

## 香叶醇及其糖苷在茶树中的积累和对红茶香气的贡献

周汉琛, 杨霁虹, 刘亚芹, 王 辉, 雷攀登\*

(安徽省农业科学院茶叶研究所 安徽黄山 245000)

**摘要** 采用液相质谱联用仪 LC-MS、气相质谱联用仪 GC-MS 分析不同茶树品种、不同组织器官、不同时间香叶醇及其糖苷含量的变化,结果显示:香叶基樱草糖苷在中国变种(*Camellia sinensis* var. *sinensis*)中的含量显著高于阿萨姆变种(*C. sinensis* var. *assamica*)。香叶基樱草糖苷在茶树幼嫩叶片中含量最高,在根中的含量最低,总体表现出嫩叶>茎>花>根。3 月份茶树嫩梢中的香叶醇积累量最高,随着月份的增加而逐渐降低。在祁门红茶加工过程中,香叶基樱草糖苷含量在揉捻阶段显著降低。黄山地区 6 个品种红茶中,皖茶 4 号红茶中的香叶醇含量最高;6 个品种红茶茶汤中香叶醇的气味活性值(OAV)均>1,分布范围 3.93~28.38。Pearson 相关性分析显示,有 7 个萜类合成酶候选基因表达量与香叶基樱草糖苷含量变化呈显著相关。本研究结果为进一步探究香叶醇积累差异成因及形成机制提供理论参考。

**关键词** 香叶醇; 香叶基樱草糖苷; 红茶; 气味活性值; 萜类合成酶

**文章编号** 1009-7848(2023)06-0339-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.034

茶叶香气是评价茶叶品质的重要指标之一,目前在各茶类中已鉴定出约 700 多种挥发性物质<sup>[1]</sup>。其中,萜类化合物是茶叶中一类重要的呈香物质<sup>[2]</sup>,尤其是单萜、倍半萜类等挥发性化合物对茶叶香气品质有着重要贡献<sup>[1]</sup>。它们大多具有花果香及较低的香气阈值,容易被人类嗅觉感知,比如香叶醇、芳樟醇、橙花叔醇等。香叶醇和芳樟醇作为单萜类香气物质在各类茶叶中普遍含量较高,橙花叔醇对乌龙茶花果香的形成具有重要贡献<sup>[3]</sup>。

香叶醇具有典型的玫瑰花香,在红茶、绿茶产品中含量丰富。Wang 等<sup>[4]</sup>研究表明香叶醇是祁门红茶中含量最高的萜烯类化合物。日本的 Takeo 研究表明,茶树品种(*C. sinensis* var. *sinensis*)鲜叶中香叶醇含量显著高于茶树品种(*C. sinensis* var. *assamica*),后者中的芳樟醇含量则较高<sup>[5-6]</sup>。Kang 等<sup>[7]</sup>研究显示,祁门红茶中的香叶醇相对含量(6.89%)显著高于大吉岭红茶(4.28%)、锡兰红茶(0.5%)及阿萨姆红茶(0.32%),这表明香叶醇对祁

门红茶的特征香气形成具有重要贡献<sup>[7]</sup>。此外,关于太平猴魁、龙井绿茶、滇红红茶的研究显示,香叶醇对各类茶的香气品质形成同样具有重要贡献<sup>[8-11]</sup>。

在茶树中,香叶醇主要以糖苷态储存于细胞中,且主要以樱草糖苷形式储存,还有一部分以葡萄糖苷态储存<sup>[12]</sup>。这类萜类糖苷物质作为茶叶香气前体,在茶叶加工过程中由葡萄糖苷酶、樱草糖苷酶等水解酶催化并释放出苷元物质<sup>[12]</sup>。研究显示茶树中香叶醇的生物合成受季节变化以及机械损伤的影响<sup>[4-6]</sup>。此外,研究表明香叶醇糖苷含量随季节的变化波动较大,春季含量最高,香叶醇糖苷为 47.5(峰面积之比),夏季次之(26.6),而秋季最低(13.3)<sup>[4]</sup>。香叶醇糖苷含量在不同叶片发育状态下也表现出不一致,其中幼嫩叶片中含量最高,表现出幼嫩叶片>茎>成熟叶片>枝条<sup>[12]</sup>。

香叶醇作为重要的茶香物质,深入研究其在茶树中的积累特性及对茶叶香气的贡献,能够促进后续系统研究茶叶香气形成机制。本研究对不同茶树品种、不同茶树器官、不同时间的香叶醇积累特性进行分析,同时对不同茶树品种鲜叶加工的红茶及加工过程中香叶醇的变化进行研究,旨在为后续研究香叶醇对茶叶香气品质的贡献提供理论依据。

**收稿日期:** 2022-06-27

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金项目(32002096);安徽省科技重大专项(20203a06020019);安徽省农业科学创新团队项目(2021YL036);国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-19)

