

信阳红茶发酵过程中非挥发性和挥发性代谢物的动态变化

马敬宜, 姚衡斌, 周琼琼, 赵仁亮*

(河南农业大学园艺学院, 河南郑州 450002)

摘要: 为全面了解信阳红茶发酵过程中代谢物的动态变化, 该研究以信阳群体种一芽一叶为原料制作红茶, 采用代谢组学液质联用技术(LC-MS/MS)和顶空固相微萃取-气质联用法(HS-SPME/GC-MS)对信阳红茶发酵过程中的代谢物进行了研究。结果显示: 在信阳红茶发酵过程, 共鉴定出143种非挥发性代谢物和107种挥发性代谢物, 并鉴定出23个关键差异代谢物, 其中儿茶素类、氨基酸、黄酮类、酚酸、酯类、醛类、醇类等的快速转化是红茶滋味和香气形成的主要因素。发酵过程降低了信阳红茶的苦涩味, 改善了口感和滋味, 对信阳红茶香气的形成也有着积极作用, 同时也为茶叶的保健功效奠定了基础。随着发酵过程的进行, 茶叶的香气逐渐以花香、果香为主导, 其中芳樟醇氧化物、反式-橙花叔醇、 α -松油醇、 β -法尼烯、 α -柠檬烯等一些化合物含量的增加均有利于信阳红茶花果香气的形成。该研究为信阳红茶发酵过程中代谢物的变化提供重要参考。

关键词: 信阳红茶; 发酵; 非靶向代谢组学; 顶空固相微萃取; 滋味; 香气

文章编号: 1673-9078(2023)05-242-251

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0512

Dynamic Changes of Nonvolatile and Volatile Metabolites during Xinyang Black Tea Fermentation

MA Jingyi, YAO Hengbin, ZHOU Qiongqiong, ZHAO Renliang*

(College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The dynamic changes of metabolites during the fermentation process of Xinyang black tea prepared with one bud and one leaf of the Xinyang variety using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS). A total of 143 nonvolatile and 107 volatile metabolites were detected during the fermentation process of Xinyang black tea, and 23 key differential metabolites were identified. Among these, the rapid conversion of catechins, amino acids, flavonoids, phenolic acids, esters, aldehydes, and alcohols was the major factor responsible for the formation of the characteristic black tea taste and aroma. The fermentation process reduced the bitterness and astringency of Xinyang black tea, improved its taste, and led to aroma formation, thus laying the foundation for the health benefits of the tea. As the fermentation process progressed, the aroma of the tea was gradually dominated by floral and fruity notes, and increases in the levels of linalool oxide, trans-nerolidol, α -terpineol, β -farnesene, and α -limonene, among other compounds, were conducive to the formation of the floral and fruity aroma of Xinyang black tea. These findings offer an important reference for metabolite changes in Xinyang black tea during fermentation.

Key words: Xinyang black tea; the fermentation; untargeted metabolomics; headspace solid phase microextraction; taste; aroma

引文格式:

马敬宜,姚衡斌,周琼琼,等.信阳红茶发酵过程中非挥发性和挥发性代谢物的动态变化[J].现代食品科技,2023,39(5):242-251.

MA Jingyi, YAO Hengbin, ZHOU Qiongqiong, et al. Dynamic changes of nonvolatile and volatile metabolites during Xinyang black tea fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 242-251.

收稿日期: 2022-04-25

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(21A210020); 河南省科技攻关项目(222102110365)

作者简介: 马敬宜(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 茶叶加工及品质化学, E-mail: 1483994631@qq.com

通讯作者: 赵仁亮(1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 茶叶加工及功能成分化学, E-mail: zrenliang@henau.edu.cn

红茶是我国六大茶类之一,是一种全发酵茶,经过萎凋、揉捻、发酵、干燥一系列的工艺制作而成,是我国生产和出口的主要茶类之一,占全球茶叶总销量的 80%左右^[1]。红茶具有调节肠道菌群^[2],抗炎、抗癌、抗氧化^[3],降血糖^[4]等功效;因其独特的香气和滋味,红茶深受人们喜爱。挥发性物质有助于茶叶独特的风味和香气的形成,非挥发性物质有助于茶叶的滋味和保健功效的形成^[5]。而滋味和香气是红茶最重要的品质,红茶加工过程中代谢物的变化对其滋味以及香气产生重要的影响,红茶的滋味主要是由化学成分决定的,如儿茶素类物质、氨基酸类物质、黄酮类物质、酚酸类物质和生物碱等^[6],各成分的含量和比值决定了茶的滋味。茶叶在加工过程中可产生 600 多种香气物质,其中类胡萝卜素、酯类、氨基酸类和糖苷类物质是茶叶香气形成的重要前体^[7]。发酵是红茶品质形成的关键工艺,有助于红茶汤色、滋味和香气的形成,在发酵过程中多酚类化合物在多酚氧化酶的作用下氧化形成茶黄素、茶红素、聚酯型儿茶素等^[8]。对红茶发酵的研究主要集中在发酵参数对红茶品质的影响,如发酵时间、发酵湿度、发酵温度等^[9]。

过去对信阳红茶品质的研究,主要是采用传统的化学分析法,具有较大的局限性。而非靶向代谢组学具有高通量、高灵敏度的特点,可以同时确定许多物质的组分并全面分析代谢物的变化,广泛应用于植物生理学、生物化学和风味化学^[10],目前非靶向代谢组学在茶叶领域中应用广泛。Zhang 等^[11]利用非靶向代谢组学研究表明黄酮类化合物可以鉴别祁门红茶的等级。Zhang 等^[12]利用非靶向代谢组学对不同品种加工的乌龙茶进行研究,结果表明摇青使乌龙茶种代谢物的水平发生了重大变化,并用化学计量学分析得到紫牡丹、水仙、黄玫瑰三个品种有 18 个标记化合物,包括 ECG、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸等。Wang 等^[13]利用非靶向代谢组学探讨绿茶加工过程中非挥发性代谢物的变化,筛选出 153 个差异非挥发性代谢物,研究也表明杀青对非挥发性代谢物的影响很大。顶空固相微萃取-气质联用法(HS-SPME/GC-MS)因其操作时间短、样品量少、重复性好等优点广泛应用于茶叶挥发性物质的鉴定^[14],陈林等^[15]以乌龙茶品种鲜叶制作白茶,利用 HS-SPME/GC-MS 对成品白茶进行香气成分检测,鉴定出 136 种香气成分,芳樟醇及其氧化物、香叶醇、橙花醇、水杨酸甲酯等香气成分可作为花香白茶的测评指标。宁静等^[16]采用 HS-SPME/GC-MS 技术对发花前后云南大叶种晒青茶进行挥发性物质鉴定,结果表明:发花后具有花木香的芳樟醇及其氧化物和具有药香的水杨酸甲酯等香气含量明显升高。

