



# 不同黑稻品种黑米和谷壳的花青素产量 及其抗氧化性比较

张欧玲,向珣朝\*,颜李梅,许亮,游慧,梁程

(西南科技大学 植物分子遗传育种实验室,四川绵阳 621010)

**摘要:**该研究以5个黑稻品种籽粒为材料,通过单因素实验探究树脂吸附法中各因素对黑米花青素纯化效果的影响,优化花青素纯化工艺,比较分析对不同黑稻品种黑米和谷壳的花青素纯化后的产量;采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法比较其抗氧化活性,并采用PCR方法检测花青素生物合成代谢途径中关键结构基因,以明确不同黑稻品种中黑米和谷壳花青素产量及其抗氧化特性,为黑稻花青素开发利用提供技术支撑。结果表明:(1)黑稻花青素提取液的最佳纯化条件为:静态吸附平衡时间4 h,解吸时间1.5 h,吸附液pH为2.5,温度30℃,70%乙醇洗脱。(2)黑稻黑米中花青素产量最高的品种是‘辐黑香糯’(213 μg/g),谷壳中花青素产量最高的品种是‘固城黑糯’(226 μg/g),且‘固城黑糯’黑米和谷壳的总花青素产量最高(432 μg/g)。(3)黑米花青素的DPPH清除率为65.1%,黑色谷壳花青素的DPPH清除率为73.7%,每克黑米和黑色谷壳的花青素冻干粉对DPPH自由基清除能力分别相当于3.694和4.208 mmol维生素E,谷壳花青素抗氧化能力比黑米花青素高13.9%。(4)对5个黑稻品种的花青素合成途径的5个关键基因检测发现,仅‘矮血糯’中无黄酮-3'-氢化酶基因(*OsF3'H*),而且其谷壳中的花青素产量(125 μg/g)也显著低于其余4个品种,表明*OsF3'H*基因可能与黑稻谷壳的花青素含量有关。

**关键词:**黑稻 (*Oryza sativa L.*);花青素;纯化工艺;产量;抗氧化性

中图分类号:Q946.83<sup>+</sup>6 文献标志码:A

## Comparison of Yield and Antioxidant Activity of Anthocyanin from Grains and Husks among Different Black Rice Varieties

ZHANG Ouling, XIANG Xunchao\*, YAN Limei, XU Liang, YOU Hui, LIANG Cheng

(Lab of Plant Molecular Genetics and Breeding, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China)

**Abstract:** In order to optimize anthocyanin purification process, we used the grains of five black rice varieties as materials and a single factor experiment design to investigate the effect of various factors of resin adsorption in the purification of black rice anthocyanin. The yields of purified anthocyanin of brown rice and husk in different varieties were compared. Then, the antioxidant activities of anthocyanin from different varieties were analyzed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method. Finally, PCR was used to detect the key structural genes in anthocyanin synthesis pathway of black rice so that to clarify the yields and antioxidant characteristics of anthocyanin from brown rice and husk of five different black rice varieties and this will provide technical support for the development and utilization of anthocyanin in black rice. The re-

收稿日期:2019-11-05;修改稿收到日期:2020-02-12

基金项目:四川省科技厅重点研发计划(重大科技专项, No. 2019YFN0019);四川省教育厅重点项目(17ZA0272)

作者简介:张欧玲(1996—),女,在读硕士研究生,主要从事分子标记辅助改良稻米品质研究。E-mail: zolloz@163.com

\*通信作者:向珣朝,博士,教授,硕士生导师,主要从事分子遗传育种研究。E-mail: xiangxunchao@swust.edu.cn

sults showed that: (1) the optimum purification condition for extracts of black rice anthocyanin was 4 h of static adsorption equilibrium, 1.5 h of the desorption time, 2.5 of pH, 30 °C of temperature, 70% ethanol of eluent. (2) The highest yield of anthocyanin in brown rice came from Fuheixiangnuo (213 µg/g), however, to husk from Guchengheinuo (226 µg/g). Meanwhile, Guchengheinuo possessed the highest total yield of anthocyanin, 432 µg/g. (3) The DPPH clearance rate of anthocyanin in brown rice was 65.1%, and it in husk was 73.7%. The DPPH free radical scavenging capacity per gram anthocyanin freeze-dried powder from brown rice and husk were equivalent to 3.694 mmol and 4.208 mmol vitamin E, respectively. The antioxidant capacity of anthocyanin from husk increased by 13.9% compared with that from brown rice. (4) In the identification of the five key structural genes of anthocyanin synthesis pathway for five black rice, it was found that there was no *flavonoid-3'-hydrogenase* gene (*OsF3'H*) in Aixuenuo. And its anthocyanin yield in rice husk was also the lowest (125 µg/g) compared to the other four varieties, and it is suggested that *OsF3'H* may be related to the anthocyanin content came husk of black rice.

