

茶树黄酮醇苷的合成代谢及检测分析研究进展

魏沙沙^{1,2,3}, 陈志丹^{2,3,4}, 孙威江^{1,2,3,4*}

¹福建农林大学园艺学院,福州 350002;²福建省安溪现代农业产业园协同创新中心,泉州 362400;

³福建省茶产业工程技术研究中心,福州 350002;⁴福建农林大学安溪茶学院,泉州 362400

摘要:黄酮醇及其糖苷类物质是茶叶中含量丰富且具有较好保健功效的一类重要次生代谢物质,不仅可以调节茶树的生理功能,也是茶叶形成独特风味品质的主要贡献物之一。本文综述了国内外黄酮醇及糖苷物质合成代谢的影响因素、途径以及检测方法的研究进展,为更好的了解黄酮醇苷物质的合成规律、探究其在茶树体内的代谢途径以及深度利用黄酮醇苷物质提供支撑。

关键词:茶树;黄酮醇苷;合成途径;代谢途径

中图分类号:R91

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)1-0153-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.1.021

Research progress on anabolic and detection analysis of flavonol glycosides in tea plants

WEI Sha-sha^{1,2,3}, CHEN Zhi-dan^{2,3,4}, SUN Wei-jiang^{1,2,3,4*}

¹College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

²Collaborative Innovation Center of Modern Agricultural Industry Park in Anxi County, Quanzhou 362400, China;

³Tea Industry Engineering Technology Research Center of Fujian Povince, Fuzhou 350002, China;

⁴College of Tea, Fujian Agriculture and Forestry University, Quanzhou 362400, China

Abstract: Flavonol and its glycosides are important secondary metabolites as well as rich in health-care ingredients in tea. They not only regulate the physiological functions of tea trees, but also one of the main contributors to the unique flavor quality of tea. In this paper, the influencing factors, detection methods, synthetic pathways of flavonols and glycosides were reviewed, which provided support for better understanding of the synthesis and accumulation of flavonol glycosides, metabolic pathways and deep utilization in tea plants.

Key words: *Camellia sinensis*; flavonol glycosides; synthetic pathways; metabolic pathways

多酚类物质是茶树生理功能和茶叶品质的主要贡献物质之一,黄酮醇及其糖苷类物质是黄酮类物质中重要的一类,占茶叶中总多酚类物质含量的13%左右^[1]。黄酮醇类物质阈值浓度极低(0.001~19.8 mM),不仅赋予茶汤干燥及柔和的收敛感,对咖啡碱的苦味也有增强作用^[2],同时也是绿茶黄绿汤色的主要成分。茶叶中的黄酮醇苷主要以O-糖苷的形式存在,在C-3位置连接槲皮素、山奈酚、杨梅素^[3]。茶叶中的黄酮醇苷类物质结构复杂,种

类繁多,根据苷元不同分为杨梅素糖苷(M-glycosides)、槲皮素糖苷(Q-glycosides)和山奈酚糖苷(K-glycosides),也可以根据糖基配体数量分为单糖苷、二糖苷和三糖苷^[4]。黄酮醇类物质具有抗糖尿病^[5]、抗氧化^[6]、抗炎^[7]、抗高血压^[8]、脂肪分解^[9]以及抗癌效应^[10]等功能,最新研究表明黄酮醇增加10 mg/天、黄酮类摄入量增加500 mg/天,心血管疾病^[11]和糖尿病^[12]的风险分别降低5%。

黄酮醇苷类物质受茶叶品种、叶片成熟度、采收季节和茶叶加工工艺等因素影响,至今已在不同茶叶中报道了超过二十多种黄酮醇苷^[13],虽然黄酮醇及其糖苷类物质已逐渐引起研究者的关注,但目前国内外的研究多集中在茶树体内黄酮醇苷的检测方法、保健功效及影响因素的探究,对其合成途径和代

收稿日期:2019-10-08 接受日期:2019-12-20

基金项目:国家重点研发计划(2018YFF0214203);2018年福建省自然科学基金(2018J01589);2017年福建省科技计划(2017N3012)

