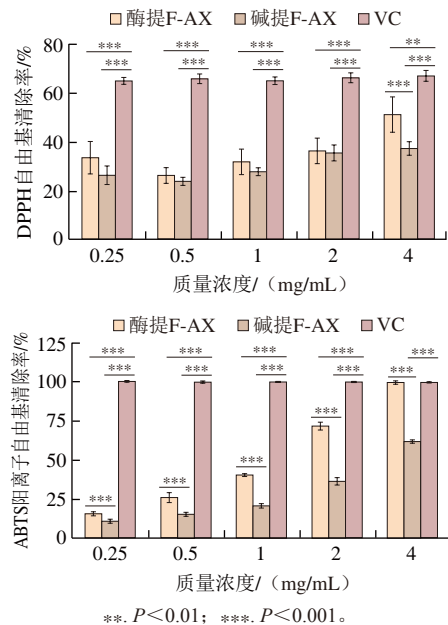


图7 F-AX样品抗氧化性

Fig. 7 Antioxidant capacity of F-AX samples

2.9 超声波辅助酶法提取F-AX体外消化过程中阿魏酸的释放情况

酶提F-AX经过体外模拟消化后的阿魏酸释放情况如图8所示。酶提F-AX在模拟体外消化过程中的阿魏酸释放量代表其可以用于吸收的生物可及量,其在口腔、胃、小肠3个阶段的消化液中阿魏酸的释放量分别为

(0.06 ± 0.01)、(0.60 ± 0.02)、(0.14 ± 0.01) $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，都远低于其本身的阿魏酸含量 (13.11 ± 0.19) $\mu\text{g}/\text{mg}$)，说明酶提F-AX在体外模拟消化过程中只释放了极少量阿魏酸。经过体外模拟小肠消化后，酶提F-AX释放出的游离阿魏酸含量相较于胃消化阶段有所减少，这可能是由于其释放出的游离阿魏酸与胰液酶相互作用并结合，先前研究表明酚酸可以与胰液 α -淀粉酶、胰蛋白酶以及胰脂肪酶结合^[32]。

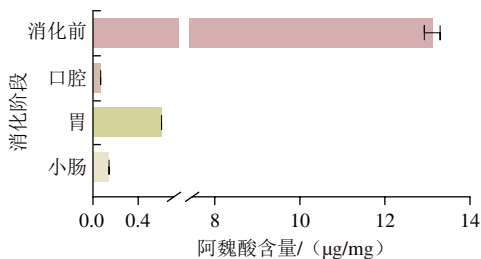


图8 酶提F-AX样品体外消化过程中的阿魏酸释放情况

Fig. 8 Ferulic acid release during *in vitro* digestion of enzymatically extracted F-AX samples

3 结论

本研究对Jizi439黑麦麸中阿魏酸的形态及含量、F-AX的消化特性、抗氧化性以及结构特性进行了测定。发现不同的提取方式对F-AX的阿魏酸形态、抗氧化活性以及结构有较大影响，但两种提取方式所得F-AX总糖含量接近。相较于使用碱法提取F-AX，使用超声波辅助酶法提取可以有效保护其阿魏酸结构不被破坏，但由于酶的剪切作用，酶提F-AX的分子质量更小。酶提F-AX由于其具有更多的阿魏酸单元，因此具有更高的抗氧化活性。通过模拟体外消化实验发现，酶提F-AX中的阿魏酸在模拟口腔、胃、小肠消化后释放量极少，关于F-AX在消化过程中的阿魏酸释放和吸收机制仍有待进一步探索。结果可为黑麦麸中结合态阿魏酸的进一步研究提供技术支撑，为充分发挥谷物麸皮营养价值提供科学依据。

参考文献:

[1] DAS NEVES M A, KIMURA T, SHIMIZU N, et al. Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2006, 49(3): 481-490. DOI:10.1590/s1516-89132006000400017.

[2] CHENG W, SUN Y J, FAN M C, et al. Wheat bran, as the resource of dietary fiber: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(26): 7269-7281. DOI:10.1080/10408398.2021.1913399.

[3] OU S Y, KWOK K C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84(11): 1261-1269. DOI:10.1002/jsfa.1873.

[4] KIM H K, JEONG T S, LEE M K, et al. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats[J]. Clinica Chimica Acta, 2003, 327(1/2): 129-137. DOI:10.1016/S0009-8981(02)00344-3.

[5] 贾子琴, 朱瑞瑞, 田连起, 等. 阿魏酸对幽门螺杆菌致胃炎小鼠胃黏膜Wnt/ β -catenin信号通路的影响[J]. 药物评价研究, 2024, 47(1): 109-114. DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2024.01.013.

[6] LIN S, AGGER J W, WILKENS C, et al. Feruloylated arabinoxylan and oligosaccharides: chemistry, nutritional functions, and options for enzymatic modification[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2021, 12: 331-354. DOI:10.1146/annurev-food-032818-121443.

[7] ZHANG B, ZHANG Y J, LI H Y, et al. A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their contribution to human health with future perspectives[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 347-362. DOI:10.1016/j.tifs.2020.09.029.

