

基于代谢组学分析工夫红茶发酵过程中代谢物的变化

宫连瑾, 薄佳慧, 杜哲儒, 李瑾, 孙红玉, 陈义琴, 裴若云, 肖力争

Metabolomics Analysis of Changes in Metabolites During the Fermentation Process of Congou Black Tea

GONG Lianjin, BO Jiahui, DU Zheru, LI Jin, SUN Hongyu, CHEN Yiqin, PEI Ruoyun, and XIAO Lizheng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030361>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

滇红茶加工过程中氟虫腈及其代谢物降解规律分析及膳食暴露评估

Degradation of Fipronil and Its Metabolites during Processing of Yunnan Black Tea and Dietary Exposure Assessment

食品工业科技. 2020, 41(21): 218-223

揉捻温度对工夫红茶滋味品质的影响

Effect of rolling temperature on the quality of congou black tea

食品工业科技. 2017(07): 90-95

基于近红外光谱技术(NIRS)对工夫红茶茶色素含量测定

Determination of tea pigments contents of Congou black tea by near infrared spectroscopy

食品工业科技. 2017(01): 308-311

基于不同冲泡条件宜红工夫茶滋味品质评价

Evaluation of taste of Yichang Congou black tea based on different brewing conditions

食品工业科技. 2017(12): 65-71

基于¹H-NMR代谢组学初步比较真蜂蜜和掺假蜂蜜差异成分

Comparison of Chemical Constituents in Honey and Adulterated Honey Based on ¹H-NMR Metabonomics

食品工业科技. 2019, 40(7): 218-223,227

基于代谢组学技术研究凤冈锌硒茶对正常大鼠机体代谢调节规律

Global Metabolic Regulation of Fenggang Zinc-Selenium Tea in Normal Rat Based on Metabolomics Technology

食品工业科技. 2020, 41(6): 99-105



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

宫连瑾, 薄佳慧, 杜哲儒, 等. 基于代谢组学分析工夫红茶发酵过程中代谢物的变化 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 8–16. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030361

GONG Lianjin, BO Jiahui, DU Zheru, et al. Metabolomics Analysis of Changes in Metabolites During the Fermentation Process of Congou Black Tea[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(21): 8–16. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030361

基于代谢组学分析工夫红茶发酵过程中 代谢物的变化

宫连瑾^{1,2}, 薄佳慧^{1,2}, 杜哲儒^{1,2}, 李 瑾^{1,2}, 孙红玉^{1,2}, 陈义琴^{1,2}, 裴若云^{1,2}, 肖力争^{1,2,3,*}

(1. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南长沙 410128;

2. 湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128;

3. 湖南农业大学植物功能成分利用省部共建协同创新中心, 湖南长沙 410128)

摘 要: 以保靖黄金茶为原料, 按照工夫红茶工艺进行加工, 采用基于代谢组学的液质联用技术 (LC-MS/MS) 对发酵过程中的茶样进行检测, 分析工夫红茶发酵过程中代谢产物的动态变化。结果表明, 在发酵过程中, 茶叶中代谢物呈现规律性动态变化; 共筛选到 493 种差异代谢物, 且这些差异代谢物的变化趋势以发酵 2 h 为节点可分为两个阶段, 即发酵前期和发酵后期。发酵前期代谢物变化明显, 物质代谢活跃, 而发酵后期差异代谢物明显少于发酵前期, 物质代谢减弱, 且整个发酵过程中上调的差异代谢物数量均大于下调的差异代谢物数量; 此外, 对鉴定出的 90 种差异代谢物进行分析, 结果显示, 在红茶发酵过程中呈涩味的代谢物下调表达, 可溶性糖、茶黄素类呈甜醇、鲜爽滋味的代谢物显著上调表达。本实验为探究工夫红茶发酵过程中的物质代谢调控机制提供了重要参考。

关键词: 工夫红茶, 发酵, 代谢物, 代谢组学

中图分类号: TS272.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)21-0008-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030361

本文网刊:



Metabolomics Analysis of Changes in Metabolites During the Fermentation Process of Congou Black Tea

GONG Lianjin^{1,2}, BO Jiahui^{1,2}, DU Zheru^{1,2}, LI Jin^{1,2}, SUN Hongyu^{1,2}, CHEN Yiqin^{1,2},
PEI Ruoyun^{1,2}, XIAO Lizheng^{1,2,3,*}

(1. Key Laboratory of Tea Science of Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. National Research Center of Engineering and Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3. Co-innovation Center of Education Ministry for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Baojing Huangjinchá was used as raw material and processed according to congou black tea technology, used metabolomics-based liquid-mass spectrometry (LC-MS/MS) to detect tea samples during the fermentation process, and analyzed the dynamic changes of metabolites during the fermentation process of congou black tea. The results showed that during the fermentation process, the metabolites in tea showed regular dynamic changes. A total of 493 different metabolites were screened in the study, moreover, the change trend of these different metabolites can be divided into two stages, namely the early stage of fermentation and the later stage of fermentation, taking the 2 h fermentation as the node. In the early stage of fermentation, the metabolites were change significantly, and the material metabolism was active, while the differential metabolites in the later stage of fermentation were significantly less than that in the early stage of fermentation, and the material metabolism was weakened. Analysis of the identified 90 differential metabolites showed that the astringent metabolites were down-regulated during the fermentation of black tea, and the soluble sugars and theaflavins were

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 湘财农指 ([2020]65 号)。

作者简介: 宫连瑾 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 茶叶加工理论与新技术, E-mail: 617407012@qq.com。

* 通信作者: 肖力争 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 茶叶加工理论与新技术, E-mail: 1369949056@qq.com。

sweetened and refreshing metabolites were significantly up-regulated. This experiment provides an important reference for exploring the mechanism of substance metabolism regulation in the fermentation process of congou black tea.

Key words: congou black tea; fermentation; metabolite; metabonomics

工夫红茶是我国特有的传统茶类,具有滋味甘醇醇厚、香气优雅高长、汤色明亮的典型特征^[1]。工夫红茶的初制过程为萎凋、揉捻、发酵(氧化)和干燥,其中发酵过程是其色、香、味形成的关键工序^[2]。因此,探索工夫红茶发酵过程中内含物质的变化,是了解工夫红茶品质形成的重要途径。然而,由于分析方法的限制,对于复杂的发酵过程往往不能进行全面的研究。

如今,随着科学技术的发展,检测茶叶各方面指标的方法也开始增多,其中代谢组学技术已被广泛应用于茶叶研究^[3]。代谢组学研究主要采用气相色谱质谱联用、高效液相色谱质谱联用、核磁共振、毛细管电泳技术等方法,阐明茶叶加工过程中的化学变化,更加全面的展现了茶叶从种植到加工过程中内含物质的动态变化规律,从而揭示茶叶特殊风味的形成原理^[4-6]。例如,研究证明,运用 GC-MS(气相色谱质谱联用)可分离和鉴定红茶中微量和芳香活性成分^[7]。郑起帆等^[8]通过研究不同山头普洱生茶的差异代谢物,运用 ¹H-NMR(核磁共振)方法为普洱茶的品质评价找到新思路。戴宇樵等^[9]采用 HPLC-MS(超高效液相色谱/质谱联用技术)探究云南大叶种“云抗 10 号”晒青茶加工过程中代谢产物的变化,确定了影响晒青茶品质形成的标志性代谢物。

