

广泛靶向代谢组学分析不同采收期紫黑香米和普通大米成分差异

田程飘¹, 龙凌云¹, 刘功德¹, 叶雪英¹, 谢秀萍², 檀小辉¹, 王丽萍^{1,*}

(1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 广西 南宁 530001;

2. 广西融水元宝山苗润特色酒业有限公司, 广西 柳州 545300)

摘要: 采用超高效液相色谱-串联质谱联用广泛靶向代谢组学对广西地区产的紫黑香米和普通大米进行分析, 主要分析紫黑香米与普通大米代谢物种类及含量差异, 并阐述显著差异代谢途径。样品中共鉴定出667个代谢物, 包含脂质、类黄酮、酚酸、生物碱及有机酸等几大类; 通过主成分分析、聚类分析及整体代谢物剖析发现, 紫黑香米与普通大米相比, 成熟样品组间存在的278种差异代谢物中上调的有239种, 提前20 d采收组存在的267种差异代谢物中上调的有235种; 不同时期的紫黑香米成分相似, 说明提前采收的紫黑香米兼具食用粥软糯口感及完整营养结构。京都基因与基因组百科全书分析发现与普通大米相比, 在紫黑香米中显著上调的鼠李素-3-O-葡萄糖苷、橙皮素-7-O-葡萄糖苷、高圣草酚、圣草酚、橙皮素、儿茶素、槲皮素、柚皮素查耳酮等化合物参与到黄酮和黄酮醇的生物合成途径, 调节黄酮、黄酮醇类物质含量, 提升紫黑香米营养品质及抗氧化功效。

关键词: 紫黑香米; 普通大米; 广泛靶向代谢组学; 差异代谢物; 代谢途径

Widely Targeted Metabolomics Analysis of Compositional Differences between Purple Black Rice and Common Rice at Different Harvest Periods

TIAN Chengpiao¹, LONG Lingyun¹, LIU Gongde¹, YE Xueying¹, XIE Xiuping², TAN Xiaohui¹, WANG Liping^{1,*}

(1. Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning 530001, China;

2. Guangxi Rongshui Yuanbaoshan Miorun Specialty Wine Co. Ltd., Liuzhou 545300, China)

Abstract: In this study, widely targeted metabolomics based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to analyze the types and contents of differential metabolites between purple black rice and common rice produced in Guangxi and to illustrate the significantly differential metabolic pathways. A total of 667 metabolites were identified, including lipids, flavonoids, phenolic acids, alkaloids, and organic acids. Principal component analysis (PCA), cluster analysis and overall metabolite profiling showed that 239 of the 278 differential metabolites identified in mature rice samples were up-regulated, and 235 of the 267 differential metabolites identified in the 20 day earlier harvest group were up-regulated when compared with common rice. The metabolite composition of purple black rice at different harvest periods was similar, indicating that porridge made from purple black rice harvested in advance will have soft and glutinous texture as well as complete nutritional structure. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis showed that significantly up-regulated compounds such as rhamnose-3-O-glucoside, hesperidin-7-O-glucoside, homoeriodictyol, eriodictyol, hesperidin, catechin, quercetin, naringin and chalcones in purple black rice were involved in the biosynthetic pathways of flavonoids and flavonols, regulating the contents of flavonoids and flavonols, and improving the nutritional quality and antioxidant effect of purple black rice.

Keywords: purple black rice; common rice; widely targeted metabolomics; differential metabolites; metabolic pathway

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230315-147

中图分类号: TS213.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 01-0125-08

收稿日期: 2023-03-15

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2021GXNSFAA220084); 广西农业科学院基本科研业务专项 (桂农科2021YT143)

第一作者简介: 田程飘 (1994—) (ORCID: 0000-0001-7143-0938), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为天然有机化学。

E-mail: exotcp@163.com

*通信作者简介: 王丽萍 (1986—) (ORCID: 0000-0001-5041-8139), 女, 高级农艺师, 硕士, 研究方向为植物生物化学及分子生物学。E-mail: twows@163.com

引文格式:

田程飘, 龙凌云, 刘功德, 等. 广泛靶向代谢组学分析不同采收期紫黑香米和普通大米成分差异[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 125-132. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230315-147. <http://www.spkx.net.cn>

TIAN Chengpiao, LONG Lingyun, LIU Gongde, et al. Widely targeted metabolomics analysis of compositional differences between purple black rice and common rice at different harvest periods[J]. Food Science, 2024, 45(1): 125-132. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230315-147. <http://www.spkx.net.cn>

水稻是中国乃至世界上消费量最大的谷物之一, 是世界上一半以上人口的主食^[1-2]。中国更是水稻盛产大国, 培育种植有大米 (*Oryza sativa* L.)、紫米、黑米等多样稻类作物。紫米和黑米皆是营养丰富的粗粮, 除了相近的颜色, 紫米外观更为饱满均匀、色泽清透, 口感具有更佳的黏糯性。紫米是特种稻米的一种^[3-4], 素有“米中极品”之称, 近年我国培育出了对地理环境条件适应性较强的新品种, 但不同产地紫米的营养成分和化学成分都没有得到合理认识^[5]。另外, 紫米因富含花青素、赖氨酸、色氨酸和VB等^[5-6], 而具有良好抗氧化作用^[7-10]。

广西地区的紫黑香米已有一定的历史^[11], 但没有像普通水稻般大规模推广种植, 更多是作为一种食用稻米, 用于产后或病愈人群补气血食用。近年来由于人们对健康饮食的关注度逐渐加大, 紫黑香米便作为特种稻米的一种重新在饮食界登场。除了拥有与普通大米相似的基本营养物质和饱腹功能外, 自带天然美观色彩的紫色米还被应用于制作养生粥^[12]、五色糯米饭、奶茶佐料等, 作为原料还可生产紫米酒、花雕酒等^[13]。紫黑香米在各个地区的食用方法也得到一定的交流, 比如广西地区相关从业人员就在多次走访调研中国台湾地区稻米食用情况后, 提前采收的紫黑香米富含更适合人体食用的淀粉类群, 因此提前采收的紫黑香米用来做粥, 更适合为人体尤其是病弱人体所食用。