信阳茶区是传统的绿茶生产区,生产红茶的历史不长,对信阳红茶的品质形成机理了解还不清楚。本研究以信阳群体种为原料,按照信阳红茶加工工艺进行制作,采用 LC-MS/MS 和 HS-SPME/GC-MS 技术探究信阳红茶发酵过程中非挥发性代谢物和挥发性代谢物的变化规律,将为信阳红茶品质调控提供重要科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取信阳群体种为试验原料,以一芽一叶采摘标准为主,采摘自信阳市七龙山生态农业发展有限公司(信阳市浉河港)茶园。本文中的信阳红茶制作在信阳市七龙山生态农业发展有限公司加工车间完成,通过多次试验以感官评价品质最佳对应的技术参数为本论文的加工技术参数,如下:鲜叶依次经室内自然萎凋 20 h,揉捻(空压 10 min~轻压 10 min~中压 20 min~重压 10 min~轻压 5 min,下机解块,轻压 5 min~中压 20 min~重压 5 min~轻压 5 min),发酵(温度 30 °C,湿度 95%,4 h),毛火(115 °C 约 15 min,烘至水分 20%~25%),摊凉(45 min),足火(90 °C 约 30 min,烘至水分 5%~6%)。在红茶发酵过程中,每隔 1 h 取一次过程样,每个过程样取 3 次重复,所有样品分别用锡箔纸包裹,立即置于液氮桶中迅速固样后放在 -80 °C 超低温冰箱中保存。样品标记分别为:FJ1(发酵 1 h)、FJ2(发酵 2 h)、FJ3(发酵 3 h)、FJ4(发酵 4 h)。

1.2 试剂与仪器

试验试剂:实验用水为屈臣氏超纯水;LC-MS 级甲醇、乙腈购于 CNW Technologies 公司;乙酸铵购于 SIGMA-ALDRICH 公司;氨水购于 Fisher Chemical 公司;氯化钠购于国药公司;正己烷购于 Merck 公司。

试验仪器:Vanquish 超高液相,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Q Exactive HFX 高分辨质谱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Heraeus Fresco17 离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;BSA124S-CW 天平,德国 Sartorius 公司;JXFSTPRP-24 研磨仪,上海净信科技有限公司;PS-60AL 超声仪,深圳市雷德邦电子有限公司;8890-5977B (GC-MS),美国 Agilent 公司;DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm)(色谱柱),美国 Agilent 公司;MM400 球磨仪,德国 Retsch 公司;50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头,美国 Agilent 公司;固相微萃取装置,瑞士 CTC Analytics AG 公司等。

1.3 非挥发性代谢物分析

1.3.1 样品制备

样品液氮研磨后称取 50 mg, 加入甲醇:水=3:1 (V/V) 的提取液 1 000 μ L, 35 Hz 研磨处理 4 min, 而后冰水浴中超声 5 min, 重复步骤 2~3 次, 然后 -40 $^{\circ}$ C 下静置 1 h, 然后高速离心机离心 15 min, 转速为 12 000 r/min, 取上清液过 0.22 μ m 滤膜后进行代谢组学分析, 每个样品重复提取三次。

1.3.2 UHPLC-QE-MS 分析

色谱条件: 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m) 液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为水相, 含 5 mmol/L 乙酸铵和 5 mmol/L 乙酸; B 相为乙腈; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样体积 3 μ L; 流动相洗脱梯度: 0~0.7 min, 1% B 相, 0.7~9.5 min, 1%~99% B 相, 9.5~11.8 min, 99% B 相, 11.8~12 min, 99%~1% B 相, 12~14.8 min, 1% B 相。

质谱条件: 电喷雾离子化 (ESI); 扫描方式为正负离子模式, 毛细管电压 \pm 4.0 kV; 毛细管温度 350 $^{\circ}$ C; 分辨率: 7 500; 碰撞能量: 10~60 eV; 扫描范围 m/z 100~1 000; 雾化器压强 30 psi。

分析获得的原始数据经 Proteo Wizard 软件转成 mzXML 格式后, 使用自主编写的 R 程序包进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理, 然后与 Biotree DB (V2.1) 自建二级质谱数据库 (数据库由上海百趣生物医学科技有限公司提供) 匹配进行物质注释, 算法打分的 Cutoff 值设为 0.3。

1.4 挥发性代谢物分析

1.4.1 样品制备

将茶叶样品从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出, 样品进行液氮磨样, 涡旋混合均匀, 每个样品称取 1 g 于顶空瓶中, 分别加入饱和氯化钠溶液和 10 μ L (50 μ g/mL) 内标溶液, 然后使用 HS-SPME 进行样本萃取, 以供 GC-MS 分析。

1.4.2 HS-SPME 萃取条件

在 100 $^{\circ}$ C 恒温条件下, 震荡 5 min, 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS 萃取头插入样品顶空瓶, 顶空萃取 15 min, 于 250 $^{\circ}$ C 下解析 5 min, 然后进行 GC-MS 分离鉴定。采样前萃取头 250 $^{\circ}$ C 下老化 5 min。

1.4.3 香气组分检测分析

色谱条件: DB-5MS 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), 载气为高纯氮气 (纯度不小于 99.99%), 恒流流速 1.2 mL/min, 进样口温度 250 $^{\circ}$ C, 不分流进样。程序升温: 40 $^{\circ}$ C 保持 3.5 min, 以 10 $^{\circ}$ C/min 升至

100 $^{\circ}$ C, 再以 7 $^{\circ}$ C/min 升至 180 $^{\circ}$ C, 最后以 25 $^{\circ}$ C/min 升至 280 $^{\circ}$ C, 保持 7 min。质谱条件: 电子轰击离子源 (EI), 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, 四级杆温度 150 $^{\circ}$ C, 质谱接口温度 280 $^{\circ}$ C, 电子能量 70 eV, 扫描方式为选择离子检测模式 (SIM), 定性定量离子精准扫描。将检索得到的质谱图与 MWGCSIM 1.0 数据库对照, 结合保留时间对挥发性物质进行鉴定。

1.5 试验数据处理与分析

主成分分析采用 Simca-P14 软件 (Umetrics 公司, 瑞典), 热图分析采用 TBtools 软件, 单因素方差分析 (ANOVA) 采用 SPSS 26.0 统计分析软件, 采用 Origin 2018 绘制相关图表。

2 结果与分析

2.1 发酵过程中非挥发性代谢物的主成分分

析 (PCA)