*通信作者 Tel:86-01370506;E-mail:swj8103@126.com

谢网络等研究还未深入。

1 茶树黄酮醇苷成分和含量差异的影响因素

1.1 茶树品种

黄酮醇及其糖苷物质在茶树品种之间的差异很大,可以作为区分茶树起源或栽培品种类型的有效生物标志物^[14-16]。Zheng等^[16]探究了不同栽培品种对黄酮醇苷和儿茶素组成的影响,结果显示无论总量还是单体的含量,黄酮醇苷在茶树品种间的变化大于儿茶素,可用于区分不同茶树栽培品种。Monobe等^[17]筛选了高黄酮醇含量的品种“Saemidori”、“Sofu”、“Surugawase”、“Fukumidori”和“Asatsuyu”,“Saemidori”和“Sofu”中的槲皮素糖苷含量较高(110170 $\mu\text{g/mL}$),被认为是槲皮素的有效来源。Tian等^[18]在云南熟普中鉴定出10种黄酮醇苷(8-17),其中黄酮醇苷(8-11)首次在茶树中被鉴定出。茶树品种不同,黄酮醇的种类和含量存在明显差异,Zhao等^[19]检测武夷岩茶和武夷水仙两份茶叶样品,发现表儿茶素没食子酸(epicatechin gallate, ECG)、杨梅素糖苷等物质可能是影响两种茶叶独特风味的主要因素。Li等^[20]检测了13个茶树品种的差异代谢物以全面了解适制绿茶品种(GT)和适制红绿茶品种(G&BT)之间的差异,结果表明所有芹菜素糖苷和杨梅素糖苷(杨梅素3-半乳糖基芸香苷除外)、三种槲皮素糖苷在GT栽培品种中更高;代谢途径分析表明,黄酮类化合物途径倾向于GT品种中黄酮醇苷的合成,而倾向于G&BT品种中儿茶素和酚酸的合成,该研究结论也为茶树品种适制性和品种调查奠定基础。

1.2 茶叶产品种类

不同的茶叶产品种类中黄酮醇苷的含量及组成有差异,白茶中寿眉和白牡丹中山奈酚-O-糖苷、槲皮素-O-糖苷和杨梅素-O-葡萄糖苷含量均高于白毫银针,而山奈酚3-(6"-没食子酰葡萄糖苷)、山奈酚7-(6"-没食子酰葡萄糖苷)和槲皮素3-O-半乳糖苷在银针中含量最高^[21]。Bai等^[22]在六安瓜片中鉴定出21种黄酮醇及糖苷类物质,其中4种是酰化物质、12种化合物是异构体组,并且发现了一种新型酰化黄酮醇四糖苷:山奈酚3-O-[(E)-*p*-香豆酰-(1 \rightarrow 2)][α -L-阿拉伯吡喃糖基-(1 \rightarrow 3)][β -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 3)- α -L-鼠李糖基(1 \rightarrow 6)]- β -D-吡喃葡萄糖苷(camellikaempferoside C, 1)。Tian在茯砖茶(FBT)中鉴定出一种新的酰化黄酮醇糖苷:山奈酚3-O-[*E**p*-香豆酰-(\rightarrow 2)][α -1-阿拉伯吡喃糖基-(1

\rightarrow 3)][α -1-吡喃吡喃糖基(1 \rightarrow 6)]- β -二吡喃葡萄糖苷,命名为 camellikaempferoside A, 从 FBT 中与 camelliqueracetiside C 一起分离^[23]。Pedan^[24]在陈年生普茶(APT)和新熟普茶(YPT)中首次鉴定了黄酮醇及其苷元,如槲皮素-半乳糖苷(Q-gal)、槲皮素-葡萄糖苷(Q-glu)等,发现在APT中黄酮醇苷含量始终高于YPT,但是YPT中含有的槲皮素和山奈酚高于APT,结合PCA和HCA分析发现,槲皮素和山奈酚可以作为区别YPT和APT的化学标记物,为多变量因子表征不同茶叶品类开辟了新途径。

1.3 茶叶加工工艺

已有一些研究者研究了茶叶的加工工艺对黄酮醇糖苷组成的影响^[25-29],但实验的商品茶通常是从不同的厂家和公司收集^[25,30],难以控制茶叶品种和叶片成熟度,而这两者都影响黄酮醇糖苷的组成。Fang等^[4]用福鼎大白品种分别制成绿茶、黄茶、白茶、乌龙茶和红茶,探究黄酮醇苷在加工过程中的动态变化,结果显示红茶总黄酮糖苷含量最低(9.83 mg/g),其次是乌龙茶(11.96 mg/g);杀青工序因高温使酶失活,对保持黄酮糖苷的稳定起重要作用;在红茶发酵和干燥过程中,杨梅素糖苷、槲皮素糖苷及单糖苷、二糖苷、三糖苷大量损失,而山奈酚糖苷的含量保持相对稳定,表明发酵和干燥工序是导致加工过程中黄酮糖苷大量减少的关键因素。Bai等^[22]用龙井长叶品种分别制成白茶、绿茶、黄茶、红茶、黑茶和乌龙茶,发现9种黄酮醇苷在这六大茶类中分布呈多样性,山奈酚3-O-葡萄糖基芸香苷在六种茶类中含量最高,槲皮素3-O-葡萄糖基芸香苷次之,二者含量都随着发酵程度的增加而减少,并且认为它们可以区别不同加工类型的茶叶。Liu等^[31]研究了不同半发酵时间处理的铁观音乌龙茶黄酮醇苷的变化,发现随着半发酵时间的增加,杨梅素、杨梅素-鼠李糖、槲皮素-芸香苷的含量大大降低,而槲皮素、山奈酚、山奈酚-半乳糖、山奈酚-芸香苷显著增加。

1.4 茶叶生产季节

黄酮醇苷的含量随着季节性变动。Dai等^[32]比较了春季、夏季和秋季采摘的9个品种的绿茶代谢物谱图,发现槲皮素-O-糖苷表现出明显的季节性波动,且黄酮醇及其糖苷的变化趋势由其苷元决定:如山奈酚-O-糖苷(山奈酚-3-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-半乳糖苷、山奈酚-3-葡萄糖基-芸香苷和山奈酚-3-半乳糖基-芸香苷)在夏茶样品中含量最低,春、秋茶样品之间无明显差异,而夏季茶叶中槲皮素-O-糖苷

