



乌龙茶鲜叶游离氨基酸组成轮廓的模式识别研究

张应根, 宋振硕, 陈林, 陈键, 王丽丽, 项丽慧

引用本文:

张应根, 宋振硕, 陈林, 陈键, 王丽丽, 项丽慧. 乌龙茶鲜叶游离氨基酸组成轮廓的模式识别研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2023, 31(6): 853–862.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4667>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

43个福建省茶树品种指纹图谱构建及遗传多样性分析

Constructing Fingerprints and Analyzing Genetic Diversity of 43 Tea Cultivars in Fujian Province

热带亚热带植物学报. 2017, 25(6): 579–586 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3743>

木豆不同品种和叶龄对叶片氨基酸形成的影响和聚类分析

Effects of Different Germplasms and Leaf Ages on Amino Acid Formation in Pigeonpea Leaves and Cluster Analysis

热带亚热带植物学报. 2018, 26(6): 617–626 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3895>

茶树新梢中纤维素酶活性及相关基因表达差异分析

Differences Analysis of Cellulase Activity and Its Related Gene Expression in Shoots of *Camellia sinensis*

热带亚热带植物学报. 2017, 25(2): 157–162 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3651>

油茶砧和茶穗嫁接后苗期叶片形态和次级代谢物含量的变化

Changes in Morphological Characters and Secondary Metabolite Contents in Leaves of Grafting Seedlings with *Camellia sinensis* as Scions and *C. oleifera* as Stocks

热带亚热带植物学报. 2017, 25(1): 35–42 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3641>

'柿大茶'品系间芳香类物质、儿茶素及游离氨基酸差异分析

Analysis of Aromatics, Catechins and Free Amino Acids in Different Strains of 'Shida Tea'

热带亚热带植物学报. 2018, 26(3): 302–308 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3809>

向下翻页, 浏览PDF全文

乌龙茶鲜叶游离氨基酸组成轮廓的模式识别研究

张应根, 宋振硕, 陈林*, 陈键, 王丽丽, 项丽慧

(福建省农业科学院茶叶研究所, 福州 350013)

摘要: 为探明乌龙茶品种鲜叶游离氨基酸的组成轮廓特征, 以绿茶品种春季幼嫩鲜叶(一芽二或三叶)和成熟鲜叶(中小开面二至四叶)为对照, 对采自乌龙茶品种春、秋两季的幼嫩和成熟鲜叶进行高效液相色谱检测分析和统计模式识别。结果表明, 茶树品种、芽叶嫩度和采摘季节对供试鲜叶游离氨基酸组成轮廓均有影响。全部供试茶样可按茶树品种特性划分成乌龙茶与绿茶品种 2 大族群, 且芽叶嫩度对乌龙茶鲜叶游离氨基酸组成轮廓的影响仅次于茶树品种特性引起的茶样族群差异。绿茶与乌龙茶品种春季幼嫩鲜叶、绿茶与乌龙茶品种春季成熟鲜叶、春季乌龙茶品种幼嫩与成熟鲜叶、秋季乌龙茶品种幼嫩与成熟鲜叶、春季和秋季乌龙茶品种幼嫩鲜叶及春季和秋季乌龙茶品种成熟鲜叶间存在客观的类群区分。不同鲜叶来源对供试茶样的游离氨基酸总量及大部分游离氨基酸组分均有显著或极显著影响。较高的甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸含量和较低的 γ -氨基丁酸含量是乌龙茶品种有别于绿茶品种春季鲜叶的主要差异性成分; 相同采摘季节的乌龙茶品种幼嫩鲜叶相较成熟鲜叶拥有更高的精氨酸含量, 而不同芽叶嫩度的春季和秋季乌龙茶鲜叶存在不同的差异特征组分。因此, 茶树品种遗传特性是影响茶树鲜叶游离氨基酸组成轮廓的主导因子, 乌龙茶特定的鲜叶游离氨基酸组成化学模式为其加工品质的形成提供了必要的物质基础。

关键词: 乌龙茶; 绿茶; 鲜叶; 氨基酸; 模式识别

doi: 10.11926/jtsb.4667

Pattern Recognition of Free Amino Acids Profile in Fresh Leaves of Oolong Tea Cultivars

ZHANG Yingeng, SONG Zhenshuo, CHEN Lin*, CHEN Jian, WANG Lili, XIANG Lihui

(Tea Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: In order to reveal the characteristics of free amino acids (FAAs) profile in fresh leaves of oolong tea cultivars, young and mature shoots harvested from oolong tea cultivars in spring and autumn were detected by high performance liquid chromatography and classified by statistical pattern recognition, the young shoots (two or three leaves and a bud) and mature shoots (two to four leaves and a *banjhi* bud) of green tea cultivars in spring were used as controls. The results showed that all tea samples could be divided into two groups, oolong tea cultivars and green tea cultivars. The effect of shoots maturity on the FAAs profile in fresh leaves of oolong tea cultivars was second only to the difference of tea sample groups caused by tea tree variety characteristics. Furthermore, the objective group differences could be verified among young shoots (green tea cultivars vs oolong tea cultivars) in spring, mature shoots of (green tea cultivars vs oolong tea cultivars) in spring, (young shoots vs mature shoots) of oolong tea cultivars in spring, (young shoots vs mature shoots) of oolong tea cultivars in autumn,

收稿日期: 2022-05-07 接受日期: 2022-06-22

基金项目: 福建省属公益类项目(2018R1012-4, 2019R1029-5); 福建省自然科学基金项目(2020J011364); 福建省农业科学院科技创新团队项目(CXTD2021004-2)资助

This work was supported by the Special Project for Public Welfare Research Institutes in Fujian (Grant No. 2018R1012-4, 2019R1029-5); the Project for Natural Science in Fujian (Grant No. 2020J011364); and the Project for Scientific and Technological Innovation Team of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No. CXTD2021004-2).

作者简介: 张应根(1976年生), 男, 助理研究员, 主要从事茶叶加工、茶叶生物化学及其综合利用方面的研究。E-mail: zhyg98@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: chenlin_xy@163.com

young shoots of oolong tea cultivars (spring vs autumn), and mature shoots of oolong tea cultivars (spring vs autumn). The different sources of fresh leaves (cultivars, shoots maturity and harvesting season) had significant or extremely significant effect on the total amount of FAAs and most of the components of FAAs. The higher contents of glycine, leucine and lysine and the lower content of γ -aminobutyric acid were the main difference components of fresh leaves in spring between oolong tea and green tea cultivars. The young shoots of oolong tea cultivars had higher content of arginine than mature shoots in the same harvesting season, and there were different characteristic components of fresh oolong tea leaves with different shoot maturity in spring and autumn. Therefore, it was suggested that the genetic characteristics of tea cultivars were dominant factors affecting the FAAs profile in fresh leaves. The specific chemical pattern of FAAs in fresh leaves of oolong tea provided a necessary material basis for the quality formation.

