

不同等级普洱熟茶的代谢物差异分析

王娟^{1,2}, 肖巧梅¹, 张晓宇¹, 罗涵潇¹, 李雪丹¹, 魏子涛¹, 吕才有^{1*}

(1. 云南农业大学茶学院, 云南昆明 650201) (2. 勐海县茶叶与绿色食品产业发展中心, 云南勐海 666200)

摘要: 为探究不同等级晒青茶对其制备的普洱熟茶品质的主要化学成分影响, 通过分筛机械把机采机制晒青茶原料分为三个等级, 加工得到 A、B 和 C 三个不同等级普洱熟茶, 应用茶叶感官审评和代谢组学技术对其进行检测。结果表明: B 等级的感官审评最优; PCA 分析中 A 明显区别于其余试样; 共筛选出的 238 个差异代谢物中有 12 个标志性代谢物, 除了 D-麦芽糖的相对定量是与等级呈负相关, 其余都是与等级呈正相关; 四类重点物质中氨基酸及其衍生物的相对总量为 A(0.053 mg/g) > B(0.007 mg/g) > C(0.006 mg/g), 生物碱为 A(0.072 mg/g) > B(0.042 mg/g) > C(0.028 mg/g), 黄酮及类黄酮为 A(0.516 mg/g) > C(0.221 mg/g) > B(0.245 mg/g), 儿茶素及其衍生物为 A(1.808 mg/g) > B(0.668 mg/g) > C(0.482 mg/g), 都是随等级的降低而减少; 苯丙氨酸代谢是所有差异代谢物里相关性较强的通路。这些差异代谢物的变化规律可为机采机制晒青茶在后续普洱熟茶加工中的品质提升提供理论依据和科学指导。

关键词: 机采茶; 不同等级; 普洱熟茶; 感官审评; 代谢组学

文章编号: 1673-9078(2022)11-122-131

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.0121

Analysis of Differentially Accumulated Metabolites among Different Grades of Ripe Pu-erh Tea

WANG Juan^{1,2}, XIAO Qiaomei¹, ZHANG Xiaoyu¹, LUO Hanxiao¹, LI Xuedan¹, WEI Zitao¹, LYU Caiyou^{1*}

(1. College of Tea, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2. Tea and Green Food Industry Development Center in Menghai County, Menghai 666200, China)

Abstract: To investigate the influence of different grades of sun-dried green tea on the quality of the roasted Pu-erh tea prepared from them, the raw materials of machine-harvested sun-dried green tea were sieved and divided into three grades. Three different grades of roasted Pu-erh tea, namely A, B and C, were processed and examined through sensory evaluation of tea leaves and metabolomic analysis. Grade B had the best sensory evaluation results, and grade A was notably different from the other specimens in principal component analysis. Of 238 differentially accumulated metabolites, 12 were screened. Of these, D-maltose was negatively correlated with grade, whereas the other 11 metabolites were positively correlated with grade. The relative total content for four key substances were in the order of A (0.053 mg/g) > B (0.007 mg/g) > C (0.006 mg/g) for amino acids and their derivatives, A (0.072 mg/g) > B (0.042 mg/g) > C (0.028 mg/g) for alkaloids, A (0.516 mg/g) > C (0.221 mg/g) > B (0.245 mg/g) for flavanones and flavonoids, and A (1.808 mg/g) > B (0.668 mg/g) > C (0.482 mg/g) for catechins and their derivatives. Phenylalanine metabolism was the most involved pathway among all differentially accumulated metabolites. The variation patterns of these differentially accumulated metabolites can provide a theoretical basis and scientific guidance for improvement of the quality of machine-harvested sun-dried green tea and its subsequent processing into roasted Pu-erh tea.

Key words: machine-harvested tea; different grades; ripe Pu-erh tea; sensory evaluation; metabolomics

引文格式:

王娟,肖巧梅,张晓宇,等.不同等级普洱熟茶的代谢物差异分析[J].现代食品科技,2022,38(11):122-131

WANG Juan, XIAO Qiaomei, ZHANG Xiaoyu, et al. Analysis of differentially accumulated metabolites among different grades of ripe Pu-erh tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 122-131

收稿日期: 2022-02-08

基金项目: 国家现代农业(茶叶)产业技术体系建设专项(CARS-19)

作者简介: 王娟(1996-),女,硕士研究生,研究方向:茶叶加工与质量控制,

E-mail: 1098964697@qq.com

通讯作者: 吕才有(1964-),男,博士,教授,研究方向:茶学, E-mail:

2495846526@qq.com

普洱茶是使用独特的加工工艺而制成的具有独特品质特征的茶叶,按加工工艺的不同分为普洱生茶和普洱熟茶^[1]。因其具有降脂减肥、抗氧化、降血糖、预防心血管疾病等的药理作用^[2-4],市场需求量逐渐增大。市场扩大的同时,云南省茶叶种植面积也在逐年上升,但我国平均茶园单产 830 kg/hm² 远低于土耳其的

3 314 kg/hm², 致使很多茶叶的生物产量没有被充分利用, 茶鲜叶存在利用率低^[5], 并且省内对茶树鲜叶的采摘还主要依靠传统手工采摘方式来完成^[6], 采摘环节出现了严重的用工荒。如何提高单位面积的产出效益和降低采摘成本成为云南省茶产业发展亟待解决的问题, 机械化采摘成为解决此难题的最可能途径^[7-9]。茶树鲜叶机械化采摘的研究推广, 促使提升机采机制茶品质成了首要任务。分级处理是提高品质的一个重要手段, 经过分级处理后的机采茶, 在应用及品质上都有所提升。目前已有大量的分级设备投入使用, 可以对机采鲜叶进行分级, 一定程度上提高鲜叶的匀度和质量^[10]。经分级后的机采鲜叶, 也能初步区分鲜叶的老嫩程度, 有利于之后加工原料的分离^[11]。依据原料的等级来加工不同种类红茶和绿茶^[12,13], 使得机采鲜叶原料的资源利用率提升到最大化。利用机采机制晒青茶, 经分级处理后加工成普洱熟茶, 是提高利用率和产出效益的方法, 也是普洱茶提质增效的关键手段。