(槲皮素-3-*O*-半乳糖苷、槲皮素 3-*O*-半乳糖基-芸香苷和槲皮素 3-*O*-葡萄糖基-芸香苷)的含量高于秋季茶叶中的含量。绿茶的感官品质在春季不同时期变化较大,Liu 等^[33]对早春、中春和晚春季节采摘的幼嫩枝叶进行代谢物分析,显示晚春季节茶叶碳水化合物、黄酮类及其糖苷含量大量提高,三羧酸循环和光呼吸强烈增强,从而提高了所制茶叶的感官品质。

1.5 茶树组织部位

不同的茶叶组织部位黄酮醇苷的含量不同,总体呈现出在茶树嫩叶的含量高于成熟叶。黄酮醇单糖苷、二糖苷和三糖苷主要积累在茶树的幼叶中,在老茎和根中含量极低^[3]。Wu 等^[34]在茶树鲜叶中鉴定了 13 种黄酮醇及其糖苷物质,第二叶位总黄酮醇苷含量最高(4 018.0 μg/g),其次是第四叶和第六叶,芽中含量最低(1 780.0 μg/g),Li 等^[35]的研究也得出相似结果,在成熟叶和幼嫩叶中检测到比茎和根含量更高的黄酮醇。与山奈酚和杨梅素相比,槲皮素是黄酮醇类中含量最为丰富的一类物质,成熟叶中的槲皮素和杨梅素与幼叶相比显著增加,而幼叶中山奈酚的含量比成熟叶高。芦丁(二糖苷)在茶树成熟叶中的含量大约是幼叶的两倍,在茶树中仅检测到少量的槲皮素单糖苷,这些研究结果揭示了茶树中黄酮醇糖苷分布的时空变化。

1.6 温度与光照

温度和光照均影响黄酮醇苷的含量。Zhang 等^[36]分析了遮光处理下光强和温度对茶叶中黄酮醇苷的影响,发现在遮荫处理中黄酮醇及其糖苷含量显著下降,而适当的高温有利于黄酮醇苷的积累,尤其是山奈酚 3-*bd*-吡喃葡萄糖苷,对光强变化的敏感性高于对温度变化。光为植物的生长和发育提供能量,然而过量的光会导致光损伤,因此避免光胁迫对植物至关重要^[37-39],黄酮类化合物对茶树光保护的作用已有大量研究^[40]。与具有单羟基的类黄酮相比,B 环中具有邻二羟基结构的类黄酮在叶片中优先积累^[41],Zhang 等^[42]发现与正常绿叶相比,光敏型黄化茶“黄金芽”叶片中二羟基黄酮类化合物含量较高,主要是槲皮素及其糖苷(槲皮素 3-半乳糖苷,槲皮素 4',7-二葡萄糖苷等),而杨梅素及其糖苷(杨梅素 3-阿拉伯糖苷,杨梅素 3,3'-二半乳糖苷等)的含量低于正常绿叶,表明二羟基黄酮类化合物在茶叶中的功能存在很大差异,特别是槲皮素及其糖苷在黄化叶中对光保护及清除活性氧自由基有巨大作用。

1.7 其它因素

Qi 等^[43]分析了不同砧木对新鲜茶叶中代谢物的不同影响,发现大多数差异代谢物属于茶多酚(黄烷-3-醇,黄酮,黄酮醇等),表明嫁接的影响主要集中在多酚相关的途径。Dong 等^[44]探究了“龙井 43”茶树中黄酮醇及其糖基化衍生物对缺氮、正常氮、过量氮供应的响应机制,发现用正常氮处理时,大多数黄酮醇糖苷(槲皮素-3-葡萄糖苷、山奈酚-3-葡萄糖基-鼠李糖苷-葡萄糖苷)积累到最高水平。而黄酮醇糖苷的碳水化合物底物水平(如蔗糖、蔗糖-6-磷酸、D-果糖 1,6-二磷酸和葡萄糖-1-磷酸)与黄酮醇糖苷含量呈正相关,表明正常的氮水平下茶树通过基因调节底物含量来促进黄酮醇糖苷的生物合成,而异常的氮处理,尤其是过量氮处理则具有抑制作用。

2 黄酮醇苷类物质检测方法

由于茶叶中黄酮糖苷的种类非常多,又缺少相应的商业标准品,因此建立一种快速且成本低廉的方法来检测茶叶中的黄酮醇苷非常重要。随着物质分离检测技术的不断发展,高效液相色谱、超高效液相色谱、色谱-质谱联用等技术逐渐应用于茶叶中黄酮醇苷的定性与定量研究。

