多酚氧化酶对普洱茶渥堆发酵过程中品质变化的影响

付赢萱，刘通讯

（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：本文探讨了添加不同浓度多酚氧化酶对渥堆发酵过程中普洱茶理化指标和感官品质的影响。实验结果表明：经不同浓度多酚氧化酶处理后的普洱茶，其部分品质成分在渥堆发酵过程中的变化差异显著（$p<0.01$），与对照组相比，实验组的渥堆平均温度相对较高，茶多酚、儿茶素指标变化速度加快，且与多酚氧化酶的添加量呈负相关；茶黄素发酵前期生成速度加快，后期转化速度提高；茶褐素有较快积累。加入多酚氧化酶的普洱茶发酵 18 d 后，在外形、汤色、滋味、香气、叶底等感官品质上基本具有熟茶的品质，其中 1.6 U/g、3.2 U/g 多酚氧化酶组可达到陈年普洱汤色红浓明亮，滋味醇厚回甘，香气浓郁的品质特点。本研究为缩短发酵周期，改善普洱茶品质提供新的思路和方法。

关键词：普洱茶；多酚氧化酶；渥堆发酵

文章篇号：1673-9078(2015)3-197-201 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.033

The Effect of Polyphenol Oxidase on the Pile-fermentation Process and Quality of Pu-erh Tea

FU Ying-xuan, LIU Tong-xun

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The change in the physical and chemical properties and sensory quality of Pu-erh tea was investigated during the pile-fermentation process, facilitated by the addition of different concentrations of polyphenol oxidase (PPO). The results showed significant changes in some quality components ($p < 0.01$) during the pile-fermentation process after treatment with PPO. The average pile-fermentation temperature was observed to be higher in the treatment group, compared to the control group. In addition, the change rates in polyphenols and catechins accelerated in the treatment group, and were negatively correlated with PPO concentration. Theaflavin accumulation was faster during the early stage of pile-fermentation, and the transformation occurring rapidly during the late stage of pile-fermentation. On the other hand, the accumulation of theabrownins was observed to be faster during the pile-fermentation process. Pile-fermentation for 18 days with added PPO conferred good organoleptic properties (associated with sensory qualities) to the Pu-erh tea, including tea stripe, color of tea soup, taste and aroma, as well as tea leaf. 1.6 U/g and 3.2 U/g PPO groups were observed to attain properties of aged Pu-erh tea, with a red and glow liquor color, pure and mellow taste, and full-bodied aroma. This study provides new ideas and methods to reduce the pile-fermentation period and improve the quality of Pu-erh tea.

Key words: Pu-erh tea; polyphenol oxidase (PPO); pile-fermentation

普洱茶是我国的特色茶种之一，起源于我国云南古普洱府（今普洱市），故得名。现主产于西双版纳、昆明、思茅、临沧、下关等地，是以公认普洱茶区的云南大叶种晒青毛茶为原料[1]，经发水、握堆发酵、陈化及干燥等工序加工而成。普洱茶渥堆，实质是以晒青毛茶的内含成分为基质，在微生物分泌的胞外酶（多酚氧化酶，蛋白酶，纤维素酶等）和茶叶内含酶酶促作用、微生物呼吸代谢产热和茶叶水分的湿热的协同作用下，发生了茶多酚的氧化、缩合，蛋白质和氨基酸的分解、降解，碳水化合物的分解以及各产物之间的聚合、缩合等一系列反应，最终形成普洱茶（熟茶）独有的滋味醇厚、汤色红褐、沉香显著、叶底红褐的品质特性的过程。研究证实，普洱茶具有降血脂减肥、抗氧化性、提高机体免疫力和自由基清除能力等生理功能[2~3]，受到越来越多消费者的喜爱。为了迎合消费者对高档次茶的需求，国内外学者都已经认识到仅靠调节工艺技术指标不能更好地提高茶叶品质。因此，国内外不少学者便就添加外源活性物质（外源酶制剂）改善茶叶品质进行了广泛的探索，其中不少