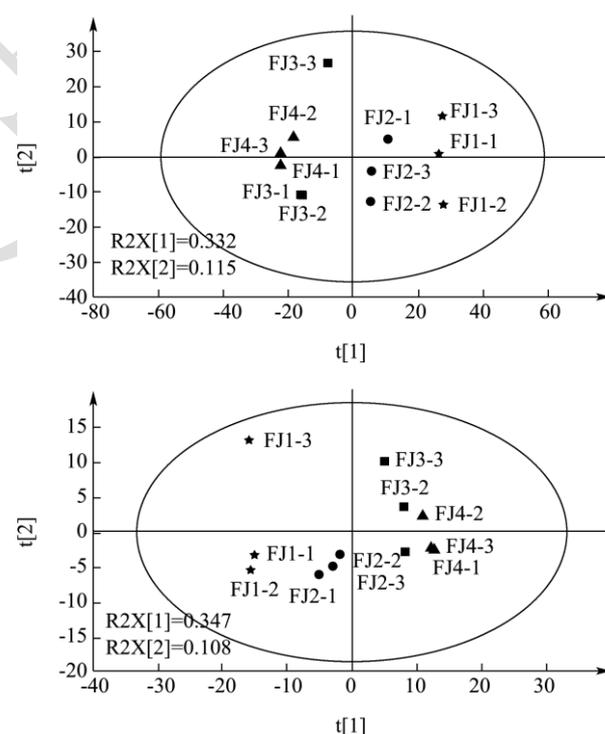


图 1 发酵过程中正、负离子模式下主成分分析得分图

Fig.1 Score of principal component analysis in positive and negative ion modes during fermentation

对正、负离子模式下采集的数据进行处理分别得到 1 212 种、353 种代谢物, 为了更好地了解信阳红茶在发酵过程中代谢物的变化, 对采集到的正、负离子模式下的代谢物进行主成分分析 (PCA) 图 1 可知: 正离子模式下 PC1 和 PC2 分别为 32.20%、11.50%

(R2X=43.70%), 负离子模式下 PC1 和 PC2 分别为 34.70%、10.80% (R2X=45.50%), 发酵过程样可以很好的分离, 此模型基本可靠且重复性良好, 同时也说明发酵过程样非挥发性代谢物存在显著差异。

2.2 发酵过程中非挥发性代谢物类别分析

根据相关文献^[6,12,13]和茶代谢组数据库共鉴定出 143 种代谢物, 包括 14 种儿茶素、13 种二聚儿茶素、23 种黄酮和黄酮醇苷、17 种酚酸及其衍生物、8 种脂肪酸、2 种萜类化合物、6 种糖苷类物质、16 种氨基酸、4 种生物碱、23 种核苷、3 种其他。如图 2 所示, 呈苦涩味的儿茶素、二聚儿茶素、黄酮类化合物在发酵过程中逐渐降低, 核苷类化合物在发酵过程中也呈降低趋势, 酚酸类化合物、脂肪酸类化合物、生物碱类化合物呈上升趋势, 氨基酸类化合物在发酵过程呈先升高后降低的变化趋势。

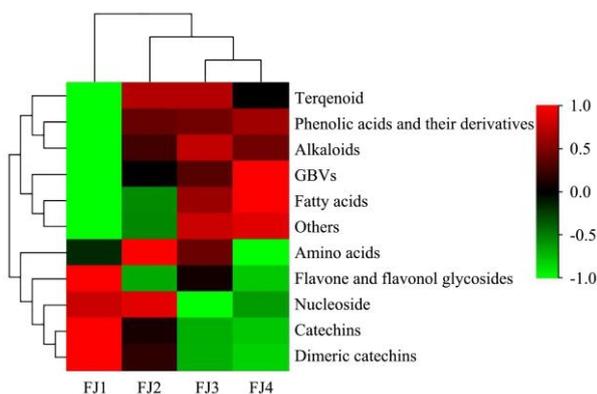


图 2 发酵过程中不同类别非挥发性代谢物的变化热图

Fig.2 Heat map of different types of non-volatile metabolites during fermentation

2.3 发酵过程中不同类别非挥发性代谢物变化分析

2.3.1 发酵过程中儿茶素及其聚合物动态变化

儿茶素约占茶多酚的 60%~80%, 可以合成二聚儿茶素, 儿茶素含量过高会使茶汤苦涩味增强^[17], 在本研究中, 绝大部分儿茶素在发酵过程中呈下降趋势, 儿茶素单体 Epigallocatechin Gallate (EGCG)、Epicatechin (EC)、Gallocatechin (GC)、Epigallocatechin (EGC)、Epicatechin-3-O-Gallate (ECG) 和甲基化儿茶素 4-甲基-EGC (Epicatechin 3-O-(4-Methylgallate)) 在发酵过程中含量均呈下降趋势。茶黄素是红茶中的特征代谢物, 是由儿茶素在发酵过程中酶促氧化得来的^[17]。鉴定到 3 种茶黄素单体分别为茶黄素 (Theaflavin, TF1)、茶黄素-3-没食子酸酯

(Theaflavin-3-Gallate, TF2A) 和茶黄素双没食子酸酯 (Theaflavin-3,3'-Digallate, TF3), 其中茶黄素在发酵过程中呈下降趋势, 茶黄素-3-没食子酸酯在发酵过程中呈上升趋势, 茶黄素双没食子酸酯呈先下降后上升的趋势与 Hua 等^[9]研究结果不一致。在 Hua 等研究中, 茶黄素含量升高, 茶黄素-3-没食子酸酯和茶黄素双没食子酸酯的含量发酵初期增加随后又减少, 这可能是由于传统发酵与动态滚筒发酵的发酵方式不同造成的。同时 Hua 等研究发现通过动态滚筒发酵机(转速: 6 r/min、温度 28 °C、湿度 90%、时间 2.5 h) 发酵茶黄素-3-没食子酸酯含量最高。

在检测到的原花青素物质中, 原花青素 C1 (Procyanidin C1)、原花青素 B2 (Procyanidin B2) 在发酵过程中呈下降趋势, 原花青素 B6 (Procyanidin B6) 在发酵过程先降低但是发酵 4 h 时含量上升。原飞燕草素 A1 (Prodelphinidin A1)、原飞燕草素 A2 (Prodelphinidin A2) 和 3'-没食子酰基原飞燕草素 B2 (3'-Galloylprodelphinidin B2) 在发酵过程中呈下降趋势。检测到的两种聚酯型儿茶素分别为聚酯型儿茶素 A (Theasinensin A) 和聚酯型儿茶素 C (Theasinensin C) 在发酵过程中均呈下降趋势。

2.3.2 发酵过程中氨基酸类物质动态变化

氨基酸赋予茶汤鲜爽味, 也是香气的关键前体, 在发酵过程中氨基酸类物质与邻醌及其他物质作用下形成芳香物质^[18], 鉴定出来的 16 种氨基酸在发酵过程中均发生明显变化, 一些游离氨基酸在发酵过程中呈下降趋势, 包括酪氨酸 (Tyr)、苏氨酸 (Thr)、丝氨酸 (Ser)、组氨酸 (His)、谷氨酸 (Glu), 脯氨酸 (Pro)、苯丙氨酸 (Phe) 在发酵过程中呈上升趋势, 色氨酸 (Try) 在发酵过程中呈先升高后降低的趋势。茶叶中特殊的非蛋白质氨基酸茶氨酸 (Theanine) 和 γ -氨基丁酸在发酵过程中呈先升高后降低的变化规律在发酵 2 h 含量最高。这与 Tan 等^[19]的研究略有不同, 在 Tan 的研究中将发酵时间延长到了 14 h, 使色氨酸和酪氨酸在发酵的前期增加随后减少, 苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸和谷氨酸相对稳定, 茶氨酸呈下降趋势, 由此说明发酵时间长短对游离氨基酸类物质的动态变化影响很大。