**第一作者:** 周汉琛,女,博士,副研究员

**通信作者:** 雷攀登 E-mail: lpteagle@126.com.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本研究中供试茶树品种 (*C. sinensis* var. *sinensis*)“鳧早 2 号”(FZ2)、“舒茶早”(SCZ)、“皖茶 91”(WC91)、“中茶 108”(ZC108)、“浙农 117”(ZN117)、“皖茶 4 号”(WC4)、“楮叶种”(ZYZ)取材于安徽省农业科学院茶叶研究所;供试阿萨姆变种 (*C. sinensis* var. *assamica*)“勐库大叶”(MKDY)、“清水 3 号”(QS3)、“紫鹃”(ZJ)、“云抗 14”(YK14)、“云抗 37”(YK37)、“云抗 43”(YK43)取材于云南省农科院茶叶研究所;祁门红茶加工过程样(鲜叶、萎凋叶、揉捻叶、不同发酵时间叶)取材于安徽省农业科学院茶叶研究所;茶树品种“舒茶早”第一叶、第二叶、第三叶及茎取材于 5 月份,花、根等器官取材于 9 月份;不同月份取样均在每月份的下旬。

试验中所用标准品香叶醇购买于 Sigma 公司;香叶基樱草糖苷委托山东大学国家糖工程技术研究中心合成。

### 1.2 仪器与设备

本试验中香叶醇含量分析使用气相色谱质谱联用仪 Agilent 7697A-7890A (美国 Agilent 公司);香叶基樱草糖苷分析使用液相-四级杆-飞行时间质谱仪 Agilent 1290-Agilent 6545 LC/Q-TOF(美国 Agilent 公司)。

### 1.3 香叶醇提取方法

参考文献中方法<sup>[13-14]</sup>,采用顶空固相微萃取(headspace solid phase microextraction, HS-SPME)对样品中的挥发性物质进行吸附。红茶中的挥发性物质提取方法为:准确称取 0.2 g 茶粉末,加入 10 mL 沸水(茶水比 1:50),于 70 °C 水浴平衡 5 min 后,利用 65 μmol/L PDMS/DVB SPME 萃取头(美国 Supelco 公司)于 70 °C 水浴吸附 30 min,后用于 GC-MS 分析。

鲜叶样挥发物提取时,利用液氮将鲜叶研磨粉碎后称取 0.2 g,加入 5 mL 超纯水,于 70 °C 水浴平衡 5 min 后,利用 65 μmol/L PDMS/DVB SPME 萃取头于 70 °C 水浴吸附 30 min,后用于 GC-MS 分析。

### 1.4 GC-MS 分析、香叶醇鉴定及定量

气相质谱联用仪 Agilent 7697A-7890A 用于

本研究中挥发性物质分析,其中气相色谱柱为 DB-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm;美国 Agilent 公司),气相不分流,流速为 1.0 mL/min,载气为氦气,色谱柱升温程序为:初始温度 50 °C,保持 1 min;以 10 °C/min 速率上升到 100 °C,并保持 1 min;后以 4 °C/min 速率上升到 200 °C,并保持 1 min;以 16 °C/min 速率上升到 280 °C,并保持 7 min。

香叶醇鉴定依据 NIST 数据库、化合物保留指数(retention indices, RI)及标准品。香叶醇定量方法为使用标准品定量,准确吸取 1 μL 300 μg/mL 香叶醇标准品加入 5 mL 或 10 mL 超纯水,于 70 °C 水浴平衡 5 min 后,利用相同 SPME 萃取头于 70 °C 水浴吸附 30 min 后上机分析。香叶醇含量计算方式为:利用样品中峰面积与标准品峰面积之比计算含量,其中红茶样品中香叶醇含量表示为 μg/L,鲜叶中香叶醇含量表示为 μg/g (鲜重, fresh weight, FW)。

### 1.5 香叶基樱草糖苷提取

利用液氮将鲜叶样品、红茶加工过程样研磨粉碎,准确称取 0.100 g,并立即加入 750 μL 预冷的含 0.1%甲酸的甲醇,充分振荡 15 s 后超声 15 min,后在 10 000 r/min 下离心 10 min,取上清液稀释 10 倍后,采用 0.22 μm 有机系滤膜过滤,并用于液相质谱分析。