Key words: Oolong tea; Green tea; Tea shoots; Amino acids; Pattern recognition

茶树鲜叶中的游离氨基酸约占干重的 1%~4%，其与茶叶风味品质、质量等级和保健特性密切相关^[1]。迄今从茶叶中发现并鉴定的游离氨基酸多达 26 种，并以茶氨酸含量最为丰富^[2]。由于受茶树品种特性、自然环境、农艺措施、采摘标准和制茶工艺等诸多因素的影响，游离氨基酸在成品茶中呈现出多样化的组成轮廓特征^[3-8]。在茶叶加工过程中，特定的制作工序将促使在制品中的蛋白和非蛋白游离氨基酸发生一定的规律性变化。如在鲜叶萎凋或摊晾过程的蛋白水解将有助于游离氨基酸含量的增加、厌氧处理或机械损伤可明显提高 γ -氨基丁酸含量^[9]。此外，揉捻和发酵过程发生脱氨、脱羧或羟化作用，干燥过程的非酶促反应(如 Maillard 反应和 Strecker 降解)及渥堆过程的微生物代谢等引起的游离氨基酸变化亦可有效调节成品茶的风味品质^[10-11]。尽管如此，游离氨基酸在除黑茶外的其他茶类加工过程中的增减幅度较为有限，其在成品茶中的种类和含量在很大程度上仍由茶鲜叶原料所持有的游离氨基酸组成特征所决定^[12-13]。福建是乌龙茶的发祥地和主产区，独特的气候条件和地理环境，孕育了丰富的乌龙茶种质资源。特殊的鲜叶理化性状为乌龙茶加工品质形成奠定了必要的物质基础^[14-15]。通过前期对乌龙茶和绿茶品种一芽二或三叶及中小开面二至四叶的水浸出物、茶多酚、游离氨基酸总量、可溶性糖和咖啡因等主要品质成分的检测分析及化学模式识别结果表明，不同芽叶嫩度的春季乌龙茶与绿茶品种鲜叶的主要品质化学轮廓存在较好的类群区分，且乌龙茶品种春季和秋季鲜叶的主要品质成分亦有明显的季节性差异^[16-17]。为进一步探明乌龙茶品种鲜叶的化学品质特征，本试验以国家或省级审(认、鉴)定绿茶品种春季鲜叶为对照，对

采自乌龙茶品种春、秋两季的一芽二或三叶和中小开面二至四叶进行了游离氨基酸检测分析，并对不同鲜叶来源茶样的游离氨基酸组成轮廓进行了主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)等统计模式识别及差异特征成分筛选，以期为乌龙茶品种的生化鉴定和种质资源创新利用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试鲜叶均采自集中管理并分行种植于福建省茶树资源圃 4~5 龄试验茶园(27°13'57" N, 119°34'31" E)的 10 个绿茶品种春季第一轮新梢与 10 个乌龙茶品种春季和秋季第一轮新梢。春茶和秋茶样品采摘时间分别为 3 月 26 日—5 月 7 日、10 月 9 日—24 日。采摘标准：一芽二或三叶(简称幼嫩鲜叶)和中小开面二至四叶(简称成熟鲜叶)。绿茶品种包括：(1) 国家认(鉴)定绿茶品种‘福云 6 号’、‘福云 7 号’、‘福云 10 号’、‘福鼎大白茶’、‘福鼎大毫茶’、‘福安大白茶’和‘霞浦春波绿’；(2) 福建省审定绿茶品种‘九龙大白茶’、‘霞浦元宵茶’和‘早春毫’。乌龙茶品种按产地来源包括：(1) 新选品种‘茗科 1 号’和‘黄观音’，均为‘铁观音’(♀)与‘黄棪’(♂)人工杂交后代；(2) 闽北品种‘肉桂’、‘福建水仙’、‘大红袍’和‘矮脚乌龙’；(3) 闽南品种‘铁观音’、‘黄棪’、‘梅占’和‘白芽奇兰’。

氨基酸标准品：茶氨酸(THE)，纯度为 99%，瑞士 Adamas 试剂； γ -氨基丁酸(GABA)，纯度为 99%，美国 Sigma-Aldrich 试剂；L-谷氨酸(L-Glu)，BR 级，纯度 $\geq 98.5\%$ ，上海沪试试剂；17 种氨基酸混和标样(Agilent PN 5061-3331)：250 pmol/mL，溶于 0.1 mol/L HCl，内含天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、

丝氨酸(Ser)、组氨酸(His)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、半胱氨酸(Cys)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)和脯氨酸(Pro)。氨基酸衍生化试剂: (1) 硼酸缓冲液(Agilent PN: 5061-3339): 0.4 mol/L 水溶液, pH 10.2; (2) 邻苯二甲醛(OPA)试剂(Agilent PN: 5061-3335): 10 mg/mL, 溶于 0.4 mol/L 硼酸缓冲液和 3-巯基丙酸、甲醇和乙腈, HPLC 级, 美国 Sigma-Aldrich 试剂; 超纯水(自制)。除特殊要求外, 其余均为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器设备

6CHM-901 型电热式碧螺春烘干机(浙江省富阳茶叶机械总厂)。安捷伦 1260 Infinity 液相色谱系统, 包括四元泵(G1311C VL)、标准自动进样器(G1329B)、柱温箱(G1316A)和二极阵列检测器(G1315D VL); 化学工作站: ChemStation for LC 3D systems Rev. B.04.03。ACD-0502-U 实验室超纯水系统(重庆颐洋企业发展有限公司); PL203 电子天平(美国 Mettler-Toledo 集团); PB-21 标准型 pH 计(德国 Sartorius 公司); GM-0.33A 隔膜真空泵和 1L 溶剂过滤器(天津市津腾实验设备有限公司); DHG-9246A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); A11basic 分析研磨机; MS3 BASIC 小型涡旋混合器(德国 IKA 集团)。

1.3 方法

茶样制备 将电热式碧螺春烘干机升温至 180 °C, 开启风机, 投入鲜叶 150~180 g, 进行热风杀青(先闷后透, 温度 100 °C~105 °C, 约 10 min), 再将茶样转入电热恒温鼓风干燥箱, 80 °C 烘至足

干, 冷却后用锡箔袋真空密封包装, 于 -20 °C 冷冻保存备用。各供试茶样根据其鲜叶来源(茶树品种、芽叶嫩度和采摘季节)可划分为 6 个类群(表 1): 绿茶品种春季幼嫩鲜叶(YGS)、绿茶品种春季成熟鲜叶(MGS)、乌龙茶品种春季幼嫩鲜叶(YOS)、乌龙茶品种春季成熟鲜叶(MOS)、乌龙茶品种秋季幼嫩鲜叶(YOA)和乌龙茶品种秋季成熟鲜叶(MOA)。