2.3.3 发酵过程中黄酮和黄酮醇苷类物质动态变化

黄酮和黄酮醇苷是茶叶中主要的涩味物质之一, 茶叶中主要的黄酮醇和黄酮醇苷苷元为槲皮素、山奈酚、杨梅素等^[20]。在本研究中大多数黄酮和黄酮醇苷呈下降趋势, 只有小部分升高或者变化不明显。黄酮类化合物是茶汤中重要的呈色物质, 其中槲皮素是茶

汤呈绿色的代谢产物之一^[12]。在发酵过程中检测出 10 种槲皮素糖苷，仅有槲皮素 3-O-6"-乙酰基-葡萄糖苷（Quercetin 3-O-(6"-Acetyl-Glucoside)）在发酵过程中含量升高，其他 9 种槲皮素糖苷在发酵过程中含量下降或者变化不大，这可能是红茶汤色绿色消失的其中一个原因。检测出 7 种山奈酚糖苷，山奈酚（Kaempferol）在发酵过程中含量升高与 Wang 等^[21]

研究结果一致，山奈酚 3-O- α -L-呋喃鼠李糖苷（Kaempferol 3-O- α -L-Rhamnofuranoside）在发酵过程中含量降低，其他 5 种山奈酚糖苷在发酵过程中变化无规则，4 种杨梅素糖苷在发酵过程中含量降低与 Tan 等^[19]研究结果一致。柚皮素具有抗氧化、抗炎、调节免疫力、抗肿瘤等功效^[22]，柚皮素（Naringenin）在发酵过程中含量升高。

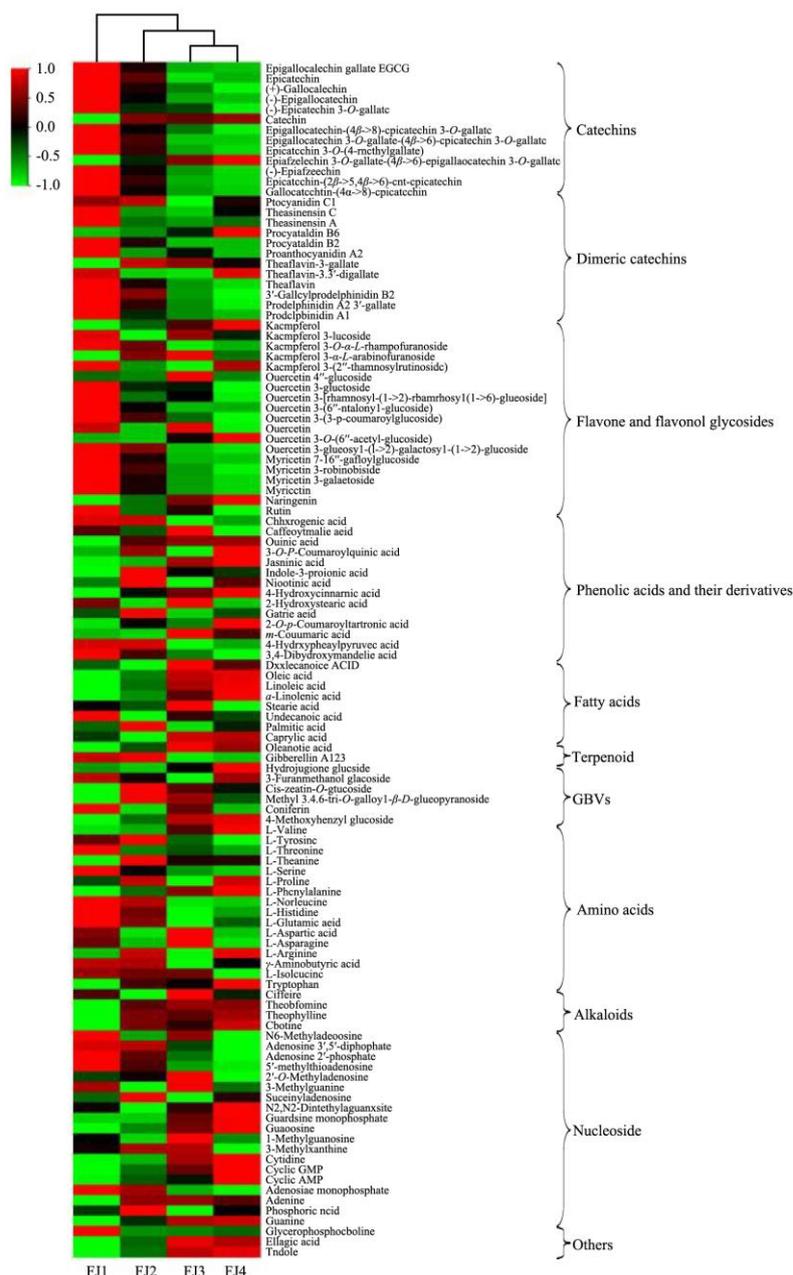


图 3 发酵过程中非挥发性化合物变化热图

Fig.3 Heat map of non-volatile compounds during fermentation

2.3.4 发酵过程中酚酸及其衍生物动态变化

酚酸及其衍生物是茶叶中重要的抗氧化成分，有助于茶汤色泽和滋味的形成^[17]。本研究中共鉴定出 16 种酚酸类物质，绿原酸（Chlorogenic Acid）和 3,4-二羟基扁桃酸（3,4-Dihydroxymandelic Acid）在发酵过

程中含量明显降低，茶没食子素（Theogallin）、4-羟基肉桂酸（4-Hydroxycinnamic Acid）、香豆酸（m-Coumaric Acid）、茉莉酸（Jasmonic Acid）在发酵过程中含量升高，其他几种酚酸类物质在发酵过程中变化不大。

2.3.5 发酵过程中核苷和核苷酸类物质动态变化

核苷和核苷酸类物质是茶汤滋味的主要贡献者之一^[23]，本研究共鉴定出 23 种核苷和核苷酸类物质，腺苷 3',5'-二磷酸 (Adenosine 3',5'-Diphosphate)、腺苷 2'-磷酸 (Adenosine 2'-Phosphate)、5'-甲硫腺苷 (5'-Methylthioadenosine)、磷酸腺苷 (Adenosine Monophosphate) 在发酵 2 h 后含量降低，2'-O-甲基腺嘌呤 (2'-O-Methyladenosine)、鸟嘌呤 (Guanine)、环鸟苷酸 (Cyclic GMP) 等 10 种核苷和核苷酸类物质在发酵 2 h 后含量升高，其他几种核苷和核苷酸类物质在发酵过程中含量变化不大。