### 1.6 UPLC/Q-TOF 分析

Agilent 1290 超高效液相色谱仪结合 Agilent 6545 LC/Q-TOF 四级杆-飞行时间质谱仪用于样品中的香叶基樱草糖苷分析;色谱柱为 Zorbax reverse-phase 柱 (RRHD SB-C18 3×150 mm, 1.8 μm)。离子源为 Dual ESI, A 相洗脱液为含 0.1%甲酸的蒸馏水, B 相洗脱液为含 0.1%甲酸的乙腈。LC-MS/MS 运行时洗脱总时间为 35 min:首先 5% B 保持 8 min;后 10 min 内 B 相梯度由 5% 上升到 45%;5 min 内 B 相梯度从 45% 上升到 65%,并保持 4 min;3 min 内 B 相梯度从 65% 下降到 40%;3 min 内 B 相梯度从 40% 下降到 5%,并保持 2 min。流速始终为 0.4 mL/min,样品进样量为 2 μL,色谱柱温度设为 35 °C。MS 采集率为 1 spectra/s,采集范围设为 100~700。Auto 模式下 MS/MS 采集率为 2 spectra/s。离子源碰撞能量为 25 和

35 eV 两种。

本研究中样品在负离子模式下运行, 负离子模式下香叶基樱草糖苷提取母离子 ( $m/z$ ) 为 493.22。本试验条件下, 香叶基樱草糖苷出峰时间约为 17.6 min。采用 Agilent Masshunter (B.07.00 版本) 和 Agilent 定量软件 Qualitative Analysis (B.07.00 版本) 进行化合物的分析。样品中香叶基樱草糖苷通过标准品 MS/MS 峰图进行鉴定, 并通过与标准品峰面积之比进行化合物的定量, 含量表示为  $\mu\text{g/g}$  (FW)。

### 1.7 香叶醇生物合成候选基因筛选与功能分析

利用开放网站 TPIA (<http://tpdb.shengxin.ren/>) 获得“舒茶早”二代基因组组装数据。依据 Xia 等<sup>[15]</sup>研究结果显示, 二代基因组 CSS2.0 中共有 72 个候选萜类合成酶基因。通过基因结构<sup>[16]</sup>、蛋白结构域解析 (<http://pfam.xfam.org/>) 获得具有全长功能的单萜类合成酶基因或双功能萜类合成酶基因。

全长克隆候选基因, 并与植物双元表达载体 PBI121 连接, 以农杆菌介导的遗传转化体系瞬时过表达于本氏烟草叶片中, 3 d 后收取叶片。其中以侵染缓冲液 (MES 10 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  20 mmol/L, 乙酰丁香酮 200  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理叶片为阴性对照, 瞬时过表达罗勒 (Sweet Basil) 香叶醇合成酶基因 *ObGES* 叶片为阳性对照。将瞬时表达叶片液氮研磨后, 称取 0.2 g, 加入 5 mL 超纯水以及 200 mg/mL AR2000 (广谱糖苷酶) 于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴平衡 20

min 后, 利用 65  $\mu\text{mol/L}$  PDMS/DVB SPME 萃取头于 70  $^{\circ}\text{C}$  水浴吸附 30 min, 后用于 GC-MS 分析。

### 1.8 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件对试验样品间的差异进行单因素方差分析 (ANOVA), 其中运算方法为最小显著性差异法 (LSD), 以检验不同样品间的显著性 ( $P < 0.05$ )。相关性分析利用 GraphPad Prism9 软件 (GraphPad, USA) 完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 香叶基樱草糖苷在茶树中的积累特性

香叶醇在茶树中主要以糖苷态储存在细胞中, 且主要以樱草糖苷型储存, 约占 70%~78%<sup>[17]</sup>。为量化香叶醇积累差异, 本研究分析了香叶基樱草糖苷在不同茶树品种间、茶树不同组织器官中的含量变化。结果显示 6 个供试中国变种 (*C. sinensis* var. *sinensis*) 鲜叶中显著积累更多的香叶基樱草糖苷, 分布范围为 1.4~3.3  $\mu\text{g/g}$ , 而 6 个阿萨姆变种 (*C. sinensis* var. *assamica*) 叶片中香叶基樱草糖苷的含量普遍较低, 约为 0.1~0.6  $\mu\text{g/g}$  (图 1a)。在 12 个供试茶树品种中, 茶树品种 WC4 嫩梢中的香叶基樱草糖苷含量最为丰富, 其次为祁门楮叶种 ZYZ (图 1a)。

以茶树品种“舒茶早 SCZ”为对象, 分析了茶树不同组织器官中香叶基樱草糖苷含量变化。结果显示, 香叶基樱草糖苷在第一叶中含量最高, 为 1.17  $\mu\text{g/g}$ ; 在茶树根部的含量最低, 为 0.02  $\mu\text{g/g}$