2.1 高效液相色谱法

高效液相色谱法是在传统液相色谱法的基础上发展起来的新型检测方法,具有检测限制低、灵敏度高、分析效率高等优点。高效液相色谱仪常与紫外(UV)、二极管阵列(DAD)等检测系统结合使用,成为分析茶树中黄酮醇苷物质最有效的定量定性分析技术之一。Fanali^[45]用一种标准品的 UV 吸收来量化黄酮醇苷元的其他糖苷物质,以这种方式在白茶样品中定量了十种黄酮醇糖苷。Lakenbrink 为了保证样品的纯度,在检测时利用聚酰胺柱层析进行了前处理^[46],Hilal^[47]使用聚酰胺、Sephadex LH 20 色谱和制备型 HPLC 在白茶中鉴定出新的杨梅素三糖苷(鼠李糖苷),在乌龙茶中检测到新型乙酰化黄酮醇四糖苷。早期研究报道中多使用糖苷配基作为标准溶液定量黄酮醇苷,或者是制备茶叶提取液分离黄酮醇苷然后量化。然而一些黄酮醇糖苷在茶树中微量积累,不能在单次 HPLC 运行中有效分离和精确定量。因此,在现有的分离检测体系下建立更加高效的分析技术和设备方法成为黄酮醇苷类物质分析的必然趋势。

2.2 液相色谱-质谱检测法

液相色谱-质谱检测联用技术(HPLC-MS)可以实现对目标化合物的相对分子质量、离子碎片以及物质结构进行综合分析,同时具有高效、抗干扰能力强的优点。近年来该技术已运用于茶树中黄酮醇苷类物质的鉴定^[48],在绿茶和红茶中鉴定了19种黄酮醇糖苷^[49],其中14种被确定为红茶中涩味的主要贡献者^[2]。Sultana等^[50]采用HPLC-UV/ESI-MS同时对绿茶、红茶、乌龙茶中的黄酮醇等24种酚类物质进行检测,不仅能区分不同品种茶叶中的酚类物质构成,在缺乏标准品的情况下,还可以根据色谱的保留时间和碎片离子鉴定目标化合物。Rha^[51]用HPLC-MS法鉴定了绿茶中16种黄酮醇糖苷,证明此方法作为检测茶叶中黄酮醇苷组分稳定有效。但其操作难度大、仪器成本高,且难以对一些复杂结构的目标化合物进行有效识别,目前的应用还有很大的发展空间。

2.3 超高效液相色谱

超高效液相色谱(UPLC)是在HPLC的基础上发展起来的,具有高效快速、分辨率高、灵敏度好等特点。Jiang等^[28]首次采用UPLC法对绿茶、红茶、乌龙茶中的黄酮醇苷类物质进行检测,通过电喷雾串联质谱识别了18种黄酮醇苷类物质,并发现绿茶中主要以山奈酚糖苷为主,乌龙茶则以槲皮素和杨梅素糖苷为主,红茶中以槲皮素糖苷为主,表明黄酮醇苷可以作为区别不同品种的标志物质。QQQ-MS/MS是一种串联质谱仪,可以分析和提供分子离子特征产物离子的信息,其MRM模式是一种高灵敏度的方法^[52]。Wu、Dong等^[3,44]建立了UPLC-QQQ-MS/MS MRM模式的方法,测定了不同茶树品种的黄酮醇苷类化合物。Bai等^[22]建立的UPLC方法可以在六种加工类型的茶中同时测定含有一至四个糖单元的不同黄酮醇糖苷的方法。Zhao、Wu等也利用UHPLC-DAD-MS/MS对不同茶叶中黄酮醇糖苷的鉴定和测定进行了多项研究^[53-56]。超高效液相色谱法以其操作简便、准确度高、检测时间短高效,对目标化合物的分离能力强等优点,已逐渐成为茶树中黄酮醇苷类物质检测的有力方法之一。

3 黄酮醇苷类物质合成途径的关键酶类

3.1 黄酮醇苷类物质合成上游途径的相关酶

茶树中黄酮醇的生物合成途径是类黄酮化合物代谢途径的一个分支,由苯丙氨酸途径经丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸4-羟化酶(C4H)、4-香豆酸辅酶

A连接酶(4CL)、查尔酮合成酶(CHS)产生柚皮素查耳酮,之后在查耳酮异构酶(CHI)催化下被特异环化形成柚皮素,然后在一种或多种黄烷酮羟化酶(F3H)或类黄酮羟化酶(类黄酮3'-羟化酶,F3'H和类黄酮3',5'-羟化酶,F3'5'H)催化下产生不同的二氢黄酮醇,如二氢山奈酚、二氢槲皮素、二氢杨梅素等。二氢黄酮醇可以在黄酮醇合成酶(FLS)作用下氧化形成黄酮醇苷元,然后在尿苷二磷酸糖基转移酶(UGTs)催化下发生糖基化等修饰,形成稳定多样的黄酮醇衍生物^[57]。