2.3.6 发酵过程中其他非挥发性化合物动态变化

脂肪酸类物质本身具有香气，同时又是香气的重要前体，对茶叶的香气有重要贡献，同时也具有抗氧化、降低胆固醇、增强记忆力等生物活性是人体所必需的物质^[24]，本实验中共鉴定出 8 种脂肪酸类物质，油酸 (Oleic Acid)、亚油酸 (Linoleic Acid)、 α -亚麻酸 (Alpha-Linolenic Acid)、辛酸 (Caprylic Acid) 发酵 2 h 后含量升高，棕榈酸 (Palmitic Acid)、十一酸 (Undecanoic Acid) 在发酵 2 h 后含量降低。茶碱 (Theophylline) 和胆碱 (Choline) 在发酵过程中含量升高，咖啡碱 (Caffeine) 变化不明显与 Jiang 等^[25]和 Hua 等^[9]研究结果一致，吲哚在发酵过程中含量升高。

2.4 发酵过程中非挥发性差异代谢物的筛选

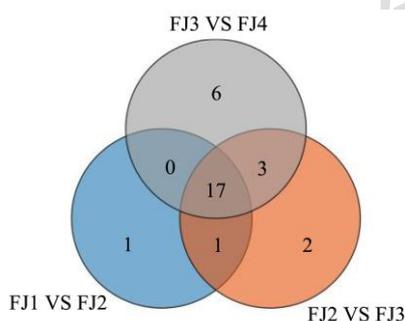


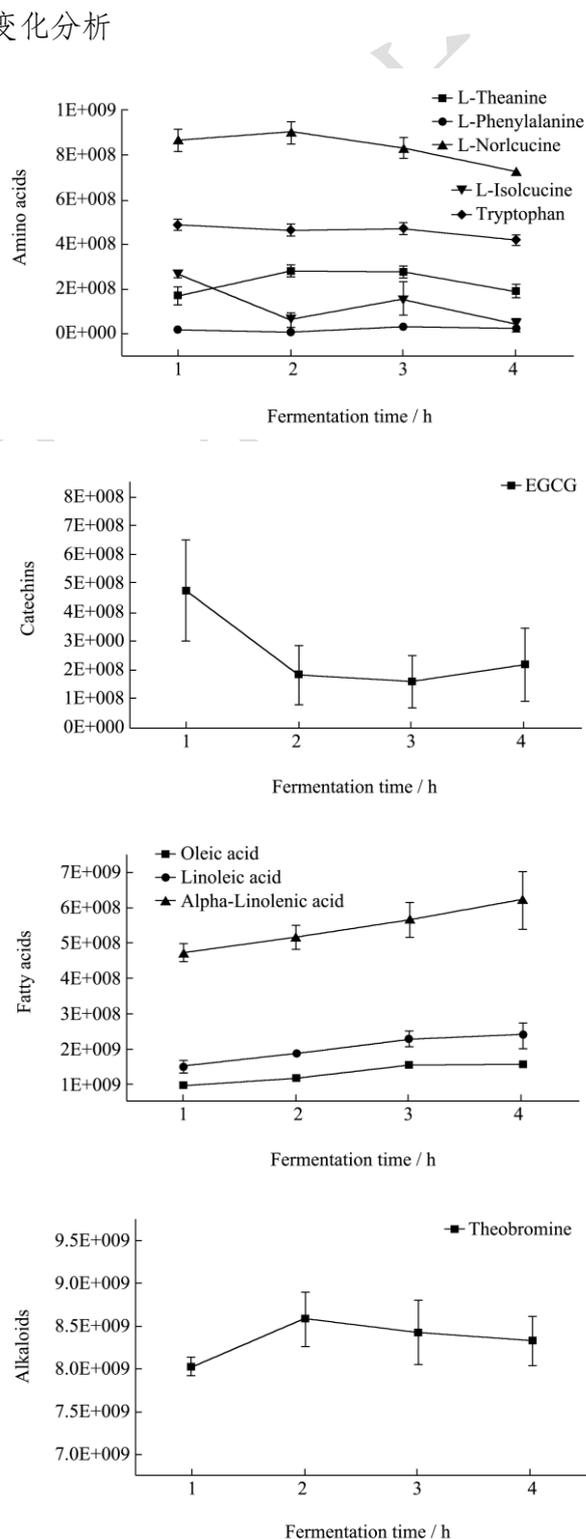
图 4 发酵过程中差异非挥发性代谢物韦恩图

Fig.4 Venn diagram of differential non-volatile metabolites during fermentation

为了研究发酵对红茶非挥发性代谢物的影响，具体地探讨了发酵过程中关键差异代谢物，参考 Wang 等^[13]的绿茶加工过程中关键差异代谢物的筛选方法。对发酵 1 h VS 发酵 2 h、发酵 2 h VS 发酵 3 h 和发酵 3 h VS 发酵 4 h 分别进行正交偏最小二乘分析 (OPLS-DA)，根据 $VIP > 1$ 和 $fold\ change \geq 2$ 或 ≤ 0.5 的原理筛选差异代谢物。如图 4 所示，共鉴定出 17 个关键差异代谢物，包括 1 种儿茶素、3 种黄酮类物质、2 种酚酸、3 种脂肪酸、5 种氨基酸、1 种生物

碱、2 种核苷。分别为 EGCG、山奈酚 5-葡萄糖苷、杨梅素 3-半乳糖苷、杨梅素、奎宁酸、3-O-p-香豆酰奎宁酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、茶氨酸、苯丙氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、可可碱、5'-甲硫腺苷、黄嘌呤。

2.5 发酵过程中非挥发性差异代谢物的动态变化分析



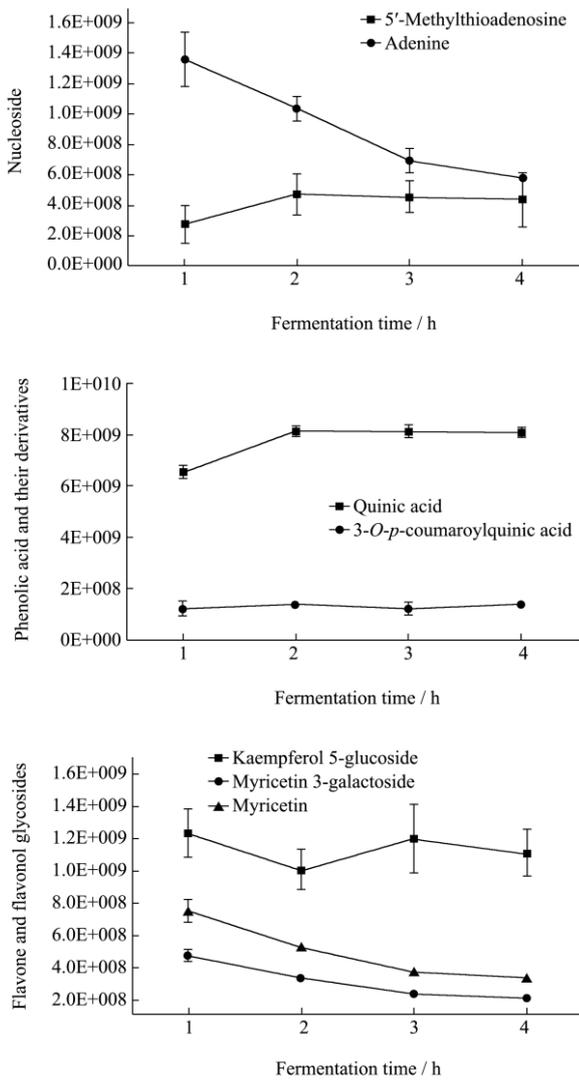


图5 红茶发酵过程中儿茶素等7类物质差异代谢物的动态变化
Fig.5 Dynamic changes of seven metabolites including catechins during black tea fermentation