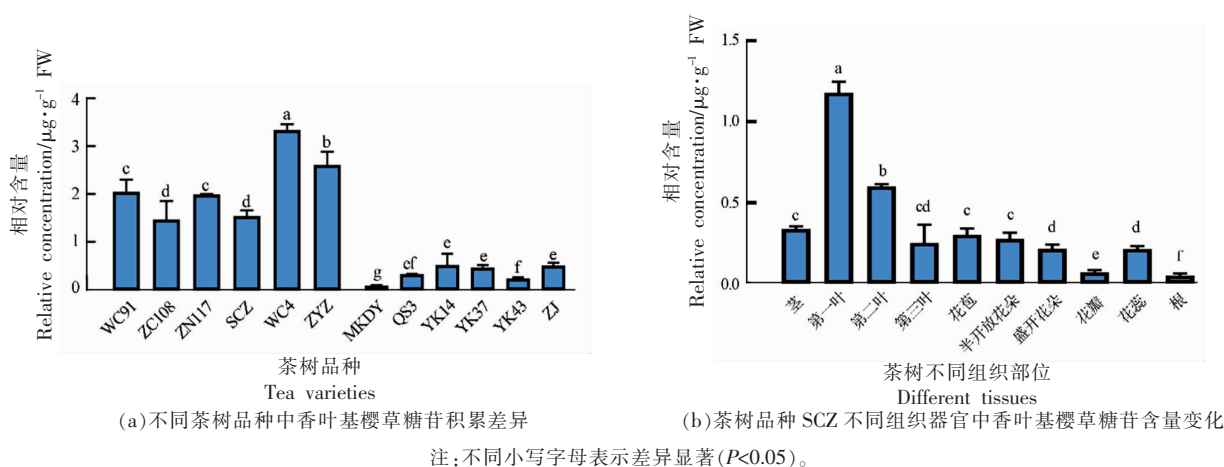


图 1 不同茶树品种及“舒茶早”不同组织器官中香叶基樱草糖苷积累变化

Fig.1 The accumulation patterns of geraniol and its primeveroside in the fresh leaves of different tea cultivars and in the different tissues of the SCZ cultivar

(图 1b);茶树叶片幼嫩部位积累更多的香叶基樱草糖苷,而在发育程度高的叶片中,香叶基樱草糖苷含量较低。在茶树花器官中,花瓣中的香叶基樱草糖苷含量最低,约为  $0.07 \mu\text{g/g}$ ,随着茶花逐渐盛开,香叶基樱草糖苷含量显著下降(图 1b)。在茶树不同组织器官中,香叶基樱草糖苷含量变化总体为:叶>花>根。

## 2.2 不同月份中香叶醇积累特性

为探究不同月份下茶树中香叶醇的积累特性,本研究分析了不同茶树品种嫩梢在不同月份中的香叶醇含量。在所测 4 个茶树品种中,香叶醇均在 3 月份嫩梢中的含量最为丰富(图 2)。尤其是茶树品种 WC4,在 3 月份嫩梢中,香叶醇含量达到  $8.01 \mu\text{g/g}$ ,而其在 2 月份嫩梢中含量只有  $0.54 \mu\text{g/g}$ ;与 2 月份相比,3 月份 WC4 嫩梢中香叶醇积累量约增加了 15 倍,然后随着月份增加,香叶醇含量逐渐降低;不同月份下,茶树品种 FZ2 和 SCZ 嫩梢中香叶醇变化规律与茶树品种 WC4 基本相同,均在 3 月份嫩梢中含量最高,而茶树品种 ZC108 在 5 月份嫩梢中的香叶醇含量略高于 4 月份中的含量(图 2)。在所测茶树品种中,6、7、8 月份嫩梢中的香叶醇含量变化不大,基本持平(图 2)。

## 2.3 香叶醇对红茶香气的贡献分析

本研究分析了祁门红茶加工进程中的萎凋叶、揉捻叶、不同时间发酵叶中香叶基樱草糖苷的含量变化,结果显示香叶基樱草糖苷在萎凋进程中开始下降,在揉捻过程中剧烈减少,约减少了 90%,随着发酵进程延长,香叶醇樱草糖苷进一步被水解,发酵完成时,只有鲜叶中的 3.8%(图 3a),这与已有的报道结果相一致<sup>[18-19]</sup>。

以黄山地区 6 个茶树品种红茶为例(图 3b),气相质谱分析结果显示 6 个品种红茶中香叶醇丰度均较高,其中 WC4 品种红茶中的香叶醇丰度显著高于其它品种红茶(图 3b)。含量计算结果显示 WC4 品种红茶茶汤中香叶醇含量最高,约为  $187.34 \mu\text{g/L}$ ,其次为 SCZ 红茶茶汤,香叶醇含量为  $49.27 \mu\text{g/L}$ ;楮叶种 ZYZ 红茶茶汤中香叶醇含量为  $45.06 \mu\text{g/L}$ ;WC91 红茶茶汤中的香叶醇含量最低,为  $26.01 \mu\text{g/L}$ (图 3c)。