**Key words:** black rice (*Oryza sativa* L.); anthocyanin; purification process; yield; antioxidant activity

黑稻(*Oryza sativa* L.)是一种独特的水稻品种,它富含人体必需氨基酸、膳食纤维、维生素、矿物质、花青素以及酚类化合物,在世界各地都广受欢迎<sup>[1]</sup>。其中,花青素是黑米中重要的生理活性物质之一<sup>[2-3]</sup>,它大多来自于黑米的糊粉层或黑稻的谷壳。中国黑稻种植历史悠久,种质资源十分丰富<sup>[4]</sup>。作为谷类商品中花青素的主要来源,黑稻花青素含量丰富,不仅黑米花青素含量是红米的35倍<sup>[5]</sup>,黑稻谷壳中也含有一定的花青素<sup>[6]</sup>。黑米花青素的纯化通常使用树脂吸附法进行,其操作简便且成本低廉,使用最为广泛<sup>[7]</sup>。然而,根据现有报道,黑米和黑色谷壳花青素树脂吸附的纯化条件存在较大差异<sup>[8-11]</sup>,还缺少一套较为完整的体系。黑米花青素具有强抗氧化性,其清除超氧阴离子能力是欧洲越橘的3.63倍<sup>[12]</sup>,而黑稻谷壳作为功能性食品的潜在用途也越来越受到人们的关注<sup>[13]</sup>,其花青素提取物抗氧化性高于紫包菜花青素提取物<sup>[14]</sup>,但相关研究还较少,且目前关于对不同黑稻资源之间花青素含量和抗氧化性的比较分析还未见报道。因此,深入研究不同黑稻品种的黑米糊粉层和黑稻谷壳中花青素含量及其抗氧化性的高低对黑稻的开发与深加工具有重要意义。同时,花青素生物合成过程非常复杂,虽然研究者基本探明了花青素生物合成途径和分子调控机制<sup>[15]</sup>,但关键结构基因苯丙氨酸合成酶基因(*Os PAL*, phenylalanine ammonia-lyase)、花青素合成酶基因(*Os ANS*, anthocyanidin synthase)、黄烷酮-3-羟化酶基因(*Os F3H*, flavanone-3-hydroxylase)、二氢黄酮醇还原酶基因(*Os DFR*, dihydroflavonol-4-reductase)、类黄酮-3'-羟化酶基因(*Os F3'H*, flavonoid-3'-hydroxylase)等在花青素不同合成阶段对花青素积累的作用还有待深入

研究<sup>[16]</sup>。

本试验首先以龙跃腾等<sup>[17]</sup>确定的最佳工艺进行黑米花青素粗品提取,采用具有高效吸附率和解吸附率的DM-301大孔树脂纯化花青素粗品<sup>[18]</sup>,确定最佳吸附时间、温度、上样pH及解吸溶剂浓度,拟得到优化的纯化条件。其次,使用优化的纯化条件纯化不同黑稻品种黑米和谷壳的花青素,比较其产量,并测定纯化后的黑米和谷壳花青素的抗氧化性,鉴定花青素生物合成代谢途径中关键结构基因。从而筛选出黑米和谷壳花青素产量较高的黑稻品种,明确黑米花青素和谷壳花青素抗氧化性的高低,得到一套完整的黑稻花青素纯化方法,并初步明确花青素合成代谢途径关键基因与花青素含量间的关系,为黑稻花青素开发利用提供技术支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及样品制取

本研究以5个黑稻品种‘固城黑糯’、‘黑糯02’、‘香碧糯’、‘矮血糯’和‘辐黑香糯’为供试材料,均由西南科技大学植物分子遗传育种实验室提供。对不同黑稻品种分别收获,自然晾晒后,在42 °C恒温干燥箱中烘48 h,然后在储藏箱中再平衡水分60 d。稻米加工时,首先经过电动砻谷机(日本Kett, TR-200)脱壳为糙米,糙米和谷壳进一步经高速锤式通用粉碎磨(瑞典Perten, Lm3100型)过100目筛分别磨成米粉和糠粉,待用。

### 1.2 花青素提取

本研究以无毒且易除去的无水乙醇为提取剂,采用龙跃腾等<sup>[17]</sup>确定的最佳工艺进行黑稻花青素提取:提取液为体积分数80%的乙醇,用盐酸调节pH至1,提取时间为60 min,提取温度为45 °C,料

液比为 1:7(g/mL)。花青素纯化的静态和动态试验用‘黑糯 02’品种的黑米粉花青素粗提液进行。

### 1.3 花青素标准曲线的制作

精密称取 10 mg 矢车菊-3-葡萄糖苷标准品溶于 pH 为 2 的乙醇溶液中, 定容至 10 mL, 配制成 1 mg/mL 的标准储备液。然后, 配制成浓度分别为 10、20、30、40 和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列标准溶液, 用分光光度计测定吸光度。以矢车菊-3-葡萄糖苷浓度为横坐标, 以其吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线。

### 1.4 花青素纯化的大孔树脂静态试验

在侯召华等<sup>[9]</sup>和孟宪军等<sup>[19]</sup>的方法上加以改进, 结合他们试验的结果, 进行黑米花青素大孔树脂纯化。

$$\text{吸附率} = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$$

$$\text{解吸率} = A_2/(A_0 - A_1) \times 100\%$$

式中,  $A_0$  为吸附前溶液吸光光度值;  $A_1$  为吸附后溶液吸光光度值;  $A_2$  为解吸后溶液吸光光度值。

**1.4.1 确定静态吸附时间** 取 1.0 g 预处理过的大孔吸附树脂于锥形瓶中, 加入 30 mL 黑米花青素提取液, 调节 pH 为 2, 保鲜膜封口后放入 30 ℃ 恒温水浴振荡器中, 以 110 r/min 的速度振荡, 每隔 1 h 测定一次吸光度, 直到数值稳定为止。

**1.4.2 确定静态解吸时间** 取 1.0 g 吸附饱和的大孔吸附树脂于锥形瓶中, 加入 30 mL 体积分数为 80%、pH 为 2 的乙醇, 保鲜膜封后放入 30 ℃ 的恒温水浴振荡器中, 调节速度为 110 r/min, 每间隔 1 h 测 1 次吸光度, 直到数值趋于稳定。

**1.4.3 确定最佳吸附温度** 分别取 1.0 g 预处理过的大孔树脂于 5 个锥形瓶中, 每个锥形瓶加入 30 mL 花青素提取液, 分别放入振荡速度为 110 r/min, 温度分别为 20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃ 的恒温水浴振荡器中, 吸附完全后, 分别测定其吸光度, 确定最佳吸附温度。

**1.4.4 确定最佳洗脱剂体积分数** 分别取 1.0 g 吸附饱和的大孔树脂于 5 个锥形瓶中, 分别加入 pH 为 2, 体积分数分别为 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇 30 mL, 放入 30 ℃ 恒温水浴振荡器中以 110 r/min 速度震荡, 解吸完全后, 测定吸光度, 确定最佳洗脱剂体积分数。

