基于 LOX-HPL 途径的武夷肉桂加工中香气物质的形成与调控

周子维[1,2]，刘宝顺[3]，武清扬[1,2]，毕婉君[1,2]，倪子鑫[1,2]，赖钟雄[2]，孙 云[*1]

（1. 福建农林大学 园艺学院/茶学福建省高校重点实验室，福建 福州 350002；2. 福建农林大学 园艺植物生物工程研究所，福建 福州 350002；3. 武夷山市幔亭岩茶研究所，福建 武夷山 354300）

摘要：武夷肉桂是以福建省级茶树良种肉桂（*Camellia sinensis* cv. Rougui）鲜叶为原料制成的乌龙茶，具有"岩骨花香"的品质特征，深受消费者青睐。除茶树鲜叶外，武夷肉桂的品质形成很大程度上取决于加工工艺，但生产加工过程中以绿叶挥发物（Green Leaf Volatiles，GLVs）和果酯类为代表的脂肪族类香气成分代谢机理的研究，尚未见报道。以武夷肉桂的鲜叶、晒青叶及做青过程叶为试材，采用顶空固相微萃取法（Headspace Solid-Phase Microextraction，HS-SPEM）结合气相色谱与高通量飞行时间质谱联用技术（Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry，GC-TOF-MS）对加工过程样中的脂肪族类香气成分检测发现：脂肪族醛类在做青过程中显著降低，而大量的脂肪族醇类和酯类显著积累，其中叶醇酯类和己烯醇、酯类分别对静置失水和机械损伤存在响应；利用紫外/可见分光光度法检测加工过程样中 LOX-HPL 途径中关键酶活力，结果表明，脂肪氧合酶（Lipoxygenase，LOX）、乙醇脱氢酶（Alcohol dehydrogenase，ADH）及乙醇酰基转移酶（Alcohol acyltransferases，AAT）的活力分别在第三次摇青叶（3T）、第四次摇青后叶（4T）及第五次摇青后叶（5T）中达到最大值；实时荧光定量聚合酶链式反应（Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction，qRT-PCR）结果表明，*CsLOX2*、*CsLOX5* 基因主要在做青初始阶段（2T、3T）相对表达量较高，而随着工艺过程的推进，Cs*ADH2-1*、*CsAAT* 基因在做青后期（4T、5T）开始上调表达；通过 Pearson 系数评估武夷肉桂加工过程中的脂肪族类香气、酶活力和基因表达量间的相关性，发现正己醇、戊酸叶醇酯、己酸己酯、丁酸甲基叶醇酯、柳酸叶醇酯等大量具有天然花果香的脂肪族醇类和酯类与 *CsADH2-1* 基因具有显著（$P<0.05$）或极显著（$P<0.01$）的正相关，*CsAAT* 基因与 *CsLOX2*、*CsLOX5* 基因在加工过程中具有相似的表达模式（$r=0.762$，$r=0.732$）。LOX-HPL 途径关键基因的共表达，驱动了脂肪族类香气在加工过程中的协同积累，是武夷肉桂馥郁香气形成的重要基础。

关键词：脂肪氧合酶；途径；武夷岩茶；加工过程；香气；酶活力；基因

中图分类号：S 57.1　**文章编号：**1673-1689(2021)01-0100-12　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.01.013

收稿日期：2019-10-05

基金项目：国家现代农业（茶叶）产业技术体系建设专项（CARS-19）；福建农林大学科技创新基金项目（cxzx2017178）。

*通信作者：孙 云（1964—），女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事茶叶加工与生物技术研究。E-mail：sunyun1125@126.com

研究论文

Formation and Regulation of Aroma-Related Volatiles During the Manufacturing Process of Wuyi Rougui Tea via LOX-HPL Pathway

ZHOU Ziwei[1,2], *LIU Baoshun*[3], *WU Qingyang*[1,2], *BI Wanjun*[1,2], *NI Zixin*[1,2], *LAI Zhongxiong*[2], *SUN Yun*[*1]

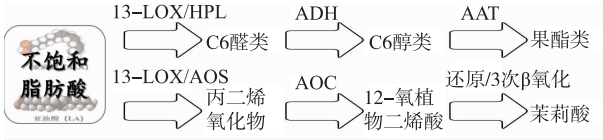
(1. College of Horticulture Key Laboratory of Tea Science in Fujian Province, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002,China;2. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;3. Wuyishan Manting Rock Tea Research Institute, Wuyishan 354300, China)

Abstract: Wuyi Rougui tea is a kind of oolong tea made from the fresh leaves of *Cinnamomum cassia* (*Camellia sinensis* cv. Rougui), which is a provincial improved tea tree variety in Fujian Province and deeply favored by consumers because of the characterization of 'rock in the throat, flower in the mouth'. Besides fresh tea leaves, the aroma quality of Wuyi Rougui tea depend greatly on the manufacturing process. However, studies on the metabolic mechanism of aliphatic aroma components represented by green leaf volatiles (GLVs) and fruit esters during process have not been reported. Fresh tea leaves, solar-withering leaves and turn-over leaves of Wuyi Rougui tea were used as test samples. The detection of aliphatic aroma components in samples during manufacture was done by headspace solid phase microextraction (HS-SPEM) combined with gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS) . The aliphatic aldehydes were significantly reduced during the turn-over process, while a large amount of aliphatic alcohols and esters were formed and accumulated. Among them, leaf alcohol esters, hexenols and hexenyl esters could responded to water loss and mechanical damage, respectively. The key enzyme activities in the LOX-HPL pathway during process was detected by UV/visible spectrophotometry. The results indicated that the activities of lipoxygenase (LOX), alcohol dehydrogenase (ADH) and alcohol acyltransferases (AAT) reached their peak values in the third time (3T), the fourth time (4T) and the fifth time (5T) of turn-over process, respectively. The results of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) demonstrated that *CsLOX2* and *CsLOX5* genes had a higher relative expression levels in the initial stage of turn over (2T, 3T), and the up-regulation of relative expression of *CsADH2-1* and *CsAAT* genes was observed during the late stage of turn over (4T, 5T) when the process advanced. The correlation between aliphatic aroma, enzyme activity and gene expression during manufacturing pocess of Wuyi Rougui tea was evaluated by Pearson coefficient. A large number of aliphatic alcohols with natural floral and fruity flavors such as 1-hexanol, cis-3-hexenyl isovalerate, hexanoic acid, hexyl ester, cis-3-hexenyl-methylbutyrate and cis-3-hexenyl salicylate, had significant(P<0.05) or extremely significant (P<0.01) positive correlation with the *CsADH2-1* gene. Meanwhile, *CsAAT* gene had similar expression pattern with *CsLOX2* and *CsLOX5* genes during manufacturing process (r=0.762,r=0.732). Co-expression of key genes in the LOX-HPL pathway drove the synthesis and accumulation of aliphatic aromas during manufacture, laying an important basis for the formation of the aroma-related volatiles of Wuyi Rougui tea.

