

# 江西狗牯脑红茶加工过程中关键酶活性动态变化分析

侯思同<sup>1</sup> 李东煌<sup>1</sup> 黄衍庭<sup>2</sup> 郭文娟<sup>2</sup> 滕杰<sup>1</sup>

(1. 江西农业大学农学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西遂川县茶产业发展中心, 江西 吉安 343900)

**摘要:** [目的] 探究红茶加工过程中酶活性及结构变化趋势, 分析多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -GC)和蛋白酶的功能表达, 以优化狗牯脑红茶加工工艺。[方法] 以狗牯脑群体种一芽一叶为试验材料, 采用传统加工工艺制成狗牯脑红茶, 测定加工过程中茶样相对褐变度和茶多酚含量, 并分析 PPO、POD、 $\beta$ -GC 和蛋白酶的活性及结构变化趋势, 探究酶功能表达机制。[结果] 红茶加工中相对褐变度增加, 在毛火工序中达到最大, 为 503.21%; 而茶多酚含量下降至 15.4%, 以发酵后降幅最大。PPO、POD 和  $\beta$ -GC 活性呈降低趋势, 而蛋白酶活性呈升—降—升趋势。通过紫外—可见光谱和傅里叶红外变换光谱扫描发现, PPO 在鲜叶和萎凋、揉捻时酶构象发生较大改变; POD 在发酵、毛火和干茶工序时酶结构变化, 特别是发酵时活性显著下降;  $\beta$ -GC 在萎凋、揉捻和干茶时有明显吸收峰, 酶活性不断降低; 蛋白酶在加工中均有特征吸收峰, 酶活性在萎凋时下降, 毛火时上升。而 X-射线衍射光谱表明, PPO、 $\beta$ -GC 和蛋白酶均为非晶态聚合物, POD 三维构象发生改变。[结论] 狗牯脑红茶在加工过程中 PPO、POD、 $\beta$ -GC 和蛋白酶的活性及结构发生显著变化。

**关键词:** 狗牯脑红茶; 多酚氧化酶; 过氧化物酶;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 蛋白酶; 酶活性

## Dynamic changes of main enzyme activities during processing of Jiangxi Gougunao black tea

HOU Sitong<sup>1</sup> LI Donghuang<sup>1</sup> HUANG Yanting<sup>2</sup> GUO Wenjuan<sup>2</sup> TENG Jie<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China;

2. Tea Industry Development Center of Suichuan County, Ji'an, Jiangxi 343900, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the trends in enzyme activity and structural changes during black tea processing, and to analyze the functional expression of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD),  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -GC), and protease, aiming to optimize the processing technology of Gougunao black tea. [Methods] Using one bud and one leaf of the Gougunao population as raw materials, Gougunao black tea was prepared by traditional processing technology. The relative browning degree and tea polyphenol content during processing were measured. The activity and structural changes of PPO, POD,  $\beta$ -GC, and protease were analyzed, and the enzyme functional expression mechanisms were explored. [Results] The relative browning degree increased during black tea processing, reaching a maximum of 503.21% during the first drying stage. Tea polyphenol content decreased to 15.4%, with the largest decline occurring after fermentation. Activities of PPO, POD, and  $\beta$ -GC showed a decreasing trend, whereas protease activity exhibited an increase-decrease-increase pattern. UV-visible and Fourier transform infrared (FTIR) spectra revealed significant conformational changes in PPO during fresh leaves, withering, and rolling. POD's enzyme structure changed during fermentation, first drying, and final drying, with a marked decrease in activity during fermentation. Beta-GC exhibited distinct absorption peaks during withering, rolling, and drying, with a continuous decrease in activity.

**基金项目:** 江西省主要学科科学技术带头人项目(编号: 20232BCJ23052); 江西省自然科学基金项目(编号: 20232BAB215038); 国家自然科学基金项目(编号: 32260791); 江西省吉安市科技计划项目(编号: 20222-191732)

**通信作者:** 滕杰(1988—), 男, 江西农业大学副教授, 博士。E-mail: tengjie@jxau.edu.cn

**收稿日期:** 2025-02-18 **改回日期:** 2025-08-06

**引用格式:** 侯思同, 李东煌, 黄衍庭, 等. 江西狗牯脑红茶加工过程中关键酶活性动态变化分析[J]. 食品与机械, 2025, 41(12): 2-10.

**Citation:** HOU Sitong, LI Donghuang, HUANG Yanting, et al. Dynamic changes of main enzyme activities during processing of Jiangxi Gougunao black tea[J]. Food & Machinery, 2025, 41(12): 2-10.

Protease showed characteristic absorption peaks throughout processing, with activity decreasing during withering and increasing during first drying. X-ray diffraction (XRD) spectra indicated that PPO,  $\beta$ -GC, and protease were amorphous polymers, while POD's three-dimensional conformation changed. [Conclusion] Significant changes occurred in the enzyme activities and structures of PPO, POD,  $\beta$ -GC, and protease during Gougunao black tea processing.

**Keywords:** Gougunao black tea; polyphenol oxidase; peroxidase;  $\beta$ -glucosidase; protease; enzyme activity

茶叶加工过程中酶对其品质的形成具有重要作用,通过不同程度的利用或抑制其酶活性,可以形成色泽、香气和风味品质迥异的不同茶类<sup>[1]</sup>,该过程主要涉及的酶有氧化还原酶类,如多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD),芳香物质合成酶类的 $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -GC)以及水解酶类的蛋白酶等<sup>[2-3]</sup>。红茶作为全发酵茶类,其酶活性变化尤为激烈,PPO在红茶加工过程中可催化多酚类物质的氧化,降低茶叶中儿茶素类含量,生成茶黄素、茶红素和茶褐素等物质<sup>[4]</sup>。茶多酚在红茶加工过程中不断减少,其含量直接影响茶叶褐变度,对茶汤的色泽和口感有积极影响<sup>[5-6]</sup>。同样,在红茶加工过程中,维持POD活性有助于催化过氧化氢存在下黄烷醇类物质的氧化,生成茶黄素、茶红素、茶褐素等茶色素类物质<sup>[7]</sup>。 $\beta$ -GC能够催化茶树糖苷类香气前体的水解反应,生成芳樟醇、 $\beta$ -紫罗醇和橙花叔醇等糖苷态香气前体物质,成为茶叶品质的重要物质基础<sup>[8-9]</sup>。蛋白酶可促进茶叶加工中蛋白质的水解,增加氨基酸含量,从而改善茶叶的香气和滋味,提高茶汤的营养价值和透明度<sup>[10]</sup>,特别在红茶萎凋阶段,蛋白酶水解作用能显著增加总氨基酸含量<sup>[11]</sup>。尽管酶在茶叶加工中发挥重要的作用,但不同酶在茶叶加工中的变化规律及具体变化机制尚不明晰。

