

厌氧处理对黄茶生物活性的影响及 γ -氨基丁酸富集的代谢组学分析

章垚琪¹, 潜卫东², 傅玲琳¹, 王彦波¹, 张巧智^{1,*}

(1.浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江食品质量安全工程研究院, 浙江 杭州 310018;

2.缙云县黄贡茶业有限公司, 浙江 丽水 321400)

摘要:以黄茶为研究对象, 探究厌氧处理对茶叶中 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)以及其他活性成分的含量和功能的影响, 并利用代谢组学分析厌氧过程促进黄茶富集GABA的机理和代谢途径变化。结果表明, 厌氧处理后黄茶中的GABA含量升至3.3 mg/g, 且其上下游氨基酸的含量发生了相应变化。同时, 厌氧处理后黄茶中的总酚和总黄酮含量均有显著提升。体外抗氧化、抗糖基化和降糖活性分析发现, 厌氧处理提高了黄茶的自由基清除能力、总抗氧化能力和抑制糖基化产物形成的能力, 但对其抑制淀粉消化酶活性的能力影响较小。经代谢组学分析共筛选出218种差异代谢物, 包括氨基酸类、有机酸、类黄酮、类核苷酸和糖类等。经通路富集分析, 发现受显著调控的通路包括氨基酸的生物合成代谢、色氨酸代谢、类黄酮生物代谢和丁酸代谢等。厌氧处理通过影响L-谷氨酸和琥珀酸半醛途径调控GABA含量。本研究可为GABA富集茶的研究和开发提供参考。

关键词: γ -氨基丁酸; 黄茶; 厌氧处理; 生物活性; 代谢组学

Effect of Anaerobic Treatment on Bioactive Properties of Yellow Tea and Metabolomic Analysis of Its Promoting Effect on γ -Aminobutyric Acid Enrichment

ZHANG Yaoqi¹, QIAN Weidong², FU Linglin¹, WANG Yanbo¹, ZHANG Qiaozhi^{1,*}

(1. Zhejiang Research Institute of Food Quality and Safety Engineering, School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China; 2. Jinyun County Huanggong Tea Industry Co. Ltd., Lishui 321400, China)

Abstract: In this study, we aimed to explore the effect of anaerobic treatment on the contents and functions of bioactive components such as γ -aminobutyric acid (GABA) in yellow tea and to analyze the mechanism by which anaerobic treatment promotes GABA enrichment using metabolomics. We also analyzed the changes in related metabolism pathways. The results showed that the content of GABA in yellow tea was increased to 3.3 mg/g after anaerobic treatment, and the contents of the upstream and downstream amino acids related to GABA were changed correspondingly. Moreover, anaerobic treatment significantly increased the contents of total phenolics and total flavonoids in yellow tea. *In vitro* bioactivity evaluation showed that anaerobic treatment improved the free radical scavenging capacity, total antioxidant activity and inhibitory effect on the formation of glycosylation products of yellow tea, but had little effect on the ability of yellow tea to inhibit starch digestion enzymes. A total of 218 differential metabolites between fresh and GABA-rich tea, including amino acids, organic acids, flavonoids, nucleotides, and sugars. Pathway enrichment analysis demonstrated that the amino acid biosynthesis, tryptophan metabolism, flavonoid biosynthesis, and butyrate metabolism pathways were significantly regulated. Anaerobic treatment could regulate the GABA content in yellow tea by affecting the L-glutamate and succinic semialdehyde pathways. This study can provide a reference for the research and development of GABA-rich tea.

Keywords: γ -aminobutyric acid; yellow tea; anaerobic treatment; biological activity; metabolomics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220501-004

中图分类号: TS272

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 06-0065-09

收稿日期: 2022-05-01

基金项目: 浙江省基础公益研究项目 (LGN22C200027)

第一作者简介: 章垚琪 (2001—) (ORCID: 0000-0003-0425-9450), 女, 本科, 研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 2413230402@qq.com

*通信作者简介: 张巧智 (1990—) (ORCID: 0000-0002-0578-4778), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品质量与安全。

E-mail: qiaozhi1005@outlook.com

引文格式:

章垚琪, 潜卫东, 傅玲琳, 等. 厌氧处理对黄茶生物活性的影响及 γ -氨基丁酸富集的代谢组学分析[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 65-73. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220501-004. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Yaoqi, QIAN Weidong, FU Linglin, et al. Effect of anaerobic treatment on bioactive properties of yellow tea and metabolomic analysis of its promoting effect on γ -aminobutyric acid enrichment[J]. Food Science, 2023, 44(6): 65-73. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220501-004. <http://www.spkx.net.cn>

黄茶是我国六大茶类之一, 属于轻发酵茶, 独特的“闷黄”工艺造就了黄茶“黄汤黄叶、味甘鲜爽”的品质特征。黄茶富含多种营养成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、降血脂、降血糖和护肝等保健疗效^[1]。 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种四碳非蛋白氨基酸, 具有镇定安神、降血压、改善睡眠、抑制癌细胞转移等多种生理功能^[2-3]。研究发现, GABA属一类逆境响应产物, 对维持植物中碳氮代谢的平衡有重要作用。当植物受到冷冻、盐胁迫、低氧、高温或机械损伤等逆境胁迫时, GABA含量会显著富集, 可据此制备富含GABA的茶产品(即伽玛茶)^[4]。目前, 多采用厌氧处理方式快速提升茶鲜叶中的GABA含量, 常见的厌氧条件包括 CO_2 、 N_2 、真空处理和间歇厌氧处理等^[5]。Chen等^[6]以中国台湾青心乌龙茶为原料, 经 N_2 和无氧交替处理后制得GABA含量达3 mg/g的茶叶; 沈强等^[7]利用真空有氧交替处理福鼎大白茶, 连续作用13 h后GABA含量达2.43 mg/g。植物中GABA的形成与其响应的多种生物与非生物胁迫相关, 提高茶叶中的GABA含量将进一步提升茶叶的保健功效。

当前, 针对GABA茶的研究主要集中在厌氧工艺的优化上, 并且针对的大多是绿茶、红茶和白茶, 鲜少有针对黄茶中GABA富集的研究。此外, 在厌氧过程中, 茶叶代谢途径的变化会造成氨基酸、茶多酚等一系列物质的含量发生改变, 进而影响处理后茶叶的品质和生物活性。然而, 目前针对厌氧处理影响GABA茶的保健功效及其富集作用的代谢机制分析鲜有报道。因此, 本研究以黄茶为研究对象, 经厌氧处理制得高GABA含量的黄茶, 分析处理后黄茶中活性物质的含量变化, 比较厌氧处理后黄茶的体外抗氧化活性、抗糖基化活性及降糖活性变化, 进一步通过超高效液相色谱-串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)联用技术通过类靶向代谢组学分析厌氧处理促进黄茶中GABA快速累积的机理, 揭示厌氧过程中黄茶的关键代谢途径差异, 阐明黄茶厌氧过程中主要品质成分的变化机制, 以期期为GABA保健茶的研究开发以及茶叶品质的提升提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

