DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260423006
引用格式: 瞿广胜, 蒋瑶, 徐林, 等. 氨基酸靶向代谢组学分析晶粒小鬼伞自溶过程关键差异代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(11): 148–157.
QU GS, JIANG Y, XU L, *et al*. Analysis of key differential metabolites in the autolysis process of *Coprinellus micaceus* by amino acid targeted metabolomics [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(11): 148–157. (in Chinese with English abstract).

氨基酸靶向代谢组学分析晶粒小鬼伞自溶过程关键差异代谢物

瞿广胜[1,2], 蒋　瑶[3*], 徐　林[1,2], 戴　乾[1,2], 李显娭[1,2], 韦　刚[1,2], 刘钰洁[1,2], 赵连伟[1,2]

(1. 安顺市疾病预防控制中心, 安顺　561000; 2. 安顺市食品安全风险监测重点实验室, 安顺　561000; 3. 贵州医科大学公共卫生与健康学院, 贵阳　561113)

摘　要: 目的　通过氨基酸靶向代谢组学, 筛选晶粒小鬼伞自溶过程中的氨基酸差异代谢物, 并分析其自溶过程潜在通路。**方法**　采集晶粒小鬼伞样本, 将样本分成对照组和自溶组, 每组样本各 6 份, 共 12 份。采用超高效液相色谱-串联质谱方法检测样本中的 24 种氨基酸, 通过多元统计主成分分析(principal component analysis, PCA)评估样本重复性与整体代谢差异趋势, 正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)最大化组间差异, 筛选差异代谢物, 并对差异代谢物进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。**结果**　通过 PCA 和 OPLS-DA 分析, 主成分 1 (PC1)的贡献率为 52.6%, 主成分 2 (PC2)的贡献率为 24.1%, 自溶组(R)和对照组(W)间完全分离, 晶粒小鬼伞在自溶过程中的氨基酸代谢物表现出显著差异; 以变量重要性投影(variable importance projection, VIP)≥1, P<0.05 且|$\log_2$FC|≥0.58 为条件筛选差异代谢物, 晶粒小鬼伞自溶过程中的差异氨基酸为鸟氨酸下调 2.7 倍, 色氨酸、瓜氨酸和半胱氨酸分别上调 1.8 倍、2.5 倍和 1.9 倍; 聚类分析结果显示, 自溶组和对照组的氨基酸代谢物存在显著差异, 半胱氨酸、色氨酸和瓜氨酸在自溶组中呈显著高表达, 鸟氨酸呈显著低表达; Pearson 相关性分析显示, 半胱氨酸、瓜氨酸与色氨酸之间呈极显著正相关(P<0.01), 而三者与鸟氨酸均呈显著负相关(P<0.05)。对存在显著差异的氨基酸代谢物进行富集分析, 结果显示, 晶粒小鬼伞自溶的潜在核心高富集通路为氨基酸生物合成通路, 次核心高富集通路为植物次生代谢物的生物合成通路, 中等富集通路为精氨酸生物合成、甘氨酸丝氨酸和苏氨酸代谢、谷胱甘肽代谢、2-氧羧酸代谢、癌症中的中心碳代谢、氨酰基转移核糖核酸生物合成、*D*-氨基酸代谢、蛋白质消化与吸收和辅因子生物合成。**结论**　筛选确定鸟氨酸、色氨酸、瓜氨酸和半胱氨酸为晶粒小鬼伞自溶过程中的关键差异代谢物; 上述 4 种差异代谢物可通过多条潜在通路协同调控晶粒小鬼伞自溶进程。本研究结果可为大型真菌保鲜贮藏、加工工艺优化及资源综合开发利用提供数据支撑与科学依据。

关键词: 晶粒小鬼伞; 自溶; 氨基酸代谢; 靶向代谢组学

收稿日期: 2026-04-23
基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合支撑[2021]一般 023); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwkj2025-514)
第一作者: 瞿广胜(1996—), 男, 理化检验中级, 主要研究方向为大型真菌食源性中毒研究。E-mail: 1152740256@qq.com
***通信作者:** 蒋瑶(1988—), 女, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食品卫生与健康。E-mail: 1096134542@qq.com

Analysis of key differential metabolites in the autolysis process of *Coprinellus micaceus* by amino acid targeted metabolomics

QU Guang-Sheng[1,2], JIANG Yao[3*], XU Lin[1,2], DAI Qian[1,2], LI Xian-Yu[1,2], WEI Gang[1,2], LIU Yu-Jie[1,2], ZHAO Lian-Wei[1,2]

(1. *Anshun Centers for Disease Control and Prevention*, *Anshun* 561000, *China*; 2. *Anshun Key Laboratory of Food Safety Risk Monitoring*, *Anshun* 561000, *China*; 3. *School of Public Health and Wellness*, *Guizhou Medical University*, *Guiyang* 561113, *China*)

ABSTRACT: Objective To screen the differential metabolites of amino acids during the autolysis process of the *Coprinellus micaceus* by amino acid targeted metabolomics, and analyze the potential pathways of its autolysis process. **Methods** The samples of *Coprinellus micaceus* were collected, the samples were divided into a control group and an autolysis group, with 6 samples in each group, totaling 12 samples. The 24 kinds of amino acids in the samples were detected by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The sample repeatability and the trend of overall metabolic differences were evaluated through multivariate statistical principal component analysis (PCA). Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) maximizes differences between groups and screens for differential metabolites and the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was conducted for the differential metabolites. **Results** Through PCA and OPLS-DA, the contribution rate of principal component 1 (PC1) was 52.6%, and that of principal component 2 (PC2) was 24.1%. The autolysis group (R) and the control group (W) were completely separated, and the amino acid metabolites of *Coprinellus micaceus* disseminatus during autolysis showed significant differences. Differential metabolites were screened under the conditions of variable importance projection (VIP)$\geqslant$1, P<0.05, and $|\log_2 FC| \geqslant 0.58$. The differential amino acids during the autolysis of *Coprinellus micaceus* were ornithine downregulated by 2.7-fold, and tryptophan, citrulline and cysteine upregulated by 1.8-fold, 2.5-fold and 1.9-fold, respectively. Cluster analysis results showed significant differences in amino acid metabolites between the autolysis group and the control group. Cysteine, tryptophan, and citrulline were significantly highly expressed in the autolysis group and stably lowly expressed in the control group, while the expression pattern of ornithine was completely opposite to that of the 3 metabolites. Pearson correlation analysis showed that there were extremely significant positive correlations between cysteine, citrulline and tryptophan (P<0.01), while all 3 showed significant negative correlations with ornithine (P<0.05). Enrichment analysis was performed on the significantly different amino acid metabolites. The results showed that the potential core highly enriched pathway in the autolysis of *Coprinellus micaceus* was the amino acid biosynthesis pathway, the sub-core highly enriched pathway was the biosynthesis of plant secondary metabolites and the moderately enriched pathways included arginine biosynthesis, glycine, serine and threonine metabolism, glutathione metabolism, 2-oxocarboxylic acid metabolism, central carbon metabolism in cancer, aminoacyl-tRNA biosynthesis, *D*-amino acid metabolism, protein digestion and absorption, and cofactor biosynthesis. **Conclusion** Ornithine, tryptophan, citrulline and cysteine are screen and identify as the key differential metabolites in the autolysis process of *Coprinellus micaceus*. These 4 kinds of amino acid differential metabolites can synergistically regulate the autolysis process of *Coprinellus micaceus* through multiple potential pathways. The results of this study can provide data support and scientific basis for the preservation and storage of macrofungi, optimization of processing techniques, and comprehensive development and utilization of resources.