游离氨基酸组分测定 (1) 茶样预处理: 准确称取 0.400 g 粉碎茶样(过 40 目筛), 置 50 mL 具塞试管中, 加入 40 mL 蒸馏水, 沸水浴充分浸提 1 h (30 min 时摇匀 1 次), 冷却后加水定容至 40 mL, 摇匀后滤去茶渣, 茶汤经 0.45 μm 水膜过滤待测; (2) 柱前衍生化自动进样程序: 吸取 2.5 μL 硼酸盐缓冲液→吸取 0.5 μL 样品, 混合, 等待 0.5 min→用水清洗针头→吸取 0.5 μL OPA, 混合→用水清洗针头→吸取 32.5 μL 水, 混合→进样; (3) 色谱分析条件: 色谱柱: ZORBAX Eclipse-AAA (4.6 mm×150 mm, 粒径: 5 μm, 美国 Agilent 公司), 柱温 40 °C; 流动相: 40 mmol/L Na₂HPO₄ (A 相, pH7.8)和乙腈:甲醇:水(45:45:10, V/V/V)(B 相)。梯度洗脱程序: 100% A (0 min)→100% A (1.9 min)→43% A、57% B (18.1 min)→100% B (18.6 min)→100% B (22.3 min)→100% A (23.2 min)→100% A (26 min), 后运行时间: 3 min。进样量: 10 μL; 流速: 2 mL/min; 检测波长: 338 nm。(4) 游离氨基酸定量: 在 100 μL 的氨基酸混和标样中加入 1 μL 茶氨酸(20 mg/mL)和 1 μL γ-氨基丁酸(2 mg/mL), 稀释成 4 个浓度梯度(25、50、125 和 250 pmol/mL), 并按步骤(2)和(3)进行氨基酸标准品的自动在线衍生化检测。随后以游离氨基酸色谱峰面积为纵坐标, 氨基酸进样浓度为横坐标绘制标准曲线, 并将其

表 1 茶样编码及其鲜叶来源

Table 1 Codes of tea samples and fresh leaf sources

绿茶品种 Green tea cultivar	幼嫩 Young	成熟 Mature	乌龙茶品种 Oolong tea cultivar	幼嫩 Young		成熟 Mature	
				春季 Spring	秋季 Autumn	春季 Spring	秋季 Autumn
‘福云 6 号’ ‘Fuyun 6’	YGS1	MGS1	‘茗科 1 号’ ‘Mingke 1’	YOS1	YOA1	MOS1	MOA1
‘福云 7 号’ ‘Fuyun 7’	YGS2	MGS2	‘黄观音’ ‘Huangguanyin’	YOS2	YOA2	MOS2	MOA2
‘福云 10 号’ ‘Fuyun 10’	YGS3	MGS3	‘肉桂’ ‘Rougui’	YOS3	YOA3	MOS3	MOA3
‘福鼎大白茶’ ‘Fuding Dabaicha’	YGS4	MGS4	‘福建水仙’ ‘Fujian Shuixian’	YOS4	YOA4	MOS4	MOA4
‘福鼎大毫茶’ ‘Fuding Dahaocha’	YGS5	MGS5	‘大红袍’ ‘Dahongpao’	YOS5	YOA5	MOS5	MOA5
‘福安大白茶’ ‘Fuan Dabaicha’	YGS6	MGS6	‘矮脚乌龙’ ‘Aijiaowulong’	YOS6	YOA6	MOS6	MOA6
‘霞浦春波绿’ ‘Xiapu Chunbolv’	YGS7	MGS7	‘铁观音’ ‘Tieguanyin’	YOS7	YOA7	MOS7	MOA7
‘九龙大白茶’ ‘Jiulong Dabaicha’	YGS8	MGS8	‘黄棪’ ‘Huangdan’	YOS8	YOA8	MOS8	MOA8
‘霞浦元宵茶’ ‘Xiapu Yuanxiaocha’	YGS9	MGS9	‘梅占’ ‘Meizhan’	YOS9	YOA9	MOS9	MOA9
‘早春毫’ ‘Zaochunhao’	YGS10	MGS10	‘白芽奇兰’ ‘Baiyaqilan’	YOS10	YOA10	MOS10	MOA10

应用于供试茶样中游离氨基酸组分的定量分析^[18]。茶样干物质含量参照 GB/T 8303—2013, 采用 120 °C 烘干法测定^[19]。

1.4 统计分析

预先将液相色谱化学工作站 ChemStation B.04.03 创建的各供试茶样游离氨基酸组分数据文件转换成标准 AIA 格式文件, 并将其导入到化学指纹图谱系统解决方案软件 ChemPattern 2017 [科迈恩(北京)科技有限公司]进行各检出峰定性、多组分定量、色谱图绘制和供试茶样游离氨基酸组成轮廓的可视化模式识别[主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)]。采用 SIMCA 17 (德国 Sartorius Stedim Data Analytics AB 公司)确定各 PLS-DA 模型的最佳潜变量数, 开展所构建模型的交互验证预测残差的方差分析(CV-ANOVA)和置换检验($n=200$), 同时应用 R 4.0.5 软件(奥地利维也纳统计计算 R 基金会)及其程序包 agricolae 1.3-5 (秘鲁拉莫利纳国立农业大学)对不同鲜叶来源茶样的氨基酸总量及其组分进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和组间差异显著性比较(LSD 法, P 值采用 Bonferroni 校正)。

2 结果和分析

2.1 茶样游离氨基酸组成轮廓的模式识别

从图 1 和 2 可见, 各供试茶样游离氨基酸的高效液相色谱轮廓相似, 且均以 THE 色谱峰响应值

最高, 其次为谷氨酸、天冬氨酸、酪氨酸和精氨酸, 而半胱氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸和亮氨酸等仅在部分茶样中少量检出。

分别以各游离氨基酸含量最小值的 1/5 对相应游离氨基酸进行缺失值填充, 并通过基于变量均一化预处理的 PCA 建模结果表明, 全部供试茶样的游离氨基酸组成化学模式可用 3 个主成分来刻画, 其方差贡献度分别为 31.11% (PC1)、25.34% (PC1)和 10.20% (PC3), 累积方差贡献率达 66.65%。由图 3 可见, 不同来源茶样在前 2 个主成分(PC1×PC2)二维得分视图的平面分布可按茶树品种特性(绿茶 vs 乌龙茶)划分成 2 大类群(半胱氨酸、 γ -氨基丁酸、赖氨酸、甘氨酸、和亮氨酸等为主要区分性成分), 同时各茶样亦可根据芽叶嫩度(幼嫩 vs 成熟)和采摘季节(春季 vs 秋季)进行一定的类群区分, 具体表现为: (1) 相同芽叶嫩度茶鲜叶可按茶树品种特性进行相互间的类群区分(YGS vs YOS、MGS vs MOS); (2) 春季乌龙茶品种相较绿茶品种鲜叶具有更为明显的芽叶嫩度区分, 且秋季乌龙茶鲜叶亦有较明显的采摘嫩度区分(YOS vs MOS、YOA vs MOA); (3) 相同芽叶嫩度的乌龙茶鲜叶存在较明显的采摘季节差异(YOS vs YOA、MOS vs MOA), 并以秋季鲜叶和成熟鲜叶样品的群体分布较春季鲜叶样品更为聚集。