3.2 黄酮醇苷合成途径的糖基转移酶

3.2.1 糖基转移酶的分类

茶树中的黄酮类化合物有黄烷-3-醇、酚酸、花青素和黄酮醇等,赋予茶独特的风味,使茶汤苦味和涩味之间取得平衡。大多数的黄酮类化合物在黄酮类糖基转移酶作用下以糖苷形式存在于植物中,增加了其稳定性、溶解性以及生物利用度^[58];在茶树中,黄酮醇糖苷物质的上游合成途径已基本明了,但将黄酮醇苷元催化形成黄酮醇衍生物的UGTs还处于研究的初级阶段。由于UDP-糖基转移酶是由多基因家族编码,所以难以筛选茶树中特异性参与黄酮醇化合物的目标UGT基因。迄今为止,基于高度保守的PSPG基序,已经从各种植物基因组中鉴定了超过1500个推测的UGT基因,这些UGT序列已被分为16个不同的组(从A到P)^[59]。Noguchi等^[60]将黄酮类糖基转移酶分为四个官能团,命名为簇I、II、IIIa、IIIb和IV,推测四组转移酶分别编码3-O、5-O和7-O糖基转移酶和二糖苷/二糖链糖基转移酶。

3.2.2 茶树中鉴定出的糖基转移酶

在茶树中发现的178个UGT基因中,很少具有功能特征^[61]。Jiang等^[62]从茶树转录组数据库中筛选出132个UGT基因(CsUGT),其中CsUGT73A20、CsUGT75L12、CsUGT78A14和CsUGT78A15被分类到不同的簇中,这些CsUGT是导致茶树中不同组织器官中不同黄酮醇糖苷的积累的原因。

3.2.3 CsUGT78A14、CsUGT78A15基因与黄酮醇苷合成

在茶树中,黄酮类化合物主要以3-O-葡萄糖苷^[62]的形式存在,其可能是由未成熟叶片中的CsUGT78A14和CsUGT78A15产生。研究表明,CsUGT78A14在3-OH糖基化位点用UDP-葡萄糖作为糖供体促进了黄酮醇葡萄糖苷的合成,

CsUGT78A15 则以 UDP-半乳糖作为糖供体促进黄酮醇半乳糖苷的增加。在过表达 CsUGT78A14、CsUGT78A15 两个基因的拟南芥和烟草中,鉴定出黄酮醇苷山奈酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷和山奈酚-3-*O*- β -D-半乳糖苷,分别为这两个基因的催化产物,即 CsUGT78A14 和 CsUGT78A15 的酶特异性的产生具有区域选择性的 3-*O*-葡萄糖苷/半乳糖苷^[61]。

3.2.4 CsUGT73A20 与黄酮醇苷的合成

有研究发现,在 CsUGT73A20 表达的植物中,参与 3-OH 和 7-OH 位点的糖基化反应的黄酮醇糖苷的含量显著增加,但黄烷-3-醇的含量降低^[62]。Zhao 等^[60]从茶树中分离出属于簇 IIIa 的黄酮醇糖基转移酶(CsUGT73A20),发现其表现出广泛的底物耐受性,对黄酮醇(山奈酚,槲皮素和杨梅素),黄酮(芹菜素)和黄烷酮(柚皮素)具有活性,其中山奈酚是最佳底物,使用 UDP-半乳糖作为糖供体时,未检测到产物。体外实验表明,CsUGT73A20 对黄酮醇化合物进行多位点糖苷化,主要形成 3-*O*-葡萄糖苷和 7-*O*-葡萄糖苷。pH 对糖基转移酶的活性也有影响,CsUGT73A20 在 pH8.0 下积累的 K7G 产物更多,但 K3G 是 pH9.0 时的主要产物,高 pH 抑制体外 7-OH 位点的糖基化反应。在过量表达 CsUGT73A20 的烟草中,生成一种新的槲皮素 3-*O*-鼠李糖苷-7-*O*-鼠李糖苷(Q-3-R-7-R)黄酮醇糖苷^[62]。

3.2.5 CsUGT78A17 与黄酮醇苷的合成

Ohgami^[63]发现 UGT73A17 基因在成熟叶中高丰度表达,随着叶片成熟,其表达量与槲皮素糖苷的积累曲线一致,表明 UGT73A17 部分参与茶树中黄酮醇糖基化。Su^[64]进一步鉴定了 UGT73A17 基因,其负责多种类黄酮糖苷的生物合成,序列分析表明 UGT73A17 蛋白在氨基酸水平上与 7-*O*-糖基转移酶显示出高度同一性,并且它与其他植物物种的几种 7-*O*-糖基转移酶聚集在同一进化枝中。rUGT73A17 在高温(例如 50 °C)下的活性高于低温时的活性,表明 UGT73A17 负责多种黄酮糖苷的生物合成,也与茶树的热响应和品质有关。CsUGT73A17 比目前在茶树中鉴定的其他 UGT 具有更广泛的底物特征,体外酶促测定还证实,CsUGT73A17 主要产生 7-*O*-葡萄糖苷,产生少量的 3,3'-,4'-*O*-葡萄糖苷;从酶动力学结果来看,CsUGT73A17 对所有黄酮醇和黄酮底物显示出较高的亲和力和较低的 K_m 值,但 CsUGT73A20 似乎对山奈酚比对其他底物更具活

性。CsUGT73A17 类似于 CsUGT73A20,也主要产生 7-*O*-葡萄糖苷,但是含有少量的 3-*O*-葡萄糖苷^[30]。CsUGT78A14 和 CsUGT78A15 以及 CsUGT73A20 都不能在成熟叶片中高度表达,而芦丁在成熟叶中高水平积累^[65],UGT73A17 也在成熟叶中高度表达,所以猜测 UGT73A17 可能是产生芦丁的原因^[64]。