Keywords: lipoxygenase, pathway, Wuyi rougui tea, manufacturing process, aroma, enzyme activity, gene

武夷岩茶是我国的传统名茶,它是在武夷山自然生态环境条件下,选用适宜茶树品种的鲜叶为原料,经晒青、做青、杀青、揉捻、干燥、拣剔、筛分、匀堆、焙火等工艺制成的乌龙茶,具有“岩骨花香”的品质特征[1]。作为武夷岩茶的主要花色品种,武夷肉桂因香气馥郁,似有辛辣的桂皮香而得名[2-3],颇受市场青睐。

香气是衡量茶叶品质的重要指标之一,除茶树品种所赋予的基底外,更多源自茶树鲜叶采摘后的加工工艺[4-6]。目前,茶树鲜叶中已被分离鉴定的挥发性物质约有 80 余种, 乌龙茶中约有近 400 种[7]。脂肪族类挥发性成分是茶叶中重要的香气组分之一[8],茶树鲜叶在采后的萎凋、做青过程中产生的高温、机械损伤等非生物胁迫,诱导了不饱和脂肪酸的脂氧合酶代谢途径(LOX pathway)[1]中结构基因的表达,进而提升关键酶活力,促使离体鲜叶中以亚油酸、α-亚麻酸为代表的不饱和脂肪酸氧化降解,形成丰富的脂肪族类香气物质[9-10]。根据 LOX pathway 中关键限速酶 LOX 的氧化产物氢过氧化物(9/13-HPOT) 的代谢差异, 可分为 LOX-AOS 和 LOX-HPL 两个支路途径 [11-12], 前者在逆境胁迫中 13S-HPOT 在丙二烯合酶(AOS) 、丙二烯氧化物环化酶(AOC)作用下形成 12-氧植物二烯酸(OPDA),该物质再历经还原和 3 次 β-氧化反应后形成茉莉酸(JA),这是植物在生长发育过程中,最为迅捷的应激信号物质之一[13]。后者主要响应外源生物及非生物胁迫,在 HPL、ADH、AAT 的氧化、还原、酯化作用下,形成青叶醛、青叶醇、己酸己酯、乙酸叶醇酯等绿叶型挥发物及带有弥散香味的果酯类[9,14]。



LOX:脂肪氧合酶;ADH:乙醇脱氢酶;AAT:乙醇脱氢转移酶;AOS:丙二烯氧合酶;AOC:丙二烯环化酶[2]

图 1 植物中不饱和脂肪酸脂肪氧合酶代谢途径的两个支路途径

Fig. 1 Two branches of unsaturated fatty acid lipoxygenase pathway in plant

茶树在不同口器昆虫的危害下, 能激活 LOX-HPL 途径上的基因,释放 GLVs 驱赶害虫,吸引天敌[15-16],与此同时,GLVs 又是茶叶加工过程中香气构成的重要组分[17]。王晶(2010)研究了不同茶树品种加工过程中 LOX 与香气形成的关系[18]。GUI J 等(2015)以金萱为供试材料,发现脂肪氧合酶活力随着工艺过程的推进而升高,认为乌龙茶的花果香与脂肪酸氧化降解的关系更为密切[19]。HU CJ 等(2018)以佛手和浙农 139 为试材,利用 GC-MS 与转录组测序技术, 指出 LOX pathway 形成的 GLVs 是乌龙茶花果香品质形成过程中的主要化学组分[20]。CHO 等[21]以青心大有为材料,研究了台式乌龙茶加工过程中关键代谢物及基因表达谱,发现在做青后期 LOX-HPL 途径的 C6 醛类、C6 醇类、C6 酸类含量均有上升。ZENG L 等以金萱为材料,探究在茶叶采后持续的机械力损伤及低温胁迫下 α-亚麻酸(ALA)、亚油酸(LA)的含量及 LOX 基因相对表达量变化规律, 发现乌龙茶做青过程中的 *CsLOX1* 基因能响应持续的机械损伤及低温胁迫[22]。综上,GLVs 既是茶树应对外界胁迫的防御策略, 同时在讲究“看青做青”的乌龙茶加工过程中,它既是制茶过程中的重要指示物,又是乌龙茶天然花果香的前体, 但武夷岩茶加工过程中 GLVs 形成及转化的研究尚未见报道。

作者采用理想化的做青工艺参数探讨了鲜叶、摇青叶、摊放叶在脂肪族类香气组分及前体物质上的差异, 认为做青过程中的机械力损伤上调了 LOX、ADH 相关基因的表达量, 促使乌龙茶形成天然的花果香 [9], 但仅基于 LC-MS,GC-MS 和 qRT-PCR 技术分析 LOX-HPL 途径上部分基因转录水平和脂肪族类香气挥发物的变化和相关性分析,缺乏了关键酶活性的探究,关键基因的选择缺乏转录组和基因组数据的支撑。而作者以武夷肉桂实际生产中的鲜叶(F)、晒青叶(SW)、做青过程叶(1T~5T)、杀青前叶(BP)为试材,采用 GC-TOF-MS 技术,获得高通量香气挥发物, 并结合 LOX-HPL 途径上关键酶 LOX、ADH 及 AAT 活力变化和基于转录组测序筛选获得的关键基因表达量,构建武夷岩茶加工过程中 LOX-HPL 途径中“香气-酶活-基因”的代谢调控模型, 筛选 LOX-HPL 途径中与香气品质形成相关的潜在基因,旨在探究实际生产加工过程中脂肪族类香气物质的形成机理[3]。

1 材料与方法

1.1 供试样品

武夷肉桂鲜叶采自武夷山慧苑坑山场,采摘时间为 2018 年 5 月上旬。

1.2 主要试剂

植物中脂肪氧合酶(LOX)活力检测试剂盒、乙醇脱氢酶(ADH)活力检测试剂盒及乙醇酰基转移酶(AAT)试剂盒:北京索莱宝科技有限公司产品;总 RNA 抽提试剂盒: 北京天根生化科技有限公司产品; 逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 预混液:日本 Takara 公司产品。

1.3 仪器设备

LGJ-25C 型真空冷冻干燥机:北京四环公司产品;气相色谱-质谱联用仪:德国 Gerstel 公司产品;7890B 气相色谱: 美国 Agilent 公司产品;Pegasus HT 飞行时间质谱:美国 LECO 公司产品;紫外/可见分光光度计:上海元析公司产品;高速冷冻离心机:美国贝克曼库尔特公司产品;K5500 超微量分光光度计:北京凯奥公司产品;实时荧光定量聚合酶链式反应仪:美国罗氏公司产品。

1.4 工艺过程

以武夷岩茶初制过程进行加工制作,工艺过程和主要技术参数、各工艺过程的表观叶态成像及取样节点如图 1 和表 1 所示。日光萎凋(晒青)温度为 20 ℃,历时 30 min;采用综合做青机对萎凋叶进行做青处理,做青期间温度为 26~30 ℃,做青总历时为 6 h 17 min。在武夷岩茶的做青结束后,往往并未立即进行高温杀青, 而是出做青桶堆积静置 1 h 左右,故增设杀青前叶。

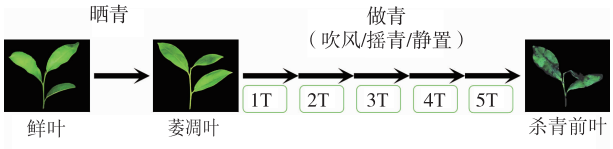


图 2 武夷肉桂加工过程中的表观叶态成像

Fig. 2 The apparent imaging of primary manufacturing process of Wuyi Rougui tea

1.5 分析方法

1.5.1 GC-TOF-MS 检测脂肪族类香气 武夷肉桂过程样经真空冷冻干燥处理 72 h 后,达"梗折即短"状态,采用研钵充分研磨呈粉末状,称取 2.0 g 粉末于 20 mL 顶空瓶中[7],SPME 法进行挥发性物质的提取, 通过 GC-TOF-MS 对提取到的挥发性物质进行检测。