茶叶品质评定的方法包括感官审评和理化检验, 感官审评是利用人们的感觉器官对茶叶的外形、内质进行审评, 并用专业术语来描述茶叶的各种品质属性。而理化检验则是通过一定的仪器、设备或方法来探测茶叶的理化性状, 组学是动态的揭示系统结构、功能相互作用和运行规律的技术, 目前植物代谢组学被广泛用在茶学研究中, 主要集中在茶叶加工^[14]、茶叶功效^[15]、品质研究^[16]等方面。本试验采用秋季机采鲜叶制作的机采晒青茶为原料, 经筛分后得到的三个不同等级机采机制晒青茶, 通过小框发酵的方式加工成不同等级普洱熟茶。用代谢组学技术来揭示氨基酸、生物碱、黄酮及类黄酮和儿茶素及其衍生物这几类物质在不同等级普洱熟茶中的变化规律, 以期找到影响不同等级普洱熟茶品质的主要化学成分; 并根据感官审评结果来筛选出提高机采晒青茶加工普洱熟茶品质的加工工序, 增加机采机制晒青茶的经济效益。

1 材料与方法

1.1 实验材料

晒青茶取样: 本实验于2020年秋季, 课题组成员前往云南省德宏现代农业产业茶园使用机械采摘大叶种云抗十号鲜叶, 后经机械化加工制成机采机制晒青茶, 并以此为原料。通过型号6CSY茶叶平筛机(筛子为4目和7目)把机采机制晒青茶原料分为三个等级, 三个不同等级机采机制晒青茶在相同条件下使用竹筐发酵的加工方式, 得到A、B和C三个不同等级普洱熟茶试样。

1.2 试验方法

1.2.1 感官审评

引用感官审评国标^[17]中普洱熟茶的感官审评方法分别从香气、汤色、滋味、叶底四个方面评审并得出评语。

1.2.2 差异代谢物测定

委托上海百趣生物科技有限公司, A、B和C三个不同等级普洱熟茶为实验材料, 应用EXION LC System (SCIEX) 超高效液相色谱仪, 使用超高效液相色谱(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)和串联质谱(Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)的代谢组学技术, 通过Waters UPLC液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离, 主要方法如下:

(1) 代谢物提取

将样本进行冷冻干燥处理后再进行研磨(60 Hz, 30 s); 称取50 mg的样本到离心管中, 加入700 μL甲醇水提取液(体积比3:1, 含内标); 涡旋30 s, 35 Hz匀浆4 min, 冰水浴超声5 min; 重复匀浆超声3次; 在混匀仪上4 °C过夜; 将样本4 °C, 12 000 r/min离心15 min; 取上清经0.22 μm微孔滤膜过滤; 用提取液稀释上清液20倍, 涡旋30 s, 每个样本各取20 μL混合成质量控制(Quality Control, QC)样本; -80 °C储存直到上机检测。

(2) 液相条件

本试验使用EXION LC System (SCIEX) 超高效液相色谱仪, 通过Waters UPLC液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱A相为含体积分数0.1%甲酸水溶液, B相为乙腈。柱温箱温度为40 °C, 自动进样器温度为4 °C, 进样体积为2 μL, 体积流量为400 μL/min, 具体流动相梯度见表1。

表1 液相色谱流动相条件

时间/min	流量/(μL/min)	A 0.1%甲酸水溶液	B 乙腈
0	400	98	2
0.5	400	98	2
10	400	50	50
11	400	5	95
13	400	5	95
13.1	400	98	2
15	400	98	2

(3) 质谱条件

本试验使用装备IonDrive Turbo VESI离子源的SCIEX 6500 QTRAP+三重四极杆质谱仪, 以多反应监测(MRM)模式进行质谱分析。离子源参数如下:

IonSpray Voltage: +5500 V/-4500 V, Curtain Gas: 35 psi, Temperature: 400 °C, Ion Source Gas 1: 60 psi, Ion Source Gas 2: 60 psi, DP: ±100 V。

1.3 数据分析

每个样品提取 4 次，实验中所有质谱数据采集及目标化合物定量分析工作。均通过 SCIEX Analyst Work Station Software (Version 1.6.3) 来完成。使用 MSconverter 软件将质谱原始转成 TXT 格式。再使用自撰写 R 程序包结合自建数据库完成提峰、注释等工作。

采用多元统计分析，基于正交偏最小二乘法-判别分析 (Orthogonal Projections to Latent Structures-Discriminant Analysis, OPLS-DA) 结果，从多变量分析 OPLS-DA 模型的变量重要性投影 (Variable Importance in Project, VIP) 中初步筛选出不同样品间差异代谢物，再通过组合单变量分析的 P (P-Value) 值或差异倍数 (Fold Change) 来进一步筛选差异代谢物。本试验中存在生物学重复，通过 Fold Change 和 OPLS-DA 模型的 VIP 值相结合的方法来筛选差异代谢物。筛选标准：选取 Fold Change ≥ 2 (上调) 和 Fold Change ≤ 0.5 (下调) 的代谢物。

2 结果与讨论

2.1 感官审评

参照普洱茶国家标准 GB/T 22111-2008 对三个试样进行感官审评，得出感官审评结果表 2 和图 1，认为这三个普洱熟茶试样为合格茶样，具有普洱熟茶的品质特征。外形评定中 A 最好，条索较紧结和紧细，只是略带老梗；B 较好，带少量黄片与老梗；C 较差，存在大量黄片与老梗。内质评定中七个试样的汤色除 A

为红褐之外，其余试样的汤色都为褐红，差异较小；香气结果中为 B 较好，表现为陈香浓郁且持久，其余试样都为陈香较浓郁；滋味结果中为 B 和 C 最好，口感达到醇厚，A 的滋味较淡；叶底结果中，A 的叶底明显区别于其余试样，A 的叶底中明显存在泛青的现象，说明发酵程度不足，其余试样差异较小。

A、B 和 C 三个不同等级普洱熟茶中 B 的感官审评结果最优；A 等级嫩度最高，但感官审评结果并不是最优的，叶底中出现泛青现象，发酵程度明显低于其余试样，说明不一定嫩度最高，加工的普洱熟茶品质就最好。



图 1 感官审评

Fig.1 Sensory evaluation

表 2 感官审评结果

Table 2 Sensory evaluation results

序号	外形	汤色	香气	滋味	叶底
A	条索较紧结，身骨重实，色泽红褐泛灰，较洁净，略带老梗	红褐明亮	陈香较浓郁持久	醇平	柔软，色泽红褐泛青，较匀
B	条索较紧结，身骨较重实，色泽红褐，较匀整，较洁净，带老梗	褐红较明亮	陈香浓郁持久	醇厚	较柔软，红褐，较匀
C	条索尚紧结，身骨尚重实，色泽红褐略带花朵，尚洁净，多老梗	褐红	陈香较浓郁持久	醇厚	尚柔软，红褐，尚匀