如图5所示,在发酵过程中5种差异氨基酸含量均降低;EGCG在发酵1 h~3 h之间逐渐降低,而后的发酵过程中又逐渐升高;在发酵过程中奎宁酸和3-O-p-香豆酰奎宁酸含量均有所增加;5'-甲硫腺苷在发酵过程中含量逐渐降低、黄嘌呤在发酵1 h~2 h含量逐渐升高而后趋于稳定;在发酵1 h~2 h山奈酚3-葡萄糖苷含量逐渐降低而后升高,发酵3 h后又逐渐降低,杨梅素3-半乳糖苷、杨梅素在发酵过程中均降低;具有苦味的可可碱,在发酵1 h~2 h含量逐渐升高,2 h后逐渐降低;3种脂肪酸类差异代谢物在发酵过程中含量逐渐升高。

2.6 发酵过程中挥发性代谢物类别分析

本研究对信阳红茶发酵过程中香气成分分析共得到107种香气成分,包括28种萜类、24种酯类、

7种醇类、9种杂环化合物、4种酮类、22种烃类、12种醛类、1种其他。如图6所示,萜类、酯类和醇类是主要的挥发性成分,在萎凋过程中的总量分别占挥发性成分总量的43.62%~44.36%、23.69%~25.92%和12.43%~15.58%。在发酵过程中,萜类化合物呈先降低后升高而后再降低的变化趋势,在发酵3 h时含量最高;酯类化合物呈先降低后升高的趋势;醇类化合物呈先升高后降低的趋势,在发酵2 h时含量最高;醛类化合物呈先升高后降低而后升高的趋势,在发酵4 h时含量达到最高;杂环化合物、烃类化合物、酮类化合物在发酵过程中呈升高趋势。

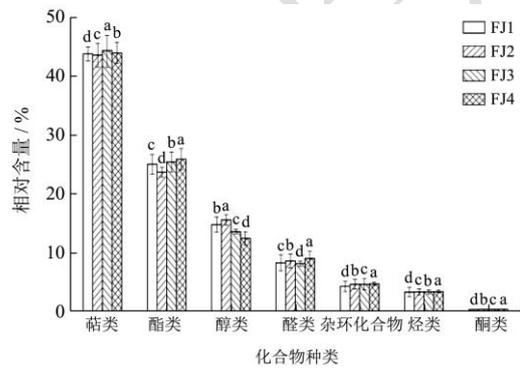


图6 发酵过程中不同类别挥发性代谢物的变化柱状图
Fig.6 Histogram of changes of different volatile metabolites during fermentation

注:不同小写字母表示发酵过程样之间同种挥发性代谢物含量的差异显著($P < 0.05$)。

2.7 发酵过程中不同类别挥发性代谢物变化分析

2.7.1 发酵过程中酯类化合物的动态变化

酯类挥发性化合物是由茶叶中脂肪酸水解或氧化产生的内酯衍生物^[26],如图7所示,在发酵过程中大部分酯类化合物呈降低趋势,水杨酸甲酯具有冬青油香气,是影响茶叶整体香气最重要的酯类化合物^[27]。在发酵过程中(Z)-3-己烯己酸酯、3-己烯己酸酯、己酸己酯、E-2-己烯基苯甲酸酯、香叶酸乙酯、己酸-5-己烯基酯、甲酸辛酯在发酵过程中呈降低趋势,水杨酸甲酯、(Z)-丁酸-4-己烯酯、十六酸甲酯在发酵过程中呈上升趋势,辛酸甲酯在发酵过程中呈先升高后降低的变化趋势。

2.7.2 发酵过程中萜类化合物的动态变化

萜类挥发性化合物对茶叶香气形成起着关键作用,在发酵过程中含量较高的萜类化合物有 β -蒎烯、香叶醇、芳樟醇、 δ -蒎品烯、月桂烯、反式- β -紫罗兰酮、 β -紫罗兰酮、 α -柠檬烯和 β -罗勒烯。在发酵过程

中，萜类化合物呈现出不同的变化趋势， β -蒎烯、 δ -蒎烯、月桂烯、反式-橙花叔醇、 α -松油醇、 β -法尼烯、 α -柠檬烯、 β -罗勒烯、(Z)- β -法呢烯呈上升趋势，香叶醇、芳樟醇、脱氢B-环柠檬醛、2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯、 γ -蒎烯、(E,E)-2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯、2-甲基-6-亚甲基-1,7-辛二烯呈先升高后降低的趋势，反式- β -紫罗兰酮、 β -紫罗兰酮和环氧- β -紫罗兰酮在发

酵过程中呈降低趋势。 α -松油醇是由糖苷类香气前体水解产生的，具有紫丁香香味^[28]。采用顶空固相微萃取结合气相色谱-嗅闻(GC-O)技术鉴定出滇红香气物质含有月桂烯和 α -柠檬烯(新鲜的柠檬香味)且稀释系数为5，对滇红香气有一定的促进作用^[29]。在发酵过程中这些化合物含量的增加均有利于红茶花果香气的形成。

