

## 普洱茶渥堆过程中复合酶制剂的应用研究

杨富亚<sup>1</sup>, 许波<sup>1,2,3,4</sup>, 李俊俊<sup>1,2,3,4</sup>, 唐湘华<sup>1,2,3,4</sup>, 杨云娟<sup>1,2,3,4</sup>, 慕跃林<sup>1,2,3</sup>, 黄遵锡<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. 云南师范大学生命科学学院, 云南昆明 650092; 2. 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南昆明 650092; 3. 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 云南昆明 650092; 4. 云南师范大学酶工程重点实验室, 云南昆明 650092)

**摘要** [目的] 研究在复合酶制剂的作用下普洱茶渥堆过程中部分理化成分的变化及对普洱茶品质的影响。[方法] 在实验室模拟普洱茶渥堆发酵过程, 通过不同浓度复合酶制剂的作用, 分析研究渥堆过程中各阶段普洱茶中干物质率、水浸出物、茶多酚、可溶性糖、黄酮等理化成分的变化。[结果] 试验得出, 联合应用多酚氧化酶、多糖水解酶类(纤维素酶、果胶酶、 $\beta$ -糖苷酶、淀粉酶)、单宁酶、蛋白酶等制成的复合酶制剂, 在一定浓度下有利于普洱茶中水浸出物、茶多酚、可溶性糖的增加, 有助于普洱茶品质的形成, 并可缩短渥堆发酵时间。[结论] 复合酶制剂应用于普洱茶渥堆发酵过程, 可以简化工艺, 缩短加工时间。

**关键词** 普洱茶; 渥堆发酵; 复合酶; 理化品质

**中图分类号** S571.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)09-04057-04

### Application of Complex Enzymes during Pile-Fermentation of Pu'er Tea

YANG Fu-ya et al (School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650092)

**Abstract** [Objective] To study the change of physical and chemical composition during pile-fermentation of Pu'er tea under the treatment of complex enzyme and its effects on Pu'er tea quality. [Method] The change of physical and chemical composition in each stages of pile-fermentation process was analyzed, such as dry matter rate, water extract, polyphenols, flavonoids and water-soluble carbohydrates after simulating pile-fermentation of Pu'er tea in the laboratory and through the effect of different concentration of complex enzymes. [Result] The results showed that in a certain concentration, by applying complex enzymes which mixed by polyphenol oxidase, polysaccharide hydrolases (cellulase, pectinase,  $\beta$ -glucosidase, amylase), tannin enzyme and protease can give a positive effect on increasing Pu'er-tea water extracts, polyphenols and water-soluble carbohydrates as well as improving the quality of Pu'er tea and shortening the time of pile-fermentation. [Conclusion] The application of complex enzymes during pile-fermentation of Pu'er tea could simplify technique and shorten the processing time.

**Key words** Pu'er tea; Pile-fermentation; Complex enzymes; Physics and chemical quality

渥堆是形成普洱茶品质的关键工序。渥堆的实质是以晒青毛茶的内含成分为基质, 在湿热、酶促作用下经过一系列的生化反应, 形成普洱茶特有的品质。在传统普洱茶的加工中, 茶叶的胞内酶与微生物产生的胞外酶共同作用于渥堆过程<sup>[1]</sup>。但是普洱茶鲜叶经晒青处理, 微生物活性受抑制, 胞内酶的作用极大钝化。现代普洱茶加工中渥堆发酵过程耗时周期约 27~35 d, 发酵程度靠人工调控。因而, 缩短发酵周期, 量化监控发酵程度, 提高茶叶品质, 实现普洱茶产业的标准化成为现在普洱茶产业的研究重点, 因此, 外源酶技术开始受到人们的关注。