保靖黄金茶产于湖南湘西,其内含物质丰富、氨基酸含量高,所制绿茶“香、绿、爽、浓”,红茶则“汤色红艳、香高味浓”^[10-11]。目前,关于黄金茶工夫红茶的各方面研究都相对较少,探究其品质形成原因的研究更为稀少。基于此,本研究采用黄金茶为原料制作成工夫红茶,利用代谢组学的液质联用技术(LC-MS/MS)探究其发酵过程中代谢产物的变化,以期对湖南工夫红茶加工过程中的品质调控提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲜叶原料 均采自湖南湘西妙古金茶叶公司茶园,品种为保靖黄金茶,原料等级为一芽二叶,采摘时间为 2020 年 8 月上旬;甲醇、醋酸铵 色谱级, Thermo 公司;水 Merck 公司;甲酸 Fisher 公司。

Q Exactive™ HF-X 质谱仪、Vanquish UHPLC 色谱仪 Thermo 公司; Hypesil Gold column C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱 Thermo Fisher 公司; D3024R 低温离心机 Scilogex 公司;凉青架、凉青筛、55 型揉捻机 福建佳友公司;链板式烘干机 四川省农副产品加工技术开发公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品加工工艺 萎凋:准确称取 25 kg 鲜叶,

进行室内萎凋(鲜叶薄摊 2~3 cm, 平均气温 20 ℃);揉捻:待萎凋至鲜叶含水量为 62%~63% 时,将萎凋叶转入 55 型揉捻机进行揉捻(不加压 5 min、轻压 10 min、重压 10 min、轻压 5 min、重压 10 min、轻压 5 min);发酵:将揉捻叶转入发酵室进行发酵(环境温度 28 ℃、相对湿度 90% 以上,发酵 4 h);干燥:发酵后,采用链板式烘干机进行干燥(毛火温度 120 ℃、足火温度 100 ℃,干燥至成品茶含水量为 4%~5% 止)。取样:工夫红茶发酵过程中,于发酵 0、2、4 h 分别取样,记为 FJ0h、FJ2h、FJ4h;随后将样品迅速用液氮固定、置于 -80 ℃ 储存待进一步分析。每组样品包含 3 个生物学重复。

1.2.2 代谢物提取 取 100 mg 液氮研磨的组织样本,置于 EP 管中,加入 500 μL 含 0.1% 甲酸的 80% 甲醇水溶液,涡旋振荡,冰浴静置 5 min, 15000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,取一定量的上清液加质谱级水稀释至甲醇含量为 53%,并置于离心管中, 15000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,收集上清液,进样 LC-MS 进行分析^[12]。

质控(QC)样本:每组待测样本中的三个生物学重复样品分别取等体积的样本混匀制成 QC 样本,每组茶叶样品均独立制备质控样品,用于平衡色谱-质谱系统和监测仪器状态,在整个实验过程中对系统稳定性进行评价。

空白(blank)样本:含 0.1% 甲酸的 53% 甲醇水溶液代替实验样本,前处理过程与实验样本相同,主要用于去除背景离子。

1.2.3 色谱条件 色谱柱: Hypesil Gold column C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)、柱温: 40 ℃、流速: 0.2 mL/min、正离子模式: 流动相 A: 0.1% 甲酸、流动相 B: 甲醇; 负离子模式: 流动相 A: 5 mol/L 醋酸铵, pH9.0; 流动相 B: 甲醇, 洗脱条件如表 1 所示。

表 1 色谱梯度洗脱程序
Table 1 Chromatographic gradient elution procedure

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	98	2
1.5	98	2
12	0	100
14	0	100
14.1	98	2
17.0	98	2

1.2.4 质谱条件 扫描范围选择 m/z 70~1050; ESI 源的设置如下: 喷雾电压: 3.2 kV; 鞘层气体流速: 40 arb; 辅助气体流量率: 10 arb; 毛细管温度: 320 ℃; 极性: 正, 负; MS/MS, 二级扫描为数据相关扫描。

1.3 数据处理

下机原始数据使用 CD3.1 软件根据保留时间、质荷比等参数进行数据预处理。对于不同样本,根据保留时间偏差和质量偏差(Part per million, ppm)进行峰对齐;随后根据设置的 ppm、信噪比(Signal-to-noise ratio, S/N)、加合离子等信息进行峰提取,并对峰面积进行定量。然后比对高分辨二级谱图数据库 mzCloud、mzVault 以及 MassList 一级数据库检索(数据库由北京诺禾致源生物科技股份有限公司提供),进行代谢物鉴定。用 Blank 样本去除背景离子,并对定量结果进行归一化,最后得到数据的鉴定和定量结果。保留 QC 样本中变异系数(Coefficient of Variance, CV)小于 30% 的代谢物作为最终的鉴定结果,进行后续分析^[13]。主成分分析采用 SIMCA 14.1 软件进行分析,数据分析采用 Excel 2019 及 SPSS 22.0 软件,热图绘制使用 TBtools 软件。

2 结果与分析

2.1 主成分分析

以三个样品组(正离子模式和负离子模式检测结果合并)的代谢物进行主成分分析,根据离散度分析样品重复性及差异性,判断仪器稳定性和数据有效性。若样品离散度小,则仪器稳定,检测结果可靠。如图 1 所示,三个样品组明显分开,插入的 QC 样本可以很好的重叠,说明仪器具有较好的稳定性。且样品组内生物学重复样品离散度小,表明生物学重复样品的重复性好,具有代表性,为后续代谢物分析结果的准确提供了依据。另外,由图 1 可知,工夫红茶发酵过程中代谢物逐渐变化。发酵 0 h 样品与发酵 2、4 h 样品距离较远,而发酵 2 h 与发酵 4 h 样品组较为接近。由此可见,发酵前期物质变化明显,提示发酵前期是工夫红茶品质形成的关键阶段。

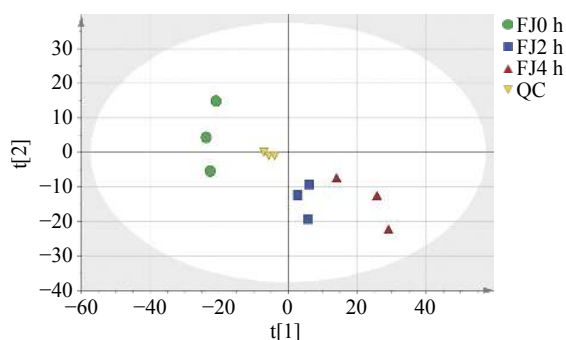


图 1 工夫红茶发酵过程中代谢物主成分分析得分图
Fig.1 Principal component analysis scores of metabolites during the congou black tea fermentation