收稿日期：2014-06-13

作者简介：付赢萱（1990-），女，硕士，研究方向：粮食、油脂与蛋白质工程

通讯作者：刘通讯（1975-），男，博士，副教授，研究方向：粮食、油脂与蛋白质工程

成果已应用于生产，取得了良好的效果。到目前为止，已有单宁酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、多酚氧化酶等酶制剂应用到茶叶加工中[4~5]。

本文在前期优化出的潮水量、翻堆间期和发酵时间的基础上，通过添加多酚氧化酶的方法进行发酵，对实验组和对照组的理化指标进行对比分析，主要研究多酚氧化酶对普洱茶发酵过程和出堆品质的影响，既可以为研究发酵过程中的酶促作用提供理论基础，又可以为利用外源酶技术进行普洱茶定向发酵和改善普洱茶品质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大叶六级种晒青毛茶，云南腾冲，2013年；多酚氧化酶，标注酶活力845 U/mg，合肥博美生物科技有限公司；其他试剂均为分析纯。

ESJ200-4 电子分析天平，上海精科电子有限公司；UV752N 型分光光度计，上海棱光技术有限公司；富华 420 型三用水箱，金坛市富华仪器有限公司；DHG90A 电热恒温鼓风干燥箱，上海索普仪器有限公司；循环水式真空泵，巩义市予华仪器有限责任公司；手提式压力蒸汽灭菌锅，江阴滨江医疗设备有限公司；GL-21M 高速冷冻离心机，长沙湘仪离心机有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 普洱茶发酵方法

多酚氧化酶浓度（A）：A1：0.4 U/g，A2：0.8 U/g，A3：1.6 U/g，A4：3.2 U/g

多酚氧化酶添加量/mg＝茶叶质量×多酚氧化酶浓度/多酚氧化酶酶活

晒青毛茶以4 kg为一堆，以茶叶重量计算多酚氧化酶的添加量，将添加有多酚氧化酶的水喷洒在茶堆中使含水量增加到 45%，空白组用纯净水潮水增湿至茶堆含水量为45%。从加水渥堆开始，每6 d翻堆一次，发酵时间为18 d，翻堆3次，每次翻堆之前对茶堆的芯层和表层进行五点取样法取样。每次 70 g，充分混匀后用于测定。分别用F1、F2、F3表示毛茶、一翻、二翻、三翻样。

实验进行时间2014年3月~5月，环境温度为18 ℃~28 ℃。

1.2.2 渥堆温度测定

从渥堆开始，用100 ℃的酒精温度计记录每天中午12:00时的堆芯温度，直至发酵结束。

1.2.3 理化成分分析方法

水分含量测定：GB/T8304-2002《茶 水分测定》；儿茶素总量：香荚兰素比色法；茶多酚含量测定：参照 GB8313-2002《茶 茶多酚测定》；茶色素（茶黄素TF、茶红素TR、茶褐素TB）的测定：采用比色系统分析法。

1.2.4 普洱茶感官品质分析方法

感官评定[6]：邀请专业评茶师进行密码感官审评打分，从干茶色泽、汤色、滋味、香气和叶底五个方面进行专业品评，采用百分制评分，各部分分别占 15、20、20、35、10分，并根据品质特性给予相应的评语，评茶术语参照 DB53/T103-2006。

1.3 数据分析

用Microsoft excel 2010处理数据和做图。用SPSS进行显著性分析和相关性分析。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度多酚氧化酶对普洱茶发酵过程中堆温变化的影响

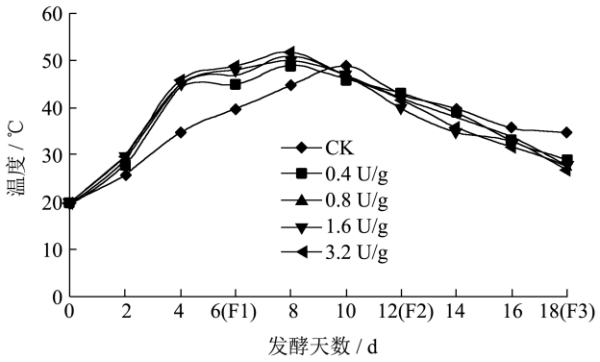


图1 添加不同浓度多酚氧化酶渥堆过程中堆温的变化

Fig.1 Pile temperature during the fermentation process, with addition of PPO at different concentrations

