

龙井茶树多酚氧化酶蛋白提取方法的优化

许雷, 张书芹, 徐小云, 陈盛虎, 姚燕妮, 黄友谊*

(园艺植物生物学教育部重点实验室, 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘要: **目的** 优化缓冲液匀浆提取茶树多酚氧化酶的方法。 **方法** 以龙井43号茶树鲜叶为材料, 采用缓冲液匀浆浸提法提取茶树多酚氧化酶, 分别进行不同单因素浸提优化试验, 测定比较提取的粗酶活性, 确定适合的浸提条件。 **结果** 以鲜叶标准为一芽二叶, 料液比1:2, 加入内含5% PVP(w:v)、经预冷的pH5.6柠檬酸-磷酸盐缓冲液(0.15 mol/L), 海砂适量, 冰浴研磨, 4℃条件下隔夜浸提12 h, 于4℃、9000 r/min离心35 min, 取上清液, 为龙井43号鲜叶中多酚氧化酶缓冲液成浆浸提的最优条件。 **结论** 采用优化的浸提条件, 可以制备得到高活性多酚氧化酶粗酶液, 为茶树多酚氧化酶同工酶分离与酶性质研究提供了基础。

关键词: 龙井43号; 多酚氧化酶; 提取; 同工酶

Optimization of the extraction method of polyphenol oxidase from *Camellia sinensis* var. Longjing

XU Lei, ZHANG Shu-Qin, XU Xiao-Yun, CHEN Sheng-Hu, YAO Yan-Ni, HUANG You-Yi*

(Ministry of Education Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction method of the tea polyphenol oxidase in buffer solution homogenate. **Methods** Polyphenol oxidase from fresh leaves of Longjing 43 was extracted by buffer homogenate method. Different single extraction factors were tested, and the extracted crude enzyme activity was measured and compared to determine the appropriate extraction conditions. **Results** The fresh leaves were of a bud with two leaves, solid (tea leaf)-liquid (extraction buffer) ratio was 1:2, and the pre-cooling citrate-phosphate buffer (pH 5.6, 0.15 mol/L) containing 5% PVP (w:v) was added, a small amount of sea sand was added, and tea leaves were ground in ice bath and extracted overnight about 12 h at 4℃. The extracted buffer was centrifuged for 35 min with 9000 r/min at 4℃, and the supernatant was obtained. **Conclusion** High activity of crude polyphenol oxidase solution can be prepared using the optimized extraction conditions, which benefits to the isolation and purification and the analysis of enzymatic properties for isozyme of tea polyphenol oxidase.

KEY WORDS: *Camellia sinensis* var. Longjing No. 43; polyphenol oxidase; extraction; isozyme

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(2012ZYTS038)、国家自然科学基金项目(31270731)

Fund: Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2012ZYTS038) and the National Natural Science Foundation of China (31270731)

*通讯作者: 黄友谊, 博士, 副教授, 主要研究方向为茶叶生物技术。E-mail: youyi@mail.hzau.edu.cn

*Corresponding author: HUANG You-Yi, Associate Professor, No.1, Shizishan Street, Wuhan 430070, China. E-mail: youyi@mail.hzau.edu.cn

1 引言

茶树多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO, EC 1.10.3.1)是茶树栽培生理与制茶过程中极为重要的功能酶之一,在红茶发酵和乌龙茶半发酵中具有重要作用,也是茶树抗逆重要功能酶,一直是人们关注的热点^[1-3]。当前对茶树 PPO 粗酶的酶性质、同工酶谱带变化等方面研究较多^[1-14],然而针对茶树 PPO 的提取方法却研究不多^[1,3,15-20]。因茶叶富含茶多酚,导致从茶树鲜叶中提取酶蛋白困难;常规的都是使用丙酮粉法来提取 PPO,但该方法并不适合于茶树 PPO 同工酶的提取^[15,16,19,20]。李立祥等发现缓冲液浸提法优于缓冲液匀浆法和丙酮粉法^[16,19],已有对缓冲液匀浆提取条件优化的报道^[17,18],但至今未见对缓冲液匀浆浸提法提取条件的优化报道^[15-19]。当前对茶树 PPO 的研究一直停留在粗酶水平,而无法深入到单一同工酶的水平,就在于酶蛋白的提取、分离纯化等方面存在瓶颈,迫切需要不断去优化^[1-14]。为此,本研究开展了龙井 43 号茶树 PPO 的单一因素提取试验,优化提取条件,以促进茶树 PPO 的研究与利用。