PLS-DA 建模结果表明(图 4, 5), 绿茶与乌龙茶品种春季幼嫩鲜叶(YGS vs YOS)、绿茶与乌龙茶品

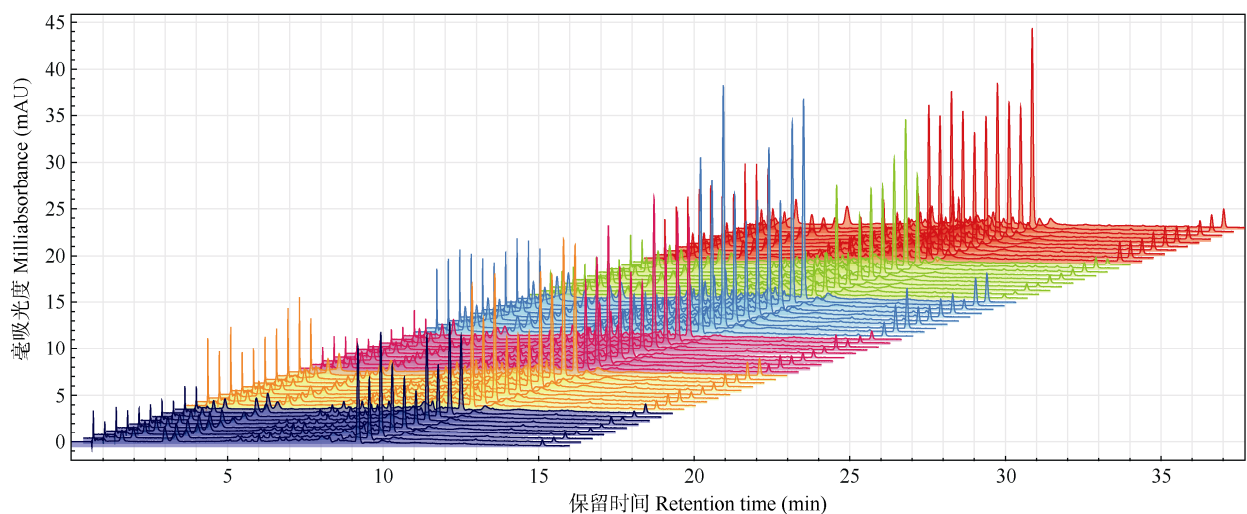


图 1 茶样的游离氨基酸高效液相色谱图。自上而下依次为 YGS1~YGS10、MGS1~MGS10、YOS1~YOS10、MOS1~MOS10、YOA1~YOA10 和 MOA1~MOA10。

Fig. 1 HPLC of FAAs in tea samples. From top to bottom are YGS1~YGS10, MGS1~MGS10, YOS1~YOS10, MOS1~MOS10, YOA1~YOA10 and MOA1~MOA10, respectively.

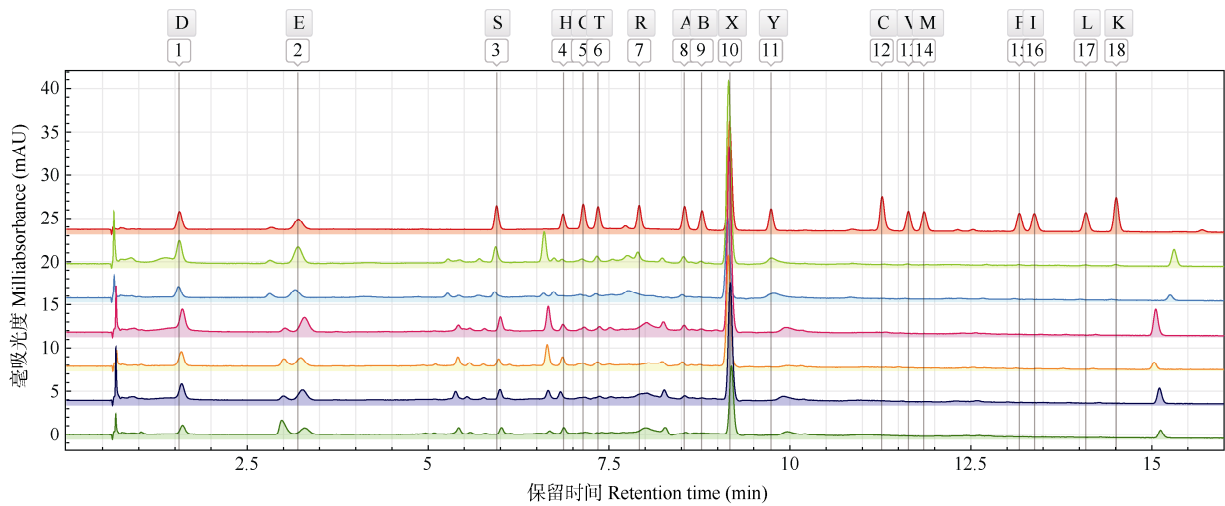


图 2 代表性茶样游离氨基酸的高效液相色谱图。自上而下依次为氨基酸标准品(AAS)、YGS1、MGS1、YOS1、MOS1、YOA1 和 MOA1。D: 天冬氨酸; E: 谷氨酸; S: 丝氨酸; H: 组氨酸; G: 甘氨酸; T: 苏氨酸; R: 精氨酸; A: 丙氨酸; B: γ -氨基丁酸; X: 茶氨酸; Y: 酪氨酸; C: 半胱氨酸; V: 缬氨酸; M: 蛋氨酸; F: 苯丙氨酸; I: 异亮氨酸; L: 亮氨酸; K: 赖氨酸。

Fig. 2 HPLC of FAAs in representative tea samples. From top to bottom are amino acid standard (AAS), YGS1, MGS1, YOS1, MOS1, YOA1 and MOA1. D: Aspartic acid; E: Glutamate; S: Serine; H: Histidine; G: Glycine; T: Threonine; R: Arginine; A: Alanine; B: Gamma aminobutyric acid; X: Theanine; Y: Tyrosine; C: Cysteine; V: Valine; M: Methionine; F: Phenylalanine; I: Isoleucine; L: Leucine; K: Lysine.