3.2.6 CsUGT75L12 与黄酮醇苷的合成

研究证实 CsUGT75L12 是黄酮醇 7-*O*-糖基转移酶。Dai 等^[66]在大肠杆菌中表达的重组 CsUGT75L12 蛋白在 7-OH 位置对多个酚类底物表现出葡萄糖基化活性,但花青素,儿茶素和酚酸除外。在过表达 CsUGT75L12 的拟南芥植物中,槲皮素 3-*O*-鼠李糖苷-7-*O*-吡喃葡萄糖苷和山奈酚 3-*O*-鼠李糖苷-7-*O*-吡喃葡萄糖苷的积累被显著促进。

3.2.7 CsUGT72AM1 与黄酮醇苷的合成

Zhao 等^[67]从茶树中分离出属于簇 IIIb 的糖基转移酶(CsUGT72AM1),rCsUGT72AM1 可以在体外对黄酮醇进行糖苷化,分别形成 3-*O*-葡萄糖苷或 4-*O*-葡萄糖苷。这种酶对黄烷酮也可以进行多位点糖苷化,产物是柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷和 4'-*O*-葡萄糖苷。此外,在用花青素作为底物的酶测定中,CsUGT72AM1 的糖基化活性被高浓度的花色苷显著抑制。He^[68]从龙井 43 品种的天然杂交种群中获得了一种新的紫叶茶品种“Moomal”,HPLC 和 LC-MS 分析显示花青素和 *O*-糖基化黄酮醇在“Moomal”叶片中显著积累,通过转录组数据鉴定出紫叶茶中的一个新的 UGT 基因(CsUGT72AM1),体外酶促测定证实 CsUGT72AM1 具有作为黄酮醇 3-*O*-葡萄糖基转移酶的催化活性,并显示出广泛的底物特异性。

4 展望

黄酮醇及糖苷物质作为参与茶树抵抗逆境及茶叶滋味、色泽及具有保健功能的次生代谢物,其在不同茶树品种、加工工艺、茶叶品类的合成、积累已有一些研究基础,黄酮醇类物质与多种环境因子均有互作^[69],其生物合成的环境调控因素研究目前以光照和温度为主,但其他环境胁迫因素如 CO₂、干旱或水涝、病虫害等生物胁迫对黄酮醇生物合成的影响方面的探索较少。黄酮醇类化合物种类多、结构复杂,相关标准品的缺乏使其定性和定量检测工作比较困难。近年来高效液相色谱法、液相色谱-质谱检测法、高效液相色谱法等多种方法已在茶树黄酮醇苷类物质的测定过程中得到应用,但今后的研究还

需使用多种检测仪器建立更加高效便捷的检测方法,加强分析检测工作的系统性和精确性。黄酮醇及糖苷生物合成途径中已有诸多基因被克隆、鉴定及部分功能验证,但由于该通路代谢网络复杂,各基因间协同表达及调控机制尚较模糊。在不同条件下,多转录因子互作及其对黄酮醇及糖苷合成相关结构基因的调控机制有待阐明。在今后的研究中,应将检测分析及代谢途径和关键基因表达相结合,从根本上解决茶树黄酮醇及糖苷类物质的积累及代谢调控的有关问题,为筛选黄酮醇类物质特异性积累的茶树种质资源以及膳食性黄酮醇食品的利用和品质提升奠定基础。