新鲜及厌氧处理后的黄茶由丽水市缙云县黄贡茶业有限公司提供。厌氧黄茶加工流程: 摊青 \rightarrow 厌氧 \rightarrow 杀青 \rightarrow 闷黄 \rightarrow 揉捻 \rightarrow 干燥 \rightarrow 分拣, 厌氧处理工艺参照林智等^[8]的报道, 未经厌氧处理的样品为对照。所有茶叶样品放置于密封袋中并于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

没食子酸、芦丁、阿卡波糖、核糖、2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪(2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine, TPTZ)上海阿拉丁生化科技股份有限公司; α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)、GABA等氨基酸标准品、稳定同位素标记标准品、乙酸铵 美国Sigma-Aldrich公司; 4-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷酸(β -D-glucopyranosiduronic acid, 4-nitrophenyl, pNPG)、抗坏血酸、槲皮素 上海麦克林生化科技有限公司; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)(pH 7.2~7.4, 0.01 mol/L) 北京博奥拓达科技有限公司; 甲醇、乙腈、甲酸(均为色谱纯) 美国Thermo Fisher Scientific公司; 实验用水均为Milli-Q超纯水。

1.2 仪器与设备

Multiskan Spectrum全波长酶标仪、ST16R高速冷冻离心机 美国Thermo Fisher Scientific公司; ExionLCTMAD液相色谱系统、QTRAP 6500+质谱仪 美国AB SCIEX公司; Xselect HSS T₃色谱柱、ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱 美国Waters公司。

1.3 方法

1.3.1 样品提取

取适量未处理的黄茶和厌氧处理后的黄茶样品置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 预冻10 h以上, 用冻干机冻干后研磨粉碎。称取粉碎后的样品粉末各2.5 g, 分别注入50 mL沸腾的超纯水, 于 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡水浴20 min。提取完成后, 粗茶汤经 $43\sim 48\text{ }\mu\text{m}$ 滤纸膜过滤, 滤液用超纯水定容至50 mL得茶汤提取液, 冻干后备用。

1.3.2 化学成分测定

1.3.2.1 靶向代谢组学检测GABA及氨基酸含量

取100 mg样品, 加入500 μL 80%甲醇溶液, 冰浴静

置5 min, 在15 000×g、4 °C离心20 min。取上清液, 用质谱级水稀释至甲醇质量分数为53%, 15 000×g、4 °C离心20 min, 收集上清液, 进行UPLC-MS/MS分析^[9]。准确称取氨基酸标准品, 制备5 mg/mL混标线性母液; 同时配制一定浓度的氘代丙氨酸和苯胺-D₂溶液, 混匀得到内标溶液。

色谱条件: ACQUITYUPLCBEHAmide色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 柱温50 °C; 流速0.3 mL/min; 进样量1 μL; 流动相A(含0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液), 流动相B(含0.1%甲酸的乙腈溶液); 梯度洗脱: 0~0.5 min, 20% A、80% B; 0.5~2.0 min, 20%~30% A、80%~70% B; 2.0~3.5 min, 30% A、70% B; 3.5~4.0 min, 30%~55% A、70%~45% B; 4.0~6.0 min, 98% A、2% B; 6.0~6.01 min, 55%~20% A、45%~80% B; 6.01~9.0 min, 20% A、80% B。

质谱条件: 电喷雾离子源; 正离子电离模式; 离子源温度550 °C; 离子源电压5 500 V; 气帘气压强35 psi; 雾化气压强50 psi; 辅助气压强60 psi。采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行扫描。根据目标物保留时间、质荷比和峰强度对照标准品信息和标准曲线进行定量。

1.3.2.2 总酚含量的测定

参照Singleton等^[10]的方法, 用Folin-Ciocalteu法进行测定。取2 mL样品提取液与79 μL福林-酚试剂混合, 涡旋并静置5 min。加入263 μL 20% Na₂CO₃溶液, 静置10 min后测定反应液在690 nm波长处的吸光度。以没食子酸标准品制备系列标准溶液(0~0.04 mg/mL)并制作标准曲线($y=13.283x+0.0262$, $R^2=0.9995$)。结果以每克样品中没食子酸当量表示(mg/g)。

1.3.2.3 总黄酮含量的测定

参考Bao Jinsong等^[11]的方法, 采用比色法进行测定。取0.5 mL样品提取液与0.15 mL 5% NaNO₃溶液混合, 静置5 min。加入0.15 mL 10% AlCl₃·6H₂O溶液, 静置5 min。加入1 mL 1 mol/L NaOH溶液, 涡旋并反应15 min后测定反应液在415 nm波长处的吸光度。以芦丁为标准品制备系列标准溶液(0~1 mg/mL)并制作标准曲线($y=0.339x+0.0321$, $R^2=0.9994$)。结果以每克样品中芦丁当量表示(mg/g)。

1.3.3 体外抗氧化活性测定

1.3.3.1 DPPH自由基清除能力测定

参照Zhang Qiaozhi等^[12]的方法, 并略有改动。将1 mL不同质量浓度样品提取液(0~0.06 mg/mL)与2 mL 0.05 mg/mL DPPH-乙醇溶液混合均匀, 室温下避光反应30 min, 测定反应液在519 nm波长处的吸光度。以乙醇代替样品为空白对照, 以抗坏血酸(0.001~0.1 mg/mL)

为阳性对照。按照式(1)计算样品的DPPH自由基清除率, 计算半抑制浓度(IC₅₀)值。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A 为样品组吸光度; A_0 为空白对照组吸光度。

1.3.3.2 ABTS阳离子自由基清除能力测定

参照Re等^[13]的方法, 并略有改动。将ABTS二铵盐储液与2.45 mmol/L K₂S₂O₈溶液以1:1(V/V)混匀, 室温避光反应12 h。用pH 7.4 PBS将溶液稀释至734 nm波长处吸光度为0.70±0.02, 得ABTS阳离子自由基工作液。将200 μL不同质量浓度样品提取液(0~1 mg/mL)与800 μL ABTS阳离子自由基工作液混合均匀, 室温下暗处反应6 min, 测定反应液在734 nm波长处吸光度。以PBS代替样品为空白对照, 以抗坏血酸(0.001~0.1 mg/mL)为阳性对照。按照式(2)计算样品的ABTS阳离子自由基清除率, 计算IC₅₀值。

$$\text{ABTS阳离子自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A 为样品组吸光度; A_0 为空白对照组吸光度。