近年来, 将酶技术运用于茶叶加工中的研究屡见报道。研究表明, 茶叶加工中纤维素酶的添加对提高水浸出物含量, 改善茶叶品质有明显作用<sup>[2]</sup>。有研究人员将  $\beta$ -糖苷酶粗品添加到绿茶揉捻工序中, 明显改善了夏茶烘青的香气<sup>[3]</sup>。有研究表明, 淀粉酶作用于茶叶加工可增进茶汤的甜醇滋味和浓度, 生成焦糖香味物质<sup>[4]</sup>。有学者比较使用单宁酶、单宁酶/纤维素酶和单宁酶/果胶酶处理红茶茶汤, 结果表明添加酶处理比未添加者有较高的萃取率, 且固形物含量较多, 混合酶处理均比单独处理好<sup>[5]</sup>。李中皓等运用不同浓度过氧化物酶、纤维素酶、风味蛋白酶对成品普洱茶品质的影响研究发现, 一定量的酶促处理对普洱茶品质成分的形成具有

很好的效果<sup>[6]</sup>。但是参与普洱茶加工过程酶的种类很多, 且不同酶类之间复杂的作用机制, 使得单一酶类的作用效果与复合酶类作用效果存在差异。

笔者根据已报道的在普洱茶加工中对其理化品质有重要作用的氧化酶类及水解酶类, 按渥堆发酵工艺要求, 结合实验室条件, 将多酚氧化酶、多糖水解酶类(纤维素酶、果胶酶、 $\beta$ -糖苷酶、淀粉酶)、单宁酶、蛋白酶等制成的复合酶制剂运用于模拟大规模的渥堆发酵, 主要分析研究在复合酶制剂的作用下普洱茶渥堆过程中水分含量、水浸出物、茶多酚、黄酮、可溶性糖等理化成分的变化及对普洱茶品质的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 茶样: 选用勐海茶厂所产的 2010 年春季大叶种晒青毛茶作为渥堆茶样。复合酶制剂: 于实验室配制符合食品添加剂要求的复合酶制剂, 主要成分为: 多酚氧化酶、纤维素酶、果胶酶、 $\beta$ -糖苷酶、淀粉酶、单宁酶、蛋白酶。水: 灭菌纯净水, pH 6.5。仪器: 恒温恒湿培养箱(宁波莱福), 电热烘箱, 分析天平, 电子天平(梅特勒), 研钵, 精密 pH 仪(梅特勒), 纯水机(艾柯), 恒温水浴锅, 电磁炉(美的), 布氏漏斗, 真空抽滤装置, 漩涡振荡器, 722 分光光度计, 除菌过滤器, 冰箱。试剂: 硫酸亚铁, 酒石酸钾钠, 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 磷酸二氢钾, 浓硫酸, 萘酚, 三氯化铝。

### 1.2 方法

**1.2.1 酶液的配制。** 根据设定的酶量与水的比例将其溶解(可使用振荡器振荡 30 min 使其充分溶解), 4 °C, 8 000 r/min 离心, 取上清。用除菌过滤器对上清进行过滤, 即所需酶液。

**基金项目** 云南省社会发展科技计划应用基础研究专项(2008CD105)。

**作者简介** 杨富亚(1987-), 女, 云南元谋人, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程及基因工程, E-mail: 362279328@qq.com。\* 通讯作者, E-mail: huangzunxi@163.com。

**收稿日期** 2013-03-18

**1.2.2 渥堆发酵过程。**在模拟试验中,每个样品称茶重 200 g,置于塑料盆中,将酶液按 30% 的液茶比,分别喷洒于茶样上,注意喷洒均匀。用 4 层纱布盖住盆口,避光置于恒温恒湿培养箱内 30 ℃,培养 42 d,每隔 3 d 用温度计检测渥堆发酵盆内茶堆中心堆温(控制温度不超过 60 ℃),设置为 7 d 取 1 次茶样,共采集 5 次。

每次渥堆取样之后,根据干物率监控,分析潮湿度,对茶样进行潮水。潮水量按茶叶湿润程度具体决定,总体要求不超过首次潮水量。

**1.2.3 试验分组。**空白组:晒青毛茶(不添加水和酶);对照组:晒青毛茶,添加与试验组同体积水;试验组:晒青毛茶,添加同体积不同浓度复合酶液,分别为 0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5% (W/V),每一组做 2 个平行,将 2 个平行分为 A、B 2 组。

