

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.80051

NaCl 和 CaCl_2 对箭筈豌豆芽苗菜酚类物质积累与抗氧化性的影响

Effects of NaCl stress and CaCl_2 supplemental on phenolic accumulation and antioxidant activity in common vetch sprouts

赵齐燕 唐 宁 赵德宸 张博雅 程永强

ZHAO Qi-yan TANG Ning ZHAO De-chen ZHANG Bo-ya CHENG Yong-qiang

(中国农业大学食品科学与营养工程学院植物源功能食品北京市重点实验室, 北京 100083)

(Beijing Key Laboratory of Functional Food from Plant Resources, College of Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

摘要:目的: 开发箭筈豌豆菜用价值, 探究盐溶液对箭筈豌豆芽苗菜酚类物质积累与抗氧化能力影响。方法: 通过超高效液相色谱分析 NaCl 和 CaCl_2 对箭筈豌豆酚类物质积累的影响, 并与豌豆苗、黄豆芽和绿豆芽进行对比, 探究盐溶液处理下 PAL、C4H、4CL 关键酶活力与基因相对表达量变化、抗氧化酶活性变化和抗氧化能力变化。结果: NaCl 和 CaCl_2 共同处理后箭筈豌豆芽苗菜总酚含量由 (10.63 ± 0.40) mg GAE/g DW 提升至 (15.76 ± 0.36) mg GAE/g DW。箭筈豌豆芽苗菜中共检出 16 种酚酸成分, 在两种盐离子共同作用下, 芦丁含量由 (22.50 ± 0.49) mg/kg DW 增长至 (57.38 ± 0.87) mg/kg DW, 分别为豌豆苗、黄豆芽、绿豆芽的 79.69、260.82、5.89 倍。Na⁺ 通过提高 PAL、4CL 和 C4H 基因相对表达量提高了酶活力, Na⁺ 和 Ca²⁺ 共同处理下基因相对表达量下降或无显著变化而酶活力提高。结论: NaCl 和 CaCl_2 混合培养箭筈豌豆芽苗菜能够富集酚类物质, 提升抗氧化能力。**关键词:** 箭筈豌豆芽苗菜; NaCl; CaCl_2 ; 酚酸; 基因相对表达量; 抗氧化

Abstract: Objective: The study aimed to develop the vegetable value of common vetch (CV) and explore the effects of salt solution on phenolic accumulation and antioxidant activity in CV sprouts. **Methods:** The effects of NaCl stress and supplemental CaCl_2 on free and combined phenolic accumulation in CV sprouts were analysed by UPLC in comparison with pea sprouts, soybean

sprouts and mung bean sprouts. The changes of key enzyme activities and gene relative expression levels of PAL, C4H and 4CL, antioxidant enzyme activities and antioxidant activities were investigated under NaCl and CaCl_2 treatments. **Results:** The total phenolics increased from (10.63 ± 0.40) mg GAE/g DW to (15.76 ± 0.36) mg GAE/g DW with the co-treatment of NaCl and CaCl_2 . Sixteen phenolic acids were detected in CV sprouts. The content of Rutin increased from (22.50 ± 0.49) mg/kg DW to (57.38 ± 0.87) mg/kg DW with the co-treatment, which was 79.69, 260.82, 5.89 times of pea sprout, soybean sprout and mung bean sprout respectively. Na⁺ increased enzyme activities of PAL, 4CL and C4H by increasing their relative gene expression levels. However, the co-treatment increased enzyme activities but their relative gene expression levels decreased or didn't change significantly. **Conclusion:** The co-treatment of NaCl and CaCl_2 can enrich the phenolic content and enhance its antioxidant activity of CV sprouts.

Keywords: common vetch sprouts; NaCl; CaCl_2 ; phenolic acid; gene relative expression level; antioxidant activity

箭筈豌豆 (*Vicia sativa* L.) 是蔷薇目豆科野豌豆属一年生草本植物, 是优良的绿肥^[1]、饲料^[2]和重要的粮食作物, 但菜用开发程度较低。与其他野豌豆属植物相比, 箭筈豌豆含有较丰富的酚类物质和较强的抗氧化性^[3], 多酚含量是白豆的 1.5 倍, 扁豆的 1.3 倍^[4], 多酚、黄酮还原力和清除活性均高于大豆多酚^[5], 酚酸是箭筈豌豆种子的优势成分^[6]。

NaCl 胁迫是一种非生物胁迫, 会增加活性氧 (ROS) 含量, 诱导酚酸积累和抗氧化能力的提升^[7]。NaCl 处理可缩短鳞茎草根茎长, 并促进总酚、总黄酮、总花青素、总游离氨基酸和总可溶性糖含量的积累^[8]; NaCl 处理下,

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (编号: CARS-22)

作者简介: 赵齐燕, 女, 中国农业大学在读硕士研究生。

通信作者: 程永强 (1972—), 男, 中国农业大学教授, 博士。

E-mail: chengyq@cau.edu.cn

收稿日期: 2022-03-20

红花中儿茶素、苯甲酸和山奈酚含量增加^[9];大麦芽苗在 Na^+ 作用下 PAL、C4H 和 4CL 的基因和酶活上升,酚酸和黄酮类化合物含量分别提高了 11.19% 和 32.54%^[10]。

CaCl_2 也具有调节酚酸含量的能力。在豆芽生长过程中, CaCl_2 可以通过初级代谢和次级代谢、离子运输、信号转导和转录调控^[11] 调节酚类、维生素以及其他营养物质含量; Ca^{2+} 还能够延长豆芽茎长,提高其产量^[12]。研究^[13] 表明, Ca^{2+} 在麦芽中通过调控基因、蛋白表达以及 PAL、C4H 和 4CL 等酶活性,促进酚的合成。

发芽是一种快速、清洁、经济的食品开发方式,在豌豆苗^[14]、花生芽^[15]、藜麦^[16] 等物质的萌发过程中,酚类物质和抗氧化能力都得到了迅速提升。已有研究^[4] 显示,箭筈豌豆黑暗条件发芽 5 d,其总酚含量比萌发前提高了 18.7 mg/kg,是白豆芽菜和扁豆芽菜的 1.40 和 1.36 倍。但 NaCl 和 CaCl_2 对箭筈豌豆芽苗菜酚酸含量和抗氧化系统的影响和作用机制暂不明确。因此研究拟采用 NaCl 和 CaCl_2 水培箭筈豌豆芽苗菜,以豌豆苗、黄豆芽、绿豆芽为对照,分析芽苗菜酚酸含量、抗氧化能力变化,并通过测定抗氧化酶关键酶活力、酚酸合成关键酶活力和基因表达探究两种盐溶液对其抗氧化水平影响的作用机理,以期为今后箭筈豌豆芽苗菜开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

箭筈豌豆种子、豌豆苗:市售;

绿豆芽:北京方圆平安生物科技股份有限公司;

黄豆芽:北京中禾清雅芽菜生产有限公司;

APX、CAT、SOD、GR、POD、GST 试剂盒:北京索莱宝科技有限公司;

原儿茶酸、香草酸、绿原酸、对香豆酸、没食子酸、槲皮素、阿魏酸、芦丁、儿茶素、芥子酸、肉桂酸、表儿茶素:HPLC $\geq$ 98%,北京索莱宝科技有限公司;

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH):HPLC $\geq$ 97%,东京化成工业株式会社;

芹菜素、山奈酚、丁香酸、水杨酸:HPLC $\geq$ 98%,上海安普实验科技股份有限公司;

