

外源酶对陈年武夷岩茶香气品质的改善作用

谢李玲, 薛婉茹, 李丹阳, 周惠媛, 孟春, 洪晶*
(福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350000)

摘要: 为研究外源酶对陈年武夷岩茶挥发性成分的影响, 运用气相色谱-质谱联用技术 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、感官评价和香气活性值 (odor activity value, OAV) 方法对酶处理后的武夷岩茶进行分析。GC-MS 分析结果表明, 纤维素酶、果胶酶、漆酶和 β -葡萄糖苷酶质量比为 2:1:2:3 时有利于香气物质的释放, 尤其对醇类、酯类及酮类香气物质释放贡献较大。感官评价和 OAV 值的结果表明, 酶的添加能明显提高武夷岩茶的花香、甜香和木香, 复合酶的处理效果最佳, 其次是 β -葡萄糖苷酶。经复合酶处理后己醛、2-己烯醛和 (E,E)-2,4-己二烯醛等物质含量降低, OAV 减小。上述研究表明, 纤维素酶、果胶酶、漆酶、 β -葡萄糖苷酶及其复合酶的添加均可明显改善陈年武夷岩茶香气品质。

关键词: 纤维素酶; 果胶酶; 漆酶; β -葡萄糖苷酶; 气相色谱-质谱法; 香气活性值; 武夷岩茶

Exogenous Enzymes Improve the Aroma Quality of Wuyi Rock Tea

XIE Li-ling, XUE Wan-ru, LI Dan-yang, ZHOU Hui-yuan, MENG Chun, HONG Jing*

(College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350000, Fujian, China)

Abstract: The effect of exogenous enzymes on the volatile components of aged Wuyi rock tea was studied by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), sensory evaluation, and odor activity value (OAV) method. The GC-MS results showed that cellulase, pectinase, laccase, and β -glucosidase at the ratio of 2:1:2:3 were beneficial to the release of aroma substances, especially alcohols, esters, and ketones. The sensory evaluation and OAV results showed that the addition of enzymes significantly improved the floral, sweet, and woody aromas of Wuyi rock tea, and the complex enzymes showed the best performance, followed by β -glucosidase. The addition of the complex enzymes reduced the content of hexanal, 2-hexenal, and (E,E)-2,4-hexadienal and decreased the OAV. The above results demonstrated that the addition of cellulase, pectinase, laccase, β -glucosidase and their combinations could significantly improve the aroma quality of aged Wuyi rock tea.

Key words: cellulase; pectinase; laccase; β -glucosidase; gas chromatography-mass spectrometry; odor activity value; Wuyi rock tea

引文格式:

谢李玲, 薛婉茹, 李丹阳, 等. 外源酶对陈年武夷岩茶香气品质的改善作用[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(5): 155-164.

XIE Liling, XUE Wanru, LI Danyang, et al. Exogenous Enzymes Improve the Aroma Quality of Wuyi Rock Tea[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5): 155-164.

武夷岩茶是乌龙茶的一种, 中国十大名茶之一。“岩茶风味”是指在加工过程中由前体产生的醇厚口感和特有花香^[1]。迄今为止, 已从各种茶叶中发现了 700 多种香气物质, 包括醇类、醛类、酮类、酯类、内酯类、酸类、酚类、碳水化合物等十余类化合物, 其中又以醇类、酯类、酮类、醛类和碳水化合物为主^[2-4]。

茶香气是茶叶最重要的品质之一, 它影响着茶叶的感官特征和经济价值, 是评价茶叶质量优劣的重要指标之一^[5]。由于香气物质在茶叶中含量低 (质量分数仅 0.1% 左右)、种类多、易挥发、提取过程中易发生各种复杂的化学反应, 因而在茶叶深加工过程中香气物质易香气混杂、损耗及变化而导致香气低沉恶化^[6]。随

作者简介: 谢李玲 (1996—), 女 (汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品工程。

* 通信作者: 洪晶 (1981—), 女, 副教授, 研究方向: 食品生物技术研究。

着国内外研究的深入,消费者对茶叶香气的品质要求越来越高,因此,如何提高低档茶的香气,成为一个重要的研究课题^[7]。

酶解发酵技术是改善茶香气的众多方法中较为有效的方法^[8]。Rigling等^[9]研究发现绿茶发酵后,香叶醇、芳樟醇等香气物质显著增加,且茶叶香气从原有的青草香转为更令人喜爱的花香。Xiao等^[10]用冠突散囊菌处理夏秋茶,结果表明具有花香气的萜烯醇含量明显增加,夏秋茶苦涩味减弱。张良桢^[11]研究发现黑曲霉胞外酶液处理乌龙茶粉后苯甲醛、顺-3-己烯醇等的含量明显增加。缪凤等^[12]研究发现添加外源纤维素酶可以促进红茶香气化合物产生,加快花香类化合物的转化,从而改善红茶品质。Kinugasa等^[13]发现在绿茶罐装茶水中加入果胶酶可释放出大量芳樟醇和香叶醇。Su等^[14]、Zhang等^[15]研究表明 β -葡萄糖苷酶可提高茶叶中香气物质的含量,如香叶醇、顺-3-己烯醇。

相关研究表明,合理贮藏有利于提高武夷岩茶的感官品质^[16],而本研究采用的低档陈年武夷岩茶由于储存不当,导致香气低沉恶化。虽然已有研究报道关于酶对茶香气的影响,但由于不同茶叶中的香气前体物质不同,目前尚未有研究探究酶解对陈年武夷岩茶香气的释放作用。因此,本文运用纤维素酶、果胶酶、漆酶、 β -葡萄糖苷酶对陈年武夷岩茶进行处理,研究单一酶及复合酶对武夷岩茶挥发性成分种类、含量的影响,为提高低档岩茶的香气提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

陈年武夷岩茶:市售;纤维素酶(50 U/g)、果胶酶(500 U/g)、漆酶(120 U/g)、 β -葡萄糖苷酶(100 U/g):上海源叶生物科技有限公司; α -半乳糖苷酶(9 000 U/g):南京都莱生物技术有限公司;2-辛醇(10 mg/L):阿拉丁试剂(上海)有限公司;氯化钠(分析纯)、无水乙醇(色谱纯):国药集团化学试剂有限公司;芳樟醇、顺-3-己烯醇、苯乙醛、2,5-二甲基吡嗪、反式- α -紫罗兰酮(均为色谱纯):Sigma-Aldrich公司。

1.1.2 仪器与设备

7890B 气相色谱-质谱联用仪、Agilent HP-INNOWAX 弹性石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm,0.25 μ m):美国安捷伦科技公司;Supleco 固相微萃取装置(50/30 μ m DVB/CAR/PDMS):美国 Supelco 公司;98-T-B 电子调温电热套:天津市泰斯特仪器有限公司;SHA-C 恒温振荡器:国华(常州)仪器制造有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器:巩义市予华仪器有限责任公司;24/29 型水蒸气蒸馏装置:四川蜀玻(集

团)有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 武夷岩茶香气物质的提取

采用水蒸气蒸馏法提取陈年武夷岩茶中的香气物质,具体方法:5 g 武夷岩茶加入到含有 100 mL 超纯水的圆底烧瓶中,加适量酶在50 $^{\circ}$ C下酶解 2 h 后,进行水蒸气蒸馏,蒸馏完毕后,收集馏出液。