KEY WORDS: *Coprinellus micaceus*; autolysis; amino acid metabolism; targeted metabolomics

0　引　言

晶粒小鬼伞(*Coprinellus micaceus*)是担子菌小鬼伞属的大型野生真菌, 因较幼时菌盖表面覆盖一层闪亮晶状颗粒而得名, 民间俗称“狗尿苔”, 是小鬼伞属真菌最典型的种类之一[1], 其子实体幼嫩时可食且味道鲜美, 具有抗氧化、抑制肿瘤的功效, 其对小鼠肉瘤 180 的抑制率为 70%, 对艾氏癌的抑制率为 80%[2], 具有重要的药用开发潜力。

然而, 晶粒小鬼伞菌子实体成熟后 4~8 h 内会发生黑褐色“墨汁样”快速自溶现象[3], 并产生鬼伞素等有毒物质, 这一特性严重制约了晶粒小鬼伞的开发利用。

自溶是真菌等微生物因外源营养匮乏或生长代谢环境不适, 由自身水解酶介导细胞壁、细胞质发生的自然降解过程[4]。快速自溶是晶粒小鬼伞在自身衰老或外界损伤后表现出的典型生物学特征, 作为一种程序性细胞死亡或细胞内容物降解过程, 其核心机制涉及内源性水解酶的激活[5−6]。晶粒小鬼伞自溶阶段是其潜在有毒物质(如鬼伞素)的合成关键期, 若误食自溶后的子实体且同时摄入酒精, 可能引发“双硫仑样反应”[7], 危害人体健康。而真菌自溶过程受到复杂的信号通路调控, 这类通路通过影响代谢和破坏细胞壁完整性来介导自溶[8−9]。孙晓燕等[10]、唐玲等[11]和吴志亮等[12]对双孢菇、鸡腿菇和草菇的自溶机制展开研究, 研究表明, 基质消耗、渗透压失衡、葡聚糖酶、几丁质酶、色素合成相关酶和自噬与程序性死亡相关基因等与大型真菌自溶过程密切相关; 马红俊[9]研究发现, 真菌自溶过程中大量差异表达基因显著富集于 RNA 合成、核糖体功能及内质网相关降解等途径; 另有研究表明, 氨基酸氧化酶在大型真菌自溶过程中可能通过氧化氨基酸产生过氧化氢等活性氧物质, 从而促进细胞壁的降解和菌体的自溶[13]。这些研究提示, 大型真菌自溶过程中会释放多种酶类, 这些酶不仅参与细胞壁降解, 还与氨基酸代谢密切相关。对于晶粒小鬼伞而言, 其快速自溶并非简单的被动分解, 而是受精密遗传与代谢网络调控的主动过程, 该过程与氨基酸代谢的关联涉及多种生化途径及调控机制[14]。因此, 自溶过程中氨基酸代谢物的变化, 对真菌的生长及环境适应性具有重要意义。

氨基酸代谢不仅为蛋白质合成提供底物, 其衍生物更是多种生物活性分子和次级代谢产物的前体[15]。晶粒小鬼伞自溶过程引发的细胞内环境剧变, 可能直接或间接受特定氨基酸代谢通路调控影响。氨基酸靶向代谢组学技术能够精确定量生物样本中数十种氨基酸及其代谢产物水平[16−20], 将该技术应用于晶粒小鬼伞自溶过程研究, 能够有效筛选其自溶过程中的氨基酸差异代谢物, 为晶粒小鬼伞自溶机制的深入研究提供基础数据支撑。

目前, 关于晶粒小鬼伞的研究多集中于形态学鉴定与毒素成分分析, 而对于其自溶进程的研究较少, 尤其是氨基酸代谢网络, 作为真菌蛋白质合成底物及多种生物活性分子的前体, 其在自溶过程中的作用与调控规律仍亟待深入探究。氨基酸靶向代谢组学技术的发展, 为准确定量氨基酸及其衍生物、筛选氨基酸差异代谢物提供了强有力的技术支撑。本研究采用氨基酸靶向代谢组学技术, 分析晶粒小鬼伞自溶过程中氨基酸代谢谱及潜在代谢通路变化, 为深入探究大型真菌贮藏保鲜及发育调控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

新鲜未自溶的晶粒小鬼伞子实体样本采集自安顺市九龙山国家森林公园。

24 种氨基酸混合标准溶液、*L*-苯丙氨酸-D_5 (质量浓度 1000 mg/L, 坛墨质检科技股份有限公司); 盐酸(优级纯, 重庆川东化工有限公司); 苯酚(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸(色谱纯, 上海阿拉丁试剂有限公司); Atlantis^{TM} HILIC Silica 色谱柱(100 mm×3.0 mm, 1.7 μm, 美国沃特世科技有限公司); 25 mL 玻璃耐压管(江苏翌哲试验仪器有限公司)。

1.1.2 仪器与设备

QTRAP 4500 液相色谱-质谱联用仪(美国 AB SCIEX 公司); ME204TS 万分之一分析天平(美国梅特勒-托利多仪器有限公司); 2X2-4 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技仪器有限公司); TTL-DC11 氮吹仪(北京同泰联科技有限公司); ZXFD-B5090 恒温鼓风干燥箱(上海智诚分析仪器制造有限公司); MVT 多样本旋涡混合器(广州得泰仪器科技有限公司); ELGA PURELAB Option-R 纯水机(法国威立雅公司)。

1.2 标准溶液配制

准确吸取 1 mL 质量浓度为 1000 mg/L 的 24 种氨基酸混合标准溶液, 用 10%乙腈水溶液稀释得质量浓度为 100 mg/L 的混合标准中间液; 再吸取 1 mL 混合标准中间液, 用 10%乙腈水溶液稀释得质量浓度为 10 mg/L 的混合标准使用液。取适量混合标准使用溶液, 用 10%乙腈水配制成质量浓度为 10~800 μg/L 的标准系列溶液。

1.3 样本制备与处理

采集同一株新鲜未发生自溶的晶粒小鬼伞子实体样本, 剔除表面杂质后, 将其均分为两份。其中一份即时取样作为 0 h 对照组(W), 迅速置于液氮中速冻固定, 随后转入−80 ℃超低温冰箱冷冻保存备用; 另一份则置于 22 ℃恒温箱中静置培养 24 h, 待子实体出现墨汁样自溶后取样, 作为自溶组(R), 自溶样本后续处理、固定及保存方式均与对照组保持一致。

取出样本置于冷冻干燥机中, –60 ℃冷冻干燥至干, 粉碎过 50 目筛, 待分析。质控(quality control, QC)样制备方法: 分别称取每份已过筛样本各 100 mg, 混匀备用。氨基酸提取方法参考文献[16–17], 其具体操作如下:

准确称取 0.1 g 样品置于 25 mL 消解管中, 加入质量浓度为 1000 mg/L 的内标溶液 25 μL, 加 10 mL 6 mol/L 盐酸, 继续向水解管中加入 3 滴苯酚, 旋涡混匀 2 min, 充入氮气于 110 ℃烘箱中水解 22 h, 水解结束后, 将水解液过滤至 50 mL 容量瓶中, 用少量去离子水多次冲洗水解管, 水洗液移入同