对羟基苯甲酸、木犀草素:HPLC $\geq$ 98%,上海甄准生物科技有限公司;

其他试验试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

酶标仪:SMP500-15275-SWXN 型,美谷分子仪器有限公司;

智能培养箱:PRx-450C 型,宁波赛福实验仪器有限公司;

色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3 型(2.1 mm $\times$

100 mm,1.8 μm),美国沃特世公司;

超高效液相色谱串联质谱仪:ACQUITY UPLC TQD 型,美国沃特世公司;

离心机:5810R/5415D 型,德国艾本德公司;

qPCR 仪:7500 型,赛默飞科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 箭筈豌豆芽苗菜开发 参照 Swieca 等^[17] 的方法并稍作修改。在体积分数 0.1% 次氯酸钠溶液中浸种 30 min,蒸馏水洗至中性,去离子水中浸泡 12 h。并分别在去离子水、15 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L CaCl_2 、15 mmol/L NaCl+0.5 mmol/L CaCl_2 溶液中育苗。温度 25 $^{\circ}\text{C}$,湿度 80%,黑暗条件下培养 4 d,光照强度 20%,光照周期 12 h/12 h 条件下培养 1 d。采集芽苗菜可食用部分,立即用液氮冷冻,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存后冻干,0.42 mm 粉碎过筛,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 鲜重、茎长、种子活力测定 以 100 支去根芽苗菜为一组,用分析天平测定鲜重,游标卡尺测量茎长,并按式(1)计算种子活力指数。

$$V_1 = \sum (G_t / D_t) \times L, \quad (1)$$

式中:

V_1 ——种子活力指数;

L ——茎长,cm;

D_t ——种子发芽天数,d;

G_t ——第 t 天发芽种子数,个。

1.2.3 酚类物质提取与总酚、总黄酮含量测定

(1) 游离态和结合态酚类物质提取:参照马燕^[18] 的方法。

(2) 总酚、总黄酮含量测定:分别采用福林酚法^[10] 和黄酮沉淀法^[19]。

1.2.4 酚酸含量测定 参照黄彪等^[20] 的方法并稍作修改。流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.05% 甲酸水溶液,流速 0.3 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 5 μL ,自动进样器温度 20 $^{\circ}\text{C}$,梯度洗脱程序见表 1。负离子模式下,毛细管电压 2.90 kV,离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度 400 $^{\circ}\text{C}$,锥孔气(N_2)流速 50 L/h,脱溶剂气(N_2)流速 600 L/h,碰撞气(Ar)流速 0.07 mL/min。正离子模式下,毛细管电压 3.10 kV,其余条件与负离子模式相同。

1.2.5 PAL、C4H、4CL 酶活性测定

(1) PAL 活性:参照 Zhang 等^[21] 的方法。

(2) C4H 活性:参照 Chance 等^[22] 的方法。

(3) 4CL 活性:参照陈雷等^[23] 的方法。

1.2.6 酚酸合成关键酶基因表达量测定 采用 TRIzol LS Reagent 试剂盒提取箭筈豌豆芽苗菜总 RNA,经琼脂凝胶电泳验证,以总 RNA 为模板,用 Thermo 公司反转录试剂盒合成 cDNA。选取 *Tua* 基因为内参基因,依据 NCBI 数据库 Primer designing tool 设计引物(见表 2),目

标基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 比较阈值法表示。

1.2.7 APX、CAT、SOD、GR、POD、GST 酶活力测定 取新鲜芽苗菜制作组织匀浆,按试剂盒说明书测定 APX、CAT、SOD、GR、POD、GST 酶活力。

1.2.8 体外抗氧化评价

(1) DPPH 自由基清除率:参照 Koodkaew^[24] 的方法。

(2) ABTS 自由基清除率:参照 Islam 等^[25] 的方法。

1.2.9 数据处理 运用 Excel、SPSS 25.0 和 Origin 2022 软件处理数据,每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 对箭筈豌豆芽苗菜鲜重、茎长、种子活力的影响

由图 1 可知,15 mmol/L NaCl 处理下,鲜重降低了 20.11%,茎长缩短了 27.88%,种子活力指数降低了 29.57%,即 Na⁺ 给芽苗菜的鲜重、茎长、种子活力造成了不同程度的负面影响;0.5 mmol/L CaCl₂ 处理下,鲜重增

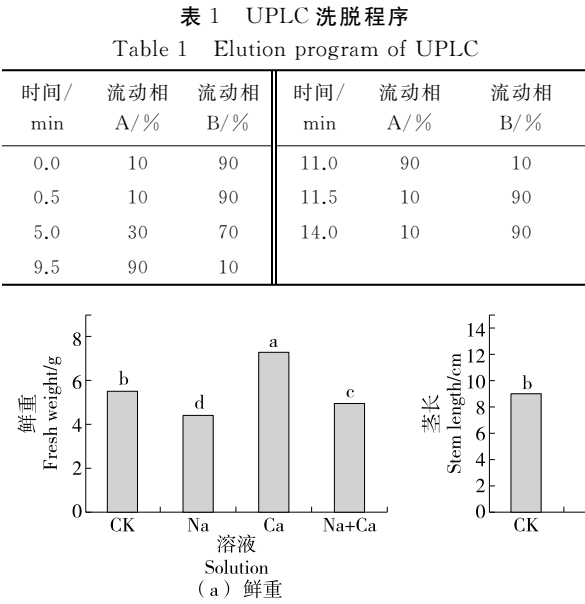
长了 31.70%,茎长增长了 26.05%,种子活力指数增长了 23.72%,即 Ca²⁺ 显著促进了箭筈豌豆芽苗菜的生长。两种盐溶液共施时,鲜重恢复了 13.94%,茎长和种子活力恢复至与对照组无显著差异,即 Ca²⁺ 缓和了 Na⁺ 的胁迫作用。

2.2 对箭筈豌豆芽苗菜总酚、总黄酮含量的影响

由图 2 可知,箭筈豌豆芽苗菜酚类物质主要以游离态存在。NaCl 处理下,游离态酚含量提升了 29.36%,游离态黄酮含量提升了 33.41%;CaCl₂ 处理下,游离态酚含量上升了 26.45%,游离态黄酮含量上升了 28.04%;两者

表 2 RT-qPCR 正向引物和反向引物

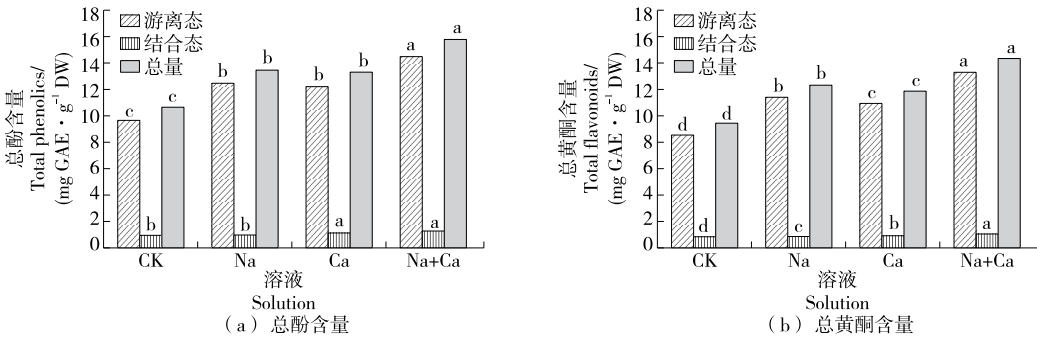
Table 2 Forward and reverse primers of RT-qPCR		
基因		引物序列(5—3)
PAL1-1	F	TCCAATCTGTTGATTTTACTA
	R	TATAATAGAACCAAAGCTCCG
PAL2-1	F	CATGGATAATACACGTTTG
	R	CAGAACAATAAGATGCCA
PAL2-3	F	CAATACTTGGCGAACCCG
	R	TGGCAAAGTGCAATGAGG
C4H	F	GCAACGTCGTCCTTCGACATC
	R	GCGGTATTGTGACACAACCT
4CL	F	CCTCCAATGCCAAGCTCCT
	R	GCGTCACCGTTATCCTCACA