1.2.2 武夷岩茶香气物质的检测

顶空固相微萃取(headspace solid phase microextraction, HS-SPME)萃取过程:取 1.2.1 中的馏出液样品 6 mL,加入 10 μ L 2-辛醇(10 mg/L)和 2.0 g 氯化钠。60 $^{\circ}$ C水浴加热 15 min 后,插入已老化的萃取针,顶空吸附 45 min 后通过气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)仪进样,250 $^{\circ}$ C条件下解吸 5 min。

GC-MS 分析条件:色谱柱为 HP-INNOWAX 弹性石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm,0.25 μ m);进样口温度为 250 $^{\circ}$ C;升温程序:初始柱温 40 $^{\circ}$ C,保持 5 min,以 5 $^{\circ}$ C/min 升至 240 $^{\circ}$ C,保持 5 min,后运行时间 5 min;进样方式:不分流进样。

质谱条件:电离方式为电子轰击电离源(electronic ionization, EI),电子能量为 70 eV,离子源温度为 230 $^{\circ}$ C,质量扫描范围为 m/z 35 amu~450 amu。

定性定量分析:将 GC-MS 检测的物质与 NIST.11 library 相匹配,从而确定挥发性成分。利用被测物与内标物(2-辛醇)峰面积的比值计算茶叶中挥发性物质的相对含量。

以醇类、酯类、醛类、酮类、香气物质总量及武夷岩茶中主要挥发性成分含量为指标,对武夷岩茶香气物质进行检测。

1.2.3 武夷岩茶香气物质的增香工艺研究

1.2.3.1 复合酶种类的筛选

以纤维素酶加果胶酶为基础,分别复配不同的复合酶酶解武夷岩茶(每种酶的添加量为 2 mg)。具体复合酶添加方式:a 对照组(control check, ck),不加酶;b 酸解+纤维素酶+果胶酶+ β -葡萄糖苷酶;c 纤维素酶+果胶酶+ α -半乳糖苷酶;d 纤维素酶+果胶酶+漆酶;e 纤维素酶+果胶酶+ β -葡萄糖苷酶;f 纤维素酶+果胶酶+漆酶+ α -半乳糖苷酶;g 纤维素酶+果胶酶+漆酶+ β -葡萄糖苷酶,按照 1.2.1 的方法进行提取,再按照 1.2.2 中的方法进行分析 and 检测。

1.2.3.2 单因素试验

按照 1.2.1 的方法研究单一酶不同添加量酶解武夷岩茶的单因素试验,具体加酶量为纤维素酶(0.15 U/g~0.60 U/g)、果胶酶(1.5 U/g~6.0 U/g)、漆酶(0.36 U/g~

1.44 U/g)、 β -葡萄糖苷酶(0.3 U/g~1.2 U/g)。将所有样品按照 1.2.2 中的方法进行分析 and 检测。

1.2.3.3 正交试验

选取纤维素酶、果胶酶、漆酶和 β -葡萄糖苷酶复合酶体系,以不同加酶量为因素,各取 3 个水平,进行四因素三水平正交试验以确定最优复合酶配比。按照 1.2.1 的方法提取茶香气物质,按照 1.2.2 中的方法进行香气物质的检测。因素及水平如表 1 所示。

表 1 因素及水平
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 纤维素酶/(U/g)	B 果胶酶/(U/g)	C 漆酶/(U/g)	D β -葡萄糖苷酶/(U/g)
1	0.30	1.5	0.36	0.3
2	0.45	3.0	0.72	0.6
3	0.60	4.5	1.08	0.9

1.2.4 感官评价

参考相关文献[17~20],选取青草香、花香、木香、甜香和烘烤香 5 种香气属性作为感官评价指标。取一定体积的无水乙醇将标准品分别稀释成 1、5、9 分对应的浓度,并建立武夷岩茶感官评价标准,具体标准见表 2,选取 12 名感官评价成员(20 岁~40 岁,包括 8 名女性和 4 名男性)对酶解后的茶汤在(25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C 的洁净环境中进行感官评价。其中 1 分表示香气强度较低,5 分表示香气强度中等,9 分表示香气强度较高。

表 2 武夷岩茶感官评价标准

Table 2 The sensory evaluation standards of Wuyi rock tea $\mu\text{g/L}$				
香气属性	标准品	1 分浓度	5 分浓度	9 分浓度
花香	芳樟醇	10.0	50.0	90.0
青草香	顺-3-己烯醇	70.0	350.0	630.0
甜香	苯乙醛	4.0	20.0	36.0
烘烤香	2,5-三甲基吡嗪	20.0	100.0	180.0
木香	反式- α -紫罗兰酮	0.4	2.0	3.6

1.2.5 香气活性值(odor activity value, OAV)的计算

OAV 为某香气成分的浓度与其嗅觉阈值的比值,查找相关文献[18,21]获得阈值,再根据定量结果计算 OAV 值,计算公式如下。

$$\text{OAV} = \frac{C_i}{OT_i}$$

式中: C_i 为香气成分的浓度, $\mu\text{g/L}$; OT_i 为该香气成分的阈值, $\mu\text{g/L}$ 。

1.2.6 数据统计分析

所有试验重复 3 次,使用 SPSS statistics 18.0 统计分析软件进行单因素方差分析,利用 Mini-tab 17 进行正交方差分析和极差分析,利用 SIMCA 14.1 软件进行

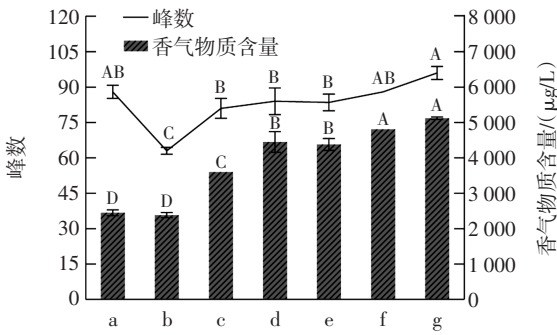
主成分分析,使用 R 4.05 进行聚类热图分析。试验结果显著性水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 复合酶种类对陈年武夷岩茶挥发性成分的影响

雪松醇是陈年白茶的主要成分,这可能是构成陈年武夷岩茶香气陈纯的物质基础^[21]。具有花果香的香叶醇、芳樟醇、橙花叔醇等醇类物质,其含量与组成对乌龙茶香气品质的形成起着关键作用^[22]。醇类成分基本上是做青过程中经酶水解糖苷配基而形成的,已有研究表明可以通过添加外源酶来促进糖苷类香气前体充分水解释放出糖苷配基,从而形成游离态的芳香物质^[23]。

不同复合酶酶解陈年武夷岩茶的 GC-MS 分析结果如图 1 所示。



a.对照组;b.酸解+纤维素酶+果胶酶+ β -葡萄糖苷酶;c.纤维素酶+果胶酶+ α -半乳糖苷酶;d.纤维素酶+果胶酶+漆酶;e.纤维素酶+果胶酶+ β -葡萄糖苷酶;f.纤维素酶+果胶酶+漆酶+ α -半乳糖苷酶;g.纤维素酶+果胶酶+漆酶+ β -葡萄糖苷酶。不同大写字母表示差异显著, $p < 0.05$ 。