**1.3 测定分析方法** 茶叶磨碎试样的制备及其干物质含量测定采用 GB/T 8303-1987;茶样中水分含量测定采用 GB/T 8304-1987;茶样中水浸出物含量测定采用 GB/T 8305-1987;茶样中茶多酚的检测采用 GB/T 8313-2008;可溶性糖的测定采用蒽酮比色法<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 普洱茶渥堆过程中干物质含量的变化** 干物质含量从侧面反映出茶样中水分含量的多少。晒青毛茶一般含水量在 9%~12%,必须适当增加茶叶含水量,为微生物的滋生繁殖创造一定的温度、湿度条件,在渥堆发酵过程中产生一系列的酶促、湿热等化学反应,进而形成普洱茶特有的品质风格。罗龙新等研究表明,适当提高发水量,渥堆过程中茶叶升温快,有利于以茶多酚为主体的一系列化学成分的和普洱茶品质的形成<sup>[8]</sup>。在渥堆过程中,干物质含量的监控,为每次翻堆之后确保下一阶段进行的潮水量提供了依据,在确保渥堆所需要的温度、湿度条件下,避免过度潮水造成的霉变<sup>[9]</sup>。根据渥堆季节性的不同,环境相对湿度对干物率有明显的影响(图 1)。

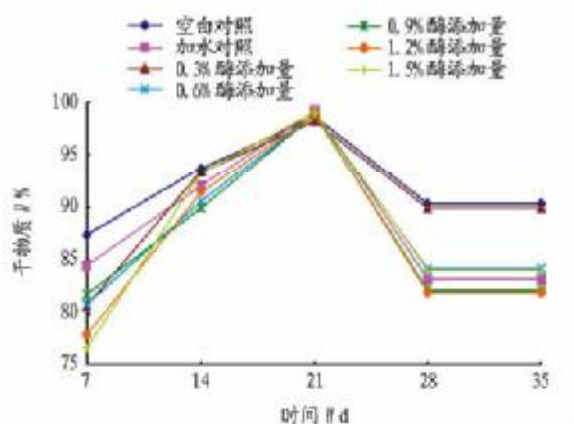


图 1 普洱茶渥堆过程中干物质的变化

**2.2 普洱茶渥堆过程中水浸出物的变化** 水浸出物是茶叶中能溶于热水,并且可检测到的所有可溶性物质的总称,是茶汤的主要呈味物质<sup>[10]</sup>。其含量的高低反映了茶叶中可溶性物质的多少,标志着茶汤的厚薄、滋味的浓淡程度,在一定

程度上反映茶叶品质的优劣。茶样中水浸出物主要包括可溶性糖、茶多酚、原果胶、氨基酸等生物活性物质。水浸出物的变化直接影响风味物质的析出,一定程度的水浸出物地提高有利于增强茶汤的滋味与滑顺口感,形成普洱茶醇、厚、黏性好的品质<sup>[11]</sup>。

从图 2 可以看出,以加水对照的水浸出物在渥堆过程中的总趋势为参照,0.6% 的复合酶试验组在渥堆 28 d 较其他试验组水浸出物有明显提高;1.5% 的复合酶试验组在 21 d 达到其渥堆过程中水浸出物最高含量,比其余试验组提前了一个阶段。至渥堆发酵结束,不同浓度的复合酶试验组的水浸出物含量均比空白试验组有明显提高,其中 1.2% 的复合酶试验组水浸出物率比空白试验组提高了 25%。