2 材料与方法

2.1 试验材料

茶树鲜叶采摘于华中农业大学茶学专业教学基地的龙井 43 号茶树(*Camellia sinensis* var. Longjing No. 43),鲜叶规格为一芽二叶,采摘时间为春季,于-80℃超低温冰箱保存备用。聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)、交联聚乙烯吡咯烷酮(又称交联聚维酮, cross-linking polyvinyl pyrrolidone, PVPP)、 β -巯基乙醇、甲醛、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、尿素等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

2.2 茶树 PPO 的不同因素提取试验

本试验采用缓冲液匀浆浸提法^[16,19]进行龙井 43 号茶树 PPO 粗酶的提取条件优化。称取茶鲜叶 3 份,每份 3 g,以 1:2(w:v)的料液比,加入内含茶多酚去除剂、经预冷的柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 5.6, 0.05 mol/L),海砂适量,冰浴研磨,于 4℃隔夜浸提 12 h,于 4℃、9000 r/min 离心 35 min,取上清液,过滤制得粗酶液,测定 PPO 酶活性,分析比较不同处理提取茶树 PPO 的效果。

不同单因素浸提条件分别设置为: 1)添加茶多酚

去除剂: 加入 5%(w:v)PVP、5%(w:v)PVPP 和不加去除剂; 2)PVP 不同添加量: 1%、2%、5%、7%(w:v); 3)不同料液比: 1:1、1:2、1:3、1:4(w:v); 4)不同浸提时间: 3、6、12、18 h; 5)鲜叶嫩度: 芽、第一二叶、第三叶和成熟叶; 6)浸提缓冲液 pH: 5.2、5.6、6.0、6.4、6.8、7.2、7.6。分别依序采用不同因素条件来提取茶树 PPO,后续的试验依次采用前面试验得出的最佳条件来处理,此外其他条件统一按照上面的操作条件进行。

2.3 茶树 PPO 同工酶电泳方法

茶树 PPO 同工酶进行非变性凝胶不连续垂直板电泳,比较同工酶谱带。电泳浓缩胶浓度为 4%,分离胶浓度为 7.5%,每孔上样量为 20 μ L。预电压为稳压 50 V,当溴酚蓝指示剂进入分离胶后将电压调至稳压 110 V,冰浴条件下进行电泳。结束电泳后,将凝胶置于染色液(60 mL 1%邻苯二酚, 20 mL 0.6g/L 对苯二胺, 20 mL pH 7.2、0.05 mol/L 磷酸缓冲液)中,室温染色 30 min 后,蛋白胶用蒸馏水冲洗、浸泡至 PPO 同工酶带清晰为止。

2.4 茶树 PPO 活性测定方法

根据《茶学实验技术》(黄意欢主编)和刘敬卫的酶活性测定方法^[12],经过改进进行 PPO 酶活性测定。具体步骤如下:用移液枪取 10 μ L PPO 酶液加入酶标板,再加入 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 50 μ L 和 75 μ L 反应混合液,在 37℃条件下反应 30 min,即刻加入 50 μ L 的 6 mol/L 尿素溶液终止反应,然后利用酶标仪在 460 nm 波长处测其吸光值,对照组选用煮沸 5~10 min 的 PPO 酶液来代替待测样品^[12]。