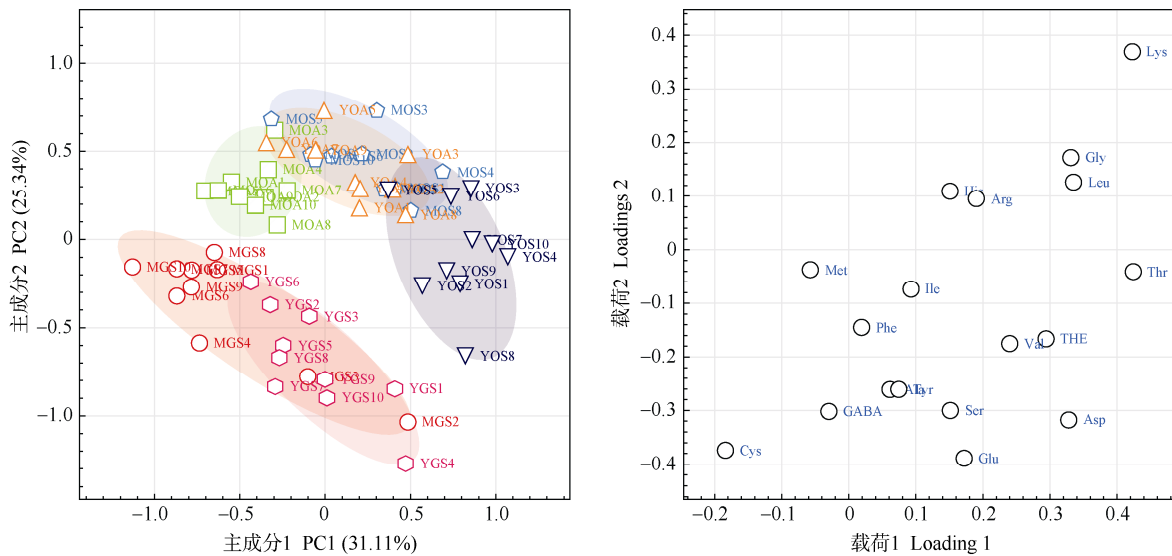


图 3 基于供试茶样游离氨基酸组成轮廓的主成分分析。YGS1~YGS10、MGS1~MGS10、YOS1~YOS10、YOA1~YOA10、MOS1~MOS10 和 MOA1~MOA10 见表 1; Asp: 天冬氨酸; Glu: 谷氨酸; Ser: 丝氨酸; His: 组氨酸; Gly: 甘氨酸; Thr: 苏氨酸; Arg: 精氨酸; Ala: 丙氨酸; GABA: γ -氨基丁酸; THE: 茶氨酸; Tyr: 酪氨酸; Cys: 半胱氨酸; Val: 缬氨酸; Met: 蛋氨酸; Phe: 苯丙氨酸; Ile: 异亮氨酸; Leu: 亮氨酸; Lys: 赖氨酸。下同

Fig. 3 Principal component analysis based on FAAs profile in tea samples. YGS1~YGS10, MGS1~MGS10, YOS1~YOS10, YOA1~YOA10, MOS1~MOS10, and MOA1~MOA10 see Table 1. Asp: Aspartic acid; Glu: Glutamate; Ser: Serine; His: Histidine; Gly: Glycine; Thr: Threonine; Arg: Arginine; Ala: Alanine; GABA: Gamma aminobutyric acid; THE: Theanine; Tyr: Tyrosine; Cys: Cysteine; Val: Valine; Met: Methionine; Phe: Phenylalanine; Ile: Isoleucine; Leu: Leucine; Lys: Lysine. The same below

种春季成熟鲜叶(MGS vs MOS)、春季乌龙茶品种幼嫩与成熟鲜叶(YOS vs MOS)、秋季乌龙茶品种幼嫩与成熟鲜叶(YOA vs MOA)、春季和秋季乌龙茶品

种幼嫩鲜叶(YOS vs YOA)及春季和秋季乌龙茶品种成熟鲜叶(MOS vs MOA)在前 2 个潜变量(LV1×LV2)二维得分视图的平面分布均具有良好的类群

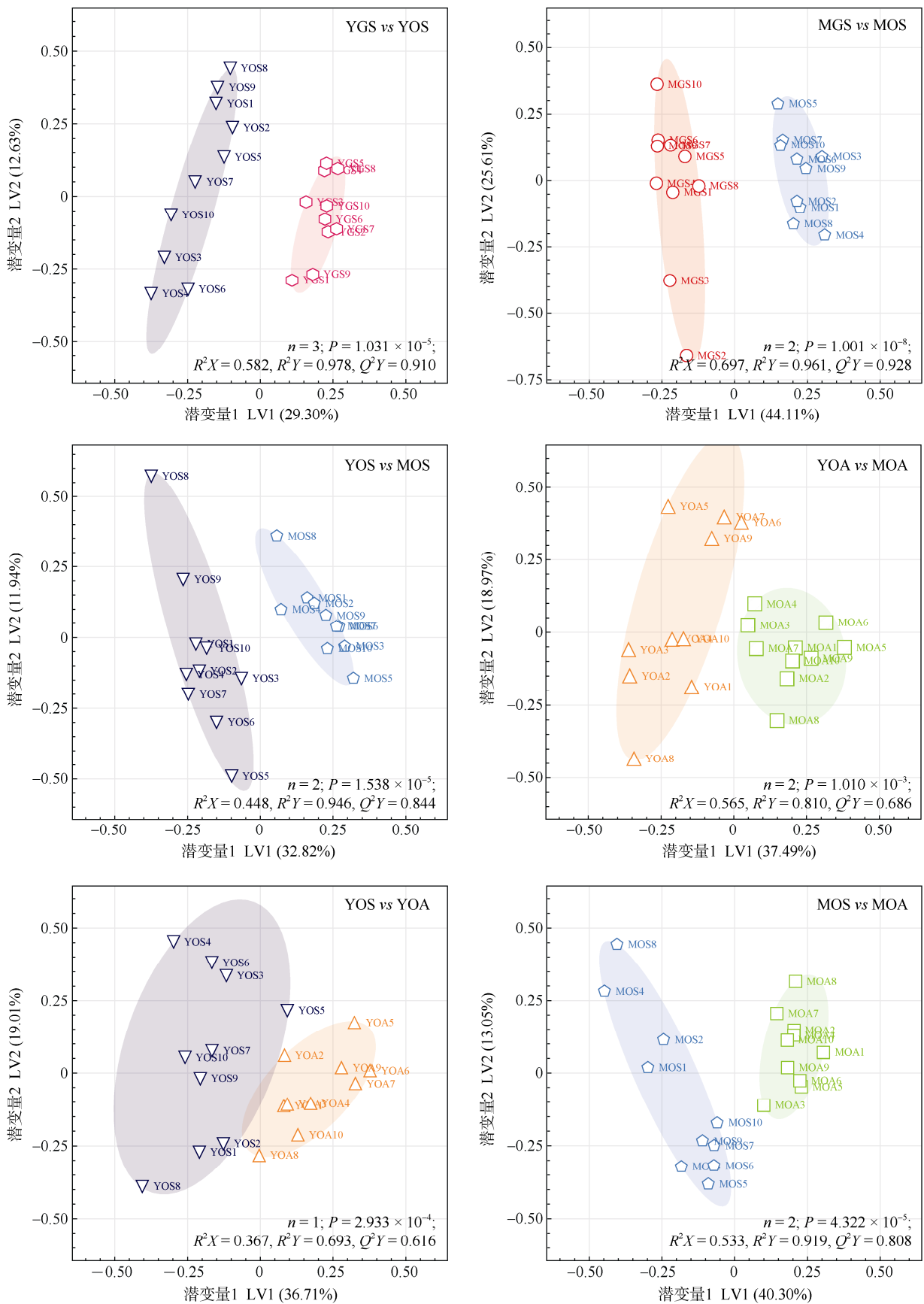


图 4 基于供试茶样游离氨基酸组成轮廓的偏最小二乘判别分析

Fig. 4 Partial least squares discriminant analysis based on the free amino acids profile in tea samples