堆温是普洱茶渥堆发酵过程中的重要控制因素，直接影响普洱茶的品质。适宜的堆温不仅有助于微生物的生长繁殖，也有利于酚类物质的氧化聚合。分别对实验组和空白组进行实时堆温监测。由图 1 所示，从加水渥堆开始，堆温逐渐升高，与空白对照相比，实验组温度上升幅度更大，在第 4 d 之前都已达到40 ℃。实验组从发酵第 4 d 到 F2，堆温基本维持在40~55 ℃之间，有利于微生物的生长繁殖和酶促反应。实验组的最高堆温均高于对照组，说明添加多酚氧化酶可以增强发酵过程中的生化反应，加快反应产热，从而有利于茶叶内部物质的转化和生成。F2 之后，发酵进行到一定程度，生化反应活性降低，温度逐渐趋于室温。

2.2 不同浓度多酚氧化酶对普洱茶发酵过程中茶多酚与儿茶素变化的影响

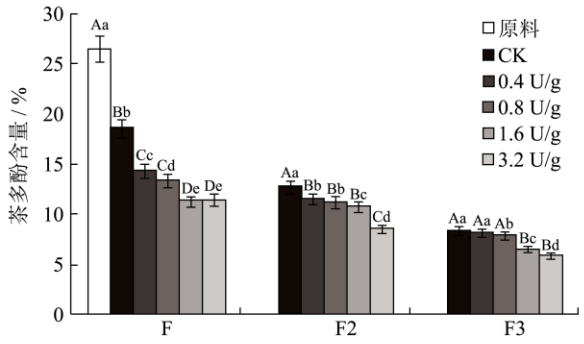


图 2 添加不同浓度多酚氧化酶渥堆发酵过程中茶多酚含量的变化

Fig.2 Changes in the polyphenol content (%) during pile-fermentation, with addition of different concentrations of PPO

注：图中英文大、小写字母分别表示 Duncan's 新复极差测验（SSR 法）在 P=0.01、P=0.05 水平下的差异显著性，字母不同表示差异显著，反之不显著（n=3）。图 3、4、5 注释同。

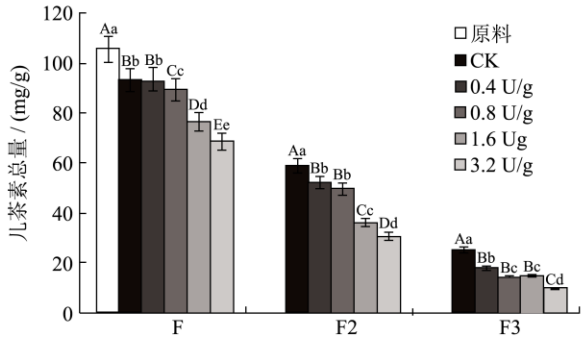


图 3 添加不同浓度多酚氧化酶渥堆发酵过程中儿茶素变化（mg/g）

Fig.3 Changes in the catechin content (mg/g) during pile-fermentation, with addition of different concentrations of PPO

茶多酚是茶叶中的多酚类衍生物的总称，包括儿茶素、黄酮、黄酮醇和花色素、酚酸等化合物，具有较强的涩味，收敛性强，是构成苦涩味和回甘、生津的主要物质，是茶汤滋味、汤色的主体成分[1, 6]。测定普洱茶中茶多酚的变化对研究普洱茶的品质形成具有重要作用。由图 2 可知，添加了不同浓度多酚氧化酶的普洱茶在渥堆发酵过程中，茶多酚含量有不同程度的极显著下降趋势（$p<0.01$），但 A1、A2 之间的差异性不显著（$p>0.05$）。F1 和 F2 时下降迅速，从原料到 F3，对照组和 A1、A2、A3、A4 多酚氧化酶组茶多酚转化率分别为 68.2%、69.4%、70.3%、75.4%、79.0%。表明添加多酚氧化酶能加快普洱茶的渥堆发酵进程，使茶多酚转化速度加快，且茶多酚的转化率与添加多酚氧化酶的浓度呈正相关。