反应混合液配制方法:按 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液:0.1%脯氨酸:1%邻苯二酚 = 10:2:3(v:v:v)的比例配制,现配现用。在本试验测定条件下,将以邻苯二酚为底物的反应液的吸光值每分钟增加 0.001 定义为 1 个酶活力单位(U)。

2.5 数据处理方法

所有试验均重复 3 次,所得的数据用 excel 表格统计计算。

3 结果与分析

3.1 添加剂对茶树 PPO 提取的影响

因茶叶中含有高含量的茶多酚,在进行酶蛋白提取时,需尽可能地减少茶多酚的干扰,需加入其他

去除茶多酚的成分, 为此比较了当前提取茶叶酶蛋白常用的茶多酚去除物质 PVP、PVPP 对 PPO 提取活性的影响。从图 1 可知, 添加 PVP 的 PPO 活性显著提高, 是对照的近 7 倍; 而添加 PVPP, 活性还略微低于对照, 可能是 PVPP 不溶于水, 导致在缓冲液匀浆浸提中保护作用不明显。因此, 在提取茶树鲜叶 PPO 蛋白时, 以添加 PVP 为好, 这与已有的报道都采用 PVP 是一致的^[16-18]。

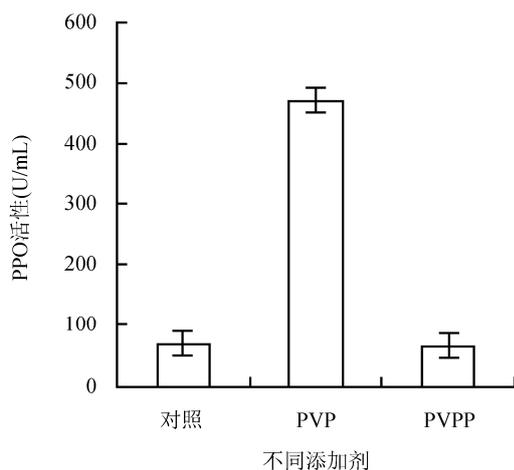


图 1 添加不同提取剂提取的茶树 PPO 活性

Fig. 1 PPO activity extracted by adding different additives

3.2 PVP 添加量对茶树 PPO 提取的影响

在确定采用 PVP 作为去除茶多酚的添加剂后, 分别比较了不同添加量对 PPO 活性的影响。从图 2 可见, 随着 PVP 添加量的增加 PPO 活性也增加, 至 PVP 添加量为 5% 时 PPO 活性达到最大值, 然后随 PVP 添加量的增加 PPO 活性开始呈下降趋势。由此可见, PVP 在龙井 43 号茶树 PPO 蛋白提取时, 适宜添加量以 5% 为好, 该结果与图 1 是一致的。

3.3 料液比对茶树 PPO 提取的影响

料液比过高或者过低均会影响 PPO 的提取, 为此进行了不同料液比提取的茶树 PPO 活性比较。从图 3 可知, 随着料液比的增加, 茶树 PPO 单位酶活力单位整体都显著提高。尽管料液比为 1:4 时总酶活大于料液比为 1:2 时总酶活, 但单位酶活力相对更低, 而且提取液体积偏大, 增加了分离纯化过程中的负担。为此综合考虑, 选择以 1:2 的料液比来提取龙井

43 号茶树 PPO 蛋白。王丽霞等^[17]选择的是 1:1 的料液比, 刘琨等^[18]选择的是 1:4.52 的料液比, 造成这种差异, 可能与不同材料中 PPO 同工酶的存在形式、含量以及其他浸提条件不同等有关。