SPME 条件:萃取针:PDMS/DVB(23 Ga,Plain,65 μm,美国 Supelco 公司产品);孵育温度:80 ℃;孵育时间:31 min;萃取时间:60 min;解析时间:3.5 min。

色谱条件: 色谱柱:Rxi® -5silMS (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 进样口温度:250 ℃; 传输线温度:275 ℃;载气:氦气;氦气流量:1 mL/min;程序升温:50 ℃保持 5 min,以 3 ℃/min 的速率升至 210 ℃,保持 3 min,以 15 ℃/min 的速率升至 230 ℃;不分流进样品。

质谱条件:溶剂延迟时间:300 s;扫描范围:30~500; 检测器电压:1 530 V;EI 电离能量:70 eV;离子源温度:250 ℃。

1.5.2 紫外/可见分光光度法检测关键酶活力 LOX-HPL 途径的关键酶 LOX (紫外分光光度法),ADH(紫外分光光度法)及 AAT(可见分光光度法)的活力检测,具体步骤均严格按照试剂盒说明书操作。

1.5.3 叶片的总 RNA 提取及逆转录 称取 1.0 g 供试材料, 利用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒抽提取样品的总 RNA,用 1.2 g/dL 变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 并对吸光度及浓度进行检测,而后将提取的总 RNA 采用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录为 cDNA。

1.5.4 qRT-PCR 检测基因相对表达量 以加工过程样的 mRNA 反转录成 cDNA 为模板,基于转录组测序结果,筛选出 LOX-HPL 途径关键基因 7 条,利

表 1 武夷肉桂加工过程取样点

Table 1 Sampled points during manufacturing process of Wuyi Rougui tea

编号	取样点	
F	鲜叶	
SW	萎凋叶	
1T	做青叶	第一次摇青叶
2T		第二次摇青叶
3T		第三次摇青叶
4T		第四次摇青叶
5T		第五次摇青叶
BP		杀青前叶

用 qRT-PCR 技术对关键基因的表达量进行分析。采用 DNAMAN 6.0 软件设计基因的 qRT-PCR 引物(表 2),以 *CsACT* 为内标基因[23]。反应体系、PCR 反应程序参照周子维等[9]进行。采用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 分别计算出关键基因的相对表达量[24]。

表 2 茶树 LOX-HPL 途径相关基因的引物列表

Table 2 Primer sequences of related genes in LOX-HPL pathway in tea tree

基因名称	转录组编号	基因组(CSS)[25] ID	碱基序列(5′-3′)	扩增长度/bp
CsLOX1	Unigene16231_All	TEA025499.1	F: CATCCACAAAGATTTACGCCAC R: AAACGGAGCCTTCAACAC	165
CsLOX3	Unigene22214_All	TEA011776.1	F: CAGAAATCCGAACGGTAGGT R: GAGAAGGAAAGCACATCAAGAG	279
CsLOX2	CL11629.Contig3_All	TEA009423.1	F: CTCCCGAATCTGCTATTACCAA R: TGAACACTTGCTTCCACTCAG	273
CsLOX5	CL6749.Contig1_All	TEA012289.1	F:TGAACCGTTACTACCCAGATTC R:TGAACCGTTACTACCCAGATTC	208
CsADH2-2	CL3475.Contig7_All	TEA024401.1	F:TGTTGGAAGTGCTGGAACC R:CATACCACACACGGCAATG	220
CsADH2-1	CL822.Contig4_All	TEA029320.1	F: TACCTCTCTATGCCACACTGATG R: GTTGCTCTCTTCGGATTTACAG	205
CsAAT	Unigene20050_All	TEA022398.1	F: TGGCTCATCACAAACAACTG R: CGACATTGGGCTTCGTATTT	153
CsACT	CL841.Contig3_All	TEA019484.1	F:GCCATCTTTGATTGGAATGG R:GGTGCCACAACCTTGATCTT	175

1.5.5 *数据的统计与分析* 差异显著性分析采用 SPSS 18.0 软件中的图凯(Tukey)HSD 法,$P<0.05$ 表示差异显著。相关性分析采用 SPSS 18.0 软件中双变量相关性检测,以皮尔森(Pearson)相关系数评估变量间的线性关系,采用双尾检验。

2 结果与分析

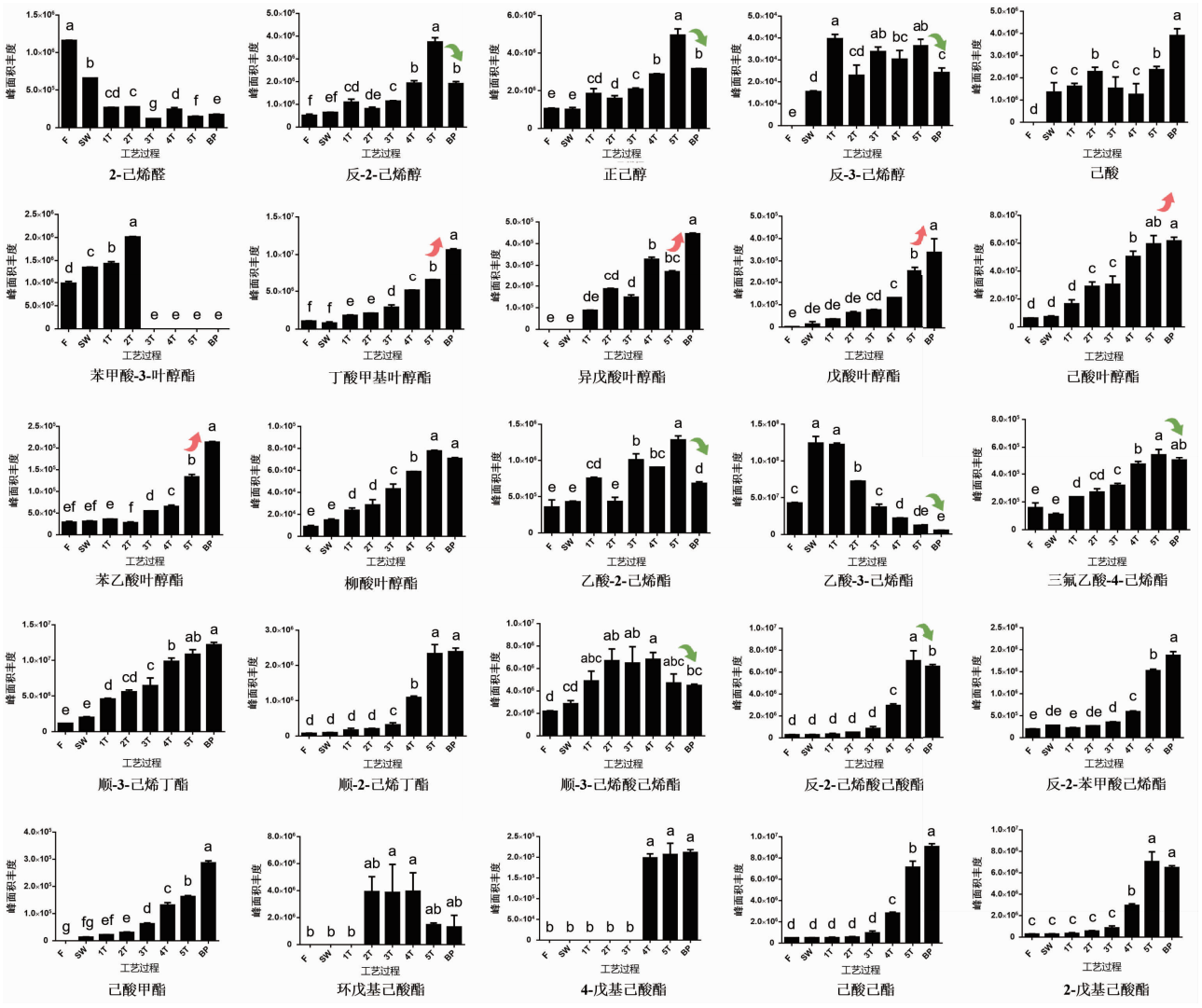
2.1 武夷肉桂加工中的脂肪族类香气变化

武夷肉桂加工过程中脂肪族类香气的动态变化如图 3 所示,共检测获得脂肪族醛类、醇类、酸类和酯类。脂肪族醛类为 2-己烯醛,该物质质量分数在工艺过程中呈下降趋势,鲜叶在萎凋和第一次摇青后质量分数有大幅度的降低(43.20 %,59.40 %)。