儿茶素是主要的多酚类物质，由图 3 可知，儿茶素的含量随着渥堆时间的延长而逐渐减少，与茶多酚的变化趋势保持一致。从渥堆开始到 F1，对照组儿茶素含量下降并不显著，转化率仅为 12.3%，在 F1 后，儿茶素含量大幅下降；多酚氧化酶的加入使实验组儿茶素加快下降，其中 3.2 U/g 多酚氧化酶组儿茶素转化率在 F1 时已达到 35.8%，三翻后，对照组和 A1、A2、A3、A4 多酚氧化酶组茶儿茶素转化率分别为 76.4%、83.0%、86.4%、85.8%、90.8%。除 F1 时期 A1 外，多酚氧化酶各浓度处理样儿茶素含量较 CK 差异均达到极显著性水平（$P<0.01$），其中 A4 与 A1、A2、A3 均达到极显著差异。再次表明多酚氧化酶显著促进多酚类物质的氧化，加快了普洱茶发酵速度，使得儿茶素加快降低，且儿茶素的转化率与添加多酚氧化酶的浓度呈正相关。儿茶素的氧化聚合对茶色素的形成具有重要意义。

2.3 不同浓度多酚氧化酶对普洱茶发酵过程中茶色素变化的影响

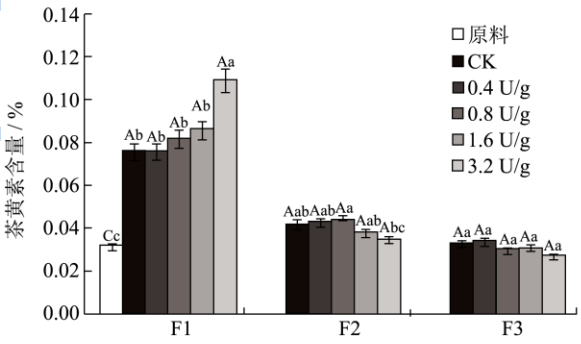


图 4 添加不同浓度多酚氧化酶渥堆过程中茶黄素变化（%）

Fig.4 Changes in the theaflavin content (%) during pile-fermentation, using different concentrations of PPO

在渥堆发酵过程中，多酚类物质在湿热、微生物作用下发生酶促和非酶促氧化，通过氧化聚合，生成橙黄色的茶黄素，再进一步氧化产生红色的茶红素，茶红素很快氧化形成暗褐色的茶褐素。其影响普洱茶的外观、汤色以及品质。茶黄素外观为橙黄色，影响茶汤的亮度，被誉为茶叶中的“软黄金”，具有降血脂、抗氧化、抗癌、抗心脑血管疾病和调节神经等生理活性[7]。由图 4 可知，从渥堆发酵开始到 F1，对照组和 A1、A2、A3、A4 多酚氧化酶组的茶黄素含量呈增加趋势，即儿茶素转化速度高于茶黄素氧化成茶红素和茶褐素的速度，实验组增幅明显高于对照组，其中 A4

样茶黄素含量从原料的 0.32%增加到 0.109%，空白组仅为 0.076%，A4 样茶黄素含量较 CK 达到极显著差异（P<0.01），通过添加多酚氧化酶使得茶黄素在发酵前期大量积累，可以将此法应用到红茶发酵，在发酵前期提取茶黄素，解决从红茶中提取茶黄素得率低的问题；而 F1 后，茶黄素含量逐渐降低，F3 时期多酚氧化酶各浓度处理水平无显著性差异（P>0.05）。多酚氧化酶的加入使实验组茶黄素总体下降加快。

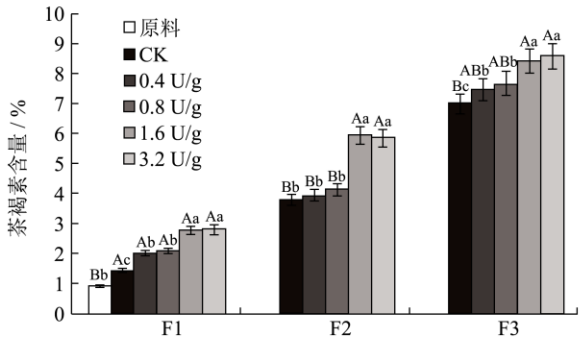


图 5 添加不同浓度多酚氧化酶渥堆过程中茶褐素变化（%）

Fig.5 Changes in the theabrownin content (%) during pile-fermentation with different concentrations of PPO