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 1 鲜重、茎长、种子活力指数

Figure 1 Fresh weight, stem length and vigor index of seeds



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 2 总酚和总黄酮含量

Figure 2 The content of total phenolics and flavonoids

同施时,总酚含量由(10.63±0.40) mg GAE/g DW 提升至(15.76±0.36) mg GAE/g DW,总黄酮含量由(9.36±0.06) mg GAE/g DW 上升至(14.32±0.08) mg GAE/g DW。结果表明,NaCl 和 CaCl₂ 能够协同促进酚类物质富集。

2.3 箭筈豌豆芽苗菜酚酸含量变化

由表 3 可知,对照组中,共检出 16 种酚酸,总量为(51.00±3.06) mg/kg DW,其中,游离态酚酸总量为(21.87±0.81) mg/kg DW,结合态酚酸总量为(29.16±

表 3 箭筈豌豆芽苗菜游离态和结合态酚酸含量[†]

Table 3 The content of free and combined phenolic acid of CV sprouts					mg/kg DW				
化合物	施加离子	游离态	结合态	酚酸总量	化合物	施加离子	游离态	结合态	酚酸总量
没食子酸	CK	0.09±0.05 ^{ab}	0.83±0.12 ^b	0.90±0.07 ^c	芥子酸	CK	0.22±0.06 ^a	1.76±0.12 ^d	1.99±0.19 ^d
	Na	0.07±0.01 ^b	1.69±0.30 ^a	1.76±0.30 ^b		Na	0.23±0.05 ^a	3.89±0.02 ^a	4.12±0.08 ^a
	Ca	0.15±0.01 ^a	2.16±0.17 ^a	2.32±0.16 ^a		Ca	0.29±0.05 ^a	2.45±0.08 ^c	2.74±0.13 ^c
	Na+Ca	0.10±0.01 ^{ab}	1.94±0.16 ^a	2.05±0.17 ^{ab}		Na+Ca	0.14±0.06 ^b	3.59±0.11 ^b	3.73±0.01 ^b
原儿茶酸	CK	ND	0.14±0.02 ^b	0.14±0.02 ^b	阿魏酸	CK	1.19±0.02 ^b	7.02±0.48 ^c	8.18±0.68 ^c
	Na	ND	0.39±0.05 ^a	0.39±0.05 ^a		Na	1.09±0.06 ^b	11.60±0.84 ^a	12.66±0.90 ^{ab}
	Ca	ND	0.42±0.05 ^a	0.42±0.05 ^a		Ca	2.81±0.61 ^a	9.49±0.22 ^b	11.87±0.37 ^b
	Na+Ca	ND	0.46±0.05 ^a	0.46±0.05 ^a		Na+Ca	1.09±0.31 ^b	12.04±0.2 ^a	13.09±0.52 ^a
儿茶素	CK	0.13±0.01 ^a	ND	0.13±0.01 ^a	芦丁	CK	16.19±0.90 ^b	6.31±0.39 ^c	22.50±0.49 ^c
	Na	0.13±0.03 ^a	ND	0.13±0.03 ^a		Na	17.31±0.13 ^b	5.51±0.17 ^c	22.81±0.30 ^c
	Ca	0.04±0.02 ^b	ND	0.04±0.02 ^b		Ca	33.75±2.23 ^a	16.30±1.30 ^b	50.05±3.52 ^b
	Na+Ca	0.10±0.01 ^a	ND	0.10±0.01 ^a		Na+Ca	35.18±0.77 ^a	22.20±0.10 ^a	57.38±0.87 ^a
对羟基苯甲酸	CK	ND	1.18±0.53 ^d	1.18±0.53 ^d	水杨酸	CK	0.06±0.01 ^b	0.04±0.01 ^b	0.10±0.02 ^b
	Na	ND	2.47±0.11 ^c	2.47±0.11 ^c		Na	0.15±0.01 ^a	0.10±0.00 ^a	0.25±0.01 ^a
	Ca	ND	6.10±0.47 ^a	6.10±0.47 ^a		Ca	ND	ND	ND
	Na+Ca	ND	5.28±0.14 ^b	5.28±0.14 ^b		Na+Ca	ND	ND	ND
绿原酸	CK	0.35±0.13 ^b	ND	0.35±0.13 ^b	肉桂酸	CK	ND	ND	ND
	Na	0.48±0.06 ^a	ND	0.48±0.06 ^a		Na	ND	ND	ND
	Ca	0.54±0.12 ^a	ND	0.54±0.12 ^a		Ca	0.68±0.01	ND	0.68±0.01
	Na+Ca	0.42±0.15 ^a	ND	0.42±0.15 ^a		Na+Ca	0.64±0.07	ND	0.64±0.07
香草酸	CK	0.03±0.01 ^b	0.16±0.03 ^b	0.19±0.03 ^b	槲皮素	CK	0.99±0.02	1.65±0.01 ^c	2.63±0.01 ^c
	Na	0.14±0.03 ^a	0.49±0.07 ^a	0.63±0.02 ^a		Na	0.95±0.00	1.20±0.01 ^d	2.15±0.01 ^d
	Ca	0.16±0.03 ^a	0.53±0.11 ^a	0.69±0.03 ^a		Ca	1.01±0.01	2.58±0.10 ^a	3.59±0.09 ^a
	Na+Ca	0.14±0.01 ^a	0.53±0.11 ^a	0.67±0.06 ^a		Na+Ca	1.02±0.00	1.79±0.03 ^b	2.81±0.02 ^b
表儿茶素	CK	ND	ND	ND	木犀草素	CK	0.78±0.10	0.62±0.02 ^b	1.41±0.12 ^b
	Na	ND	ND	ND		Na	0.85±0.03	0.82±0.13 ^b	1.67±0.10 ^{ab}
	Ca	ND	ND	ND		Ca	0.83±0.02	0.68±0.02 ^b	1.51±0.04 ^b
	Na+Ca	ND	ND	ND		Na+Ca	0.81±0.03	1.10±0.08 ^a	1.90±0.11 ^a
丁香酸	CK	ND	0.14±0.03	0.14±0.03	山奈酚	CK	0.93±0.28	2.59±0.40 ^a	3.52±0.68 ^{ab}
	Na	ND	0.14±0.07	0.14±0.07		Na	1.32±0.07	1.58±0.19 ^b	2.90±0.25 ^b
	Ca	ND	0.17±0.06	0.17±0.06		Ca	1.78±0.57	2.70±0.20 ^a	4.48±0.36 ^a
	Na+Ca	ND	0.15±0.06	0.15±0.06		Na+Ca	1.47±0.30	2.13±0.13 ^{ab}	3.60±0.16 ^{ab}
对香豆酸	CK	0.44±0.03 ^a	6.26±0.04 ^c	6.70±0.02 ^c	芹菜素	CK	0.47±0.01	0.47±0.02	0.94±0.03
	Na	1.01±0.04 ^b	4.93±0.11 ^d	5.95±0.15 ^d		Na	0.54±0.02	0.47±0.00	1.01±0.02
	Ca	2.51±0.01 ^a	9.28±0.24 ^a	11.79±0.25 ^a		Ca	0.47±0.03	0.45±0.00	0.92±0.03
	Na+Ca	0.94±0.01 ^c	7.19±0.07 ^b	8.13±0.07 ^b		Na+Ca	0.48±0.02	0.45±0.00	0.93±0.02

