

基于非靶向代谢组学比较不同发酵方式 红茶滋味物质差异

曾议霆, 吴雪莉, 杨春梅, 刘高杰, 高丙德, 唐克纯*

(成都产品质量检验研究院有限责任公司, 成都 610000)

摘要: **目的** 基于非靶向代谢组学, 比较恒温发酵和变温发酵红茶的滋味物质差异。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic orbitrap high-resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap-MS)对华盖山不同发酵方式红茶的非挥发性化合物进行非靶向筛查, 采用 Compound Discoverer 3.1 和 Chemspider 软件对化合物进行鉴定, 并结合多元统计学软件筛选特征差异化合物。**结果** 通过 UPLC-Q-Orbitrap-MS 检测到 358 种非挥发性化合物, 通过正交偏最小二乘-重要变量投影(orthogonal partial least square-variable import project, OPLS-VIP)结合非参数检验, 获得了具有标志性差异的成分 91 种(VIP>1.0, $P<0.05$); 变温发酵红茶有 66 种物质相对含量显著高于恒温发酵红茶, 有 25 种物质相对含量显著低于恒温发酵红茶。**结论** 该研究确定了恒温发酵和变温发酵红茶的差异滋味物质, 为四川华盖山红茶滋味品质的调控与加工工艺的改善提供了参考依据。

关键词: 红茶; 非靶向代谢组学; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法; 滋味; 发酵方式

Comparison of taste substances of black tea with different fermentation methods based on non-targeted metabolomics

ZENG Yi-Ting, WU Xue-Li, YANG Chun-Mei, LIU Gao-Jie, GAO Bing-De, TANG Ke-Chun*

(Chengdu Institute of Product Quality Inspection Co., Ltd., Chengdu 610000, China)

ABSTRACT: Objective To clarify the difference of taste substances between constant temperature fermentation and variable temperature fermentation of black tea based on non-targeted metabolomics. **Methods** The non-volatile compounds of black tea from different fermentation ways in Huaying Mountain were non-targeted screened by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap-MS), the compounds were identified by Compound Discoverer 3.1 and Chemspider software, and the compounds with characteristic differences were screened by multivariate statistical software. **Results** The 358 kinds of non-volatile compounds were detected by UPLC-Q-Orbitrap-MS, and 91 kinds of components with significant differences (VIP>1.0, $P<0.05$) were obtained by orthogonal partial least square-variable import project (OPLS-VIP) combined with non-parametric test; the relative content of 66 kinds of substances in the variable temperature fermented black tea was significantly higher than that in the constant-temperature fermented black tea, and the

基金项目: 四川省市场监督管理局科技项目(SCSJ2021012)

Fund: Supported by the Science and Technology Foundation of Sichuan Market Supervision Administration (SCSJ2021012)

*通信作者: 唐克纯, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 385849334@qq.com

*Corresponding author: TANG Ke-Chun, Master, Engineer, Chengdu Institute of Product Quality Inspection Co., Ltd., Chengdu 610000, China. E-mail: 385849334@qq.com

relative content of 25 kinds of substances was significantly lower than that in the constant-temperature fermented black tea. **Conclusion** This study determine the different flavor substances of black tea fermented at constant temperature and variable temperature, which provide a reference for the regulation of taste quality and the improvement of processing technology of Huayingshan black tea in Sichuan.

KEY WORDS: black tea; non-targeted metabolomics; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic orbitrap high-resolution mass spectrometry; taste; fermentation method

0 引言

红茶具有抗氧化、免疫调节^[1-2]、降脂降血糖^[3-4]等保健功能, 是最受消费者欢迎、国际贸易中最主要的茶类之一^[5-6], 在中国茶叶市场占有率重要地位的红茶种类主要包括工夫红茶、小种红茶和红碎茶^[7]。红茶初制的基本工艺包括萎凋、揉捻(揉切)、发酵、干燥, 其中发酵是红茶外形、色泽、汤色、香气、滋味等特有品质形成的关键工序, 该过程是在适当的温湿度条件下以茶多酚类化合物的酶促氧化作用为主, 并伴随鲜叶内其他物质的氧化、聚合等一系列生化反应^[8], 从而形成红茶特有的乌润色泽、甜香高爽和滋味醇厚等品质特征。

滋味是评判茶叶品质的最重要因子, 占茶叶感官评价总分的 35%, 它是茶汤中多种呈味物质的综合反应, 而呈味物质的差异与茶叶产地^[9]、茶树品种^[10]、采摘季节^[11]和工艺参数^[12]等因素有关。因此探究不同工艺对红茶滋味的影响对于提高红茶品质具有重要意义, 红茶发酵的良好控制是决定其品质优良的重要条件, 儿茶素是生化反应的主体物质, 茶多酚酶促氧化生成的茶黄素是红茶发酵反应的品控指标, 对红茶的滋味鲜度、浓度及汤色的亮度起着重要作用^[13-14]。关于红茶发酵的研究主要集中于发酵条件的控制, 主要因素包括发酵温度、环境湿度、发酵时间等^[15-16], 且品质因子的研究主要集中于大部分香气^[17]和少部分常规性的高含量滋味成分^[18]的变化, 鲜见对发酵工艺影响的系统性滋味成分的研究, 特别是不同发酵方式。发酵方式包括恒温发酵和变温发酵, 持续的过高和过低温度均不利于红茶品质的形成。持续的低温, 茶叶中的多酚氧化酶活性较低, 茶多酚等成分的转化速率较慢、转化不彻底, 内含物积累不足, 红茶品质不高; 持续的高温, 茶叶中多酚类物质的转化速率过快, 致使茶黄素的积累在短时间内增加迅速, 这些色素会继续进行氧化、缩合反应, 最终形成大量茶褐素。通常认为恒温发酵温度控制在 22~30℃^[19], 且恒温发酵在偏离发酵适度标准后再延长发酵时间就会造成发酵过度, 进而导致茶样变酸^[20]。变温发酵一般采取人为控制发酵过程中的前后环境温度变化, 并且研究发现先高后低的温度设定有利于提高红茶品质^[21], 且前后高低温之间的温差需达到 15~25℃, 低于 10℃效果不明显^[22]。