目前, 对稻米类的营养成分研究主要集中在不同水稻品种^[14]、不同加工方式^[15]、糙米和大米之间^[1], 更多的是集中在已知的营养素和生物活性成分分析, 石尚^[16]对108份水稻品种的抗性淀粉、谷蛋白、总黄酮等功能营养成分和粒长、千粒质量、糙米率等品质形状进行测定, 结果表明各形状在年际间的含量稳定, 并筛选出高抗性淀粉的降糖稻、高总黄酮含量的东农425等品质好的品种。利用代谢组学可以全面分析代谢产物含量变化, 剖析不同样品之间因种植条件、采收时间、加工方式等不同带来的差异代谢物变化情况^[17], 由此辅助选定优势品种或最佳处理方法。任传英等^[1]利用液相色谱-串联质谱非靶向代谢组学技术研究了糙米与大米中代谢产物种类和数量的变化规律, 发现全谷物糙米与大米相比, 差异代谢物上调为主, 而且通过影响氨基酸代谢、碳代谢、嘌呤代谢和甜菜碱生物合成等代谢途径, 调节米糠和胚中多种氨基酸、多酚、脂肪酸类物质含量, 提

升稻米的营养品质。本研究利用超高效液相色谱-串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 联用广泛靶向代谢组学技术分析紫黑香米和普通大米间代谢物差异及其不同采收期的代谢物种类和含量的变化, 并结合差异代谢物的关键代谢途径, 为紫黑香米生产中选择采收期及其食用推广提供基本依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

紫黑香米与普通大米 (野香优海丝) 于7月份在广西壮族自治区柳州市融水县安太乡元宝村采集。于成熟期采收的紫黑香米标记为ZH, 提前20 d采收的紫黑香米标记为ZH20 (未成熟米), 常用于制作成粥米; 于成熟期采收的普通大米标记为PD, 提前20 d采收的普通大米标记为PD20 (未成熟米), 常用于制作成粥米。稻米均经脱壳、去胚、去果皮、碾碎等处理。

甲醇、乙腈 (均为色谱纯) 默克化工技术 (上海) 有限公司; 甲酸 (色谱纯) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

Scientz-100F冻干机 宁波新芝生物科技股份有限公司; MM 400 Retsch研磨仪 弗尔德 (上海) 仪器设备有限公司; Nexera X2 UPLC仪 岛津 (中国) 有限公司; Applied Biosystems 4500 QTRAP串联质谱仪 赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司; SB-C₁₈色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 安捷伦科技 (中国) 有限公司; CentriVap离心机 美国Labconco公司。

1.3 方法

1.3.1 原料处理及提取液制备

利用研磨仪将提前真空冷冻干燥好的紫黑香米样品在30 Hz下研磨1.5 min至粉末状, 称取50 mg粉末溶解于1.2 mL 70%甲醇溶液中, 每30 min涡旋1次, 每次持续30 s, 共涡旋6次, 将涡旋好的提取液置于12 000 r/min离心30 s, 吸取上清液, 用0.22 μm微孔滤膜过滤, 滤液保存于液相进样瓶中^[18-19]。普通大米样品进行同样处理; 质控 (quality control, QC) 样本由各样本提取物混合制备而成, 设置3个重复。

1.3.2 UPLC-MS/MS条件

UPLC条件：流动相A为超纯水，流动相B为乙腈，两者均加入0.1%甲酸；洗脱梯度：0~9 min, 95%~5% A、5%~95% B；9~10 min, 5% A、95% B；10~11.1 min, 5%~95% A、95%~5% B；11.1~14 min, 95% A、5% B；流速0.35 mL/min；柱温40℃；进样量4 μL。

MS/MS条件：电喷雾离子源（electrospray ionization, ESI）温度为550℃，离子喷雾电压5 500 V（正离子模式）/ -4 500 V（负离子模式）；离子源气体I、气体II压力和气帘气压力分别设置为50、60 psi和25 psi。在三重四极杆（triple quadrupole, QQQ）和线性离子阱模式下分别用10 μmol/L和100 μmol/L聚乙二醇溶液进行仪器调谐和质量校准。QQQ扫描使用多反应监测（multiple reaction monitoring, MRM）模式，并将碰撞气体（氮气）设置为中等。通过进一步的去簇电压（declustering potential, DP）和碰撞能（collision energy, CE）优化，完成了各个MRM离子对的DP和CE。根据每个时期内洗脱的代谢物，在每个时期监测一组特定的MRM离子对^[20]。

1.4 数据处理与分析

利用Analyst1.6.3分析软件和multiquant软件进行质谱数据定性定量及进行色谱峰积分，以研究紫黑香米与普通大米的代谢产物。基于迈维自建数据库MWDB，根据二级谱信息进行物质定性。代谢物定量是利用三重四极杆质谱的MRM分析完成，过程中对同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正^[21-22]。

主成分分析（principal component analysis, PCA）和层次聚类分析（hierarchical cluster analysis, HCA）分别利用R软件的内置统计prcomp函数、ComplexHeatmap包处理，采用PCA和HCA方法对各组样本间的总体代谢物和组内样本代谢物进行多元统计分析，以研究紫黑香米与普通大米的代谢产物差异^[23]。

京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）注释与富集分析是利用KEGG Compound数据库对鉴定的代谢物进行注释，然后将注释的代谢物映射到KEGG Pathway数据库中。然后将具有显著调控的代谢物的通路输入MSEA（代谢物集富集分析），通过超几何检验的P值确定其显著性。