茶褐素是影响普洱茶品质的重要因素，随着发酵时间的延长，茶褐素的含量呈逐渐增加趋势，各组茶褐素在 F3 时达到最大，实验组增加幅度明显高于对照组，此时多酚氧化酶各浓度水平较对照组达到显著差异（P<0.05），实验结果表明，发酵过程中添加多酚氧化酶，有利于加快多酚类物质的氧化聚合反应从而促进茶黄素的转化以及茶褐素的积累，对普洱茶的感官品质有着重要作用。

2.4 相关性分析

表 1 各项指标相关系数和显著性分析

Table 1 Correlation coefficients between indices and significance analysis

项目	茶多酚	儿茶素	茶黄素	茶褐素	多酚氧化酶浓度
茶多酚	1				
儿茶素	0.899**	1			
茶黄素	-0.136	0.286	1		
茶褐素	-0.854**	-0.986**	-0.337	1	
多酚氧化酶浓度	-0.147	-0.163	0.063	0.168	1

注：*相关显著（P<0.05）；**相关极显著（P<0.01）。

多酚氧化酶是一种重要的末端氧化酶，参与渥堆发酵过程中的酶促反应，使茶叶内含物质发生转化，对茶叶品质和香气形成着重要的作用。为了进一步研究多酚氧化酶对普洱茶品质的影响，对不同浓度多酚氧化酶条件下普洱茶渥堆发酵过程中相应指标和多酚氧化酶添加量进行相关性和显著性分析，结果见表 2。茶多酚和儿茶素之间呈极显著正相关，相关系数为 0.899；茶褐素与茶多酚儿茶素呈极显著负相关，相关系数为-0.854，-0.986。多酚氧化酶浓度与茶多酚、儿茶素、茶黄素的变化呈负相关，而与茶褐素的变化呈正相关，说明添加多酚氧化酶的浓度越高，茶多酚、儿茶素、茶黄素下降越快，而茶褐素含量有所提高；从而说明，多酚氧化酶可加快渥堆过程中各种生化反应速度，缩短发酵周期。

2.5 感官综合分析

表 2 添加不同浓度多酚氧化酶渥堆发酵的茶样感官分析

Table 2 Sensory assessment of pile-fermented teas containing different concentrations of PPO

茶样	外形 15% 评语/评分	汤色 20% 评语/评分	香气 20% 评语/评分	滋味 35% 评语/评分	叶底 10% 评语/评分	总分
CK	棕红略黑 12	浅红微透 11	陈香不足 12	纯和微苦 20	棕红较软 6	61
0.4 U/g	红褐色 14	红浓微亮 13	陈香尚显 14	纯和尚涩 22	红褐较软 7	70
0.8 U/g	红褐色 14	红浓微亮 14	陈香平和 15	醇厚回甘 24	红褐柔软 8	75
1.6 U/g	红褐色 14	红浓明亮 16	陈香纯正 16	醇厚棉滑 25	红褐柔软 8	79
3.2 U/g	红褐色 14	红浓明亮 16	陈香纯正 16	醇厚甘滑 27	红褐柔软 8	81

分别 对对照组和实验组普洱茶进行感官评价，品评结果如表 2 所示。茶叶的汤色、香气、滋味及叶底经过添加多酚氧化酶的渥堆发酵后发生了明显变化。汤色由黄绿明亮转化为红褐明亮，香气缩短发酵周期，提高茶叶品质，为开发高品质普洱茶提供理论基础由清香纯正转化为陈香，滋味由醇和尚涩变为醇和回甘，叶底由晒青的粗老黄绿变为红褐。空白组在发酵 18 d 后尚未发酵完全，其它实验组在发酵 18 d 后，外观红褐呈猪肝色，达到高品质熟茶的外观品质，叶底红褐，弹性好，茶汤苦涩度低，有一定回甘，茶汤略薄。其中，0.8 U/g 多酚氧化酶组刚好达到发酵终点，茶汤甜滑醇厚。1.6 U/g 和 3.2 U/g 多酚氧化酶实验组的茶样可以媲比陈年熟茶，汤色棉柔醇厚，沉香显露，无苦涩，水较甜，综合而言，两组无显著区别。