四川广安共种植茶叶 1.32 万亩, 华莹山因其独特的地理优势, 海拔 1000 m 左右, 自古就是优质茶产区, 已有“华莹山银针茶”独特品牌, 但还存在发展主体小、散、弱, 规模化、产业化程度不足, 科技创新含量待提升等问题。本研究以四川华莹山春季茶叶一芽一叶为原料, 基于非靶向代谢组学, 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic orbitrap high-resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap-MS)对茶汤中滋味物质成分进行鉴定, 并通过多元统计分析技术探讨恒温发酵和变温发酵方式对四川华莹山红茶滋味物质组成的影响, 旨在为四川华莹山红茶资源的开发利用提供服务。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

供试材料来自四川广安华莹山茶叶公司加工而成的红茶, 其加工工艺除了发酵方式不同外, 其余工序完全相同。采摘时间均为 2022 年 3 月, 茶树品种为老川茶; 鲜叶采摘标准为一芽二叶, 成熟度、叶片色泽、形状大小一致; 萎凋程度: 65%~70%, 常温, 鼓风; 揉捻方式: 不加压, 25 min; 干燥条件: 110℃理条造型 30 min, 85℃烘干机烘 40 min。其中 HC-BWFJ-1~HC-BWFJ-10 为变温发酵红茶: 控制湿度 95%, 温度 40℃, 发酵 1 h 后, 再利用自然阳光(温度 20~25℃)发酵 5 h; HC-HWFJ-1~HC-HWFJ-10 为恒温发酵红茶: 控制湿度 95%, 温度 40℃, 发酵 5 h。所有样品均用茶叶专用铝箔袋包装, 存放于 4℃冰箱。

乙腈、甲醇(色谱纯)、甲酸(质谱级)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

Orbitrap Exploris 120 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(配有 Compound Discoverer 3.1 数据处理系统)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); KH-500DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); SECURA224-1CN 电子天平(精度 0.1 mg, 德国 Sartorius 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 美国 Waters 公司); 0.22 μm 有机滤膜(美国艾杰尔公司)。

1.2 方法

1.2.1 非挥发性化合物检测

样品前处理过程: 称取 100 mg 茶粉于 5 mL 离心管中, 加入体积分数 70% 的甲醇水溶液 1 mL, 密封超声 30 min, -20°C 静置 20 min, 12000 r/min, 4°C 条件下离心 5 min, 收集上清液, 再重复提取 2 次, 合并上清液, 定容至 5 mL, 过 0.22 μm 有机滤膜, 上机^[23]。

质控(quality control, QC)样: 从所有样品提取物中各取 0.5 mL, 混合均匀, 用于评估分析方法的稳定性。

茶多酚和茶黄素含量测定: 参照分光光度法^[24]测定。

1.2.2 仪器条件

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 柱温: 40°C ; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 1 μL ; 流动相 A: 0.1% 甲酸, 流动相 B: 乙腈。流动相 B 的洗脱梯度为: 0~0.5 min, 5%; 0.5~3 min, 5%~20%; 3~6 min, 20%~50%; 6~8 min, 50%~70%; 8~8.5 min, 70%~90%; 8.5~10 min, 90%; 10~10.1 min, 90%~5%; 10.1~13 min, 5%。

质谱条件: 喷雾电压: 3500 V(+), 2500 V(-); 加热温度: 350°C ; 鞘气气压: 50 Arb; 辅助气压: 15 Arb; 毛细管温度: 320°C 。扫描方式: Full MS-ddMS² (4 Scans); 扫描范围: 70~700 m/z , 700~1500 m/z ; 一级全扫描分辨率 60000 FWHM; 数据依赖二级扫描分辨率 30000 FWHM。

未知成分鉴定: 实验数据采用 Compound Discoverer 3.1 软件进行峰提取、峰对齐、背景扣除、选取在 QC 样品中相对标准偏差小于 30% 的特征离子, 化合物的鉴定使用 MZcloud、MZval、Chemspider (HMDB、PubChem、Massbank 等)、MassList 等数据库。

1.2.3 感官评价

参照 GB/T 23776—2018《茶叶感官审评方法》中的红茶感官审评方法采用评语和评分相结合的方式评定。随机称取 3.0 g 红茶于 150 mL 精茶审评杯中, 用 150 mL 沸水冲泡 5 min, 过滤, 由 6 名(3 名男性、3 名女性)具有茶叶感官审评资质的评茶员进行评分。

1.3 数据统计与分析

采用 Origin 2018 进行热图分析; 采用 SPSS 22.0 进行非参数检验(Mann-Whitney 检验), 确定 P 值; 采用 SIMCA 14.1 (Sartorius 公司)进行主成分分析(principal component

analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析法(orthogonal partial least square-discriminant analysis, OPLS-DA)分析, 在 OPLS-DA 模型中计算重要变量投影(variable import project, VIP)值, 将满足 $\text{VIP}>1.0$ 、同时 $P<0.05$ 的变量被选作为差异代谢物^[25]。

2 结果与分析

2.1 两种发酵方式红茶感官品质分析

由感官评价结果表 1 可知, 恒温发酵红茶整体评分高于变温发酵红茶; 外形上, 恒温发酵红茶形状更成条, 颜色更均匀, 整体显黑褐色, 而变温发酵红茶卷曲得更多, 且颜色均匀度略差, 少部分呈棕色, 整体更偏向于棕褐色; 茶汤颜色方面, 恒温发酵红茶更亮丽; 滋味方面, 恒温发酵红茶更厚重, 刺激感更强, 而变温发酵红茶味道更鲜醇, 回味微甘甜。除外形外, 该感官结果同发酵机发酵与自然发酵红茶品质差异分析^[26]的结果一致。究其原因可能主要是恒温发酵方式使红茶发酵得更充分, 相关研究表明发酵温度适当地增加有利于总汤色红黄度的提升^[27]。