狗牯脑茶产于罗霄山脉南麓支脉的江西遂川县,属于国家地理标志产品。作为江西优质绿茶代表,近年来为推动茶产业高质量发展,以传统工夫红茶加工工艺为基础,促进狗牯脑红茶的生产与消费,但现阶段有关狗牯脑红茶加工的相关研究较少。试验拟以遂川狗牯脑群体种的鲜叶为材料,测定其茶加工过程中相对褐变度和茶多酚含量,并检测加工过程中PPO、POD、 $\beta$ -GC和蛋白酶的活性及酶结构的变化趋势,分析酶功能表达机制,为狗牯脑红茶生产加工提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

茶鲜叶:于2024年5月采自江西省吉安市遂川县汤湖镇的狗牯脑群体种,采摘标准为一芽一叶;

甲醇、愈创木酚、碳酸钠、没食子酸、磷酸氢二钠:分析纯,上海金锦乐实业有限公司;

福林酚:分析纯,大连美仑生物技术有限公司;

邻苯二酚:分析纯,上海邦成化工有限公司;

柠檬酸、聚乙烯吡咯烷酮:分析纯,湖北万得化工有

限公司;

L-半胱氨酸、酪蛋白、三氯乙酸:分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司。

### 1.2 仪器与设备

电子分析天平:ATX224型,日本岛津公司;

冷冻离心机:TGL-16G型,上海安亭科学仪器厂;

冷冻干燥机:SCIENIZ-50N型,浙江宁波新芝生物科技股份有限公司;

紫外分光光度计:SG-723PC型,上海光学仪器一厂;

傅里叶变换红外光谱仪:Frontier型,美国珀金埃尔默股份有限公司;

X-射线衍射仪:XRD-6000型,日本岛津公司。

### 1.3 方法

1.3.1 样品预处理 狗牯脑红茶加工工艺分为鲜叶—萎凋(4 h, 30 °C, 湿度 72%~75%)—揉捻(1 h)—发酵(5.5 h, 32 °C, 湿度 95%)—毛火(20 min, 100~130 °C)—干茶(70 min, 105 °C)6个阶段,以各阶段的茶样为材料,茶样经液氮处理后置于-80 °C超低温冰箱保存备用。

1.3.2 褐变度的测定 参照孟一等<sup>[12]</sup>的方法,按式(1)计算相对褐变度。

$$BD = \frac{A_{410\text{处理组}}}{A_{410\text{对照组}}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

BD——相对褐变度,%;

$A_{410\text{处理组}}$ ——茶叶样品处理后的吸光度;

$A_{410\text{对照组}}$ ——未处理对照组的吸光度。

1.3.3 茶多酚含量测定 根据文献<sup>[13]</sup>。

1.3.4 PPO提取及酶活性测定 根据文献<sup>[14]</sup>。

1.3.5 POD提取及酶活性测定 根据文献<sup>[15]</sup>。

1.3.6  $\beta$ -GC提取及酶活性测定

(1)  $\beta$ -GC粗酶液制备:取8 g茶样,加入40 mL 0.1 mol/L pH为6.0的柠檬酸—磷酸缓冲液(含4 g PVPP),4 °C匀浆3 min,4 °C静置2 h,4 °C、10 000×g离心15 min,取上清液即为 $\beta$ -GC粗酶液。

(2)  $\beta$ -GC酶活测定:根据文献<sup>[16]</sup>。酶活以每克样品每分钟E405增加0.01为1个活力单位(U)。

1.3.7 蛋白酶提取及酶活性测定

(1) 蛋白酶粗酶液制备:取8 g茶样,加入40 mL pH为6.0的80 mmol/L磷酸缓冲液(含1 mmol/L EDTA,4 g

PVPP), 4℃匀浆 3 min, 4℃静置 2 h(其间摇动 1 次), 4℃、10 000×g 离心 15 min, 取上清液即为蛋白酶粗酶液。

(2) 蛋白酶活性测定: 根据文献[17]。茶叶蛋白酶活性通过酪蛋白消化单位(CDU)表示, 定义为 37℃下每分钟消耗酪蛋白产生酪氨酸的质量, 按式(2)计算蛋白酶活性。

$$U = \frac{A}{A_s} \times 50 \times \frac{V_1}{t} \times \frac{n}{V_2}, \quad (2)$$

式中:

$U$ ——蛋白酶活性, CDU/mL;

$A$ ——样品和对照品的吸光度差值;

$A_s$ ——酪氨酸吸光度值;

$V_1$ ——总反应体积, mL;

$V_2$ ——样品体积, mL;

$t$ ——反应时间, min;

50——每毫升溶液中所含酪氨酸质量,  $\mu\text{g}$ ;

$n$ ——酶稀释倍数。

1.3.8 三相分离纯化粗酶液 根据文献[18]。

1.3.9 紫外—可见光谱分析 根据文献[19]。

1.3.10 傅里叶红外变换光谱分析 将三相分离纯化后的酶冷冻干燥。分别称取 20 mg 于玛瑙研钵中, 加入 150 mg KBr 并磨成细粉, 压片, 在 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$  范围, 分辨率为 2  $\text{cm}^{-1}$  下扫描 64 次, 并用 KBr 作为空白对照。数据经 Omnic 软件转换后, 采用 Peakfit 对酰胺 I 带(1 700~1 600  $\text{cm}^{-1}$ )进行解卷积和分峰拟合, 并对各归属峰进行二级结构指认<sup>[20]</sup>。

1.3.11 X-衍射光谱分析 将三相分离纯化后的酶冷冻干燥, 分别在玻璃样品槽中压平。X-衍射扫描参数: 管压 40 kV, Cu K 射线( $\lambda_1=1.540 6 \text{ \AA}$ ,  $\lambda_2=1.544 4 \text{ \AA}$ ), 扫描速度 2 ( $^\circ$ )/min, 扫描范围  $2\theta$  为  $3^\circ\sim 80^\circ$ <sup>[21]</sup>。