一容量瓶内, 用去离子水定容至刻度, 振荡混匀。

吸取 1 mL 上清液至 15 mL 离心管中, 冷冻干燥至干。残留物用 10%乙腈水溶液溶解定容至 50 mL, 过 0.22 μm 滤膜, 采用液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析。

1.4　仪器方法

1.4.1　液相色谱条件

采用 Atlantis^{TM} HILIC Silica 色谱柱(100 mm × 3.0 mm, 1.7 μm); 流动相A, 0.1%甲酸; 流动相B, 乙腈; 流速0.2 mL/min; 进样量 2 μL; 柱温 35 ℃; 流动相梯度洗脱程序为: 0~1.0 min, 90% B; 1.0~3.0 min, 90%~40% B; 3.0~12.0 min, 40%~10% B; 12.0~16.0 min, 10% B; 16.0~16.5 min, 10%~90% B; 16.5~20.0 min, 90% B。

1.4.2　质谱条件

采用电喷雾正离子源, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行质谱分析。离子源参数为: 电喷雾电压, +5500 V; 气帘气, 35 psi; 喷雾气, 50 psi; 辅助加热气, 50 psi; 离子源温度, 500 ℃; 24 种氨基酸和内标质谱参数见表 1。

表 1　24 种氨基酸 MRM 质谱参数

Table 1　MRM mass spectrometry parameters of 24 kinds of amino acid species

序号	氨基酸	母离子(*m*/z)	子离子(*m*/z)	去簇电压/V	碰撞电压/V
1	*L*-鸟氨酸	133.1	70.1*/115.8	30	24.3/11.9
2	*L*-色氨酸	205.0	145.9*/188.0	40	23.8/14.9
3	*L*-瓜氨酸	176.0	70.1*/158.8	30	33.9/14.1
4	*L*-半胱氨酸	121.9	75.7*/58.9	25	21.0/28.9
5	*L*-丙氨酸	90.2	43.8*/72.1	30	14.2/13.1
6	*L*-精氨酸	174.9	69.6*/115.8	20	33.9/10.0
7	*L*-天冬酰胺	132.9	73.8*/86.5	30	21.3/14.6
8	*L*-天冬氨酸	133.9	73.7*/87.9	30	19.7/14.9
9	*L*-胱氨酸	240.9	119.7*/151.9	50	29.8/19.0
10	4-氨基丁酸	103.9	86.7*/68.9	30	16.0/22.3
11	*L*-谷氨酰胺	147.0	83.9*/55.9	30	23.3/41.7
12	*L*-谷氨酸	148.1	83.9*/56.0	30	22.5/40.8
13	甘氨酸	75.7	30.1*/58.9	25	15.0/10.9
14	*L*-组氨酸	155.9	109.8*/94.8	35	21.9/22.9
15	*L*-异亮氨酸	132.0	86.0*/43.8	35	16.1/33.5
16	*L*-亮氨酸	132.1	85.8*/68.6	35	13.0/27.0
17	*L*-赖氨酸	147.1	83.9*/129.8	30	21.8/13.7
18	*L*-蛋氨酸	150.0	60.7*/55.7	30	31.1/24.6
19	*L*-苯丙氨酸	165.9	103.0*/120.1	35	37.0/19.1
20	*L*-脯氨酸	115.9	69.8*/56.7	30	23.8/15.0
21	*L*-丝氨酸	105.9	59.6*/41.8	30	14.1/33.9
22	*L*-苏氨酸	120.1	73.7*/60.8	30	16.0/28.1
23	*L*-酪氨酸	182.2	91.0*/135.7	30	35.1/17.8
24	*L*-缬氨酸	118.1	71.8*/55.0	30	15.8/26.9
25	苯丙氨酸-D_5	171.0	124.8*/135.0	35	19.1/18.9

注: *为定量离子。

1.5　方法学验证

1.5.1　回收率和精密度验证

取待测样本 3 份, 加入质量浓度为 1000 mg/L 的标准溶液 100 μL, 按 1.3 描述方法处理, 计算加标回收率, 回收率 80%~120%有效; 同时, 另取 7 份样本, 按 1.3 描述方法处理, 计算 7 次测定结果相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)得方法精密度, RSD<20%有效。

1.5.2　基质效应验证

按 1.3 描述方法处理, 取 1 mL 样品处理液作为基质溶液(S_A), 取 50 μg/L 混合标准溶液作为溶剂标准溶液(S_B), 另取 1 mL 样品处理液(S_A), 冷冻抽干后加入 1.0 mg/L 溶剂标准溶液 50 μL 作为基质标准溶液(S_C), 按公式(1)计算对应化合物响应值的比值, 作为基质效应(matrix effect, ME)。ME 在 0.8~1.2 之间为弱 ME; ME>1.2 或 ME<0.8, 为基质增强或基质抑制效应。

$$ME=\frac{S_C-S_A}{S_B} \quad (1)$$

式中, S_A 为基质溶液中目标物响应值, S_B 为溶剂标准溶液

中目标物响应值, S_C 为基质标准溶液中目标物响应值。

1.6 数据处理

待测样本采用 Analyst 1.7.2 软件采集质谱数据，用 SCIEX OS 2.0.1 软件通过内标标准曲线法处理样本定量数据。定量数据通过联川生物云平台(https://www.omicstudio.cn/tool.)，采用 R version 4.1.3 软件包 prcomp 函数进行主成分分析(principal component analysis, PCA)，以获得样本间总体代谢差异和组内样本间的变异情况；采用 OPLSR.Anal 函数进行正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)，进一步展示各组间差异，用置换检验法对模型进行拟合检验；对代谢物进行两独立样本 t 检验，并使用 Benjamini-Hochberg 法对 P 进行错误发现率(false discovery rate, FDR)校正，P<0.05 表示差异有统计学意义。最终根据差异倍数(fold change, FC)进行差异代谢物筛选，选取变量重要性投影(variable importance projection, VIP) ≥1, P<0.05 且$|\log_2 FC|\geq 0.58$ 的代谢物作为差异代谢物；进一步对差异代谢物进行聚类分析和 Pearson 相关性分析，并将其注释至京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库，对差异代谢物进行 KEGG 通路富集分析；绘图软件为 Origin Pro 2025。

2 结果与分析

2.1 氨基酸总离子流图及方法学验证结果

如图 1 所示，为 24 种氨基酸总离子流图。本研究采用亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)结合 MRM 正离子模式，对 24 种氨基酸进行定量检测。目标氨基酸在该色谱体系下峰形对称、分离度优异；同时 MRM 质谱检测通道无杂峰干扰、信号强度稳定。本研究对该方法开展方法学验证，结果如表 2 所示。24 种氨基酸在 10~800 μg/L 线性范围内线性关系良好，r>0.995；回收率范围为 85.0%~111.0%，精密度范围为 1.5%~8.9%，ME 值范围为 0.88~1.11，QC 样本的 RSDs 范围为 1.0%~6.5%。结果表明该方法符合 24 种氨基酸的分析要求，可为晶粒小鬼伞自溶过程中氨基酸差异代谢物筛选及精准定量分析提供可靠技术支撑。