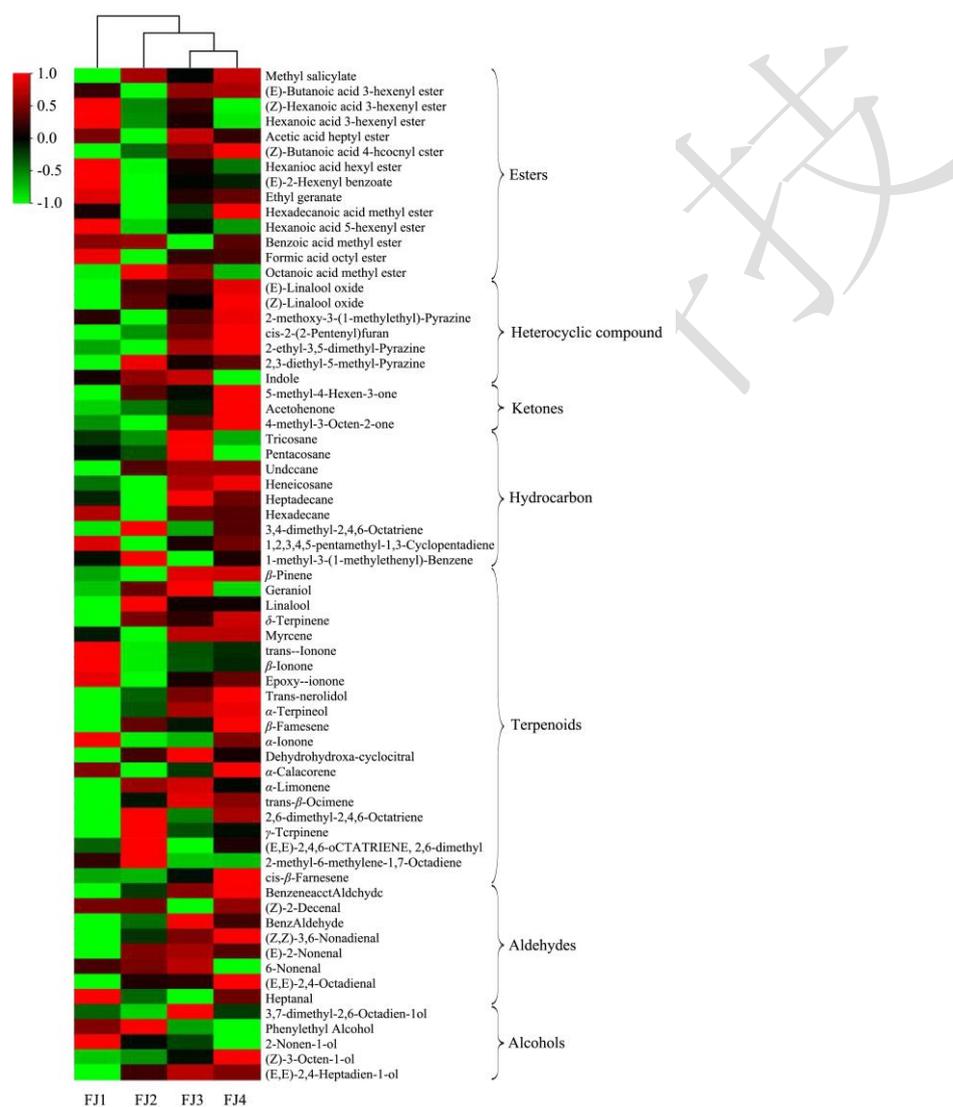


图 7 发酵过程中挥发性化合物变化热图

Fig.7 Heat map of volatile compounds changes during fermentation

2.7.3 发酵过程中其他类挥发性化合物的动态变化

醛类挥发性化合物是由茶叶中氨基酸类(多为苯丙氨酸)氧化降解产生的^[30]，具有蜂蜜香的苯乙醛、具有草药香苯甲醛^[31]和3,6-壬二烯醛、(E)-2-壬烯醛、2,4-辛二烯醛在发酵过程中呈上升趋势，其中苯乙醛和苯甲醛在发酵3h后含量显著提升，6-壬烯醛在发酵过程中含量呈下降趋势，其他醛类化合物在发酵过程中变化不大。酮类化合物是通过热降解、脂肪氧化、

氨基酸降解、美拉德反应等途径形成的^[29]，在发酵阶段检测到的酮类化合物含量呈上升趋势，在发酵末期含量显著升高。在发酵过程中大部分杂环化合物的含量随着发酵时间的延长其含量呈上升趋势，(E)-芳樟醇氧化物、(Z)-芳樟醇氧化物、异丙基甲氧基吡嗪、顺-2-(2-戊烯基)咪唑、2-乙基-3,5-二甲基吡嗪均在发酵4h时含量达到最高，吡嗪在发酵过程中呈先升高后降低的变化趋势，发酵4h时吡嗪的含量急剧下降。在发酵初期2-苯乙醇、2-壬烯-1-醇的含量升高，发酵3h

后含量又呈降低趋势,而(Z)-3-辛烯-1-醇、(E,E)-2,4-庚二烯-1-醇呈现出完全相反的变化趋势。

2.8 发酵过程中挥发性差异代谢物的筛选

为了确定能够揭示 FJ1 到 FJ4 相邻阶段挥发性代谢物动态变化的标志化合物,参考 Wang 等^[13]的绿茶加工过程中关键差异代谢物的筛选方法,将 107 个挥发性代谢物进一步进行 OPLS-DA 统计分析,根据 VIP >1 和 fold change ≥2 或 ≤0.5 的原理筛选差异代谢物。如图 8 所示,共鉴定出 6 个关键差异代谢物,包括 3 种酯类、2 种醛类、1 种醇类。分别为香叶酸乙酯、水杨酸甲酯、2-苯乙醇、3-己烯酸丁酯、苯乙醛、苯甲醛。

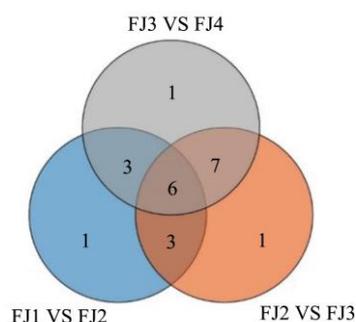


图 8 发酵过程中差异挥发性代谢物韦恩图

Fig.8 Venn diagram of differential volatile metabolites during fermentation

3 结论

本研究采用UHPLC-Q-TOF/MS对红茶发酵过程中非挥发性代谢物进行研究,共鉴定出143种非挥发性代谢物,结果发现随着发酵时间的延长其代谢物含量差异较大。通过OPLS-DA鉴定出发酵过程中17种非挥发性差异代谢物,其中儿茶素、氨基酸、黄酮类、酚酸等的快速转化是红茶滋味形成的主要因素。发酵促进了具有苦涩味的儿茶素类物质发生氧化,使其含量降低,阈值较低具有苦涩味的黄酮类物质含量降低,因此发酵降低了红茶的苦涩味。在发酵过程中对茶汤滋味贡献很大的核苷和核苷酸类物质呈上升趋势,酚酸类物质中茶没食子素、4-羟基肉桂酸、香豆酸等酚酸类物质含量升高,这些物质的变化均有利于改善红茶的口感和滋味。氨基酸类物质是香气的关键前体,在发酵过程中氨基酸总量略有降低,2 h时氨基酸总量最高,氨基酸含量升高使红茶关键香气前体增强从而有利于红茶香气的形成。在发酵过程中脂肪酸类物质呈上升趋势,对红茶香气形成也有着积极作用。柚皮素和脂肪酸类物质含量升高为茶叶的保健功效奠定了基础。