2.2 代谢产物种类及主成分分析

三个试样经广泛靶向代谢组学技术鉴定，共检测到 1 073 种物质，已确定 1 048 种代谢物，包括 178 个黄酮及类黄酮、141 个生物碱、139 个萜类、86 个酚类

及其衍生物、67 个苯丙素和香豆素、55 个脂类、50 个醇类、44 个氨基酸及其衍生物、42 个酸类、36 个杂环化合物、32 个有机化合物、31 个核苷酸及其衍生物、28 个木脂素、24 个酮类、18 个醌类、14 个植物激素、9 个糖类、6 个维生素、3 个酯类和 45 个其他类，共

20 个类别。

主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 图中横坐标 PC[1]和纵坐标 PC[2]分别表示排名第一和第二的主成分的得分, 每个散点代表一个样本, 散点的颜色和形状表示不同的分组。样本基本处于 95%置信区间内。图 2 PCA 得分图中, A、B 和 C 三个不同等级存在明显区分。A 明显区别于其余试样, 本实验设计的不同等级试样之间均得到清晰的区分, 存在具有显著性差异的相关化合物, 说明它们可作为鉴别不同等级普洱熟茶之间的代谢标志物。

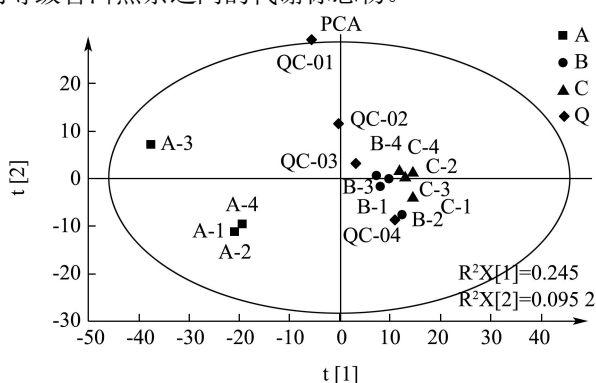


图 2 PCA 得分图

Fig.2 PCA score chart

2.3 不同等级普洱熟茶代谢物对比分析

为了进一步区分不同组别差异, 确定不同等级普洱熟茶的差异成分, 采用有监督的 OPLS-DA 进行数据分析, 图 3 分别显示了 OPLS-DA 方法对原料分级和精制分级后得到不同等级普洱熟茶的分析结果。图中横坐标 t[1]P 表示第一主成分的预测主成分得分, 展示样本组间差异, 纵坐标 t[1]O 表示正交主成分得分, 展示样本组内差异, 每个散点代表一个样本, 散点形状和颜色表示不同的实验分组。从 OPLS-DA 得分图的结果可以看出, 两组样本两两之间区分非常显著, 且样本全部处于 95%置信区间 (Hotelling's T-squared ellipse) 内, 说明不同等级普洱熟茶组分间的代谢产物都产生较大的差异。

置换检验通过随机改变分类变量 Y 的排列顺序, 多次 (次数 $n=200$) 建立 OPLS-DA 模型以获取随机模型的 R^2 和 Q^2 值。图 4 中横坐标表示置换检验的置换保留度 (与原模型 Y 变量顺序一致的比例, 置换保留度等于 1 处的点即为原模型的 R^2Y 和 Q^2 值), 纵坐标表示 R^2Y 和 Q^2 取值, 绿色圆点表示置换检验得到的 R^2Y 值, 蓝色方点表示置换检验得到的 Q^2 值, 两条虚线分别表示 R^2Y 和 Q^2 的回归线^[18]。原模型 R^2Y 非常接近 1, 说明建立的模型符合样本数据的真实情况; 原模型 Q^2 比较接近 1, 说明如果有新样本加入模型, 会得到比较

近似的分布情况, 总的来说原模型可以很好地解释两组样本之间的差异。置换检验随机模型的 Q^2 值均小于原模型的 Q^2 值; Q^2 的回归线与纵轴的截距小于零; 同时随着置换保留度逐渐降低, 置换的 Y 变量比例增大, 随机模型的 Q^2 逐渐下降。由此说明本试验模型具有良好的稳健性, 不存在过拟合现象。

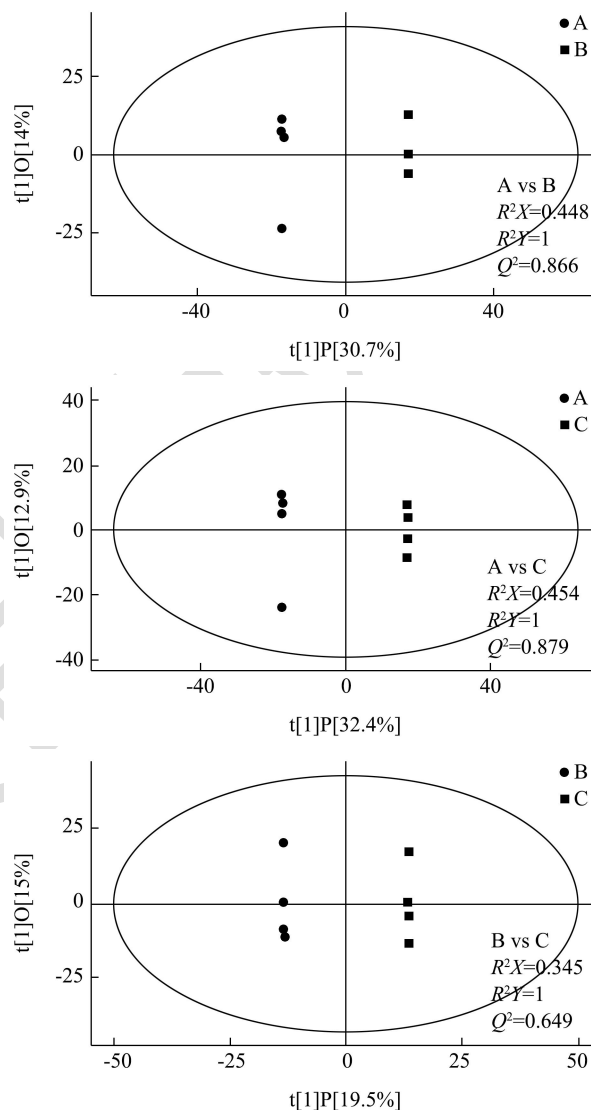
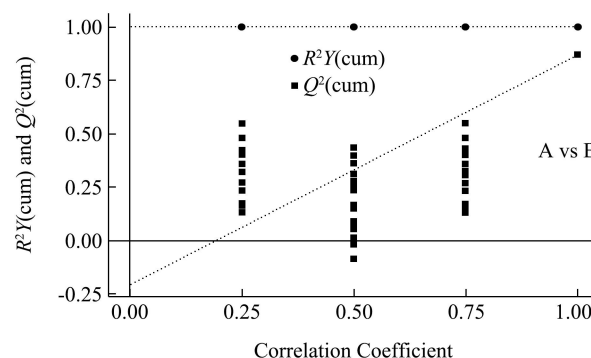