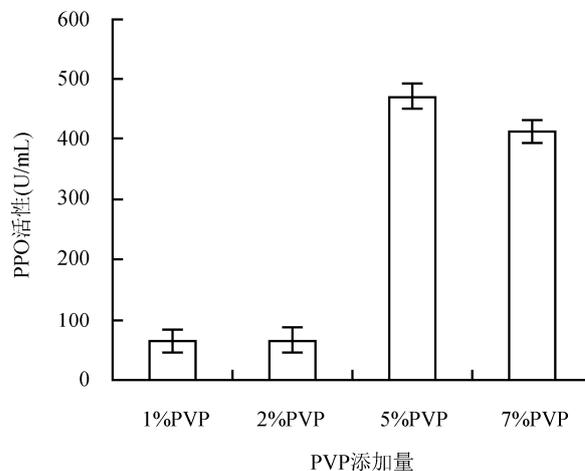


图 2 添加不同量 PVP 提取的茶树 PPO 活性

Fig. 2 PPO activity extracted by adding different amount of PVP

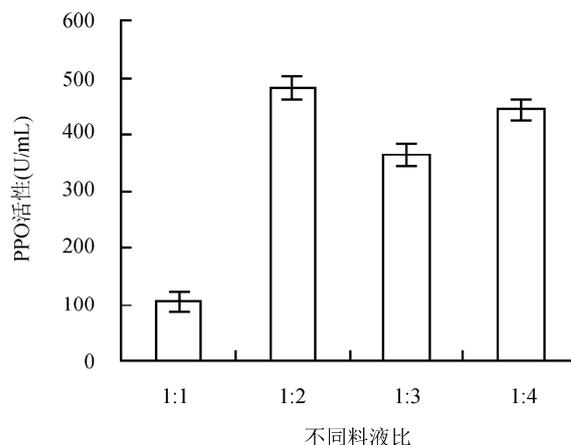


图 3 不同料液比提取的茶树 PPO 活性

Fig. 3 PPO activity extracted by different solid-liquid ratio

3.4 浸提时间对茶树 PPO 提取的影响

浸提时间会影响 PPO 的浸出量, 对提取活性也会有直接的影响, 为此比较了不同浸提时间的茶树 PPO 活性。从图 4 可见, 随着浸提时间的增加, 龙井 43 号茶树 PPO 活性逐渐增加, 12 h 后 PPO 活性基本不变, 表明浸提 12 h 后 PPO 蛋白基本浸提完全, 而浸提 12 h 的酶活比浸提 6 h 的高 12%, 为此选择浸提 12 h 为宜, 这与李立祥的报道一致^[19]。

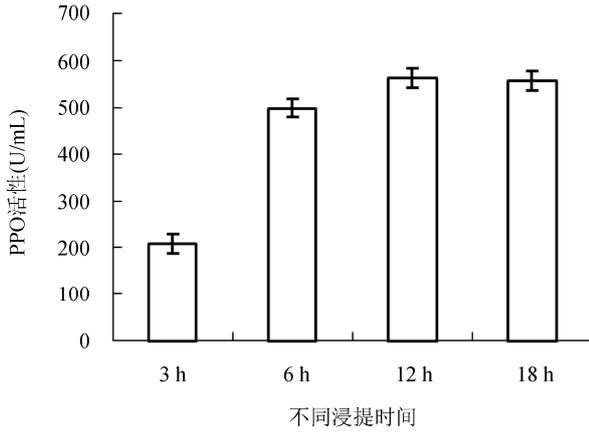


图 4 不同浸提时间提取的茶树 PPO 活性
Fig. 4 PPO activity extracted by different time

3.5 不同鲜叶嫩度对茶树 PPO 提取的影响

对不同嫩度原料中 PPO 酶活性进行了分析。从图 5 可知, 随成熟度的增加龙井 43 号茶树 PPO 酶活性显著增加, 但成熟度过高活性显著下降。以第三叶中 PPO 酶活性最高, 是芽中 PPO 酶活性的 2 倍多, 是成熟叶中的 3 倍多。以往一般认为随鲜叶嫩度的增加 PPO 活性增加, 但这里却发现龙井 43 号茶树 PPO 活性在一定条件下是随鲜叶成熟度的增加而增加, 导致这种差异的原因可能是 PPO 提取方法不同造成的, 过去主要采用的是丙酮粉法^[19]。在试验中, 因第三叶的叶片大, 有一定的成熟度, 手工研碎时难度大, 为此依然是以一芽二叶为原料。