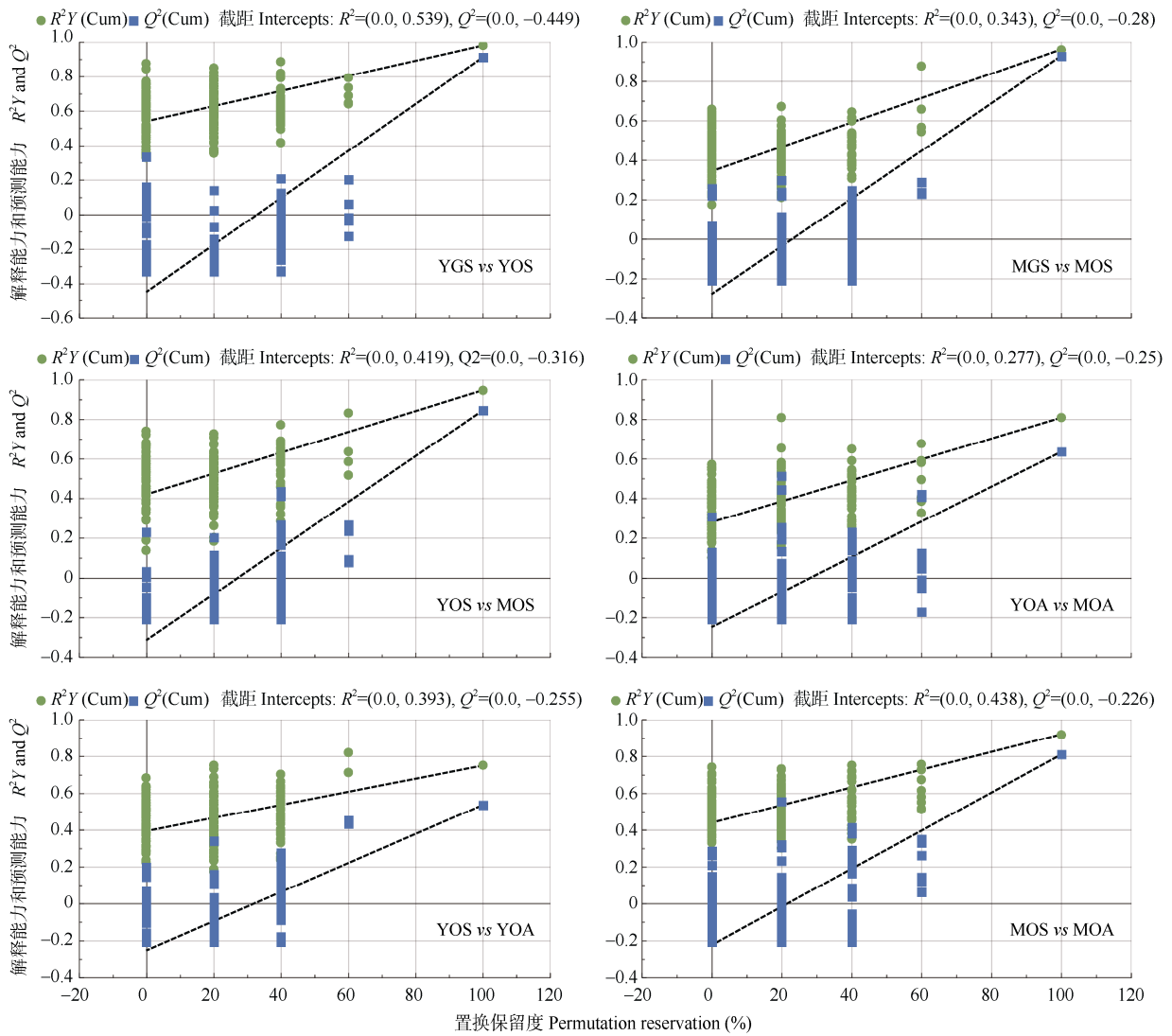


图 5 不同鲜叶来源茶样偏最小二乘判别分析模型的响应排序检验

Fig. 5 Permutation test of partial least squares discriminant analysis for tea samples from different fresh leaf sources

区分。通过 7 次循环交互验证(7-fold CV)确定各判别分析模型的最优潜变量数, 并采用交互验证预测残差的方差分析(CV-ANOVA)和置换检验($n=200$)对模型的有效性检验结果显示, 各模型两组间均有极显著差异($P<0.01$), 且不存在过拟合现象。这表明乌龙茶与绿茶品种春季幼嫩鲜叶或成熟鲜叶的游离氨基酸组成化学模式存在客观的类群区分, 且其亦受芽叶嫩度和采摘季节的影响。

2.2 乌龙茶品种鲜叶游离氨基酸组成特征分析

One-Way ANOVA 结果表明, 不同类群茶样的游离氨基酸总量有极显著差异($P<0.01$), 且其他游离氨基酸组分(除蛋氨酸和异亮氨酸外)亦有显著($P<0.05$)或极显著差异(表 2)。结合 PLS-DA 模型中的变量投影重要性($VIP>1$)和多重比较分析(LSD 法)

结果表明: (1) 较高的 GABA 含量和较低的甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸含量是区分绿茶与乌龙茶品种春季幼嫩鲜叶(YGS vs YOS)的主要差异性成分, 而较高的 γ -氨基丁酸、酪氨酸、半胱氨酸含量和较低的甘氨酸、苏氨酸、亮氨酸、赖氨酸含量则是区分绿茶与乌龙茶品种春季成熟鲜叶(MGS vs MOS)的主要差异性成分; (2) 较高的天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、精氨酸、茶氨酸和酪氨酸含量是区分春季乌龙茶品种幼嫩与成熟鲜叶(YOS vs MOS)的主要差异性成分, 而较高的精氨酸和赖氨酸含量则是区分秋季乌龙茶品种幼嫩与成熟鲜叶(YOA vs MOA)的主要差异性成分; (3) 较高的天冬氨酸、谷氨酸、茶氨酸和缬氨酸含量是区分春季和秋季乌龙茶品种幼嫩鲜叶(YOS vs YOA)的主要差异性成分, 而较高

的亮氨酸和赖氨酸含量则是区分春季和秋季乌龙茶品种成熟鲜叶(MOS vs MOA)的主要差异性成分。由此可见,较高的甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸含量和较低的 γ -氨基丁酸含量是乌龙茶品种有别于绿

茶品种春季鲜叶的主要差异性成分;相同采摘季节的乌龙茶品种幼嫩鲜叶相较成熟鲜叶拥有更高的精氨酸含量,而不同芽叶嫩度的春季和秋季乌龙茶鲜叶存在不同的差异特征组分。

表 2 茶样游离氨基酸组分的含量(mg/g DW)