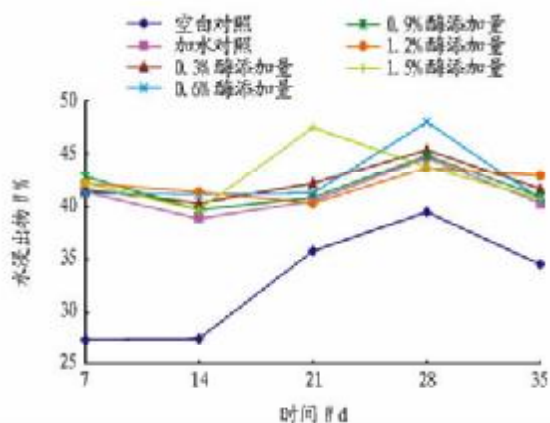


图 2 普洱茶渥堆过程中水浸出物的变化

**2.3 普洱茶渥堆过程中茶多酚含量的变化** 茶多酚是茶叶中主要的呈味物质,是多种酚类物质的总称,主体活性物质为儿茶素,约占茶多酚总量的 70% 左右,滋味苦涩且具有较强的收敛性,是构成苦涩味和回甘、生津的主要物质,与茶汤的滋味、汤色呈正相关。在整个普洱茶渥堆发酵过程中,多酚类物质在多酚氧化酶的作用下氧化缩合,同时带动其他物质氧化<sup>[12]</sup>,从而使茶汤滋味由苦涩转变成醇和,汤色逐渐由黄绿变为红亮,之后继续转变为红褐;体现在茶多酚含量检测上,便是茶多酚含量在整个渥堆过程中持续地降低。

从图 3 可以看出,在整个渥堆过程中,茶多酚的含量随着发酵周期的延长,所有试验组茶多酚含量均在不断下降。参照空白,加水对照试验组出现明显下降,说明水对发酵的进行起着至关重要的作用;而复合酶制剂试验组,茶多酚含量的下降更为显著,说明复合酶制剂可以有效促进发酵的进程。因此,添加一定量的复合酶制剂,并控制渥堆发酵时间,有利于形成普洱茶的茶汤色泽红褐、滋味醇和回甘的品质。

**2.4 普洱茶渥堆过程中可溶性糖含量的变化** 可溶性糖是指通过沸水浸提后溶解出的糖类物质,包括单糖、双糖、多糖、杂多糖果胶等物质。多糖在纤维素酶、果胶酶等多糖水解酶的作用下完全水解时形成葡萄糖和果糖。糖类物质和氨基酸类物质相互作用,对茶叶的汤色和滋味有着直接的影响,体现为醇和口感及甜味,并且还间接影响到茶叶的香气<sup>[13]</sup>。在整个普洱茶渥堆过程可溶性总糖含量的变化,目前没有定论。周红杰等研究表明,在普洱茶的渥堆加工中水

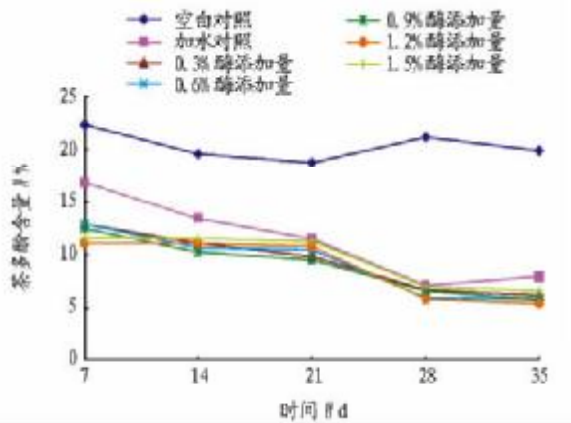


图3 普洱茶渥堆过程中茶多酚含量变化

溶性糖是增加的;而罗龙新等研究表明,水溶性糖含量在渥堆过程中的变化虽有波动,但总的趋势是减少的<sup>[14]</sup>。

从图4可以看出,在普洱茶渥堆过程中,可溶性糖的含量呈波动性变化,与空白对照相比,其余试验组的可溶性糖含量在发酵各个时期均基本高于空白试验组的含量。复合酶制剂试验组均在21 d达到可溶性糖含量最高值,1.5%复合酶制剂试验组比空白试验组的可溶性糖含量提高了50%;随着发酵时间的延长,可溶性糖含量开始下降至空白组水平。