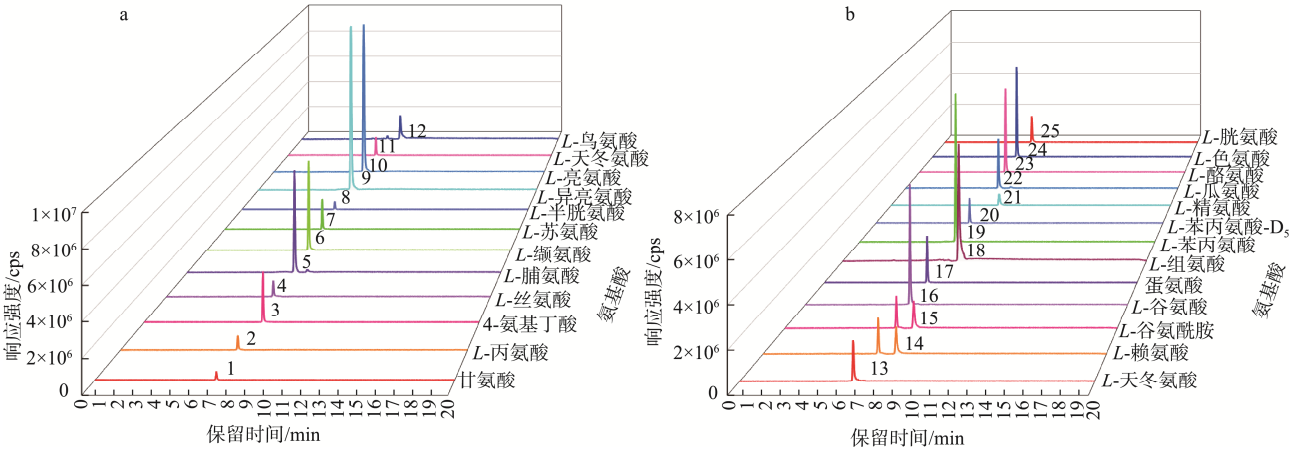


图 1 24 种氨基酸总离子流图

Fig.1 Total ion current chromatogram for 24 kinds of amino acids

表 2 24 种氨基酸线性、回收率、精密度、MEs 及 QC 样 RSDs

Table 2 Linearity, recovery rates, precision, MEs, and QC sample RSDs of 24 kinds of amino acids

氨基酸	线性方程	相关系数(r)	回收率/%	精密度/%	MEs	QC 样 RSD/%
L-鸟氨酸	Y=15000.303X+2.431e5	0.9992	92.6	1.7	0.90	1.0
L-色氨酸	Y=16206.476X–8.431e4	0.9990	111.0	1.9	1.08	2.5
L-瓜氨酸	Y=19821.621X+15240.929	0.9958	94.5	1.9	0.99	2.8
L-半胱氨酸	Y=924.62752X–5194.771	0.9979	107.6	6.0	0.90	2.6
L-丙氨酸	Y=1918.242X+4.554e4	0.9980	95.6	3.6	1.09	1.7
L-精氨酸	Y=351.804X–1148.230	0.9965	97.4	5.2	1.05	2.3
L-天冬酰胺	Y=3906.334X–13775.695	0.9980	90.7	3.5	1.11	6.5
L-天冬氨酸	Y=1167.112X–3876.483	0.9986	105.2	4.7	1.07	2.6
L-胱氨酸	Y=1163.395X–7813.589	0.9984	103.6	5.1	1.03	4.1
4-氨基丁酸	Y=2325.478X–1886.647	0.9957	96.0	3.7	0.92	2.0
L-谷氨酰胺	Y=777.466X–820.975	0.9967	102.1	2.7	1.03	NA
L-谷氨酸	Y=3.168e4X–8.004e4	0.9955	85.0	2.4	1.09	1.4

表 2(续)

氨基酸	线性方程	相关系数(r)	回收率/%	精密度/%	MEs	QC 样 RSD/%
甘氨酸	Y=193.397X+9529.461	0.9952	106.9	6.2	1.04	1.7
L-组氨酸	Y=13623.848X+4.216e4	0.9983	88.5	2.4	1.06	3.3
L-异亮氨酸	Y=1.163e5X+8.011e4	0.9961	95.7	2.6	1.09	1.6
L-亮氨酸	Y=27930.108X+18690.380	0.9981	90.1	3.3	1.04	1.1
L-赖氨酸	Y=4308.405X+24628.797	0.9961	91.1	2.2	0.98	2.5
L-蛋氨酸	Y=1586.720X–787.284	0.9994	94.7	3.7	0.88	2.6
L-苯丙氨酸	Y=3.750e4X–9.464e4	0.9980	106.5	2.5	1.08	1.7
L-脯氨酸	Y=8692.045X–6656.313	0.9952	88.6	3.2	1.06	1.5
L-丝氨酸	Y=298.760X+8054.365	0.9984	90.9	8.9	1.05	1.4
L-苏氨酸	Y=725.013X+5439.546	0.9977	103.8	3.4	1.07	3.7
L-酪氨酸	Y=3.132e4X–8.286e4	0.9964	89.3	1.5	1.07	2.9
L-缬氨酸	Y=7769.698X+22579.840	0.9979	93.4	4.1	0.94	2.4

注: NA 为未检出。

2.2　主成分分析

对晶粒小鬼伞自溶过程中的氨基酸代谢物进行 PCA 分析，结果见图 2。模型自变量可解释率 R^2X=0.679>0.5，主成分 1 (PC1)可解释原始数据 52.6%的特征，主成分 2 (PC2)可解释原始数据 24.1%的特征，PC1 和 PC2 的累计解释率(PC1+PC2)为 76.7%>70.0%，说明数据拟合性较好，PCA 模型较稳定；且质控组(QC)、自溶组(R)和对照组(W)组间完全分离，说明晶粒小鬼伞自溶过程中氨基酸代谢物差异明显。

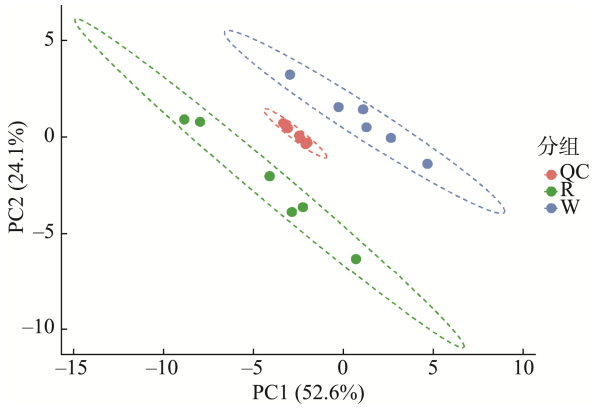


图 2　晶粒小鬼伞自溶过程中氨基酸靶向代谢组学 PCA
Fig.2　PCA of amino acid-targeted metabolomics during the autolysis process of *Coprinellus micaceus*

2.3　正交偏最小二乘判别分析

进一步进行 OPLS-DA 分析，结果见图 3a。结果显示，晶粒小鬼伞对照组与自溶组组内具有较强的聚类性，且样本组间有较好的分离度，表明晶粒小鬼伞在自溶过程中的氨基酸代谢物差异明显。R^2Y=0.985>0.9，说明 OPLS-DA 模型解释能力较好，Q^2=0.946>0.9，说明 OPLS-DA 模型预测能力较好，可用于晶粒小鬼伞自溶过程中氨基酸代谢物差异分析。

