

文章编号: 1673 1689(2010)05-0648-05

# 普洱茶发酵过程中不同外源添加物对 氧化酶活性与成分变化的影响

隋华嵩<sup>1</sup>, 杨旭<sup>1</sup>, 周红杰<sup>2</sup>, 龚加顺\*<sup>1</sup>

(1. 云南农业大学 食品科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学 普洱茶学院, 云南 昆明 650201)

**摘要:** 研究了添加不同外源物对云南普洱茶发酵过程中氧化酶活性及成分变化的影响。结果表明, 添加不同外源物的发酵普洱茶中抗坏血酸酶活性变化较大: 发酵 10 d 时, 酶活性大小依次表现为焦性没食子酸 > 没食子酸 > 水 > 甘氨酸 > 葡萄糖; 发酵 20 d 时, 酶活性大小依次表现为水 > 没食子酸 > 葡萄糖 > 焦性没食子酸 > 甘氨酸; 发酵 30 d 时, 酶活性大小依次表现为焦性没食子酸 > 葡萄糖 > 水 > 甘氨酸 > 没食子酸。而多酚氧化酶酶活性均呈下降趋势, 以一翻样(发酵 10 d) 最高。发酵前后, 添加不同外源物的发酵茶样中茶黄素无明显变化, 茶多酚和茶红素含量大幅减少, 茶褐素含量大幅增加。这说明, 外源添加葡萄糖、没食子酸、焦性没食子酸和甘氨酸对普洱茶发酵过程中酶活性和成分有较大影响, 可加速茶褐素的形成。

**关键词:** 普洱茶; 外源物; 酶活性; 成分变化; 茶多酚; 茶褐素

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

## Effects of Different Exogenous Additives on Oxidases Activity and Components During Fermentation of Pu erh Tea

SUI Hua-song<sup>1</sup>, YANG Xu<sup>1</sup>, ZHOU Hong-jie<sup>2</sup>, GONG Jia-shun\*<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Yunnan 650201, China; 2. Pu erh Tea Academy, Yunnan Agricultural University, Yunnan 650201, China)

**Abstract:** The effects of different exogenous additives on the activity of oxidases and the change of components during fermentation of Yunnan pu- erh tea were studied. The results suggested that the significant change of ascorbic acid oxidase activity of fermented pu erh tea was detected with different additives during fermentation process: The activity of ascorbic acid oxidase of pu erh tea ranked in the order of pyrogallol > gallic acid > water > glycine > glucose when tea samples fermented after 10 days, that after 20 days the order changed to water > gallic acid > glucose > pyrogallol > glycine, that after 30 days in the order of pyrogallol > glucose > water > glycine > gallic acid. The activity of polyphenol oxidase of tea samples appeared a downward trend with different exogenous additives addition during fermentation, and the polyphenol oxidase activity in the first pile up(ferment for 10 days) sample was the highest. The contents of theaflavins have no significant changes and the content of polyphenols and thearubigins reduced significantly, and the content of theabrownins increased significantly of fermented

收稿日期: 2009-11-2

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760152, 30960241); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD58B00)。

\* 通信作者: 龚加顺(1971-), 男, 汉族, 云南富源人, 教授, 主要从事食品科学方面的研究。Email: gong199@163.com

puerh tea samples with different additives. The study indicated that the different exogenous additives such as glucose, gallic acid, pyrogallol and glycine exhibited remarkable effects on the oxidases activity and the components of puerh tea during fermentation, and they could accelerate the formation of theabrownins in puerh tea.

**Key words:** Puerh tea, exogenous additive, enzyme activity, polyphenols, theabrownin

普洱茶为云南特色茶,距今已有1700多年的历史。传统普洱茶是在长途运输、长年贮藏过程自然产生后发酵(缓慢后熟)而成,20世纪70年代中期形成了以云南大叶种晒青毛茶为原料,经人工增湿、渥堆后发酵等工序(较快后熟)加工而成的现代普洱茶。普洱茶特定品质形成的关键工序—固态发酵(也称后发酵或渥堆)是在有水分和氧气的条件下,通过热催化和酶促催化作用,使固态发酵叶内产生一系列的化学反应和生物转化反应,形成了普洱茶的各种品质成分。在普洱茶固态发酵过程中,由于湿热作用为微生物活动和代谢创造了良好的条件,同时也给茶叶的化学成分提供了热源,加强了酶系活动。近年来有许多学者对普洱茶在加工过程中的酶活性和化学成分的变化进行研究,但由于系统研究不足,都没有很全面的从酶促催化作用机理和变化来阐述普洱茶品质的形成。本论文主要研究不同外源物的添加对云南普洱茶发酵过程中抗坏血酸氧化酶和多酚氧化酶活性以及茶多酚、茶色素的变化,为云南普洱茶品质形成的调控提供一定的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料、试剂与仪器