图 3 不同等级普洱熟茶对比的 OPLS-DA 得分散点图

Fig.3 OPLS-DA score scatter diagram of comparison of different grades of Pu'erh ripe tea



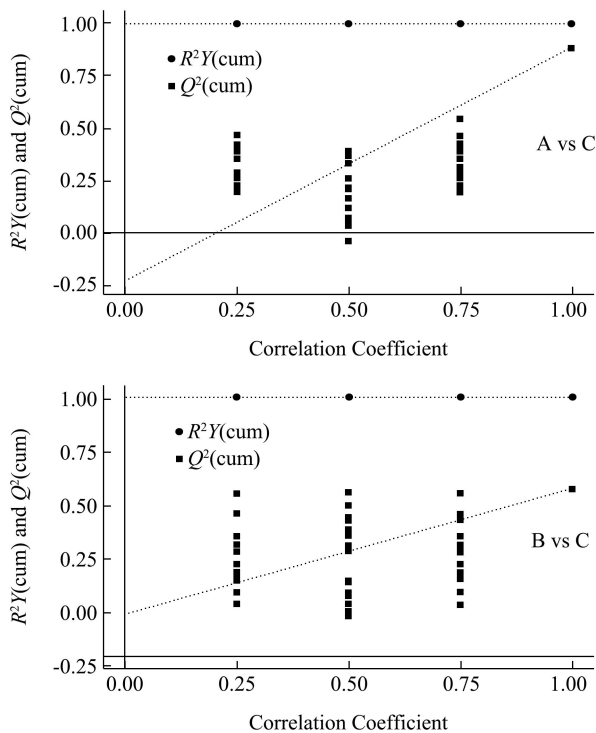


图4 不同等级普洱熟茶对比的模型置换检验图

Fig.4 Model replacement test chart for comparison of different grades of Pu'erh ripe tea

2.4 不同等级普洱熟茶差异代谢物的筛选

VIP 值表示对应代谢物的组间差异在模型中各组样本分类判别中的影响强度，一般认为 $VIP \geq 1$ 的代谢物则为差异显著。本研究以 $VIP \geq 1$ 且 $p < 0.05$ 为卡值标准，用 OPLS-DA 模型（图 4）来比较不同等级普洱熟茶间的代谢差异。A、B 和 C 三个不同等级普洱熟茶差异代谢物中，A 组相对于 B 组有 269 个差异代谢物，237 个成分显著上调，32 个成分显著下调；A 组相对于 C 组有 296 个差异代谢物，255 个成分显著上调，41 个成分显著下调；B 组相对于 C 组有 127 个差异代谢物，83 个成分显著上调，44 个成分显著下调。

根据上述得到的差异代谢物，将筛选差异代谢物的结果以火山图（Volcano Plot）的形式进行可视化，来寻找潜在的差异物质^[9]。如图 5 所示，火山图中每个点代表一个代谢物，横坐标代表该组对比各物质的倍数变化（取以 2 为底的对数），纵坐标表示学生 *t* 检验的 P-value（取以 10 为底对数的负数），散点大小代表 OPLS-DA 模型的 VIP 值，散点越大 VIP 值越大。散点颜色代表最终的筛选结果，显著上调的代谢物以红色表示，显著下调的代谢物以蓝色表示，非显著差异的代谢物为灰色。可以直观的看出不同组间差异代谢物的分布情况，每组对比样本都有明确的高表达或者低表达的区域，都能够很好的区别，不同等级普洱

熟茶在代谢产物的表达上有呈现出明显差异性。

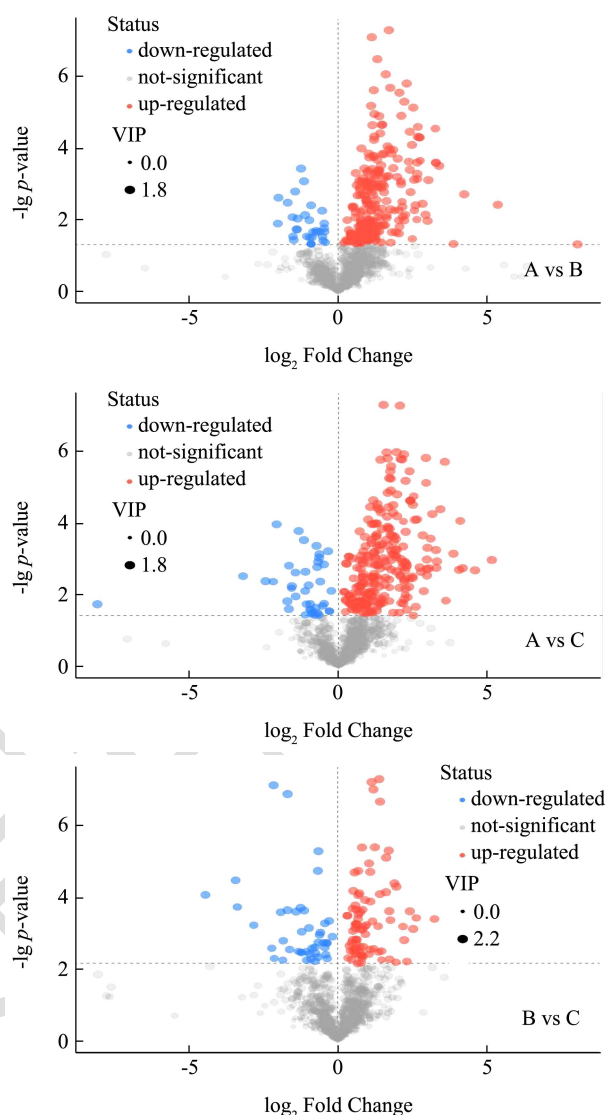


图5 A vs B、A vs C、B vs C 差异代谢物

Fig.5 The difference metabolites of A vs B、A vs C、B vs C

2.5 不同等级普洱熟茶主要差异代谢物分析

为了进一步找出不同等级普洱熟茶中两组间对结果分析起贡献作用的变量，采用 $VIP \geq 1$ 、 $p < 0.05$ 且 $Fold\ Change \geq 2$ 或 ≤ 0.5 作为最终差异物筛选的条件，结果筛选鉴定出 A、B 和 C 三个不同等级中差异代谢物共 238 个，具体结果见表附录；其中 A 组相对于 B 组有 163 个差异代谢物，150 个成分显著上调，13 个成分显著下调；A 组相对于 C 组有 185 个差异代谢物，167 个成分显著上调，18 个成分显著下调；B 组相对于 C 组有 37 个差异代谢物，23 个成分显著上调，14 个成分显著下调。上调代表相对定量增加，下调代表相对定量降低。