据文献报道显示,香叶醇在水中的阈值约为

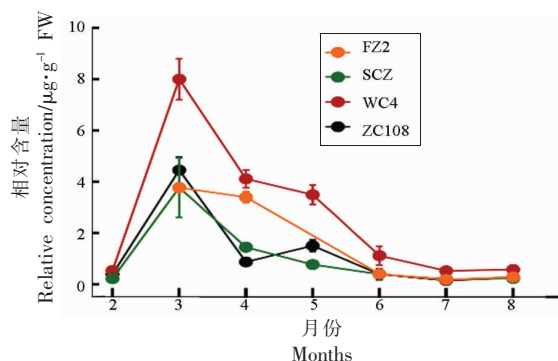


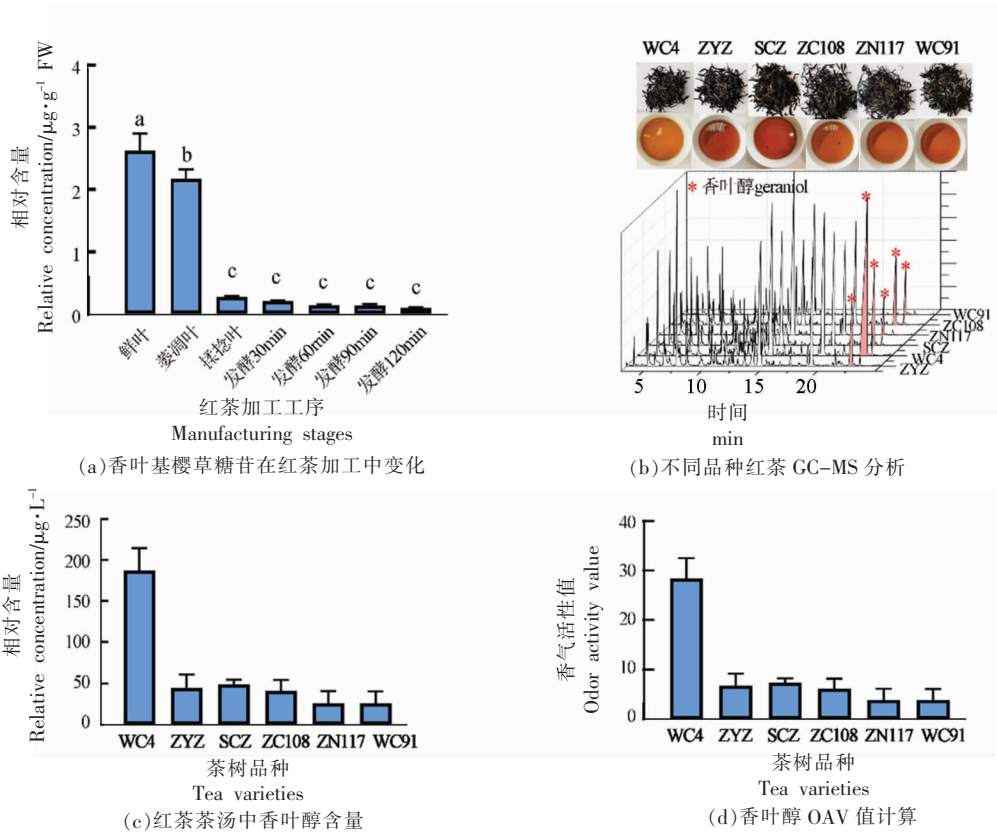
图 2 不同月份下茶树鲜叶中香叶醇的含量变化

Fig.2 The accumulation patterns of geraniol in the fresh leaves of different varieties in different months

$3.2\sim 75 \mu\text{g/L}$ ,不同研究中所用阈值有较大差异,常用的有  $3.2 \mu\text{g/L}$ <sup>[1]</sup>,  $40 \mu\text{g/L}$ <sup>[10]</sup>,  $75 \mu\text{g/L}$ <sup>[11]</sup>。根据 L.J. van Gemert 新书中的标注,最近文章中的研究表明香叶醇阈值为  $6.6 \mu\text{g/L}$ <sup>[20]</sup>。因此,本研究中以阈值  $6.6 \mu\text{g/L}$  计算了香叶醇在 6 个红茶茶汤中的香气活性值(odor activity value, OAV)。结果表明,WC4 品种红茶茶汤中香叶醇香气活性值最高,为 28.38,其次为 SCZ 茶汤,为 7.47(图 3d)。一般认为香气化合物 OAV 值>1 是对茶汤香气有贡献<sup>[11]</sup>,而在本研究中的 6 个红茶茶汤中,香叶醇 OAV 值均>1,约为 3.93~28.38,这表明香叶醇对红茶香气构成具有重要贡献。