**1.4.5 确定提取液 pH** 分别取 1.0 g 预处理过的大孔吸附树脂于 5 个锥形瓶中, 分别加入 pH 为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 的 30 mL 黑米提取液, 放入 30 ℃ 恒温水浴振荡器中以 110 r/min 速度震荡, 解吸完全后, 测定吸光度, 确定最佳 pH。

### 1.5 花青素纯化的大孔树脂动态试验

**1.5.1 黑米花青素在大孔树脂上的泄露曲线** 将预处理后的 DM-301 大孔树脂用湿装柱法进行装柱(柱子径高比 1:50)。将温度为 30 ℃ 的花青素提取液以 2 mL/min 的流速通过柱子, 当流出液的吸光度值为上样液吸光度值的 1/10 时, 花青素就从树脂上泄露。以吸光度值为纵坐标, 上样体积为横坐标绘制花青素泄露曲线。

**1.5.2 洗脱曲线的绘制** 将预处理后的 DM-301 大孔树脂用湿装柱法装柱, 进行花青素吸附, 待吸附饱和后, 用足量的蒸馏水通过柱子, 然后用 pH 为 2 的 70% 乙醇以 3 mL/min 的流速洗脱, 测出该洗脱液在不同体积时的吸光度, 以洗脱液中花青素含量作为纵坐标, 洗脱液体积作为横坐标绘出洗脱曲线。

### 1.6 不同品种黑米及其谷壳花青素提取与纯化

分别取 3 g 不同品种的黑米粉及 5 g 不同品种的黑色谷壳粉, 用上述最佳条件提取, 再用大孔树脂进行纯化, 通过旋转蒸发仪进行浓缩, 用真空冷冻干燥机进行干燥, 最后称重比较。

### 1.7 花青素抗氧化性测定

黑米和黑色谷壳花青素抗氧化性测定参考

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称 Name of primer	引物序列 Sequence of primer	退火温度 Tm	引物长度 The length of the primer/bp
OsF3'H	F: CCGCTACAGTACCAAGCCTTC R: TGCCACCATTCTAGAGTTCC	55	479
OsPAL	F: GGTGTTCCCGCTCTACC R: GGAACACCTTGTGCACTCC	59.7	102
OsANS	F: GAAGAGGGAGTGGGAGGACT R: CAGAACGACGCCAGGAGAG	59	527
OsDFR	F: CGGGTTCAAGGTTCAAGTACA R: TGAAACCGGAGGGAGTAAC	50.2	383
OsF3H	F: GAGCAATGGGAGGTTCAAGA R: CTTCGATTTTCGACGGAAGA	48	469

Amarowicz 等<sup>[14]</sup>的 DPPH 法,在 516 nm 处测定吸光度通过计算得到。DPPH 自由基清除率的计算公式如下:

$$\Delta A \% = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$$

式中,  $A_0$  为 60 min 开始前在 516 nm 处的吸光光度值,  $A_t$  为 60 min 结束时在 516 nm 的吸光光度值。

### 1.8 花青素生物合成代谢途径中关键结构基因的鉴定

根据 Shih 等<sup>[20]</sup>在 Table S1 中提供的花青素生物合成关键结构基因的引物序列,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成 PCR 扩增引物,引物信息见表 1。

### 1.9 数据分析

本研究中所有数据的统计和处理用 Excel 2010 进行。采用 IBM SPSS 软件进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑稻花青素提取液大孔树脂纯化体系的优化

**2.1.1 花青素标准曲线** 根据薛晓丽<sup>[21]</sup>及刘长姣<sup>[22]</sup>的研究可知黑米麸皮花青素提取物的主要成分为矢车菊色素-3-葡萄糖苷,几乎占总含量的 95% 以上,所以本试验中矢车菊-3-葡萄糖苷的标准曲线可视为黑米花青素的标准曲线。以矢车菊-3-葡萄糖苷为标准品绘制矢车菊-3-葡萄糖苷标准曲线如图 1。得到的标准曲线方程为  $y = 0.0187x - 0.0054$ ,  $R^2 = 0.9981$ , 式中  $y$  为吸光光度值,  $x$  为矢车菊-3-葡萄糖苷的浓度。

**2.1.2 静态吸附时间** 根据图 2,A 可知,在最开始的 1 h,花青素吸附量增加很快,随着时间的增加,吸附率也逐渐增加。吸附率在 1~3 h 明显增加,3~4 h 增加缓慢;4 h 以后,吸附率保持相对平衡,基本没什么变化。说明此时大孔树脂吸附达到动态平衡,所以本试验确定最佳吸附时间为 4 h。

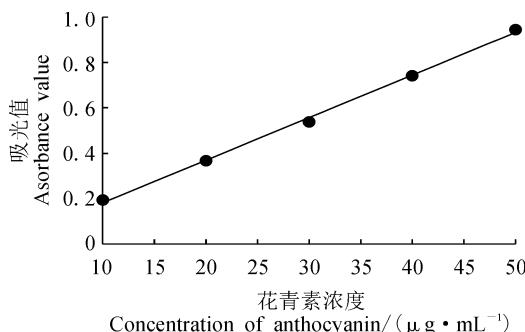


图 1 花青素标准曲线

Fig. 1 Anthocyanin standard curve

**2.1.3 静态解吸时间** 图 2,B 显示,随着时间增加,花青素解吸率明显增加,且在开始 1.5 h 增加明显,在 1.5 h 以后解吸率趋于平稳,原因可能是在 30 ℃ 时随着时间增加,提取液中花青素部分氧化降解。因此,本试验确定的最佳解吸时间为 1.5 h。