2.2 主成分分析

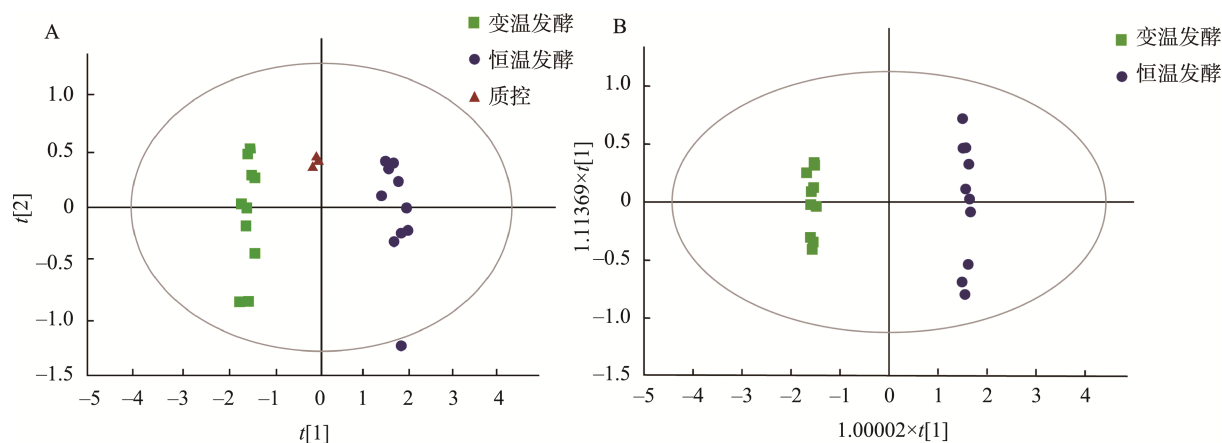
经 UPLC-Q-Orbitrap-MS 主要检测到 358 种非挥发性化合物(正负离子模式检测结果合并), 以这些代谢物进行主成分分析, 根据离散度分析样品重复性及差异性, 判断仪器稳定性和数据有效性。若样品离散度小说明仪器稳定, 检测结果可靠。如图 1A, PCA 图中第一主成分的贡献率为 66.1%, 第二主成分的贡献率为 6.5%, 3 个质控样 QC 重叠良好, 组内样品聚集比较集中, 说明检测方法的信号稳定性良好, 得出的数据结果可靠, 且两个样品组表现出明显的分离趋势, 说明恒温发酵红茶和变温发酵红茶的代谢物具有较大的差异。

2.3 两种发酵方式红茶滋味物质差异分析

如图 1B 所示, OPLS-DA 模型得到两个主成分, 第一主成分的贡献率为 68.5%, 第二主成分的贡献率为 4.4%, 两组样品的区分效果非常明显, 且模型的评价参数均大于 0.5 [$R^2X(\text{cum})=0.729$, $R^2Y(\text{cum})=0.999$], 且 $Q^2(\text{cum})=0.995$, 大于 0.9, 说明 OPLS-DA 模型构建良好, 预测性可靠且有意义, 可根据 VIP 值分析筛选差异代谢物。结合 S-plot 和

表 1 不同发酵方式红茶感官评审结果
Table 1 Sensory evaluation results of black tea with different fermentation methods

茶样	外形		汤色		滋味		总分
	评语	评分	评语	评分	评语	评分	
恒温发酵	条索尚紧细, 微卷, 色泽黑褐尚润	91.1 \pm 0.6	橙红亮	90.3 \pm 2.0	醇厚鲜爽	88.1 \pm 2.6	90.5 \pm 2.2
变温发酵	条索尚紧细, 部分成卷, 色泽棕褐尚润	88.2 \pm 2.4	橙红尚亮	87.1 \pm 2.2	鲜醇回甘	86.0 \pm 2.0	88.7 \pm 1.7



注: A 为 PCA 得分图; B 为 OPLS-DA 得分图。

图 1 不同发酵方式红茶的多元统计分析结果

Fig.1 Multivariate statistical analysis results of black tea with different fermentation methods

Mann-Whitney 检验, 筛选出 $VIP > 1.0$, 且 $P < 0.05$ 的成分, 得到具有标志性差异的成分有 91 种, 占有代谢成分的 25.4%, 说明不同发酵方式形成的红茶内含物差异显著。91 种差异化合物热图如图 2 所示, 包括 13 种有机酸类、10 种氨基酸及其衍生物类、12 种核苷酸及其衍生物类、41 种酚类(包括黄酮醇类和黄酮苷类、儿茶素类、鞣质类)、4 种生物碱类、11 种其他类。在所有差异化合物中, 变温发酵红茶有 66 种物质呈上调表达, 即相对含量显著高于恒温发酵红茶, 包括 9 种有机酸类、4 种氨基酸及其衍生物类、8 种核苷酸及其衍生物类、33 种酚类(包括黄酮醇类和黄酮苷类、儿茶素类、鞣质类)、2 种生物碱类、10 种其他类; 有 25 种物质呈下调表达, 即相对含量显著低于恒温发酵红茶, 包括 4 种有机酸类、6 种氨基酸及其衍生物类、4 种核苷酸及其衍生物类、8 种酚类(包括黄酮醇类和黄酮苷类、儿茶素类)、2 种生物碱类、1 种其他类, 上调化合物的数量远大于下调化合物的数量。两种发酵方式红茶在内含物种类和数量上的差异, 形成了各自不同的滋味特征。