图 1 不同复合酶处理对武夷岩茶香气物质含量和峰数的影响
Fig.1 Effect of different complex enzymes treatment on the aroma substances content and peak number of Wuyi rock tea

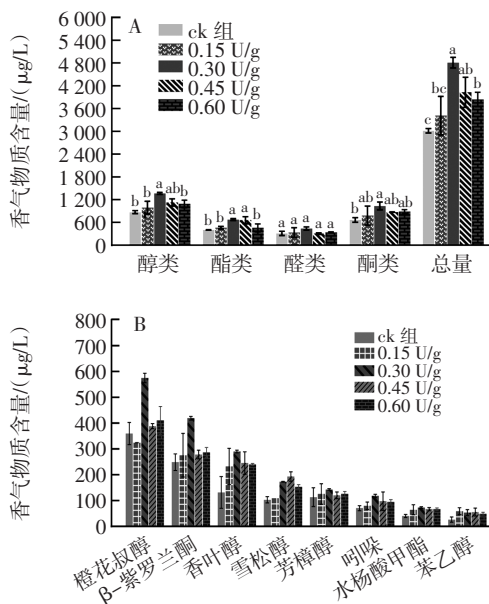
由图 1 可知,武夷岩茶若先酸解再加入复合酶,挥发性成分的数量与对照组相比显著减少($p < 0.05$),说明酸解可能会使武夷岩茶中原有的香气物质被水解,而其他复合酶组的挥发性成分与对照组相比无显著性差异($p > 0.05$)。复合酶处理(除 b 组外)可以显著提高香气物质含量($p < 0.05$),其中 f 组、g 组对香气物质总量的增加较为有效,分别提高了 96%、109%,其次是 d 组和 e 组,分别提高了 82%、79%。b 组与对照组相比,其香气物质含量变化不大,但香气物质的个数却大幅减少,这表明酸解不利于陈年武夷岩茶香气物质的释放。综上,最终选择复合酶种类为纤维素酶、果胶酶、漆酶和 β -葡萄糖苷酶。

2.2 不同酶添加量对陈年武夷岩茶挥发性成分影响

2.2.1 纤维素酶对陈年武夷岩茶香气物质的影响

不同纤维素酶添加量对陈年武夷岩茶香气物质的影响如图 2 所示。

由图 2 可知,陈年武夷岩茶原料中的雪松醇(木



A.挥发性组分;B.特征香气。不同小写字母表示差异显著, $p<0.05$ 。

图2 纤维素酶不同添加量对武夷岩茶挥发性组分和特征香气的影响

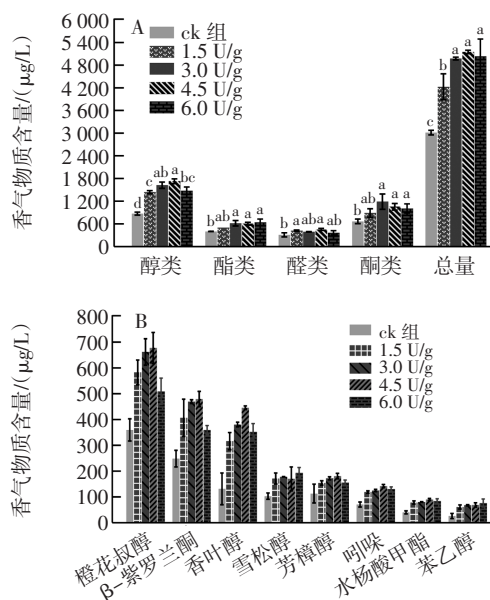
Fig.2 Effects of different concentration of cellulase on volatile components and characteristic aroma of Wuyi rock tea

香)、橙花叔醇(花果香)、 β -紫罗兰酮(花果香)、苯乙醇(甜香、花香)、香叶醇(花香、甜香)含量较高。雪松醇是陈年白茶的主要成分,这可能是陈年武夷岩茶香气陈纯的物质基础^[21];具有花果香的香叶醇、芳樟醇、橙花叔醇等醇类物质,其含量与组成对乌龙茶香气品质的形成起着关键作用^[22]。与对照组相比,纤维素酶处理后醇类、酯类、酮类及香气总量均明显提高。随着纤维素酶添加量的增加,各香气组分呈现先增加后降低的趋势,研究表明苯丙氨酸是苯乙醇前体物质,苯丙氨酸被苯乙醛合酶催化形成苯乙醛,再通过芳基脱氢酶转化为苯乙醇,由此可以推测苯乙醇的来源可能与纤维素酶促进苯丙氨酸转化有关^[24-25]。大多数香气物质在纤维素酶添加量为0.30 U/g~0.45 U/g时达到最高值,这是因为纤维素酶能作用于茶叶的细胞壁,破坏细胞壁中的不溶性纤维素,增加细胞的通透性,从而提高香气物质的得率。但随着纤维素酶添加量的持续增加,纤维素酶无法进一步水解纤维素,香气物质不再增加,而游离的香气物质被进一步水解,导致香气物质含量降低^[26]。因此,大部分的香气物质在纤维素酶添加量为0.30 U/g时酶解效果最佳。

2.2.2 果胶酶对陈年武夷岩茶香气物质的影响

欧伊伶^[27]在研究楮叶齐夏秋乌龙茶时发现,果胶酶一方面增加细胞间通透性,另一方面能引起细胞的胞间层解体,释放出能引发胁迫响应的低聚糖和一些与香气形成关联密切的糖苷酶类物质,从而间接地促

进楮叶齐夏秋乌龙茶内含生化成分的转化和香气品质的形成。不同果胶酶添加量对陈年武夷岩茶香气物质的影响如图3所示。



A.挥发性组分;B.特征香气。不同小写字母表示差异显著, $p<0.05$ 。

图3 果胶酶不同添加量对武夷岩茶挥发性组分和特征香气的影响

Fig.3 Effects of different concentration of pectinase on volatile components and characteristic aroma of Wuyi rock tea

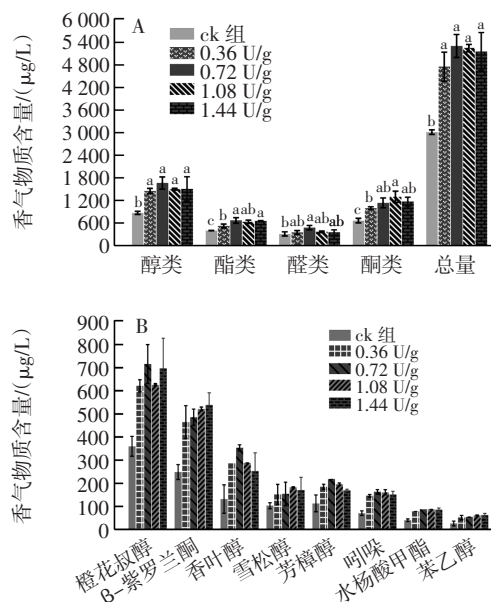
由图3A可知,随着果胶酶添加量的增加,香气物质总量、酯类、醛类、酮类均先增加后趋于平缓,当果胶酶浓度高于3.0 U/g时,这些香气物质含量无显著差异($p>0.05$)。而醇类物质随着果胶酶添加量的增加呈现先增加后降低的趋势,在果胶酶添加量达到4.5 U/g时,醇类物质含量达到最高值,但是与3.0 U/g时没有显著差异($p>0.05$)。综上,果胶酶添加量为3.0 U/g时,陈年武夷岩茶的增香效果最佳。