2 结果与分析

2.1 总体代谢物及多元统计分析

两种稻米中共鉴定出代谢物667种（包括阳离子和阴离子模式下）。如图1所示，共鉴定到6类129种脂

质（19.34%），其中游离脂肪酸68种；共鉴定到7类114种黄酮类代谢物（17.09%），其中45种属于黄酮类（39.47%），38种属于黄酮醇类（33.33%），与Kris-Etherton等^[24]研究发现酚类化合物（包括其亚类黄酮类化合物）广泛存在于在谷物、豆类和坚果中的结果符合；依次还有生物碱类代谢物83种，酚酸类代谢物70种，氨基酸及其衍生物70种，有机酸类代谢物48种，核苷酸及其衍生物42种，萜类代谢物15种，木质素和香豆素类代谢物7种，其他类代谢物89种（糖类代谢物含62种）。

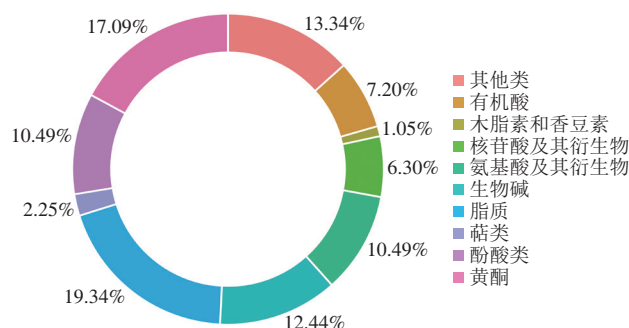


图1 代谢物类别组成环形图

Fig. 1 Ring chart depicting the distribution of metabolite classes identified

为分析两个品种样品之间的总体代谢差异及样品间差异度大小，本研究对样品进行PCA（图2），PC1解释率55.81%，PC2解释率10.92%，可以看出各组样本（包括QC样本）可以分别组内聚集到一起，而组间有明显的分离趋势，说明各组样本组内成分类别和含量相似，而组间各样本组存在一定差异。其中PD20、PD分别与其他3组样本差异较为明显，而ZH20和ZH则组间差距较近，说明这两组样本成分种类和含量较为接近。由图3可得出与PCA得分图一样的结论，即各组样本组内存在相似性，不同采收期、不同品种稻米间均存在差异，又能看出未成熟大米与成熟大米成分较为相似，未成熟紫黑香米与成熟紫黑香米成分较为相似，而紫黑香米与普通大米则整体上存在明显差异。不同采收期紫黑香米代谢物除脂质外，其他种类的代谢物含量皆高于不同采收期的普通大米（红色代表高含量，绿色代表低含量）。

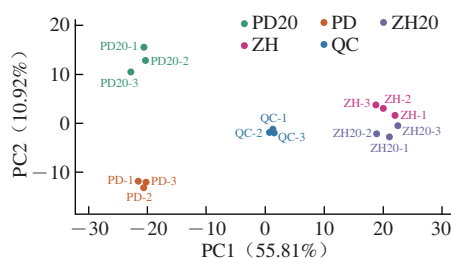


图2 PCA散点图

Fig. 2 PCA scatter plot

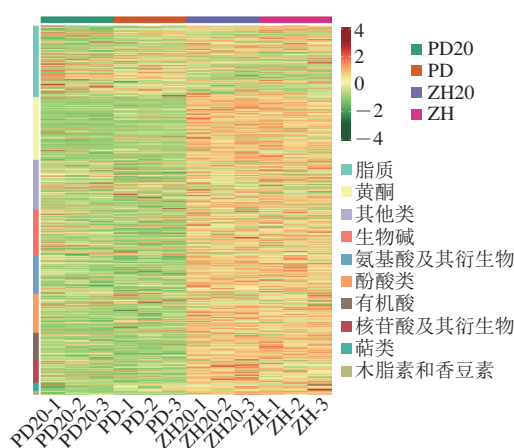


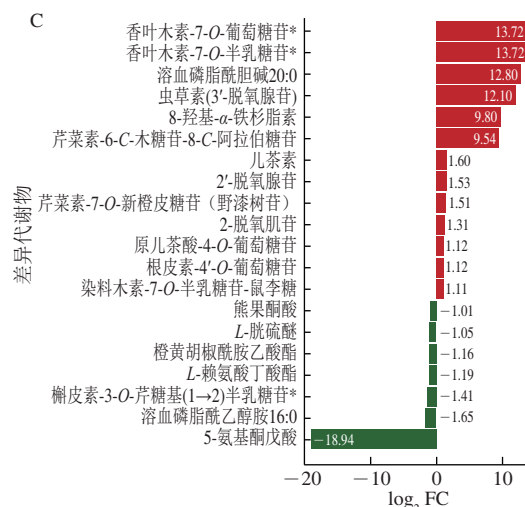
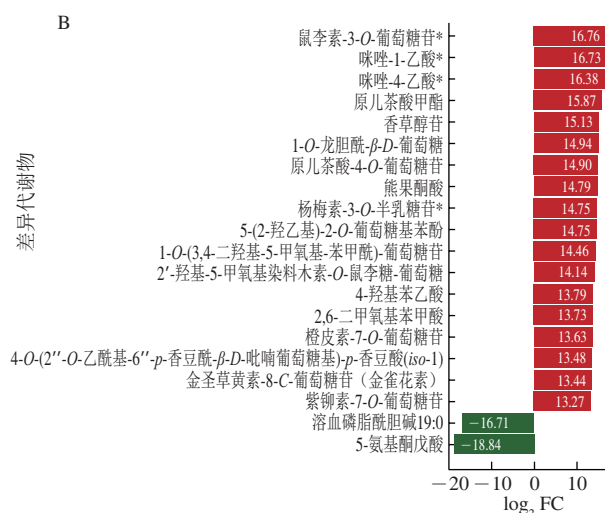
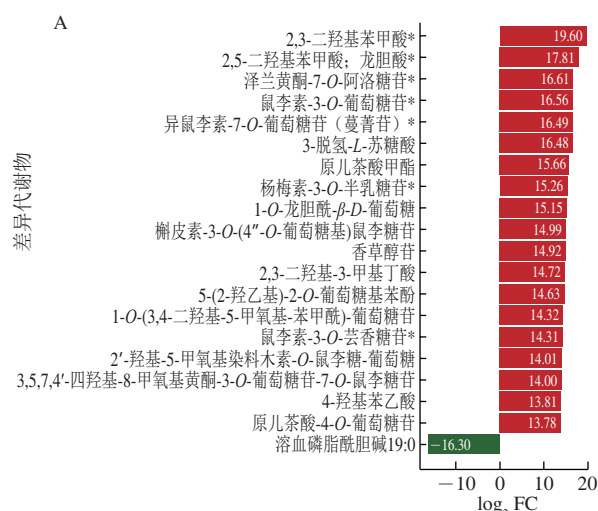
图3 所有代谢物HCA图