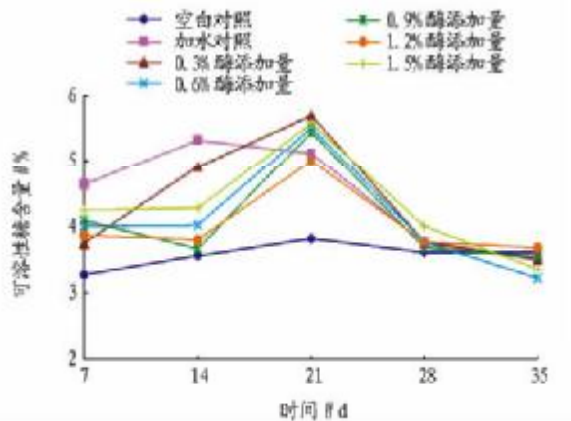


图4 普洱茶渥堆过程中可溶性糖含量的变化

**2.5 普洱茶渥堆过程中黄酮含量的变化** 黄酮类物质属于儿茶素类,在茶叶中含量很少。普洱茶在渥堆发酵过程中,黄酮类化合物发生氧化、聚合、缩合、转化等一系列复杂的生化反应<sup>[15]</sup>。张春花等研究不同地区的4个普洱茶茶样在渥堆过程中黄酮类化合物的变化发现,不同样品在渥堆的不同时期,黄酮含量的变化趋势不同,但是最终都明显高于其晒青原料<sup>[16]</sup>。李家华等采用HPLC法检测了普洱茶的晒青毛茶原料及不同发酵阶段翻堆样中3种主要的黄酮醇类物质,结果表明黄酮类物质随着发酵时间的延长而显著减少<sup>[17]</sup>。

如图5所示,试验所用普洱茶,在渥堆14 d时黄酮含量均达到最大,21 d出现不同程度地下降,28 d后复合酶试验组黄酮含量逐渐稳定。参照空白对照,其他试验组黄酮含量明显较低,其中复合酶试验组变化趋势较为一致,除1.5%的复合酶试验组在21 d到达黄酮含量最低,之后略有上升,分

析可能与复合酶作用浓度地提高有关。

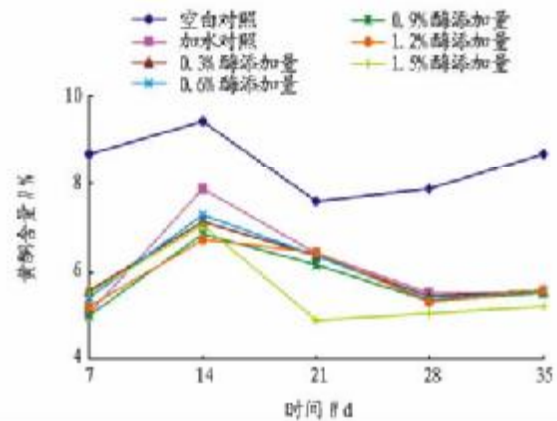


图5 普洱茶渥堆过程中黄酮含量的变化

### 3 结论与讨论

该试验通过分析研究在复合酶制剂的作用下普洱茶渥堆过程中水分含量、水浸出物、茶多酚、可溶性糖等理化成分的变化,联系对普洱茶品质的影响,发现一定浓度的复合酶制剂对普洱茶的品质形成具有明显促进作用。由于普洱茶发酵程度不但受到茶叶产地、环境相对湿度、温度、pH等外部条件的影响,而且茶树品种、采摘季节、芽叶老嫩等内质因素对发酵过程中普洱茶理化成分的变化都起着重要的影响。复合酶制剂的应用,在一定的外部环境条件下,相对于微生物产酶具有更高的稳定性和可控性。

与传统工艺相比较,在普洱茶加工中应用酶制剂具有以下优势:①从食品安全角度出发,酶具有高度催化性,作用条件温和,有严格的专一性,反应终点易控制,本身无毒、无味、无嗅,不会影响食品的安全性和食用价值,如将有机磷农药降解酶运用于茶叶加工中还可有效降低茶叶中的低浓度农药残留。②从提高茶叶品质的角度出发,外源酶类的添加有利于开发出品种风味独特、功能各异的茶叶制品。③从经济角度出发,复合酶制剂在普洱茶中的运用,有望解决微生物在渥堆过程中微生物复杂而难以质控的难题,可使工艺简化,将多步调控过程合而为一,缩短加工时间的同时可以更好地控制发酵程度,节约生产成本。