1.3.3.3 铁离子还原能力(ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)测定

参考Benzie等^[14]的方法, 并略有改动。将100 μL不同质量浓度样品提取液(0~1.8 mg/mL)与500 μL新鲜制备的FRAP溶液充分混合, 37 °C水浴避光反应15 min, 于593 nm波长处测定反应液吸光度。以FeSO₄·7H₂O为标准品制备系列标准溶液(0.5~2 mmol/L)并制作标准曲线。FRAP值以每克样品中Fe²⁺浓度表示(mmol/(L·g))。FeSO₄·7H₂O的线性回归方程为 $y=1.1183x+0.1123$ ($R^2=0.9904$)。

1.3.4 晚期糖基化终末产物(advanced glycation end-products, AGEs)的抑制活性测定

参照Séro等^[15]的方法, 向黑色96孔板中依次加入20 μL不同质量浓度样品提取液(0~25 mg/mL)、50 μL 10 mg/mL牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液、80 μL PBS(pH 7.4, 0.1 mol/L)和50 μL核糖溶液(0.5 mol/L)。将孔板置于37 °C孵育24 h, 测定各孔在激发波长355 nm, 发射波长460 nm处的荧光强度。以PBS代替样品为空白对照, 以槲皮素(0.002~2 mg/mL)作为阳性对照。按照式(3)计算样品的AGEs形成抑制率, 计算IC₅₀值。

$$\text{AGEs形成抑制率}/\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: A 为样品组吸光度; A_0 为空白对照组吸光度。

1.3.5 体外降糖活性测定

1.3.5.1 α-淀粉酶抑制活性测定

参照Podsdek等^[16]的方法, 并略有改动。取40 μL不

同质量浓度样品提取液 (0~10 mg/mL)、20 μ L 0.2% 淀粉溶液和40 μ L 0.1 mg/mL α -淀粉酶溶液混合后37 $^{\circ}$ C 孵育20 min。加入160 μ L 0.4 mol/L 盐酸终止反应, 而后加入10 μ L 5 mmol/L I_2 (5 mmol/L KI), 混合均匀后测定反应液在620 nm波长处的吸光度。以PBS替代样品为空白对照, 以PBS替代 α -淀粉酶溶液为阴性对照, 以阿卡波糖 (0.01~0.5 mg/mL) 为阳性对照。按照式 (4) 计算样品 α -淀粉酶抑制率, 计算 IC_{50} 值。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率}/\% = \left(1 - \frac{B-A}{B_0-A_0}\right) \times 100 \quad (4)$$

式中: A 为样品组吸光度; A_0 为样品空白对照组吸光度; B 为阴性对照组吸光度; B_0 为阴性空白对照组吸光度。

1.3.5.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

参照Podsedek等^[16]的方法, 并略有改动。取100 μ L 不同质量浓度样品提取液 (0~10 mg/mL) 与50 μ L 0.1 mg/mL α -葡萄糖苷酶溶液混合后37 $^{\circ}$ C 孵育20 min。加入100 μ L 5 mmol/L pNPG溶液并旋涡均匀, 将反应液置于37 $^{\circ}$ C 暗处反应20 min。加入200 μ L 0.1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应, 混合均匀后测定其在405 nm波长处吸光度。以PBS替代样品为空白对照, 以阿拉伯糖 (0~50 mg/mL) 为阳性对照。按照式 (5) 计算样品 α -葡萄糖苷酶活性抑制率, 计算 IC_{50} 值。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶活性抑制率}/\% = \frac{A_0-A}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

式中: A 为样品组吸光度; A_0 为空白对照组吸光度。

1.3.6 类靶向代谢组学分析

代谢物提取同1.3.1节步骤。

色谱条件: Xselect HSS T_3 色谱柱 (2.1 mm \times 150 mm, 2.5 μ m); 柱温50 $^{\circ}$ C; 流速0.4 mL/min; 流动相A (含0.1%甲酸的水), 流动相B (含0.1%甲酸的乙腈^[17]); 梯度洗脱: 0~2 min, 98% A、2% B; 2~15 min, 98%~0% A、2%~100% B; 15~17 min, 0% A、100% B; 17~17.1 min, 0%~98% A、100%~2% B; 17.1~20 min, 98% A、2% B。

质谱条件: 电喷雾电离源; 离子源电压5 500 V (正离子), -4 500 V (负离子); 气帘气压强35 psi; 离子源温度550 $^{\circ}$ C; 雾化气压强60 psi; 辅助气压强60 psi。

1.3.7 代谢物鉴定

基于自建数据库, 采用MRM对实验样本进行检测, 根据子离子对化合物进行定量, 以母离子、子离子、保留时间、去簇电压和碰撞能进行定性。利用SCIEX OSV1.4软件进行峰匹配与峰面积提取, 得到各色谱峰面积积分数据, 最终得到代谢物的定性和定量结果。

1.4 数据处理

所有实验至少重复测定3次, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采

用IBM SPSS 26.0软件对数据进行统计分析, 显著性分析采用 t 检验或Mann-Whitney检验, $P < 0.05$, 差异显著, $P < 0.01$, 差异极显著。使用GraphPad Prism 8.0软件通过非线性回归曲线拟合计算 IC_{50} 值。

除单变量分析外, 对代谢组数据进行多元统计分析, 包括主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)。差异代谢物筛选的标准为: PLS-DA的变量投影重要性 (variable important in projection, VIP) 值大于1、两组间在统计学上差异显著 ($P < 0.05$) 且差异倍数 (fold change, FC) ≥ 2 或 $FC \leq 0.5$ 。通过R语言绘制差异代谢物的火山图、聚类热图和气泡图等。利用KEGG数据库分析差异代谢物的功能和代谢途径。