脂肪族醇类有反-2-己烯醇、正己醇和反-3-己烯醇 3 种,反-2-己烯醇和正己醇的含量变化较为相似,它们均在 5T 中累积达到最大值(3.74×10^6、4.95×10^6)[8],且与其他过程样品中的含量差异显著($P<0.05$),而反-3-己烯醇的峰面积丰度较小,且在 1T 中就达到最大值(3.96×10^4),在后期工艺过程中有所降低。脂肪族酸类为己酸,它在工艺过程中呈上升趋势,在 BP 中达到最大值(3.36×10^6)。

脂肪族酯类较为丰富,共测得 20 种,将其分为叶醇酯、己烯酯和己酸酯 3 个类别,其中叶醇酯类包含苯甲酸-3-叶醇酯、丁酸甲基叶醇酯、异戊酸叶醇酯、戊酸叶醇酯、己酸叶醇酯、苯乙酸叶醇酯和柳酸叶醇酯共 7 种,除苯甲酸-3-叶醇酯在第三次摇青后再未测得外,该类型在加工过程中变化较一致,均是随着工艺过程的推进而逐步积累提升的,在 BP 中大部分的叶醇类仍有累积,达到最大值,且与先前工艺过程中的样品间差异均达显著水平。己烯酯类包含乙酸-2-己烯酯、乙酸-3-己烯酯、三氟乙酸 4-己烯酯、顺-3-己烯基丁酯、顺-2-己烯基丁酯、顺-3-己烯酸己烯酯、反-2-己烯酸己酸酯、反-2-苯甲酸己烯酯共 8 种,是脂肪族酯类中最为丰富的亚类。在该亚类中乙酸-2-己烯酯、反-2-己烯酸己酸酯、三氟乙酸-4-己烯酯具有类似的动态变化趋势,三者均在做青工艺中累积增多,于 5T 中达最大值(1.28×10^6、7.04×10^6、5.45×10^5),并与先前的过程样间的差异达显著水平,值得注意的是,三者在 BP 中含量出现降低,其中乙酸-2-己烯酯、反-2-己烯酸己酸酯在 BP 与 5T 中的差异存在显著性;反-2-苯甲酸己烯酯、顺-3-己烯丁酯和顺-2-己烯丁酯

在武夷肉桂加工过程中,具有与叶醇酯相似的动态变化规律,三者均随着工艺过程的推进不断累积增多，在 BP 中达到最大值（1.87×10^6、1.22×10^7、2.39×10^6),且与先前样品中的含量均存在显著性差异(除顺-3-己烯丁酯的 BP 与 5T 外)。而剩余的乙酸-3-己烯酯在萎凋后有大幅度提升(191.10%),而随着做青工艺的开展,含量逐步下降,而顺-3-己烯酸己烯酯则呈现出先升高后降低的变化趋势,在 4T 中达到最大值(6.81×10^6),但在 5T 和 BP 中含量有所降低,但与鲜叶间的差异仍存在显著性差异。己酸酯包含己酸甲酯、环戊基己酸酯、4-戊基己酸酯、己酸己酯、2-戊基己酸酯共 5 种类型，其中己酸甲酯、己酸己酯、4-戊基己酸酯和 2-戊基己酸酯在武夷肉桂加工过程中均呈上升趋势,除 2-戊基己酸酯在 5T 中达到最大值(7.04×10^6)外,其余三者均在 BP 中达到最大值(2.87×10^5、9.10×10^6、2.11×10^5),而 BP 中的己酸甲酯和己酸己酯均与前期处理样品中存在显著差异，而环戊基己酸酯在第三次摇青叶(2T)方测得(3.92×10^6),但 5T 和 BP 中有所降低,但与 2T~4T 阶段并不存在显著性差异。



相同小写字母表示在 0.05 水平比较结果,相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著;F:鲜叶,SW:萎凋叶,1T~5T:第一次至第五次摇青后叶,BP:杀青前叶;红色箭头表示在杀青前静置过程(5T~BP)中累积的叶醇酯类,绿色箭头表示在杀青前静置过程中降低的己烯醇及其酯类。

图 3　武夷肉桂加工过程中脂肪族类香气物质的动态变化

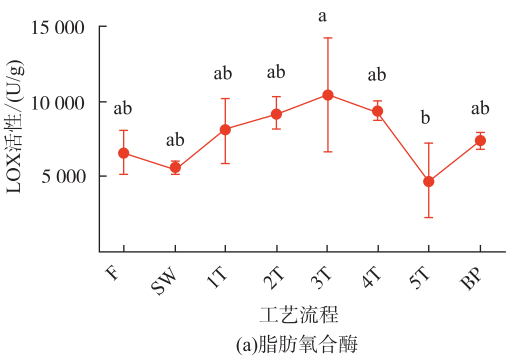
Fig. 3　The dynamic variation of aliphatic aroma-related volatiles during manufacturing process of Wuyi Rougui tea

2.2 武夷肉桂加工过程中 LOX-HPL 途径关键酶活力变化

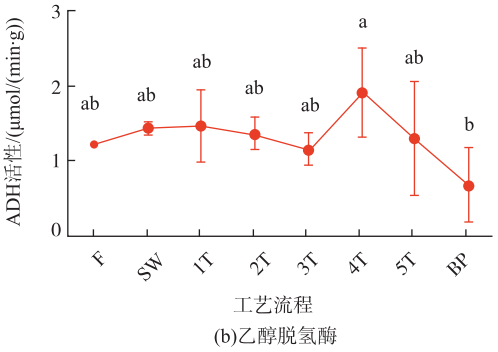
武夷肉桂加工过程中 LOX-HPL 途径关键酶 LOX、ADH 及 AAT 的活性变化如图 4 所示。LOX 活力在萎凋过程中有所降低,做青阶段开始活力逐步上升并于第三次摇青叶(3T)达到最大值(1.04×10^4 U/g),而后开始逐步下降,在 5T 中达到最低值(4.7×10^3 U/g),且与 3T 中的活力存在显著性差异($P<0.05$),但在做青结束后的静置摊放过程中 LOX 活力又有所上升。ADH 在工艺过程前期变化并不明显,直至 4T 中活力达到最大值(1.94 μmol/(min·g)),而后又呈下降趋势,在 BP 中将至最低值(0.71 μmol/(min·g)),同时与 4T 中的活力存在显著性差异($P<0.05$)。与 ADH 相似,AAT 在鲜叶(F)至 4T 中的工艺前阶段活力变化幅度较小,两两间并无显著性差异,但在 5T 中,活性陡然提升至最大值(207.69 U/g),并与其他样品中的活力均存在显著性差异($P<0.05$)。