由图3B可知,橙花叔醇、 β -紫罗兰酮、香叶醇、芳樟醇、吲哚、水杨酸甲酯的含量随果胶酶添加量的增加呈现先升高后降低的趋势,并在果胶酶添加量4.5 U/g时均达到最高值,但是与果胶酶添加量为3.0 U/g时相差不大,说明适宜的果胶酶添加量有利于这些香气物质的释放,过低可能酶解不完全,过高可能使游离的挥发性物质被水解。

2.2.3 漆酶对陈年武夷岩茶香气物质的影响

不同漆酶添加量对陈年武夷岩茶香气物质的影响如图4所示。

由图4A可知,从醇类含量、香气物质含量总量来看,当漆酶的浓度为0.36 U/g时,其增香效果显著高于对照组($p<0.05$),再继续增加漆酶添加量,这些香气物质无显著变化($p>0.05$)。在漆酶量为0.72 U/g时,酯类、醛类及酮类的含量达到较高水平,继续增大漆酶添加



A.挥发性组分;B.特征香气。不同小写字母表示差异显著, $p<0.05$ 。

图4 漆酶不同添加量对武夷岩茶挥发性组分和特征香气的影响

Fig.4 Effects of different concentration of laccase on volatile components and characteristic aroma of Wuyi rock tea

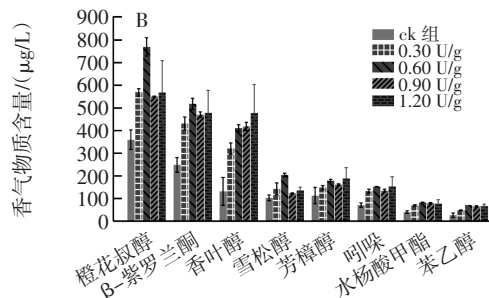
量时,这些香气物质含量变化趋于平缓或有所降低,这可能是由于当漆酶添加量增加到一定程度时,漆酶无法进一步把木质素降解为小分子物质,不利于茶叶内部物质发生转变,无法形成更多有利于香气品质的成分^[28]。肖世青^[29]的研究表明,漆酶能增加酯类香气物质的含量,而本文结果表明漆酶不仅能提高酯类含量,还能提高其他香气组分含量。

由图4B可知,随着漆酶添加量的增加,大部分的香气物质呈现先升高后缓慢降低的趋势,大部分的香气物质如橙花叔醇、香叶醇、芳樟醇、吡嗪、水杨酸甲酯等在漆酶添加量为0.72 U/g时达到最高值。综上所述,漆酶浓度为0.72 U/g时增香效果最佳。

2.2.4 β -葡萄糖苷酶对陈年武夷岩茶香气物质的影响

不同 β -葡萄糖苷酶添加量对陈年武夷岩茶香气物质的影响如图5所示。

由图5A可知,随着 β -葡萄糖苷酶添加量的增加,香气物质的总量、酯类和酮类的含量呈现先升高后降低的趋势,但是对醛类物质没有显著影响($p>0.05$)。武



A.挥发性组分;B.特征香气。不同小写字母表示差异显著, $p<0.05$ 。

图5 β -葡萄糖苷酶不同添加量对武夷岩茶挥发性组分和特征香气的影响

Fig.5 Effects of different concentration of β -glucosidase on volatile components and characteristic aroma of Wuyi rock tea

夷岩茶中的重要特征香气成分,如橙花叔醇、香叶醇等醇系香气物质,大多是以糖苷类香气物质为前体经水解游离形成, β -葡萄糖苷酶可促进键合态的糖苷的香气前体水解成游离的香气物质,从而增加茶汤中茶香气物质的含量,当 β -葡萄糖苷酶的添加量继续增加时,茶中的糖苷香气前体基本上已经完全游离,因此香气物质含量不会继续增加;香气物质含量降低可能是因为 β -葡萄糖苷酶可以促进游离香气物质进一步反应^[9]。

由图5B可知,在 β -葡萄糖苷酶的作用下,芳樟醇、香叶醇、水杨酸甲酯等糖苷前体的挥发性化合物含量整体呈增加的趋势,这与Su等^[14]、Supriyadi等^[30]的研究结果一致,且香叶醇含量随 β -葡萄糖苷酶添加量的增加而增加。大多数的香气物质如橙花叔醇、 β -紫罗兰酮、吡嗪、雪松醇、水杨酸甲酯、苯乙醇含量在 β -葡萄糖苷酶添加量为0.60 U/g时,达到最高值,且 β -紫罗兰酮的含量在加酶处理组中的含量均明显高于对照组,Wang等^[20]研究结果发现 β -葡萄糖苷酶处理绿茶后,其 β -紫罗兰酮的含量增加,这与本研究结果相一致。

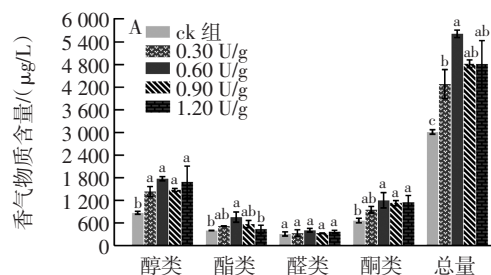
2.3 复合酶配比对陈年武夷岩茶挥发性成分的影响

以单一酶添加量的试验结果为基础,挑选出纤维素酶、果胶酶、漆酶和 β -葡萄糖苷酶的3个酶浓度水平,进行正交试验,正交试验的结果及极差分析如表3所示。

表3 复合酶配比正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test of complex enzymes ratio

序号	A 纤维素酶/(U/g)	B 果胶酶/(U/g)	C 漆酶/(U/g)	D β -葡萄糖苷酶/(U/g)	香气物质总量/ μ g/L
1	1(0.30)	1(1.5)	1(0.36)	1(0.3)	4 674.52
2	1	2(3.0)	2(0.72)	2(0.6)	5 753.57
3	1	3(4.5)	3(1.08)	3(0.9)	5 805.99



续表3 复合酶配比正交试验结果

Continue table 3 Results of orthogonal test of complex enzymes ratio

序号	A 纤维素酶/(U/g)	B 果胶酶/(U/g)	C 漆酶/(U/g)	D β -葡萄糖苷酶/(U/g)	香气物质总量/ $(\mu\text{g/L})$
4	2(0.45)	1	2	3	6 455.96
5	2	2	3	1	5 320.31
6	2	3	1	2	5 185.62
7	3(0.60)	1	3	2	4 577.67
8	3	2	1	3	4 800.13
9	3	3	2	1	5 051.26
k_1	5 411	5 236	4 887	5 015	
k_2	5 654	5 291	5 754	5 172	
k_3	4 810	5 348	5 235	5 687	
极差 R	844	112	867	672	
优水平	A_2	B_1	C_2	D_3	
主次顺序	$C>A>D>B$				