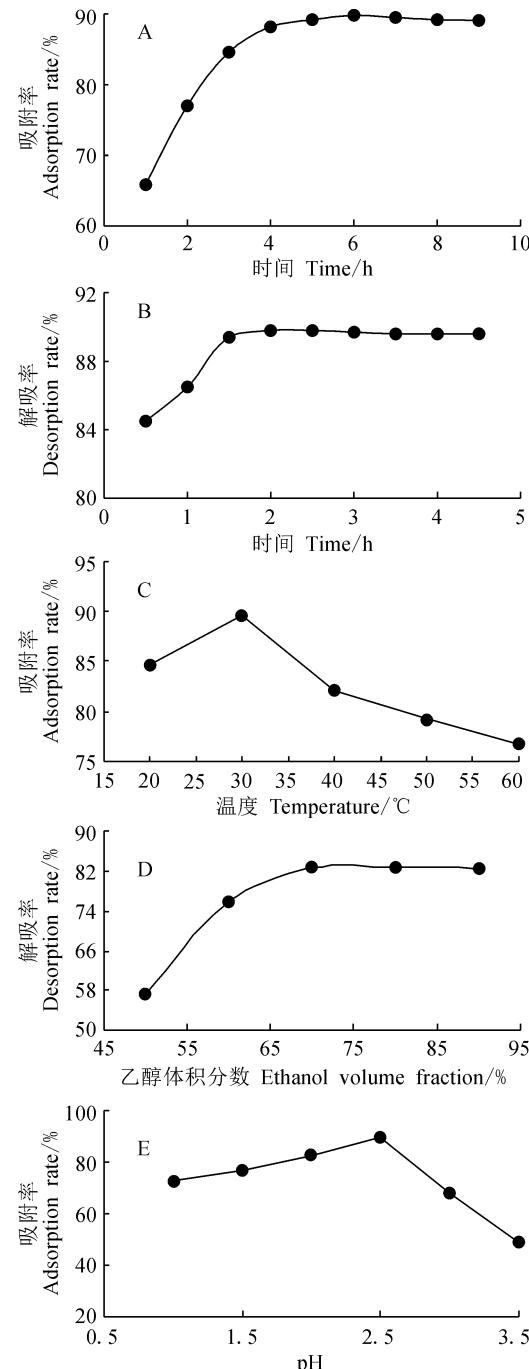


图 2 不同环境条件下大孔树脂对黑稻花青素静态吸附率的变化

Fig. 2 Static adsorption rate of black rice anthocyanin by macroporous resin under different environmental conditions

**2.1.4 吸附温度** 由图 2,C 可看出,随着温度升高,花青素吸附率逐渐增加,并在 30 ℃时吸附率最大;温度高于 30 ℃后,吸附率随着温度增加而明显降低。由于温度过高会加速花青素的降解从而使花青素氧化,所以本试验确定的最佳吸附温度为 30 ℃。

**2.1.5 洗脱剂体积分数** 由图 2,D 来看,随着洗脱剂乙醇体积分数增加,花青素解吸率也缓慢增加,这可能是由于随着洗脱剂体积分数增加,花青素在其中的溶解也增加;当乙醇体积分数达到 70% 时,曲线出现最高点,解吸率最高;随着乙醇体积分数的继续增加,解吸率基本保持不变,所以本试验确定最佳洗脱剂乙醇积分数为 70%。

**2.1.6 pH 值** 图 2,E 表明,随着吸附液 pH 增加,花青素吸附率也逐渐增加,这可能是因为花青素是类黄酮类物质,具有一定的极性和酸性,适宜的 pH 有利于它的吸附;当 pH 达到 2.5 时吸附率达到最大,pH 大于 2.5 以后,吸附率随着 pH 的增加而明显降低,这可能是因为黑米花青素因离子化趋势而不易被吸附,所以本试验的最佳 pH 为 2.5。

**2.1.7 泄露曲线** 试验中当上样液体积达到 460 mL 后出现泄漏,即流出液中花青素的光密度(optical density, OD)值达到上样液中花青素 OD 值的 1/10。结合图 3,A 可知,在吸附初始阶段吸附效率很高,上样液体积达到一定量后流出液的 OD 值增加较快,这是由于大孔树脂的吸附已接近饱和状态。

**2.1.8 洗脱曲线** 图 3,B 显示,使用酸性 70% 的乙醇溶液进行洗脱,能较好地洗脱树脂上的花青素,虽然有拖尾现象,但洗脱峰相对较集中。其中,当洗脱液用量为 20 mL 时,达到洗脱峰;当洗脱液用量增至 60 mL 时,树脂上吸附的黑米花青素大部分都被洗脱下来;当洗脱液用掉 100 mL 时,树脂上的花青素基本被洗净。

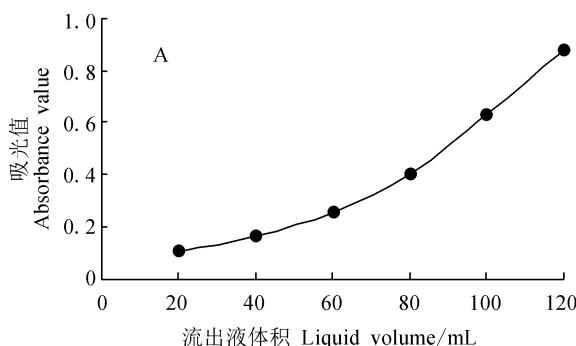


图 3 黑稻花青素大孔树脂的泄露曲线(A)和洗脱曲线(B)

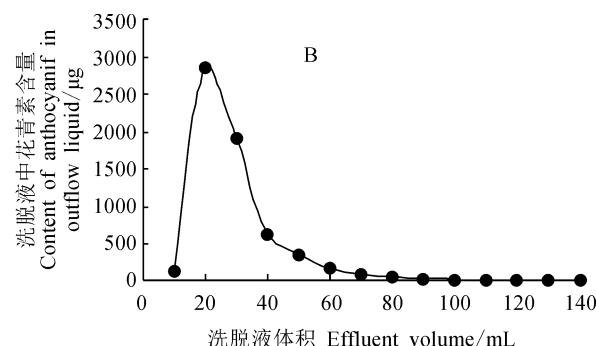
Fig. 3 Leak curve (A) and elution curve (B) of black rice anthocyanin from macroporous resin