2.4 不同类别滋味物质差异分析

为了更直观地观察恒温发酵和变温发酵红茶主要差异滋味物质的折叠变化, 利用 Origin 软件生成了黄酮类和儿茶素类、有机酸类、氨基酸及其衍生物类、核苷酸及其衍生物类化合物的热图, 如图 3 所示。儿茶素、黄酮、有机酸、氨基酸、核苷酸等是影响红茶滋味的主要滋味物质^[28]。

2.4.1 黄酮类和儿茶素类化合物的差异分析

红茶中的黄酮类化合物主要是异黄酮、黄酮醇和黄酮醇类, 黄酮醇常与糖结合成糖苷并以 3-O-糖苷的形式存在, 茶叶中的黄酮类物质主要包括槲皮素(苷)、山奈素(苷)和杨梅素(苷)^[29-30]。黄酮糖苷类物质对茶汤的色泽和滋味均有贡献, 具有一种引起口腔干燥和柔软收敛性的涩味^[31-32],

儿茶素是茶叶多酚类的主体, 酯型儿茶素具有较强的苦涩味和收敛性, 是构成茶叶苦涩味的主要物质^[33], 而非酯型儿茶素的涩味和收敛性都较弱, 回味爽口^[34]。如图 3A 所示, 变温发酵红茶中相对含量较高的有 30 种黄酮类, 主要为杨梅素、槲皮素、木犀草素、槲皮素-3-O-葡萄糖基-1-3-鼠李糖基-1-6-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-(6''-反式-P-香豆酰-2'-葡萄糖基)鼠李糖苷、牡荆素葡萄糖苷、芹菜素 6,8-二半乳糖苷等, 1 种儿茶素类化合物, 为表没食子儿茶素 5,3',5'-三甲基醚 3-O-没食子酸酯; 而恒温发酵红茶中只有 8 种黄酮类化合物的相对含量较高, 主要为根皮素、二氢槲皮素、槲皮素 7-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-半乳糖苷等。其他常见的儿茶素类化合物如儿茶素、没食子酸儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素没食子酸酯、原花青素、茶黄素类等并没有表现出显著差异。

比较筛查到的茶多酚总量, 结果见表 2, 两种发酵方式的茶多酚总量和茶黄素总量相差不大, 该结果与和红河^[35]的研究较一致。变温发酵红茶的茶多酚含量微高于恒温发酵红茶; 茶黄素含量却表现为恒温发酵红茶微高于变温发酵红茶。这可能是由于变温发酵相对于恒温发酵, 只在前 1 h 采用较高的温度和湿度, 提高酶的活性促进茶多酚的酶促氧化, 积累了一定量的茶黄素, 而后 5 h 变为阳光下低温(20~25℃)发酵, 湿度较低和供氧不足, 酶活性低于恒温发酵, 发酵程度弱于恒温发酵持续的高温高湿环境, 较大程度减少了茶多酚向茶黄素的转化, 虽然茶黄素的进一步转化弱于恒温发酵, 但最终保留的茶黄素量低一点。茶黄素是影响茶汤亮的主因, 也是汤味刺激性强烈和鲜爽的重要成分, 本研究中恒温发酵红茶样品感官表现出滋味醇厚爽口而不苦涩, 说明保留的多酚类物质与茶黄素及其他水溶性物质较协调^[36]。