参考文献

- Hodgson JM, et al. Tea flavonoids and cardiovascular health [J]. *Mol Asp Med*, 2010, 31: 495-502.
- Scharbert S, et al. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse [J]. *J Agr Food Chem*, 2004, 52: 3498-3508.
- Wu YH, et al. Quantification of flavonol glycosides in *Camellia sinensis* by MRM mode of UPLC-QQQ-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1017: 10-17.
- Fang ZT, et al. Dynamic changes in flavonol glycosides during production of green, yellow, white, oolong and black teas from *Camellia sinensis* L. (cv. Fudingdabaicha) [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2019, 54: 490-498.
- Zhang Y, et al. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670: 325-332.
- Lee YJ, et al. Kaempferol protects HIT-T15 pancreatic beta cells from 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage [J]. *Phyther Res*, 2010, 24(3): 419-423.
- Crespo I, et al. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells [J]. *Brit J Nutr*, 2008, 100: 968-976.
- Olszanecki R, et al. Kaempferol, but not resveratrol inhibits angiotensin converting enzyme [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2008, 59: 387-392.
- Da-Silva WS, et al. The small polyphenolic molecule kaempferol increases cellular energy expenditure and thyroid hormone activation [J]. *Diabetes*, 2007, 56: 767-776.
- Kang JW, et al. Kaempferol and quercetin, components of Ginkgo biloba extract (EGB 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells [J]. *Phyther Res*, 2010, 24(S1): S77-S82.
- Wang X, et al. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies [J]. *Brit J Nutr*, 2014, 111(1): 1-11.
- Gentile D, et al. Dietary flavonoids as a potential intervention to improve redox balance in obesity and related co-morbidities: a review [J]. *Nutr Res Rev*, 2018, 31: 239-247.
- Tan JF, et al. Flavonoids, phenolic acids, alkaloids and theanine in different types of authentic Chinese white tea samples [J]. *J Food Compos Anal*, 2017, 57: 8-15.
- Engelhardt U, et al. Antioxidative phenolic compounds in green-black tea and other methylxanthine-containing beverages [J]. *ACS Publications*, 2000, 217: 111-118.
- Chen S, et al. Metabolite profiling of 14 Wuyi Rock tea cultivars using UPLC-QTOF MS and UPLC-QqQ MS combined with chemometrics [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 104.
- Zheng XQ, et al. Screening the cultivar and processing factors based on the flavonoid profiles of dry teas using principal component analysis [J]. *J Food Compos Anal*, 2018, 67: 29-37.
- Monobe M, et al. Quercetin glycosides-rich tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) in Japan [J]. *Food Sci Technol Res*, 2015, 21: 333-340.
- Tian LW, et al. Carboxymethyl- and carboxyl-catechins from ripe Pu-er tea [J]. *J Agr Food Chem*, 2014, 62: 12229-12234.
- Zhao F, et al. Simultaneous determination of caffeine and some selected polyphenols in Wuyi Rock tea by high-performance liquid chromatography [J]. *J Agr Food Chem*, 2014, 62: 2772-2781.
- Li PL, et al. Metabolomic analysis reveals the composition differences in 13 Chinese tea cultivars of different manufacturing suitabilities [J]. *J Sci Food Agr*, 2018, 98: 1153-1161.
- Yang C, et al. Application of metabolomics profiling in the analysis of metabolites and taste quality in different subtypes of white tea [J]. *Food Res Int*, 2018, 106: 909-919.
- Bai WX, et al. Novel acylated flavonol tetraglycoside with inhibitory effect on lipid accumulation in 3T3-L1 cells from Lu'an GuaPian tea and quantification of flavonoid glycosides in six major processing types of tea [J]. *J Agr Food Chem*, 2017, 65: 2999-3005.
- Tian YZ, et al. A new anti-proliferative acylated flavonol glycoside from Fuzhuan brick-tea [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30: 2637-2641.
- Pedan V, et al. Bioactive compound fingerprint analysis of aged raw pu'er tea and young ripened Pu-er tea [J]. *Molecules*, 2018, 23(8): 1931.

- 25 Price KR, et al. Flavonol glycoside content and composition of tea infusions made from commercially available teas and tea products[J]. J Agr Food Chem, 1998, 46:2517-2522.
- 26 Unachukwu UJ, et al. White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles[J]. J Food Sci, 2010, 75:C541-C548.
- 27 van der Hooft JJ, et al. Structural annotation and elucidation of conjugated phenolic compounds in black, green, and white tea extracts[J]. J Agr Food Chem, 2012, 60:8841-8850.
- 28 Jiang H, et al. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC[J]. Food Chem, 2015, 183:30-35.
- 29 Tan J, 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 Res Int, 2016, 79:106-113.
- 30 Jiang H, et al. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC[J]. Food Chem, 2015, 183:30-35.
- 31 Liu PP, et al. Flavor characteristics and chemical compositions of oolong tea processed using different semi-fermentation times[J]. J Food Sci Technol, 2018, 55:1185-1195.
- 32 Dai WD, et al. Nontargeted analysis using ultraperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry uncovers the effects of harvest season on the metabolites and taste quality of tea (*Camellia sinensis* L.) [J]. J Agr Food Chem, 2015, 63:9869-9878.
- 33 Liu JW, et al. Metabolomic Analyses reveal distinct change of metabolites and quality of green tea during the short duration of a single spring season[J]. J Agr Food Chem, 2016, 64:3302-3309.
- 34 Wu LY, et al. Complementary itraq proteomic and transcriptomic analyses of leaves in tea plant (*Camellia sinensis* L.) with different maturity and regulatory network of flavonoid biosynthesis[J]. J Proteome Res, 2019, 18:252-264.
- 35 Li Q, et al. A comparative proteomic analysis of the buds and the young expanding leaves of the tea plant (*Camellia sinensis* L.) [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16:14007-14038.
- 36 Zhang QF, et al. Metabolomic analysis using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS) uncovers the effects of light intensity and temperature under shading treatments on the metabolites in tea[J]. PLoS One, 2014, 9(11):e112572.
- 37 Aluru MR, et al. Chloroplast photooxidation-induced transcriptome reprogramming in *Arabidopsis* *immutans* white leaf sectors[J]. Plant Physiol, 2009, 150:904-923.
- 38 Lee LS, et al. Metabolomic analysis of the effect of shade treatment on the nutritional and sensory qualities of green tea [J]. J Agr Food Chem, 2013, 61:332-338.
- 39 Nishiyama Y, et al. Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery [J]. Appl Microbiol Biol, 2014, 98:8777-8796.
- 40 Bernal M, et al. Altitudinal and seasonal changes of phenolic compounds in *Buxus sempervirens* leaves and cuticles[J]. Plant Physiol Biochem, 2013, 70:471-482.
- 41 Hofmann RW, et al. Responses to UV-B radiation in *Trifolium repens* L. - physiological links to plant productivity and water availability[J]. Plant Cell Environ, 2003, 26:603-612.
- 42 Zhang QF, et al. Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves [J]. BMC Plant Biol, 2017, 17:64.
- 43 Qi DD, et al. Non-targeted metabolomic analysis based on ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry reveals the effects of grafting on non-volatile metabolites in fresh tea leaves (*Camellia sinensis* L.) [J]. J Agr Food Chem, 2019, 67:6672-6682.
- 44 Dong F, et al. Effects of nitrogen supply on flavonol glycoside biosynthesis and accumulation in tea leaves (*Camellia sinensis*) [J]. Plant Physiol Biochem, 2019, 138:48-57.
- 45 Fanali C, et al. Analysis of polyphenols and methylxanthines in tea samples by means of nano-liquid chromatography utilizing capillary columns packed with core-shell particles [J]. J Chromatogr A, 2012, 1234:38-44.
- 46 Lakenbrink C, et al. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages[J]. J Agr Food Chem, 2000, 48:2848-2852.
- 47 Hilal Y, et al. A new myricetin-rhamnoglucoside from *Camellia sinensis* [J]. Nat Prod Res, 2009, 23:1621-1629.
- 48 Sun J, et al. A non-targeted approach to chemical discrimination between green tea dietary supplements and green tea leaves by HPLC/MS[J]. J AOAC Int, 2011, 94:487-497.
- 49 Obuchowicz J, et al. Flavonol database for green and black teas utilising ISO 14502-1 and ISO 14502-2 as analytical tools[J]. J Food Compos Anal, 2011, 24:411-417.
- 50 Sultana T, et al. Quality assessment and quantitative analysis of flavonoids from tea samples of different origins by HPLC-DAD-ESI-MS[J]. J Agr Food Chem, 2008, 56:3444-3453.
- 51 Rha CS, et al. Antioxidative, anti-inflammatory, and anticancer effects of purified flavonol glycosides and aglycones in green tea[J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8:2542-2546.
- 52 Sherwood CA, et al. Rapid optimization of mrm-ms instrument parameters by subtle alteration of precursor and product m/z