[8] CHEN X, LI X Y, ZHU X W, et al. Optimization of extrusion and ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Jizi439 black wheat bran[J]. Processes, 2020, 8(9): 1153. DOI:10.3390/pr8091153.

[9] CĂLINOIU L F, VODNAR D C. Whole grains and phenolic acids: a review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability[J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1615. DOI:10.3390/nu10111615.

[10] KLEPACKA J, FORNAL L. Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46(8): 639-647. DOI:10.1080/10408390500511821.

[11] HE H J, QIAO J L, LIU Y, 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. DOI:10.1021/acs.jafc.1c04506.

[12] ZHOU S M, LIU X Z, GUO Y, et al. Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(4): 784-789. DOI:10.1016/j.carbpol.2010.03.040.

[13] 付元芳, 陈卓昀, 曾凡航, 等. 黑小麦阿拉伯木聚糖酶提工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 四川农业大学学报, 2019, 37(3): 374-382. DOI:10.16036/j.issn.1000-2650.2019.03.014.

[14] RUTHES A C, MARTÍNEZ-ABAD A, TAN H T, et al. Sequential fractionation of feruloylated hemicelluloses and oligosaccharides from wheat bran using subcritical water and xylanolytic enzymes[J]. Green Chemistry, 2017, 19(8): 1919-1931. DOI:10.1039/C6GC03473J.

[15] 金瑾, 刘延奇, 秦令祥. 蒸汽爆破辅助提取蔬菜多糖及苯酚-硫酸法测定其多糖含量的研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(5): 116-120. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2022.05.027.

[16] XU Z H, XIONG X, ZENG Q Z, et al. Alterations in structural and functional properties of insoluble dietary fibers-bound phenolic complexes derived from lychee pulp by alkaline hydrolysis treatment[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 127: 109335. DOI:10.1016/j.lwt.2020.109335.

[17] CHEN X, SUN K J, ZHUANG K, et al. Comparison and optimization of different extraction methods of bound phenolics from Jizi439 black wheat bran[J]. Foods, 2022, 11(10): 1478. DOI:10.3390/foods11101478.

[18] GUO R, XU Z X, WU S F, et al. Molecular properties and structural characterization of an alkaline extractable arabinoxylan from hull-less barley bran[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 218: 250-260. DOI:10.1016/j.carbpol.2019.04.093.

[19] KAUR A, SINGH B, YADAV M P, et al. Isolation of arabinoxylan and cellulose-rich arabinoxylan from wheat bran of different varieties

- and their functionalities[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 106287. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.106287.
- [20] 戴军, 朱松, 汤坚, 等. PMP柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J]. 分析测试学报, 2007, 26(2): 206-210. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2007.02.015.
- [21] LI Y, LI M L, WANG L L, et al. Effect of particle size on the release behavior and functional properties of wheat bran phenolic compounds during *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130751. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130751.
- [22] PUSSAYANAWIN V, WETZEL D L, FULCHER R G. Fluorescence detection and measurement of ferulic acid in wheat milling fractions by microscopy and HPLC[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 36(3): 515-520. DOI:10.1021/jf00081a027.
- [23] AGUEDO M, FOUGNIES C, DERMIENCE M, et al. Extraction by three processes of arabinoxylans from wheat bran and characterization of the fractions obtained[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 105: 317-324. DOI:10.1016/j.carbpol.2014.01.096.
- [24] RUMPAGAPORN P, REUHS B L, KAUR A, et al. Structural features of soluble cereal arabinoxylan fibers associated with a slow rate of *in vitro* fermentation by human fecal microbiota[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 130: 191-197. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.04.041.
- [25] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220106-050.
- [26] WANG L B, ZHANG L F, QIU S, et al. Rheological properties and structural characteristics of arabinoxylan hydrogels prepared from three wheat bran sources[J]. Journal of Cereal Science, 2019, 88: 79-86. DOI:10.1016/j.jcs.2019.05.003.
- [27] GUO R, CAO N N, WU Y, et al. Optimized extraction and molecular characterization of polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. seeds[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 231-242. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.10.002.
- [28] ROBERT P, MARQUIS M, BARRON C, et al. FT-IR investigation of cell wall polysaccharides from cereal grains. arabinoxylan infrared assignment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(18): 7014-7018. DOI:10.1021/jf051145y.
- [29] REVANAPPA S B, NANDINI C D, SALIMATH P V. Structural variations of arabinoxylans extracted from different wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in relation to chapati-quality[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 736-742. DOI:10.1016/j.foodhyd.2014.08.002.
- [30] ZHANG Z X, SMITH C, LI W L. Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: a critical review[J]. Food Research International, 2014, 65: 423-436. DOI:10.1016/j.foodres.2014.05.068.
- [31] LIU Y, WANG S W, KANG J, et al. Arabinoxylan from wheat bran: molecular degradation and functional investigation[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 107: 105914. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.105914.
- [32] DRAWBRIDGE P C, APEA-BAH F, BETA T. Bioaccessibility of ferulic acid in hullless barley varieties at stages of simulated *in vitro* digestion[J]. Cereal Chemistry, 2023, 100(4): 954-965. DOI:10.1002/cche.10673.