[†] ND 表示未检测出;不同处理字母不同表示差异显著(P<0.05)。

2.22) mg/kg DW,主要为芦丁、阿魏酸和槲皮素,含量分别为(22.50±0.49),(8.18±0.68),(6.70±0.02) mg/kg DW。

箭筈豌豆芽苗菜中,儿茶素、绿原酸、肉桂酸只以游离态存在,对羟基苯甲酸、原儿茶酸只以结合态存在,其余酚酸以游离、结合两态存在。在 NaCl 处理下,8 种酚酸含量显著升高,其中阿魏酸含量上升了 54.77%,芥子酸含量上升了 107.03%;在 CaCl₂ 处理下,芦丁含量上升了 122.44%,对香豆酸含量上升了 75.97%,槲皮素、芥子酸、阿魏酸等 11 种酚酸含量也有所提升。

NaCl 和 CaCl₂ 同施组,芦丁含量比对照组、NaCl 处理组和 CaCl₂ 处理组分别提升了 150.02%,151.56%,114.65%,阿魏酸含量提升至(13.09±0.52) mg/kg DW,木犀草素含量提升了 34.75%,原儿茶酸含量提升了 228.57%。综上,Na⁺ 和 Ca²⁺ 同施对芦丁、阿魏酸、木犀草素和原儿茶酸的合成具有协同促进作用。

对香豆酸、槲皮素含量在 NaCl 处理下分别下降了 11.19%,22.32%,在 NaCl 和 CaCl₂ 共同作用下,二者分别比对照组提高了 21.34%,6.80%,山奈酚在 NaCl 作用下下降了 21.37%,经 NaCl 和 CaCl₂ 共同作用恢复至与对照组无明显差异。试验表明,Ca²⁺ 解除了 Na⁺ 对对香豆酸、槲皮素、山奈酚合成的胁迫作用。

由表 4 可知,豌豆苗中优势成分是对香豆酸、阿魏酸、

芥子酸、山奈酚和槲皮素,黄豆芽优势成分是对香豆酸、阿魏酸、芥子酸、丁香酸,绿豆芽中含量最为突出的是对香豆酸。豌豆苗、黄豆芽和绿豆芽中的对香豆酸含量远高于箭筈豌豆芽苗菜。

蒸馏水培养下,箭筈豌豆芽苗菜中共检出 16 种酚酸,豌豆苗、黄豆芽、绿豆芽中分别只检出 12,8,9 种酚酸,说明箭筈豌豆芽苗菜的酚酸种类更为丰富。箭筈豌豆芽苗菜中芦丁和对羟基苯甲酸含量显著高于豌豆苗、黄豆芽和绿豆芽。箭筈豌豆芽苗菜芦丁含量为(22.50±0.49) mg/kg DW,分别为豌豆苗、黄豆芽及绿豆芽的 31.25,102.27,2.31 倍。对羟基苯甲酸含量为(1.18±0.53) mg/kg DW,是豌豆苗的 1.51 倍,而黄豆芽和绿豆芽中未检出对羟基苯甲酸。

NaCl—CaCl₂ 体系富集了箭筈豌豆芽苗菜的优势酚酸组分。在 NaCl 和 CaCl₂ 培养下,箭筈豌豆芽苗菜中芦丁含量达(57.38±0.87) mg/kg DW,分别为豌豆苗、黄豆芽及绿豆芽的 79.69,260.82,5.89 倍。NaCl 和 CaCl₂ 共同培养的箭筈豌豆芽苗菜中对羟基苯甲酸含量为(5.28±0.14) mg/kg DW,是豌豆苗的 6.77 倍;其阿魏酸含量是绿豆芽的 1.21 倍。

综上,箭筈豌豆芽苗菜酚酸种类丰富,芦丁、对羟基苯甲酸含量显著高于豌豆苗、绿豆芽和黄豆芽,氯化钠和氯化钙混合处理后再进一步提高了箭筈豌豆芽苗菜的酚酸

表 4 豌豆苗酚酸含量[†]
Table 4 The content of phenolic acids in pea sprouts mg/kg DW

化合物	豌豆苗			黄豆芽			绿豆芽		
	游离态	结合态	总量	游离态	结合态	总量	游离态	结合态	总量
没食子酸	ND	ND	ND	0.99±0.12	ND	0.99±0.12	ND	ND	ND
原儿茶酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
儿茶素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
对 羟 基 苯 甲酸	ND	0.78±0.14	0.78±0.14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
绿原酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
香草酸	ND	ND	ND	0.48±0.16	ND	0.48±0.16	0.41±0.01	ND	0.41±0.01
表儿茶素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
丁香酸	ND	ND	ND	1.13±0.04	35.33±3.26	36.46±3.30	ND	ND	ND
对香豆酸	2.39±0.15	173.38±0.89	175.77±0.74	0.05±0.01	107.66±0.06	107.70±0.06	3.59±0.12	104.00±3.10	107.59±2.98
芥子酸	0.59±0.06	58.28±4.16	58.87±4.22	0.09±0.01	36.89±0.48	36.99±0.47	ND	0.25±0.05	0.25±0.05
阿魏酸	3.33±0.27	67.33±4.05	70.66±4.32	0.74±0.05	43.82±2.64	44.56±2.59	0.62±0.04	10.22±0.81	10.84±0.85
芦丁	1.21±0.02	ND	0.72±0.72	0.22±0.03	ND	0.22±0.03	9.30±1.63	0.44±0.02	9.75±1.61
水杨酸	ND	ND	ND	0.96±0.23	1.19±0.06	2.16±0.29	ND	ND	ND
肉桂酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.43±0.47	ND	1.43±0.47
槲皮素	1.10±0.01	39.80±1.81	40.90±1.80	0.99±0.10	ND	0.99±0.10	0.95±0.02	2.68±0.09	3.63±0.08
木犀草素	1.11±0.82	0.94±0.05	2.05±0.77	ND	0.56±0.01	0.56±0.01	ND	ND	ND
山奈酚	2.33±2.13	44.29±2.76	46.62±0.63	ND	4.03±0.47	4.03±0.47	0.53±0.04	2.04±0.50	2.57±0.46
芹菜酸	ND	ND	ND	1.14±0.02	ND	1.14±0.02	0.56±0.03	0.49±0.01	1.05±0.02