238 个差异代谢物中有 12 个在三组对比中均为差异代谢物，即为标志性代谢物，包括 1 个核苷酸及其

衍生物、1个嘌呤核苷类、3个萜类、2个酚类、4个黄酮及类黄酮和1个糖类。表3为标志性差异代谢物的详细信息，红色代表差异为2倍以上，蓝色代表差异在0.5以下。对这些标志性差异代谢物的相对定量作出柱形图（图6）。结果可得：A、B和C三个不同等级普洱熟茶随着等级的降低，鸟苷3',5'-环一磷酸、去氧苦地胆苦素、黄独素B、黄独素D、表没食子儿茶素没食子酸酯、没食子酸甲酯、3-没食子酰基奎宁酸、儿茶素、(-)-没食子酸儿茶素酯、表儿茶素没食子酸酯等这些标志性差异代谢物的相对定量是显著减少的，而D-麦芽糖的相对定量却是随着等级的降低而显著增加。儿茶素类物质有很强的抗氧化活性，是茶叶中重要的活性成分之一，根据有关文献，儿茶素组含量在武夷肉桂茶^[20]、湖南黑毛茶^[21]等不同茶类中都与等级呈正相关。本实验的12个标志性代谢物中，儿茶素类物质占比较多，表没食子儿茶素没食子酸酯、儿茶

素、(-)-没食子酸儿茶素酯和表儿茶素没食子酸酯这几个儿茶素类物质的相对定量都是极显著的A高于B高于C，说明普洱熟茶儿茶素组分的相对定量与等级也呈正相关，等级越高儿茶素组分相对定量越高。

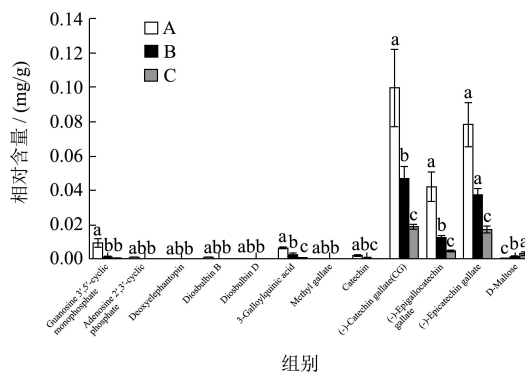


图6 标志性差异代谢物

Fig.6 Marker differential metabolites

注：不同小写字母表示具有显著性差异， $p < 0.05$ 。

表3 标志性差异代谢物

Table 3 Marker differential metabolites

编号	英文名称	中文名称	化学式	类别	差异代谢物		
					Fold Change ≥ 2 且 ≤ 0.5		
					A vs B	A vs C	B vs C
1	Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate	鸟苷 3',5'-环一磷酸	$C_{10}H_{12}N_5O_7P$	核苷酸及其衍生物	7.15	18.42	2.58
2	Adenosine 2',3'-cyclic phosphate	-	$C_{10}H_{12}N_5O_6P$	嘌呤核苷类	6.09	24.65	4.05
3	Deoxyelephantopin	去氧苦地胆苦素	$C_{19}H_{20}O_6$	倍半萜	5.59	14.85	2.66
4	Diosbulbin B	黄独素 B	$C_{19}H_{20}O_6$	二萜	4.46	16.98	3.81
5	Diosbulbin D	黄独素 D	$C_{19}H_{20}O_6$	二萜	3.50	7.41	2.12
6	3-Galloylquinic acid	3-没食子酰基奎宁酸	$C_{14}H_{16}O_{10}$	酚类	2.31	6.01	2.60
7	Methyl gallate	没食子酸甲酯	$C_8H_8O_5$	酚类	3.08	6.73	2.18
8	Catechin	儿茶素	$C_{15}H_{14}O_6$	黄酮	2.18	4.77	2.19
9	(-)-Catechin gallate(CG)	(-)-没食子酸儿茶素酯	$C_{22}H_{18}O_{10}$	黄酮	2.13	5.21	2.45
10	(-)-Epigallocatechin gallate	表没食子儿茶素没食子酸酯	$C_{22}H_{18}O_{11}$	类黄酮	3.40	8.34	2.45
11	(-)-Epicatechin gallate	表儿茶素没食子酸酯	$C_{22}H_{18}O_{10}$	类黄酮	2.08	4.50	2.16
12	D-Maltose	D-麦芽糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	糖类	0.39	0.18	0.46

注：表中“-”代表未查到中文名称。

茶叶品质研究中，氨基酸、生物碱、黄酮及类黄酮和儿茶素及其衍生物这几类物质对茶叶品质的影响至关重要^[22]，所以本次研究也重点关注到这几类物质在不同等级普洱熟茶中变化差异。238个差异代谢物中共筛选出18个氨基酸及其衍生物、18个生物碱、19个黄酮及类黄酮和12个儿茶素及其衍生物。表4为重点类物质信息表，由表可知：18个氨基酸及其衍生物的相对总量为A(0.053 mg/g) > B(0.007 mg/g) > C(0.006 mg/g)；18个生物碱的相对总量为A(0.072 mg/g) > B(0.042 mg/g) > C(0.028 mg/g)；19个黄酮及类

黄酮的相对总量为A(0.516 mg/g) > C(0.221 mg/g) > B(0.245 mg/g)；12个儿茶素及其衍生物的相对总量为A(1.808 mg/g) > B(0.668 mg/g) > C(0.482 mg/g)。这几类物质的相对总量变化趋势都随等级降低而减少，除了儿茶素及其衍生物类物质中A、B和C之间具有显著性差异($p < 0.05$)，其余类物质都为A与B和C之间具有显著性差异($p < 0.05$)，B和C之间无显著性差异($p > 0.05$)。