2.3 武夷肉桂加工中 LOX-HPL 途径结构基因的相对表达量

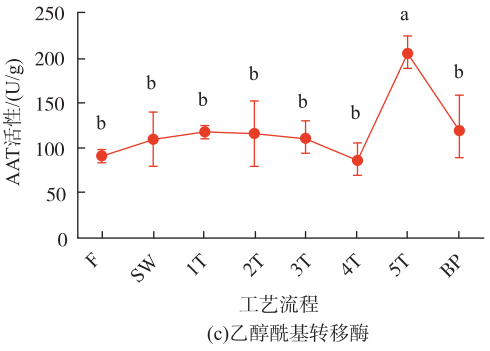
采用离心柱法对武夷肉桂加工过程样进行总 RNA 的抽提,通过 RNA 完整性及纯度的检测结果表明,武夷肉桂加工过程样总 RNA 的凝胶电泳均具备较清晰的 18 S 和 28 S 亚基条带,且无明显的拖尾弥散,见图 4(a),这表明离体的武夷肉桂鲜叶在晒青和做青处理过程中,RNA 未出现明显降解,而超微量分光光度计检测的结果表明,武夷肉桂加工过程样总 RNA 的质量浓度介于 400~800 ng/mL,$A_{260\ nm}$ 与 $A_{280\ nm}$ 比值介于 2.00~2.10 之间,且所有样品在 $A_{260\ nm}$ 处均具备单一的吸收峰,见图 4(b)。因此,武夷肉桂加工过程样进行总 RNA 符合试验要求,可开展下一步试验[10]。



(a)脂肪氧合酶



(b)乙醇脱氢酶



(c)乙醇酰基转移酶

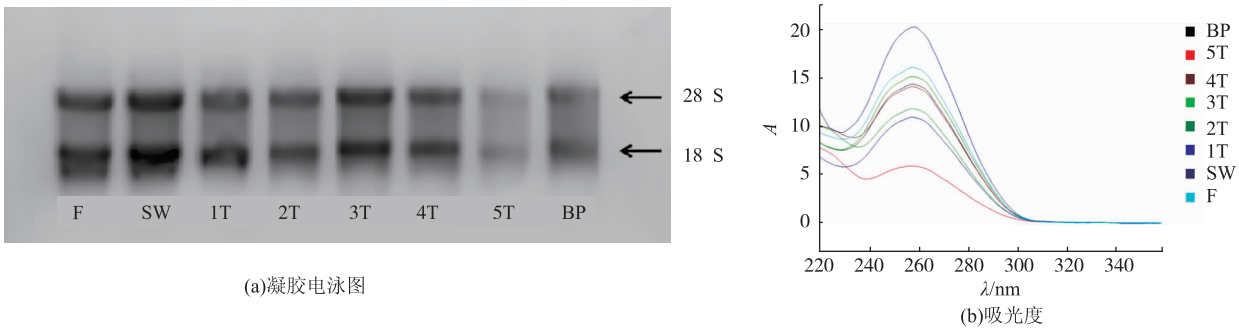
相同小写字母表示在 0.05 水平比较结果,相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著。F:鲜叶,SW:萎凋叶,1T~5T:第一次至第五次摇青后叶,BP:杀青前叶。

图 4 武夷肉桂加工过程中脂肪氧合酶,乙醇脱氢酶和乙醇酰基转移酶的变化

Fig. 4 Variation of lipoxygenase,alcohol dehydrogenase and alcohol acyltransferases during manufacturing process of Wuyi Rougui tea

武夷肉桂加工过程中 LOX-HPL 途径关键基因表达谱热图如图 5 所示。LOX 相关基因 *CsLOX2* 及 *CsLOX5* 具有较为相似的表达模式,均是随着工艺过程的推进先升高而后降低,这契合了 2.2 中 LOX 活力的变化趋势,且 *CsLOX2* 与 *CsLOX5* 均在 2T 中达到最大值(6.96、7.53),且与其他样品的表达量存在显著性差异,*CsLOX3* 基因则在 BP 中有所表达,*CsLOX1* 基因在做青前期表达略微上调后,呈下降趋势,同时 *CsLOX3* 与 *CsLOX1* 基因表达量在武夷肉桂加工过程中两两均不存在显著性差异。

CsADH2-1 基因在第四次摇青前相对表达量较低,两两间均不存在显著差异,但在 5T、6T 中表达量陡然上调至最大值(2.79),且与先前处理中表达量存在显著差异。*CsAAT* 基因在 2T、4T 中存在上调表达现象,尽管 *CsLOX3* 基因在 BP 中表达量有所提升,但它与 *CsADH2-2*、*CsLOX1* 基因相似,在武

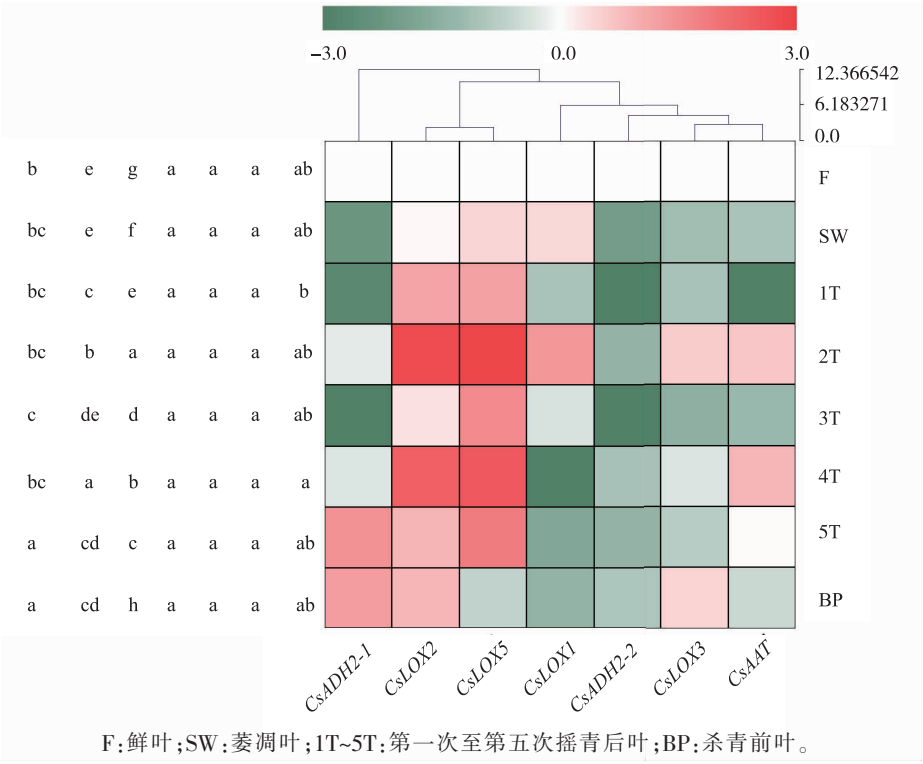


(a)凝胶电泳图　(b)吸光度

18S 和 28 表示叶片中总 RNA 的两个亚基;F:鲜叶,SW:萎凋叶,1T~5T:第一次至第五次摇青后叶,BP:杀青前叶。

图 5　武夷肉桂加工过程中 RNA 的凝胶电泳图及样品总 RNA 的吸光度

Fig. 5　Electrophoretogram of total RNA and absorbance fluctuations of Wuyi Rougui tea samples during manufacturing process