## 2.4 香叶醇生物合成相关萜类合成酶候选基因分析

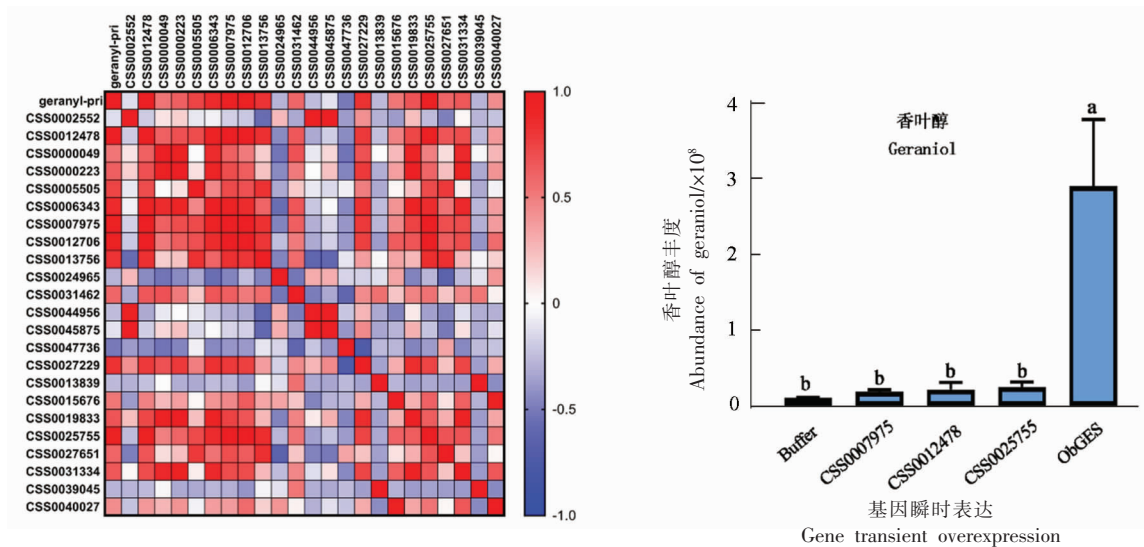
基于二代基因组数据,显示共有 72 个候选茶树萜类合成酶基因,通过与已发表并鉴定功能的萜类合成酶基因结构进行关联分析,推测具有全长的单萜合成酶/双功能萜类合成酶基因共有 23 个。本研究利用茶树不同组织器官中香叶基樱草糖苷的含量与各候选基因表达量进行 Pearson 相关性分析(图 4a),结果显示共有 7 个萜类合成酶基因表达量与香叶基樱草糖苷含量变化显著相关,分别为 *CSS0012478* ( $R=0.984$ ), *CSS0006343* ( $R=0.865$ ), *CSS0007975* ( $R=0.978$ ), *CSS0012706* ( $R=0.979$ ), *CSS0013756* ( $R=0.817$ ), *CSS0027229* ( $R=0.820$ ) 和 *CSS0025755* ( $R=0.984$ ),其中 *CSS0012478*、*CSS0007975*、*CSS0012706* 和 *CSS0025755* 表达模式与香叶基樱草糖苷含量变化达到



注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图 3 香叶醇及其樱草糖苷在祁门红茶加工中不同品种红茶中的含量及 OAV 值

Fig.3 The contents of geraniol and its primeveroside in the processing stage of Keemun black tea and the tea infusions of six black tea samples and the odor activity value of geraniol in six tea infusions



注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图 4 茶树中香叶醇生物合成萜类合成酶候选基因筛选与功能分析

Fig.4 The identification of geraniol synthase candidate genes and the functional verification

极显著相关( $R>0.9$ 且 $P<0.01$ )。

通过全长克隆,将 *CSS0007975*、*CSS0012478* 和 *CSS0025755* 瞬时过表达于本氏烟草叶片中,其中以侵染缓冲液瞬时表达叶片为阴性对照,以已鉴定功能的罗勒香叶醇合成酶 *ObGES* 为阳性对照。结果显示,与阴性对照相比,*CSS0007975*、*CSS0012478* 和 *CSS0025755* 瞬时过表达本氏烟草叶片中香叶醇丰度虽略有增加但未达到显著水平,而瞬时过表达 *ObGES* 本氏烟草叶片中,香叶醇丰度显著提升(图 4b)。

### 3 讨论与结论

香叶醇在不同茶树品种中的差异已经多有报道<sup>[2,4-5]</sup>,且目前常以萜烯指数(芳樟醇+芳樟醇氧化物/芳樟醇+芳樟醇氧化物+香叶醇)来表明茶树品种间香叶醇与芳樟醇积累的差异<sup>[5]</sup>。日本 Takeo<sup>[5]</sup>的研究显示,斯里兰卡地区阿萨姆种(*Assamica*)茶树变种萜烯指数可达到 1;杂交变种约为 0.2~0.7,而中国种(*Sinensis*)茶树变种萜烯指数普遍较低,最低可达到 0.07。Xia 等<sup>[19]</sup>的研究表明我国云南地区 18 个常见栽培茶树品种主要是阿萨姆种茶树变种,与安徽、浙江地区栽培品种(系)差异较大。本研究中,6 个供试中国种茶树变种为安徽、浙江地区选育及当地栽培品种,其香叶基樱草糖苷含量显著高于 6 个供试阿萨姆种茶树变种,这与茶树变种的遗传背景密切相关。Xia 等<sup>[19]</sup>的研究即表明,栽培品种在遗传驯化中存在选择性,两个变种间共有的驯化基因只有 206 个,而阿萨姆种茶树变种独有驯化基因为 548 个,中国种茶树变种独有驯化基因 538 个,这表明不同茶树栽培品种(系)在遗传驯化中逐渐产生差异,使得内源次级代谢途径改变,并导致代谢产物积累不同。