采用绘制热图的方式对这些重点物质的单一相对定量进行代谢产物层次聚类分析，图7中不同位置的

色块代表代谢物的相对表达量, 高低表达组分交互在一起, 红色表示代谢物相对定量上调, 蓝色表示代谢物相对定量下调; Group 1 代表氨基酸、Group 2 代表生物碱、Group 3 代表黄酮及类黄酮和 Group 4 代表儿茶素及其衍生物。热图分析可得: A 中氨基酸、生物碱、黄酮及类黄酮和儿茶素及其衍生物这几类物质大部分都呈高表达, 说明 A 在三个等级中这几类重点物质的相对定量较高, 在 B 中呈较低表达, 在 C 中呈低表达; B 中有生物碱 Lumichrome (光色素) 和黄酮及类黄酮(-)-Maackiain (高丽槐素) 呈高表达, 其中 Lumichrome (光色素) 在 A 中呈较低表达, C 中呈低表达, (-)-Maackiain (高丽槐素) 在 C 中呈高低表达, A 中呈低表达; C 中氨基酸 Levodopa (左旋多巴)、生物碱 Tombozine (妥包嗪) 和黄酮及类黄酮 Isorhamnetin (异鼠李素) 呈高表达, 这三个物质在 B 中都呈较低表达, A 中呈低表达。

综上所述: 这几类物质相对总量的变化趋势都随等级降低而减少, 在所有物质的相对定量分析中除了氨基酸 Levodopa (左旋多巴)、生物碱 Tombozine (妥包嗪) 和黄酮及类黄酮 Isorhamnetin (异鼠李素) 这三

个物质是随着等级的降低而显著增加, 其余大部分物质是随着等级的降低而显著减少。氨基酸类物质在发酵过程中, 微生物的大量繁殖需要消耗大量的氨基酸作为氮源^[23], 陈保等^[24]曾在不同等级原料加工普洱熟茶的化学成分变化研究中, 得出三级晒青茶和叶片粗老的老黄片在游离氨基酸总量的变化上随等级的降低呈下降趋势的结论; 薛晨^[25]得出不同等级普洱茶中各氨基酸组分随级别的降低总体呈下降趋势, 本实验中氨基酸的相对总量变化趋势也随等级降低而减少, 以上结论与本实验结果一致, 意味着不同等级晒青茶的发酵影响着氨基酸总量的消耗。吕海鹏等^[26]研究得出高等级普洱茶中的黄酮总量 (1.39%) 明显低于中、低等级普洱茶 (分别为 1.54% 和 1.58%), 中、低级别普洱茶差异不明显 ($p>0.05$); 而赵熙^[27]等在研究不同等级茯砖茶化学成分变化中, 却得到一级料茯砖茶 (2.72%) 的黄酮类物质含量高于三级料茯砖茶 (2.15%), 本实验结果中黄酮及类黄酮的相对总量变化趋势为 A (0.516 mg/g) > C (0.245 mg/g) > B (0.221 mg/g), A 明显高于 B 和 C, 但 B 和 C 之间差异较小, 与以上结论存在异同点。

表 4 重点类物质信息

Table 4 Information of key substances

类别	英文名称	中文名称	相对总量/(mg/g) ($p<0.05$)		
			A	B	C
氨基酸 及其衍生物	L-Theanine	L-茶氨酸			
	L-Phenylalanine	L-苯丙氨酸			
	Isoleucine	异亮氨酸			
	L-Isoleucine	L-异亮氨酸			
	L-Norleucine	L-正亮氨酸			
	L-Arginine	L-精氨酸			
	3-Methy-L-histidine	3-甲基组氨酸			
	L-Pipecolic acid	L-哌啶酸			
	L-Homoglutamic acid	L-高谷氨酸	0.053±0.006 ^a	0.007±0.001 ^b	0.006±0.001 ^b
	5-Aminovaleric acid	5-氨基戊酸			
	Pyrrole-2-carboxylic acid	吡咯-2-羧酸			
	L-Serine	L-丝氨酸			
	L-Homoserine	同型丝氨酸			
	L-Threonine	L-苏氨酸			
	Levodopa	左旋多巴			
	DL-Tyrosine	DL-酪氨酸			
Tryptophan	色氨酸				
Glycine	甘氨酸				
生物碱	Convolvine	旋花碱			
	3-Acetoxytropine	3-乙酰莨菪碱			
	Hordenine	大麦芽碱	0.072±0.014 ^a	0.042±0.008 ^b	0.028±0.002 ^b
	Vasicine	骆驼蓬碱			
	Acarbose	阿卡波糖			

续表 4

类别	英文名称	中文名称	相对总量/(mg/g) ($p < 0.05$)			
			A	B	C	
生物碱	Retronecine	倒千里光裂碱				
	Narciclasine	水仙环素				
	3-Methylindole	3-甲基吲哚				
	Chimonanthine	山腊梅碱				
	Piperidine	哌啶				
	Colchicine	秋水仙碱				
	Tabernanthine	马山茶碱	0.072±0.014 ^a	0.042±0.008 ^b	0.028±0.002 ^b	
	Pilocarpine	毛果芸香碱				
	Isatidine	菘蓝千里光碱				
	Crotonoside	巴豆苷				
	Trigonelline	葫芦巴碱				
	Lumichrome	光色素				
	Tombozine	妥包嗪				
	黄酮及类黄酮	Isoquercitrin	异槲皮苷			
		Cyanin	花青素苷			
Theaflavin		茶黄素				
Cimifugin		升麻素				
Dihydrorobinetin		刺槐亭				
Glucoliquiritin		葡萄糖基甘草苷				
Flavone		黄酮				
2,3-Dehydrosilybin A		2,3-脱氢水飞蓟宾 A				
Buddlenoid A		望春花黄酮醇苷 1				
Myricitrin		杨梅苷	0.516±0.077 ^a	0.221±0.030 ^b	0.245±0.037 ^b	
Puerarin		葛根素				
Procyanidin B2		原花青素 B2				
Irisfloreantin		次野鸢尾黄素				
Rhoifolin		野漆树苷				
Cynaroside		木犀草苷				
Troxeuti	曲克芦丁					
儿茶素及其衍生物	Kaempferol-3-O-rutinoside	山奈酚-3-O-芸香糖苷				
	(-)-Maackiain	高丽槐素				
	Isorhamnetin	异鼠李素				
	3,4-Dihydroxybenzaldehyde;	原儿茶醛				
	(-)-Epigallocatechin gallate	表没食子儿茶素没食子酸酯				
	(-)-Epigallocatechin	表没食子儿茶素				
	(-)-Epiafzelechin	(-)-表阿夫儿茶精				
	Epicatechin;(+)Epicatechin	表儿茶素				
	L-Epicatechin	表儿茶素				
	Gallocatechin	(+) -没食子儿茶素	1.808±0.177 ^a	0.668±0.065 ^b	0.482±0.042 ^c	
	Catechin	儿茶素				
	(-)-Catechin gallate(CG)	(-)-没食子酸儿茶素酯				
	(-)-Epicatechin gallate	表儿茶素没食子酸酯				
	(-)-Gallocatechin gallate	没食子儿茶素没食子酸酯				
	Cianidano	儿茶素				