F:鲜叶;SW:萎凋叶;1T~5T:第一次至第五次摇青后叶;BP:杀青前叶。

图 6　武夷肉桂加工过程中 LOX-HPL 途径关键基因表达谱热图

Fig. 6　Heat map of LOX-HPL pathway key genes expression profile during manufacturing process of Wuyi Rougui tea

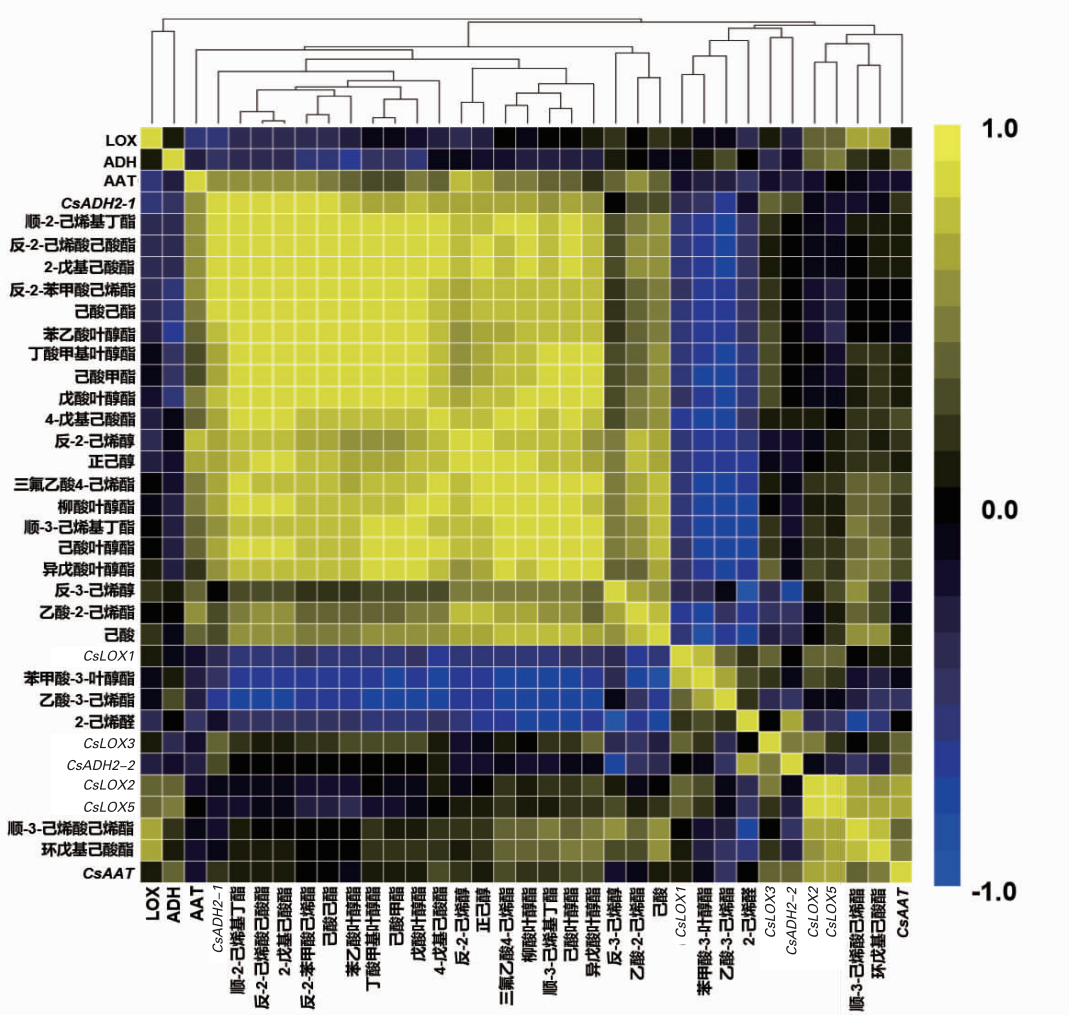
夷肉桂加工过程中表达量变化幅度较小,两两间均不存在显著性差异。

2.4　武夷肉桂加工过程中 LOX-HPL 途径脂肪族类香气-酶活-基因的关联性分析

LOX-HPL 途径中脂肪族类香气、酶活力、基因表达量在武夷肉桂加工过程中的相关性热图如图 7 所示。

在脂肪族类香气与酶活力之间,与 LOX 存在显著正相关的有顺-3-己烯酸己烯酯(0.740*)、环戊基己酸酯(0.764*),而并未发现与 ADH 存在显著正相关的香气物质。

在脂肪族类香气与基因表达量之间,*CsLOX1* 与苯甲酸-3-叶醇酯存在显著正相关 (0.800*)。与 LOX 相似,*CsLOX5* 基因与顺-3-己烯酸己烯酯、环戊基己酸酯也存在显著正相关(0.786*,0.740*)。作为 LOX-HPL 途径中将 C6 醛还原为 C6 醇的关键酶相关基因,*CsADH2-1* 基因与顺-2-己烯基丁酯(0.906**)、戊酸叶醇酯(0.857**)、反-2-己烯酸己



LOX，脂肪氧合酶；ADH，乙醇脱氢酶；AAT，乙醇酰基转移酶；*CsLOX1*，*CsLOX2*，*CsLOX3*，*CsLOX2*：脂肪氧合酶相关基因，*CsADH2-1*，*CsADH2-2*：乙醇脱氢酶相关基因；*CsAAT*：乙醇酰基转移酶相关基因。

图 7　武夷肉桂加工过程中 LOX-HPL 途径中脂肪族类香气-酶活力-基因表达量的相关性热图

Fig. 7　Heat map of correlation coefficient among aliphatic aroma enzyme activity gene expression level during manufacturing process of Wuyi Rougui tea

酸酯(0.920**)、反-2-苯甲酸己烯酯(0.902**)、己酸己酯(0.904**)、2-戊基己酸酯(0.920**)存在极显著正相关，同时与反-2-己烯醇(0.774*)、正己醇(0.790*)、顺-3-己烯基丁酯(0.734*)、丁酸甲基叶醇酯(0.793*)、苯乙酸叶醇酯(0747*)、柳酸叶醇酯(0.825*)、己酸甲酯 (0.734*)、4-戊基己酸酯(0.771*)存在显著正相关。*CsADH2-2* 基因则与 2-己烯醛存在显著正相关(0.727*)，而与反-3-己烯醇存在显著性负相关(-0.796*)。

在基因之间，*CsLOX2* 基因与 *CsLOX5* 和 *CsAAT* 基因分别存在极显著 (0.914**) 和显著 (0.762*)的正相关，同时 *CsLOX5* 与 *CsAAT* 基因亦存在显著正相关(0.732*)。

在脂肪族类香气之间，2-己烯醛与反-3-己烯醇存在极显著负相关(-0.901**)、与顺-3-己烯基丁酯(-0.761*)、己酸叶醇酯(-0.708*)、顺-3-己烯酸己烯酯(-0.785*)、柳酸叶醇酯(-0.720*)、己酸(-0.798*)间存在显著负相关；己酸与三氟乙酸 4-己烯酯(0.832*)、顺-3-己烯基丁酯(0.830*)、异戊酸叶醇酯(0.712*)及己酸叶醇酯(0.822*)间存在显著正相关；与乙酸-3-己烯酯存在显著负相关的有三氟乙酸 4-己烯酯 (-0.794*)、顺-3-己烯基丁酯(-