普洱茶原料:云抗10号、佛(夏)、长叶白毫晒青毛茶。PVP、脯氨酸、没食子酸、焦性没食子酸、无水葡萄糖和甘氨酸等均为分析纯。

722紫外-可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司生产;HWS型智能恒温恒湿发酵箱:宁波东南仪器有限公司产品;HH-60恒温水浴锅;TDL-5-A型离心机,上海安亭科学仪器厂产品;DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱,上海中友仪器设备有限公司生产。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 普洱茶发酵方法** 将3种晒青毛茶(云抗10号、佛(夏)、长叶白毫)各200g混匀后,从中取出4份茶样,每份100g。将不同外源物(按质量分数1%葡萄糖,1%没食子酸,1%焦性没食子酸或1%甘氨酸)分别溶于50mL去离子水中,溶解后分

别喷洒于4份茶样中,边喷洒边拌匀茶样,再用40mL水润洗喷壶,用同样方法喷洒于茶样,待茶样完全吸湿后用PE塑料薄膜包裹茶样。将经潮水处理的茶样放置于温度45℃、湿度70%的恒温恒湿箱中发酵,每隔10d取样品检测发酵效果,共发酵30d。另设添加90mL水和原料样(未加外源物)作对照处理。

**1.2.2 抗坏血酸氧化酶的测定** 采用碘滴定法<sup>[1]</sup>。

**1.2.3 多酚氧化酶的测定** 采用分光光度法<sup>[2]</sup>。

**1.2.4 茶多酚的测定** 采用酒石酸铁比色法<sup>[3]</sup>。

**1.3.5 茶黄素、茶红素与茶褐素的测定** 采用分光光度法<sup>[3]</sup>。

**1.3.6 水分的测定** 采用103℃恒量法<sup>[3]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵过程中酶活性的变化**

**2.1.1 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵过程中抗坏血酸氧化酶活性的变化** 由图1可知,在发酵过程中,添加葡萄糖、没食子酸和甘氨酸的晒青毛茶的抗坏血酸氧化酶活性呈下降的趋势,添加水的酶活性呈先上升后下降的趋势,添加焦性没食子酸茶样的酶活性呈先下降后上升的趋势。发酵10d时,酶活性大小依次表现为焦性没食子酸>没食子酸>水>甘氨酸>葡萄糖;发酵20d时,酶活性大小依次表现为水>没食子酸>葡萄糖>焦性没食子酸>甘氨酸;发酵30d时,酶活性大小依次表现为焦性没食子酸>葡萄糖>水>甘氨酸>没食子酸。结果说明在所有发酵处理样中均检测到抗坏血酸氧化酶活性,仅活性高低不同。有研究表明,在普洱茶渥堆中,抗坏血酸氧化酶呈增长趋势。在本试验中除经过水处理的茶样其酶活性略有上升外,其余4种添加外源物发酵茶样在发酵10d时的酶活性均高于后期发酵样。说明在发酵初期,抗坏血酸氧化酶作用较强,外源添加物对其活性有一定影响。

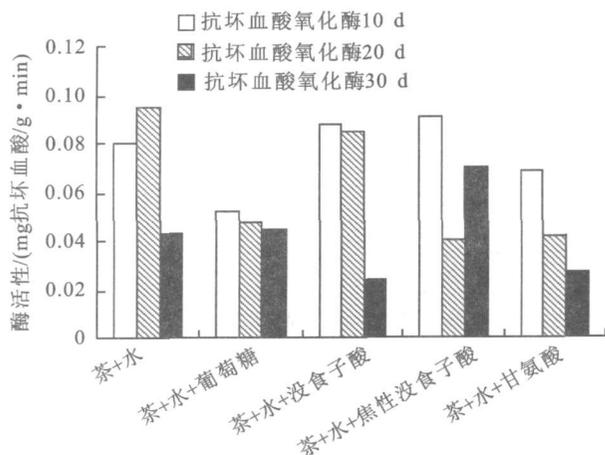


图1 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵过程中抗坏血酸氧化酶活性的变化

Fig.1 Change of the ascorbic acid oxidase activity in sun dried green tea with different additives during fermentation