2 结果与分析

2.1 靶向代谢组学定量分析GABA及其他游离氨基酸含量

GABA是茶叶中重要的活性成分, 属于一类逆境响应产物, 在普通的新鲜茶叶中含量较低, 而受到低氧、低温和盐胁迫等逆境时含量会大幅增加。如图1所示, 未处理黄茶中GABA含量为153.2 μ g/g, 这与张金玉等^[18]测得的绿茶 (0.03~0.05 mg/g) 和红茶 (0.07~0.11 mg/g) 中GABA含量相近。经厌氧处理后, 黄茶中GABA含量提升至3 300.5 μ g/g, 提高了超20倍, 且已达到日本茶业届对伽玛茶中GABA含量的标准 (1.5 mg/g以上)。植物中GABA的合成主要受谷氨酸脱羧和多胺降解反应的影响。据报道, 低氧条件会导致细胞内pH值从正常生理值降低^[19], 从而激活植物中谷氨酸脱羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD) 的活性^[20]。因此对鲜茶进行厌氧胁迫处理, 可激发酶促反应, 促使L-谷氨酸经GAD催化、转化合成和多胺降解形成GABA^[21-22]。此外, 有研究发现, 茶叶厌氧过程中GABA含量的升高也与CsGAD的上调和二胺氧化酶的活性有关^[23]。吴琴燕等^[24]用脱氧剂处理鲜茶叶, 发现随着厌氧时间延长, 茶叶中GABA含量逐渐上升, 并于处理3 h后达到平衡, 处理后茶叶的GABA含量为1.2 mg/g。林智等^[25]发现在25 $^{\circ}$ C真空条件下处理茶鲜叶8 h, GABA含量升至最高, 可达3.3 mg/g。

另外, 茶叶中游离氨基酸的组成、含量和分布对茶叶香气和滋味的形成有重要影响^[26]。茶叶加工过程中, 氨基酸的降解和转化会直接影响茶叶的品质。如图1所示, 厌氧处理后, 除GABA外, 黄茶中的游离氨基酸总量从7.8 mg/mL降至4.9 mg/mL, 其中谷氨酸 (3.7 mg/g降至2.0 mg/g) 和天冬氨酸 (2.0 mg/g降至1.1 mg/g) 的含量下降最为明显。谷氨酸是GABA以及多种氨基酸的共

同前体物质, 厌氧过程中谷氨酸通过GAD向GABA转化而含量下降, 这与吴春兰^[27]和吴琴燕^[24]等发现的结果一致。相比之下, 厌氧处理后茶叶中的甘氨酸、脯氨酸、精氨酸和丙氨酸的含量有所上升, 这可能与厌氧条件下蛋白质水解和氨基酸代谢有关的途径受到调控有关。

	未处理黄茶	厌氧处理黄茶
GABA	153.2	3 300.5**
甘氨酸	7.9	11.1*
丝氨酸	232.2	162.4
甲硫氨酸	1.1	1.5
脯氨酸	9.0	11.5*
亮氨酸	67.5	58.3
谷氨酸	3 693.9	1 952.3**
苯丙氨酸	101.2	74.6*
赖氨酸	362.1	224.4
精氨酸	218.0	365.1*
色氨酸	135.1	86.9*
酪氨酸	106.5	146.4
组氨酸	68.6	48.3
缬氨酸	30.9	23.7
丙氨酸	160.3	224.3**
异亮氨酸	68.1	55.8
天冬氨酸	2 007.0	1 149.0**
苏氨酸	127.7	89.5
谷氨酰胺	368.2	228.0*
天冬酰胺	69.1	54.8

*.与未处理组相比差异显著 ($P < 0.05$); **.与未处理组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 表1、2同。

图1 厌氧处理后黄茶中GABA及游离氨基酸含量变化

Fig. 1 Changes in contents of GABA and free amino acids in yellow tea after anaerobic treatment

2.2 厌氧处理后黄茶的总酚、总黄酮含量变化

作为一种特殊类型的微生物后发酵茶, 黄茶在闷黄工序中经过空气中微生物发酵和水热作用下的非酶氧化, 其有机物质通过代谢转变可以形成多种有益成分。酚类和黄酮类物质是黄茶中重要的生物活性物质, 也是赋予黄茶抗氧化、抗肿瘤、降血糖和降血脂等多种生理功能的贡献物质。前人发现黄茶中的黄酮类化合物主要有类黄酮、黄酮/黄酮醇、酮类和黄烷酮等, 其中黄酮醇/黄酮主要以茶黄素、槲皮素、山柰酚、芹菜素等的糖苷形式存在, 上述化合物已被证明具有多种潜在生理保健功能^[28]。如表1所示, 未处理黄茶的总酚含量为181.2 mg/g, 总黄酮含量为203.0 mg/g, 而厌氧处理后黄茶的总酚和总黄酮含量分别为245.5 mg/g和333.2 mg/g。厌氧处理使黄茶的总酚含量极显著升高了35% ($P < 0.01$), 总黄酮含量极显著升高了64% ($P < 0.01$)。Kim等^[29]采用连续厌氧工艺处理绿茶后发现, 茶叶中主要茶多酚(如表没食子儿茶素没食子酸酯和表没食子酸儿茶素)含量显著上升; 类似地, 吴春兰等^[27]以真空交替透气处理毛叶茶, 发现处理后的茶叶总黄酮含量显著提升, 但个别茶多酚含量有所降低。黄茶中总酚含量增加可能与厌氧发酵过程中发生的氧化、水解等反应有关^[30]。相反的, Wang

等^[31]利用厌氧好氧循环处理绿茶后发现, 大多数茶多酚含量并未发生显著变化。低pH值和酶(β -葡萄糖苷酶、脂酶等)的存在以及细菌发酵可能会促进部分酚类物质发生转化^[32]。上述研究结果的差异可能与茶叶本身的组成和特性以及杀青和厌氧发酵的工艺条件有关。本研究中, 厌氧处理使黄茶中酚类物质得到富集, 这可能会赋予黄茶更理想的生物活性。

表1 厌氧处理后黄茶生物活性成分及体外抗氧化能力比较
Table 1 Changes in bioactive components and antioxidant activity of yellow tea after anaerobic treatment

样品	总酚含量/ (mg/g)	总黄酮含量/ (mg/g)	体外抗氧化活性			AGEs形成 抑制IC ₅₀ 值/ (mg/mL)
			DPPH自由基 清除IC ₅₀ 值/ (mg/mL)	ABTS阳离子自 由基清除IC ₅₀ 值/ (mg/mL)	FRAP值/ (mmol/(L·g))	
未处理黄茶	181.2±0.11	203.0±7.9	0.029±0.001	0.16±0.02	0.62±0.002	11.8±2.4
厌氧处理黄茶	245.5±3.75**	333.2±40.3**	0.016±0.002**	0.027±0.0003**	0.86±0.018**	3.75±1.6**
抗坏血酸			0.024±0.002	0.045±0.001		