## 1.4 数据处理

每个样品均采用 3 次独立重复试验, 结果用平均值土标准差表示。使用 SPSS 27 软件进行显著性和相关性分析, 字母不同代表差异显著( $P<0.05$ )。采用 Origin 2024 和 WPS Office 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 褐变度

茶叶中的酚类物质与 PPO 氧化反应生成醌类物质, 醌类物质通过自身氧化缩合或与其他物质结合产生黑色或褐色物质, 导致褐变<sup>[22]</sup>。红茶加工过程中茶样和茶汤颜色如图 1 所示。

由图 2 可知, 红茶加工过程中的相对褐变度呈增加趋势, 且鲜叶、萎凋、揉捻、发酵和毛火处理间差异显著。鲜叶中的相对褐变度与其他处理相比最低; 在萎凋工序中

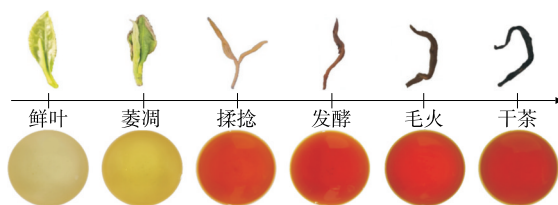


图 1 狗牯脑红茶加工过程中茶样和茶汤颜色

Figure 1 Colors of tea samples and tea soup during processing of Gougunao black tea

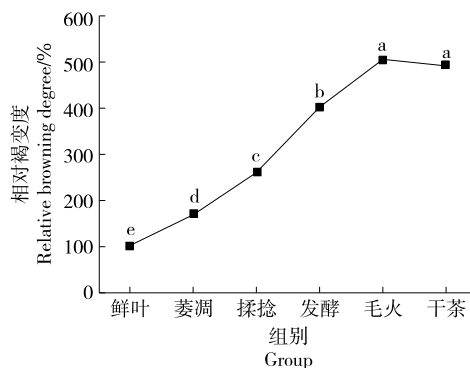


图 2 狗牯脑红茶加工过程中相对褐变度变化

Figure 2 Changes in relative browning degree during Gougunao black tea processing

PPO 与酚类物质进一步发生酶促褐变; 经过揉捻相对褐变度达到 261.39%; 在发酵工序后相对褐变度显著增加; 在毛火和干茶中达到较高的水平, 分别为 503.21% 和 492.77%。

### 2.2 茶多酚含量

茶多酚能够帮助茶树抵御外界环境的侵害, 同时也是茶叶品质形成的关键因素之一<sup>[23]</sup>。由图 3 可知, 在红茶加工过程中, 由于茶多酚在 PPO、POD 等酶类的作用下发生酶促氧化, 茶多酚含量逐渐降低, 鲜叶中含量最高, 为 23.37%; 经萎凋后茶多酚含量降至鲜叶的 11%; 萎凋和揉捻工序中茶样的茶多酚含量差异不显著; 发酵后茶多酚含量进一步下降, 降幅为揉捻叶的 19%; 发酵、毛火和干燥工序中茶多酚含量无显著差异, 干茶的茶多酚含量最低, 为 15.4%。茶多酚含量变化趋势与图 2 相对褐变度发生交联关系, 茶多酚含量经过发酵工序后降幅最大, 表明该工序能显著降低茶多酚含量, 降低红茶的涩味, 提高茶叶品质。

### 2.3 PPO、POD、 $\beta$ -GC 和蛋白酶活性的动态变化

由图 4(a) 可知, PPO 活性在红茶加工过程中呈降低趋势。鲜叶经过萎凋后 PPO 活性降低了 27% ( $P<0.05$ ), 可能是因为萎凋导致酶  $\text{Cu}^{2+}$  结合区域受到影响, 二级结构发生改变<sup>[24]</sup>。在进行揉捻时, 由于叶片细胞破损致使

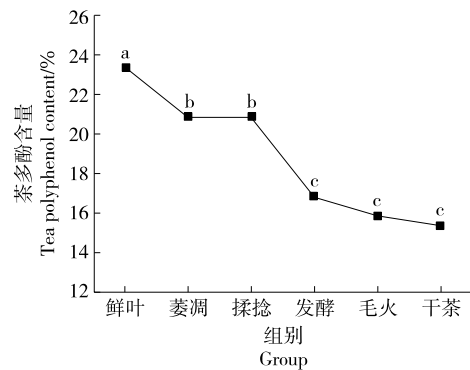


图3 狗牯脑红茶加工过程中茶多酚含量变化

Figure 3 Changes in content of tea polyphenol during Gougunao black tea processing

PPO 活性下降,与萎凋后的酶活相比降低了 59% ( $P < 0.05$ );揉捻和发酵过程后 PPO 活性无显著变化;毛火后的酶活性与发酵后的相比降低了 81% ( $P < 0.05$ );干茶 PPO 活性为 13.6 U,是因为高温干燥导致酶活性丧失,终止了酶促氧化反应。

由图 4(b)可知,红茶的 POD 活性在萎凋后下降,但变化不显著;经过揉捻后有上升趋势,但 POD 活性在萎凋和揉捻后变化均不显著。发酵后 POD 活性为 8 105.81 U,随后酶活性显著降低 ( $P < 0.05$ ),毛火后 POD 活性为

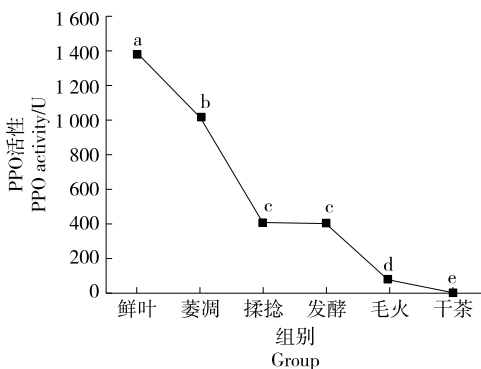
104.16 U,其活性在发酵后降幅最大。结合图 3 可知,茶多酚含量与 POD 活性呈正相关性,但在发酵中由于多酚类物质与酶结合形成不溶性复合物,导致 POD 活性受到抑制<sup>[25]</sup>。