2.2.2 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵过程中多酚氧化酶活性的变化 如图2所示,在发酵的不同阶段,多酚氧化酶活性总体呈下降的趋势。除添加甘氨酸的茶样多酚氧化酶活性呈先上升后下降的趋势外,其余4种茶样的多酚氧化酶活性都呈现出下降的趋势。

有研究表明,在普洱茶渥堆中,多酚氧化酶活力与黑曲霉及微生物总量的消长呈高度正相关。说明普洱茶在发酵10 d后,微生物已大量生长,多酚氧化酶活力得到显著提高,而再发酵10 d后,由于温度(45℃)持续高温,微生物的生长受到了抑制,从而影响了多酚氧化酶活性。

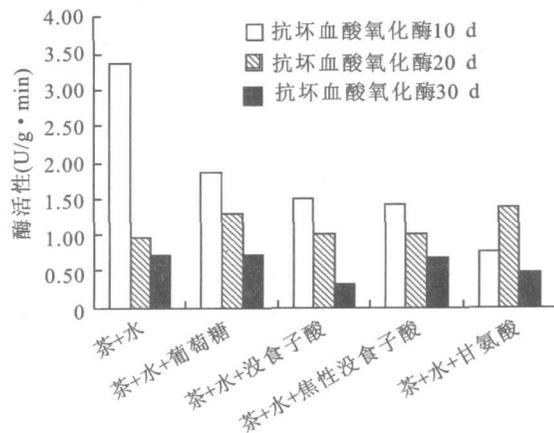


图2 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵过程中多酚氧化酶活性的变化

Fig.2 Change of the polyphenol oxidase activity in sun dried green tea with different additives during fermentation

2.2 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵前和发酵30 d后的成分变化

2.2.1 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵前和发酵30 d后的茶多酚变化 如图3所示,不同外源物的晒青毛茶在发酵前后(发酵30 d)茶多酚质量分数大幅度减少,分别减少了质量分数94.5%、93.5%、95.6%、94.1%和94.8%。发酵前,原料茶中茶多酚含量在28%~32%之间,基本无差异;而发酵后,茶多酚的含量剧减为1.5%~2.0%之间。

普洱茶熟茶中茶多酚含量一般为质量分数15%~20%,但是这次发酵的普洱茶茶多酚含量都低于质量分数2%,说明发酵过程中大部分茶多酚被氧化或者发生了生物转化。

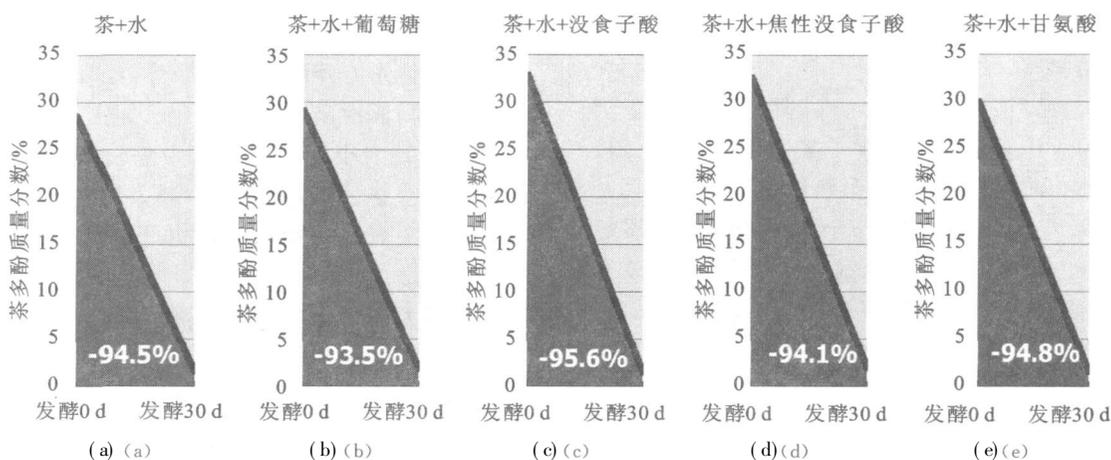


图3 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵前后茶多酚含量的变化

Fig.3 Change of tea polyphenols in sun dried green tea with adding exogenous compounds before and after fermentation