目前,利用酶制剂来提高茶叶品质的方法已被认可,但是在普洱茶加工中,如何真正将技术应用于生产,转化为现实的经济效益,而不是只停留在实验室中,还有许多问题需要解决:①研究各种酶的酶学特性,开发在各种不同的茶叶加工环境中都能保持较高的酶活性的功能性酶类。②确保在改善工艺、节约成本的前提下,利用微生物提取酶开发廉价高效的商品化酶制剂。③针对多种酶之间协同效应,加强复合酶作用机制研究。此外,在茶叶加工中,不同批次的茶叶,老嫩程度不同的叶片,对不同酶的需要量是不同的,因此,如何根据不同条件使用相应的酶类配比成为复合酶制剂应用中所需要解决的最大问题。

### 参考文献

- [1] 何青元. 云南普洱茶加工工艺探讨[J]. 贵州茶叶, 2002(3): 13-15.
- [2] 谭和平, 周李华, 钱杉杉, 等. 茶叶发酵中的酶学研究进展[J]. 中国测

- 试,2009,35(1):19-24.
- [3] 余凌子,赵正惠. 酶制剂在茶叶加工中的应用[J]. 中国茶叶,1999,21(4):8-10.
- [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):18-21.
- [5] 王斌,江和源,张建勇,等. 酶工程技术在茶叶深加工中的应用及展望[J]. 茶叶科学,2010,30(S1):521-526.
- [6] 李中皓,刘通讯. 外源酶对成品普洱茶品质的影响研究[J]. 食品工业科技,2008,29(2):152-154.
- [7] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [8] 罗龙新. 云南普洱茶渥堆过程中生化成分的变化及其与品质形成的关系[J]. 茶叶科学,1998,18(1):53-60.
- [9] 韩海华,梁名志,周斌星. 普洱茶发酵过程中潮水用量对茶品质的影响[J]. 湖南农业科学,2011(9):112-114.
- [10] 何青元,张亚萍,王平盛. 云南普洱茶感官品质与内含成份关系研究[J]. 中国农学通报,2009,25(11):38-41.
- [11] 陶忠,赵丽萍,邵婉芳. 云南普洱茶研究进展现状[J]. 思茅师范高等专科学校学报,2008,24(5):20-21.
- [12] 刘育玲,姚开,贾冬英,等. 茶多糖酶法提取的优化条件及其对葡萄糖激酶活性的影响[J]. 食品科技,2010,35(2):134-137.
- [13] 田军,沈舫,梁自达,等. 普洱茶渥堆过程中总水溶性碳水化合物和茶多酚的变化分析[J]. 价值工程,2011,29(2):313-315.
- [14] 周红杰,李家华,甘月明,等. 普洱茶渥堆过程化学成分变化与品质形成的关系[J]. 茶苑,2004(1):6-8.
- [15] 吕海鹏,谷记平. 普洱茶的化学成分及生物活性研究进展[J]. 茶叶科学,2007,27(1):8-18.
- [16] 张春花,单治国,周红杰. 云南普洱茶加工中黄酮类化合物的[J]. 茶叶通讯,2008,35(3):7-9.
- [17] 李家华,赵明,胡艳萍. 普洱茶发酵过程中黄酮醇类物质含量变化的研究[J]. 西南大学学报,2012,34(2):59-66.

(上接第3994页)

游览一回来后在集中社区农趣体验区摘菜、戏水、垂钓、烧烤一在特色餐饮长廊吃晚饭一在大田里观赏夕阳西下、群山环绕的景象一在露营区搭帐篷住或在集中社区农家旅社里居住一夜游静谧的稻田,体验农村的安详一早晨观看日出和农田里的薄雾轻烟,呼吸乡村早晨清新的空气和迷人的稻香一吃农家早饭一闲逛稻田和水渠,看流水潺潺、草木茂盛、远山秀美一观看农耕的生产过程,去林盘作坊中体验加工乐趣一吃午饭一在林盘茶园中休息一去集中社区农趣体验园继续体验无公害蔬菜的采摘和戏水垂钓的乐趣一吃晚饭一回程<sup>[2]</sup>。