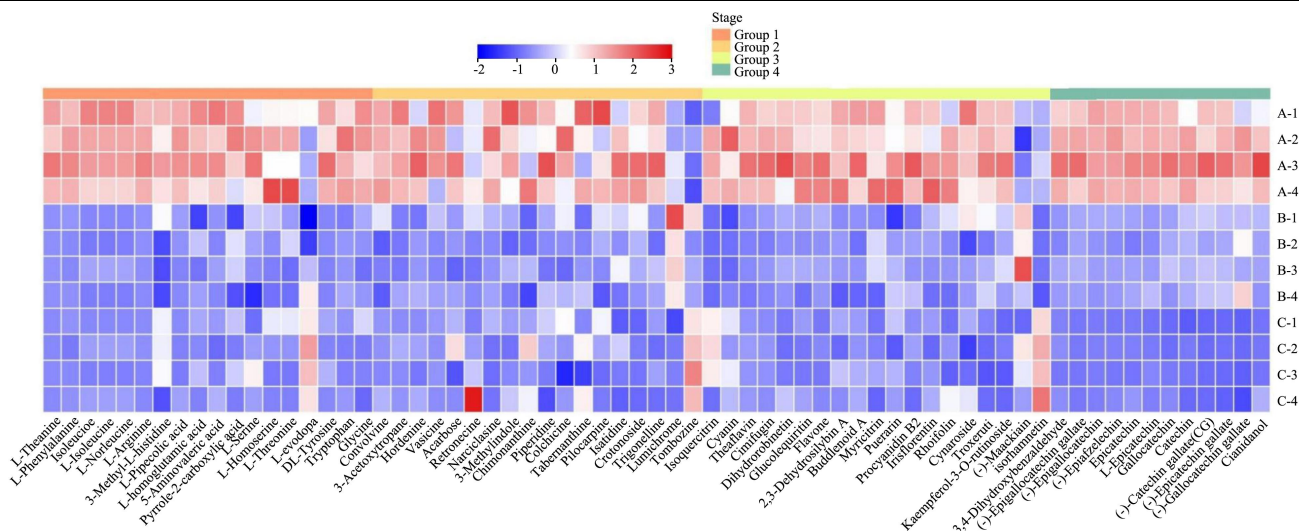


图7 不同等级普洱熟茶重点物质热图

Fig.7 Heatmap of key substances of different grades of Pu'erh ripe tea

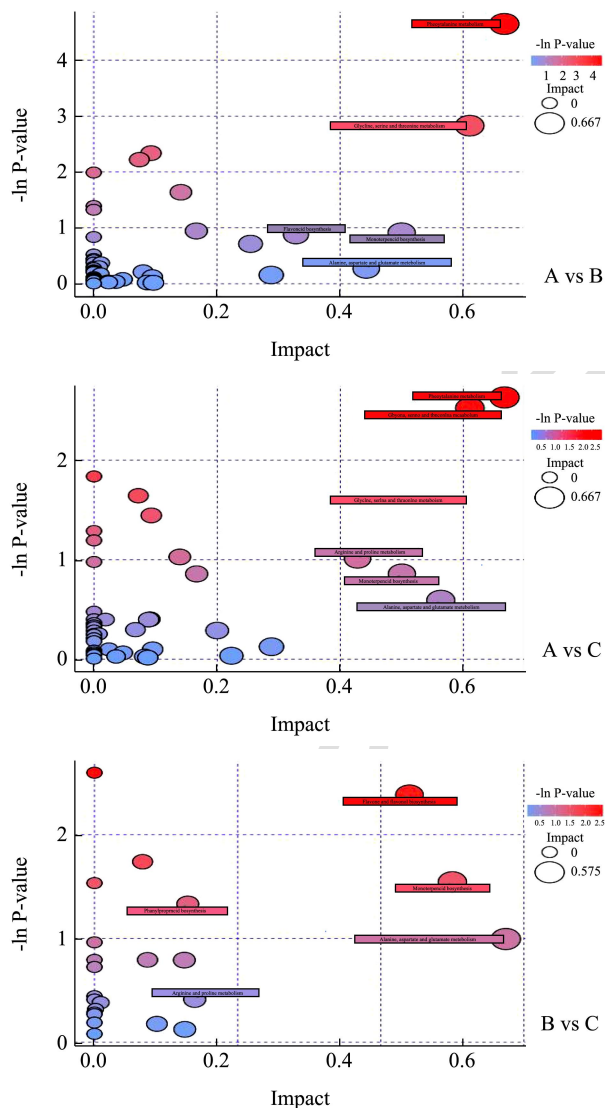


图8 差异代谢物KEGG富集通路气泡图

Fig.8 Bubble diagram of differential metabolite KEGG enrichment pathway

2.6 差异代谢物相关通路分析

通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库^[28]对所有差异显著的代谢物质进行通路富集分析, 结果如图8显示, 气泡图中每一个气泡代表一个代谢通路, 气泡所在横坐标和气泡大小表示该通路在拓扑分析中的影响因子大小, 气泡越大影响因子越大; 气泡所在纵坐标和气泡颜色表示富集分析的P值(取负自然对数, 即 $-\ln P\text{-value}$), 颜色越深P值越小, 富集程度越显著。代谢产物主要分布在15条代谢途径中, 基于富集分析得到的P小于0.05对关键代谢途径进行筛选, 得到1条差异代谢物数量富集相关性较强的通路, 该差异代谢物富集通路为苯丙氨酸代谢, 包括L-苯丙氨酸、2-苯乙胺、2-苯乙酰胺和4-羟基肉桂酸等4种代谢物质。