2.2.2 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵前和发酵30 d后的茶色素变化 由图4可知,发酵前(晒青毛茶样)茶样中的茶黄素、茶红素和茶褐素的含

量分别为质量分数0.56%、3.74%和1.27%。发酵后的茶样,茶黄素含量最低,在0.028~0.068%的范围内,各组之间含量无明显变化。茶红素含量在

0.28%~0.65%的范围内,发酵茶样与原料茶对比,其中茶红素含量明显降低,茶褐素含量明显升高。其中添加没食子酸的茶样发酵后,茶褐素含量最高,达到3.002%,明显高于添加其他外源物的茶样,远远高于原料茶和对照组茶样。从总体来看,添加外源物发酵的普洱茶所产生的茶色素高于未添加外源物对照组的茶色素含量。

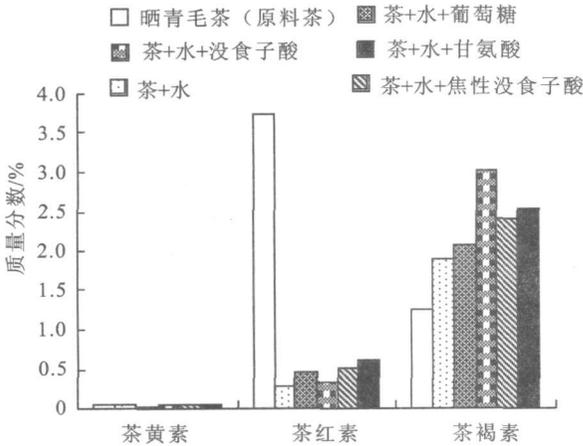


图4 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵前后茶色素含量的变化

Fig. 4 Change of tea pigments in sundried green tea with exogenous compounds before and after fermentation

2.2.3 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵过程中水分的变化 由图5可知,发酵前(0 d)不同处理茶样水分含量在6.40%~7.58%。发酵开始时,各处理的初始潮水量相同。随发酵时间的延长,各处理样的水分含量总体呈下降趋势,10 d>20 d>30 d。但不同外源物发酵的普洱茶水分下降速度不同,没食子酸、焦性没食子酸和甘氨酸下降幅度较大。

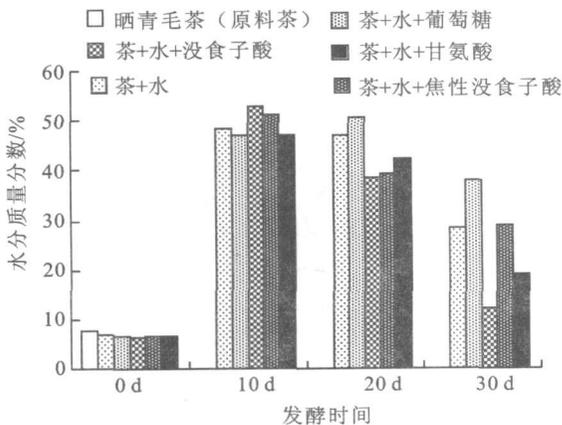


图5 添加不同外源物的晒青毛茶在发酵过程中水分的变化

Fig. 5 Change of water in the sun dried green tea added with different additives during fermentation

### 3 讨论

1) 普洱茶在发酵过程中抗坏血酸氧化酶活性是先增大后下降,但是添加了外源物后,酶活性高峰的出现发生提前或延迟。这说明添加的外源物能影响抗坏血酸氧化酶的活性。从不同外源物对发酵普洱茶中氧化酶活性的影响来看,由于添加没食子酸和焦性没食子酸,茶样的抗坏血酸氧化酶的活性高于添加葡萄糖和甘氨酸的茶样,说明没食子酸和焦性没食子酸的存在有增强抗坏血酸氧化酶的活性。

2) 普洱茶在发酵过程中前期(发酵10 d后)多酚氧化酶的活性较大,说明发酵前期茶多酚的氧化较快。普洱茶发酵过程中多酚氧化酶活性下降,可能与外源物抑制了微生物的生长和持续高温有关,但根据茶色素形成的量可以看出,添加了外源物的茶样所产生的茶褐素要高于未添加外源物的,说明外源物能促进茶褐素的形成。