2.3 厌氧处理后黄茶的体外抗氧化活性变化

2.3.1 DPPH自由基清除能力

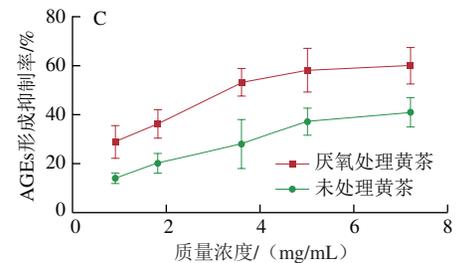
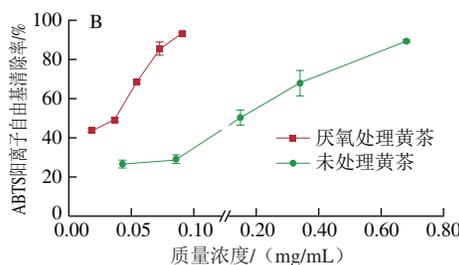
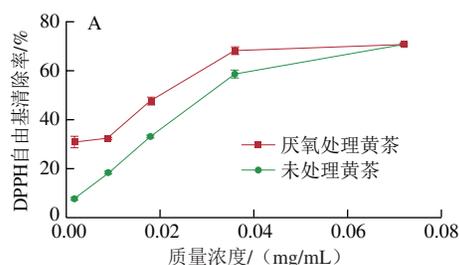


图2 厌氧发酵前后黄茶提取物的DPPH自由基清除能力(A)、ABTS阳离子自由基清除能力(B)和AGEs形成抑制能力(C)

Fig. 2 DPPH radical scavenging activity (A), ABTS radical cation scavenging activity (B), and inhibitory effect on AGEs formation (C) of yellow tea before and after anaerobic treatment

如图2A所示, 黄茶提取物的DPPH自由基清除率与其质量浓度呈剂量相关。厌氧处理前后, 黄茶提取物的DPPH自由基清除 IC_{50} 值分别为0.029 mg/mL和0.016 mg/mL, 差异极显著 ($P < 0.01$) (表1); 相比之下, 抗坏血酸的DPPH自由基清除 IC_{50} 值为0.024 mg/mL。这说明黄茶提取物具有较好的DPPH自由基清除能力, 且厌氧发酵增强了黄茶的抗氧化活性, 这可能与处理过程中GABA、黄酮类物质和疏水性氨基酸等活性成分的富集有关。类似的, Kim等^[29]发现持续厌氧处理提升了绿茶的DPPH自由基清除能力, 且这一效果随着厌氧处理时长增加而提升。

2.3.2 ABTS阳离子自由基清除能力

如图2B所示, 黄茶提取物的ABTS阳离子自由基清除率随其质量浓度的上升而增强。由表1可知, 厌氧处理前后, 黄茶提取物的ABTS阳离子自由基清除 IC_{50} 值分别为0.16 mg/mL和0.027 mg/mL, 差异极显著 ($P < 0.01$)。厌氧发酵后, 黄茶提取物的ABTS阳离子自由基清除能力强于抗坏血酸 ($IC_{50} = 0.045$ mg/mL), 且强于杨高等^[31]报道的绿茶 ($IC_{50} = 0.23$ mg/mL) 和乌龙茶提取物 ($IC_{50} = 0.38$ mg/mL)。可见, 黄茶对ABTS阳离子自由基有很强的清除能力, 厌氧处理过程进一步提高了其抗氧化效用。

2.3.3 FRAP分析

酸性条件下, Fe^{3+} -TPTZ被样品中抗氧化剂还原为 Fe^{2+} -TPTZ并呈现蓝色。由表1可知, 未处理和厌氧发酵后黄茶的FRAP值为0.62 mmol/(L·g)和0.86 mmol/(L·g), 差异极显著 ($P < 0.01$)。数值高于马慧等^[34]测得的绿茶 (0.044 mmol/(L·g)) 和茉莉花茶 (0.041 mmol/(L·g)), 但低于李晓飞^[1]测得的白茶 (2.33 mmol/(L·g))。同样的, 厌氧发酵处理提升了黄茶的总抗氧化能力。

2.4 厌氧处理后黄茶的体外抗糖基化活性分析

除抗氧化活性外, 已有研究指出茶叶的特定成分具有抑制非酶糖基化反应的能力, 这与其发挥降血糖、控制心脑血管疾病等活性的作用机制有关^[35]。非酶糖基化反应是还原糖羰基与蛋白质自由氨基间的加缩反应。体内非酶糖基化反应的发生会形成大量糖基化产物 (如AGEs), 这些产物对蛋白质的结构和功能有不良影响, 会介导一系列病理过程, 最终诱发糖尿病等慢性疾病的发生^[36-37]。如图2C所示, 在BSA-核糖反应模型中, 黄茶的加入降低了体系中AGEs的生成水平, 且这一抑制效果呈剂量-效应关系。由表1可知, 未处理和厌氧发酵后黄茶提取物抑制AGEs形成的 IC_{50} 值分别为11.8 mg/mL和3.75 mg/mL, 差异极显著 ($P < 0.01$)。厌氧发酵处理大幅提升了黄茶的抗糖基化活性。茶叶的活性物质, 如茶多酚和茶氨酸等, 可能通过清除自由基、钝化过渡金属

以及捕获活性反应中间体等多种途径阻断反应进程, 达到抑制蛋白质糖基化损伤的效果^[35,38]。Zhang Mimin等^[39]发现茶叶提取物中儿茶素、邻苯三酚等抗氧化成分有助于提高其抗糖基化活性, 与本实验结果一致。

2.5 厌氧处理后黄茶对淀粉消化酶的抑制活性变化

抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶等消化酶的活性, 阻碍碳水化合物在消化道内的分解, 可以达到抑制葡萄糖吸收、控制血糖水平的目的。淀粉消化酶抑制剂的挖掘和应用也是当前2型糖尿病的重要治疗手段之一^[40]。如表2所示, 厌氧处理前后黄茶的 α -淀粉酶抑制 IC_{50} 值分别为1.34 mg/mL和2.28 mg/mL, 但低于阿拉伯糖的抑制活性 ($IC_{50} = 0.08$ mg/mL)。郭爽爽等^[41]测得陈化1 h的茯砖茶的 α -淀粉酶抑制 IC_{50} 值为5.7 mg/mL, Li Songjie等^[42]测得鸪鹑茶的 α -淀粉酶抑制 IC_{50} 值为3.96 mg/mL, 均低于本实验中黄茶的抑制活性。

此外, α -葡萄糖苷酶抑制剂能控制小肠中碳水化合物的分解, 阻断1,4-糖苷键水解, 从而有效减缓碳水化合物水解为葡萄糖的过程。质量浓度为5.1 mg/mL时, 未处理黄茶对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为74.9%, 与相同质量浓度下厌氧处理黄茶的抑制率相似, 这表明厌氧处理对黄茶抑制 α -葡萄糖苷酶活性影响较小。值得注意的是, 这与文献中报道的茶多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶具有较强抑制作用的结果不相符^[43]。厌氧发酵后黄茶的总酚含量上升, 抗氧化能力升高但抑制淀粉消化酶活性的水平并未发生明显改变, 这可能是由于, 多酚类物质尤其是黄酮类化合物的消化酶抑制活性与其结构和取代基团有关, 厌氧处理可能并未对那些具有较强抑制活性的多酚含量产生影响^[43]; 此外, 厌氧过程中产生的其他次级代谢产物, 如部分有机酸和 Cl^- 、 Ca^{2+} 等离子, 可能通过别构效应等方式引起蛋白质构象发生变化从而增强消化酶活性, 其机制有待进一步研究^[44]。