3 结果

3.1 多酚氧化酶作为外源酶制剂添加到普洱原料中进

行渥堆发酵，可以加快发酵成熟速度，促进发酵过程中茶叶内部化学品质成分的氧化聚合，加快反应产热，确保了普洱茶发酵前期温度。添加多酚氧化酶后，实验组渥堆温度明显高于对照组，茶多酚、儿茶素、茶色素指标变化明显加快，茶多酚和儿茶素含量呈极显著下降趋势（P<0.01），茶黄素和茶褐素含量在较高浓度多酚氧化酶水平下较对照组差异达到显著水平（P<0.05），茶黄素作为一种天然活性物质在食品、医药保健领域有着诱人前景，利用多酚氧化酶对发酵过程中茶黄素的影响，控制发酵时间从而提高产物得率，也可将此法应用到红茶发酵中。通过相关性分析，茶褐素与茶多酚、儿茶素呈极显著负相关，相关系数分别为-0.854、-0.986，多酚氧化酶浓度与茶多酚、儿茶素、茶黄素呈负相关，而与茶褐素呈正相关；通过感官评价结果得出，多酚氧化酶的加入提高了普洱茶品质，使普洱茶外观红褐呈猪肝红，达到熟茶品质外观，茶汤滋味更甘甜，其中 1.6 U/g、3.2 U/g 多酚氧化酶组普洱茶品质可媲比陈年熟茶，色泽叶底呈猪肝色，汤色红浓明亮，滋味醇厚回甘，表现出较佳的综合品质。3.2　酶具有高效、温和、专一的特点。外源酶制剂在普洱茶发酵中的应用，可以控制发酵程度，缩短加工时间，通过添加不同酶制剂，形成不同的普洱茶品质，有利于开发风味独特的普洱茶产品。

参考文献

[1] 刘通讯,凌萌乐.不同氨基酸对普洱熟茶呈味物质和香气成分的影响[J].现代食品科技,2013,29(9):2199-2205
LIU Tong-xun, LING Meng-le. Effect of different amino acids on the flavour and volatile aroma components of ripe pu-erh tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2199-2205

[2] Hou Y, Shao W F, Xiao R, et al. Pu-erh tea aqueous extracts lower atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model [J]. Experimental Gerontology, 2009, 44(6): 434-439

[3] Ahmed S, Unachuwu U, Stepp J R, et al. Pu-erh tea tasting in Yunnan, China: Correlation of drinkers' perceptions to phytochemistry [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 132(1): 176-185

[4] 王元凤,王登良,魏新林.酶技术在茶叶深加工中的应用研究[J].饮料工业,2000,3(6):18-22
WANG Yuan-feng, WANG Deng-liang, WEI Xin-lin. Study on the application of enzymatic technology to the further processing of tea [J]. Beverage Industry, 2000, 3(6): 18-22

[5] 李中皓,刘通讯.过氧化物酶对成品普洱茶品质的影响研究[J].现代食品科技,2007,23(7):29-32
LI Zhong-hao, LIU Tong-xun. Effects of peroxidase concentrations on the quality of puer tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(7): 29-32

[6] Liang Y R , Lu J L, Zhang L Y, et al. Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions [J]. Food Chemistry, 2003, 80(2): 283-290

[7] Yoshino K, Hara Y, Sano M, et al. Antioxidative effects of black tea theaflavins and thearubigin on lipid peroxidation of rat liver homogenates induced by tert-butyl hydroperoxide [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1994, 17(1): 146-149

[8] Dreger H, Lorenz M, Kehrer A, et al. Characterisics of catechin and theaflavin mediated cardioprotection [J]. Experimental Biology and Medicine, 2008, 233(4): 427-433

[9] 刘伟,周洁,龚正礼.茶黄素的功能活性研究进展[J].食品科学,2013,34(11):383-391
LIU Wei, ZHOU Jie, GONG Zheng-li. Research progress in functional activity of theaflavins [J]. Food Science, 2013, 34(11): 383-391