**2.2.3 度假游路线。**园区主入口一选择中意的林盘和度假小屋入住一游览荷塘、游览奇异瓜果园、农业技术展示园、在采摘园采摘高品质的蔬菜水果一在林盘茶园中喝茶休息,小孩在农趣树林中玩耍一在集中社区农趣体验区摘菜、戏水、垂钓、烧烤一每天去大田游览区散步健身,观看大田风光和远山碧水一每天清晨在晨练广场晨练、读书、呼吸新鲜空气一自己在小屋内烹饪一和家人朋友在庭院中闲聊静坐一在作坊中体验农事活动。

## 2.3 配套设施

**2.3.1 景观设施。**①园垣:在集中社区农趣体验园和林盘中布置有围垣、短垣、栅篱、栏杆、花栅、照壁等。②园桥:配置砖桥、土石桥、木板桥、石板桥、竹木桥等。③园灯:在园区中,凡门柱、走廊、园路的交叉点,以及主要建筑物及绿道处均可以考虑设置园灯,可以考虑与杀虫灯设置相结合。④园椅:园区中在绿道边、林盘和农趣体验区内布置一定数量的座椅(材质方面,在大田游览区采用生态自然的石质座椅,林盘和农趣体验区内使用木质座椅)。⑤绿廊:绿道的局部路段结合生产布局绿廊,绿廊棚架上多选择的藤蔓性植物分为3类:以欣赏为目的的牵牛花、茑萝、蔓蔷薇、紫藤等;以遮荫为目的常选用枝叶浓密并具有观赏价值的如金银花、九重葛、紫藤、常春藤等;以食用为目的的有丝瓜、苦瓜、葡萄等。⑥凉亭:在园区的采摘区、观景区、人行步道交叉口等处应设置凉亭或类似的瞭望台,用于景观搭配和游人观景、纳凉、避

风、遮雨。⑦植物景观:植物景观应突出农田景观的特色,充分利用乡土植物群落结构、树种、树干、花、叶、果等形态与色彩,形成不同结构景观与四季景观。

**2.3.2 旅游服务设施。**①餐饮设施:布局应按照游览路线和园区实际条件加以统筹安排,主要位于集中社区、林盘与大田的交界处、服务配套结合集中社区和林盘的住宅布置,建筑的造型应新颖、独特,与乡村自然环境协调。②住宿设施:园区内的住宿服务,应根据游客规模和需求,确定接待房间、床位数量及档次比例,主要结合集中社区住宅发展短期的民宿,结合林盘发展长期的度假住宿。③标识、解说设施:在园区中要在显著位置设施标识、解说碑等,标识、解说碑应起到改善游憩体验,增进游客安全、避免以外灾害、阐释科普知识、宣传经营政策理念的作用;医疗站点:结合集中社区布局,主要提供简单的急救和外伤的处理,保证游客在受伤或突发疾病时得到一定的治疗。④自行车出租与维修:结合集中社区布局,主要是向自行车出租游玩和骑游者提供维修服务,增强绿道的使用率。

**2.3.3 市政服务设施。**①公共厕所:结合集中社区和林盘设置公共厕所,方便游人游玩时使用;②垃圾箱:各个游玩区域和绿道旁人流较大或停留时间教长的地方设置垃圾箱,造型要生态自然,与田园环境相协调;③垃圾收集点:在集中社区和林盘内设置垃圾收集点,位置要较为隐蔽<sup>[3]</sup>。

## 3 结语

“天马德弘万亩绿海农趣园”的规划建设结合了都江堰的生产和环境优势,在三产上与周边差异化经营,深入挖掘了农趣的内涵,为都江堰市天马镇未来实现城乡统筹,一三产联动发展具有较大的指导作用,同时也可以为其他农业园区建设提供一定的借鉴。

## 参考文献

- [1] 何景明. 成都市“农家乐”演变的案例研究[J]. 旅游学刊,2005(6):71-74.
- [2] 陈宇,姜卫兵. 观光农业园(区)规划研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(11):5289-5291.
- [3] 冯建国,杜姗姗,陈奕捷. 大城市郊区休闲农业园发展类型探讨[J]. 中国农业资源与区划,2012(1):23-30.