在发酵过程中共鉴定出 107 种香气成分,许多挥发性物质包括芳樟醇、香叶醇、芳樟醇氧化物、β-紫

罗兰酮、β-环柠檬醛、反式-β-紫罗兰酮、2-苯乙醇、水杨酸甲酯、反式-橙花叔醇、苯甲醛和苯乙醛等都是红茶重要的芳香化合物,能产生甜香、花香或果香,其中一些化合物在发酵过程中含量增加有利于信阳红茶花果香气的形成,随着发酵过程的进行,茶叶的香气逐渐以花香、果香为主导。在发酵前 3 h 香叶醇含量呈上升趋势,3 h 后香叶醇含量又显著降低;芳樟醇在发酵 1 h~2 h 含量呈上升趋势,而后又趋于稳定;反式-橙花叔醇、(E)-芳樟醇氧化物和(Z)-芳樟醇氧化物在发酵过程中呈上升趋势,如图 9 所示,可能是发酵后期促进了香叶醇转化为反式-橙花叔醇和芳樟醇,也加速了芳樟醇的氧化降解。本研究为信阳红茶的开发和信阳红茶代谢产物的形成机制提供了新的见解和理论依据,为进一步优化红茶的加工过程提高红茶的品质提供了参考。

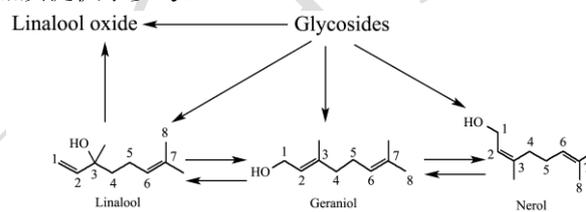


图 9 信阳红茶特征香气化合物的形成机制

Fig.9 Formation mechanism of characteristic aroma compounds in Xinyang black tea

参考文献

- [1] 常笑君,周子维,朱晨,等.工夫红茶加工新工艺研究进展[J].安徽农业科学,2016,44(24):66-68.
- [2] Gross G, Jacobs D M, Peters S, et al. *In vitro* bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(18): 10236-10246.
- [3] Villarreal S A, Beaufort S, Bouajila J, et al. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts [J]. Process Biochemistry, 2019, 83(1): 44-45.
- [4] Grassi D, Draijer R, Desideri G, et al. Black tea lowers blood pressure and wave reflections in fasted and postprandial conditions in hypertensive patients: a randomised study [J]. Nutrients, 2015, 7(2): 1037-1051.
- [5] Rawat R, Gulati A, Acharya R, et al. Characterization of volatile components of Kangra orthodox black tea by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2007, 105(1): 229-235.

- [6] Li Y C, He C, Yu X L, et al. Effects of red-light withering on the taste of black tea as revealed by non-targeted metabolomics and transcriptomics analysis [J]. LWT, 2021, 147(1): 111620.
- [7] Feng Z H, Li Y F, Li M, et al. Tea aroma formation from six model manufacturing processes [J]. Food Chemistry, 2019, 285(1): 347-354.
- [8] 薛金金,尹鹏,张建勇,等.工夫红茶品质化学成分及加工工艺研究进展[J].食品研究与开发,2020,41(18):219-224.
- [9] Hua J J, Xu Q, Yuan H B, et al. Effects of novel fermentation method on the biochemical components change and quality formation of Congou black tea [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 96(1): 103751.
- [10] 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(3):379-392.
- [11] Zhang P, Wang W, Liu X H, et al. Detection and quantification of flavoalkaloids in different tea cultivars and during tea processing using UPLC-TOF-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2021, 339(1): 127864.
- [12] Zhang N, Jing T T, Zhao M Y, et al. Untargeted metabolomics coupled with chemometrics analysis reveals potential non-volatile markers during Oolong tea shaking [J]. Food Research International, 2019, 123(1): 125-134.
- [13] Wang H J, Hua J J, Li J, et al. Widely targeted metabolomic analysis reveals dynamic changes in non-volatile and volatile metabolites during green tea processing [J]. Food Chemistry, 2021, 363(30): 130131.1-130131.10.
- [14] 张铭铭,尹洪旭,邓余良,等.基于 HS-SPME/GC×GC-TOFMS/OAV 不同栗香特征绿茶关键香气组分分析[J].食品科学,2020,41(2):244-252.
- [15] 陈林,张应根,陈键,等.乌龙茶品种鲜叶加工白茶过程中香气成分动态变化规律[J].茶叶科学,2020,40(6):771-781.
- [16] 宁静,李健权,刘本英,等.云南大叶种晒青茶发花前后主要风味成分的变化研究[J].茶叶科学,2021,41(2):213-227.
- [17] Li Q, Jin Y L, Jiang R G, et al. Dynamic changes in the metabolite profile and taste characteristics of Fu brick tea during the manufacturing process [J]. Food Chemistry, 2021, 344(15): 128576.
- [18] 宋晓东,赵瑶,罗晓英,等.发酵处理对宜红茶品质影响的研究[J].中国茶叶加工,2017,Z2:44-47.
- [19] Tan J F, Dai W D, Lu M L, 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(1): 106-113.
- [20] Zheng X Q, Nie Y, Gao Y, et al. Screening the cultivar and processing factors based on the flavonoid profiles of dry teas using principal component analysis [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 67(1): 29-37.
- [21] Wang L, Luo Y, Wu Y N, et al. Fermentation and complex enzyme hydrolysis for improving the total soluble phenolic contents, flavonoid aglycones contents and bio-activities of guava leaves tea [J]. Food Chemistry, 2018, 264(30): 189-198.
- [22] 王丹,彭莉,周燕红.柚皮素抗肿瘤作用的研究进展[J].中草药,2021,52(10):3151-3156.
- [23] Chen Q C, Shi J, Mu B, et al. Metabolomics combined with proteomics provides a novel interpretation of the changes in nonvolatile compounds during white tea processing [J]. Food Chemistry, 2020, 332(1): 127412.
- [24] 马超龙,李小嫒,岳翠男,等.茶叶中脂肪酸及其对香气的影响研究进展[J].食品研究与开发,2017,38(4):220-224.
- [25] Jiang H, Yu F, Qin L, et al. Dynamic change in amino acids, catechins, alkaloids, and gallic acid in six types of tea processed from the same batch of fresh tea (*Camellia sinensis* L.) leaves [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2019, 77(1): 28-38.
- [26] Ravichandran R, Parthiban R. Lipid occurrence, distribution and degradation to flavour volatiles during tea processing [J]. Food Chemistry, 2000, 68(1): 7-13.
- [27] Lv S D, Wu Y S, Li C W, et al. Comparative analysis of Pu-erh and Fuzhuan teas by fully automatic headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry and chemometric methods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(8): 1810-1818.
- [28] Zheng X Q, Li Q S, Xiang L P, et al. Recent advances in volatiles of teas [J]. Molecules, 2016, 21(3): 338.
- [29] Qiu X L, Wang J X, Yu X F, et al. Aroma formation in Dianhong black tea: Effects of baking [J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(11): 2724-2735.
- [30] Kenji K, Hideki M. Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavor dilution technique [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(20): 5660-5663.
- [31] Chen X H, Chen D J, Jiang H, et al. Aroma characterization of Hanzhong black tea (*Camellia sinensis*) using solid phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry and sensory analysis [J]. Food Chemistry, 2019, 274(1): 130-136.