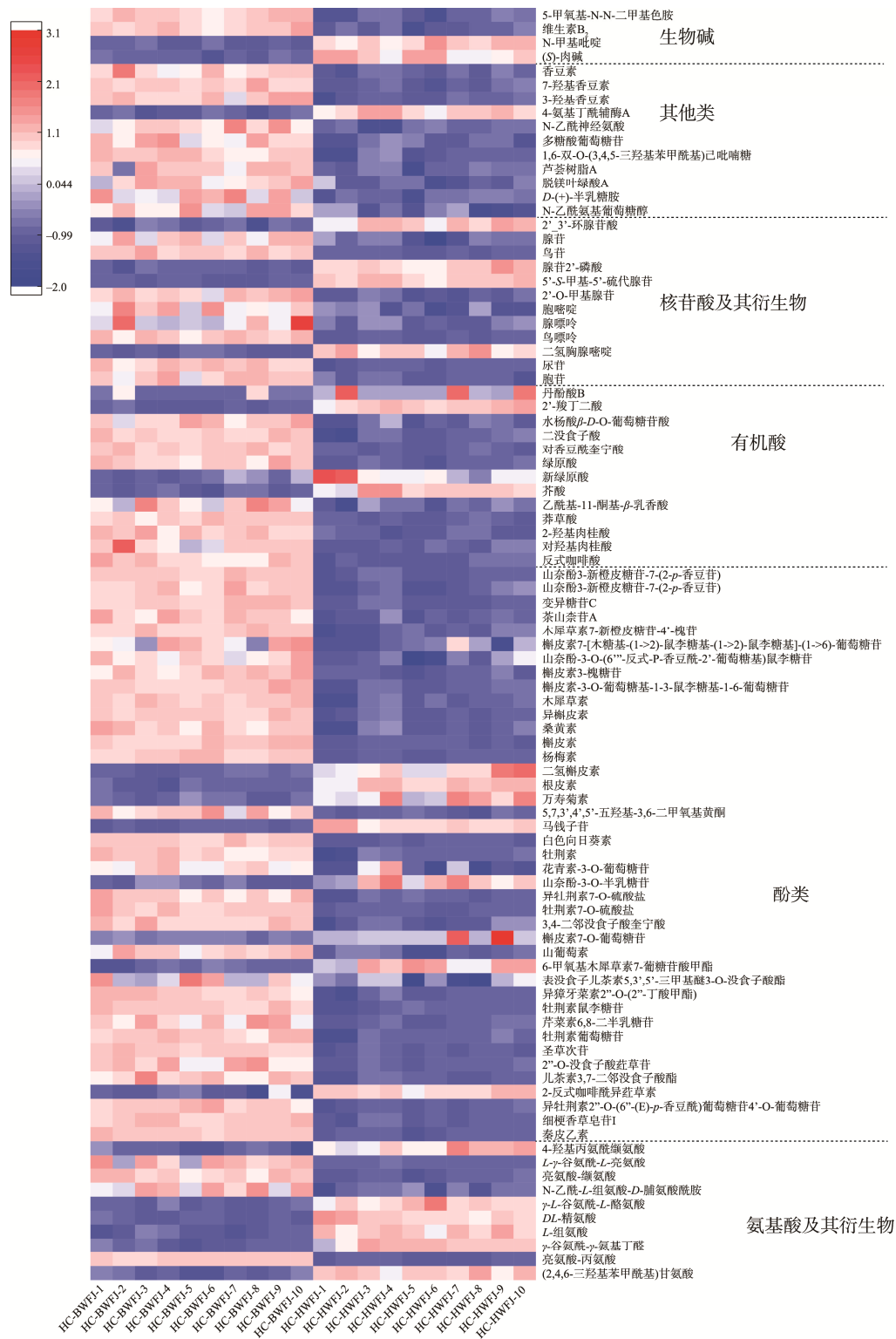


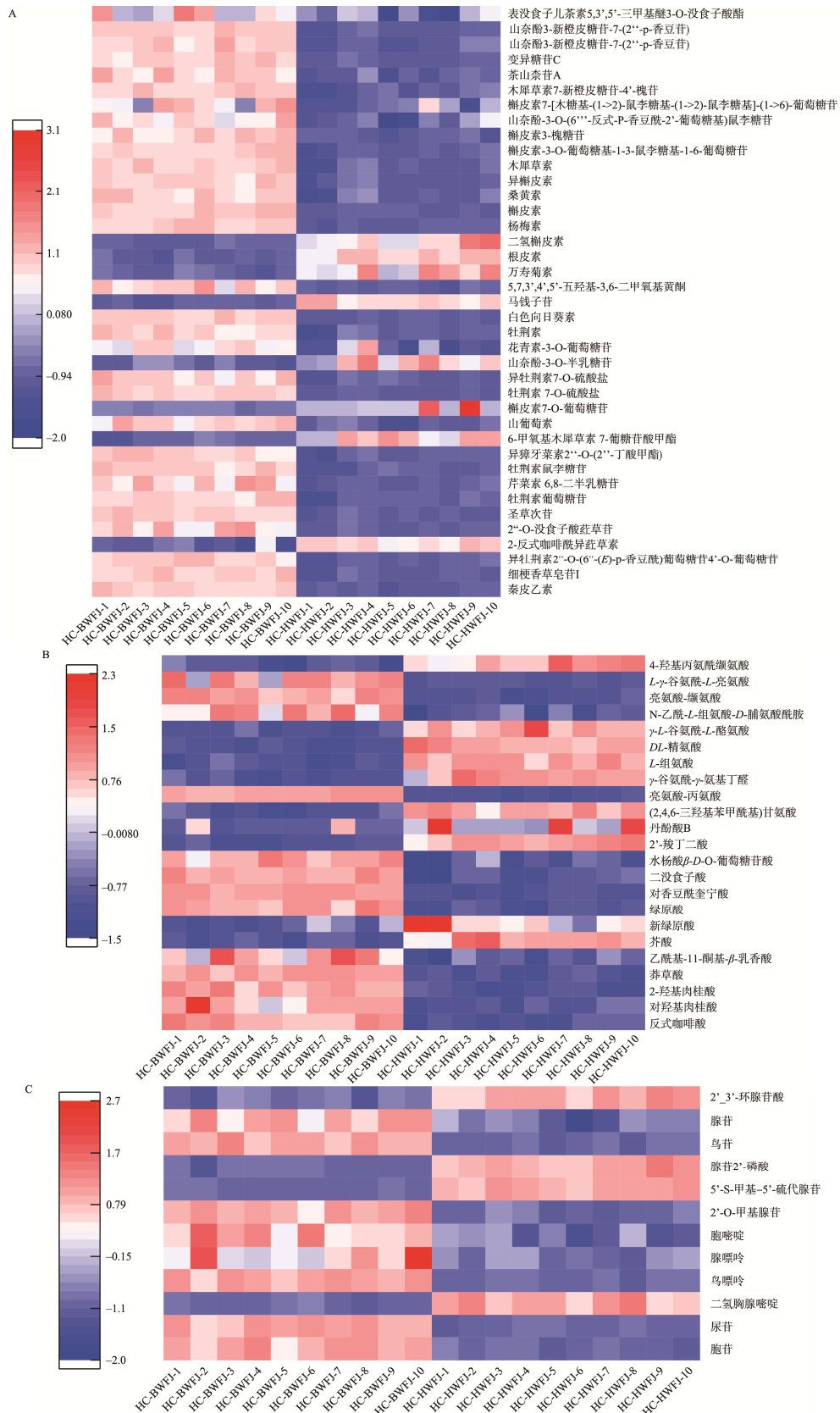
图 2 两种发酵方式红茶标志性差异成分热图分析

Fig.2 Heat map analysis of the signature differences of black tea with 2 kinds of fermentation methods

2.4.2 有机酸和氨基酸类化合物的差异分析

有机酸和氨基酸是构成茶叶香气和滋味的主要成分,有机酸约占茶叶干物质总量的 3%^[37],在茶叶加工过程中,

主要由糖类物质分解形成,氨基酸主要来自于蛋白质水解,有研究发现红茶在不同变温发酵过程中,总氨基酸含量呈逐渐下降趋势^[36]。茶叶中的有机酸如酚酸是一类对茶汤滋



注: A 为黄酮类和儿茶素类化合物; B 为有机酸和氨基酸类化合物; C 为核苷酸类化合物。

图 3 不同发酵方式红茶 3 种主要差异物质热图

Fig.3 Heat map of 3 kinds of main different substances in black tea with different fermentation methods