0.724*)、顺-2-己烯基丁酯(-0.726*)、丁酸甲基叶醇酯(-0.739*)、异戊酸叶醇酯(-0.725*)、戊酸叶醇酯(-0.722*)、己酸叶醇酯(-0.777*)、反-2-己烯酸己酸酯(-0.724*)、柳酸叶醇酯(-0.757*)、己酸甲酯(-0.725*)、4-戊基己酸酯(-0.735*)、2-戊基己酸酯(-0.724*)。而在叶醇酯、己烯酯和己酸酯的 3 个亚类两两之间普遍存在着极显著或显著的正相关。此外,顺-3-己烯酸己烯酯和环戊基己酸酯与其他酯类间不存在显著的相关性,但两者与 LOX 及 *CsLOX5* 存在显著正相关。

3 讨 论

3.1 武夷肉桂加工过程中的香气变化

在茶树鲜叶中,长链不饱和脂肪酸 α-亚麻酸和亚油酸是 LOX-HPL 代谢的前体物质[26],在 LOX/HPL 酶系统的氧化裂解下,α-亚油酸降解己烯醛、己烯醇及相应的叶醇酯类,而亚油酸则降解形成正己醛、正己醇及相应的己醇酯类[27-28]。在武夷肉桂的加工过程中,乙酸-2-己烯酯、反-2-己烯酸己酸酯、三氟乙酸-4-己烯酯等以亚油酸为前体的己烯酯类在最后一次摇青处理(5T)中达到最大值,而在杀青前的静置摊放过程中,含量有所降低。以异戊酸叶醇酯、戊酸叶醇酯、己酸叶醇酯、苯乙酸叶醇酯和柳酸叶醇酯等 7 种以 α-亚油酸为前体的叶醇酯类,它们在加工过程中不断累积,在杀青前的摊放过程中亦然。该结果说明,亚麻酸的代谢可能主要响应做青过程中所产生的外源机械力损伤,而 α-亚油酸的代谢则可能不完全依赖于机械力的刺激,而主要响应鲜叶静置失水。作者在先前的研究中,发现乌龙品种毛蟹(*Camellia sinensis* cv. Maoxie)在摇青叶中积累较多的己烯醇,如反-2-己烯醇(0.48%)、反-3-己烯醇(0.30%)以及反-4-己烯醇(3.75%),而未摇青的摊放叶中则仅有反-2-己烯醇(0.47%)[9,11]这也说表明外源机械损伤可以推进亚油酸的氧化裂解。脂肪醛类具有强烈的青草气,在茶树鲜叶芳香油中占比约 3%,作为茶叶中低级脂肪醛类的代表,2-己烯醛 ($CH_3CH_2CH_2$-CH=CH-CHO,分子量 98.14)具备较高的沸点(150~152 ℃),是茶叶清香气味的主要成分之一[7,29]。在武夷肉桂的加工过程中,脂肪族醛类仅测得 2-己烯醛,这可能是茶树鲜叶在采摘形成的第一次机械损伤后[9]、再经回厂过程中,促进了脂肪族醛类物质转化和挥发,而仅测得较为稳定的高沸点脂肪族醛——2-己烯醛。

己醛类物质被 ADH 还原为己醇的同时,还有一部分被氧化为己酸,而后形成己酸酯类物质,具备清新果香[30-31]。在武夷肉桂加工过程中,测得了己酸甲酯、己酸己酯、4-戊基己酸酯和 2-戊基己酸酯等己酯类,其中己酸甲酯呈似菠萝香气,己酸己酯有生水果的清香。己酸酯类的形成得益于己醛氧化形成的己酸。不同于铁观音做青过程的摇青与静置,武夷肉桂的做青在综合做青机中完成,是在较为温暖(25~30 ℃)的做青间对青叶进行“送风-摇青-停机”的过程。摇青的同时,伴随着做青设备内部风管的送风,风压将气流穿过风管的孔洞,在鲜叶加温走水的同时[32],也带来了一定的氧气,这可能是己醛类物质氧化的主要驱动力。因此,武夷肉桂加工工艺在给离体鲜叶带来外源机械力的同时,还存在着温度、气流等的影响,许多 LOX 相关基因则还可响应温度[33]、光质[34]等因素,所以基于气流、温度、光质等因子的乌龙茶加工过程中 LOX-HPL 代谢通路的研究还有待进一步深入。

3.2 武夷肉桂加工过程中的 LOX-HPL 酶活力和基因转录

对多元不饱和脂肪的酶促反应,形成的 C-6/-9 类挥发性物质,这既是植物应对逆境胁迫的生长和生存机制[35],也是植物形成特征性风味物质的关键基础[36]。通过对武夷肉桂加工过程中 LOX-HPL 途径关键酶的活性检测,发现随着工艺过程的推进,代谢途径的关键酶 LOX、ADH 和 AAT 接连在3T,4T 和 5T 中达到最大值,其中关键限速酶 LOX 先升高后下降的结果与王晶的研究基本一致[18],而 CHO 等的研究也指出东方美人茶在做青后期,脂肪族类香气的增多与 LOX 活力提升有关[21]。3T-5T 阶段作为酶活变化最为明显的时期,LOX-HPL 支路关键酶可能积极响应该时期剧烈的二次机械损伤[9]、温度[32]、失水[37]等的胁迫,而成为武夷肉桂香气形成的重要阶段。

LOX-HPL 途径相关基因在番茄[38]、桃子[39]、白梨[40]、等许多园艺植物成熟及采后处理过程中香气品质的形成起重要作用。Liu 等[17]鉴定出了茶树中首个脂肪氧合酶调控的基因 *CsLOX1*,该研究认为 *CsLOX1* 基因主要在茶花的衰老过程中大量表达。近年来,基于茶树阿萨姆变种和中国变种的 LOX 基因家族成员的鉴定已先后见报[32]。在武夷肉桂的加