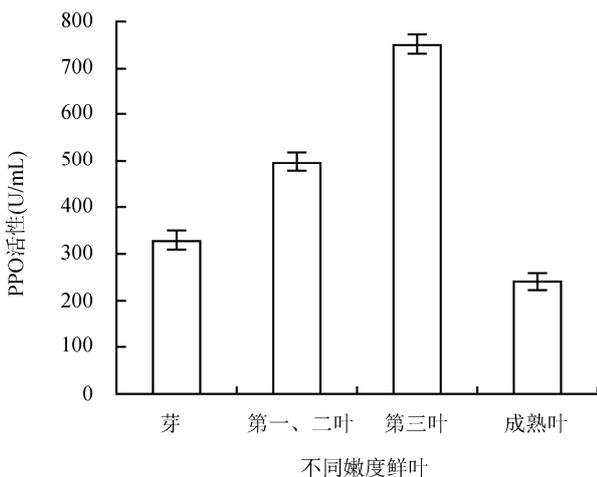


图 5 不同嫩度鲜叶提取的茶树 PPO 活性
Fig. 5 PPO activity extracted from different tenderness of leaves

3.6 浸提缓冲液 pH 值对茶树 PPO 提取的影响

浸提缓冲液 pH 值决定了酶蛋白带电荷的情况, 直接影响 PPO 蛋白的浸出与酶活性的大小。从图 6 可知, 龙井 43 号茶树 PPO 呈现有两个最适浸提 pH 值, 分别为 5.6、7.2, 尤以 pH 7.2 的活性更高, 约比 pH 5.6 浸提的高 35%。这与刘琨等^[18]在提取 PPO 时也在 pH 5.6、pH 7 左右出现 2 个峰值一致, 有区别的是刘琨提取的 pH 7 左右的峰值小于 pH 5.6 左右的值。而王丽霞等^[17]在提取黄豆 PPO 时仅有一个峰值, 约在 pH 6.5 处。为进一步了解浸提缓冲液 pH 值对 PPO 提取的影响, 对不同 pH 值缓冲液浸提的龙井 43 号茶树 PPO 同工酶进行了分析。从图 7 可知, 在酸碱两种 pH 值条件下龙井 43 号茶树 PPO 同工酶谱带有明显差异, 意味着以不同 pH 值进行浸提, 会导致浸出 PPO 同工酶的种类、数量与活性产生明显差异。

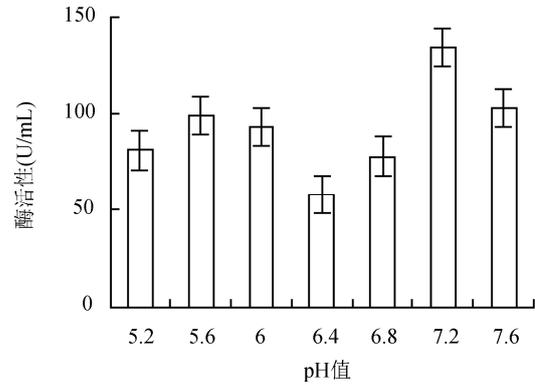


图 6 不同 pH 值缓冲液提取的茶树 PPO 活性
Fig. 6 PPO activity extracted by different pH values

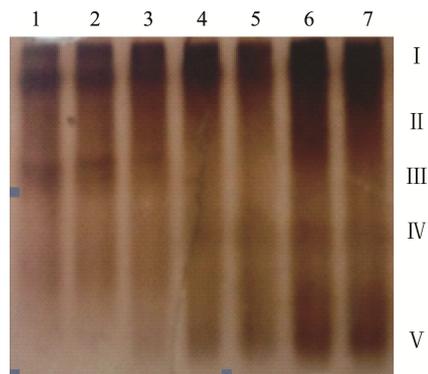


图 7 不同 pH 提取的茶树 PPO 非变性电泳图
Fig. 7 Non-denaturing electrophoresis of PPO activity extracted by different pH values
注: 1-7 分别是 pH 为 5.2、5.6、6.0、6.4、6.8、7.2、7.6 的浸提缓冲液

Notes: 1-7 are pH 5.2, 5.6, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, and 7.6 of extraction buffer, respectively.