由图 4(c)可知,红茶中  $\beta$ -GC 活性随加工的进行呈逐渐降低趋势,且各工序间的酶活性均存在显著差异。在萎凋阶段, $\beta$ -GC 活性较鲜叶降低了 44%,可能是萎凋叶的含水量较少,酶活受到抑制,与杨杰等<sup>[26]</sup>的研究结果相似;揉捻使细胞破损,底物与酶充分反应后酶活进一步降低,与萎凋相比降幅达 46%;经过发酵后  $\beta$ -GC 活性较揉捻工序降低了 32%;毛火后酶活性比发酵降低了 67%,直至干茶中  $\beta$ -GC 酶活性完全失活。

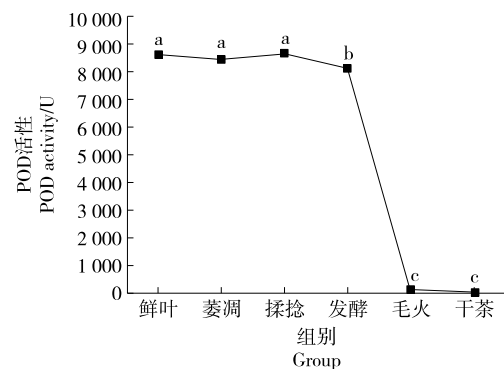
蛋白酶是一种可分解蛋白质,释放出小肽分子或游离氨基酸的蛋白水解酶<sup>[27]</sup>。由图 4(d)可知,鲜叶的蛋白酶活性为 409.62 U,萎凋后酶活增加至 498.29 U,是整个加工过程中酶活性的最高点,与鲜叶的酶活相比增幅达 22%,而经揉捻工序后蛋白酶活性呈下降趋势,相比萎凋时降幅达 40%;经过发酵工序后酶活持续下降,直至毛火后酶活受到抑制,蛋白酶活性达到加工过程的最低点 (145.41 U)。

## 2.4 紫外—可见光谱分析

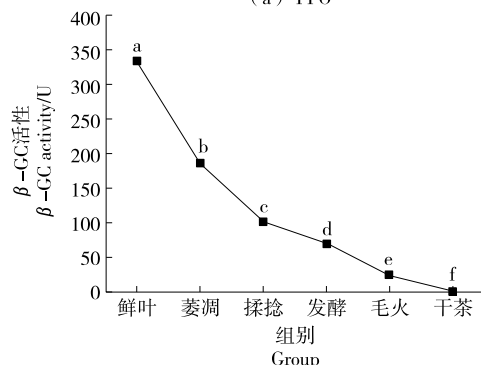
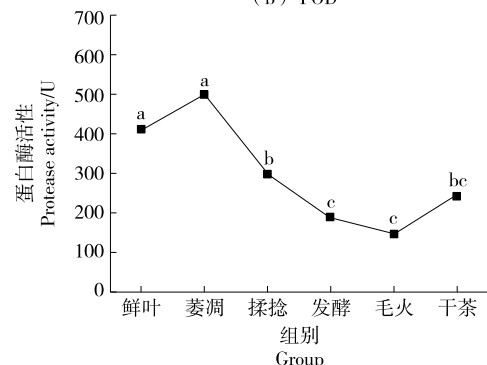
PPO、POD、 $\beta$ -GC 和蛋白酶的功能表达与酶蛋白结构



(a) PPO



(b) POD

(c)  $\beta$ -GC

(d) 蛋白酶

图4 狗牯脑红茶加工过程中PPO、POD、 $\beta$ -GC和蛋白酶的活性动态变化Figure 4 Dynamic changes of PPO, POD,  $\beta$ -GC, and protease enzyme activities during Gougunao black tea processing



密切相关。通过对酶构象的 UV-Vis 扫描,判断酶功能发挥情况,进而判断酶活性<sup>[28]</sup>。PPO 通常先以无活性的前体形式存在,  $\text{Cu}^{2+}$  结合区是该酶的主要功能区,其他部分则对酶的构象、高级结构的形成和维持起作用<sup>[29]</sup>。由图 5(a)可知, PPO 在 250~350 nm 时有明显的特征吸收峰, 发酵、毛火和成品工序的紫外吸光度和峰形基本一致,可能是 PPO 在此阶段活性受到抑制或失去活性。在鲜叶、萎凋、揉捻工序中, PPO 的峰位发生了明显变化,且紫外吸光度明显高于发酵、毛火和干茶阶段。这可能与 PPO 在鲜叶、萎凋和揉捻过程中三级结构发生改变有关。PPO 的结构中通常包含色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸 3 种芳香族氨基酸残基。在茶叶加工过程中, PPO 功能结构及其活性中心微环境受到这些氨基酸残基的显著影响,导致酶活性改变,从而调控茶叶中多酚类物质的氧化反应,促进茶色素类物质形成,最终对红茶的色泽、香气和滋味等品质特征起到关键作用。

由图 5(b)可知, POD 在 250~350 nm 时,鲜叶的紫外吸光度最高且峰形最明显;其次是萎凋工序;揉捻、发酵和成品工序的紫外吸光度和峰形基本一致但吸收峰不明显,光谱图图像趋于平滑的曲线。鲜叶的 POD 活性与其他加工过程相比最高。

由图 5(c)可知,  $\beta$ -GC 在 250~350 nm 时,鲜叶的紫外

吸光度最高,萎凋工序有明显的吸收峰;但揉捻、发酵、毛火工序和干茶中紫外吸光度存在负值,猜测样品可能受到试验对象和加工工艺等因素的影响。

由图 5(d)可知,在 250~350 nm 时,蛋白酶在红茶加工工序中都有明显的吸收峰。鲜叶和萎凋工序的紫外吸光度和峰形基本一致,其紫外吸光度与其他加工工序相比较;发酵、毛火和成品工序的紫外吸光度和峰形相似,但紫外吸光度较低,揉捻工序的紫外吸光度介于两者之间,主要是由于酶蛋白分子发生折叠时蛋白表面生色基团的减少引起蛋白紫外吸光度降低<sup>[30]</sup>,随着酶蛋白结构的改变,酶活性中心位点被掩蔽或暴露,从而导致酶活性的增强或减弱,与红茶品质形成紧密相关。

## 2.5 傅里叶红外变换光谱分析

傅里叶变换红外光谱属于分子振动光谱不受其他物质干扰,可用来分析多肽和蛋白质的二级结构含量<sup>[31]</sup>。由图 6(a)可知, PPO 在揉捻时与其他工序相比峰形变化较大。以揉捻叶为例, PPO 在  $3\,430$ ,  $1\,612.5$ ,  $512.5\text{ cm}^{-1}$  处变化较大,在  $3\,430\text{ cm}^{-1}$  处吸收峰展宽可能是 O—H 的拉伸振动引起,表明羟基(—OH)基团的微环境或氢键网络发生了改变,影响酶活性的大小;在  $1\,612.5\text{ cm}^{-1}$  处出现吸收峰可能是酶结构的双键伸缩振动;  $512.5\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰可能是 PPO 的双键伸缩振动。根据各个加工工序