[†] ND 表示未检测出。

含量和开发价值。

2.4 酚酸合成关键酶活力与基因表达量变化

2.4.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活力与基因表达量变化

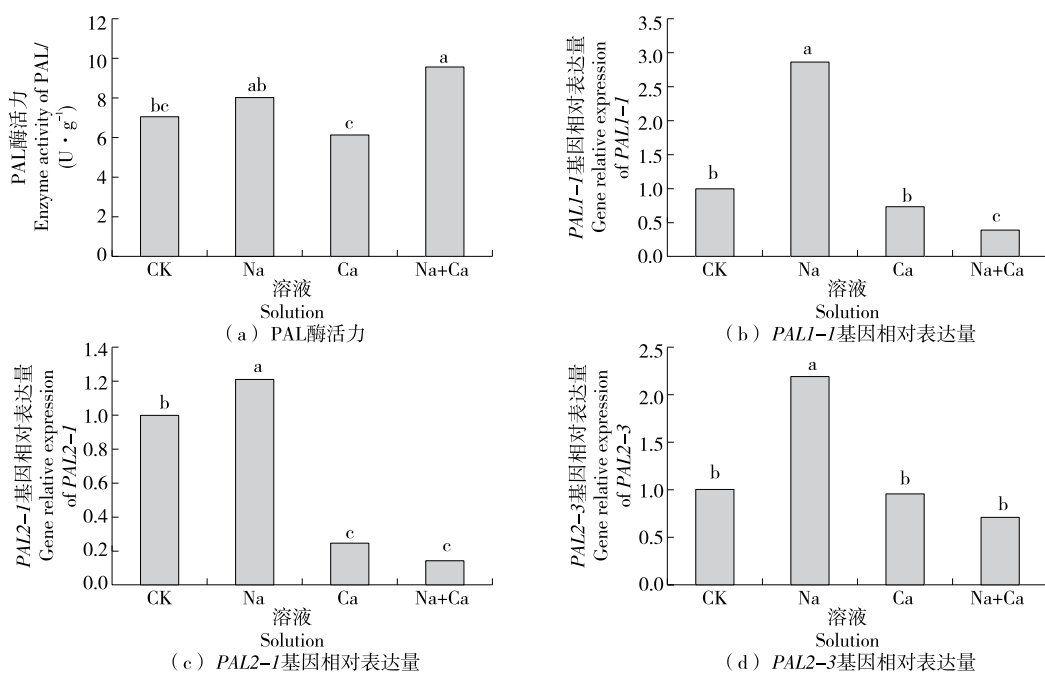
由图 3 可知, NaCl 处理下, PAL 酶活力由 (7.04 ± 0.30) U/g 上升至 (8.03 ± 0.58) U/g, *PAL1-1*、*PAL2-1*、*PAL2-3* 基因相对表达量分别上升了 187.50%, 20.70%, 119.30%; CaCl_2 处理下, PAL 酶活力略有下降, *PAL1-1*、*PAL2-1*、*PAL2-3* 基因相对表达量分别下降了 26.30%, 75.50%, 3.70%; 两种盐溶液共同施加时, 基因相对表达量大幅下降至最低, 而 PAL 酶活力显著提升至对照组、NaCl 处理组、 CaCl_2 处理组的 1.36, 1.19, 1.57 倍。

2.4.2 肉桂酸-4-羟化酶(C4H)活力与基因表达量变化

由图 4 可知, 在 NaCl 处理下, C4H 酶活力由

$(5\ 025 \pm 162)$ U/g 大幅下降至 $(2\ 702 \pm 87)$ U/g, *C4H* 基因相对表达量无显著变化; CaCl_2 处理下, *C4H* 酶活力无明显变化, *C4H* 基因相对表达量下降了 23.2%; 两种盐溶液共同施加时, *C4H* 酶活力显著上升, 达对照组、NaCl 处理组、 CaCl_2 处理组的 1.15, 2.14, 1.08 倍, 但基因相对表达量不到对照组的 1/3。

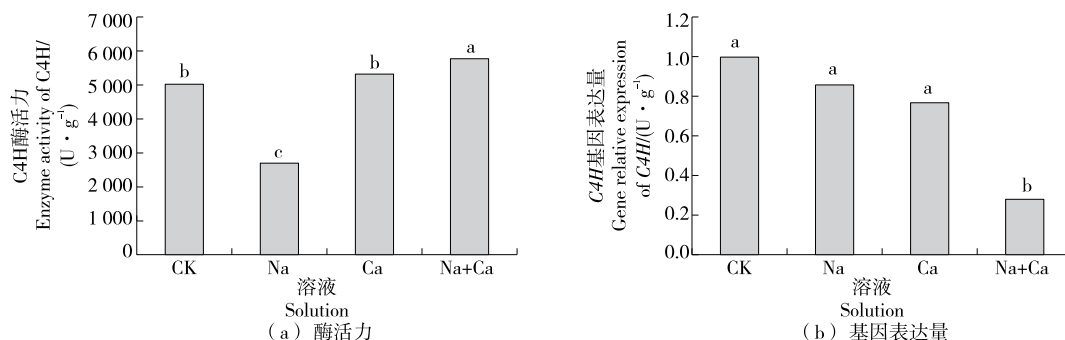
2.4.3 4-香豆酸:辅酶 A 连接酶(4CL)活力与基因表达量变化 由图 5 可知, 在 NaCl 处理下 4CL 酶活力由 (2.39 ± 0.09) U/g 上升至 (3.59 ± 0.11) U/g, *4CL* 基因相对表达量显著上升了 673.90%; CaCl_2 处理下, 4CL 酶活力上升, *4CL* 基因相对表达量无显著变化; 两种盐溶液共同施加时, 4CL 酶活力显著上升, *4CL* 基因相对表达量无显著变化。



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 3 PAL 酶活力与基因表达量

Figure 3 Enzyme activity of PAL and its gene relative expression level



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 4 C4H 酶活力与基因表达量

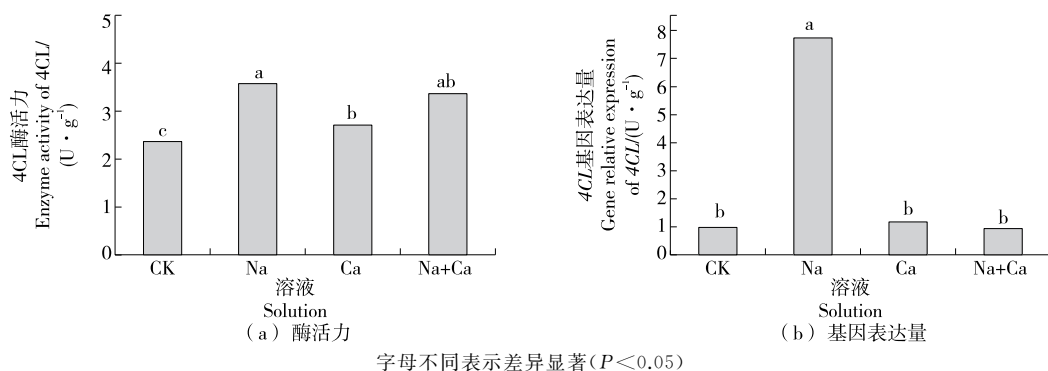
Figure 4 The enzyme activity and relative gene expression of C4H

PAL、C4H 和 4CL 是苯丙烷代谢途径的关键酶。PAL 非氧化性脱氨生成肉桂酸, C4H 催化反式肉桂酸的羟基化反应, 生成对香豆酸, 对香豆酸被 4CL 催化生成香豆酰辅酶 A^[26], 三者酶活上升能够促进类黄酮代谢阶段合成多酚、黄酮等次级代谢产物。试验表明, 在 NaCl 处理下, 箭筈豌豆芽苗菜 PAL、C4H、4CL 基因相对表达量均发生显著变化, 且变化趋势与酶活力变化趋势相同, 因此推测 Na^+ 是通过调控 PAL1-1、PAL2-1、PAL2-3、C4H 和 4CL 基因相对表达, 调控 mRNA 和蛋白的合成, 进而调节 PAL、C4H、4CL 酶合成的数量, 实现酶活力的调节。在 CaCl_2 处理下, PAL1-1、PAL2-3、C4H、4CL 基因相对表达量未发生显著变化, PAL2-1 大幅度下降, 其变化趋势与酶活力变化趋势不完全相同, 因此推测 Ca^{2+} 一方面能够通过调控基因相对表达调节 PAL、C4H、4CL