2.2 差异代谢物分析

本次实验共检测到 1415 种代谢物(正离子模式和负离子模式检测结果合并),参考岳文杰等^[14]、Yue 等^[15]的数据处理方法,利用 SPSS 软件,以 1415 个代谢物的响应强度(峰面积)为指标,进行单因素方差分析,以获得每个代谢物的 P 值,并以 $P < 0.05$

(Bonferroni 校正)筛选工夫红茶发酵过程中的差异代谢物,共筛选到 493 个差异代谢物。对获得的所有差异代谢物进行层次聚类分析,这些差异代谢物在发酵过程中的变化规律如图 2 所示。在发酵过程中,493 个差异代谢物的含量变化趋势主要分为四个类型:第一类呈现“较高→高→较低”的变化趋势,这类代谢物在发酵前期含量较高,随着发酵的进行逐渐降低;第二类呈现“较高→低→较低”的变化趋势,在发酵前期的含量最高,而随着发酵的进行,含量不断下降,特别是发酵至 4 h 时,含量出现比较明显的下降趋势;第三类呈现“较低→高→较高”的变化趋势,这类代谢物在发酵前期的含量低,而发酵至 2 h 时含量明显上升,直至发酵结束;第四类呈现“较低→低→较高”的变化趋势,这类代谢物直至发酵后期,即发酵至 4 h,含量才明显上升。此外还对两组间的差异代谢物进行统计分析,如表 2 所示。结果显示, FJ2 h vs FJ0 h、FJ4 h vs FJ0 h、FJ4 h vs FJ2 h 分别筛选到 206、482、112 个差异代谢物,其中上调表达的分别有 175、368、81 个,下调表达的分别有 31、114、31 个。综上所述,工夫红茶发酵过程中,差异代谢物变化趋势明显,且发酵过程中上调的差异代谢物数量均大于下调的差异代谢物数量;发酵 2 h 后代谢物明显差异于发酵 0 h;发酵前期差异代谢物数量多于发酵后期,物质代谢更加活跃。

2.3 不同类别差异代谢物的鉴定与分析

以上述 493 种差异代谢物进行定性分析,共鉴定到 90 个代谢物,包括 15 种儿茶素及其聚合物、22 种氨基酸、10 种有机酸、3 种核苷、20 种黄酮醇及其糖苷、12 种生物碱、8 种可溶性糖。

2.3.1 儿茶素及其聚合物类物质的变化分析 如图 3 所示,15 种鉴定到的具有差异变化的儿茶素及其聚合物:(-)-EGC((-)-Epigallocatechin)、CG(Catechin gallate)、(-)-EGCG((-)-Epigallocatechin gallate)、EC(Epicatechin)、ECG(Epicatechin-3-O-gallate)、ETFGg(Epitheafagallin 3-O-gallate)、(-)-GC((-)-Gallocatechin)、C(Catechin)、(-)-CG((-)-Catechin Gallate)、EGC(Epigallocatechin)、茶黄素-3,3'-双没食子酸酯(Theaflavine-3,3-digallate)、茶黄素-3-没食子酸酯(Theaflavin monogallate)、原花青素 A2(Procyanidin A2)、原花青素 B2(Procyanidin B2)、原花青素 B1(Procyanidin B1)。在发酵过程中,这 15 种物质表现为两种变化趋势,第一种:儿茶素类与原花青素类物质呈明显下调趋势;第二种:茶黄素类物质呈显著上调趋势,这与前人的研究结果一致^[16-18]。茶黄素是红茶特有的代谢物,对红茶茶汤滋味和色泽品质起着决定性的作用,在红茶发酵时,儿茶素与酶结合发生酶促氧化生成大量茶黄素类物质^[19],故在此过程中可观察到儿茶素类物质的大幅度下降以及茶黄素类物质的明显增加。原花青素是以儿茶素单体为结构单元构成的一种二聚体化合物,广泛存

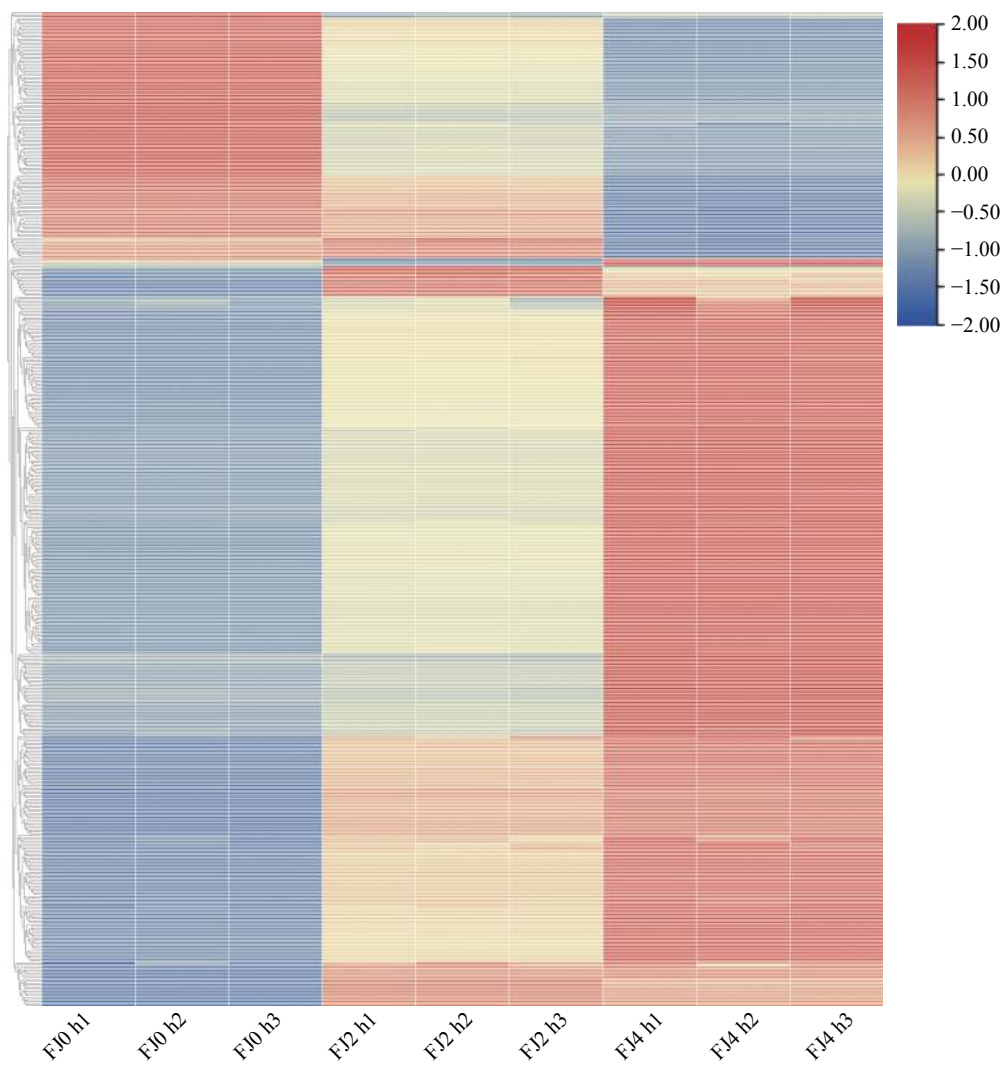


图 2 工夫红茶发酵过程中总差异代谢物的变化热图

Fig.2 Heat map of changes in total differential metabolites during the fermentation of congou black tea