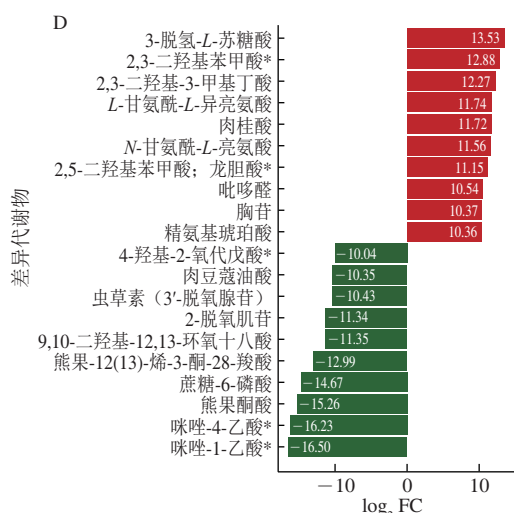
Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of all metabolites

2.2 差异代谢物筛选分析

2.2.1 不同种类成熟期稻米间差异代谢物分析

为了解各组样本代谢物组成差异情况, 变量重要性投影 ≥ 1 , 结合单变量分析的 $P \leq 0.05$ 且差异倍数 (fold change, FC) ≥ 2 或 ≤ 0.5 筛选各比较组间的差异代谢物^[25]。对比紫黑香米和普通大米的差异代谢物发现, 不论成熟期采收还是提前20 d采收, 紫黑香米次级代谢物含量均高于普通大米, 而成熟期采收的ZH与PD存在278种差异代谢物, 上调的有239种, 占85.97%, 说明紫黑香米含有更加丰富的代谢物。由PD vs ZH的FC条形图 (图4A) 可知, 在FC前20代谢物中, 成熟期采收的ZH较PD上调的有19种代谢物, 主要有9种酚酸类代谢物, 分别是2,3-二羟基苯甲酸、2,5-二羟基苯甲酸、原儿茶酸甲酯、1-O-龙胆酰- β -D-葡萄糖、香草醇苷、5-(2-羟乙基)-2-O-葡萄糖基苯酚、1-O-(3,4-二羟基-5-甲氧基-苯甲酰)-葡萄糖苷、4-羟基苯乙酸和原儿茶酸-4-O-葡萄糖苷; 8种黄酮类代谢物, 分别是泽兰黄酮-7-O-阿洛糖苷、鼠李素-3-O-葡萄糖苷、异鼠李素-7-O-葡萄糖苷 (蔓菁苷)、杨梅素-3-O-半乳糖苷、槲皮素-3-O-(4'-O-葡萄糖基)鼠李糖苷、鼠李素-3-O-芸香糖苷、2'-羟基-5-甲氧基染料木素-O-鼠李糖-葡萄糖和3,5,7,4'-四羟基-8-甲氧基黄酮-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷; 3-脱氢-L-蔗糖酸 (糖类) 和2,3-二羟基-3-甲基丁酸 (有机酸)。下调的差异代谢物是属于脂质类的溶血磷脂酰胆碱19:0。其中显著上调的还有高圣草酚、圣草酚、橙皮素、儿茶素、槲皮素、柚皮素查耳酮、柚皮素等黄酮类化合物, 这些化合物的共同特性是参与类黄酮生物合成等调控黄酮类化合物积累的代谢途径。





*.同分异构体。A. PD vs ZH; B. PD20 vs ZH20; C. ZH vs ZH20; D. PD vs PD20。图5同。

图4 各分组差异变化上下调前20物质含量差异动态分布图

Fig. 4 Dynamic distribution of the differences in the contents of top 20 up-regulated and down-regulated metabolites