对 OPLS-DA 模型进行 200 次交叉验证，模型验证结果(图 3b)显示，置换检验随机模型的 R^2 和 Q^2 均小于原模型的 R^2 和 Q^2，且 Q^2 拟合线与纵轴的相交值 Q^2=–0.789<0，表明原模型可靠、稳定性较好，不存在过拟合现象，具有统计学意义，可进行后续差异代谢物分析。

2.4　差异代谢物筛选

在 OPLS-DA 分析中，变量重要性投影值 VIP 可定量表征各变量对模型的整体贡献程度，并用以反映代谢物的重要性水平，当 VIP≥1 时，该代谢物可判定为潜在差异代谢物。结合差异倍数 FC 分析结果，$|\log_2FC|$越大，提示代谢物在两组样品间的表达差异越明显；$\log_2FC>0$ 表示代谢物呈相对上调状态，$\log_2FC<0$ 表示代谢物则呈相对下调状态；其$|\log_2FC|\geq0.58$，表示代谢物在两组样本间存在 1.5 倍以上差异。为筛选获得具有真实生物学意义的晶粒小鬼伞自溶氨基酸差异代谢物，剔除仪器检测与样本本身带来的低幅度波动及背景噪声，减少假阳性代谢物对后续分析的干扰，本研究以 VIP≥1，P<0.05 且$|\log_2FC|\geq0.58$ 作为差异代谢物筛选条件，对满足 VIP≥1 和 P<0.05，但$|\log_2FC|<0.58$，即组间表达波动较小的代谢物予以剔除，仅保留同时满足统计学显著与生物学差异幅度要求的代谢物用于后续分析。由表 3 可知，剔除生物学差异幅度小于 1.5 倍的氨基酸代谢物后，晶粒小鬼伞自溶过程中的差异氨基酸为鸟氨酸、色氨酸、瓜氨酸和半胱氨酸；可视化结果(图 4)显示，色氨酸、瓜氨酸和半胱氨酸为上调代谢物，鸟氨酸为下调代谢物。

2.5　差异代谢物聚类分析

对晶粒小鬼伞样本和 4 种差异氨基酸进行层次聚类热图分析，结果见图 5。自溶组(R)与对照组(W)样本在聚类树中完全分离，各自形成独立分支，且组内生物学重复样本紧密聚集，表明两组样本的 4 种氨基酸代谢物表达谱存

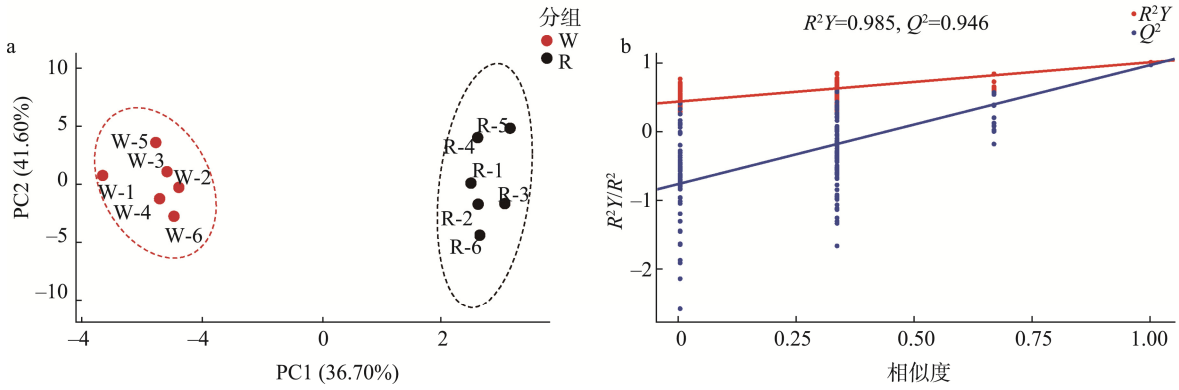


图 3 晶粒小鬼伞对照组和自溶组 OPLS-DA 及置换检验

Fig.3 OPLS-DA and permutation test for the control group and autolysis group of *Coprinellus micaceus*

表 3 晶粒小鬼伞自溶差异氨基酸汇总

Table 3 Summary of amino acids with differences in autolysis of *Coprinellus micaceus*

氨基酸	VIP	*P*	$\|\log_2 FC\|$	趋势
L-鸟氨酸	1.5552	0.0020	1.4064	下调
L-色氨酸	1.4876	0.0049	0.8235	上调
L-瓜氨酸	1.3999	0.0093	1.3046	上调
L-半胱氨酸	1.3395	0.0284	0.9323	上调

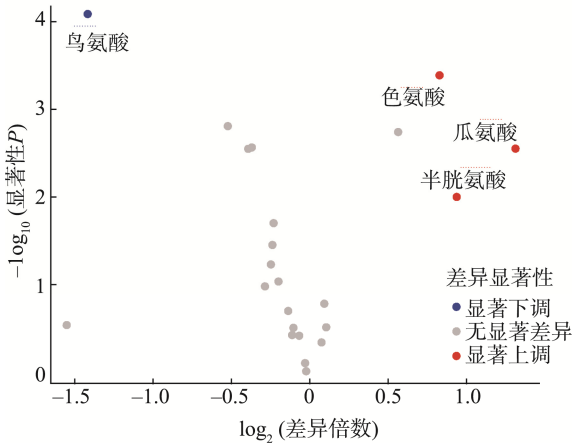
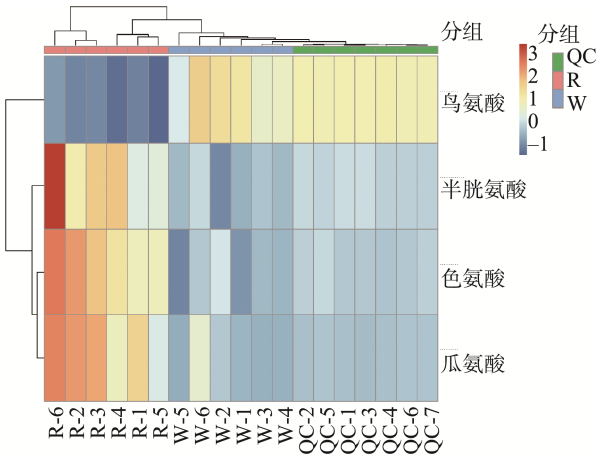


图 4 晶粒小鬼伞对照组和自溶组氨基酸差异代谢物火山图

Fig.4 Volcano plot of amino acid differential metabolites between the control group and autolysis group of *Coprinellus micaceus*

在显著差异；且所有 QC 样本聚为一个高度紧密的独立分支，证明实验检测技术重复性良好、数据可靠性，符合代谢组学分析要求。代谢物表达模式分析显示，半胱氨酸、色氨酸和瓜氨酸在自溶组中呈显著高表达，在对照组中呈稳定低表达，而鸟氨酸的表达模式与上述 3 种代谢物完全相反。