酶合成的数量, 另一方面, Ca^{2+} 还能够由胞外向胞内转运, 提升胞内 Ca^{2+} 浓度, Ca^{2+} 作为第二信使通过调控信号级联放大, 调节 PAL 单位酶活力。在 NaCl— CaCl_2 体系作用下, PAL、C4H、4CL 基因相对表达量为 4 组中最低而酶活力均大幅上升, 因此推测, NaCl— CaCl_2 体系大大强化了信号级联放大作用, 机体单位酶活力显著提升, 不需要合成较多酶即可满足需求, 所以酶的基因表达量未上升。

2.5 抗氧化酶活力变化

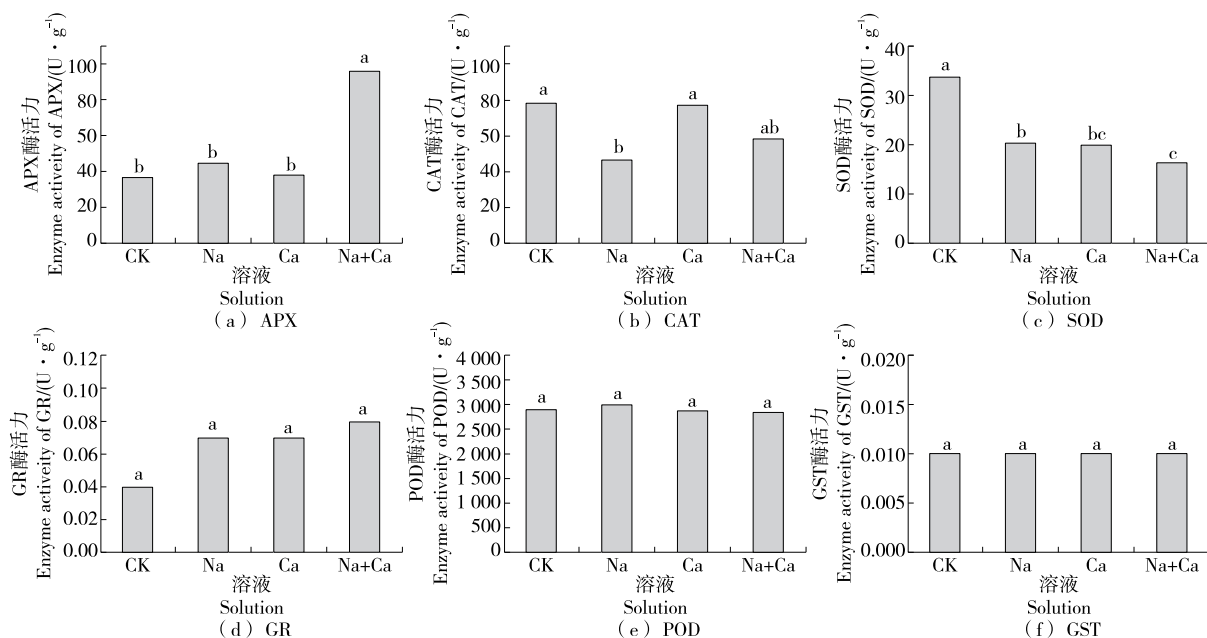
由图 6 可知, 在 NaCl 和 CaCl_2 共同处理下, APX 酶活上升了 162.82%, GR 酶活上升了 125.00%, SOD 酶活下降了 105.36%, 其余酶活力未有显著变化。结果表明, NaCl 和 CaCl_2 共同作用激活了 APX、GR 酶, 提升其酶活力来发挥抗氧化作用, POD、GST 两种酶活力并未因盐离



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 5 4CL 酶活力与基因表达量

Figure 5 The enzyme activity and relative gene expression of 4CL



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 6 抗氧化酶活力变化

Figure 6 The activity changes of the antioxidant enzymes

子而发生显著变化,因此推测酶促抗氧化系统未被完全激活。

2.6 体外抗氧化评价

2.6.1 DPPH 自由基体外抗氧化评价 由图 7 可知,4 组处理中,箭筈豌豆芽苗菜游离酚对 DPPH 自由基的 EC_{50} 值始终低于结合酚,即游离酚对 DPPH 自由基的清除能力显著高于结合酚。 $NaCl+CaCl_2$ 处理组箭筈豌豆芽苗菜游离酚对 DPPH 自由基的清除能力最强, EC_{50} 值为 1.33 mg/mL 。箭筈豌豆芽苗菜游离酚和结合酚分别在 $0.80\sim 3.15, 4.20\sim 8.45\text{ mg/mL}$ 的质量浓度范围内与 DPPH 自由基清除能力呈正相关,随着浓度的增加,箭筈豌豆芽苗菜游离酚对 DPPH 自由基的清除能力逐渐上升,清除能力强弱为 $NaCl+CaCl_2$ 处理组 $> CaCl_2$ 处理组 $> NaCl$ 处理组 $>$ 对照组。

2.6.2 ABTS 自由基体外抗氧化评价 由图 8 可知,游离酚对 ABTS 自由基的清除能力显著高于结合酚, $NaCl+CaCl_2$ 处理组箭筈豌豆芽苗菜游离酚对 ABTS 自由基的清除能力最强, EC_{50} 值为 0.71 mg/mL 。箭筈豌豆芽苗菜游离酚和结合酚分别在 $0.40\sim 1.65, 50.00\sim 100.00\text{ mg/mL}$ 的质量浓度范围内与 ABTS 自由基清除能力呈正相关,随着浓度的增加,箭筈豌豆芽苗菜游离酚

对 ABTS 自由基的清除能力逐渐上升,清除能力强弱为 $NaCl+CaCl_2$ 处理组 $> CaCl_2$ 处理组 $> NaCl$ 处理组 $>$ 对照组。

结果表明,箭筈豌豆芽苗菜游离酚的抗氧化性优于结合酚, $NaCl$ 和 $CaCl_2$ 单独培养箭筈豌豆芽苗菜均可以提高其抗氧化能力,但两者同施培养的箭筈豌豆芽苗菜对 DPPH 和 ABTS 两种自由基均展示出了更高的清除能力,抗氧化能力强弱为 $NaCl+CaCl_2$ 处理组 $> CaCl_2$ 处理组 $> NaCl$ 处理组 $>$ 对照组。

2.6.3 苗菜酚类物质含量与抗氧化性的相关性分析 由表 5 可知,箭筈豌豆芽苗菜游离态和结合态总酚、总黄酮含量与 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除能力呈极显著正相关性。在箭筈豌豆芽苗菜中,APX、GR 与 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除能力呈正相关,CAT、POD 与 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除能力基本无相关性,而 SOD 与酚类提取液的 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除能力呈显著负相关。

结果表明,酚类物质和酶促抗氧化系统共同发挥了抗氧化作用,与唐文文等^[27]、Chen 等^[28]的研究结果一致。箭筈豌豆芽苗菜酚类物质含量与抗氧化能力显著正相关,因此 $NaCl$ 和 $CaCl_2$ 可以通过提升酚类物质含量进