表 2 各组间代谢物差异筛选结果

Table 2 Screening results of metabolite differences among groups

样品组间的比较	鉴定到的代谢物总量	组间差异代谢物总量	上调的代谢物总量	下调的代谢物总量
FJ2 h vs FJ0 h	1415	206	175	31
FJ4 h vs FJ0 h	1415	482	368	114
FJ4 h vs FJ2 h	1415	112	81	31

在于自然界的众多植物中。茶叶不同的加工方式会导致其含量发生明显变化,其中以绿茶中原花青素含量最高,红茶和黑茶最低^[20-22],表明原花青素含量随茶叶的发酵程度的加深而减少,这在本实验中得到了证实。原花青素含量在红茶发酵过程中逐渐降低,初步推断可能是原花青素在红茶发酵环境下发生了氧化导致其含量下降,但其氧化机理有待进一步解析。

2.3.2 氨基酸类物质的变化分析 氨基酸作为茶叶中重要的化学成分,与茶叶的品质和营养价值密切相关。目前,从茶叶中已鉴定出的氨基酸共有 26 种。按照滋味特征划分,茶叶中的氨基酸主要包括鲜甜的茶氨酸,鲜酸的谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺,甜味的甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸,苦味的精氨酸^[23-24]。其中茶氨酸是茶叶中含量最高的氨基酸,也

是茶叶的特有成分^[25]。茶叶的风味口感主要由谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、茶氨酸等鲜味和鲜爽类的氨基酸决定^[26]。此外,高温条件下氨基酸可脱水释放烘烤香,也可在高温低湿条件下与糖类发生美拉德反应,产生焦糖香^[23]。

如图 4 所示,在发酵工序中,鉴定到的 22 种差异表达的氨基酸,除 L-苏氨酸呈现波动变化外,其余氨基酸都呈极显著变化,产生大幅度下调,这与从前关于氨基酸变化规律的研究结果相似^[27-28]。有研究指出,红茶加工过程中,氨基酸含量的下降可能是由于其转化成了其他物质,并认为有两种可能的途径可以将游离氨基酸转化为茶叶香气化合物或挥发性化合物。一是氨基酸与儿茶素氧化产物—邻醌结合,二是一些氨基酸,如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬

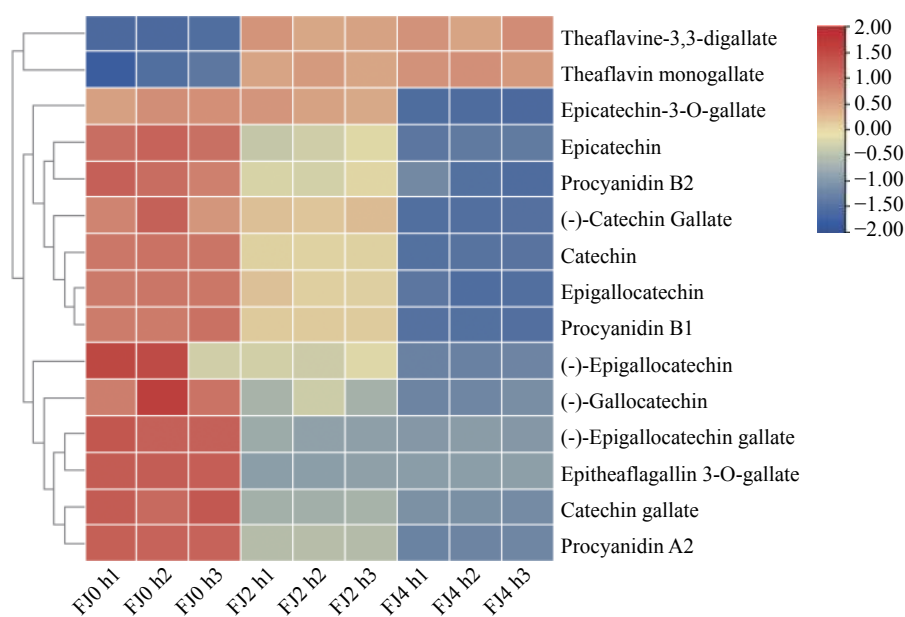


图3 工夫红茶发酵过程中儿茶素及其聚合物的变化

Fig.3 Changes of catechins and their polymers during the fermentation of congou black tea

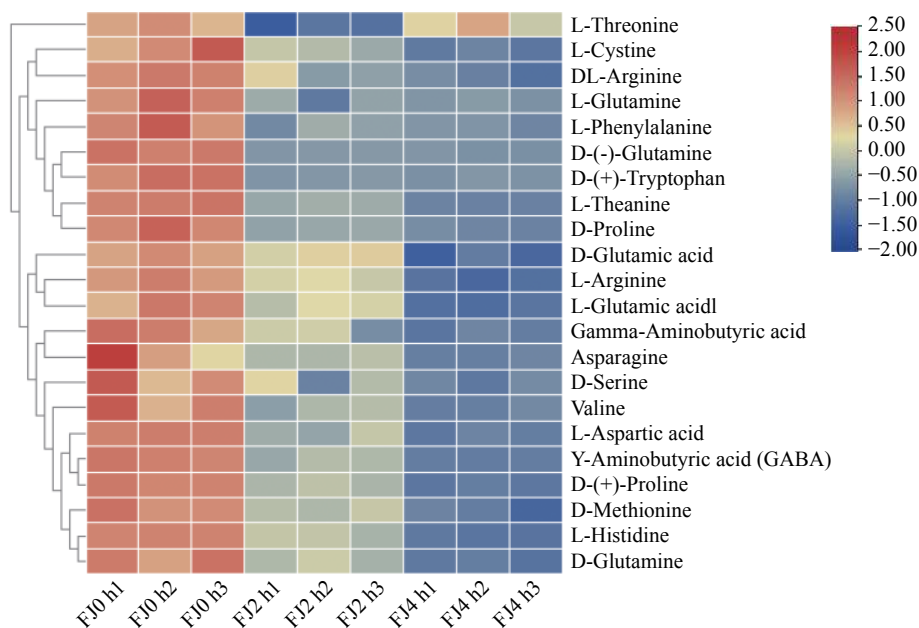


图4 工夫红茶发酵过程中氨基酸类物质的变化

Fig.4 Changes of amino acids during the fermentation of congou black tea

氨酸等,部分转化为醛、醇等物质^[27, 29-30]。

2.3.3 黄酮醇及其糖苷类物质的变化分析 黄酮类化合物是茶叶中一类低分子量的酚类化合物,分为黄酮、黄酮醇。红茶中的黄酮类物质主要是异黄酮、黄酮醇和黄酮醇等^[31]。大多数情况下,黄酮醇常与糖结合成糖苷以碳糖基的形式存在,茶叶中黄酮醇类主要以槲皮素(苷)和山奈素(苷)和杨梅素(苷)的形式存在^[32-33]。据报道,在红茶茶汤中,除了儿茶素外,一系列的黄酮-3-醇吡喃糖苷也是影响红茶口感的重要因素^[34-35]。这类黄酮-3-醇苷在极低的阈值浓度下不仅能产生天鹅绒般的苦涩感,还能通过增强咖啡碱的苦味强度促进红茶茶汤的苦味。