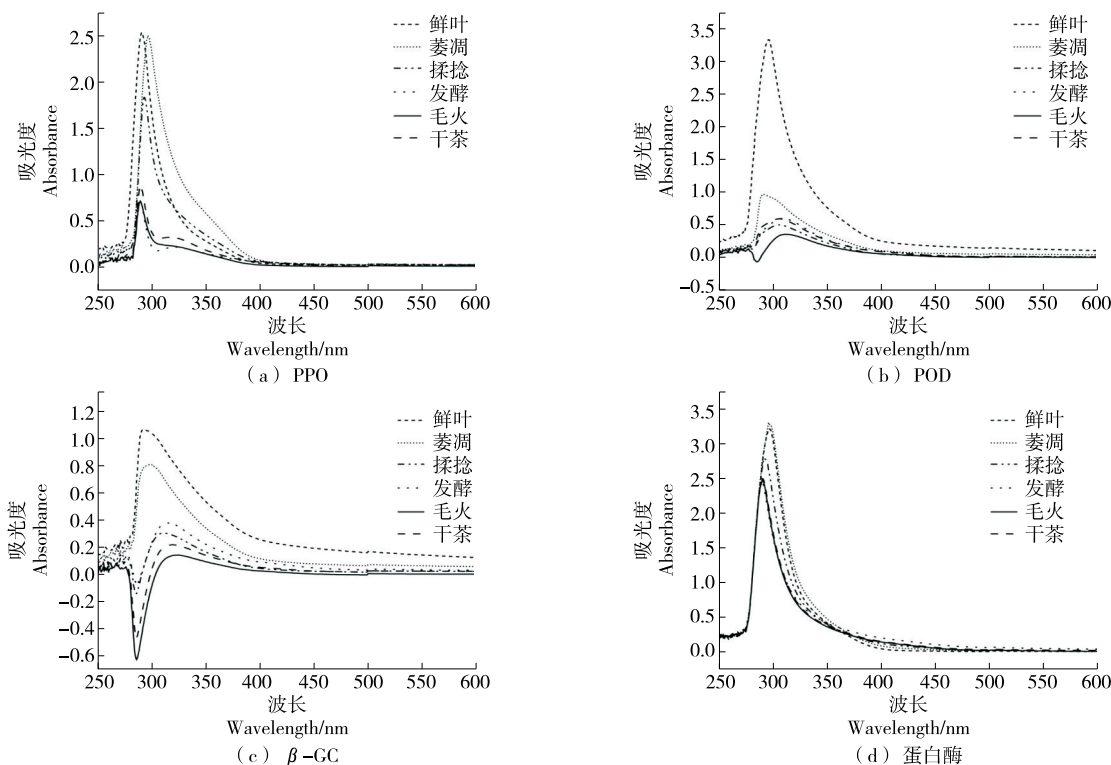


图 5 狗牯脑红茶加工过程中 PPO、POD、 $\beta$ -GC 和蛋白酶的紫外—可见光谱

Figure 5 UV-Vis spectrum of PPO, POD,  $\beta$ -GC, and protease during Gougunao black tea processing

中峰形的变化趋势以揉捻过程中PPO的峰形变化较大。

由图6(b)可知,POD的特征吸收峰约位于 $3\ 420$ 、 $1\ 650$ 、 $1\ 050$ 、 $512\text{ cm}^{-1}$ 处。 $3\ 420\text{ cm}^{-1}$ 处强而宽的峰对应O—H的拉伸振动,表明POD中存在较多的羟基;但揉捻和萎凋工序的峰形与其他工序相比变得较缓,可能是羟基发生改变而抑制酶活性。 $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 处出现窄峰表明POD内部的双键伸缩振动模式简单,能量较集中。 $1\ 200\sim 1\ 500\text{ cm}^{-1}$ 处出现了较多的吸收峰,一般归属于单键的伸缩振动和弯曲振动。 $500\text{ cm}^{-1}$ 附近出现的吸收峰与C—H伸缩振动有关,在此波数下鲜叶、萎凋和揉捻中的吸收峰较弱,特别是发酵阶段,由于儿茶素的氧化作用和介质酸化导致pH值改变,使酶活性显著下降,与黄怀生等<sup>[32]</sup>的研究结论相吻合。因此,POD的二级结构受到红茶不同加工工序的影响,这些变化能够导致POD活性位点的构象改变,调控茶叶中多酚类物质的转化,直接影响茶叶的生化品质特征,特别是在发酵、毛火和干茶阶段表现明显。

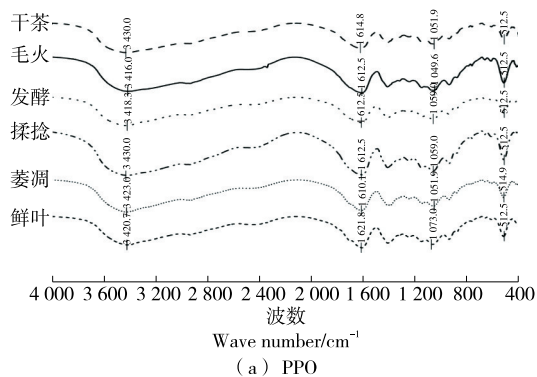
由图7(c)可知,以揉捻为例, $\beta$ -GC特征吸收峰分别位于 $3\ 420.7$ 、 $1\ 610.1$ 、 $510.2\text{ cm}^{-1}$ 处。在揉捻工序中, $\beta$ -GC在 $3\ 420.7\text{ cm}^{-1}$ 处存在强的宽峰,在 $510.2\text{ cm}^{-1}$ 处存在窄峰,表明揉捻中 $\beta$ -GC活性较其他加工工序高;干茶中 $\beta$ -GC的峰形与揉捻工序相似度较高,鲜叶、萎凋、发酵

和毛火工序的红外光谱峰形变缓,可能是 $\beta$ -GC受到羟基分子的影响,也有可能是芳香环受到影响,从而使酶活发生变化。因此,在揉捻和干茶中有利于 $\beta$ -GC水解茶叶内含成分,在一定程度上加快了酶促反应进而影响红茶发酵。