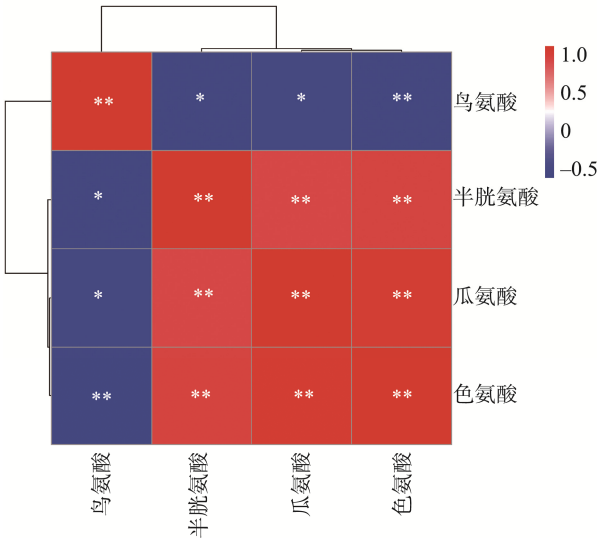
对 4 种差异氨基酸进行 Pearson 相关性聚类分析，结果见图 6。半胱氨酸、瓜氨酸与色氨酸之间呈极显著正相



注：红色为高表达；蓝色为低表达。

图 5 晶粒小鬼伞对照组和自溶组氨基酸差异代谢物聚类热图

Fig.5 Cluster heatmap of amino acid differential metabolites in the control group and autolysis group of *Coprinellus micaceus*



注：红色为正相关；蓝色为负相关；**表示差异极显著(P<0.01)；*表示差异显著(P<0.05)。

图 6 晶粒小鬼伞对照组和自溶组氨基酸差异代谢物相关性分析

Fig.6 Correlation analysis of differential metabolites of amino acids between the control group and autolysis group of *Coprinellus micaceus*

关(P<0.01)，而三者与鸟氨酸均呈显著负相关(P<0.05)。聚类结果显示，半胱氨酸、瓜氨酸和色氨酸表达模式高度协同，鸟氨酸则与其余 3 种氨基酸呈拮抗调控特征。

2.6　差异代谢物潜在富集通路分析

通过 KEGG 数据库对晶粒小鬼伞自溶产毒过程中的氨基酸差异代谢物进行富集分析，结果见图 7。富集分析结果显示，差异氨基酸代谢物按差异代谢物覆盖度呈现层级化富集特征，晶粒小鬼伞自溶过程的潜在核心高富集通路为氨基酸生物合成通路，次核心高富集通路为植物次生代谢物的生物合成通路，中等富集通路为精氨酸生物合成、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、谷胱甘肽代谢、2-氧羧酸代谢、癌症中的中心碳代谢、氨酰基转移核糖核酸生物合成、*D*-氨基酸代谢、蛋白质消化与吸收和辅因子生物合成等 9 个功能特异性通路。

综合 KEGG 富集分析获得的潜在通路，结合晶粒小鬼伞自溶表型特征，本研究初步推测晶粒小鬼伞自溶过程的潜在分子机制，见图 8。鸟氨酸、瓜氨酸、半胱氨酸和色氨酸可能通过多条潜在通路协同调控晶粒小鬼伞自溶进程，其中色氨酸可能经吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)合

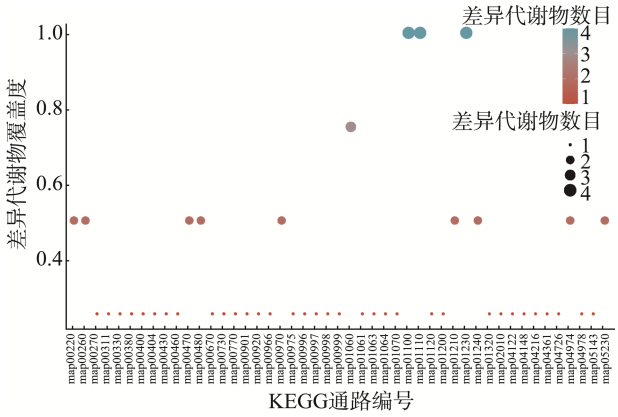


图 7　晶粒小鬼伞对照组和自溶组氨基酸差异代谢物富集分析气泡图

Fig.7　Bubble plots for enrichment analysis of amino acid differential metabolites in the control group and autolysis group of *Coprinellus micaceus*

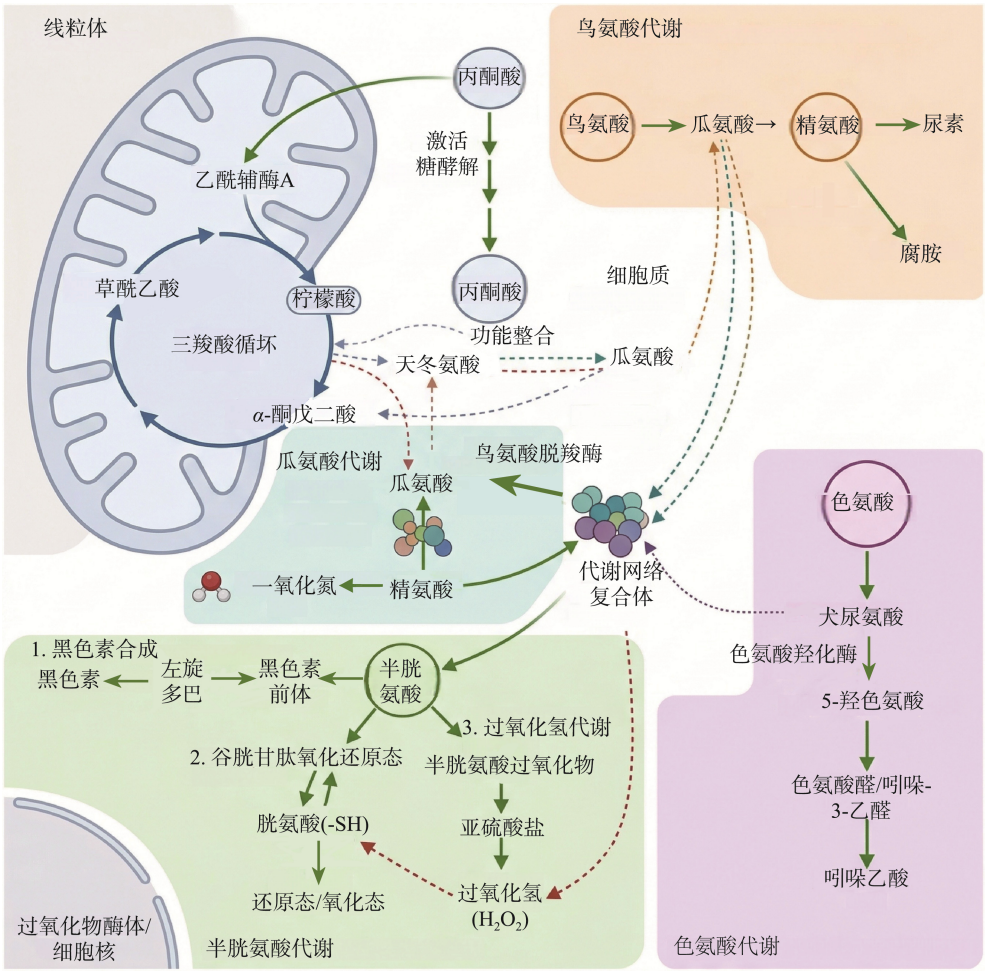


图 8　晶粒小鬼伞自溶氨基酸差异代谢物分子机制图

Fig.8　Molecular mechanism diagram of differential metabolites of amino acids in the autolysis of *Coprinellus micaceus*