表2 厌氧处理后黄茶对淀粉消化酶的抑制活性分析

Table 2 Changes in inhibitory effect on starch digestive enzymes of yellow tea after anaerobic treatment

样品	IC_{50} 值/(mg/mL)	
	α -淀粉酶	α -葡萄糖苷酶
未处理黄茶	1.34±0.08	74.9±0.72
厌氧处理黄茶	2.28±0.05	74.9±1.47
阿拉伯糖	0.08±0.28	28.2±1.23

2.6 代谢组学解析厌氧处理促进黄茶富集GABA的机理和代谢途径变化

2.6.1 PLS-DA与差异代谢物筛选

代谢组学是对生物体内的小分子代谢产物进行定性或定量分析, 探索代谢物差异及代谢机制, 并以此研究生物体系的一门科学^[45]。因其高效、全面以及准确的特点, 目前已被广泛用于茶叶品质和代谢机理的研究^[46]。

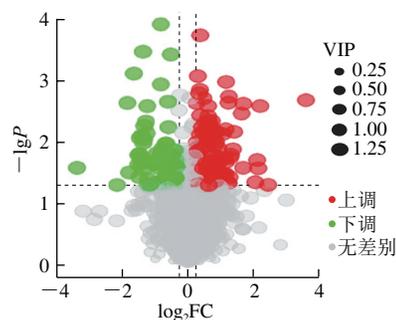
通过UPLC-MS/MS代谢组学分析,经峰匹配和数据库检索后共鉴定到1502种化合物离子用于后续分析,其中包括氨基酸及其衍生物215种、类黄酮151种、有机酸及其衍生物89种、糖类及其衍生物88种等,共62个大类。

进一步采用有监督的PLS-DA区分组间代谢轮廓的总体差异。厌氧处理前后黄茶建立的PLS-DA模型参数解释率 R^2 为1,预测率 Q^2 为0.64, $R^2 > Q^2$,表明该模型能较好解释不同样品间的差异,模型预测能力好。以上述1502种代谢物的峰面积为指标,按照 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 和 $FC \geq 2$ 或 ≤ 0.5 标准筛选差异代谢物,共筛选到218种差异代谢物,其中133种物质显著上调,85种物质显著下调,种类及变化情况如表3所示。差异代谢物的火山图可以更直观地展现代谢物在不同样本间的表达差异,如图3所示。其中, γ -氨基丁酸、4-乙酰氨基丁酸、精氨酸、琥珀酸等能量代谢中间物,以及没食子儿茶素和黄芪苷等类黄酮为主要上调差异代谢物,而L-谷氨酸、L-色氨酸、L-苹果酸、DL-天冬氨酸、DL-吡啶-3-乳酸、L-谷氨酰胺和腺苷等为主要下调差异代谢物。

表3 厌氧处理后黄茶的差异代谢物种类与变化情况

Table 3 Types and number of differential metabolites in yellow tea after anaerobic treatment

组别	化合物数量	上调化合物数量	下调化合物数量
氨基酸及其衍生物	48	30	18
类黄酮	18	10	8
核苷酸及其衍生物	14	11	3
糖类及其衍生物	12	3	9
脂肪酰类	11	8	3
有机酸及其衍生物	8	4	4
萜类	7	4	3
磷脂	6	1	5
吡啶及其衍生物	6	5	1
生物碱及其衍生物	6	4	2
磷脂	6	1	5
其他	76	52	24
总数	218	133	85



绿色为显著下调的代谢物,红色为显著上调的代谢物;VIP>1、P<0.05和FC≥2或≤0.5。

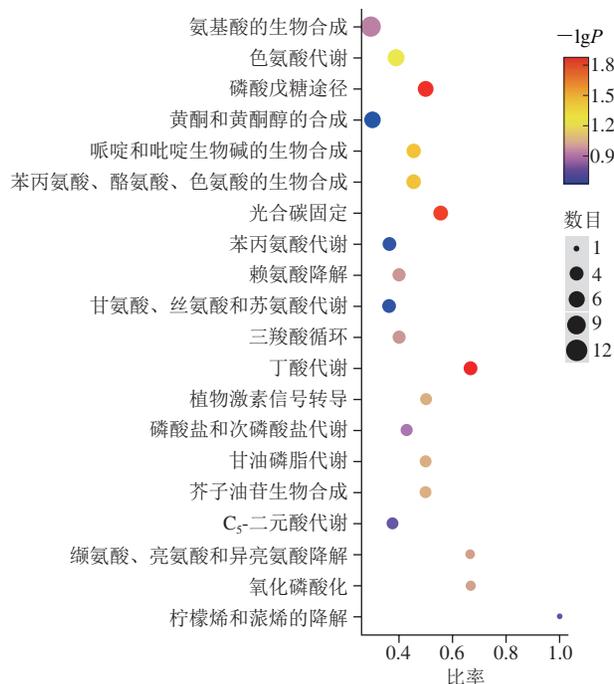
图3 厌氧处理后黄茶的差异代谢物火山图

Fig. 3 Volcanic map of differential metabolites in yellow tea after anaerobic treatment

2.6.2 差异代谢物通路分析

以KEGG Pathway数据库对差异代谢物进行途径分

析,获知差异代谢物参与代谢通路的相关信息,选取P值由小到大排序前20的通路绘制富集气泡图,如图4所示。厌氧处理过程中,氨基酸的生物合成和色氨酸代谢途径受调控的差异代谢物最多,分别为12种和7种;其次为磷酸戊糖途径、黄酮和黄酮醇生物代谢、丙烷、哌啶和吡啶类生物碱的生物合成等,这与厌氧处理后茶叶中的主要差异代谢物为氨基酸、有机酸、类黄酮和糖类等相符。此外,光合生物体中的碳固定作用、苯丙氨酸代谢、柠檬酸循环(三羧酸循环)和丁酸代谢等途径也受到影响。由此可见,厌氧处理导致黄茶中多种代谢途径受到干扰。