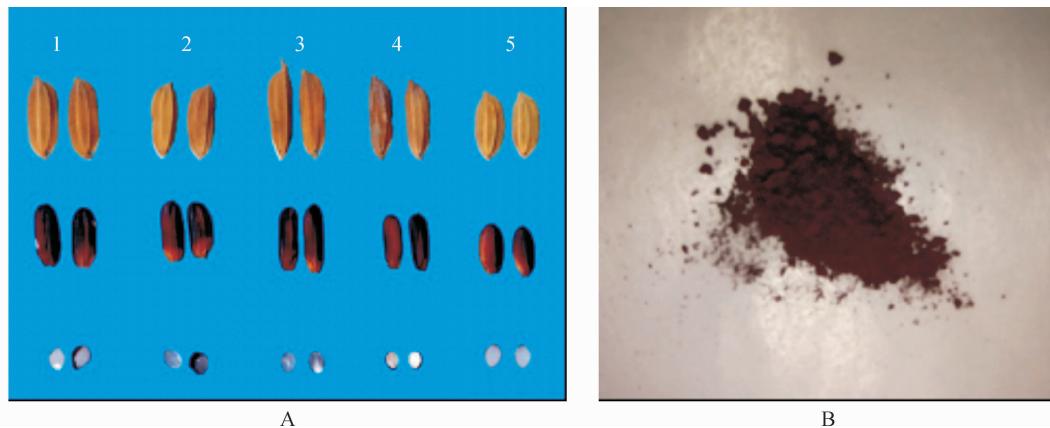
## 2.2 不同黑稻品种籽粒的外观特征及其花青素产量

根据 5 个黑稻品种籽粒和糙米的外观特征可知,其花青素主要积累于谷壳和糊粉层(图 4,A)。5 个黑稻品种的黑米及其谷壳的花青素抽提物,分别由上述花青素纯化的优化方法进行纯化,真空冷冻干燥后得到花青素冻干粉(图 4,B)。表 2 显示,在 5 个黑稻品种中,黑米花青素产量最高的是‘辐黑香糯’( $213 \mu\text{g/g}$ ),极显著高于除‘固城黑糯’以外的其他品种,其黑色谷壳的花青素产量也达到  $185 \mu\text{g/g}$ ;黑色谷壳花青素产量最高的是‘固城黑糯’( $226 \mu\text{g/g}$ ),极显著高于其他品种,其黑米的花青素产量为  $206 \mu\text{g/g}$ ,与其他品种相比也处于较高水平;这说明不同黑稻品种黑米和谷壳的花青素产量不相同,且存在显著性差异。同时,同一品种黑米和谷壳中的花青素产量也不相同。‘黑糯 02’和‘固城黑糯’谷壳中的花青素产量分别极显著或显著高于其黑米中的花青素产量,而‘矮血糯’和‘辐黑香糯’黑米中的花青素的产量分别极显著或显著高于其谷壳中的花青素产量。可见,黑米和黑稻谷壳中的花青素含量的遗传调控机制可能存在差异,相关基因在不同部位的表达量不同。此外,如果进一步考查各个黑稻品种黑米和谷壳的花青素总产量,则‘固城黑糯’最高,每 100 g 黑米和每 100 g 谷壳的总花青素总产量达到  $43.2 \text{ mg}$ ,其不仅黑米中有大量花青素,而且谷壳中的花青素产量也最高。黑稻谷壳作为稻米加工的副产物,利用价值极低,如果将黑色谷壳作为花青素提取的原料,将提升其经济价值,进一步提高黑米生产和加工的经济效益。

## 2.3 黑稻花青素的抗氧化性

根据以前的文献报道,黑稻米粉和糠粉的花青素抗氧化性差异大,因此本研究主要集中比较两者的抗氧化性差异。测试时先将所有黑稻品种纯化后





1. 固城黑糯;2. 黑糯 02;3. 香砻糯;4. 矮血糯;5. 辐黑香糯

图 4 5个黑稻品种籽粒的外观特征(A)和花青素冻干粉(B)

1. Guchenghei; 2. Heinuo 02; 3. Xiangzhainuo; 4. Aixuenuo; 5. Fuheixiangnuo

Fig. 4 Grain appearance characteristics of five varieties (A) and the freeze-dried powder of anthocyanin (B)

表 2 各个黑稻品种黑米和谷壳中花青素

纯化后产量的比较

Table 2 Comparison of purified anthocyanin yield in five varieties of black rice between grains and husk

品种 Variety	花青素产量 Yield of anthocyanin/(μg/g)	
	黑米 Rice grains	谷壳 Husk
固城黑糯 Guchenghei	206±0.1B	226±0.2A
黑糯 02 Heinuo 02	138±0.3E	192±0.1B
香砻糯 Xiangzhainuo	174±0.4D	183±0.2C
矮血糯 Aixuenuo	187±0.2C	125±0.3D
辐黑香糯 Fuheixiangnuo	213±0.2A	185±0.1C

注:同列不同大写字母表示品种间在 0.01 水平差异显著( $P<0.01$ )

Note: The different capital letters within same column indicate significant difference among varieties at 0.01 level ( $P<0.01$ )

的黑米花青素粉混合和所有品种纯化后的谷壳花青素粉混合,分为黑米花青素和谷壳花青素两类再分别进行抗氧化性测试。根据试验结果绘制维生素 E 标准曲线(图 5),标准曲线方程为  $y = 0.8374x + 0.0323$  ( $R^2 = 0.9897$ ),式中  $y$  表示 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)清除率,  $x$  表示维生素 E 浓度。根据 Amarowicz 等<sup>[14]</sup>的抗氧化活性测量方法,1 h 前后分别在 516 nm 处测定吸光度值,测出黑米花青素的 DPPH 清除率为 65.1%,黑色谷壳花青素的 DPPH 清除率为 73.7%。结合维生素 E 标准曲线可得,每克黑米花青素冻干粉对 DPPH 自由基清除能力相当于 6.94 mmol 维生素 E,每克黑色谷壳花青素冻干粉对 DPPH 自由基清除能力相当于 4.208 mmol 维生素 E,黑色谷壳花青素抗氧化性较黑米花青素提高了 13.9%。