味起作用的重要化合物, 没食子酸和茶没食子素可以增强谷氨酸钠的鲜味感官强度, 另外草酸、L-苹果酸可影响红茶的酸味, 而琥珀酸则可与氨基酸结合从而影响红茶的鲜味。如图 3B 所示, 变温发酵红茶中, 呈上调的有机酸主要是反式咖啡酸、对羟基肉桂酸、2-羟基肉桂酸、莽草酸、绿原酸、二没食子酸、对香豆酰奎宁酸等; 恒温发酵红茶中, 呈上调有机酸的主要是芥酸、新绿原酸、2'-羧丁二酸等, 变温发酵有机酸种类上调的数量多于恒温发酵。分析呈味的游离氨基酸发现, 两组红茶中只有呈苦味的精氨酸和组氨酸表现出显著差异, 在恒温发酵红茶中呈上调, 但在感官中并没有显现出苦味, 这可能是由于这两种氨基酸含量不高, 还有可能是受到甜味物质的抑制。虽然目前还不清楚各种有机酸的呈味特性, 以及与呈味氨基酸之间的相互作用, 就本研究感官评价结果可以推测红茶中有机酸

应该在一定基础上可以增强其鲜味。

2.4.3 核苷酸类化合物的差异分析

在食品中, 呈味核苷酸被称为“超级味精”, 主要种类有肌苷酸、鸟苷酸、胞苷酸、尿苷酸和黄苷酸^[38]。近年来基于代谢组学对茶叶的研究, 发现了呈味核苷酸的含量会在茶叶萎凋过程中明显上升, 且有研究表明呈味核苷酸也参与了白茶的鲜甜味口感^[39]。本研究筛选出的 12 种关键差异核苷酸及其衍生物鉴定结果见表 3。热图分析如图 3C 所示, 实验样品组有显著差异的主要为核苷代谢物, 如胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷、嘧啶类和嘌呤类, 并不包括主要的呈味核苷酸种类。核酸经磷酸二酯酶水解为核苷酸, 再由磷酸单酯酶水解为核苷和磷酸, 推测控制的发酵条件主要影响了核苷的生成, 为了使红茶中的鲜味核苷酸含量增加, 尚需开展红茶各个加工过程中呈味核苷酸变化规律的研究。

表 2 茶多酚和茶黄素含量分析结果
Table 2 Analysis results of green tea polyphenols and theaflavins

发酵方式	分光光度法		峰面积比较法	
	茶多酚含量/%	茶黄素含量/%	茶多酚含量	茶黄素含量
变温发酵	15.4±0.3	0.30±0.04	5.01×10 ¹⁰ ±7.56×10 ⁸	6.70×10 ⁸ ±2.67×10 ⁷
恒温发酵	15.0±0.3	0.34±0.03	4.70×10 ¹⁰ ±8.58×10 ⁸	8.81×10 ⁸ ±3.44×10 ⁷

表 3 差异核苷酸类鉴定结果
Table 3 Identification results of differential nucleotides

化合物名称	保留时间/min	化学式	匹配的数据库	加合离子	精确质量数(m/z)	质量误差/(mg/L)
胞苷	0.920	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	MassList、ChemSpider	[M+H] ⁺ 1	244.09286	-0.28
尿苷	1.303	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	mzVault、mzCloud	[M-H] ⁻ 1	243.06219	-0.55
二氢胸腺嘧啶	0.867	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	ChemSpider、MassList、	[M+H] ⁺ 1	129.06580	-0.32
鸟嘌呤	1.415	C ₅ H ₅ N ₅ O	ChemSpider、MassList、mzCloud、mzVault	[M+H] ⁺ 1	152.05669	-0.43
腺嘌呤	0.935	C ₅ H ₅ N ₅	ChemSpider、MassList、mzCloud、mzVault	[M+H] ⁺ 1	136.06175	-0.4
胞嘧啶	0.915	C ₄ H ₅ N ₃ O	mzCloud、mzVault	[M+H] ⁺ 1	112.05046	-0.18
2'-O-甲基腺苷	1.838	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄	mzCloud、mzVault、MassList	[M+H] ⁺ 1	282.11960	-0.07
5'-S-甲基-5'-硫代腺苷	3.902	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	mzCloud、ChemSpider、MassList	[M+H] ⁺ 1	298.09692	-0.2
腺苷 2'-磷酸	0.925	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	MassList	[M+H] ⁺ 1	348.07028	-0.17
鸟苷	1.415	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	mzCloud、mzVault、MassList	[M-H] ⁻ 1	282.08438	-0.43
腺苷	1.353	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	mzCloud、mzVault、MassList	[M+H] ⁺ 1	268.10397	-0.26
2'_3'-环腺苷酸	1.300	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₇ P	MassList	[M-H] ⁻ 1	344.04013	-0.43

3 结 论

本研究基于非靶向代谢组学采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 对 2 种不同发酵方式的红茶(恒温发酵和变温发酵)滋味成分进行了分析,并结合多元统计学方法找出它们之间的差异。结果在两种红茶中总共鉴定出 358 种滋味成分,两者在滋味成分组成上较接近,主要组成为黄酮类、儿茶素类、有机酸类、氨基酸类、核苷酸、生物碱等化合物。PCA 能明显区分恒温发酵和变温发酵红茶,并通过 OPLS-DA 筛选出 91 种具有显著差异的化合物,占有代谢物的 25.4%,说明两种发酵方式红茶代谢物质差异显著。两种红茶中含量差异显著的化合物种类最多的主要是多酚类,其次是有机酸、核苷酸及其衍生物、氨基酸等。这些物质的含量和配比差异导致了滋味品质的差异,最终恒温发酵红茶汤色和滋味整体较优于变温发酵,这与发酵时间、温度、湿度、通氧等^[40]的控制因素有关。下一步还有待进一步结合采摘季节、产地、茶树品种、萎凋、揉捻等工艺参数有针对性优化变温发酵条件,以得到感官品质更优的红茶。该研究为四川华莹山红茶滋味品质的调控和加工工艺的改善提供了理论依据。