Table 2 Free amino acid contents (mg/g DW) in tea samples

氨基酸 Amino acid	YGS	MGS	YOS	MOS	YOA	MOA
Asp	1.949±0.520ab	1.394±0.419bc	2.398±0.505a	1.342±0.381c	1.316±0.356c	1.181±0.199c
Glu	3.159±0.783a	2.283±0.651bc	2.947±0.692ab	1.376±0.406d	1.758±0.516cd	1.620±0.365cd
Ser	0.965±0.227a	0.449±0.214c	0.707±0.205b	0.364±0.090c	0.537±0.160bc	0.378±0.099c
His	0.834±0.528ab	0.720±0.391b	1.163±0.361ab	1.436±0.640a	0.954±0.466ab	0.832±0.467ab
Gly	0.067±0.048cd	0.025±0.030d	0.154±0.040a	0.147±0.042a	0.124±0.021ab	0.092±0.031bc
Thr	0.251±0.097ab	0.144±0.089c	0.350±0.0580a	0.287±0.084a	0.248±0.069abc	0.176±0.049bc
Arg	1.092±1.159b	0.402±0.248b	2.150±0.965a	0.749±0.572b	2.246±0.503a	1.002±0.421b
Ala	0.297±0.127a	0.181±0.090bc	0.171±0.065bc	0.195±0.051ab	0.085±0.057c	0.123±0.051bc
GABA	0.180±0.102a	0.110±0.024b	0.050±0.027bc	0.017±0.017c	0.030±0.036c	0.013±0.028c
THE	15.467±2.670ab	8.518±4.016c	18.764±5.389a	12.856±3.035bc	11.817±3.884bc	8.671±2.768c
Tyr	2.213±0.734a	1.003±0.655bc	1.589±0.646ab	0.111±0.080d	1.239±0.549bc	0.523±0.258cd
Cys	0.043±0.056b	0.099±0.055a	0.015±0.032b	0.007±0.021b	ND	ND
Val	0.029±0.029ab	0.027±0.050ab	0.051±0.038a	0.031±0.027ab	ND	ND
Met	0.006±0.009a	0.013±0.041a	0.004±0.009a	ND	ND	0.002±0.006a
Phe	0.028±0.032ab	0.053±0.068a	0.015±0.024ab	0.012±0.018ab	0.012±0.017ab	0.001±0.003b
Ile	0.004±0.013a	0.026±0.049a	0.022±0.028a	0.012±0.013a	ND	ND
Leu	ND	0.007±0.017b	0.035±0.023a	0.033±0.019a	0.024±0.027ab	ND
Lys	ND	ND	0.176±0.041a	0.144±0.02a	0.154±0.017a	0.042±0.068b
总和 Total	26.584±4.314ab	15.455±5.746c	30.762±5.992a	19.121±4.025c	20.544±5.147bc	14.655±3.457c

同行数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$, LSD 法检验); ND: 未检出。

Data followed different letters in the same line indicate significant difference at 0.05 level by LSD test. ND: Not detected.

3 结论和讨论

3.1 乌龙茶与绿茶品种春季鲜叶游离氨基酸组成存在模式差异

尽管受鲜叶原料特性和制茶工艺技术的影响,不同茶类中游离氨基酸组成特征存在一定的规律性差异。Horanni 等^[20]对白茶、绿茶、红茶、乌龙茶和普洱茶共 86 份茶样的研究表明,白茶拥有最高的游离氨基酸和较高的 γ -氨基丁酸、天冬酰胺含量,且游离氨基酸(尤其是精氨酸)含量与茶样氧化(发酵)程度呈反比。Zhou 等^[21]对市售白茶、绿茶、红茶、乌龙茶和黑茶共 28 份茶样进行检测,结果表明绿茶具有较高含量的鲜爽味氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸和茶氨酸),而白茶则以鲜甜味氨基酸(甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸)更为丰富;茶氨酸、精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸可作为区分不同发酵程度茶类的主要差异成分。

Alcazar 等^[22]对绿茶、白茶、红茶、乌龙茶和普洱茶共 94 份茶样的游离氨基酸进行检测,将天冬酰胺、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、谷氨酸和丝氨酸作为输入变量,使用反向传播多层感知器(BP-MLP)人工神经网络可对全部茶样按茶类进行 100%区分。本试验通过 PCA 建模能有效呈现茶树品种特性、芽叶嫩度和采摘季节对供试茶样游离氨基酸组成轮廓的影响,且春季供试茶样亦可按茶树品种特性划分成乌龙茶与绿茶品种两种类群。可见,在一致的生育树龄、生态环境和栽培管理条件下,春季茶鲜叶中游离氨基酸组成(含量和比例)的模式差异可作为区分乌龙茶与绿茶品种的重要生化鉴别依据。

3.2 低含量氨基酸为区分乌龙茶与绿茶品种的主要标识性成分

乌龙茶鲜叶原料通常采自乌龙茶品种顶芽形成驻芽的幼嫩新梢(即中小开面二至四叶),这与其

他茶类对鲜叶原料的采摘标准存在较大差异。已有研究表明, 在乌龙茶品种茶树新梢生育过程中, 游离氨基酸(尤其是茶氨酸)将发生明显的增减变化^[23]。通过比较不同鲜叶来源茶样的游离氨基酸总量可以看出, 春季绿茶和乌龙茶幼嫩鲜叶中的游离氨基酸总量均显著高于成熟鲜叶。另从本试验可以看出, 芽叶嫩度对乌龙茶品种鲜叶游离氨基酸组成轮廓的影响仅次于茶树品种特性引起的茶样类群区分。值得关注的是, 甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸和 γ -氨基丁酸等低含量氨基酸为区分乌龙茶与绿茶品种的主要标识成分, 而茶氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和精氨酸等含量较高的游离氨基酸则为春季乌龙茶品种幼嫩与成熟鲜叶(YOS vs MOS)的主要差异性成分, 据此表明茶鲜叶中高含量的游离氨基酸对乌龙茶品种鉴别并无主导作用。由于茶鲜叶中特有的茶氨酸高含量特征及各游离氨基酸比例分布的不均衡性, 本试验采用邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生反相高效液相色谱(紫外吸收)法对供试茶样中低含量的游离氨基酸检出能力较为有限。近年融合生物小分子(分子量<1 000)高通量检测和大数据分析的代谢组学作为系统生物学研究的重要组成部分, 其基本方法被逐步应用于茶叶生化成分及其代谢与转化机制研究^[24-25]。因此, 随着现代仪器分析检测技术的快速发展及其在茶树品种鉴定领域的深入应用, 同时选择多绿茶品种为对照, 相信更多乌龙茶品种鲜叶的生化组成特征将会被不断挖掘出来, 从而有效推动高香或特色乌龙茶新品种的选育与鉴定。

综上, 茶树品种、芽叶嫩度和采摘季节均为影响茶鲜叶的游离氨基酸组成轮廓的重要因素, 其中茶树品种遗传特性是影响茶树鲜叶游离氨基酸组成轮廓的主导因子。茶叶中的游离氨基酸组成、含量及其降解和转化产物可直接或间接地影响茶叶的风味品质, 故乌龙茶特定的鲜叶游离氨基酸组成化学模式为其加工品质的形成提供了必要的物质基础。