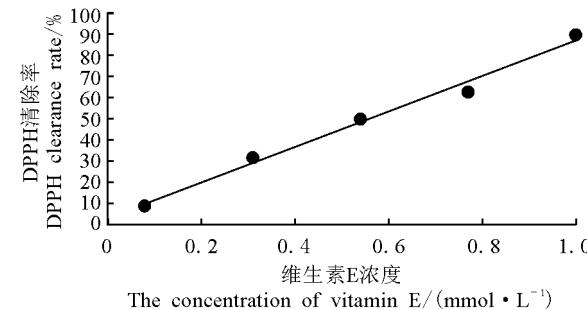


图 5 维生素 E 标准曲线

Fig. 5 The standard curve of vitamin E

3. 694 mmol 维生素 E,每克黑色谷壳花青素冻干粉对 DPPH 自由基清除能力相当于 4.208 mmol 维生素 E,黑色谷壳花青素抗氧化性较黑米花青素提高了 13.9%。

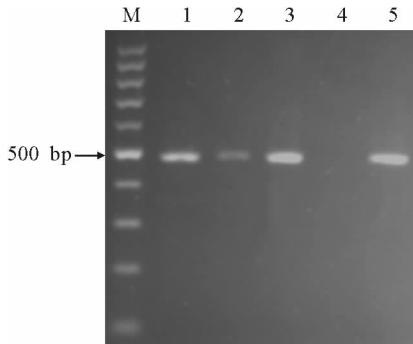
## 2.4 花青素生物合成途径中关键结构基因的鉴定

用设计的 5 对引物分别对 5 个黑稻品种进行 PCR 检测,结果表明(表 3;图 6),在‘固城黑糯’、‘黑糯 02’、‘香砻糯’、‘矮血糯’和‘辐黑香糯’中均能检测到 OsPAL、OsANS、OsDFR 和 OsF3'H 的目的基因,除‘矮血糯’外均能检测到 OsF3'H 的目的基因。说明‘矮血糯’在花青素生物合成途径中缺少 OsF3'H 关键结构基因。OsF3'H 的功能是催化二氢黄酮醇合成二氢槲皮素,但 OsF3'H 的功能可以被 OsF3'5'H(类黄酮 3',5' 羟化酶)部分替代,催化二氢黄酮醇合成二氢杨梅黄酮,二氢槲皮素和二氢杨梅黄酮都由 DFR(二氢黄酮醇-4-还原酶)催化合成无色花色素。因此,有花青素积累的品种不一定有 OsF3'H 存在,而没有 OsF3'H 的品种则会导致其花青素含量的减少。

表3 不同水稻品种的PCR条带统计

Table 3 Statistics of PCR results for different rice varieties

引物名称 Name of primer	固城黑糯 Guchengheinuo	黑糯 02 Heinuo 02	香砦糯 Xiangzhainuo	矮血糯 Aixuenuo	辐黑香糯 Fuheixiangnuo
OsF3'H	1	1	1	0	1
OsPAL	1	1	1	1	1
OsANS	1	1	1	1	1
OsDFR	1	1	1	1	1
OsF3H	1	1	1	1	1



M. 分子量标准；1. 固城黑糯；2. 黑糯 02；3. 香砦糯；  
4. 矮血糯；5. 辐黑香糯

图6 不同黑稻品种 *OsF3'H* 基因的 PCR 结果  
M. DNA maker; 1. Guchengheinuo; 2. Heinuo 02;

3. Xiangzhainuo; 4. Aixuenuo; 5. Fuheixiangnuo

Fig. 6 PCR result of *OsF3'H* gene in different black rice varieties

### 3 讨论

黑稻是中国古老而珍贵的特种水稻资源,分布广泛且品种众多。据统计,在中国收藏的黑稻资源中,原产中国的有373个<sup>[23]</sup>。其名称的由来是因为积累了大量的花青素,且黑米中含有的花青素是所有已研究有色谷粒中含量最高的<sup>[24]</sup>,优化黑稻花青素的纯化体系有利于黑稻花青素的加工和利用。本试验使用DM-301型大孔树脂对花青素进行静态及动态吸附试验研究,得到大孔树脂静态吸附平衡时间4 h、解吸时间1.5 h、吸附液pH 2.5、温度30℃、70%的乙醇洗脱效果最佳,其中静态吸附时间、解吸时间以及吸附温度与陆海莲等<sup>[25]</sup>的研究结果相同;乙醇的体积分数和侯方丽等<sup>[26]</sup>的试验结果相同。Kang等<sup>[11]</sup>利用离子交换树脂XAD7HP进行黑米花青素纯化研究,发现60%的酸化乙醇能有效地洗脱花青素。因此,花青素粗品进行纯化时如果选用不同的交换树脂则应首先要优化其工艺。

利用本试验优化后的纯化条件,对5个黑稻品种的黑米和谷壳中的花青素抽提物进行纯化并进一

步测定其抗氧化活性。结果表明,不同黑稻品种中黑米和谷壳的花青素产量差异显著,纯化后谷壳中的花青素抗氧化能力强于黑米花青素。Pitija等<sup>[27]</sup>也发现不同品种有不同的花青素含量,其花青素含量的高低与其抗氧化性的能力无一致性,甚至花青素含量高的品种,其所提取花青素的抗氧化性最低。Pathak等<sup>[28]</sup>对22个有色稻品种进行花青素提取,证明不同品种的花青素含量和其抗氧化性均存在显著差异。因此,以黑稻为原料进行花青素提取时,首先进行资源筛选是十分必要的。本研究中5个黑稻品种谷壳的花青素产量范围在125~226 μg/g,对比Jha等<sup>[29]</sup>检测印度黑稻品种 Poireton 的花青素产量(33.9 μg/g),均为花青素含量高的品种。本研究筛选出的‘固城黑糯’和‘辐黑香糯’是优良的高花青素含量品种,‘固城黑糯’每100 g黑米和每100 g谷壳的花青素总产量能达到43.2 mg,‘辐黑香糯’黑米花青素产量为213 μg/g。Kim等<sup>[30]</sup>选育了1个巨胚黑糯稻,其黑米的矢车菊-3-葡萄糖苷含量高达751.5 μg/g,因此进行高花青素含量品种的选育也会卓有成效。