4 讨论

须海荣等^[20]的试验表明常用的冷丙酮法提取茶树 PPO 时,使酶谱分不开,且活性低。李立祥等^[19]分析比较了不同缓冲液匀浆法及其浸提法、丙酮粉法提取茶树 PPO 时,发现以柠檬酸盐缓冲液匀浆浸提法提取效果最好,但丙酮粉法的单位酶活性最高。王丽霞等^[17]以磷酸盐缓冲液匀浆法优化了料液比、pH、离心转速与时间等茶树 PPO 提取条件,刘琨等^[18]利用响应面法优化了磷酸盐缓冲液提取茶树 PPO 的料液比、pH、PVP 添加量条件,而本试验优化了柠檬酸-磷酸盐缓冲液匀浆浸提条件。在试验中有以下两方面要特别注意:

4.1 去除 PPO 添加剂的选择

茶叶富含茶多酚,而茶多酚物质具有螯合蛋白质和抑制酶活性等作用。要保证提取 PPO 的效果,去除茶多酚是必须的步骤。当前在富含多酚类成分的材料中提取蛋白时,常用 PVP、PVPP 作为多酚类物质去除剂,在茶叶 PPO 提取也如此。本研究得出以添加 PVP 的效果显著好于添加 PVPP, PVP 以 5%(w:v) 添加量最佳;该添加量,区别于李大祥^[16]的 10%(w:v)、刘琨等^[18]的 0.16%(w:v)。从图 2 和已有的文献报道可见, PVP 不同添加量对茶树 PPO 活性会有显著的影响,而不同试验中得到的 PVP 最适使用量不一致。除不同试验的提取条件有所不同外,这很可能是与不同鲜叶材料中茶多酚的含量不一相关,茶树鲜叶中茶多酚的含量是变化的。因此在不同品种、不同季节以及不同鲜叶标准为原料进行提取 PPO 时,都非常有必要进行 PVP 添加量的优化,以确保获得最佳提取效果。

4.2 浸提缓冲液 pH 对茶树 PPO 的影响

当前已知茶树 PPO 在体内存在游离态和束缚态两类,不同的提取方法因提取出不同存在形式的 PPO 而导致酶活性和 PPO 同工酶谱产生差异^[1,21]。已有研究证实丙酮粉法所得的为 PPO 总酶活性,匀浆法所得的为 PPO 可溶性酶活性,而以匀浆浸提法最有利于提取茶树 PPO^[1,19,21]。在不同 pH 值缓冲液下,浸提的茶树 PPO 活性有明显差异,长期都是以 pH 5.6 的缓冲液来浸提茶树 PPO 和测定其活性^[1,21]。然而,已有的研究表明茶树 PPO 在一定的 pH 值范围内,会存在有 2 个酶活性峰值^[18]。本研究也发现在龙井

43 号茶树 PPO 也具有两个最适浸提 pH 值,尤以 pH7.2 更适合(图 6)。但目前还无人进一步分析不同浸提缓冲液 pH 值对茶树 PPO 同工酶的影响,为此我们分析了不同 pH 下的 PPO 同工酶谱带。从不同 PPO 同工酶谱带(图 7)可以看出,不同 pH 值缓冲液中浸提出不同种类、不同活性的 PPO 同工酶,这对分离纯化茶树 PPO 同工酶将有着最直接的影响。在本试验中,测定酶活性均是以邻苯二酚为底物、缓冲液 pH 为 5.6,然而不同 PPO 同工酶的最适底物和最适反应 pH 都会有所不同的,因此,如以相同的条件进行浸提和测定,则非常容易产生差异。但目前对茶树中 PPO 不同同工酶存在的形式、酶学特性等都不清楚,反而突出了开展茶树 PPO 同工酶研究的重要,也表明 PPO 酶蛋白的浸提是十分关键的一步。