3 结论

A、B和C三个不同等级普洱熟茶的感官审评结果可得B的品质在三个等级中最优; A的原料等级最高, 导致发酵程度较低, 品质受影响。代谢物差异分析可得: 三个试样经广泛靶向代谢组学技术鉴定, 共检测到1073种物质, 已确定1048种代谢物, 采用 $VIP \geq 1$ 、 $p < 0.05$ 且 $Fold\ Change \geq 2$ 或 ≤ 0.5 作为最终差异物筛选的条件, 结果筛选鉴定出A相对于B、A相对于C和B相对于C三个组间差异代谢物共238个; 共含有12个标志性代谢物, 其中鸟苷3',5'-环一磷酸、去氧苦地胆苦素、黄独素B、黄独素D、表没食子儿茶素没食子酸酯、没食子酸甲酯、3-没食子酰基奎宁酸、儿茶素、(-)-没食子酸儿茶素酯、表儿茶素没食子酸酯等这些标志性差异代谢物的相对定量与等级之间呈正相关, 随

等级的降低是显著减少的,而D-麦芽糖的相对定量却是与等级之间呈负相关,随等级的降低而显著增加;238个差异代谢物中共筛选出18个氨基酸及其衍生物、18个生物碱、19个黄酮及类黄酮和12个儿茶素及其衍生物,这几类物质相对总量的变化趋势都随等级降低而减少;在所有物质的相对定量分析中除了氨基酸Levodopa(左旋多巴)、生物碱Tombozine(妥包嗪)和黄酮及类黄酮Isorhamnetin(异鼠李素)这三个物质是随着等级的降低而显著增加,其余大部分物质是随着等级的降低而显著减少;代谢产物主要分布在15条代谢途径中,其中苯丙氨酸代谢是相关性较强的通路,包括L-苯丙氨酸、2-苯乙胺、2-苯乙酰胺和4-羟基肉桂酸等4种代谢物质。总之,同种原料的不同等级普洱熟茶之间代谢物在组成上有所不同,并且随着茶叶等级的降低,各类代谢物所占的相对定量也存在着差异,说明机采机制晒青茶的不同分级处理对后续普洱茶代谢物形成具有重要影响。

参考文献

- [1] GB/T 22111-2008,地理标志产品普洱茶标准[S]
- [2] Jiaan X, Xiujian X, Bo Y, et al. Green tea-derived theabrownin induces cellular senescence and apoptosis of hepatocellular carcinoma through p53 signaling activation and bypassed JNK signaling suppression [J]. *Cancer Cell International*, 2022, 22(1): 39
- [3] Chongye F, Xuanjun W, Yewei H, et al. Caffeine is responsible for the bloodglucose-lowering effects of green tea and Puer tea extracts in BALB/c mice [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015, 13(8): 595-601
- [4] Huan G, Mengxi F, Dingtao W, et al. Structural characteristics of crude polysaccharides from 12 selected Chinese teas, and their antioxidant and anti-diabetic activities [J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(10)
- [5] 王荣扬.柔性片状物料气固耦合数值计算及机采茶鲜叶分选装置试验研究[D].杭州:浙江理工大学,2020
- [6] 刘德和,肖星,殷丽琼,等.云南茶园机械采摘适应性研究[J]. *山东农业科学*,2015,47(4):49-51
- [7] 朱向阳.茶叶机械化采摘技术的分析与探讨[J]. *农业开发与装备*,2015,2:87
- [8] 杨娟,徐泽,袁林颖.机采茶鲜叶分级技术研究进展[J]. *福建茶叶*,2014,36(2):2-4
- [9] 陆德彪,潘建义,马军辉,等.优质绿茶机采配套技术与集成-以丽水香茶为例[J]. *中国茶叶加工*,2015,2:36-40
- [10] 唐小林,李文萃,范起业.机采茶鲜叶分类分级技术及相关设备研究进展[J]. *中国茶叶加工*,2015,2:5-8
- [11] 高士伟,叶飞,龚自明,等.加工分级对机采条形绿茶品质的影响[J]. *浙江农业科学*,2017,58(2):280-283
- [12] 叶阳.工夫红茶机采鲜叶智能化分级及自动化加工设备研究与示范[Z].2019
- [13] 叶飞,高士伟,龚自明,等.机采与手采茶鲜叶加工恩施玉露的比较研究[J]. *浙江农业科学*,2016,57(7):1131-1133
- [14] Huajie W, Jinjie H, Qinyan Y, et al. Widely targeted metabolomic analysis reveals dynamic changes in non-volatile and volatile metabolites during green tea processing [J]. *Food Chemistry*, 2021, 363
- [15] Flores S A, Manfron S E, Lanzi S G, et al. Comparative metabolomic study of high-flux hemodialysis and high volume online hemodiafiltration in the removal of uremic toxins using H NMR spectroscopy [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 208: 114460
- [16] 汪生,陈冠军,臧丹丹,等.基于超高效液相色谱-高分辨质谱联用的非靶向代谢组学分析普洱生茶和普洱熟茶醇溶性物质组成差异[J]. *安徽农业科学*,2020,48(23):226-230
- [17] GB/T 23776-2018,茶叶感官审评方法[S]
- [18] 刘晗璐,张九凯,韩建勋,等.基于UPLC-QTOF-MS代谢组学技术的NFC和FC橙汁差异成分比较[J]. *食品科学*,2021,42(6):229-237
- [19] 张磊,曾仲大,叶国注,等.基于气相色谱-质谱联用与液相色谱-质谱联用的非靶向代谢组学用于3类茶叶中化学成分分析[J]. *色谱*,2014,32(8):804-816
- [20] 徐邢燕,陈思,俞晓敏,等.不同烘焙程度与等级武夷肉桂茶品质差异分析[J]. *食品科学*,2020,41(13):22-28
- [21] 赵熙,黄浩,秦国杰,等.湖南不同等级黑毛茶品质分析[J]. *茶叶通讯*,2018,45(3):27-31
- [22] 陈红霞.普洱茶发酵过程的代谢组学研究[D].北京:北京化工大学,2013
- [23] 傅冬和,刘仲华,黄建安,等.茯砖茶加工过程中主要化学成分的变化[J]. *食品科学*,2008,2:64-67
- [24] 陈保,徐明发,姜东华,等.不同普洱茶原料渥堆发酵过程中香气成分的变化研究[J]. *食品安全质量检测学报*,2018,9(2): 284-293
- [25] 薛晨.原料级别和贮藏时间对普洱茶品质及其生物活性影响的研究[D].合肥:安徽农业大学,2013
- [26] 吕海鹏,林智,张悦,等.不同等级普洱茶的化学成分及抗氧化活性比较[J]. *茶叶科学*,2013,33(4):386-395
- [27] 赵熙,黄浩,银霞,等.不同原料等级茯砖茶的化学成分及抗氧化活性比较[J]. *中国茶叶加工*,2016,5:39-44
- [28] Minoru K, Yoko S, Masayuki K, et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, D1: D457-D462