基于绿茶加工副产物的茶黄素酶法合成工艺优化研究

李佳[1,2]，毛立科[1,2]，何涛[2,3]，魏矗巍[4]，车会莲[1,2,3,*]

（1．四川成都中农大现代农业产业研究院，成都　611430；2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院，北京 100083；3. 国家市场监督管理总局重点实验室（食品营养与健康评价技术），北京　100083；4. 贵州逅唐茶业生物科技有限公司，遵义　563100）

摘要：茶黄素因其生理活性在医药和功能性食品领域备受关注。本研究对茶黄素的酶促合成进行了工艺优化，并利用大孔树脂对其进行纯化。通过单因素和响应面分析确定茶黄素的最佳酶促合成条件：50 mL 茶汤添加 40 mL 酶液，29 ℃反应 26 min，茶黄素合成量达（173.63±1.69）μg/mL，儿茶素转化率 92.18%，合成率 14.02%，相当于每克绿茶粉生成 15.6 mg 茶黄素。粗茶黄素粉纯度为（30.23%±2.09）%。XAD−16N 树脂动态吸附参数：上样流速 5 mL/min、质量浓度 5 mg/mL，解吸梯度为 3 BV 水、6 BV 30% 乙醇和 6 BV 60% 乙醇，纯化后茶黄素纯度提升 2.92 倍。该研究为茶黄素的酶法合成与树脂纯化提供了技术支持。

关键词：茶黄素；酶促合成；大孔树脂；纯化

中图分类号：TS202.3　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1006−2513（2025）11−0059−0010

doi：10.19804/j.issn1006−2513.2025.11.008

Optimization of the enzymatic synthesis of theaflavins using by−products from green tea processing

LI Jia[1,2]，MAO Like[1,2]，HE Tao[2,3]，WEI Chuwei[4]，CHE Huilian[1,2,3,*]

（1. China Agricultural University−Sichuan Chengdu Advanced Agricultural & Industrial Institute，Chengdu　611430；2. College of Food Science and Nutritional Engineering，China Agricultural University，Beijing　100083；3. Key Laboratory of Food Nutrition and Health Evaluation Technology，State Administration for Market Regulation，Beijing 100083；4. Guizhou Houtang Tea Biotechnology Co. Ltd.，Zunyi　563100）

Abstract：Theaflavins have garnered significant attention in medicine and functional foods due to their physiological activities. In this study，the enzymatic synthesis process of theaflavins was optimized，and the theaflavin product was purified using macroporous resin. Optimal enzymatic synthesis conditions，determined through single−factor experiments and response surface methodology，were as following：reacting 50 mL of tea soup with 40 mL of enzyme solution，at 29 ℃ for 26 min. Under the above conditions，the theaflavin yield reached（173.63±1.69）μg/mL，with

收稿日期：2025−05−07

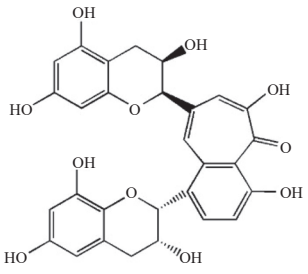
作者简介：李佳（2001−），女，硕士，研究方向：食品添加剂与功能配料。E−mail：lijia207lj@163.com

＊通信作者：车会莲（1977−），女，博士，教授，研究方向：功能食品与营养。E−mail：chehuilian@cau.edu.cn

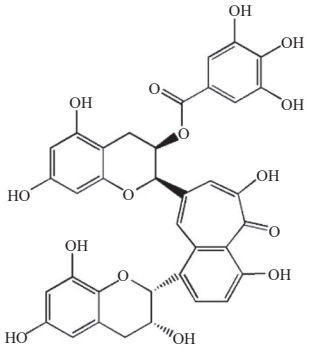
a catechin conversion rate of 92.18% and a synthesis rate of 14.02%, corresponding to 15.6 mg per gram of green tea powder. The purity of crude theaflavin powder was 30.23%±2.09%. For purification, XAD−16N resin was used with a sample loading flow rate of 5 mL/min and a concentration of 5 mg/mL. Desorption was achieved with a gradient of 3 bed volumes (BV) of water, followed by 6 BV of 30% ethanol and 6 BV of 60% ethanol. After purification, the theaflavin purity increased by 2.92 times. This research provides technical support for the enzymatic synthesis and resin−based purification of theaflavins.

Keywords: theaflavins; enzymatic synthesis; macroporous resin; purification

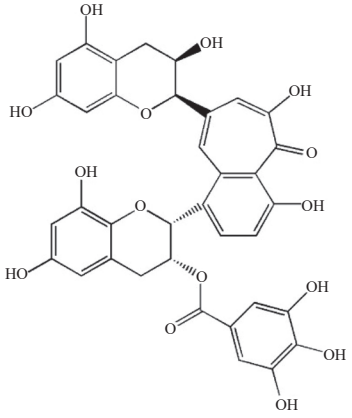
茶黄素（theaflavins，TFs）是一类具有苯骈卓酚酮核心结构的多酚类聚合物统称，其分子由表儿茶素（epicatechin，EC）、表没食子儿茶素（epigallocatechin，ECG）、表没食子儿茶素（epicatechin−3−gallate，EGC）和表没食子儿茶素没食子酸酯（epigallocatechin−3−gallate，EGCG）经多酚氧化酶介导的氧化缩聚反应合成[1]。作为红茶特征功能性成分，TFs 在干茶中的含量通常为 0.3% ~ 1.5%（*W*/*W*）。目前研究已鉴定出 28 种茶黄素结构变体，其中生物活性研究的关注焦点集中于四类典型衍生物，茶黄素 1（theaflavin 1，TF）、茶黄素 −3− 没食子酸酯（theaflavin−3−gallate，TF3G）、茶黄素 −3’− 没食子酸酯（theaflavin−3’−gallate，TF3’G）和茶黄素 −3，3’ 双没食子酸酯（theaflavin−3，3’−gallate，TFDG），其化学结构如图 1 所示[2]。近年来，随着对茶黄素的深入研究，其生物活性、药用价值及其保健功能逐渐被认识和开发。茶黄素具有多种生理功效，如抗氧化、抗癌、抗菌、抗炎、抗病毒、抗心脑血管疾病、抗代谢综合征和抗痛风等[3−8]作用。