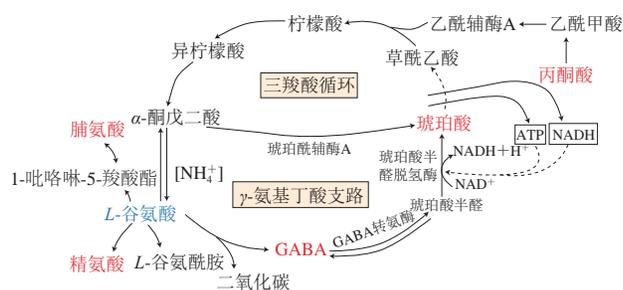
点的大小为相应通路中差异代谢物数目,点越大则该通路内差异代谢物越多;点颜色代表富集分析的 $-\lg P$ 值,颜色越深值越小,富集程度越显著,越具统计学意义。

图4 组间通路富集气泡图

Fig. 4 Scatter plot of KEGG pathway enrichment analysis

代谢通路图能直观反映代谢物的上下游关系、作用模式及代谢通路的拓扑结构,有利于研究主要产物代谢途径的动态变化。以图4中受到调控最为显著的丁酸代谢通路为例($P=0.013$),L-谷氨酸和琥珀酸半醛是黄茶代谢中GABA合成的上下游物质。其中,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径中,厌氧处理提高了1-吡咯啉-5-羧酸酯、L-谷氨酰胺和2-氧代戊二酸酯含量,在相关酶的作用下合成了L-谷氨酸,L-谷氨酸进一步在GAD作用下生成GABA;在三羧酸循环中,琥珀酸含量升高,在琥珀酰辅酶A催化作用下形成琥珀酸半醛,L-谷氨酸和琥珀酸半醛发生转氨反应,可逆生成GABA。此外,在精氨酸和脯氨酸代谢通路中, γ -谷氨酰-氨基丁酸经 γ -谷氨酰- γ -

氨基酸水解酶催化作用、4-乙酰氨基丁酸酯经精氨酸脱羧酶通路、4-氨基丁醛和4-胍基丁酸均可生成GABA, 如图5所示。



ATP.三磷酸腺苷; NADH.还原型辅酶I; NAD⁺.辅酶I; 红色为上调的氨基酸, 蓝色为下调的氨基酸。

图5 黄茶厌氧过程中GABA的富集合成途径

Fig. 5 Enrichment of GABA during anaerobic treatment of yellow tea

3 结论

对厌氧处理后黄茶中GABA的富集以及其他活性成分的含量进行分析, 系统比较了厌氧发酵对黄茶主要生理功能以及代谢组分的影响。结果表明, 厌氧处理后黄茶中GABA含量大幅升高, 导致其上下游氨基酸的含量发生了变化; 同时, 厌氧处理对黄茶中的多种酚类物质具有富集作用。黄茶本身具有较为理想的抗氧化、抗糖基化和降糖活性, 厌氧处理后其活性没有丧失, 且部分功能活性得到了显著增强, 这可能与黄茶中GABA和类黄酮等物质的含量上升有关。通过代谢组学筛选出差异常代谢物, 主要包括氨基酸、有机酸、类黄酮、类核苷酸和糖类等。差异代谢物涉及的通路包括氨基酸的生物合成代谢、色氨酸代谢、类黄酮生物代谢和丁酸代谢等。以上研究结果揭示了黄茶厌氧过程中主要差异代谢物的变化规律。黄茶经厌氧处理后GABA和类黄酮含量得到了同步提升, 且具有理想的生理保健活性, 可以作为高品质GABA茶的优异材料, 本研究为进一步研究和开发GABA富集茶提供了理论依据。

参考文献:

[1] 李晓飞. 白茶, 黄茶等六大茶类抗氧化, 抗炎及抗癌功能特性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017: 3.

[2] LIU K, KIM J, KIM D W, et al. Lhx6-positive GABA-releasing neurons of the zona incerta promote sleep[J]. *Nature*, 2017, 548: 582-587. DOI:10.1038/nature24274.

[3] KIM S, JO K, HONG K B, et al. GABA and l-theanine mixture decreases sleep latency and improves NREM sleep[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2019, 57(1): 64-72. DOI:10.1080/13880209.2018.1557698.

[4] 张亚敏. 基于代谢组解析厌氧处理促进茶鲜叶积累GABA的机理[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018: 6-7.

[5] 王凯凯, 孙滕, 宋佳敏, 等. γ -氨基丁酸(GABA)形成机理及富集方法的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(14): 323-329. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2018.14.061.

[6] CHEN B C, HUNG M Y, WANG H F, et al. GABA tea attenuates cardiac apoptosis in spontaneously hypertensive rats (SHR) by enhancing PI3K/Akt-mediated survival pathway and suppressing Bax/Bak dependent apoptotic pathway[J]. *Environmental Toxicology*, 2018, 33(7): 789-797. DOI:10.1002/tox.22565.

[7] 沈强, 许凡凡, 张小琴, 等. 真空厌氧间歇技术富集福鼎大白茶茶鲜叶GABA的参数优化[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(11): 156-160. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2018.11.027.

[8] 林智, 尹军峰, 谭俊峰, 等. 一种提高 γ -氨基丁酸含量的茶叶加工方法: CN200310109054.3[P]. 2004-11-17[2022-04-20].

[9] WANT E J, MASSON P, MICHPOULOS F, et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(1): 17-32. DOI:10.1038/nprot.2012.135.

[10] SINGLETON V L, ROSSI J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16(3): 144-158.

[11] BAO J S, CAI Y Z, SUN M, et al. Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(6): 2327-2332. DOI:10.1021/jf048312z.

[12] ZHANG Q Z, TONG X H, LI Y, et al. Purification and characterization of antioxidant peptides from alcalase-hydrolyzed soybean (*Glycine max* L.) hydrolysate and their cytoprotective effects in human intestinal Caco-2 cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(20): 5772-5781. DOI:10.1021/acs.jafc.9b01235.

[13] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9/10): 1231-1237.

[14] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70-76. DOI:10.1006/abio.1996.0292.

[15] SÉRO L, SANGUINET L, BLANCHARD P, et al. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts[J]. *Molecules*, 2013, 18(11): 14320-14339. DOI:10.3390/molecules181114320.

[16] PODSEDEK A, MAJEWSKA I, REDZYNIA M, et al. *In vitro* inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(20): 4610-4617. DOI:10.1021/jf5008264.

[17] LUO P, DAI W, YIN P, et al. Multiple reaction monitoring-ion pair finder: a systematic approach to transform nontargeted mode to pseudotargeted mode for metabolomics study based on liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(10): 5050-5055. DOI:10.1021/acs.analchem.5b00615.

[18] 张金玉, 李美凤, 郇秋艳, 等. 不同厌氧时间对绿茶和红茶加工品质的影响[J]. *茶叶学报*, 2021, 62(2): 78-84.