2.2.2 不同种类稻米提前20 d采收样品差异代谢物分析

由表1可知，提前20 d采收的ZH20与PD20存在267种差异代谢物，上调的有235种，占88.01%。由PD20 vs ZH20的FC条形图可知，在FC前20代谢物中，提前20 d采收的ZH20较PD20上调的有18种代谢物（图4B），主要有6种黄酮类代谢物，分别是鼠李素-3-O-葡萄糖苷、杨梅素-3-O-半乳糖苷、2'-羟基-5-甲氧基染料木素-O-鼠李糖-葡萄糖、橙皮素-7-O-葡萄糖苷、金圣草黄素-8-C-葡萄糖苷（金雀花素）和紫柳素-7-O-葡萄糖苷；8种酚酸类代谢物，分别是原儿茶酸甲酯、香草醇苷、1-O-龙胆酰-β-D-葡萄糖、原儿茶酸-4-O-葡萄糖苷、5-(2-羟乙基)-2-O-葡萄糖基苯酚、1-O-(3,4-二羟基-5-甲氧基-苯甲酰)-葡萄糖苷、4-羟基苯乙酸和2,6-二甲氧基苯甲酸；及咪唑-1-乙酸和咪唑-4-乙酸（生物碱类），熊果酮酸（萜类），4-O-(2''-O-乙酰基-6''-p-香豆酰-β-D-吡喃葡萄糖基)-p-香豆酸（iso-1）。下调的两种分别是生物碱类的5-氨基酮戊酸和脂质类的溶血磷脂酰胆碱19:0。PD20 vs ZH20组中出现显著上调的还有高圣草酚、圣草酚、橙皮素、儿茶素、槲皮素、柚皮素查耳酮等黄酮类化合物，说明紫黑香米中较普通大米上调的优势黄酮类化合物不受采收时期的影响，其黄酮类化合物积累有一定稳定性。

表1 差异代谢物数目统计

Table 1 Statistics of differential metabolites

组别	差异显著代谢物数目	下调代谢物数目	上调代谢物数目
PD vs ZH	278	39	239
PD20 vs ZH20	267	32	235
ZH vs ZH20	20	7	13
PD vs PD20	119	65	54

2.2.3 不同采收时期紫黑香米差异代谢物分析

由表1可知，不同时期采收的紫黑香米只有20种差异代谢物，说明紫黑香米代谢物差异不显著，其中提前20 d采收的ZH20较成熟期采收的ZH上调的有13种，下调的有7种。由ZH vs ZH20的FC条形图（图4C）可知，在FC前20代谢物中，提前20 d采收的ZH20中上调的有香叶木素-7-O-半乳糖苷、香叶木素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-6-C-木糖苷-8-C-阿拉伯糖苷、儿茶素、芹菜素-7-O-新橙皮糖苷（野漆树苷）、根皮素-4'-O-葡萄糖苷、染料木素-7-O-半乳糖苷-鼠李糖7种黄酮类代谢物，虫草素（3'-脱氧腺苷）、2'-脱氧腺苷、2-脱氧肌苷3种核苷酸及其衍生物，以及溶血磷脂酰胆碱20:0、8-羟基-α-铁杉脂素、原儿茶酸-4-O-葡萄糖苷等脂质类、木脂素和香豆素类、酚酸类代谢物。下调差异代谢物分别是生物碱类代谢物5-氨基酮戊酸和橙黄胡椒酰胺乙酸酯、脂质类代谢物溶血磷脂酰乙醇胺16:0、黄酮类代谢物槲皮素-3-O-芹糖基(1→2)半乳糖苷、氨基酸及其衍生物类L-赖氨酸丁酸酯和L-胱硫醚，及萜类代谢物熊果酮酸。

2.2.4 不同采收时期普通大米差异代谢物分析

不同时期采收的普通大米主要存在119种差异代谢物，提前20 d采收的PD20较成熟期采收的PD上调的有54种，其中含柚皮素查耳酮、槲皮素-3-O-(4''-O-葡萄糖基)鼠李糖苷、泽兰黄酮-7-O-阿洛糖苷、芦丁、异鼠李素、根皮苷查耳酮、槲皮苷21种黄酮类化合物和4种酚酸类化合物，下调的有65种，其中含35种黄酮类化合物。PD vs PD20的FC前20代谢物中上调和下调的各有10个（图4D），其中上调的有3个酚酸类代谢物，2,3-二羟基苯甲酸、肉桂酸、2,5-二羟基苯甲酸，3个氨基酸及其衍生物类代谢物，L-甘氨酸-L-异亮氨酸、N-甘氨酸-L-亮氨酸、胸苷，及3-脱氢-L-蔗糖酸、吡哆醛、2,3-二羟基-3-甲基丁酸、精氨酸琥珀酸等糖类、维生素或有机酸类代谢物。下调的含2种生物碱类代谢物咪唑-1-乙酸和咪唑-4-乙酸，2种萜类代谢物熊果酮酸和熊果-12(13)-烯-3-酮-28-羧酸，2种脂质类代谢物9,10-二羟基-12,13-环氧十八酸和肉豆蔻油酸，2种核苷酸及其衍生物2-脱氧肌苷和虫草素（3'-脱氧腺苷），蔗糖-6-磷酸（糖类）和4-羟基-2-氧代戊酸（有机酸）。

2.3 差异代谢物KEGG功能注释及富集分析

KEGG数据库是研究代谢途径的主要数据库，可提供碳水化合物、核苷酸、氨基酸等的代谢及有机物降解的可能途径，帮助了解代谢物在体内互相作用，形成不同通路的情况^[26-27]。本研究主要论述不同比较组间可注释到KEGG通路的差异代谢物的富集及代谢途径。PD vs ZH比较组中，278个差异代谢物中有102个可注释到72条数据库中现有的通路，其中类黄酮生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸转换、柠檬酸循环、抗坏血酸和桉木酸代谢为最为显著富集的4条KEGG代谢通路。

PD20 vs ZH20比较组中, 267 个差异代谢物中有80 个可注释到63 条数据库中现有的通路, 其中类黄酮生物合成、黄酮和黄酮醇的生物合成、核黄素的新陈代谢、色氨酸代谢通路显著富集。ZH vs ZH20比较组中, 20 个差异代谢物中仅有6 个可注释到11 条数据库中现有的通路, 但没有任何一条通路含差异代谢物大于5 个, 含差异代谢物最多的通路是代谢途径, 却是这些通路中最不显著的 ($0.05 < P < 1$), 说明紫黑香米在不同成熟期的代谢物差异不显著。PD vs PD20比较组中, 119 个差异代谢物中有37 个可注释到43 条数据库中现有的通路, 其中类黄酮生物合成、黄酮和黄酮醇的生物合成、异黄酮生物合成为最为显著富集的KEGG代谢通路。各组中注释到相应通路的差异代谢物数量详见图5, 各比较组显著富集通路的差异代谢物数量对比详见表2。