3) 添加了没食子酸、焦性没食子酸和甘氨酸的茶样茶色素含量要高于其他茶样,可能是由于没食子酸、焦性没食子酸为酚类物质,有利于茶色素的形成,而甘氨酸可能是由于被普洱茶发酵中的微生物所利用,促进了微生物发酵产生茶色素。从发酵产生的普洱茶茶色素含量的不同来看,利用外源物发酵普洱茶是一种可行的方法,可以提高茶褐素的形成,提高普洱茶的品质。但具体的作用机制尚待深入研究。

### 4 结语

1) 在发酵过程中添加不同外源物发酵普洱茶,茶样中抗坏血酸酶活性高峰出现时间各不相同,而多酚氧化酶活性在发酵10 d后皆呈下降趋势。

2) 添加不同外源物的发酵普洱茶中抗坏血酸酶活性变化较大:发酵10 d时,酶活性依次表现为焦性没食子酸>没食子酸>水>甘氨酸>葡萄糖;发酵20 d时,酶活性依次表现为水>没食子酸>葡萄糖>焦性没食子酸>甘氨酸;发酵30 d时,酶活性依次表现为焦性没食子酸>葡萄糖>水>甘氨酸>没食子酸。

3) 在发酵前后,添加不同外源物的茶样中茶多酚和茶红素含量大幅度减少,茶黄素含量无明显变化,茶褐素含量大幅度增加。说明添加没食子酸、焦性没食子酸以及甘氨酸有促进茶褐素的形成,缩短发酵时间。也间接反映了没食子酸、焦性没食子酸和甘氨酸可能参与了茶褐素的形成。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] 叶宝兴,朱新产. 生物科学基础实验. 植物类[ M ]. 北京:高等教育出版社,2007. 449- 451.
- [ 2 ] 商业部茶叶畜产局. 商业部杭州茶叶加工研究所. 茶叶品质理化分析[ M ]. 上海:上海科学技术出版社, 1989. 466- 471.
- [ 3 ] 陆松侯. 施兆鹏. 茶叶审评与检验[ M ] (第三版). 北京:中国农业出版社,2000. 195- 209.
- [ 4 ] 朱丹,卢立新. 绿茶中维生素 C 氧化动力学模型研究[ J ]. 食品与生物技术学报, 2007, 26( 3 ): 66- 69.  
ZHU Dan, LU Li xin. The oxidation kinetics model of vitamin c in green tea[ J ]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26( 3 ): 66- 69. ( in Chinese)
- [ 5 ] 赵杰文,郭志明,陈全胜. 基于 OSC/ PLS 的茶叶中 EGCG 含量的近红外光谱法测定[ J ]. 食品与生物技术学报, 2008, 27( 4 ): 12- 15.  
ZHAO Jie wen, GU O Zhi ming, CHEN Quar sheng. Near infrared spectroscopy determination of EGCG content in tea based on OSC and PLS [ J ]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27( 4 ): 12- 15. ( in Chinese)
- [ 6 ] 王登良,张灵枝,毛明辉,等. 不同光波晒青对单枞茶品质的影响[ J ]. 食品与生物技术学报, 2006, 25( 2 ): 57.  
WANG Deng liang, ZHANG Ling zhi, MAO Ming hui, et al. Effect of withered with different light wave bands on qualities of damcong tea[ J ]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25( 2 ): 57. ( in Chinese)
- [ 7 ] Takshi Tanaka, Yosuke Matsuo, Isao Kouno. A novel black tea pigment and two new oxidation products of epigallocatechin 3-O-gallate[ J ]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005, 53: 7571- 7578.
- [ 8 ] Akio Yanagida, Atsushi Shoji, Yoichi Shibusawa, et al. Analytical separation of tea catechins and food related polyphenols by high speed counter current chromatography[ J ]. **Journal of Chromatography A**, 2006, 1112 : 195- 201.
- [ 9 ] E Malinowska, I Inkielewiecz, W Czarnowski, et al. Assessment of fluoride concentration and daily intake by human from tea and herbal infusions[ J ]. **Food and Chemical Toxicology**, 2008, 46: 1055- 1061.
- [ 10 ] She Ching Wu, Gow-Chin Yen, Bor-Sen Wang, et al. Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea[ J ]. **LWT**, 2007, 40: 506- 512.
- [ 11 ] Naoya Kasai, Genki Nakatsubo. Size exclusion chromatography of tea tannins and intercepting potentials of peptides for the inhibition of trypsin caseinolytic activity by tea tannins[ J ]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006, 54: 5149- 5156.

(责任编辑:杨萌)