由表3可知,影响香气物质总量的因素主次顺序为 $C>A>D>B$, $A_2B_1C_2D_3$ 组合的增香效果最佳。

香气物质的总量方差分析见表4。

表4 香气物质的总量方差分析

Table 4 Analysis of variance of total aroma substances

方差来源	平方和 SS	自由度 f	均方和 MS	F 值	p 值	显著性
A	2 267 358	2	1 133 679	9.41	0.006	*
B	37 350	2	18 675	0.16	0.859	
C	2 283 487	2	1 141 744	9.48	0.006	*
D	1 483 009	2	741 504	6.16	0.021	*
误差	1084108	9	120 456			

注:*表示差异显著, $p<0.05$ 。

由表4可知,A(纤维素酶)、C(漆酶)、D(β -葡萄糖苷酶)对香气总量的提高有显著效果($p<0.05$),B(果胶酶)在提高香气物质总量时没有显著影响($p>0.05$),各试验组的香气物质含量见图6。

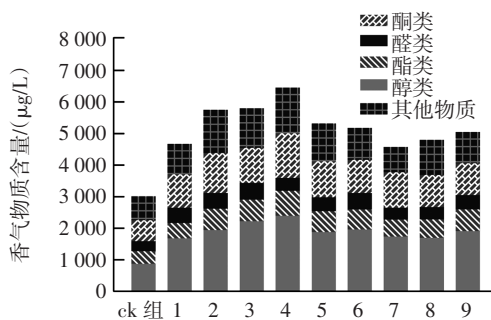


图6 复合酶配比正交试验结果

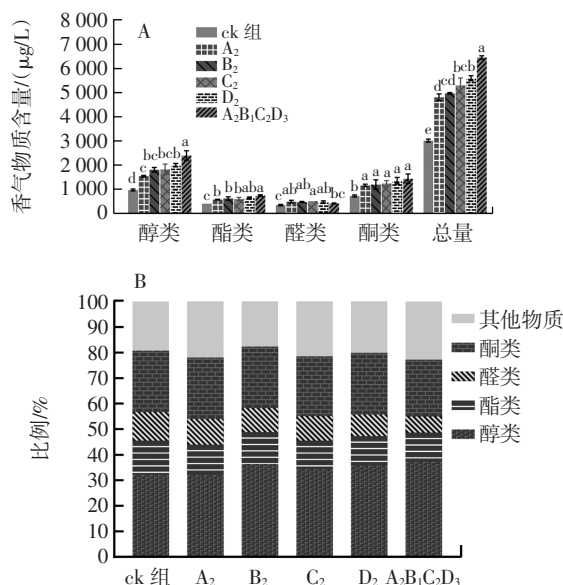
Fig.6 Orthogonal test results of the complex enzymes ratio

由图6可知,正交试验第4组的香气物质含量最高,从成本角度考虑,最终确定最优复合酶配比组合为

$A_2B_1C_2D_3$,即纤维素酶、果胶酶、漆酶、 β -葡萄糖苷酶的质量比为2:1:2:3是最佳的复合酶配比,此时香气物质总量可高达6 455.96 $\mu\text{g/L}$,是对照组的2.14倍;醇类香气物质可高达2 399.89 $\mu\text{g/L}$,是对照组的2.75倍,说明当纤维素酶、果胶酶、漆酶、 β -葡萄糖苷酶的质量比为2:1:2:3时,对香气物质含量的增加效果最佳。

2.4 单一酶及复合酶酶解陈年武夷岩茶的挥发性成分对比

为了进一步比较单一酶及复合酶对陈年武夷岩茶挥发性香气成分的影响,对单一酶及复合酶的增香效果进行了分析,结果如图7所示。



A.挥发性物质组分含量;B.挥发性物质组分比例;ck.对照组;
 A_2 0.45 U/g 纤维素酶; B_2 3.0 U/g 果胶酶; C_2 0.72 U/g 漆酶;
 D_2 0.6 U/g β -葡萄糖苷酶; $A_2B_1C_2D_3$ 为纤维素酶:果胶酶:
漆酶: β -葡萄糖苷酶=2:1:2:3(质量比)。不同小写字母表示
差异显著, $p<0.05$ 。

图7 最优酶解水平的挥发性物质组分含量及比例

Fig.7 Volatile substance component content and ratio at optimal enzymatic hydrolysis level

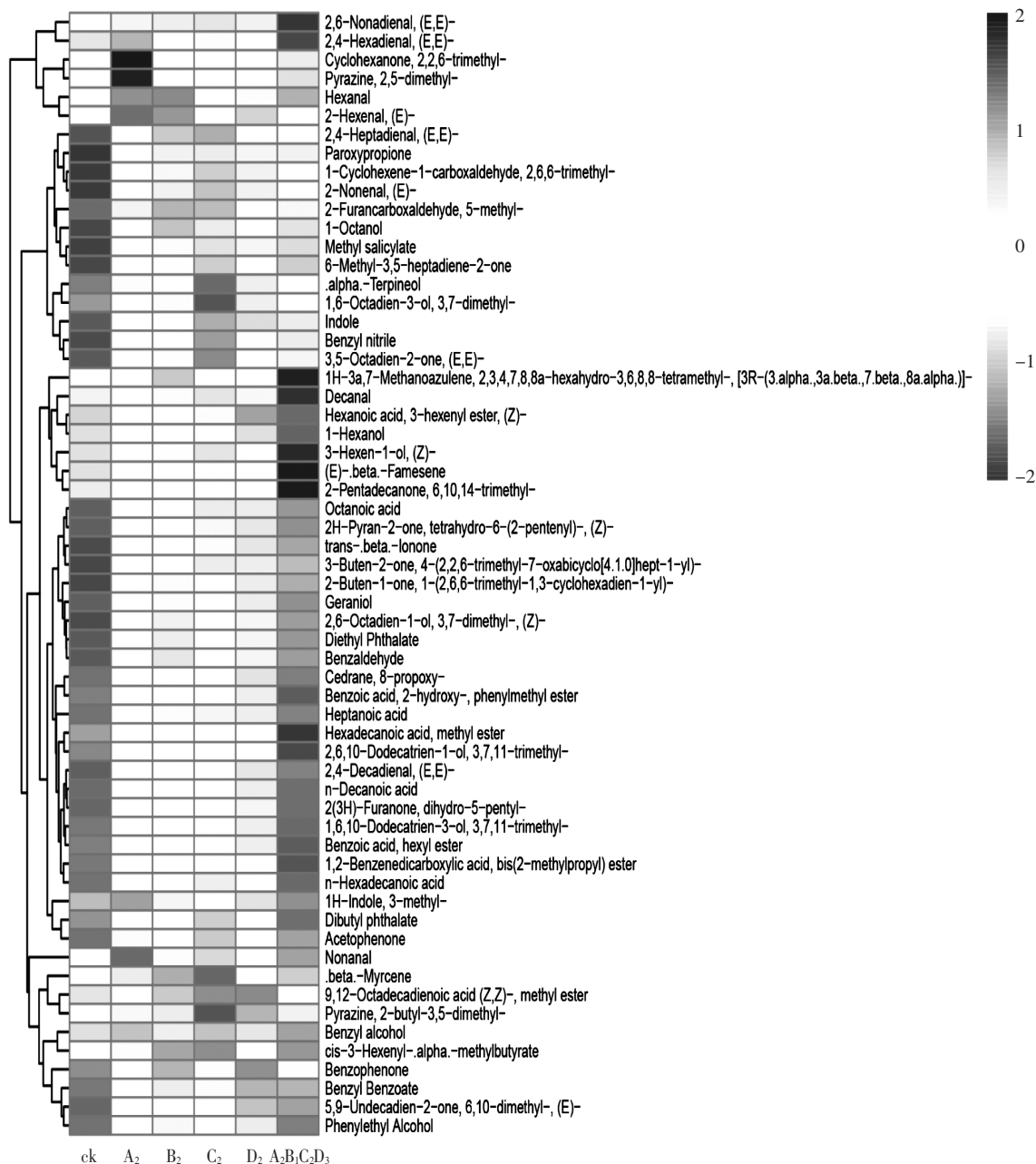
由图7A可知,单一酶和复合酶均能明显提高陈年武夷岩茶的香气物质含量。对于香气物质总量、醇类含量、酯类含量来说,复合酶的增香效果最佳;醛类物质的含量在单一酶解处理过程中含量较高,复合酶($A_2B_1C_2D_3$)对醛类香气物质的增香效果与对照组无显著差异($p>0.05$),Supriyadi等^[30]的结果表明 β -葡萄糖苷酶的加入可以加速酶的氧化反应,从而使许多苯甲醇化合物转化为苯甲醛,所以推测醛类香气物质的增加可能是在酶的作用下,醇类物质氧化生成醛;对于酮类物质来说,与对照组相比,单一酶及复合酶处理均能显著提高其含量($p<0.05$),但是各加酶组之间无显著差异($p>0.05$)。