成通路触发自溶信号, 启动细胞程序性死亡; 鸟氨酸与瓜氨酸可能通过鸟氨酸-瓜氨酸代谢循环, 构成自溶过程中氮素再利用; 半胱氨酸则可能在氧化应激调控中发挥核心作用。

3 讨 论

晶粒小鬼伞子实体成熟后会发生快速自溶现象[21]。这种自溶过程不仅导致子实体在采摘后数小时内迅速液化, 造成采后损失, 更关键的是, 自溶常伴随着有毒物质(如鬼伞素)的产生, 构成了潜在的食源性中毒风险[22]。真菌自溶作为复杂的程序性生理过程, 往往伴随细胞壁降解酶激活、能量代谢重构及氨基酸代谢网络的定向调控[10−12], 氨基酸作为蛋白质合成单元、能量代谢底物及次生代谢前体, 其代谢稳态的失衡可能是自溶进程的响应特征之一。因此, 分析自溶过程中氨基酸代谢物的差异变化, 可为真菌自溶的生化调控机制提供关键线索。

通过多元统计分析, 本研究以 VIP≥1、P<0.05 且 $|\log_2 FC|\geq 0.58$ 筛选差异代谢物。最终鉴定出鸟氨酸、色氨酸、瓜氨酸和半胱氨酸 4 种关键差异氨基酸。其中, 色氨酸、瓜氨酸和半胱氨酸在自溶组中表达上调, 而鸟氨酸表达下调。其代谢物变化谱提示晶粒小鬼伞的自溶并非随机过程, 可能伴随着氨基酸代谢网络的定向重编程。从生物学功能推测, 这些代谢物的变化可能指向不同的生理过程。鸟氨酸的下调可能与尿素循环或精氨酸代谢流的改变有关, 反映了自溶过程中氮代谢的重新分配[23]。色氨酸的上调值得关注, 因其不仅是蛋白质组分, 更是多种生物活性物质的前体, 可能参与细胞信号传导或应激响应[24]。瓜氨酸作为鸟氨酸代谢的关联分子, 其上调可能与氮素再利用过程增强有关[25]。半胱氨酸的上调则可能暗示自溶过程伴随氧化还原稳态的改变, 因为半胱氨酸是谷胱甘肽合成的重要限速底物, 与细胞的抗氧化防御密切相关[26]。需要强调的是, 这些关联是基于已知代谢通路的合理推测, 本研究并未对具体机制进行验证。

层次聚类分析表明, 本研究实验数据稳定可靠, 两组样本的氨基酸代谢谱存在显著差异。更重要的是, 相关性聚类分析揭示了 4 种差异代谢物之间存在明确的协同或拮抗关系: 半胱氨酸、瓜氨酸与色氨酸三者间呈极显著正相关, 而它们均与鸟氨酸呈显著负相关。这一关联模式进一步支持了上述关于代谢网络重编程的推断。3 种上调代谢物之间的正相关表明它们在自溶过程中可能受到协同调控, 或共同参与某一相关联的生物学过程。而它们与下调代谢物鸟氨酸的负相关关系, 则提示鸟氨酸代谢途径可能与另外三种代谢物所属的代谢途径在自溶过程中存在此消彼长的竞争或拮抗关系[27]。这种清晰的代谢物共变模式为后续聚焦关键调控节点提供了线索。

富集分析结果显示, 差异氨基酸代谢物显著富集于“氨基酸生物合成”和“精氨酸生物合成”等多个通路。这一结果与筛选得到的代谢物, 反映了差异代谢物并非孤立存在, 而是嵌入在特定的代谢网络之中。此外, “谷胱甘肽代谢”通路的富集与半胱氨酸的上调相对应, 说明自溶过程可能存在氧化应激[28]。而“植物次生代谢物的生物合成”等通路的富集, 则可能反映了真菌在自溶这种特殊生理状态下的适应性代谢响应[29]。综合差异代谢物表达模式、相关性及其富集通路, 本研究尝试对晶粒小鬼伞自溶的潜在生化逻辑进行初步勾勒(图 8)。推测认为: 色氨酸代谢变化可能通过影响吲哚乙酸等信号分子而参与自溶信号的触发[30]; 鸟氨酸-瓜氨酸代谢循环的扰动可能主导了自溶过程中氮素代谢的再平衡; 而半胱氨酸-谷胱甘肽代谢可能在于维持细胞在自溶过程中的氧化还原稳态[31]。必须明确指出, 本研究仅限于发现现象并提示潜在通路, 该模型仅为基于组学数据关联分析的合理假设, 旨在为后续研究提供方向性参考。

综上所述, 本研究成功筛选出晶粒小鬼伞自溶过程中的关键差异氨基酸代谢物, 明确了其表达特征与共变规律, 并通过潜在通路富集分析初步揭示了这些代谢物可能参与的生物学过程, 为解析晶粒小鬼伞自溶的生化调控基础提供了重要数据支撑。但本研究仍有局限: (1)仅基于代谢组学的相关性分析, 未通过关键基因表达检测、酶活性验证等功能实验, 明确代谢物变化与自溶表型间的因果关联; (2)样本仅设置两个时间节点, 未能完整覆盖自溶的动态演变进程, 且样本量偏小, 结果易受菌株遗传背景异质性及微环境波动的干扰, 稳健性有待提升; (3)仅开展单一组学层面的分析, 未结合转录组学、蛋白组学等多组学技术进行联合解析, 难以系统追溯代谢重编程的上游调控通路及核心分子机制。

4 结 论

本研究通过氨基酸靶向代谢组学分析, 筛选确定了鸟氨酸、色氨酸、瓜氨酸和半胱氨酸为晶粒小鬼伞自溶过程中的关键差异代谢物。其中, 色氨酸、瓜氨酸和半胱氨酸在自溶组中表达上调, 鸟氨酸表达下调; 且三者间呈显著正相关, 与鸟氨酸呈显著负相关。KEGG 富集分析显示, 这些代谢物可经由氨基酸生物合成、精氨酸生物合成、谷胱甘肽代谢及 2-氧羧酸代谢等多条潜在通路协同调控晶粒小鬼伞的自溶进程。本研究结果可为大型真菌保鲜贮藏、加工工艺优化及资源综合开发利用提供了理论参考与科学依据。

参考文献

[1] 朱力扬, 黄梅, 图力古尔. 中国鬼伞类真菌的分类[J]. 菌物学报, 2022, 41(6): 878–898.
ZHU LY, HUANG M, TU LGE. Taxonomy of Coprinoid Fungi in China [J]. Mycosystema, 2022, 41(6): 878–898.

[2] 陈若芸. 中国食用药用真菌化学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社. 2016
CHEN RY. Chemistry of edible and medicinal fungi in China [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Press, 2016.

[3] 刘雅慧. 鬼伞类真菌的培养特性及个体发育研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
LIU YH. Study on the cultural characteristics and ontogeny of Coprinoid Fungi [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023.

[4] 赵天鹏, 郜海燕, 周拥军, 等. 食用菌菌体自溶机制的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5 (6): 1733–1738.
ZHAO TP, GAO HY, ZHOU YJ, *et al*. Research progress on the autolysis mechanism of edible fungi [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(6): 1733–1738.

[5] LI JW, ZHANG SB, XI HP, *et al*. Processes controlling programmed cell death of root velamen radicum in an epiphytic orchid [J]. Annals of Botany. 2020, 126(2): 261–275.