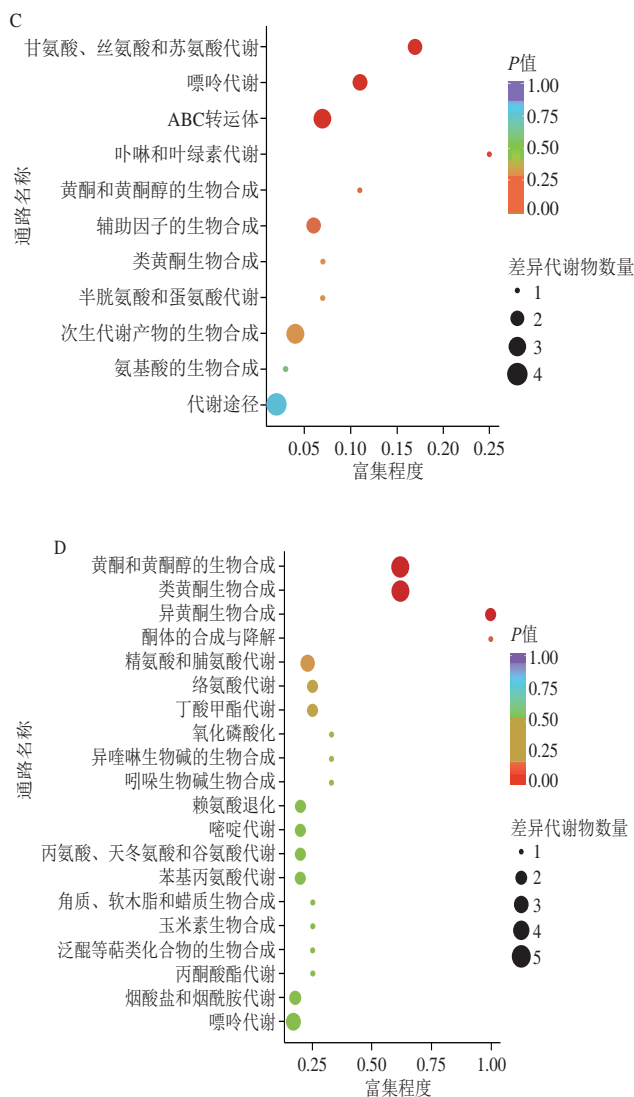
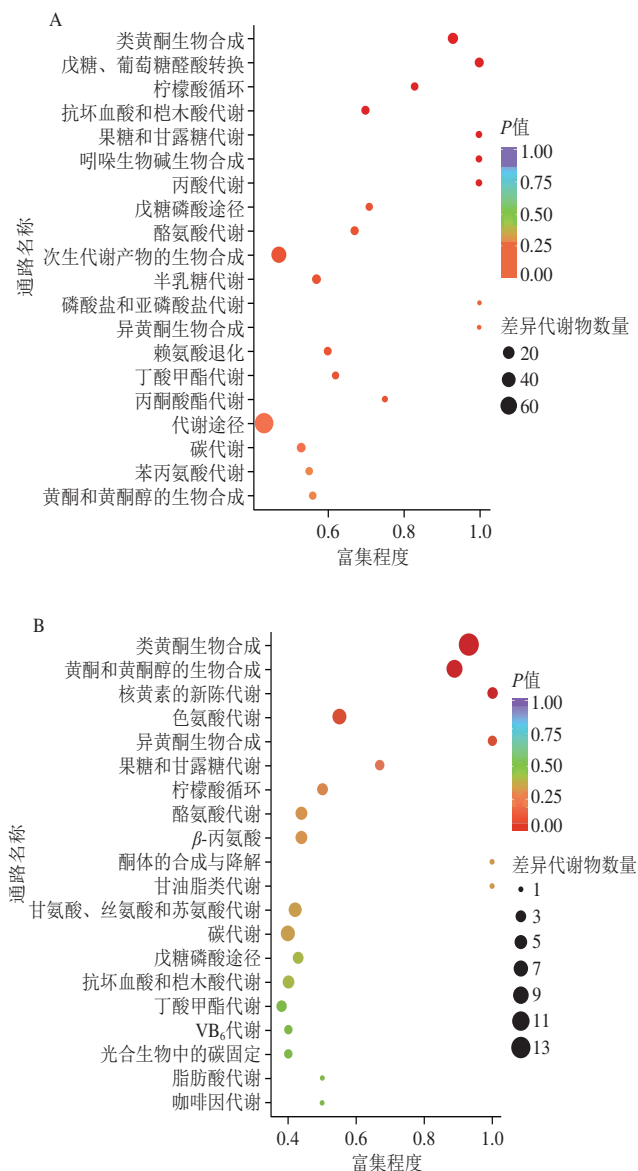


图5 4组差异代谢物KEGG富集通路图
Fig. 5 KEGG enrichment pathway analysis of differential metabolites between four groups

表2 各比较组显著富集的KEGG通路统计
Table 2 Statistics of significantly enriched KEGG pathways between four groups