茶树叶片中积累较多的香叶醇与萜类合成酶表达模式密切相关<sup>[21]</sup>。前期研究显示,茶树单萜类合成酶表达量在叶片中积累较高,而倍半萜类合成酶则在花中表达较高<sup>[21]</sup>。不同月份中,3 月份嫩梢中香叶醇积累更丰富,这与王华夫研究较一致<sup>[4]</sup>。随着月份增加,光照增强、温度升高,茶树次级代谢受到调控,影响了香叶醇生物合成量。

本研究中显示,祁门红茶在加工揉捻阶段,香叶基樱草糖苷含量极显著下降。已有的研究表明

糖苷类物质可能主要储藏在液泡中<sup>[22]</sup>,而樱草糖苷酶基因已被证明定位于细胞壁中<sup>[23]</sup>。在鲜叶采摘后,水分充足,细胞形态完整,随着萎凋进程的增加,水分逐步散失,细胞透性增加<sup>[24]</sup>,部分香叶基糖苷水解并释放出苷元;在红茶加工揉捻阶段,酶与底物充分接触,结合态的香叶醇几乎全部转成游离态,进而对红茶香气产生贡献。本研究中 6 个品种红茶中香叶醇的香气活性值均 $>1$ ,且最高达到约 28。祁门红茶的“祁门香”被认为具有浓郁的玫瑰花香、甜香等<sup>[25]</sup>,显著有别于中国云南地区的滇红红茶,可能存在香叶醇贡献率的差异。

本研究中,初步对香叶醇生物合成相关萜类合成酶基因进行了筛选与功能验证,结果显示与 *ObGES* 过表达相比,3 个茶树萜类合成酶候选基因合成香叶醇功能较弱且可能为假阳性,有待进一步分析。

综上所述,香叶醇在茶树叶片中富集,且以糖苷态储存在细胞中,在红茶加工过程的揉捻工序中,因细胞破碎水解释放并对其香气产生贡献。不同月份下、不同茶树品种中的香叶醇积累特性均有不同,推测这与香叶醇生物合成途径受温度、光照调控相关,以及存在遗传背景的差异。本研究结果为后续研究香叶醇生物合成及调控机制提供了理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] YANG Z, BALDERMANN S, WATANABE N. Recent studies of the volatile compounds in tea [J]. *Food Research International*, 2013, 2(53): 585-599.
- [2] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.  
WAN X C, Tea biochemistry[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003.
- [3] ZHOU Y, ZENG L T, LIU X Y, et al. Formation of (*E*)-nerolidol in tea (*Camellia sinensis*) leaves exposed to multiple stresses during tea manufacturing [J]. *Food Chemistry*, 2017, 231: 78-86.
- [4] WANG H F, YOU X Q. Free and glycosidically bound monoterpene alcohols in Qimen black tea [J]. *Food Chemistry*, 1996, 56(4): 395-398.
- [5] TAKEO T. Production of linalool and geraniol by hydrolytic breakdown of bound forms in disrupted tea