如图5所示在本研究的工夫红茶发酵过程样中

共鉴定到20种差异表达的黄酮及其糖苷物质,包括15种黄酮醇:车前草苷、芸香柚皮苷、新橙皮苷二氢查尔酮、高丽槐素、槲皮素、异鼠李素、二氢槲皮素、异丹叶大黄素、二氢杨梅素、杨梅素、异甘草苷、山奈酚、橙皮素、矢车菊素、熊果苷;5种黄酮醇糖苷:杨梅素-3-O- β -D-半乳糖苷、花青素鼠李葡萄糖苷、槲皮素-3-D-木糖甙、槲皮素-3,4'-O-D- β -葡萄糖苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷。工夫红茶发酵过程中,这20种物质的变化趋势分为三种类型,第一类:发酵2 h后下调表达(二氢槲皮素、二氢杨梅素、杨梅素、异甘草苷、矢车菊素、杨梅素-3-O- β -D-半乳糖苷、槲皮素-3-D-木糖甙、槲皮素-3,4'-O-D- β -葡萄糖苷);第二类:发酵2 h后上调表达(车前草苷、芸香柚皮苷、新

橙皮苷二氢查尔酮、高丽槐素、槲皮素、异丹叶大黄素、橙皮素、熊果苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷); 第三类: 发酵 2 h 后上调表达, 发酵 4 h 后下调表达(异鼠李素、山奈酚、花青素鼠李葡萄糖苷)。Guo 等^[36]进行了 PPO+POD 处理黄酮糖苷的体外研究, 验证了 PPO、POD 能促进茶叶中黄酮糖苷的转化, 从而导致其含量的下降。但目前针对茶叶加工过程中黄酮醇及其糖苷物质变化的研究较少, 因此, 对于工夫红茶发酵过程中黄酮醇及其糖苷类物质具体的变化机理还需做进一步探索。

2.3.4 生物碱类物质的变化分析 茶叶中的生物碱以嘌呤类为主, 其中, 含量最多的是咖啡碱(2%~5%)^[37]。咖啡碱是一种结构为 1,3,7-三甲基黄嘌呤

的生物碱, 是茶叶中重要的生物活性成分和呈味物质, 一般茶叶品质越好, 咖啡碱含量越高^[38]。咖啡碱呈苦味, 且阈值较低, 据研究表明, 多酚类物质可增强其苦味强度, 而氨基酸则能减弱其苦味强度^[39]。茶汤中含有丰富复杂的化合物种类, 既存在氨基酸, 也包括多酚类物质, 会对茶汤中咖啡碱的呈味产生综合影响^[40]。

如图 6 所示本次研究共鉴定到 12 种差异表达的生物碱, 前人重点研究关注的咖啡碱、可可碱、茶碱也包括其中。咖啡碱在发酵过程中呈现先上调后下调的变化趋势, 而可可碱和茶碱则是表现先下调后上调的变化趋势。这与先前的研究结果略有出入, 初步推断, 这可能与茶叶加工工艺及品种不同有关^[41-42]。

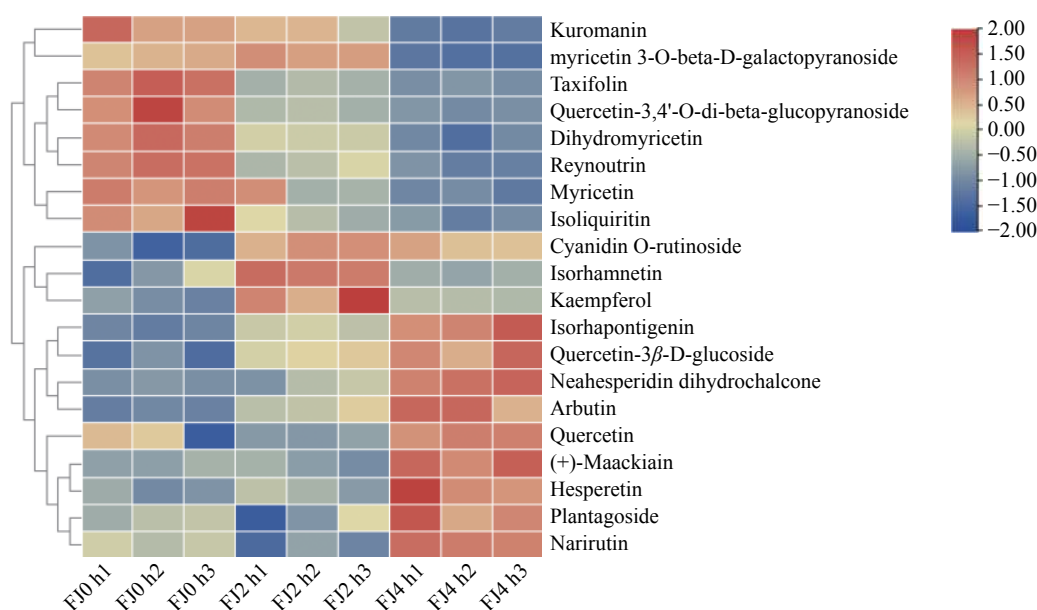


图 5 工夫红茶发酵过程中黄酮醇及其糖苷类物质的变化

Fig.5 Changes of Flavonols and their glycosides during the fermentation of congou black tea