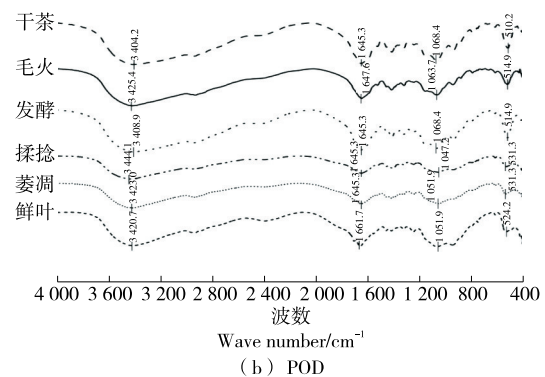
由图6(d)可知,蛋白酶在约 $3\ 423$ 、 $1\ 635$ 、 $1\ 044$ 、 $514\text{ cm}^{-1}$ 处出现特征吸收峰。与鲜叶相比, $3\ 423\text{ cm}^{-1}$ 处蛋白酶的吸收峰在萎凋时展宽,在揉捻时峰形变缓,在发酵时峰形变窄,毛火时峰形发生变化,干茶时出现宽峰,表明蛋白酶的羟基结构在红茶不同加工工序中发生改变,尤其在萎凋工序中蛋白酶的活性最高。在各加工工序中指纹区出现多处吸收峰且存在差别,这与蛋白酶的单键伸缩振动和基团的弯曲振动有关<sup>[33]</sup>。因此,蛋白酶在红茶加工中起着重要作用,在萎凋时蛋白酶催化蛋白质和多肽水解使得酶活变化更加明显,反映了蛋白质二级结构的转变,进而影响酶的催化效率,与茶叶的品质形成具有内在联系。

## 2.6 X-衍射光谱分析

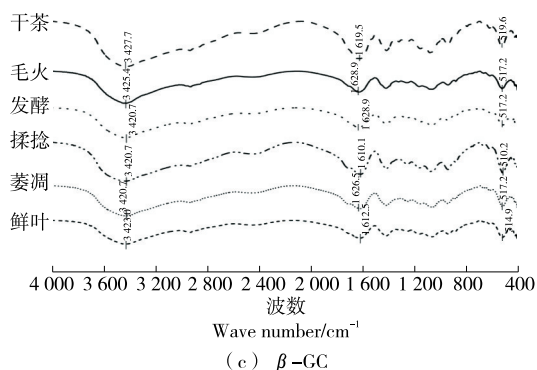
X-射线衍射光谱通过分析衍射结果可获得晶体结构信息,是研究物质结构的主要手段<sup>[34]</sup>。由图7(a)可知,PPO在衍射峰为 $20^\circ$ 时,鲜叶、萎凋、毛火和干茶工序中表现出宽峰,而在揉捻和发酵工序后强度明显降低,这与



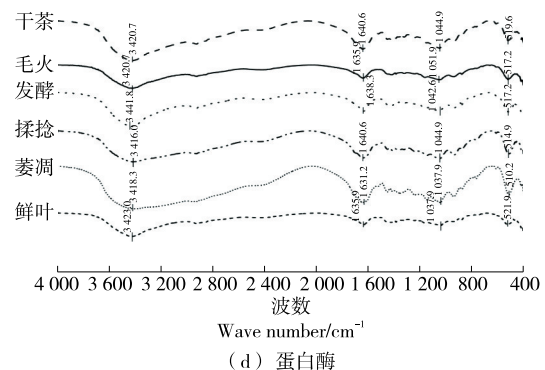
(a) PPO

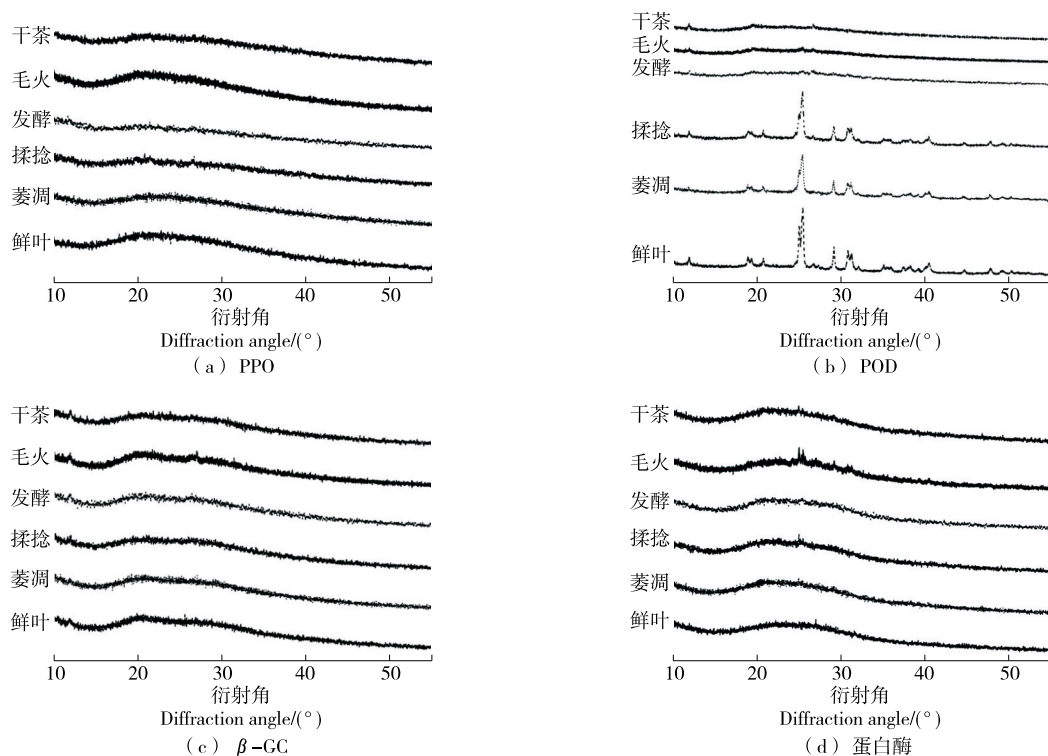


(b) POD



(c)  $\beta$ -GC



图 7 狗牯脑红茶加工过程中 PPO、POD、 $\beta$ -GC 和蛋白酶的 X-衍射光谱图Figure 7 XRD spectra of PPO, POD,  $\beta$ -GC, and protease during Gougunao black tea processing