由图7B可知,酶解作用对香气物质组分的比例略

有影响,除了 A₂ 组(纤维素酶组),其他加酶组中的醇类物质比例均高于对照组,尤其是 A₂B₁C₂D₃ 组(复合酶),醇类物质达到 37.20%;酮类物质的比例在对照组、A₂ 组、B₂ 组、D₂ 组均为 24%左右,在 C₂(漆酶)组为 23.32%、A₂B₁C₂D₃(复合酶)组为 22.22%;其他组分中,

A₂B₁C₂D₃(复合酶)组的比例也是最高的,可能是由于酸类物质(如辛酸、癸酸)、含氮类物质(如吡啶)等其他挥发性物质含量增加。

对单一酶及复合酶最优酶解武夷岩茶的主要挥发性化合物进行聚类热图分析,如图 8 所示。



ck 为对照组; A₂ 为 0.45 U/g 纤维素酶; B₂ 为 3.0 U/g 果胶酶; C₂ 为 0.72 U/g 漆酶; D₂ 为 0.6 U/g β -葡萄糖苷酶; A₂B₁C₂D₃ 为纤维素酶:果胶酶:漆酶: β -葡萄糖苷酶=2:1:2:3(质量比)。

图 8 最优酶解水平主要挥发性成分聚类热图分析

Fig.8 Heatmap analysis of major volatile components for the optimal enzymatic hydrolysis level

由图 8 可知,武夷岩茶中的主要香气物质被聚类为 4 类,第一类包括反-2,6-壬二醛、(E,E)-2,4-己二烯醛、2,2,6-三甲基环己酮、2,5-二甲基吡嗪、己醛、反式-2-己烯醛。这些成分在复合酶组中的含量很低或

没有,具有青草香的己醛和反式-2-己烯醛在 A₂(纤维素酶)和 B₂(果胶酶)组中的含量明显高于其他组分。

第二类包括 (E,E)-2,4-庚二烯醛、4-羟基苯丙酮、 β -环柠檬醛、反式-2-壬烯醛、5-甲基呋喃醛、1-辛

醇、水杨酸甲酯、6-甲基-3,5-戊二烯-2-酮、 α -松油醇、芳樟醇、吡嗪、苯乙腈、3,5-辛二烯-2-酮,这些物质在对照组中的含量很低或没有,说明其主要在加酶后产生。具有花果香的 α -松油醇、芳樟醇、吡嗪、 β -环柠檬醛以及青草香的3,5-辛二烯-2-酮在C₂(漆酶)组中含量较高。

第三类包括 α -柏木烯、癸醛、己酸叶醇酯、正己醇、青叶醇、(E)- β -金合欢烯、植酮、辛酸、茉莉内酯、 β -紫罗兰酮、4-[2,2,6-三甲基-7-氧杂二环[4.1.0]庚-1-基]-3-丁烯-2-酮、大马酮、香叶醇、橙花醇、酞酸二乙酯、苯甲醛、雪松醇、柳酸苄酯、庚酸、棕榈酸甲酯、金合欢醇、反式-2,4-癸二烯醛、丙位壬内酯、橙花叔醇、苯甲酸己酯、邻苯二甲酸酯、棕榈酸、3-甲基吡嗪、邻苯二甲酸二丁酯、苯乙酮,这些物质在对照组中的含量很低或没有。具有果香气的癸醛、己酸叶醇酯及青草香的正己醇、青叶醇在复合酶处理组中含量较高,在其他酶处理组中含量相近;具有茉莉花香的茉莉内酯、紫罗兰香的 β -紫罗兰酮、玫瑰花的香叶醇在复合酶组中含量较高,其次是D₂(β -葡萄糖苷酶)组;橙花叔醇作为高品质乌龙茶的一个重要指标,具有花果香、甜香,在复合酶组中有较高的含量,说明复合酶处理对提高武夷岩茶品质有明显效果。陈茶中特有的具有木香的

雪松醇,在复合酶组中含量较高,其次是D₂(β -葡萄糖苷酶)组。酸类物质在复合酶处理组中也有较多的积累,可能是由于醇类化合物的羟基不稳定,易氧化成醛,进一步氧化成酸,这一现象在红茶的发酵阶段尤为常见^[31]。

第四类包括月桂烯、壬醛、亚油酸甲酯、2-丁基-3,5-二甲基吡嗪、苯甲醇、顺式-3-己烯醇、2-甲基丁酸酯、二苯甲酮、香叶基丙酮、苯乙醇,这些物质在对照组和C₂(漆酶)组中含量较低。其中,具有青草香、甜香的壬醛在A₂(纤维素酶)组中含量较高;具有甜香脂、木香的月桂烯、亚油酸甲酯在C₂(漆酶)组中含量较低,在B₂(果胶酶)和D₂(β -葡萄糖苷酶)组中含量较高;具有花果香的香叶基丙酮在对照组中并没有检测到,而在D₂(β -葡萄糖苷酶)和A₂B₁C₂D₃(复合酶)组中,其含量明显高于其他加酶组。

2.5 酶处理对陈年武夷岩茶香气物质的OAV及感官评分的影响

根据GC-MS检测到的挥发性物质浓度和相关文献报道的气味阈值,计算各成分的OAV值。香气强度值大于1才能达到人体嗅觉感知的强度,因此选取计算后OAV值大于1的挥发性成分共15个,结果见表5。

从表5可以看出,在纤维素酶(A₂)、果胶酶(B₂)、

表5 不同酶处理的香气强度值(OAV>1)

Table 5 Odor activity value for different enzymes treatments (OAV>1)