参考文献

- [1] 滕杰,丰金玉,熊硕,等. 茶叶多酚氧化酶及其同工酶的研究进展[J]. 茶叶通讯, 2014, 41(2): 10-13.
Teng J, Feng JY, Xiong S, *et al.* Research progress on polyphenol oxidase and its isozyme of tea [J]. Tea Comm, 2014, 41(2): 10-13.
- [2] Altunkaya A. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from turkish tea leaf (*Camellia sinensis* L.) [J]. Int J Food Prop, 2014, 17: 1490-1497.
- [3] 赵淑娟,王坤波,傅冬和,等. 茶多酚氧化酶酶学性质研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2008, 34(1): 84-86.
Zhao SJ, Wang KB, Fu DH, *et al.* Study on the enzymological feature of polyphenol oxidase from tea [J]. J Hunan Agric Univ (Nat Sci), 2008, 34(1): 84-86.
- [4] 孙慕芳,张洁,郭桂义. 白毫早鲜叶茶多酚氧化酶酶学特性[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(6): 140-143.
Sun MF, Zhang J, Guo GY. Features of polyphenol oxidase in baihaozao fresh tea leaves [J]. Guizhou Agric Sci, 2014, 42(6): 140-143.
- [5] 叶飞,高士伟,郑鹏程,等. 利用砂梨多酚氧化酶减少夏秋红茶苦涩味研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(24): 5685-5689, 5699.
Ye F, Gao SW, Zheng PC, *et al.* Bitterness and astringency in summer and autumn black tea decreased by exogenous polyphenol oxidase [J]. Hubei Agric Sci, 2012, 51(24): 5685-5689, 5699.
- [6] 肖伟祥. 茶叶中多酚氧化酶及其同工酶的研究概况[J]. 茶叶科学简报, 1979, (4): 9-10.