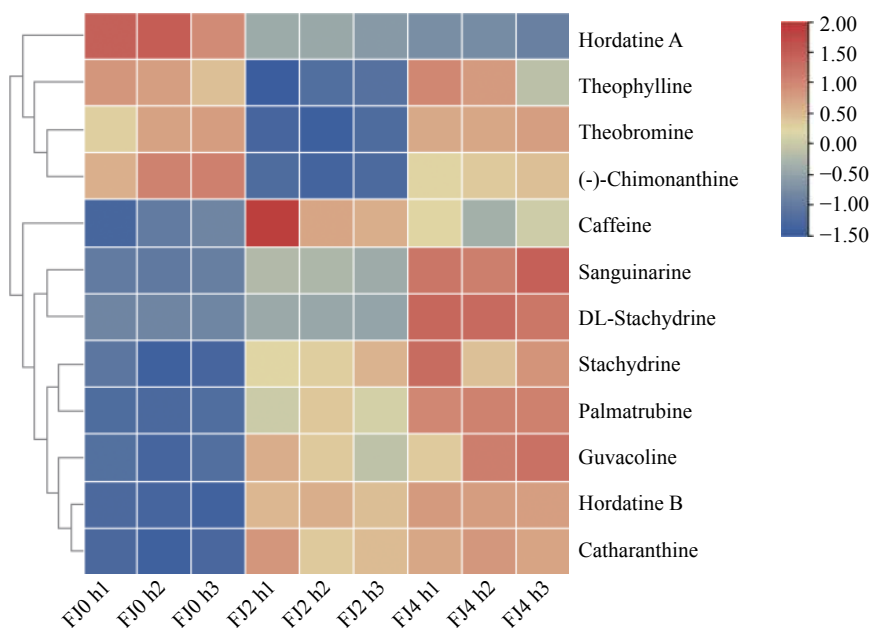


图 6 工夫红茶发酵过程中生物碱类物质的变化

Fig.6 Changes of alkaloids during the fermentation of congou black tea

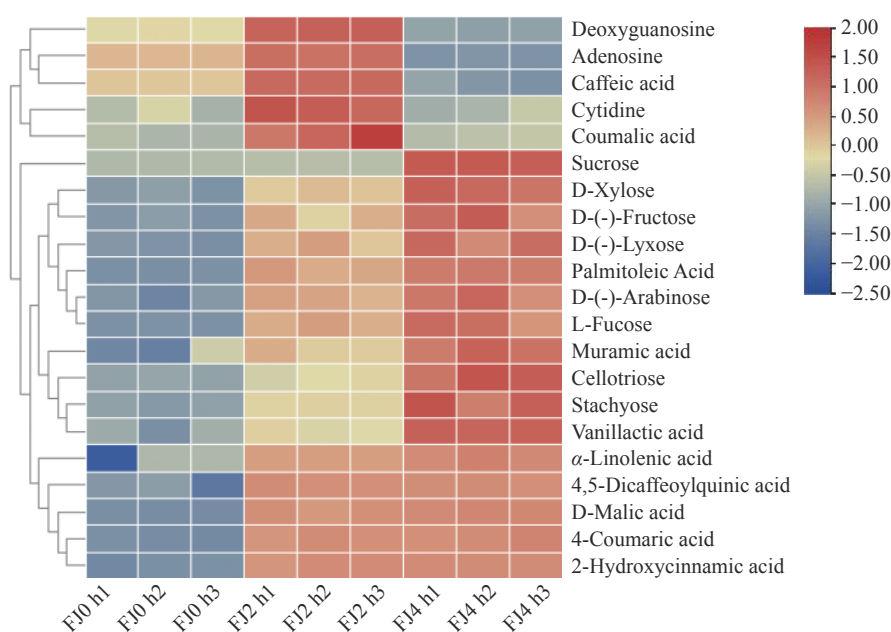


图 7 工夫红茶发酵过程中其他类物质的变化

Fig.7 Changes of other substances during the fermentation of congou black tea

其余生物碱,除大麦芽新碱与山蜡梅碱外,均是上调表达。

2.3.5 其他类物质的变化分析 此外,还鉴定到了 10 种有机酸、3 种核苷以及 8 种可溶性糖。可溶性糖是茶叶中主要的水溶性碳水化合物^[43],其主要包括三类,可溶于水的单糖(果糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、核糖、木酮糖和阿拉伯糖等)和双糖(蔗糖、乳糖、麦芽糖、棉子糖等),以及不溶于水的多糖(淀粉、纤维素、半纤维素、木质素和果胶),单糖和双糖均具有甜味^[37],一定程度上能削弱茶汤的苦涩^[44],是构成茶汤甜醇滋味的物质基础之一。在本实验中,D-阿拉伯糖、蔗糖、水苏糖、纤维三糖、D(-)-来苏糖、L(-)岩藻糖、D-木糖、D(-)-果糖是主要差异表达的可溶性糖类,且变化趋势为总体上调,这对工夫红茶甜醇滋味的品质形成具有重要意义。

如图 7 所示 10 种鉴定到的有机酸在工夫红茶发酵过程中均上调表达,3 种核苷在发酵 2 h 时上调表达,发酵 4 h 后下调表达。有机酸是构成茶叶香气和滋味的主要成分之一,占茶叶干物质总量的 3% 左右^[45]。前人的研究表明,在红茶加工中,有机酸代谢对于红茶香气的形成及转化具有重要影响^[46],基于此,猜测有机酸类物质在发酵阶段的上调表达有利于红茶香气物质在加工后期的积累。

3 结论

发酵是工夫红茶加工过程中的关键工序,在发酵过程中,丰富的内含物质发生着复杂的化学变化,为形成工夫红茶特有的品质特征奠定基础^[47]。前期的研究主要集中在工夫红茶发酵工艺的改善及品质化学分析方面,对于发酵过程中众多小分子代谢产物的变化规律仍不清晰^[48-49]。

本实验采用基于代谢组学的液质联用技术(LC-

MS/MS)对工夫红茶发酵过程中的代谢物进行鉴定分析,实现了对发酵各个阶段的明显区分,同时发现,在发酵过程中,工夫红茶的代谢物含量变化以发酵 2 h 和发酵 4 h 为时间节点,分为发酵前期(0~2 h)和发酵后期(2~4 h)。在这两个不同的发酵阶段,上调的差异代谢物数量均大于下调的差异代谢物数量;发酵 2 h 后代谢物明显差异于发酵 0 h;发酵前期差异代谢物数量多于发酵后期,物质代谢更加活跃,暗示发酵前期是工夫红茶品质形成的关键阶段;此外,还对鉴定到的差异表达的代谢物进行了分析鉴定,结果显示,在整个发酵过程中,呈涩味代谢物下调表达,可溶性糖、茶黄素类呈甜醇、鲜爽滋味的代谢物明显上调表达。综上,此研究的分析结果不仅为探索发酵时间与滋味品质形成的关系提供了理论依据,同时也可以利用这些代谢物的变化规律为生产某些高含量成分的工夫红茶产品提供参考,对湖南省工夫红茶的生产实践具有一定的指导意义。但由于未采用精确定量的样品检测方法,且实验品种过于单一,本研究工作还存在许多不足。接下来应采取绝对定量的方法以及选取丰富的红茶适制品种进行研究,以期能全面解析工夫红茶发酵过程中具体物质的变化机理。

参考文献

- [1] 李小源. 工夫红茶风味感官品质与化学品质研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2015. [Li X Y. Study on flavor, sensory quality and chemical quality of congou black tea[D]. Chongqing: Southwest University, 2015.]
- [2] 钟秋生, 林郑和, 陈常颂, 等. 春闲品种花香红茶发酵过程中生化成分的变化研究[J]. 茶叶学报, 2016, 57(2): 85-91. [Zhong Q S, Lin Z H, Chen C S, et al. Suitability of 'Baojing Huangjin tea' cultivar for processing quality black tea[J]. Journal of Tea, 2016, 57(2): 85-91.]
- [3] 虞昕磊, 艾于杰, 曲凤凤, 等. 代谢组学在研究茶叶品质形成