- targets[J]. *J Proteome Res*,2009,8:3746-3751.
- 53 Wang H, et al. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography[J]. *Food Res Int*,2001,34:223-227.
- 54 Dou J, et al. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of Oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes [J]. *J Agr Food Chem*,2007,55:7462-7468.
- 55 Zhao Y, et al. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green Pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS [J]. *Food Chem*, 2011, 126: 1269-1277.
- 56 Wu C, et al. Determination of catechins and flavonol glycosides in Chinese tea varieties [J]. *Food Chem*,2012, 132: 144-149.
- 57 Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*,2001,126:485-493.
- 58 Osmani SA, et al. Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling[J]. *Phytochemistry*,2009,70:325-347.
- 59 Caputi L, et al. A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land[J]. *Plant J*,2012,69:1030-1042.
- 60 Zhao XQ, et al. Functional characterization of a new tea(*Camellia sinensis*) flavonoid glycosyltransferase[J]. *J Agr Food Chem*,2017,65:2074-2083.
- 61 Cui L, et al. Identification of UDP-glycosyltransferases involved in the biosynthesis of astringent taste compounds in tea(*Camellia sinensis*) [J]. *J Exp Bot*,2016,67:2285-2297.
- 62 Jiang XL, et al. Tissue-specific, development-dependent phenolic compounds accumulation profile and gene expression pattern in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e62315.
- 63 Ohgami S, et al. Identification and characterization of *Camellia sinensis* glucosyltransferase, UGT73A17: A possible role in flavonol glucosylation[J]. *Plant Biotechnol-Nar*,2014,31: 573-578.
- 64 Su XJ, et al. Characterization of a heat responsive UDP:Flavonoid glycosyltransferase gene in tea plant(*Camellia sinensis*) [J]. *PLoS One*,2018,13(11):e0207212.
- 65 Cui LL, et al. Identification of UDP-glycosyltransferases involved in the biosynthesis of astringent taste compounds in tea(*Camellia sinensis*) [J]. *J Exp Bot*,2016,67:2285-2297.
- 66 Dai XL, et al. Identification of a flavonoid glycosyltransferase involved in 7-oh site glycosylation in tea plants (*Camellia sinensis*) [J]. *Sci Rep-Uk*,2017,7:5926.
- 67 Zhao X, et al. Functional analysis of an uridine diphosphate glycosyltransferase involved in the biosynthesis of polyphenolic glucoside in tea plants (*Camellia sinensis*) [J]. *J Agr Food Chem*,2017,65:10993-11001.
- 68 He XJ, et al. Isolation and characterization of key genes that promote flavonoid accumulation in purple-leaf tea (*Camellia sinensis*) [J]. *Sci Rep-Uk*,2018,8:130.
- 69 Yang CQ, et al. Advances on chemical ecology of plant flavonoids[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018,30:2009-2016.