参考文献

- [1] ZHAO M, MA Y, DAI L L, et al. A high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of 21 free amino acids in tea [J]. *Food Anal Methods*, 2013, 6(1): 69–75. doi: 10.1007/s12161-012-9408-4.
- [2] LI J, MA J M, LI Q, et al. Determination of 35 free amino acids in tea using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 767801. doi: 10.3389/fnut.2021.767801.
- [3] XU Y X, YANG L, LEI Y S, et al. Integrated transcriptome and amino acid profile analyses reveal novel insights into differential accumulation of theanine in green and yellow tea cultivars [J]. *Tree Physiol*, 2022, 42(7): 1501–1516. doi: 10.1093/treephys/tpac016.
- [4] SYU K Y, LIN C L, HUANG H C, et al. Determination of theanine, GABA, and other amino acids in green, oolong, black, and Pu-erh teas with dabsylation and high-performance liquid chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17): 7637–7643. doi: 10.1021/jf801795m.
- [5] LI M, LI D X, TAI Y L, et al. Determination of free amino acids in tea by a novel method of reversed-phase high performance liquid chromatography applying 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate reagent [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 55(10): 4276–4286. doi: 10.1007/s13197-018-3366-9.
- [6] KAZAN R M, SEDDIK H A, MARSTANI Z M, et al. Determination of amino acids content in tea species using liquid chromatography via pre-column fluorescence derivatization [J]. *Microchem J*, 2019, 150: 104103. doi: 10.1016/j.microc.2019.104103.
- [7] LI J J, FU B B, HUO D Q, et al. Discrimination of Chinese teas according to major amino acid composition by a colorimetric IDA sensor [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2017, 240: 770–778. doi: 10.1016/j.snb.2016.09.019.
- [8] JIA X L, YE J H, WANG H B, et al. Characteristic amino acids in tea leaves as quality indicator for the evaluation of Wuyi Rock Tea in different culturing regions [J]. *J Appl Bot Food Qual*, 2018, 91: 187–193.
- [9] YU Z M, YANG Z Y. 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]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(5): 844–858. doi: 10.1080/10408398.2018.1552245.
- [10] YU P H, HUANG H, ZHAO X, et al. Dynamic variation of amino acid content during black tea processing: A review [J]. *Food Rev Int*, 2022. doi: 10.1080/87559129.2021.2015374.
- [11] CHEN S S, FU Y, BIAN X Q, et al. Investigation and dynamic profiling of oligopeptides, free amino acids and derivatives during Pu-erh tea fermentation by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2022, 371: 131176. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131176.
- [12] CHEN L, CHEN J, WANG L L, et al. Chemical patterns of polyphenols and free amino acids in teas affected by processing methods [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2017, 32(3): 287–293. [陈林, 陈键, 王丽丽, 等.

- 不同茶类制法对茶多酚和游离氨基酸化学模式的影响 [J]. 福建农业学报, 2017, 32(3): 287–293. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2017.03.012.]
- [13] 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]. J Food Compos Anal, 2019, 77: 28–38. doi: 10.1016/j.jfca.2019.01.005.
- [14] GUO J C. Species characteristics and genetic variation of oolong tea germplasm resources [C]// Proceedings of Fourth Tea Industry Symposium across the Taiwan Straits. Pujiang: China Tea Science Society, 2006: 28–33. [郭吉春. 乌龙茶品种资源的种性特征及遗传变异 [C]// 第四届海峡两岸茶业学术研讨会论文集. 蒲江: 中国茶叶学会, 2006: 28–33.]
- [15] CHEN R B, LIN Z H, PENG A. Research progress of oolong tea in the past 30 years [J]. China Agric Inf, 2008(12): 23–26. [陈荣冰, 林郑和, 彭艾. 30 年乌龙茶的研究进展 [J]. 中国农业信息, 2008(12): 23–26. doi: 10.3969/j.issn.1672-0423.2008.12.008.]
- [16] CHEN L, SONG Z S, CHEN J, et al. Profiling the functional constituents in *Camellia sinensis* shoots desired for making oolong teas [J]. Acta Tea Sin, 2018, 59(4): 193–198. [陈林, 宋振硕, 陈键, 等. 适制乌龙茶品种新梢主要品质化学轮廓的模式识别研究 [J]. 茶叶学报, 2018, 59(4): 193–198. doi: 10.3969/j.issn.1007-4872.2018.04.003.]
- [17] CHEN L, XIANG L H, WANG L L, et al. HPLC profiling of catechins and purine alkaloids in leaves of oolong and green tea cultivars [J]. Fujian J Agric Sci, 2018, 33(1): 21–28. [陈林, 项丽慧, 王丽丽, 等. 乌龙茶和绿茶品种茶鲜叶儿茶素类和嘌呤碱 HPLC 指纹图谱特征比较 [J]. 福建农业学报, 2018, 33(1): 21–28. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2018.01.005.]
- [18] SONG Z S, WANG L L, CHEN J, et al. Changes on free amino acids in fresh tea leaves during withering [J]. Acta Tea Sin, 2015, 56(4): 206–213. [宋振硕, 王丽丽, 陈键, 等. 茶鲜叶萎凋过程中游离氨基酸的动态变化规律 [J]. 茶叶学报, 2015, 56(4): 206–213. doi: 10.3969/j.issn.1007-4872.2015.04.003.]
- [19] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 8303–2013 Tea: Preparation of ground sample and determination of dry matter content [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 8303–2013 茶 磨碎试样的制备及其干物质含量测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.]
- [20] HORANNI R, ENGELHARDT U H. Determination of amino acids in white, green, black, oolong, pu-erh teas and tea products [J]. J Food Compos Anal, 2013, 31(1): 94–100. doi: 10.1016/j.jfca.2013.03.005.
- [21] ZHOU P, ZHAO F, CHEN M J, et al. Determination of 21 free amino acids in 5 types of tea by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a modified 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method [J]. J Food Compos Anal, 2019, 81: 46–54. doi: 10.1016/j.jfca.2019.05.007.
- [22] ALCÁZAR A, BALLESTEROS O, JURADO J M, et al. Differentiation of green, white, black, oolong, and Pu-erh teas according to their free amino acids content [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(15): 5960–5965. doi: 10.1021/jf070601a.
- [23] CHEN L, CHEN J, ZHANG Y G, et al. Variations in free amino acid fingerprints during quality formation of fresh scent-flavor Oolong tea [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2012, 28(17): 244–252. [陈林, 陈键, 张应根, 等. 清香型乌龙茶品质形成中游离氨基酸指纹图谱变化规律 [J]. 农业工程学报, 2012, 28(17): 244–252. doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2012.17.036.]
- [24] JIANG C K, MA J Q, APOSTOLIDES Z, et al. Metabolomics for a millenniums-old crop: Tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(23): 6445–6457. doi: 10.1021/acs.jafc.9b01356.
- [25] CAI H L, ZHONG Z H, LI Z M, et al. Metabolomics in quality formation and characterization of tea products: A review [J]. Int J Food Sci Technol, 2022, 57(7): 4001–4014. doi: 10.1111/ijfs.15767.