- 中的应用[J]. *茶叶科学*, 2018, 38(1): 20–32. [Yu X L, Ai Y J, Qu F F, et al. Metabolomics application in the study of tea quality formation[J]. *Journal of Tea Science*, 2018, 38(1): 20–32.]
- [4] 李鑫磊, 俞晓敏, 林军, 等. 基于非靶向代谢组学的白茶与绿茶、乌龙茶和红茶代谢产物特征比较[J]. *食品科学*, 2020, 41(12): 197–203. [Li X L, Yu X M, Lin J, et al. Study on the metabolites characteristic of white tea compared with green tea, oolong tea and black tea based on the non-targeted metabolomics approach[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 41(12): 197–203.]
- [5] Long P, Wen M, Granato D, et al. Untargeted and targeted metabolomics reveal the chemical characteristic of pu-erh tea (*Camellia assamica*) during pile-fermentation[J]. *Food Chem*, 2020, 311: 125895.
- [6] Chen S, Liu H, Zhao X, et al. Non-targeted metabolomics analysis reveals dynamic changes of volatile and non-volatile metabolites during oolong tea manufacture[J]. *Food Res Int*, 2020, 128: 108778.
- [7] Joshi R, Gulati A. Fractionation and identification of minor and aroma-active constituents in kangra orthodox black tea[J]. *Food Chem*, 2015, 167: 290–298.
- [8] 郑起帆. 基于 ¹H-NMR 的四个茶山普洱生茶代谢组学研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2016. [Zheng Q F. H-NMR-based metabolomics for pu-erh raw tea from four different mountain origins[D]. Guangzhou: Guangdong University of Pharmacy, 2016.]
- [9] 戴宇樵, 吕才有, 何鲁南, 等. 基于代谢组学的‘云抗 10 号’晒青茶加工过程代谢物变化[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(2): 357–370. [Dai Y Q, Lv C Y, He L N, et al. Metabolic changes in the processing of yunkang 10 sun-dried green tea based on metabolomics[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(2): 357–370.]
- [10] 刘振, 杨阳, 赵洋, 等. 特早生高产优质绿茶新品种黄金茶 168 号选育研究[J]. *茶叶通讯*, 2016, 43(2): 13–18. [Liu Z, Yang Y, Zhao Y, et al. The breeding of early budding, high-yield and high quality new green tea cultivar huangjincha 168[J]. *Journal of Tea Communication*, 2016, 43(2): 13–18.]
- [11] 钟兴刚, 黄怀生, 郑红发, 等. 保靖黄金茶-优质红茶适制性分析研究[J]. *茶叶*, 2015, 41(4): 188–191. [Zhong X G, Huang H S, Zheng H F, et al. Suitability of ‘Baojing huangjin tea’ cultivar for processing quality black tea[J]. *Journal of Tea*, 2015, 41(4): 188–191.]
- [12] Want E J, O'maille G, Smith C A, et al. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(3): 743–752.
- [13] Dai W, Xie D, Lu M, et al. Characterization of white tea metabolome: Comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach[J]. *Food Res Int*, 2017, 96: 40–45.
- [14] 岳文杰, 金心怡, 陈明杰, 等. 基于非靶向代谢组学分析白茶室内自然萎凋过程代谢物的变化规律[J]. *茶叶科学*, 2021, 41: 1–16. [Yue W J, Jin X Y, Chen M J, et al. Analysis of metabolite changes in the natural withering process of Fu'an white tea based on non-targeted metabolomics approach[J]. *Journal of Tea Science*, 2021, 41: 1–16.]
- [15] Yue W, Sun W, Rao R, et al. Non-targeted metabolomics reveals distinct chemical compositions among different grades of Bai Mudan white tea[J]. *Food Chem*, 2019, 277: 289–297.
- [16] Lee L, Kim Y, Park J, et al. Changes in major polyphenolic compounds of tea (*Camellia sinensis*) leaves during the production of black tea[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2016, 25(6): 1523–1527.
- [17] 宁井铭, 方骏婷, 朱小元, 等. 基于代谢谱分析的祁门红茶加工过程中儿茶素及芳香类物质变化[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(9): 127–133. [Ning J M, Fang J T, Zhu X Y, et al. Analysis of catechins and aromatic of keemun black tea during processing based on metabolic spectrum technology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(9): 127–133.]
- [18] Tan J, Dai W, Lu M, et al. Study of the dynamic changes in the non-volatile chemical constituents of black tea during fermentation processing by a non-targeted metabolomics approach[J]. *Food Research International*, 2016, 79: 106–113.
- [19] Zhang L, Ho C T, Zhou J, et al. Chemistry and biological activities of processed *Camellia sinensis* teas: A comprehensive review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(5): 1474–1495.
- [20] 侯冬岩, 回瑞华, 刁全平, 等. 不同发酵类型的茶叶原花青素含量的比较分析[J]. *鞍山师范学院学报*, 2015, 17(6): 39–42. [Hou D Y, Hui R H, Diao Q P, et al. Comparative analysis of proanthocyanidins content in different fermented tea[J]. *Journal of Anshan Normal University*, 2015, 17(6): 39–42.]
- [21] 高晨曦, 黄艳, 孙威江. 茶叶中原花青素研究进展[J]. *茶叶科学*, 2020, 40(4): 441–453. [Gao C X, Huang Y, Sun W J. Research progress of proanthocyanidins in tea[J]. *Journal of Tea Science*, 2020, 40(4): 441–453.]
- [22] 武晓英. 四类茶叶的成分研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2011. [Wu X Y. Four types of tea composition analysis[D] Dalian: Liaoning Normal University, 2011.]
- [23] 岳翠男, 王治会, 毛世红, 等. 茶叶主要滋味物质研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(1): 219–224. [Yue C N, Wang Z H, Mao S H, et al. The main taste substances in tea research progress[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(1): 219–224.]
- [24] 王雪萍, 滕靖, 郑琳, 等. 不同鲜叶嫩度名优绿茶氨基酸组分差异分析[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(14): 166–170. [Wang X P, Teng J, Zheng L, et al. Variance analysis of amino acid composition of famous green tea with different tenderness of fresh leaves[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(14): 166–170.]
- [25] 蔡翔, 李延升, 杨普香, 等. 茶氨酸呈味特征及应用前景[J]. *蚕桑茶叶通讯*, 2017(6): 31–33. [Cai X, Li Y S, Yang P X, et al. Flavor characteristics and application prospects of theanine[J]. *Journal of Sericulture Tea Communication*, 2017(6): 31–33.]
- [26] 肖涵, 陈圆圆, 陈春月. 不同加工方式茶叶游离氨基酸组分分布特征初探[J]. *昆明学院学报*, 2018, 40(6): 32–37. [Xiao H, Chen Y Y, Chen C Y. Preliminary study on distribution