通路名称	ko ID	KEGG途径注释的代谢物比例			P值		
		PD vs ZH	PD20 vs ZH20	PD vs PD20	PD vs ZH	PD20 vs ZH20	PD vs PD20
类黄酮生物合成	ko00941	14/15	14/15	5/8	0.000 0	0.000 0	0.002 7
黄酮和黄酮醇的生物合成	ko00944	5/9	8/9	5/8	0.283 8	0.000 6	0.002 7
次生代谢产物的生物合成	ko01110	39/83	26/83	10/80	0.109 5	0.629 5	0.859 3
代谢途径	ko01100	78/182	53/182	27/179	0.196 4	0.965 1	0.680 1
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	ko00260	6/12	5/12		0.357 8	0.331 6	
ABC转运体	ko02010	18/46	12/46		0.670 2	0.875 3	
氨基酸的生物合成	ko01230	12/35	6/34		0.853 8	0.990 5	
嘌呤代谢	ko00230	5/18	6/18		0.926 6	0.548 0	
色氨酸代谢	ko00380	5/11	6/11		0.178 0	0.099 8	
碳代谢	ko01200	8/15	6/15		0.229 9	0.340 0	

注: ko ID为通路在数据库的编号; KEGG途径注释的代谢物比例为注释到该途径的目标代谢物在总目标代谢物中的比例。

对各组中显著富集的通路中的所有差异代谢物进行HCA,以提取出有用信息,帮助研究潜在重要代谢通路中的物质含量在不同分组中的变化规律。由对照组的富集分析中可知紫黑香米与普通大米的667个差异代谢物主要富集到类黄酮生物合成和黄酮和黄酮醇的生物合成途径($P \leq 0.0027$)。由PD vs ZH比较组和PD20 vs ZH20比较组的差异代谢物分析可知,高圣草酚、橙皮素、槲皮素、短叶松素、圣草酚、柚皮素、紫柳素、柚皮素查耳酮、橙皮素-7-O-葡萄糖苷、新橙皮苷、牡荆素、儿茶素、樱桃苷及根皮苷查耳酮14种黄酮类化合物参与了类黄酮生物合成,且在ZH和ZH20中的表达较PD和PD20中高,说明紫黑香米中类黄酮生物合成较为活跃,这也表明花青素、类黄酮、黄酮类和黄酮醇生物合成途径中的代谢物发生了强烈的变化^[27]。带有二苯丙烷(C6-C3-C6)单元的柚皮素查耳酮通过共轭环闭合将其转化为带有黄酮(2-苯基铬-4-酮)骨架的柚皮素,柚皮素查耳酮、柚皮素及由它们进一步修饰产生的查耳酮、花青素、黄酮和黄酮醇等构成了丰富多样的类黄酮化合物,这些化合物的积累可带来抗氧化等活性的升高。PD20 vs ZH20比较组中可看出槲皮素、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、异槲皮苷、牡荆素、野漆树苷、槲皮苷、异牡荆素及芦丁等黄酮或黄酮醇化合物参与到黄酮和黄酮醇的生物合成途径,除了槲皮苷外其他代谢物在ZH20中的表达均高于PD20。黄酮和黄酮醇皆是植物界常见的类黄酮,其生物合成途径涉及到的代谢物的增加最终能帮助类黄酮化合物的积累。PD vs ZH比较组中还可以看到丙酮酸、 α -酮戊二酸、L-苹果酸、琥珀酸及异柠檬酸等有机酸参与到柠檬酸循环中的各个反应步骤,为机体提供能量,D-阿拉伯糖、3-脱氢-L-苏糖酸、D-葡萄糖醛酸及D-半乳糖醛酸等糖类差异代谢物参与到抗坏血酸和醛糖二酸盐代谢,这些代谢物在ZH中的表达量皆高于PD。参与到代谢途径的27个差异代谢物中,L-酪胺、色胺、柚皮素、柚皮素查耳酮、芦丁等还参与到了次生代谢产物的生物合成,且在PD20的表达均高于PD,说明提前20 d采收的普通大米样品处于代谢旺盛期,代谢与生成次生代谢产物的能力高于成熟大米。

3 结论

本研究可以得知紫黑香米中富含黄酮类化合物、脂质、生物碱、酚酸等对人体有益的功能成分,高圣草酚、圣草酚、橙皮素、儿茶素、槲皮素、柚皮素查耳酮、柚皮素等黄酮类化合物的大量存在可带来可观的抗氧化潜力。不同时期采收的紫黑香米代谢物与普通大米代谢物含量相比为皆为上调,与Vichapong等^[28]研究发现黑米、红米、紫米和糙米中酚类、总黄酮含量和抗氧化

活性均高于大米结论相似,因此可以说明紫黑香米作为主食食用,较普通大米具备更丰富的营养物质。此外,紫黑香米抗性淀粉含量高于大米,以一定比例取代大米食用或用于开发精深加工产品,可减低对易消化淀粉的摄入量,避免餐后血糖急剧升高,满足特定人员如糖尿病患者饮食需求^[29-31]。普通大米不同时期采收营养成分含量则会出现一定变化,紫黑香米整体代谢物不受采收时期影响,说明提前采收的紫黑香米与成熟紫黑香米一样具备完善的黄酮类化合物等营养成分,若是需要为了迎合市场做成粥米,在淀粉形成完整前采收的紫黑香米具备更佳口感。本研究为紫黑香米推广食用及有色稻米在饮食中的应用提供数据支持。

参考文献:

- [1] 任传英,卢淑雯,洪滨,等.糙米和小米非靶向代谢组学分析[J].食品科学,2022,43(20):183-190. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20211207-082.
- [2] YAMUANGMORN S, PROM-U-THAI C. The potential of high-anthocyanin purple rice as a functional ingredient in human health[J]. Antioxidants, 2021, 10(6): 833. DOI:10.3390/antiox10060833.
- [3] 师江,李倩,李维峰,等.不同产地紫米营养成分比较及其相关性分析[J].热带作物学报,2022,43(11):2324-2333. DOI:10.3969/j.issn.1000-2561.2022.11.017.
- [4] 伍怡斐,钟锦耀,郑经绍,等.贮藏环境与辅助添加物对紫米花色苷稳定性的影响[J].食品工业科技,2020,41(16):47-53. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.009.
- [5] 吴志峰,赵稳,陈静,等.紫米的提取及成分分析[J].粮食与油脂,2021,34(8):34-37;65.
- [6] PATTANANANDECHA T, APICHA S, SIRILUN S, et al. Anthocyanin profile, antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial against foodborne pathogens activities of purple rice cultivars in Northern Thailand[J]. Molecules, 2021, 26: 5234. DOI:10.3390/molecules26175234.
- [7] 陈萍萍,游月华,戴展峰,等.有色稻抗氧化作用及其与花色苷和类黄酮含量的关系[J].热带农业科学,2021,41(2):83-87. DOI:10.12008/j.issn.1009-2196.2021.02.012.
- [8] 王宏利,韩彰桂,赖森,等.广西钦州市紫米产业发展现状与对策[J].贵州农业科学,2021,49(1):167-172. DOI:10.3969/j.issn.1001-3601.2021.01.02.
- [9] ZHANG H, LI H, XU C C, et al. Heterogeneously chemo/enzyme-functionalized porous polymeric catalysts of highperformance for efficient biodiesel production[J]. ACS Catalysis, 2019, 9: 10990-11029. DOI:10.1021/acscatal.9b02748.
- [10] TSUZUKI W, KOMBA S, KOTAKE-NARA E. Diversity in γ -oryzanol profiles of Japanese black-purple rice varieties[J]. Food Scientists and Technologists, 2019, 56: 2778-2786. DOI:10.1007/s13197-019-03767-w.
- [11] PENG B, QIU J, XUE Z Y, et al. Detection and analysis of rice quality of Yunnan purple rice seed resources[J]. Journal of Plant Sciences, 2021, 9(3): 84-95. DOI:10.11648/j.jps.20210903.13.
- [12] 刘婷,孙小东,罗雯雯,等.有色米营养米粥配方优化及血糖生成指数评价[J].农产品加工,2022(16):50-53;56. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2022.08.042.
- [13] 李康.墨江紫米产业化发展探讨[J].云南农业,2018(9):37-38.

- [14] 陈宜波, 周少川, 王志东, 等. 优质稻‘美香占2号’与‘齐新占’籽粒和精米的代谢产物差异分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(24): 8255-8264. DOI:10.13271/j.mpb.019.008255.
- [15] 王艳, 兰向东, 陈钊, 等. 糙米、胚芽米和精白米营养成分分析[J]. 食品科技, 2016, 41(11): 156-159. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2016.11.036.
- [16] 石尚. 水稻品种功能营养品质性状鉴定及与其它品质性状的关系[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- [17] DOSSOU S S K, XU F, YOU J, et al. Widely targeted metabolome profiling of different colored sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds provides new insight into their antioxidant activities[J]. Food Research International, 2022, 151: 110850. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110850.
- [18] 张琴, 董晓庆, 林欣, 等. 基于UPLC-MS/MS的不同产地蜂糖李果实初生代谢差异分析[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 284-292. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220401-014.
- [19] 张琴, 黄世安, 林欣, 等. 基于UPLC-MS/MS的3个李品种果实初生代谢物分析[J]. 食品科学, 2022, 43(16): 226-234. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20211009-085.
- [20] 李秋琳, 李燕, 陈伟, 等. 基于广泛靶向代谢组学的不同颜色棉花花瓣中类黄酮成分差异分析[J]. 棉花学报, 2021, 33(6): 482-492. DOI:10.11963/cs20210036.
- [21] FRAGA C G, CLOWERS B H, MOORE R J, et al. Signature-discovery approach for sample matching of a nerve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(10): 4165-4173. DOI:10.1021/ac1003568.
- [22] CHEN W, GONG L, GUO Z L, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics[J]. Molecular Plant, 2013, 6(6): 1769-1780. DOI:10.1093/mp/ss080.
- [23] HU Z J, XIONG Q Q, WANG K, et al. Identification of a new giant embryo allele, and integrated transcriptomics and metabolomics analysis of giant embryo development in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 697889. DOI:10.3389/fpls.2021.697889.
- [24] KRIS-ETHERTON P M, HECKER K D, BONANOME A, et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer[J]. American Journal of Medicine, 2002, 113(9): 71-88. DOI:10.1016/S0002-9343(01)00995-0.
- [25] ZHOU Y Q, SHAO L Y, ZHU J L, et al. Comparative analysis of tuberous root metabolites between cultivated and wild varieties of *Rehmannia glutinosa* by widely targeted metabolomics[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 1-12. DOI:10.1038/S41598-021-90961-6.
- [26] 王磊, 贾玉龙, 罗彦玉, 等. 基于UPLC-MS非靶向代谢组学分析乳酸菌发酵方竹笋超细全浆的代谢差异[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 200-213. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221019-177.
- [27] XIONG Q Q, SUN C H, LI A, et al. Metabolomics and biochemical analyses revealed metabolites important for the antioxidant properties of purple glutinous rice[J]. Food Chemistry, 2022, 389: 133080. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133080.
- [28] VICHAPONG J, SOOKSERM M, SRIJESDARUK V, et al. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43: 1325-1330. DOI:10.1016/j.lwt.2010.05.007.
- [29] 刘传光, 周新桥, 陈达刚, 等. 功能性水稻研究进展及前景展望[J]. 广东农业科学, 2021, 48(10): 87-99. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2021.10.010.
- [30] 杨瑞芳, 白建江, 万常照, 等. 高抗性淀粉含量粳稻新品种‘优糖稻3号’的选育[J]. 上海农业学报, 2022, 38(2): 6-9. DOI:10.15955/j.issn1000-3924.2022.02.02.
- [31] 许立益, 余宏达, 江冬怡, 等. 紫米与籼米复配对复配粉性质及紫米粉丝品质的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 114-121. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021120267.