序号	名称	阈值/(μ g/L)	气味特征	ck	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃
1	橙花叔醇	10.0	花香、果香	39.02	57.52	66.21	71.59	76.98	97.21
2	β -紫罗兰酮	8.4	花香	32.31	49.93	55.93	57.81	61.77	67.10
3	香叶醇	7.5	玫瑰花香、甜香	23.34	38.73	50.75	47.13	54.83	64.99
4	芳樟醇	10.0	花香、甜香	8.73	14.32	17.24	21.81	17.92	14.52
5	雪松醇	0.5	木香	223.75	346.23	356.70	308.52	409.11	469.60
6	吡嗪	40.0	花香	1.94	2.95	3.13	4.08	3.82	3.70
7	己醛	4.5	果香、青香	10.98	16.41	16.76	8.64	7.30	4.81
8	β -环柠檬醛	5.0	果香	7.07	12.05	12.26	13.00	12.36	11.92
9	水杨酸甲酯	40.0	薄荷香、药草香	1.12	1.83	2.01	2.18	2.06	2.21
10	壬醛	1.1	青草香、柠檬香	20.10	25.09	17.16	16.34	18.07	23.62
11	月桂烯	15.0	脂香、木香	0.73	1.19	1.43	ND	0.81	ND
12	2-己烯醛	17.0	青草香、果香	1.02	1.58	1.50	0.95	0.78	0.92
13	青叶醇	13.0	青草香	0.43	0.64	0.87	0.40	0.70	1.54
14	(E,E)-2,4-己二烯醛	10.0	青草香、果香	1.20	1.34	0.82	1.04	0.98	ND
15	香叶基丙酮	60.0	花香、果香	2.14	2.36	2.10	2.76	2.88	2.14
OAV 总值				373.89	572.18	604.86	556.26	670.39	764.28

注:ND表示未检出。

漆酶(C₂)、 β -葡萄糖苷酶(D₂)、复合酶(A₂B₁C₂D₃)的作用下,陈年武夷岩茶的OAV总值从373.89分别增至572.18、604.86、556.26、670.39、764.28,其中,贡献最大的是复合酶,其次是 β -葡萄糖苷酶。

图9为不同酶处理组的感官评分雷达图。

由图9可知,加酶组明显提高了武夷岩茶的花香、甜香、木香,烘烤香有所降低,烘烤香可能被具有花果香的香气物质覆盖。Zhang等^[15]的研究发现, β -葡萄糖

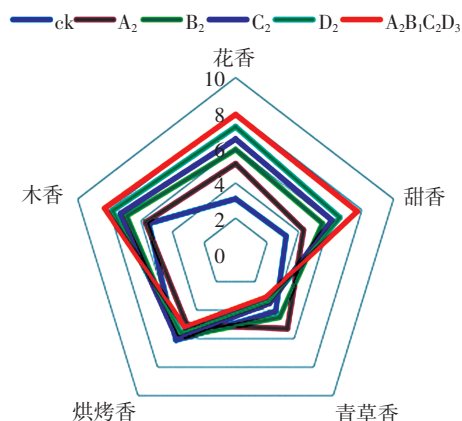


图9 不同酶处理的感官评分雷达图

Fig.9 Radar map of different enzymes treatments

苷酶处理明显提高了花香,削弱了焦糖香;肖世青^[29]研究表明,漆酶和 α -半乳糖苷酶复合处理夏季乌龙茶后,茶叶青气消失,花香显现,这与本文结果相一致。

在 $A_2B_1C_2D_3$ (复合酶)组中,橙花叔醇(OAV 97.21)、 β -紫罗兰酮(OAV 67.10)、香叶醇(OAV 64.99)有着很高的香气强度值,这些物质主要呈现花果香、甜香的香气特征,该结果与感官评价中复合酶组显示出较高的花香、甜香相符合,说明复合酶酶解对提高武夷岩茶的花果香有很大的贡献。 A_2 (纤维素酶)组中,具有青草香、果香的己醛(OAV 16.41)、壬醛(OAV 25.09)、2-己烯醛(OAV 1.58)、(E,E)-2,4-己二烯醛(OAV 1.34)的OAV高于其他酶解组,该结果与感官评分雷达图中 A_2 组具有较高青草香得分的结果相一致。具有木香的雪松醇,由于其阈值较低,OAV呈现较高值,尤其在复合酶组中其含量高达469.60,在感官评价中木香呈现最高分。

3 结论

加入生物酶处理能够明显提高陈年武夷岩茶的香气物质含量,其中复合酶(纤维素酶+果胶+漆酶+ β -葡萄糖苷酶)对武夷岩茶的增香效果最好,而先酸解再进行酶解则不能提高香气物质的种类及含量。纤维素酶、果胶酶、漆酶、 β -葡萄糖苷酶的质量比为2:1:2:3时最有利于香气物质的释放,此时的香气总量为6455.96 $\mu\text{g/L}$,是对照组的2.14倍。

单一酶和复合酶处理对提高醇类、酯类香气物质有较好的效果;对于醛类物质来说,单一酶的增香效果优于复合酶处理;对于酮类物质,单一酶及复合酶处理均能明显提高其含量。感官评价和香气强度值(OAV)的结果表明,武夷岩茶主要呈现花香、甜香、木香,单一酶处理后花香、甜香、木香明显增强,尤其是 β -葡萄糖苷酶的效果最佳,这可能是由于具有花香、甜香的橙花叔醇、香叶醇、芳樟醇、 β -紫罗兰酮及具有木

香的雪松醇等香气物质的OAV明显增大;复合酶处理下,花香、甜香、木香进一步增强,但是青草香降低,主要是由于己醛、2-己烯醛、(E,E)-2,4-己二烯醛的OAV值降低,纤维素酶处理能增强青草香。本研究通过复合酶解技术增强了武夷岩茶花香、甜香、木香的香气属性,为提高陈年低档岩茶的利用率及改良其风味提供参考。

参考文献:

- [1] YANG P, SONG H L, LIN Y P, et al. Differences of characteristic aroma compounds in Rougui tea leaves with different roasting temperatures analyzed by switchable GC-O-MS and GCxGC-O-MS and sensory evaluation[J]. Food & Function, 2021, 12(11): 4797-4807.
- [2] LIU Z B, CHEN F C, SUN J Y, et al. Dynamic changes of volatile and phenolic components during the whole manufacturing process of Wuyi Rock tea (Rougui)[J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130624.
- [3] 张婉婷, 张灵枝, 王登良. 乌龙茶加工工艺对香气成分影响的研究进展[J]. 广东茶业, 2010(S1): 21-27.
- [4] ZHANG Wanting, ZHANG Lingzhi, WANG Dengliang. The effect of oolong tea processing technology on aroma composition[J]. Guangdong Tea, 2010(S1): 21-27.
- [5] GUO X Y, HO C T, WAN X C, et al. Changes of volatile compounds and odor profiles in Wuyi rock tea during processing[J]. Food Chemistry, 2021, 341: 128230.
- [6] ZHU J C, NIU Y W, XIAO Z B. Characterization of the key aroma compounds in Laoshan green teas by application of odour activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry (GC-MS-O) and comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry (GCxGC-qMS)[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 128136.
- [7] 陈荣荣, 王根女, 张献忠, 等. 糖苷酶在茶叶增香及香气形成中的应用研究进展[J]. 香料香精化妆品, 2014(5): 48-52.
- [8] CHEN Rongrong, WANG Gennü, ZHANG Xianzhong, et al. Research progress on application of glucosidase in tea aroma enhancing and formation[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2014(5): 48-52.
- [9] PARAVISINI L, SEPTIER C, MORETTON C, et al. Caramel odor: Contribution of volatile compounds according to their odor qualities to caramel typicality[J]. Food Research International, 2014, 57: 79-88.
- [10] 薄佳慧, 张杨玲, 宫连瑾, 等. 外源酶对改善茶叶品质作用的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(11): 212-217.
- [11] BO Jiahui, ZHANG Yangling, GONG Lianjin, et al. Research progress on exogenous enzymes effect on improving the quality of tea[J]. Food Research and Development, 2021, 42(11): 212-217.
- [12] RIGLING M, LIU Z B, HOFELE M, et al. Aroma and catechin profile and *in vitro* antioxidant activity of green tea infusion as affected by submerged fermentation with *Wolfiporia cocos* (Fu Ling)[J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130065.
- [13] XIAO Y, LI M Y, LIU Y, et al. The effect of *Eurotium cristatum* (MF800948) fermentation on the quality of autumn green tea[J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129848.
- [14] 张良桢. 茶梗发酵黑曲霉胞外酶液对速溶乌龙茶粉的风味影响及蛋白质组学研究[D]. 厦门: 集美大学, 2018.
- [15] ZHANG Liangzhen. Illustrating the effect of *Aspergillus niger* extracellular enzymes on the aroma of instant oolong tea using sensory evaluation, GC-MS and proteomics analysis[D]. Xiamen: Jimei University, 2018.

- [12] 廖凤, 王俊懿, 朱海燕. 外源纤维素酶对江华苦茶红茶品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 38–46.
MIAO Feng, WANG Junyi, ZHU Haiyan. Effects of exogenous cellulase on the quality of black tea of JiangHua–KuCha[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 38–46.
- [13] KINUGASA H, TAKEO T. Deterioration mechanism for tea infusion aroma by retort pasteurization[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(10): 2537–2542.
- [14] SU E Z, XIA T, GAO L P, et al. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage[J]. Food and Bio-products Processing, 2010, 88(2/3): 83–89.
- [15] ZHANG T, FANG K, NI H, et al. Aroma enhancement of instant green tea infusion using β -glucosidase and β -xylosidase[J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126287.
- [16] 林燕萍, 龙乐, 宋焕禄, 等. 贮藏时间对武夷岩茶金锁匙生化成分及感官品质的影响[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(5): 119–126.
LIN Yanping, LONG Le, SONG Huanlu, et al. Effect of storage time on biochemical components and sensory qualities of Wuyi rock tea Jinsuoshi[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(5): 119–126.
- [17] NGUYEN H, CAMPI E M, JACKSON W R, et al. Effect of oxidative deterioration on flavour and aroma components of lemon oil[J]. Food Chemistry, 2009, 112(2): 388–393.
- [18] 蒋青香. 白芽奇兰茶叶关键香气成分的鉴定及其茶粉香气品质的研究[D]. 厦门: 集美大学, 2020.
JIANG Qingxiang. Study on the identification of key aroma compounds of baiyaqilan tea and its instant tea aroma quality[D]. Xiamen: Jimei University, 2020.
- [19] 张婷, 倪辉, 伍菱, 等. 康砖茶叶风味特征及挥发性成分分析[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 215–221.
ZHANG Ting, NI Hui, WU Ling, et al. Analysis of flavor characteristics and volatile compounds of Kangzhuang tea[J]. Food Science, 2020, 41(6): 215–221.
- [20] WANG R, SUN J C, LASSABLIERE B, et al. β -glucosidase activity of *Cyberlindnera (Williopsis) Saturnus* var. mrakii NCYC 2251 and its fermentation effect on green tea aroma compounds[J]. LWT–Food Science and Technology, 2021, 151: 112184.
- [21] 方可, 李婷, 朱艳冰, 等. β -葡萄糖苷酶有效提升速溶乌龙茶粉水溶液的花香、果香及青草香[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 235–242, 125.
FANG Ke, LI Ting, ZHU Yanbing, et al. β -glucosidase effectively improves the floral, fruity and grassy notes of instant oolong tea infusion[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(11): 235–242, 125.
- [22] 刘琳燕, 周子维, 邓慧莉, 等. 不同年份白茶的香气成分[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2015, 44(1): 27–33.
LIU Linyan, ZHOU Ziwei, DENG Huili, et al. Analysis of the aromatic components in white tea produced in different years[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2015, 44(1): 27–33.
- [23] 王飞权. 不同树龄武夷岩茶品质差异形成的机理[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
WANG Feiquan. The formation mechanism of the quality difference of Wuyi rock tea made from different tree ages[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2020.
- [24] 项丽慧, 王丽丽, 陈林, 等. 白茶加工过程中糖苷类香气成分的代谢变化[J]. 茶叶学报, 2021, 62(2): 60–65.
XIANG Lihui, WANG Lili, CHEN Lin, et al. Changes on aromatic glycosides metabolism of white tea during processing[J]. Acta Tea Sinica, 2021, 62(2): 60–65.
- [25] WANG X Q, ZENG L T, LIAO Y Y, et al. An alternative pathway for the formation of aromatic aroma compounds derived from l-phenylalanine via phenylpyruvic acid in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) leaves[J]. Food Chemistry, 2019, 270: 17–24.
- [26] 邵学良, 刘志伟. 纤维素酶的性质及其在食品工业中的应用[J]. 中国食物与营养, 2009, 15(8): 34–36.
SHAO Xueliang, LIU Zhiwei. The properties of cellulase and their application in the food industry[J]. Food and Nutrition in China, 2009, 15(8): 34–36.
- [27] 欧伊伶. 楮叶齐夏秋乌龙茶加工工艺及香味品质形成机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
OU Yiling. Study on the processing technology and quality formation mechanism of zhuyeqi summer oolong tea[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2019.
- [28] 王岁楼, 王琼波. 漆酶在食品工业中的应用及其产生菌的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 260–263.
WANG Suilou, WANG Qiongbao. Application of laccase in the food industry and its producer[J]. Food Science, 2005, 26(2): 260–263.
- [29] 肖世青. 采用外源酶改善安溪铁观音茶香气品质的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
XIAO Shiqing. Application of extrinsic enzymes to improve aroma quality of Anxi tieguanyin[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2011.
- [30] SUPRIYADI S, NARESWARI A R, FITRIANI A, et al. Enhancement of black tea aroma by adding the β -glucosidase enzyme during fermentation on black tea processing[J]. International Journal of Food Science, 2021, 2021: 5542109.
- [31] 赵常锐, 宁井铭, 丁勇, 等. 祁红毛茶初制过程中香气成分变化的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(3): 471–477.
ZHAO Changrui, NING Jingming, DING Yong, et al. Changes of aroma constituents of Qimen raw black tea during processing[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2010, 37(3): 471–477.

加工编辑: 张昱

收稿日期: 2022-01-30