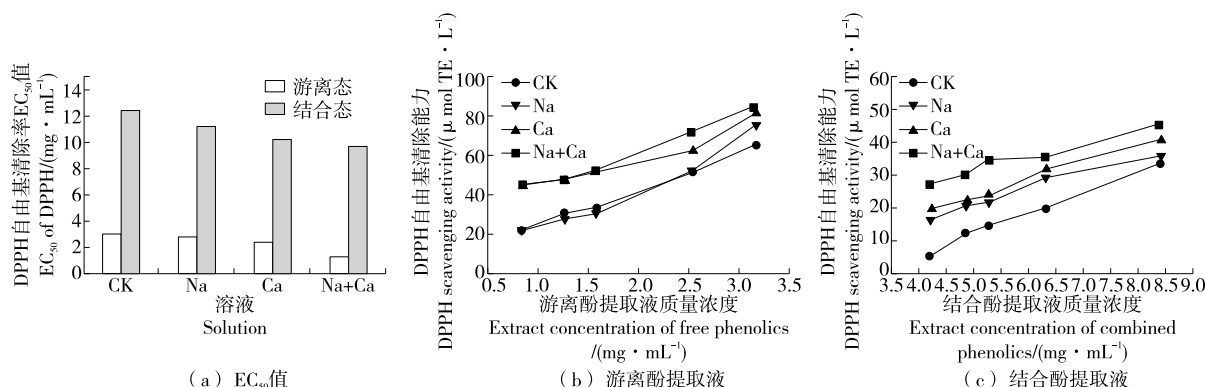


图 7 芽苗菜 DPPH 自由基清除能力

Figure 7 DPPH scavenging activity of sprouts

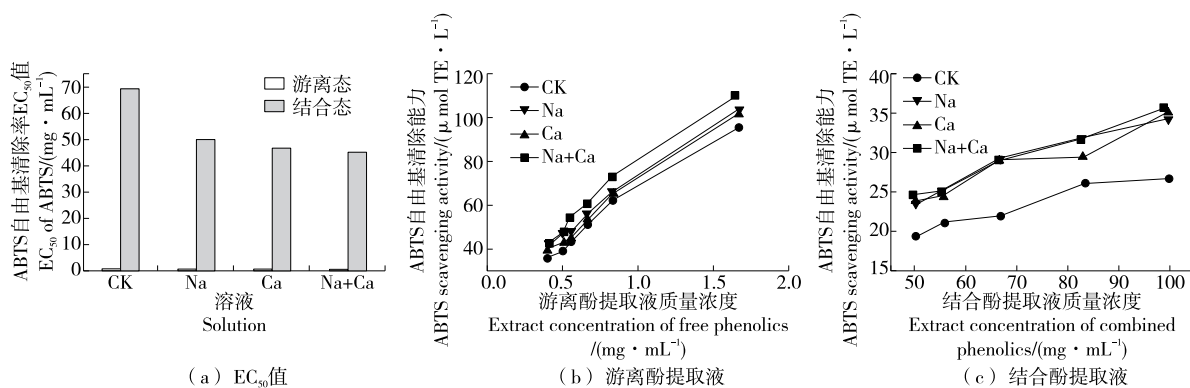


图 8 芽苗菜 ABTS 自由基清除能力

Figure 8 ABTS scavenging activity of sprouts

表 5 酚类物质、抗氧化酶与抗氧化性之间的相关性[†]

Table 5 Correlation of phenolic content, antioxidant enzyme and antioxidant capability

组别	总酚含量 (游离)	总黄酮含量 (游离)	总酚含量 (结合)	总黄酮含量 (结合)	APX	GR	CAT	POD	SOD
DPPH 自由基清除率(游离)	0.914 * *	0.985 * *	0.958 * *	0.858 * *	0.628 *	0.734 * *	-0.270	-0.158	-0.943 * *
DPPH 自由基清除率(结合)					0.767 * *	0.752 * *	-0.108	-0.247	-0.798 * *
ABTS 自由基清除率(游离)	0.877 * *	0.966 * *	0.674 *	0.628 *	0.821 * *	0.728 * *	-0.581 *	-0.068	-0.922 * *
ABTS 自由基清除率(结合)					0.466	0.664 *	-0.428	-0.098	-0.961 * *

[†] * * 代表相关性极显著($P<0.01$), * 代表相关性显著($P<0.05$)。

一步提高箭筈豌豆芽苗菜的抗氧化能力。 Na^+ 和 Ca^{2+} 激活了 APX 和 GR 酶促系统,通过提升单位酶活力提升了 APX 和 GR 清除自由基的能力,进而提高了芽苗菜抗氧化能力;DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除能力与 CAT、POD 无相关关系,甚至与 SOD 酶活力呈显著负相关,推测贡献箭筈豌豆芽苗菜抗氧化性的主要是非酶促抗氧化系统中的酚类物质,酚类物质和 APX、GR 酶促抗氧化能够平衡箭筈豌豆芽苗菜在生长 5 d 过程中产生的自由基,能够满足机体需要,因此酶促抗氧化系统未被完全激活。

3 结论

试验表明,15 mmol/L NaCl 会抑制箭筈豌豆芽苗菜生物量的积累,0.5 mmol/L CaCl_2 能够促进其生长,二者单独施用均能够富集酚类物质,增强抗氧化能力。将 15 mmol/L NaCl 和 0.5 mmol/L CaCl_2 混合施用于箭筈豌豆芽苗菜时, Ca^{2+} 缓解甚至解除了 Na^+ 带来的生物胁迫作用,二者通过提高 PAL、C4H 和 4CL 酶活力促进了对香豆酸、槲皮素、山奈酚、芦丁、阿魏酸、木犀草素、原儿茶酸等酚类物质的富集,酶促抗氧化系统被部分激活,箭筈豌豆芽苗菜展现出了更高的抗氧化能力。芦丁是箭筈豌豆芽苗菜酚酸的优势成分,含量为 (22.50 ± 0.49) mg/kg DW,经两种盐离子作用,芦丁含量富集到 (57.38 ± 0.87) mg/kg DW,约为豌豆苗、黄豆芽及绿豆芽的 79.69、260.82、5.89 倍。

NaCl 、 CaCl_2 共同作用下能够提高茎长,但对粗细无显著影响,后续可以尝试其他盐离子与 NaCl 、 CaCl_2 混用,进一步提高箭筈豌豆芽苗菜的生物量;也可以就箭筈豌豆芽苗菜丰富的酚类物质开展动物试验,进行体内评价,或提取芦丁等优势成分开展功能性评价。

参考文献

[1] DRAGICEVIC V, JANOSEVIC B, BRANKOV M, et al. Enhanced nutritional quality of sweet maize kernel in response to cover crops and bio-Fertilizer[J]. Agronomy, 2021, 11: 981.
[2] LUO Cai-yun, WANG Shi-ping, ZHAO Liang, et al. Seeding ratios and phosphate fertilizer on ecosystem carbon exchange of common vetch and oat[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2017, 109: 149-160.