PPO 在此过程中二级结构可能发生变化有关,从而影响了 PPO 活性。由图 7(b)可知,POD 在鲜叶、萎凋、揉捻时出现典型的 A 型晶体结构,其尖锐的衍射峰分别位于  $11^\circ$ 、 $19^\circ$ 、 $25^\circ$ 、 $30^\circ$ 、 $35^\circ$ 、 $40^\circ$  左右,表明 POD 在鲜叶中和受到机械作用时,其三级结构均具有较高的结构稳定性,然而加工过程中的温度剧变导致 POD 活性中心位点的微环境变化影响其酶活性,对茶叶品质形成发挥调控作用。而在发酵、毛火、干茶工序后衍射峰消失或者强度明显减弱,表明发酵、毛火、干茶阶段促进晶体结构的转变,POD 的三维构象可能在此处理下受到影响,直接影响 POD 活性。同样,由图 7(c)和图 7(d)可知, $\beta$ -GC 和蛋白酶的 X-衍射光谱图在衍射峰为  $20^\circ$  左右时均呈平缓且宽阔的“面包状”,并未出现较强的衍射峰。表明  $\beta$ -GC 和蛋白酶的三维结构没有发生改变,但峰强度出现了变化,酶的催化效率也会发生变化。

### 3 结论

对狗牯脑红茶加工过程中主要酶活性变化进行了分析。结果表明,相对褐变度在干茶中达到最大,并与茶多酚含量呈负相关。在红茶加工过程中多酚氧化酶、过氧化物酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性随红茶加工呈降低趋势;蛋白酶活性表现为先升后降再升趋势。紫外—可见光谱和傅里叶红外光谱显示,多酚氧化酶在鲜叶、萎凋和揉捻

工序时酶构象发生明显改变;过氧化物酶在发酵、毛火和干茶过程中酶结构发生了显著变化; $\beta$ -葡萄糖苷酶在鲜叶、萎凋、揉捻和干茶阶段有明显吸收峰;蛋白酶在红茶的加工过程中均有吸收峰,在整个红茶加工过程中扮演关键角色。X-衍射光谱表明,多酚氧化酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和蛋白酶均为非晶态聚合物,过氧化物酶的三维构象在加工过程中发生了改变。综合认为多酚氧化酶、过氧化物酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和蛋白酶的活性发生改变的原因在于红茶加工过程中酶的衍射峰的强弱发生变化,酶蛋白的二维和三维构象受到破坏。后续仍需深入探讨茶叶加工过程中酶活性变化的分子机制。

### 参考文献

- [1] ZHANG G Y, YANG J H, CUI D D, et al. Transcriptome and metabolic profiling unveiled roles of peroxidases in theaflavin production in black tea processing and determination of tea processing suitability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(11): 3 528-3 538.
  - [2] 王利晖, 贾智彤, 李好, 等. 外源酶添加对茶叶品质形成的研究进展[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2023(4): 23-26.
- WANG L H, JIA Z T, LI H, et al. Research progress of exogenous enzyme on tea quality formation[J]. Newsletter of Sericulture and Tea, 2023(4): 23-26.

- [3] 宫连瑾, 薄佳慧, 张天天, 等. 黄金茶红茶加工过程中香气成分及其相关酶活性的动态变化[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(6): 204-209.  
GONG L J, BO J H, ZHANG T T, et al. Dynamic changes of aroma components and related enzyme activities during Huangjincha black tea processing[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(6): 204-209.
- [4] 林星辰. 茶叶中多酚氧化酶的性质及其在茶叶加工中的作用[J]. 福建茶叶, 2024, 46(9): 32-34.  
LIN X C. Properties of polyphenol oxidase in tea and its role in tea processing[J]. Tea in Fujian, 2024, 46(9): 32-34.
- [5] 吴玲玲, 梁光志, 冯红钰, 等. 花香型金萱红茶加工过程中主要理化成分动态变化[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(4): 74-80.  
WU L L, LIANG G Z, FENG H Y, et al. Dynamic changes of main components in flowery Jinxuan black tea during processing[J]. Food Research and Development, 2024, 45(4): 74-80.
- [6] 崔宏春, 张建勇, 赵芸, 等. 发酵条件对红茶茶色素形成的影响研究进展[J]. 食品与机械, 2022, 38(8): 227-233.  
CUI H C, ZHANG J Y, ZHAO Y, et al. Research progress on the influence of black tea fermentation conditions on the tea pigment formation[J]. Food & Machinery, 2022, 38(8): 227-233.
- [7] 常君怡, 周志梅, 杜邵龙. 茶黄素制备的研究进展[J]. 中国农业通报, 2024, 40(30): 135-140.  
CHANG J Y, ZHOU Z M, DU S L, et al. Theaflavin production: a review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2024, 40(30): 135-140.
- [8] LIANG S, WANG F, GRANATO D, et al. Effect of  $\beta$ -glucosidase on the aroma of liquid-fermented black tea juice as an ingredient for tea-based beverages[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134201.
- [9] SUPRIYADI S, NARESWARI A R, FITRIANI A, et al. Enhancement of black tea aroma by adding the  $\beta$ -glucosidase enzyme during fermentation on black tea processing[J]. International Journal of Food Science, 2021, 2 021(1): 5542109.
- [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.  
BO J H, ZHANG Y L, GONG L J, et al. Research progress on exogenous enzymes effect on improving the quality of tea[J]. Food Research and Development, 2021, 42(11): 212-217.
- [11] YU P H, HUANG H, ZHAO X, et al. Dynamic variation of amino acid content during black tea processing: a review[J]. Food Reviews International, 2023, 39(7): 3 970-3 983.
- [12] 孟一, 张玉华, 陈东杰. 超声联合紫外处理对鲜切山药的保鲜作用[J]. 保鲜与加工, 2024, 24(12): 18-24.  
MENG Y, ZHANG Y H, CHEN D J. Preservation effects of ultrasound combined with ultraviolet treatments on fresh-cut yams[J]. Storage and Process, 2024, 24(12): 18-24.
- [13] 朱柏雨, 夏陈, 罗棵瀛, 等. 四川黑茶活性成分、抗氧化能力及品质评价[J]. 食品与机械, 2021, 37(8): 24-32.  
ZHU B Y, XIA C, LUO K B, et al. Active components, antioxidant capacity and quality evaluation of Sichuan dark tea [J]. Food & Machinery, 2021, 37(8): 24-32.
- [14] 袁斌, 周诗雨, 刘昌伟, 等. 多酚氧化酶的提取工艺与活性测定研究[J]. 茶叶通讯, 2020, 47(2): 291-296.  
YUAN B, ZHOU S Y, LIU C W, et al. Study on extraction process and activity determination of polyphenol oxidase[J]. Tea Communication, 2020, 47(2): 291-296.
- [15] LIU Y, WANG H F, XU Y Q, et al. Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents for the purification of tea peroxidase using a three-phase partition method[J]. LWT-Food Science and Technology, 2025, 218: 117528.
- [16] AKILE Ç, DINÇER A, AYDEMİR T. Characterization of  $\beta$ -glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWCNTS) and their application on tea extracts for aroma enhancement[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 406-414.
- [17] REN H R, WANG T L, LIU R. Correlation analyses of amylase and protease activities and physicochemical properties of wheat bran during solid-state fermentation[J]. Foods, 2024, 13(24): 3 998.
- [18] LIU Y, CHEN Q C, LIU D C, et al. Comparison of the biochemical properties and enzymatic synthesis of theaflavins by soluble and membrane-bound polyphenol oxidases from tea (*Camellia sinensis*) leaves[J]. Food Science and Technology, 2022, 42: e117321.
- [19] FANG S X, RUAN G R, HAO J, et al. Characterization and antioxidant properties of Manchurian walnut meal hydrolysates after calcium chelation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 130: 109632.
- [20] ZHANG F R, ZHENG J, LI Z Y, et al. Purification, characterization, and self-assembly of the polysaccharide from *Allium schoenoprasum*[J]. Foods, 2021, 10(6): 1 352.
- [21] 黄文睿, 唐超凡, 陶雨峰, 等. 绿色低碳共熔溶剂提取野菊花中黄酮类化合物[J]. 精细化工, 2022, 39(3): 569-576.  
HUANG W R, TANG C F, TAO Y F, et al. Extraction of flavonoids from *Chrysanthemum indicum* L. by green deep eutectic solvents[J]. Fine Chemicals, 2022, 39(3): 569-576.
- [22] 王洁, 何瑜琳, 滕建文, 等. 六堡茶渥堆过程中产多酚氧化酶菌株的筛选及多酚氧化酶的分离纯化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 130-137.  
WANG J, HE Y L, TENG J W, et al. Screening of producing polyphenol oxidase strains from the fermentation process of Liupao tea and purification of polyphenol oxidase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(5): 130-137.
- [23] 陈志云, 李杰, 冯雨, 等. 茶多酚生物活性及作用机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 333-341.  
CHEN Z Y, LI J, FENG Y, et al. Research progress on