对于黑稻所含花青素的抗氧化性问题,Bae等<sup>[31]</sup>的结果也证明黑米的花青素抽提物与阿卡波糖相比是α-葡萄糖苷酶的强有力抑制剂,添加有该抽提物的凝胶与小麦粉凝胶相比有显著低的血糖指数(glycemic index, GI),说明该抽提物通过抑制消化酶来抑制淀粉水解。为什么黑稻谷壳所提花青素的抗氧化性强于黑米所提花青素? Iqbal等<sup>[32]</sup>检测5个巴基斯坦水稻品种米糠抽提物的抗氧化性时,发现主要抗氧化性物质是生育酚、生育三烯酸和谷维醇。Pitija等<sup>[27]</sup>也发现一个黑稻品种有最高的花青素含量,但其抗氧化性和酚类含量为最低。这表明黑稻花青素抽提物的抗氧化性高低取决于其总酚类含量的多少,而不是花青素含量。另外,本研究在对5个黑稻品种进行花青素生物合成代谢途径中关键结构基因鉴定时,于‘矮血糯’品种中未检测到

*OsF3'H* 目的基因, *OsF3'H* 调控的类黄酮 3'-羟化酶(Flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)是合成矢车菊色素苷的关键酶<sup>[33]</sup>,而该品种谷壳中花青素含量也最少,两者之间的联系还需进一步探讨。

综上所述,本研究从花青素纯化条件的优化、不同黑稻品种中黑米和谷壳花青素产量的高低及其抗氧化性强弱和花青素合成代谢途径关键基因的鉴定等进行分析,以 DM-301 型大孔树脂为材料,认为静态吸附平衡时间 4 h,解吸时间 1.5 h,吸附液 pH

2.5,温度 30℃,70%的乙醇洗脱时,黑稻花青素提取液的纯化效果最佳。黑米中花青素产量最高的品种是‘辐黑香糯’,谷壳中花青素产量最高的品种是‘固城黑糯’,而‘固城黑糯’黑米和谷壳的总花青素产量最高。谷壳花青素的抗氧化性优于黑米花青素。*OsF3'H* 基因可能与黑稻谷壳花青素含量有关,但还需深入分析。本研究为黑稻资源的遗传分析、综合利用和价值提升提供了较好的技术基础和有益借鉴。

## 参考文献:

- [1] HE S D, LOU Q Y, SHI J, et al. Water extraction of anthocyanins from black rice and purification using membrane separation and resin adsorption[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, **41**(4): e13091.
- [2] ITO V C, LACERDA L G. Black rice (*Oryza sativa* L.): a review of its historical aspects, chemical composition, nutritional and functional properties, and applications and processing technologies[J]. *Food Chemistry*, 2019, **301**: 125-304.
- [3] 李昌文, 张丽华, 纵伟. 黑米色素的提取工艺及生物活性研究进展[J]. 中国调味品, 2019, **44**(7): 168-170, 175.
- [4] 邓文辉, 张涛, 吴三桥, 等. 黑稻 *CHS* 基因外显子 II 部分序列遗传变异分析[J]. 种子, 2011, **30**(9): 40-44.
- [5] DENG W H, ZHANG T, WU S Q, et al. Analysis on genetic variation of black rice *CHS* exon II gene sequence[J]. *Seed*, 2011, **30**(9): 40-44.
- [6] ABDEL-AAL E S M, YOUNG J C, RABALSKI I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**(13): 4 696-4 704.
- [7] LI Y F, TENG F, SHI F, et al. Effects of high-temperature air fluidization (HTAF) on eating quality, digestibility, and antioxidant activity of black rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Starch-Stärke*, 2016, **69** (7-8). DOI: 10.1002/star.201600274.
- [8] 崔丽霞, 张志军, 李晓君, 等. 花青素提取、分离纯化技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, **38**(20): 195-199.
- [9] CUI L X, ZHANG Z J, LI X J, et al. Research progress on extraction, separation and purification of anthocyanins [J]. *Food Research and Development*, 2017, **38**(20): 195-199.
- [10] 张名位, 郭宝江, 池建伟, 等. 黑米皮的营养与抗氧化评价及其加工处理的保质效果[J]. 农业工程学报, 2004, (6): 165-169.
- [11] ZHANG M W, GUO B J, CHI J W, et al. Nutrients and antioxidation of black rice pericarp and the preservation effects of processing techniques[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2004, (6): 165-169.
- [12] 侯召华, 翟虎渠, 万建民, 等. 黑米花色苷的提取及纯化[J]. 食品科学, 2010, **31**(10): 53-59.
- [13] HOU S H, ZHAI H Q, WAN J M, et al. Extraction and purification of anthocyanins from black rice[J]. *Food Science*, 2010, **31**(10): 53-59.
- [14] 石娟. 黑米中花青素的提取、纯化及其体内抗氧化活性研究[D]. 合肥:合肥工业大学, 2012.
- [15] KANG Y, JUNG S, LEE S. An optimal extraction solvent and purification adsorbent to produce anthocyanins from black rice (*Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo) [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2014, **23**(1): 97-106.
- [16] 常世敏, 李乾丽, 谢婵媛, 等. 黑米与欧洲越橘花色苷抗氧化活性比较研究[J]. 食品工业科技, 2019, **40** (9): 57-61, 67.
- [17] CHANG S M, LI Q L, XIE C Y, et al. Comparative study on antioxidant activity of anthocyanins from black rice and european bilberry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, **40**(9): 57-61, 67.
- [18] BOUE S M, DAIGLE K W, CHEN M H, et al. Antidiabetic potential of purple and red rice (*Oryza sativa* L.) bran extracts[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **64**(26): 5 345-5 353.
- [19] AMAROWICZ R, PEGG R B, RAHIMI-MOGHADDAM P, et al. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies[J]. *Food Chemistry*, 2004, **84**(4): 551-562.
- [20] 彭玉帅, 王如峰, 张陆军. 花青素生物合成的关键酶及其调控因子[J]. 中草药, 2014, **45**(1): 131-136.
- [21] PENG Y S, WANG R F, ZHANG L J. Key enzymes and their regulatory factors involved in biosynthesis of anthocyanins[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, **45**(1): 131-136.
- [22] 邵雅芳, 徐非非, 唐富福, 等. 水稻花青素合成相关基因的时空表达研究[J]. 核农学报, 2013, **27**(1): 9-14.
- [23] SHAO Y F, XU F F, TANG F F, et al. The temporal and spatial expression pattern of anthocyanin related genes in rice