工过程中,LOX-HPL 途径 *CsLOX2*、*CsLOX5* 基因均有上调表达,且与部分脂肪族酯类间存在极显著或显著的正相关。而作者所在课题组先前的报道[9,23]指出,在摇青处理下 *CsLOX1* 基因表达显著上调,与青叶醛、正己醛含量呈极显著负相关,与正己醇、反-3-己烯醇、反-4-己烯醇、丁酸叶醇酯、己酸叶醇酯、苯甲酸叶醇酯、异戊酸叶醇酯及丁酸己酯含量间均存在极显著正相关,认为 *CsLOX1* 是做青过程中的"明星基因",其高表达与乌龙茶的花果香有着密切相关[12]。但是,在武夷岩茶的做青过程中,*CsLOX1* 基因在 2T 中已达到最高值,且整个加工过程中变化并不显著。该现象形成的原因除了茶树品种的差异外,更多的是实际生产样品与实验室处理样品的差异。在闽北乌龙茶产区有着"勤肉桂,懒水仙"之说,这反映了武夷肉桂生产加工过程中,伴随着频繁且大量的外源机械力刺激,这在一定程度上可能推进了 LOX-HPL 途径的代谢进程,进而初始 *CsADH2-1*、*CsAAT* 基因在做青后期显著上调表达,其中 *CsADH2-1* 基因与多种具备天然花果香的酯类存在极显著或显著相关,该结果与 HU C J 等[20]的研究结果较为接近,尽管 *CsAAT* 基因与脂肪族酯类物质间未呈现出显著水平,但该基因与 *CsLOX3*、*CsLOX5* 基因具有相似表达模式,它们间形成的协同共表达网络,或许正是武夷肉桂加工过程中脂肪族类香气品质形成的重要分子机理之一。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T18745-2006 地理标志产品武夷岩茶[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
[2] 陈躬瑞,林惠玉,刘志彬,等. 武夷岩茶的感官定量描述分析[J]. 中国食品学报,2013,13(7):222-228.
[3] 陈泉宾,孙威江. 武夷岩茶品质影响因素的研究现状[J]. 福建茶叶,2003,3:44-46.
[4] 施莉婷,江和源,张建勇,等. 茶叶香气成分及其检测技术研究进展[J]. 食品工业科技,2018,39(12):347-351.
[5] ZENG L T,WATANABE N,YANG Z Y. Understanding the biosyntheses and stress response mechanisms of aroma compounds in tea(*Camellia sinensis*) to safely and effectively improve tea aroma[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,2018:1-14.
[6] ZHOU Y,ZENG L T,GUI J D,et al. Functional characterizations of β-glucosidases involved in aroma compound formation in tea (*Camellia sinensis*)[J]. **Food Research International**,2017,96:206-214.
[7] 宛晓春,夏涛. 茶树次生代谢[M]. 北京:科学出版社,2015.
[8] YANG Z,BALDERMANN S,WATANABE N. Recent studies of the volatile compounds in tea[J]. **Food Research International**,2013,53(2):585-599.
[9] 周子维,游芳宁,刘彬彬,等. 摇青机械力对乌龙茶脂肪族类香气形成的影响[J]. 食品科学,2019,40(13):52-59.
[10] 马超龙,李小媛,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.
[11] XU Q,XU X Q,YU K J,et al. Varietal dependence of GLVs accumulation and LOX-HPL pathway gene expression in Four *Vitis vinifera* wine grapes[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2016,17(11):1924.
[12] DE DOMENICO S,BONSEGNA S,HORRES R,et al. Transcriptomic analysis of oxylipin biosynthesis genes and chemical profiling reveal an early induction of jasmonates in chickpea roots under drought stress[J]. **Plant Physiology and Biochemistry**,2012,61:115-122.
[13] TAO X,QIANG Z,WEI C,et al. Involvement of Jasmonate-signaling pathway in the herbivore-induced rice plant defense[J]. **Chinese Science Bulletin**,2003,48(18):1982-1987.
[14] QIAN X,SUN L,XU X Q,et al. Differential expression of *VvLOXA* diversifies C6 volatile profiles in some *Vitis vinifera* table grape cultivars[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2017,18(12):2705.
[15] CHRISTENSEN S A,NEMCHENKO A,BORREGO E,et al. The maize lipoxygenase,*ZmLOX10*,mediates green leaf volatile,jasmonate and herbivore-induced plant volatile production for defense against insect attack[J]. **Plant Journal**,2013,74(1):59-73.
[16] SAVCHENKO T,PEARSE I S,IGNATIA L,et al. Insect herbivores selectively suppress the HPL branch of the oxylipin pathway in host plants[J]. **Plant Journal for Cell & Molecular Biology**,2013,73(4):653-662.

[17] LIU S,HAN B. Differential expression pattern of an acidic 9/13-lipoxygenase in flower opening and senescence and in leaf response to phloem feeders in the tea plant[J]. **BMC Plant Biology**,2010,10(1):228-228.
[18] 王晶. 乌龙茶加工过程中脂氧合酶与香气形成的关系[D]. 广州:华南农业大学,2010.
[19] GUI J,FU X,ZHOU Y,et al. Does enzymatic hydrolysis of glycosidically bound volatile compounds really contribute to the formation of volatile compounds during the oolong tea manufacturing process? [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2015,63(31):6905-6914.
[20] HU CJ,MA YX,ZHANG W,et al. Formation mechanism of the oolong tea characteristic aroma during bruising and withering treatment[J]. **Food Chemistry**,2018,269:202-211.
[21] CHO J Y,MIZUTANI M,SHIMIZU B,et al. Chemical profiling and gene expression profiling during the manufacturing process of Taiwan oolong tea "Oriental Beauty"[J]. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**,2007,71(6):1476-1486.
[22] ZENG L,ZHOU Y,FU X,et al. Biosynthesis of jasmine lactone in tea (*Camellia sinensis*) leaves and its formation in response to multiple stresses[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2018,66(15):3899-3909.
[23] ZHOU Z W,DENG H L,WU Q Y,et al. 2019. Validation of reference genes for gene expression studies in post-harvest leaves of tea plant(*Camellia sinensis*)[J]. **Peer J**,7:6385-4401.
[24] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. **Methods**,2001,25(4):402-408.
[25] WEI C,YANG H,WANG S,et al. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. sinensis provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality[J]. **PNAS**,2018,115(18):19622-19630.
[26] HATANAKA A,SEKIYA J,KAJIWARA T. Linolenic acid and its 13-hydroperoxide inhibit hexanal formation from linoleic acid in plant tissues[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1983,31(1):176-178.
[27] HATANAKA A,HARADA T. Formation of cis -3-hexenal,trans-2-hexenal and cis -3-hexenol in macerated *Thea sinensis* leaves [J]. **Phytochemistry**,1973,12(10):2341-2346.
[28] SEKIYA J,KAJIWARA T,HATANAKA A. Seasonal changes in activities of enzymes responsible for the formation of C6-aldehydes and C6-alcohols in tea leaves,and the effects of environmental temperatures on the enzyme activities[J]. **Plant & Cell Physiology**,1984,25(2):269-280.
[29] 康受妗. 不同茶树品种、生产季节和加工方法对茶叶挥发性化合物的影响[D]. 杭州:浙江大学,2016.
[30] 张钰乾. 菠萝芳香物质组成及其影响因子研究[D]. 南宁:广西大学,2013.
[31] 任道群,唐玉明,姚万春,等. 酯化酶动力学研究[J]. 酿酒科技,2006(6):39-40.
[32] 彭仲贤. 武夷岩茶综合做青机做青程序的探讨[J]. 福建茶叶,2001(1):15-16.
[33] ZHU J,WANG X,GUO L,et al. Characterization and alternative splicing profiles of lipoxygenase gene family in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. **Plant & Cell Physiology**,2018,59(9):1765-1781.
[34] FU X,CHEN Y,MEI X,et al. Regulation of formation of volatile compounds of tea (*Camellia sinensis*) leaves by single light wavelength[J]. **Scientific Reports**,2015,5:16858.
[35] HALITSCHKE R,BALDWIN I T. Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*[J]. **Plant Journal for Cell & Molecular Biology**,2010,36(6):794-807.
[36] BO Z,YIN X R,XIAN L,et al. Lipoxygenase gene expression in ripening kiwifruit in relation to ethylene and aroma production [J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**,2009,57(7):2875-81.
[37] 陈林,陈键,陈泉宾. 做青工艺对乌龙茶香气组成化学模式的影响[J]. 茶叶科学,2014(4):387-395.
[38] LEÓNGARCÍA E,VELAGUTIÉRREZ G,DEL O Á,et al. Increased postharvest life of tomLox B silenced mutants of tomato (*Solanum lycopersicum*) Var. TA234[J]. **Plant Foods for Human Nutrition**,2017,72(4):1-8.
[39] 申济源. 基于 LOX 途径的果实香气物质形成与调控解析[D]. 杭州:浙江大学,2013.
[40] 魏建梅,齐秀东,张海娥,等. 京白梨果实采后 PG、糖苷酶和 LOX 活性变化及其基因表达特性[J]. 园艺学报,2012,39(1):31-39.