参考文献

- [1] 于娟, 纪海玉, 白云, 等. 红茶多酚对 H22 荷瘤小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 49–55.
YU J, JI HY, BAI Y, *et al.* Immunoregulatory and antioxidant activities of black tea polyphenols on H22-bearing mice [J]. Chin J Inst Food Sci Technol, 2019, 19(10): 49–55.
- [2] ZHANG H, QI R, MINE Y. The impact of oolong and black tea polyphenols on human health [J]. Food Biosci, 2019, 29: 55–61.
- [3] 王江, 周方, 曾鸿哲, 等. 红茶及其功能成分降脂减肥研究进展[J]. 茶叶通讯, 2021, 48(2): 207–213.
WANG J, ZHOU F, ZENG HZ, *et al.* Research progress of black tea and its functional components on lipid-lowering and anti-obesity [J]. Tea Commun, 2021, 48(2): 207–213.
- [4] MAHDAVI RM, SALARI A, GHORBANI Z, *et al.* The effects of regular consumption of green or black tea beverage on blood pressure in those with elevated blood pressure or hypertension: A systematic review and meta-analysis [J]. Complement Ther Med, 2020, 51: 102430.
- [5] LENG Y, SHANG HG, SHI XY, *et al.* Analysis of China's tea import and export trade in 2018 [J]. China Tea, 2019, 41(4): 30–32.
- [6] ULF WS, NADINE B, STEFFI N, *et al.* Investigation of processes in black tea manufacture through model fermentation (oxidation) experiments [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(31): 7854–7861.
- [7] 宋楚君, 范方媛, 龚淑英, 等. 不同产地红茶的滋味特征及主要贡献物质[J]. 中国农业科学, 2020, 53(2): 383–394.
SONG CJ, FAN FY, GONG SY, *et al.* Taste characteristic and main contributing compounds of different origin black tea [J]. Sci Agric Sin, 2020, 53(2): 383–394.
- [8] DONG CW, ZHU HK, WANG JJ, *et al.* Prediction of black tea fermentation quality indices using NIRS and nonlinear tools [J]. Food Sci Biotechnol, 2017, 26(4): 853–860.
- [9] 林洁鑫, 王鹏杰, 金珊, 等. 基于广泛靶向代谢组学的不同产地红茶代谢产物比较分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 9–19.
LIN JX, WANG PJ, JIN S, *et al.* Comparative analysis of black tea metabolites from different origins based on extensively targeted metabolomics [J]. Food Ind Sci Technol, 2022, 43(2): 9–19.
- [10] 银飞燕, 吴浩人, 袁勇, 等. 5 个茶树品种的红茶适制性及茶叶品质分析[J]. 湖南农业科学, 2020, (4): 58–63.
YIN FY, WU HR, YUAN Y, *et al.* Black tea processing property of five tea varieties and tea quality analysis [J]. Hunan Agric Sci, 2020, (4): 58–63.
- [11] 李波, 黄华林, 陈欣, 等. 不同季节黄化英红九号红茶品质比较分析[J]. 山东农业科学, 2019, 51(10): 60–64.
LI B, HUANG HL, CHEN X, *et al.* Comparative analysis of black tea quality of yellowish Yinghong 9 made in different seasons [J]. Shandong Agric Sci, 2019, 51(10): 60–64.
- [12] 吴婷, 邓秀娟, 李沅达, 等. 云茶香 1 号不同萎凋工艺白茶的化学品质研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(24): 9530–9538.
WU T, DENG XJ, LI RD, *et al.* Study on the chemical quality of white tea with different withering processes of *Camellia sinensis* vs Yunchaxiang 1 [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(24): 9530–9538.
- [13] LAKSHI PRASADB, PABAN B, SANTANU SP, *et al.* Spatial variability of theaflavins and thearubigins fractions and their impact on black tea quality [J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(12): 7984–7993.
- [14] 尚卫琼, 陈春林, 孙承冕, 等. 云南大叶种茶多酚和咖啡碱对红茶品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(1): 155–159.
SHANG WQ, CHEN CL, SUN CM, *et al.* Effects of tea polyphenols and caffeine from Yunnan large leaf species on the quality of black tea [J]. Jiangsu Agric Sci, 2021, 49(1): 155–159.
- [15] HOSSAIN MA, AHMED T, HOSSAIN M, *et al.* Optimization of the factors affecting BT-2 black tea fermentation by observing their combined effects on the quality parameters of made tea using response surface methodology (RSM) [J]. Heliyon, 2022, 8(2): E08948.
- [16] WANG HJ, SHEN S, WANG JJ, *et al.* Novel insight into the effect of fermentation time on quality of Yunnan Congou black tea [J]. LWT, 2022, 155: 112939.
- [17] 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 YQ, FANG CG, XIA LF, *et al.* Effect of different fermentation degree on aroma components of heavy withered ‘Yunkang No.10’ black tea [J]. Southwest China J Agric Sci, 2020, 33(4): 760–768.
- [18] 钟兴刚, 黄怀生, 黎娜, 等. 不同萎凋和发酵处理对“汝城白毛茶”加工红茶品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(4): 137–144.
ZHONG XG, HUANG HS, LI N, *et al.* Effect of withering and fermentation technology on the quality of “Rucheng Baimaocha” processed black tea [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(4): 137–144.
- [19] 杨延, 陆多林, 查银娟. 红茶品质影响因素研究进展[J]. 农业技术与装备, 2021, (2): 12–13.
YANG Y, LU DL, ZHA YJ. Research progress on influence factors of black tea quality [J]. Agric Technol Equip, 2021, (2): 12–13.
- [20] 谭婷, 周颖, 高静, 等. 保靖黄金茶红茶发酵工艺研究[J]. 湖南农业科学, 2016, 1: 77–80.
TAN T, ZHOU Y, GAO J, *et al.* Research on fermentation technology of