- bioactivity and mechanism of tea polyphenols[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 333-341.
- [24] 姚玉仙, 张明泽, 刘丽萍, 等. 都匀毛尖茶多酚氧化酶粗酶的酶学性质[J]. 广州化工, 2020, 48(13): 39-41.
- YAO Y, ZHANG M Z, LIU L P, et al. Enzymatic characterization of crude polyphenol oxidase in fresh leaves of Duyun Maojian[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2020, 48(13): 39-41.
- [25] 王远利, 康心蕊, 陶亮, 等. 蛋白质与多酚的互作机制及其应用[J]. 中国食品学报, 2024, 24(2): 357-372.
- WANG Y L, KANG X R, TAO L, et al. The interaction mechanism between protein and polyphenol and its application[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(2): 357-372.
- [26] 杨杰, 张绍绒, 张琦, 等. 萎凋叶含水量对南川大树茶红茶品质的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(3): 54-69.
- YANG J, ZHANG Z R, ZHANG Q, et al. Effects of the water content in withered leaves on the quality of camellia Nanchuanica black tea[J]. Journal of Southwest University (Natural Science), 2024, 46(3): 54-69.
- [27] 杨丽娟, 王伟伟, 许勇泉, 等. 外源酶在红茶加工中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(7): 344-351.
- YANG L J, WANG W W, XU Y Q, et al. Progress of exogenous enzymes application in black tea processing[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(7): 344-351.
- [28] 王珂雯, 廖小军, 徐贞贞. 多酚-蛋白质相互作用分析技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 371-379.
- WANG K W, LIAO X J, XU Z Z. Advances in analytical techniques of polyphenol-protein interaction[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 371-379.
- [29] 邹纯, 尹军峰. 多酚氧化酶的性质及其在茶叶加工中的研究进展[J]. 中国茶叶, 2021, 43(6): 1-6.
- ZOU C, YIN J F. The properties of polyphenol oxidase and its research progress in tea processing[J]. China Tea, 2021, 43(6): 1-6.
- [30] 王晨, 马艳秋, 张梓湘, 等. 不同处理方法对蛋清蛋白免疫原性及结构的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(15): 93-100.
- WANG C, MA Y Q, ZHANG Z X, et al. Effects of different processing methods on the immunogenicity and structure of egg white protein[J]. Food Science, 2022, 43(15): 93-100.
- [31] 韩彦辉, 钟靖涵, 孙雪, 等. 远红外辐射对山药多酚氧化酶活性及构象的影响[J]. 食品与机械, 2023, 39(5): 132-138.
- HAN Y H, ZHONG J H, SUN X, et al. Effects of far-infrared radiation on activity and conformation of polyphenol oxidase of yam[J]. Food & Machinery, 2023, 39(5): 132-138.
- [32] 黄怀生, 黎娜, 钟兴刚, 等. 自然发酵工夫红茶品质形成与儿茶素氧化动力学分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(8): 164-169.
- HUANG H S, LI N, ZHONG X G, et al. Analysis of quality formation and catechin oxidation kinetics of congou black tea through natural fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(8): 164-169.
- [33] SHUKLA U. Fourier transform infrared spectroscopy: a powerful method for creating fingerprint of molecules of nanomaterials[J]. Journal of Molecular Structure, 2025, 1 322: 140454.
- [34] 扈健, 王梦梵, 吴婧华. X射线晶体结构解析技术在高分子表征研究中的应用[J]. 高分子学报, 2021, 52(10): 1 390-1 405.
- HU J, WANG M F, WU J H. X-ray diffraction methodology for crystal structure analysis in characterization of polymer[J]. Acta Polymerica Sinica, 2021, 52(10): 1 390-1 405.