[6] KADHIM MM, RAMÍREZ-CORONEL AA, JALIL AT, *et al*. Autophagy as a self-digestion signal in human cancers: Regulation by microRNAs in affecting carcinogenesis and therapy response [J]. Pharmacological Research, 2023, 189: 106695.

[7] 瞿广胜, 李显娱, 戴乾, 等. 基于 GPC/UPLC-MS/MS 定量分析鬼伞菌属中的鬼伞菌素[J]. 中国食物与营养, 2024, 30(11): 41–47.
QU GS, LI XY, DAI Q, *et al*. Quantitative analysis of coprine in *Coprinus species* based on GPC/UPLC-MS/MS [J]. Food and Nutrition in China, 2024, 30(11): 41–47.

[8] PEREIRA SS, JARAK I, CARVALHO RA, *et al*. Different malabsorptive obesity surgery interventions result in distinct postprandial amino acid metabolomic signatures [J]. Obesity Surgery, 2020, 30(10): 4019–4028.

[9] 马红俊. 环境胁迫下支链氨基酸代谢与红冬孢酵母类胡萝卜素合成变化的关系研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2025.
MA HJ. Study on the relationship between branched-chain amino acid metabolism and carotenoid synthesis changes in *Rhodosporidium toruloides* under environmental stress [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2025.

[10] 孙晓燕, 郭慧, 余君彤, 等. 自溶对双孢菇多糖体外抗氧化和抗肿瘤活性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(17): 74–83.
SUN XY, GUO H, YU JT, *et al*. Effects of Autolysis on *in vitro* antioxidant and anti-tumor activities of polysaccharides from *Agaricus* bisporus [J]. Food Science, 2022, 43(17): 74–83.

[11] 唐玲, 李寿建, 杨槐俊, 等. 鸡腿菇栽培中子实体自溶过程及相关酶活性变化[J]. 菌物研究, 2021, 19(3): 184–190.
TANG L, LI SJ, YANG HJ, *et al*. Autolysis process and related enzyme activity changes in the fruiting bodies of *Coprinus comatus* during cultivation [J]. Journal of Fungal Research, 2021, 19(3): 184–190.

[12] 吴志亮, 黄莹, 王则金. 草菇响应低温胁迫的差异蛋白质组学分析[J]. 食品科学, 2020, 41(19): 212–220.
WU ZL, HUANG Y, WANG ZJ. Differential proteomics analysis of *Volvariella* volvacea in response to low-temperature stress [J]. Food Science, 2020, 41(19): 212–220.

[13] SABOTIČ J, BRZIN J, ERJAVEC J, *et al*. *L*-amino acid oxidases from mushrooms show antibacterial activity against the phytopathogen ralstonia solanacearum [J]. Obesity Surgery, 2020, 11: 977.

[14] LIU B, GAO Q, ZHANG X, *et al*. *CsrA* regulates swarming motility and carbohydrate and amino acid metabolism in vibrio alginolyticus [J]. Microorganisms, 2021, 9(11): 2383.

[15] LÓPEZ-DIEZ L, CALLE-VELÁSQUEZ C, HANIGAN MD, *et al*. Amino acid metabolomic profiles in bovine mammary epithelial cells under essential amino acid restriction [J]. Animals (Basel), 2021, 11(5): 1334.

[16] 李靖妍, 郭春锋, 杨静, 等. 亲水相互作用色谱-串联质谱法测定 7 种乳粉中 17 种氨基酸[J]. 中国乳品工业, 2025, 53(9): 68–74.
LI JY, GUO CF, YANG J, *et al*. Determination of 17 amino acids in 7 types of milk powder by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Dairy Industry, 2025, 53(9): 68–74.

[17] 王奕婷, 罗艳, 李杰. 超高效液相色谱-串联质谱法测定功能食品中天然氨基酸的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2025, 61(5): 506–516.
WANG YT, LUO Y, LI J. Determination of natural amino acids in functional foods by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2025, 61(5): 506–516.

[18] 刘巍, 邱鹏飞, 鲍俊萍, 等. 氨基酸对巨大芽孢杆菌代谢网络的调控作用[J]. 安徽农业科学, 2026, 54(04): 116–123.
LIU W, QIU PF, BAO JP, *et al*. Regulatory effect of amino acids on the metabolic network of bacillus megaterium [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2026, 54(4): 116–123.

[19] 谢怡雯. 基于氨基酸代谢的腐乳风味形成机制研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2025.
XIE YW. Study on the formation mechanism of fermented bean curd flavor based on amino acid metabolism [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2025.

[20] 余欢欢, 周凌聿, 郑金明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定番石榴中 21 种游离氨基酸含量[J]. 中国食物与营养, 2025, 31(1): 35–41.
YU HH, ZHOU LY, ZHENG JM, *et al*. Determination of 21 free amino acids in guava by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food and Nutrition in China, 2025, 31(1): 35–41.

[21] WANG SR, ZANG JP, HE YR, *et al*. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Coprinellus micaceus*, a wild saprobic mushroom in China [J]. Mitochondrial DNA B Resour. 2021, 6(7): 1979–1981.

[22] DIGGINES B, WHITTLE S, YADAV I, *et al*. Multiscale topological analysis of kinetoplast DNA via high-resolution AFM [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2024, 26(40): 25798–25807.

[23] YANG K, QIU T, GONG X, *et al*. Integrated nontargeted and targeted metabolomics analyses amino acids metabolism in infantile hemangioma [J]. Frontiers in Oncology, 2023, 13: 1132344.

[24] TALESKI V, DIMKIĆ I, BOEV B, *et al*. Bacterial and fungal diversity in the lorandite (TlAsS2) mine 'Allchar' in the republic of North Macedonia [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2020, 96(9): fiaa155.

[25] FAN H, LU D, YIN X, *et al*. The metabolic regulation of tumor-associated macrophage reprogramming [J]. Molecular immunology, 2025, 187: 198–209.

[26] YOU C, LONG X, WEI H, *et al*. Age-dependent amino acid metabolism [J]. Journal of Nutrition, 2025, 155(11): 3791–3808.

[27] WANG Z, TIAN L, JIANG Y, *et al*. Synergistic role of gut-microbial *L*-ornithine in enhancing ustekinumab efficacy for Crohn's disease [J]. Cell Metabolism, 2025, 37(5): 1089–1102.

[28] LEI G, SUN M, CHENG J, *et al*. Radiotherapy promotes cuproptosis and synergizes with cuproptosis inducers to overcome tumor radioresistance [J]. Cancer Cell, 2025;43(6): 1076–1092.

[29] HASSANI D, LU Y, NI B, *et al*. The endomembrane system: How does it contribute to plant secondary metabolism [J]. Trends in Plant Science, 2023, 28(11): 1222–1236.

[30] XIE Y, LV Y, JIA L, *et al*. Plastid-localized amino acid metabolism coordinates rice ammonium tolerance and nitrogen use efficiency [J]. Nature Plants, 2023, 9(9): 1514–1529.

[31] LI Y, LI J, YU T, *et al*. Multi-signal fluorescent probe for simultaneous differentiation and imaging of Hg^{2+}, *Cys*, *Hcy*, and *GSH* in living cells and zebrafish [J]. Journal of Hazardous Materials, 2025, 488: 137427.

(责任编辑: 曹岱琳　蔡世佳)