- characteristics of free amino acid components in different processed tea leaves[J]. *Journal of Kunming University*, 2018, 40(6): 32-37.]
- [27] 赵和涛. 红茶发酵时主要化学变化及不同发酵方法对工夫红茶品质的影响[J]. *蚕桑茶叶通讯*, 1989(2): 10-13. [Zhao H T. Main chemical changes of black tea during fermentation and effects of different fermentation methods on quality of congou black tea[J]. *Journal of Sericulture Tea Communication*, 1989(2): 10-13.]
- [28] 余鹏辉, 陈盼, 黄浩, 等. 保靖黄金茶 1 号工夫红茶加工工序对主要滋味物质形成的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(10): 185-191. [Yu P H, Chen P, Huang H, et al. Influence of processing steps on the formation of main taste compounds in congou black tea made from the cultivar Baojing huangjincha 1[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 41(10): 185-191.]
- [29] Chen Y, Zeng L, Liao Y, et al. Enzymatic reaction-related protein degradation and proteinaceous amino acid metabolism during the black tea (*Camellia sinensis*) manufacturing process[J]. *Foods*, 2020, 9(1): 66.
- [30] Yu Z, Yang Z. Understanding different regulatory mechanisms of proteinaceous and non-proteinaceous amino acid formation in tea (*Camellia sinensis*) provides new insights into the safe and effective alteration of tea flavor and function[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(5): 844-858.
- [31] 李任强, 吴志炜, 梁云涛. 绿茶、红茶、银杏叶的黄酮类物质的比较分析初报[J]. *福建茶叶*, 1997(3): 30-32. [Li R Q, Wu Z W, Liang Y T. A comparative analysis of flavonoids in green tea, black tea and ginkgo leaf[J]. *Journal of Fujian Tea*, 1997(3): 30-32.]
- [32] 戴前颖, 夏涛, 高丽萍. 绿茶汤呈色物质研究进展[J]. *安徽农业大学学报*, 2011, 38(6): 887-891. [Dai Q Y, Xia T, Gao L P. A review on the compounds contributing to the color of green tea infusion[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2011, 38(6): 887-891.]
- [33] 林杰, 段玲靓, 吴春燕, 等. 茶叶中的黄酮醇类物质及对感官品质的影响[J]. *茶叶*, 2010, 36(1): 14-18. [Lin J, Duan L L, Wu C Y, et al. Flavonols in tea (*Camellia sinensis*) and its impact on sensory taste[J]. *Journal of Tea*, 2010, 36(1): 14-18.]
- [34] Scharbert S, Holzmann N, Hofmann T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(11): 3498-3508.
- [35] Scharbert S, Holzmann T. Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(13): 5377-5384.
- [36] Guo X, Lv Y, Ye Y, et al. Polyphenol oxidase dominates the conversions of flavonol glycosides in tea leaves[J]. *Food Chemistry*, 2021, 339: 128088.
- [37] 杜继煜, 白岚, 白宝璋. 茶叶的主要化学成分[J]. *农业与技术*, 2003, 23(1): 53-55. [Du J Y, Bai L, Bai B Z. Main chemical constituents of tea[J]. *Agriculture and Technology*, 2003, 23(1): 53-55.]
- [38] 陈宇宏, 王振文, 刘硕谦, 等. 茶叶咖啡碱的研究进展[J]. *茶叶通讯*, 2016, 43(3): 3-7. [Chen Y H, Wang Z W, Liu S Q, et al. Research progress on caffeine[J]. *Journal of Tea Communication*, 2016, 43(3): 3-7.]
- [39] 刘忠英, 杨婷, 戴宇樵, 等. 基于分子感官科学的茶叶滋味研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(4): 337-343. [Liu Z Y, Yang T, Dai Y Q, et al. Research progress of tea taste based on molecular sensory science[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(4): 337-343.]
- [40] 陈宗道, 包先进, 王碧芹. 咖啡碱的味觉特性[J]. *食品科学*, 1992(1): 1-2. [Chen Z D, Bao X J, Wang B Q. The taste characteristics of caffeine[J]. *Journal of Food Science*, 1992(1): 1-2.]
- [41] Li S, Lo C Y, Pan M H, et al. Black tea: Chemical analysis and stability[J]. *Food Funct*, 2013, 4(1): 10-18.
- [42] Sari F, Velioglu Y S. Changes in theanine and caffeine contents of black tea with different rolling methods and processing stages[J]. *European Food Research and Technology*, 2013, 237(2): 229-236.
- [43] 周杨, 胡小静, 周红杰, 等. 云南普洱茶水溶性碳水化合物含量的变化[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2006, 32(6): 625-627. [Zhou Y, Hu X J, Zhou H J, et al. Changes of water soluble carbohydrates in different yunnan pu-er tea[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2006, 32(6): 625-627.]
- [44] 魏明香. 基于电子舌技术的红茶滋味品质检测研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015. [Wei M X. Taste quality detection of black tea based on electronic tongue techniques[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.]
- [45] 刘盼盼, 钟小玉, 许勇泉, 等. 茶叶中有机酸及其浸出特性研究[J]. *茶叶科学*, 2013, 33(5): 405-410. [Liu P P, Zhong X Y, Xu Y Q, et al. Study on organic acids contents in tea leaves and its extracting characteristics[J]. *Journal of Tea Science*, 2013, 33(5): 405-410.]
- [46] 赵和涛. 红茶加工中有机酸代谢及对茶叶香气形成的影响[J]. *茶叶通讯*, 1993(1): 25-27. [Zhao H T. Metabolism of organic acids in black tea processing and its effect on the formation of tea aroma[J]. *Journal of Tea Communication*, 1993(1): 25-27.]
- [47] 马玉青, 方成刚, 夏丽飞, 等. 不同发酵程度对重萎凋“云抗 10 号”红茶香气成分的影响[J]. *西南农业学报*, 2020, 33(4): 760-768. [Ma Y Q, Fang C G, Xia L F, et al. Effect of different fermentation degree on aroma components of heavy withered ‘yunkang No. 10’ black tea[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 33(4): 760-768.]
- [48] 滑金杰, 袁海波, 姚月凤, 等. 温度对茶发酵叶色泽及茶色素含量的影响[J]. *农业工程学报*, 2018, 34(12): 300-308. [Hua J J, Yuan H B, Yao Y F, et al. Effect of temperature on the color and pigment content of fermented tea leaves[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, 34(12): 300-308.]
- [49] 刘强, 杨家干. 红茶发酵及自控通氧发酵技术对品质的影响[J]. *贵州茶叶*, 2018, 46(1): 8-11. [Liu Q, Yang J G. The influence on quality of black tea fermentation and the self-control aerobic fermentation[J]. *Guizhou Tea*, 2018, 46(1): 8-11.]