- Baojing golden black tea [J]. *Hunan Agric Sci*, 2016, 1: 77–80.
- [21] 谢念祠, 周浩, 周品谦, 等. 变温发酵对保靖黄金茶1号夏季鲜叶制成工夫红茶品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(8): 220–226.
- XIE NC, ZHOU H, ZHOU PQ, *et al.* Effect of variable-temperature fermentation on the quality of Congou black tea made with fresh leaves of Baojing Huangjincha 1 plucked in summer [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(8): 220–226.
- [22] 李鑫磊, 王婷婷, 俞少娟, 等. 工夫红茶发酵技术对其品质的影响[J]. *福建茶叶*, 2015, 37(5): 11–14.
- LI XL, WANG TT, YU SJ, *et al.* Effects of fermentation technology of Gongfu black tea on its quality [J]. *Fujian Tea*, 2015, 37(5): 11–14.
- [23] 岳翠男, 秦丹丹, 蔡海兰, 等. 赣北工夫红茶滋味特征及关键化合物分析[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(2): 260–267.
- YUE CN, QIN DD, CAI HL, *et al.* Taste characteristics and key compounds analysis of Congou black tea in northern Jiangxi Province [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(2): 260–267.
- [24] 施兆鹏. 茶叶审评与检验[D]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- SHI ZP. Tea review and inspection [D]. Beijing: China Agricultural Press, 2021.
- [25] LI MW, SHEN Y, LING TJ, *et al.* Analysis of differentiated chemical components between Zijuan purple tea and Yunkang green tea by UPLC-Orbitrap-MS/MS combined with chemometrics [J]. *Foods*, 2021, 10(5): 1070.
- [26] 曲凤凤, 陈东龙, 封雯, 等. 发酵机发酵与自然发酵红茶品质差异分析[J]. *中国茶叶*, 2018, 40(1): 52–55.
- QU FF, CHEN DL, FENG W, *et al.* Quality difference analysis of black tea fermented by fermenter and naturally fermented [J]. *China Tea*, 2018, 40(1): 52–55.
- [27] 潜金杰, 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 JJ, YUAN HB, YAO YF, *et al.* Effect of temperature on color and tea pigment content of fermented tea leaves [J]. *Chin Soc Agric Eng*, 2018, 34(12): 300–308.
- [28] 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.
- GONG LJ, BO JH, DU ZR, *et al.* Metabolomics analysis of changes in metabolites during the fermentation process of Congou black tea [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2021, 42(21): 8–16.
- [29] DAI WD, XIE DC, LU ML, *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.
- [30] 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 LL, WU CY, *et al.* Flavonols in tea (*Camellia sinensis*) and its impact on sensory taste [J]. *Tea*, 2010, 36(1): 14–18.
- [31] 李凤娟. 白茶的滋味、香气和加工工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- LI FJ. Studies on the taste aroma and processing of white tea [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [32] ANA GD, MARTA D, PURIFICACIÓN FZ. Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines [J]. *Food Chem*, 2014, 154: 187–198.
- [33] 袁定帅, 陈洁, 赖晓芳, 等. 热加工对西兰花营养品质及抗氧化性的影响[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2016, 37(5): 91–95.
- YUAN DS, CHEN J, LAI XF, *et al.* Effect of different cooking methods on nutritional quality and antioxidant activity of broccoli [J]. *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2016, 37(5): 91–95.
- [34] 杨晨, 戴伟东, 吕美玲, 等. 基于UHPLC-Q-TOF/MS的不同产地普洱生茶化学成分差异研究[J]. *茶叶科学*, 2017, 37(6): 605–615.
- YANG C, DAI WD, LV ML, *et al.* Study on the chemical constituents of Pu-erh teas from different areas by UHPLC-Q-TOF/MS [J]. *J Tea Sci*, 2017, 37(6): 605–615.
- [35] 和红州. 福建工夫红茶创新工艺研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- HE HZ. Study on innovative processing technology of Fujian congou black tea [D]. Fuzhou: Agriculture and Forestry University, 2102.
- [36] 黄浩, 余鹏辉, 赵熙, 等. 基于变温发酵技术的黄金茶工夫红茶品质分析[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(2): 155–163.
- HUANG H, YU PH, ZHAO X, *et al.* Quality analysis of huangjincha Congou black tea based on variable temperature fermentation technology [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2022, 38(2): 155–163.
- [37] 周宇飞, 徐帅, 杨益欢, 等. 茶叶中有机酸对茶品质的影响及其检测方法研究进展[J]. *食品科技*, 2021, 46(5): 254–259.
- ZHOU YF, XU S, YANG YH, *et al.* Research progress on the effect of organic acids on tea quality and their detection methods in tea [J]. *Food Sci Technol*, 2021, 46(5): 254–259.
- [38] 张月. 呈味核苷酸与EGCG及其蛋白络合物的相互作用对滋味的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- ZHANG Y. The effect of the interaction of taste nucleotide with EGCG and its protein complex on taste [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2021.
- [39] 陈翔, 田月月, 张丽霞. 基于亲水相互作用液相色谱-三重四极杆质谱法研究白茶萎凋过程中代谢物的变化[J]. *茶叶科学*, 2020, 40(2): 238–249.
- CHEN X, TIAN YY, ZHANG LX. The changes of metabolites during the withering process of white tea based on HILIC LC-QQ MS method [J]. *J Tea Sci*, 2020, 40(2): 238–249.
- [40] QU FF, ZENG WC, TONG X, *et al.* The new insight into the influence of fermentation temperature on quality and bioactivities of black tea [J]. *LWT*, 2020, 117(C): 108646.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



曾议霆, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: 1032401816@qq.com



唐克纯, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: 385849334@qq.com