[3] PASTOR-CAVADA E, JUAN R, PASTOR J E, et al. Antioxidant activity in the seeds of 28 vicia species from southern Spain[J]. Journal of Food Biochemistry, 2011, 35(5): 1 373-1 380.
[4] GHARACHORLOO M, TARZI B G, BAHARINIA M. The Effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activity of pulses[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2013, 90(3): 407-411.
[5] MEGÍAS C, PASTOR-CAVADA E, TORRES-FUENTES C, et al. Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of Vicia sativa polyphenol extracts [J]. European Food Research & Technology, 2009, 230(2): 353-359.
[6] MAGALHAES S C Q, TAVEIRA M, CABRITA A R J, et al. European marketable grain legume seeds: Further insight into phenolic compounds profiles[J]. Food Chemistry, 2017, 215(15): 177-184.
[7] GUETA-DAHAN Y, YANIV Z, BEN-HAYYIM Z G. Salt and oxidative stress: Similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus[J]. Planta, 1997, 203(4): 460-469.
[8] GOHARRIZI K J, RIAHI-MADVAR A, REZAEI F, et al. Effect of salinity stress on enzymes' activity, ions concentration, oxidative stress parameters, biochemical traits, content of sulforaphane, and CYP79F1 gene expression level in lepidium draba plant[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2020, 39(3): 1 075-1 094.
[9] KIM N S, KIM J K, SATHASIVAM R, et al. Impact of betaine under salinity on accumulation of phenolic compounds in safflower (Carthamus tinctorius L.) sprouts[J]. Natural Product Communications, 2021, 16(5): 1934578X2110150.
[10] WANG Mian, DING Yu-xuan, WANG Qiao-e, et al. NaCl treatment on physio-biochemical metabolism and phenolics accumulation in barley seedlings[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127282.
[11] WANG Xin-kun, YANG Run-qiang, ZHOU Yu-lin, et al. A comparative transcriptome and proteomics analysis reveals the positive effect of supplementary Ca^{2+} on soybean sprout yield and nutritional qualities[J]. Journal of Proteomics, 2016, 143: 161-172.
[12] WANG Xin-kun, YANG Run-qiang, JIN Xiao-lin, et al. Effect of supplemental Ca^{2+} on yield and quality characteristics of soybean sprouts[J]. Scientia Horticulturae, 2016, 198: 352-362.
[13] MA Yan, WANG Pei, ZHOU Ting, et al. Role of Ca^{2+} in phenolic compound metabolism of barley (Hordeum vulgare L.) sprouts under NaCl stress[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(11): 5 176-5 186.

- [14] COFFIGNIEZ F, RYCHLIK M, MESTRES C, et al. Modelling folates reaction kinetics during cowpea seed germination in comparison with soaking[J]. Food Chemistry, 2020, 340: 127960.
- [15] RAO Huan, XUE Feng, MA Su-hong, et al. Contribution of slightly acidic electrolytic water (SAEW) to food safety, nutrients enrichment and allergenicity reduction of peanut sprouts [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(3): e16396.
- [16] 陈益胜, 舒蓝萍, 徐学明, 等. 3 种藜麦发芽过程中生物活性物质及其抗氧化活性的变化规律[J]. 食品与机械, 2020, 36(3): 34-38.
- CHEN Yi-sheng, SHU Lan-ping, XU Xue-ming, et al. Changes of bioactive substances and antioxidant properties of three kinds of quinoa during germination [J]. Food & Machinery, 2020, 36(3): 34-38.
- [17] SWIECA M, GAWLIK-DZIKI U, KOWALCZYK D, et al. Impact of germination time and type of illumination on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of Lens culinaris sprouts[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 140: 87-95.
- [18] 马燕. NaCl 胁迫下 GABA 介导的大麦芽苗酚酸富集机理[D]. 南京: 南京农业大学, 2019: 28-30.
- MA Yan. The mechanism of phenolic acid accumulation mediated by GABA in barley seedlings under NaCl stress[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019: 28-30.
- [19] DEETAE P, PARICHANON P, TRAKUNLEEWATTHANA P, et al. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas[J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 953-959.
- [20] 黄彪, 何伟, 吴建鸿, 等. UPLC-MS/MS 同时测定铁皮石斛茎、叶、花中酚类组分的含量[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 262-268.
- HUANG Biao, HE Wei, WU Jian-hong, et al. Simultaneous determination of phenolic components in dendrobium officinale stems, leaves and flowers by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2021, 42(10): 262-268.
- [21] ZHANG Zhan-quan, TIAN Shi-ping, ZHU Zhu, et al. Effects of 1-methylcyclopropene(1-MCP) on ripening and resistance of jujube (Zizyphus jujuba cv. Huping) fruit against postharvest disease[J]. LWT-Food Science and Technology, 2012, 45(1): 13-19.
- [22] CHANCE B, MAEHLY A C. Assay of catalases and peroxidases[J]. Methods in Enzymology, 1955(2): 764-775.
- [23] 陈雷, 常丽, 曹福亮, 等. 银杏叶黄酮类化合物含量及相关酶活性对温度和干旱胁迫的响应[J]. 西北植物学报, 2013, 33(4): 755-762.
- CHEN Lei, CHANG Li, CAO Fu-liang, et al. Effects of temperature and soil water deficit on the flavonoid content and activities of enzymes involved in ginkgo leaves[J]. Acta Botanica Sinica of Northwest China, 2013, 33(4): 755-762.
- [24] KODAKAEW I. NaCl and glucose improve health-promoting properties in mung bean sprouts[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 247: 235-241.
- [25] ISLAM M Z, PARK B J, KANG H M, et al. Influence of selenium biofortification on the bioactive compounds and antioxidant activity of wheat microgreen extract [J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125763.
- [26] 陆胜波. 铁核桃果实青皮和内种皮芦丁合成的转录组与代谢组分析[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020: 8-11.
- LU Sheng-bo. Transcriptomes and metabolomics profiling reveals rutin biosynthesis of green husk and kernel pellicle in walnut fruit (Juglans sigillata Dode.) [D]. Guiyang: Guizhou University, 2020: 8-11.
- [27] 唐文文, 夏俊丽, 陈垣. 铁皮石斛茎、叶、花功能性成分、抗氧化活性及其相关性[J]. 食品与机械, 2021, 37(7): 45-50.
- TANG Wen-wen, XIA Jun-li, CHEN Huan. Analysis of functional composition, antioxidant activity and their correlation in stem, leaf and flower from Dendrobium officinale [J]. Food & Machinery, 2021, 37(7): 45-50.
- [28] CHEN Lin, TAN Jun-tong, ZHAO Xue, et al. Energy regulated enzyme and non-enzyme-based antioxidant properties of harvested organic mung bean sprouts (Vigna radiata) [J]. LWT, 2019, 107: 228-235.

(上接第 46 页)

- [16] International Organization for Standardization. No.81-Routine analytical machine for e-cigarette aerosol generation collection: Definitions and standard conditions: ISO 20768[S]. [S.1]: CORESTA, 2015: 1-6.
- [17] 中华人民共和国烟草行业. 烟草及烟草制品水分的测定 气相色谱法: YC/T 345—2010[S]. 北京: 国家烟草专卖局, 2010: 1-12.
- Tobacco Industry of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products: Determination of water content: Gas-chromatographic method: YC/T 345—2010[S]. Beijing: State Tobacco Monopoly Administration: 2010: 1-12.
- [18] 蔡君兰, 陈黎, 彭斌, 等. 气相色谱法同时测定电子烟液中的烟碱、1,2-丙二醇和丙三醇[J]. 中国烟草学报, 2016, 22(5): 1-9.
- CAI Jun-lan, CHEN Li, PENG Bin, et al. Simultaneous determination of nicotine, 1,2-propylene glycol and glycerol in e-liquids with gas chromatography method[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2016, 22(5): 1-9.
- [19] 张效康. 保润剂保润性能及过程的实验[J]. 烟草科技, 1994(4): 11-12.
- ZHANG Xiao-kang. Experiment on the properties and process of humectants[J]. Tobacco Science & Technology, 1994(4): 11-12.
- [20] 张丽, 张相辉, 徐丽霞, 等. 保润剂对卷烟保润性能的影响[J]. 郑州轻工业学院学报, 2012, 38(5): 38-40.
- ZHANG Li, ZHANG Xiang-hui, XU Li-xia, et al. Effect of humectant on moisture retention of cigarette[J]. Journal of Zhengzhou Institute of Light Industry, 2012, 38(5): 38-40.