[19] SNEDDEN W A, CHUNG I, PAULS R H, et al. Proton/l-glutamate symport and the regulation of intracellular pH in isolated mesophyll cells[J]. *Plant Physiology*, 1992, 99(2): 665-671.

[20] MUSTROPH A, BARDING G A, KAISER K A, et al. Characterization of distinct root and shoot responses to low-oxygen stress in arabidopsis with a focus on primary C- and N-metabolism[J]. *Plant Cell and Environment*, 2014, 37(10): 2366-2380. DOI:10.1111/pce.12282.

- [21] WU Q, GUO R, ZHANG W, et al. Effects of aminoguanidine on γ -aminobutyric acid accumulation pathways in fresh tea leaves under hypoxic conditions[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2020, 55(2): 899-907. DOI:10.1111/ijfs.14360.
- [22] BOUCHÉ N, LACOMBE B, FROMM H. GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism[J]. Trends in Cell Biology, 2003, 13(12): 607-610. DOI:10.1016/j.tcb.2003.10.001.
- [23] LIAO J, WU X, XING Z, et al. γ -Aminobutyric acid (GABA) accumulation in tea (*Camellia sinensis* L.) through the GABA shunt and polyamine degradation pathways under anoxia[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(14): 3013-3018. DOI:10.1021/acs.jafc.7b00304.
- [24] 吴琴燕, 陈露, 张文文, 等. 脱氧剂厌氧处理对茶鲜叶 γ -氨基丁酸富集的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 203-209. DOI:CNKI:SUN:ZGSP.0.2018-09-026.
- [25] 林智, 林钟鸣, 尹军峰, 等. 厌氧处理对茶叶中 γ -氨基丁酸含量及其品质的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 35-39. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2004.02.003.
- [26] 张悦, 朱荫, 叶火香, 等. 不同产地香茶的主要化学成分含量的差异分析[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 184-191. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201722028.
- [27] 吴春兰, 黄亚辉, 赖幸菲, 等. γ -氨基丁酸(GABA)毛叶茶品质成分分析[J]. 植物分类与资源学报, 2014, 36(3): 411-418. DOI:10.7677/ynzwj201413125.
- [28] LV H P, ZHU Y, TAN J F, et al. Bioactive compounds from Pu-erh tea with therapy for hyperlipidaemia[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19: 194-203. DOI:10.1016/j.jff.2015.09.047.
- [29] KIM J H, KIM M Y. Enhancement of bioactive components content and the antioxidant activity of green tea after continuous anaerobic incubation[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2012, 14(4): 837-844. DOI:10.1016/j.agee.2012.04.006.
- [30] GAO B, WANG J, WANG Y, et al. Influence of fermentation by lactic acid bacteria and *in vitro* digestion on the biotransformations of blueberry juice phenolics[J]. Food Control, 2022, 133: 108603. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.108603.
- [31] WANG H F, TSAI Y S, LIN M L, et al. Comparison of bioactive components in GABA tea and green tea produced in Taiwan[J]. Food Chemistry, 2006, 96(4): 648-653. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.02.046.
- [32] GNANGNON B, DURAISINGH M T, BUCKEE C O. Deconstructing the parasite multiplication rate of *Plasmodium falciparum*[J]. Trends in Parasitology, 2021, 37(10): 922-932. DOI:10.1016/j.pt.2021.05.001.
- [33] 杨高中, 彭群华, 张悦, 等. 厌氧处理对不同类型茶叶的氨基酸组成及生物活性的影响[J]. 茶叶科学, 2022, 42(2): 222-232. DOI:10.13305/j.cnki.jts.2022.02.002.
- [34] 马慧, 茹鑫, 王津, 等. 4种茶叶水提物及茶多酚的体外抗氧化性能研究[J]. 2022(8): 65-70.
- [35] ZHOU Q, CHENG K W, XIAO J, et al. The multifunctional roles of flavonoids against the formation of advanced glycation end products (AGEs) and AGEs-induced harmful effects[J]. Trends in Food Science and Technology, 2020, 103: 333-347. DOI:10.1016/j.tifs.2020.06.002.
- [36] ZHANG Q, WANG Y, FU L. Dietary advanced glycation end-products: perspectives linking food processing with health implications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(5): 2559-2587. DOI:10.1111/1541-4337.12593.
- [37] SINGH R, BARDEN A, MORI T, et al. Advanced glycation end-products: a review[J]. Diabetologia, 2001, 44(2): 129-146. DOI:10.1007/s001250051591.
- [38] ZHANG Q, HUANG Z, WANG Y, et al. Chinese bayberry (*Myrica rubra*) phenolics mitigated protein glycoxidation and formation of advanced glycation end-products: a mechanistic investigation[J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130102. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130102.
- [39] ZHANG M M, OTAKE K, MIYAUCHI Y, et al. Comprehensive NMR analysis of two kinds of post-fermented tea and their anti-glycation activities *in vitro*[J]. Food Chemistry, 2019, 277: 735-743. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.11.028.
- [40] PROENÇA C, RIBEIRO D, FREITAS M, et al. Flavonoids as potential agents in the management of type 2 diabetes through the modulation of α -amylase and α -glucosidase activity: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(12): 3137-3207. DOI:10.1080/10408398.2020.1862755.
- [41] 郭爽爽, 唐磊, 黄荣浩, 等. 陈化时间对泾阳茯砖茶品质及抑制 α -淀粉酶与脂肪酶效应的影响[J]. 西北林学院学报, 2018, 33(5): 179-184.
- [42] LI S J, ZHANG W M, WANG R M, et al. Screening and identification of natural α -glucosidase and α -amylase inhibitors from partridge tea (*Mallotus furetiensis* Muell-Arg) and *in silico* analysis[J]. Food Chemistry, 2022, 388: 133004. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133004.
- [43] XIAO J, NI X, KAI G, et al. A review on structure-activity relationship of dietary polyphenols inhibiting α -amylase[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013, 53(5): 497-506. DOI:10.1080/10408398.2010.548108.
- [44] MAURUS R, BEGUM A, WILLIAMS L K, et al. Alternative catalytic anions differentially modulate human α -amylase activity and specificity[J]. Biochemistry, 2008, 47(11): 3332-3344. DOI:10.1021/bi701652t.
- [45] 许国旺, 鑫路, 杨胜利. 代谢组学研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(6): 701-711.
- [46] 虞昕磊, 艾于杰, 曲凤凤, 等. 代谢组学在研究茶叶品质形成中的应用[J]. 茶叶科学, 2018, 38(1): 20-32. DOI:10.13305/j.cnki.jts.2018.01.003.