- (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, **27**(1): 9-14.
- [17] 龙跃腾, 向珣朝, 颜李梅, 等. 黑米花青素的醇提工艺优化[J]. 食品工业科技, 2018, **39**(21): 172-177.
- LONG Y T, XIANG X C, YAN L M, et al. Optimization of ethanol extracting process of anthocyanin from black rice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, **39**(21): 172-177.
- [18] 吴艳立, 丁之恩, 闫 哈, 等. 黑豆皮中花青素大孔吸附树脂分离纯化工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2016, **37**(21): 50-53, 67.
- WU Y L, DING Z E, YAN H, et al. Study on the process of macroporous resin isolate and purify anthocyanin from Black Soybean hull[J]. *Food Research and Development*, 2016, **37**(21): 50-53, 67.
- [19] 孟宪军, 李颖畅, 宣景宏, 等. AB-8 大孔树脂对蓝莓花色苷的动力吸附与解吸特性研究[J]. 食品工业科技, 2007, (12): 94-96, 99.
- MENG X J, LI Y C, XUAN J H, et al. Dynamic adsorption and desorption characteristics of AB-8 macroporous resin to anthocyanins of blueberry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, (12): 94-96, 99.
- [20] SHIH C H, CHU H, TANG L K, et al. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis[J]. *Planta*, 2008, **228**(6): 1 043-1 054.
- [21] 薛晓丽. 高效液相色谱法测定黑米提取物中矢车菊色素的成分及含量[J]. 食品科技, 2010, **35**(2): 268-270, 274.
- XUE X L. Research on the content of the extract Cyanidin (Cy)-3-glucoside in black rice by HPLC[J]. *Food Science and Technology*, 2010, **35**(2): 268-270, 274.
- [22] 刘长姣, 熊湘炜, 郑 霞, 等. HPLC 法测定黑米中矢车菊素-3-葡萄糖苷含量的不确定度评定[J]. 中国食品添加剂, 2017, (10): 147-151.
- LIU C J, XIONG X W, ZHENG X, et al. Uncertainty evaluation for determining content of Cyanidin-3-glucoside in Black rice by HPLC[J]. *China Food Additives*, 2017, (10): 147-151.
- [23] 李茂柏. 上海特种水稻研究利用现状与发展展望[J]. 种子世界, 2018, (2): 11-12.
- LI M B. Present situation and prospect of special rice research in Shanghai[J]. *Seed World*, 2018, (2): 11-12.
- [24] PEDRO A C, GRANATO D, ROSSO N D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability [J]. *Food Chemistry*, 2016, **191**: 12-20.
- [25] 陆海莲, 吴 春, 刘 宁. AB-8 大孔树脂对黑米花色苷的吸附性能研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2013, **29**(1): 93-96.
- LU H L, WU C, LIU N. Study on AB-8 macroporous resin adsorption properties of black rice anthocyanin[J]. *Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition)*, 2013, **29**(1): 93-96.
- [26] 侯方丽, 张名位, 苏东晓, 等. 黑米皮花色苷的大孔树脂吸附纯化研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2009, (1): 100-104.
- HOU F L, ZHANG M W, SU D X, et al. Research on adsorption character and purification of black rice anthocyanins with macroporous resin[J]. *Journal of South China Normal University(Natural Science Edition)*, 2009, (1): 100-104.
- [27] PITIJA K, NAKORNRIAB M, SRISEADKA T, et al. Anthocyanin content and antioxidant capacity in bran extracts of some Thai black rice varieties[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2013, **48**(2): 300-308.
- [28] PATHAK K, RATHI S, SARMA R N, et al. Assessment of physical, chemical and antioxidant properties of few pigmented glutinous rice grown in Northeast India[J]. *Indian Journal of Plant Physiology*, 2016, **21**(3): 287-299.
- [29] JHA P, DAS A J, DEKA S C. Optimization of ultrasound and microwave assisted extractions of polyphenols from black rice (*Oryza sativa* cv. Poiretton) husk[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, **54**(12): 3 847-3 858.
- [30] KIM J Y, SEO W D, PARK D S, et al. Comparative studies on major nutritional components of black waxy rice with giant embryos and its rice bran[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2013, **22**(1): 121-128.
- [31] BAE I Y, AN J S, OH I K, et al. Optimized preparation of anthocyanin-rich extract from black rice and its effects on in vitro digestibility [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2017, **26**(5): 1 415-1 422.
- [32] IQBAL S, BHANGER M I, ANWAR F. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan[J]. *Food Chemistry*, 2005, **93**(2): 265-272.
- [33] 侯泽豪, 王书平, 魏淑东, 等. 植物花青素生物合成与调控的研究进展[J]. 广西植物, 2017, **37**(12): 1 603-1 613.
- HOU Z H, WANG S P, WEI S D, et al. Anthocyanin biosynthesis and regulation in plants[J]. *Guizhou University of Chinese Medicine*, 2017, **37**(12): 1 603-1 613.

(编辑:裴阿卫)