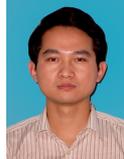
- Xiao WX. Overview on tea polyphenol oxidase and its isozyme [J]. *Tea Sci Bull*, 1979, (4): 9–10.
- [7] 叶庆生. 红茶萎凋发酵中多酚氧化酶、过氧化物酶同工酶的活动性变化与儿茶素、茶黄素组分的消长[J]. *安徽农学院学报*, 1986, (2): 19–29.
- Ye QS. Activity changes of polyphenol oxidase and peroxidase isoenzyme, and decline of catechins and theaflavins components during the withering and fermentation of black tea [J]. *J Anhui Agric Univ*, 1986, (2): 19–29.
- [8] 刘仲华, 施兆鹏. 红茶制造中多酚氧化酶同工酶谱与活性的变化[J]. *茶叶科学*, 1989, 9(2): 141–150.
- Liu ZH, Shi ZP. Variation in isozymes and activities of polyphenol oxidase during black tea manufacturing [J]. *J Tea Sci*, 1989, 9(2): 141–150.
- [9] 唐茜. 蜀永系列茶树品种多酚氧化酶的等电聚焦研究[J]. *四川农业大学学报*, 1997, 15(2): 159–162.
- Tang Q. Study on the polyphenol oxidase isoenzymes of shuyong types varieties of tea plants by isoelectric focusing [J]. *J Sichuan Agric Univ*, 1989, 9(2): 141–150.
- [10] 李斌, 陈忠正, 黎秋华, 等. 茶叶、板栗、柿子中几个酶基因的克隆[C]. *中国食品科学技术学会*, 2005, 广州.
- Li B, Chen ZZ, Li QH, *et al.* Cloning the genes of several enzymes from tea, chestnut, and persimmon [C]. *Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2005, Guangzhou.
- [11] 黄建安, 黄意欢, 罗军武, 等. 茶树多酚氧化酶基因的 SNP 分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2007, 33(4): 454–458, 485.
- Huang JA, Huang YH, Luo JW, *et al.* Identification of single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Polyphenol Oxidase gene in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *J Hunan Agric Univ (Nat Sci)*, 2007, 33(4): 454–458, 485.
- [12] 刘敬卫, 黄友谊, 丁建, 等. 茶树多酚氧化酶成熟蛋白的原核表达[J]. *茶叶科学*, 2010, 30(2): 136–140.
- Liu JW, Huang YY, Ding J, *et al.* Prokaryotic expression of polyphenol oxidase mature protein from *Camellia sinensis* [J]. *J Tea Sci*, 2010, 30(2): 136–140.
- [13] Liu JW, Huang YY, Ding J, *et al.* Prokaryotic expression and purification of *Camellia sinensis* polyphenol oxidase [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90: 2490–2494.
- [14] Wu YL, Pan LP, Yu SL, *et al.* Cloning, microbial expression and structure-activity relationship of polyphenol oxidases from *Camellia sinensis* [J]. *J Biotech*, 2010, 145: 66–72.
- [15] 禹利君, 杨伟丽. 茶树及红茶加工中 PPO 和 POD 的研究进展[J]. *湖南农业大学学报*, 1999, 25(5): 420–424.
- Yu LJ, Yang WL. Research development about polyphenol oxidase and peroxidase in *Camellia sinensis* and black tea processing [J]. *J Hunan Agric Univ*, 1999, 25(5): 420–424.
- [16] 李大祥. 茶多酚氧化酶的分离提纯及固定化技术[J]. *福建茶叶*, 2000, (1): 10–11.
- Li DX. Separation and purification, and immobilization techniques of polyphenol oxidase from *Camellia sinensis* [J]. *Fujian Tea*, 2000, (1): 10–11.
- [17] 王丽霞, 黄文成, 林启训, 等. 磷酸盐缓冲液法提取茶叶多酚氧化酶的工艺研究[J]. *淮阴师范学院学报(自然科学版)*, 2009, 8(2): 166–168, 172.
- Wang LX, Huang WC, Lin QX, *et al.* Research on extraction of polyphenol oxidase from fresh tea with phosphate buffer [J]. *J Huaiyin Teach College (Nat Sci Edit)*, 2009, 8(2): 166–168, 172.
- [18] 刘琨, 钱和, 汪何雅. 茶叶中多酚氧化酶提取的响应面优化[J]. *食品科技*, 2013, 38(1): 206–210.
- Liu K, Qian H, Wang HY. Optimization of extraction on polyphenol oxidase from green tea via response surface methodology [J]. *Food Sci Tech*, 2013, 38(1): 206–210.
- [19] 李立祥, 吴红梅. 提取方法对茶多酚氧化酶活性的影响[J]. *中国茶叶加工*, 2001, (4): 26–31.
- Li LX, Wu HM. Effects of extraction method on the activity of tea polyphenol oxidase [J]. *Chin Tea Proc*, 2001, (4): 26–31.
- [20] 须海荣, 童启庆. 关于茶叶酶液提取和茶树同工酶谱资料的处理与分析[J]. *福建茶叶*, 1988, (2): 19–21.
- Xu HR, Tong QQ. Data processing and analysis of tea isozymogram and tea enzyme extraction [J]. *Fujian Tea*, 1988, (2): 19–21.
- [21] 陈东生, 王坤波, 黄建安, 等. 茶树多酚氧化酶研究进展[J]. *茶叶通讯*, 2012, (2): 17–21.
- Chen DS, Wang KB, Huang JA, *et al.* Progress on polyphenol oxidase from *Camellia sinensis* [J]. *Tea Comm*, 2012, (2): 17–21.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



许雷, 硕士研究生, 主要研究方向为茶叶生物技术。
E-mail: 305321309@qq.com



黄友谊, 博士, 副教授, 主要研究方向为茶叶生物技术。
E-mail: youyi@mail.hzau.edu.cn