- shoots[J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(9): 2145–2147.
- [6] TAKEO T. Variation in amounts of linalool and geraniol produced in tea shoots by mechanical injury[J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(9): 2149–2151.
- [7] KANG S, YAN H, ZHU Y, et al. Identification and quantification of key odorants in the World's four most famous black teas[J]. *Food Research International*, 2019, 121: 73–83.
- [8] 杨停, 雷攀登, 周汉琛, 等. 顶空固相微萃取-气质联用结合主成分分析法对太平猴魁茶香气成分的研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(10): 7–11, 15.
- YANG T, LEI P D, ZHOU H C, et al. Studies on aroma components in Taiping Houkui tea by HS-SPME-GC-MS coupled with principal component analysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(10): 7–11, 15.
- [9] LV S D, WU Y S, SONG Y Z, et al. Multivariate analysis based on GC-MS fingerprint and volatile composition for the quality evaluation of Pu-Erh green tea[J]. *Food Analytical Methods*, 2015, 8(2): 321–333.
- [10] WANG C, ZHANG C, KONG Y, et al. A comparative study of volatile components in Dianhong teas from fresh leaves of four tea cultivars by using chromatography-mass spectrometry, multivariate data analysis, and descriptive sensory analysis[J]. *Food Research International*, 2017, 100(1): 267–275.
- [11] WANG M Q, MA W J, SHI J, et al. Characterization of the key aroma compounds in Longjing tea using stir bar sorptive extraction (SBSE) combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography-olfactometry (GC-O), odor activity value (OAV), and aroma recombination[J]. *Food Research International*, 2020, 130: 108908.
- [12] OHGAMI S, ONO E, HORIKAWA M, et al. Volatile glycosylation in tea plants; sequential glycosylations for the biosynthesis of aroma  $\beta$ -primeverosides are catalyzed by two *Camellia sinensis* glycosyltransferases[J]. *Plant Physiology*, 2015, 168(2): 464–477.
- [13] HOU Z W, WANG Y J, XU S S, et al. Effects of dynamic and static withering technology on volatile and nonvolatile components of Keemun black tea using GC-MS and HPLC combined with chemometrics[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2020, 130(5): 109547.
- [14] HAN Z X, RANA M M, LIU G F, et al. Green tea flavor determinants and their changes over manufacturing processes[J]. *Food Chemistry*, 2016, 212: 739–748.
- [15] XIA E H, TONG W, HOU Y, et al. The reference genome of tea plant and resequencing of 81 diverse accessions provide insights into genome evolution and adaptation of tea plants[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(7): 1013–1026.
- [16] MARTIN D M, AUBOURG S, SCHOUWEY M B, et al. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 226.
- [17] WANG D M, YOSHIMURA T, KUBOTA K, et al. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 1. qualitative and quantitative analyses of glycosides with aglycons as aroma compounds[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2000, 48(11): 5411–5418.
- [18] WANG D M, KURASAWA E, YAMAGUCHI Y, et al. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 2. Changes in glycoside contents and glycosidase activities in tea leaves during the black tea manufacturing process[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2001, 49(4): 1900.
- [19] CUI J L, KATSUNO T, TOTSUKA K, et al. Characteristic fluctuations in glycosidically bound volatiles during tea processing and identification of their unstable derivatives[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2016, 64(5): 1151–1157.
- [20] GEMERT L V. Compilation of odor threshold values in air and water (second enlarged and revised edition)[M]. Houten: Oliemans Punter & Partners BV, 2011: 244.
- [21] ZHOU H C, SHAMALA L F, YI X K, et al. Analysis of terpene synthase family genes in *Camellia sinensis* with an emphasis on abiotic stress conditions[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 933.
- [22] TING H M, DELATTE T L, KOLKMAN P, et al. SNARE-RNAi results in higher terpene emission from ectopically expressed caryophyllene synthase in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(3): 454–466.

- [23] MIZUTANI M, NAKANISHI H, EMA J I, et al. Cloning of beta-primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(4): 2164–2176.
- [24] NI T, XU S, WEI Y, et al. Understanding the promotion of withering treatment on quality of postharvest tea leaves using UHPLC–Orbitrap–MS metabolomics integrated with TMT–based proteomics [J]. *LWT–Food Science and Technology*, 2021, 147: 111614.
- [25] 雷攀登, 黄建琴, 丁勇, 等. 不同区域祁门红茶品质特点分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(10): 144–149.
- LEI P D, HUANG J Q, DING Y, et al. quality characteristics of Keemun black tea from various regions[J]. *Food Science*, 2015, 36(10): 144–149.

### The Accumulation of Geraniol and Its Glycoside in Tea Plant and the Contribution to the Aroma of Black Tea

Zhou Hanchen, Yang Jihong, Liu Yaqin, Wang Hui, Lei Pandeng\*

(Tea Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Huangshan 245000, Anhui)

**Abstract** Geraniol is a monoterpene with a rose trait. This study aims to know the accumulation patterns of geraniol and its glycoside, and the other is to know the contribution of geraniol to the aroma of black tea. The result showed that the CSS (*C.sinensis* var. *sinensis*) cultivars possess a higher content of geranyl primeveroside than that in the CSA (*C.sinensis* var. *assamica*) cultivars. The amount of geranyl primeveroside in tea young leaf was highest among all tissues of the tea plant, while tea roots had the lowest accumulation of geranyl primeveroside. The fresh leaves of the tea plant in March had a higher accumulation of geraniol compared to those in other months. Furthermore, the results showed that the odor activity value of geraniol in six black tea infusions ranged from 3.93 to 28.38, strongly supporting the potential contribution of geraniol to the aroma of black tea samples. The strong coregulation was obtained between the expression of seven terpene synthase candidate genes and the accumulation of geranyl primeveroside. This work gives insight into the accumulation patterns of geraniol and its primeveroside and promote the research about the biosynthesis and regulation mechanism of geraniol in tea plant.

**Keywords** geraniol; geranyl primeveroside; black tea; odor activity value; terpene synthase