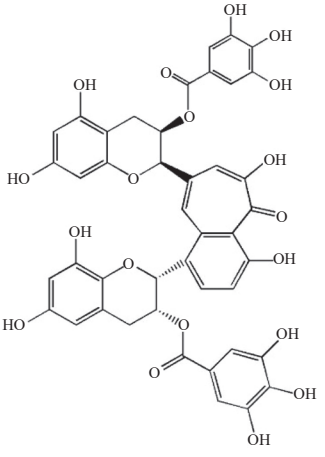
Theaflavin 1



Theaflavin-3-gallate



Theaflavin-3’-gallate



Theaflavin-3,3’-gallate

图 1　茶黄素的化学结构图

Figure 1　Chemical structure of theaflavins

多酚氧化酶（polyphenol oxidase，PPO）是一类含铜的氧化还原酶，广泛分布于细菌、植物和哺乳动物中[9]。酶法合成是利用PPO催化儿茶素氧化来制备TFs，反应机理是PPO在有氧条件下催化氧化儿茶素生成邻醌，儿茶素邻醌再进行氧化缩合反应生成TFs[10]。茶黄素的酶促合成效率受酶源选择、反应时间、反应温度、反应pH等多因素共同调控[11]。植物来源的PPO活性较强，如梨、苹果、香蕉、枇杷、茶叶和马铃薯等，能在体外高效合成茶黄素[12]。Teng等人[13]使用茶来源的纯化PPO同工酶在体外合成了单体TF。Li等人[14]优化最佳反应条件，从而提高了马铃薯来源的PPO合成茶黄素的产量。研究表明，与来自其他植物的PPO相比，来自梨的PPO表现出更好的合成茶黄素的能力。Lei等人[15]使用从梨中固定纯化的PPO将ECG和EGCG合成TF3G。

TFs因其显著的生理活性在医药和功能性食品领域具有广阔的应用前景，但由于红茶中TFs含量极低、提取困难，加之酶催化合成工艺成本高、技术尚未成熟，其开发利用受到严重制约[16]。为解决这一问题，本研究创新性地采用川产低等级绿茶和价格低廉的丰水梨为原料，利用丰水梨中天然存在的多酚氧化酶，将绿茶中的儿茶素高效转化为茶黄素。通过酶法合成工艺，系统考察了加酶量、反应时间和反应温度对TFs合成率的影响，并采用响应面分析法优化工艺参数，最终确定最佳合成条件。最终，利用大孔树脂纯化茶黄素获得较高纯度的茶黄素产品。该研究为低成本、高效制备茶黄素提供了可行性方案，有望推动其在医药保健和功能性食品领域的应用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

绿茶：四川省百岳茶业有限公司惠赠；丰水梨：超市购买；茶黄素、茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯、茶黄素-3，3'-双没食子酸、儿茶素、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素没食子酸酯（均为标准品）：上海源叶生物科技有限公司；一水合柠檬酸、磷酸氢二钠、十二水合物、无水乙醇（均为分析纯）：成都金山化学试剂有限公司；交联聚乙烯基吡咯烷酮：上海麦克林生化科技股份有限公司；L（+）-抗坏血酸、乙二胺四乙酸二钠、二水、三氯甲烷（均为分析纯）：成都市科隆化学品有限公司；冰乙酸（色谱纯）：上海易恩化学技术有限公司；乙腈（色谱纯）：赛默飞世尔科技公司；邻苯二酚（分析纯）：上海麦克林生化科技股份有限公司；超纯水：杭州娃哈哈集团有限公司；乙酸乙酯（分析纯）：天津市津东天正精细化学试剂厂；碳酸氢钠（分析纯）：兰杰柯科技有限公司；5%盐酸溶液、氢氧化钠（均为分析纯）：天津市科密欧化学试剂有限公司；XAD-16N：赛谱锐思科技有限公司。

1.2 主要仪器与设备

LC-40液相色谱仪：日本岛津公司；HH4数显恒温水浴锅：上海力辰邦西仪器科技有限公司；MGL-16MA高速冷冻离心机：上海美瑞克仪器有限公司；BSA124S分析天平：德国赛多斯公司；KQ-400DE数控超声波清洗仪：昆山市超声仪器有限公司；LINGSUM多功能粉碎机：永康市红太阳机电有限公司；UV756紫外可见分光光度计：上海佑科仪器仪表有限公司；RE-2000B旋转蒸发仪：上海亚荣生化仪器厂；ZX-LGJ-1A冷冻干燥机：上海知信实验仪器技术有限公司；Zorbax SB-C18色谱柱（4.6 mm×250 mm×5 μm）：安捷伦科技有限公司；M1-L213B桌面微波炉：广东美的厨房电器制造有限公司；HS5Pro数显式磁力搅拌器：群安科学仪器有限公司；L13-Y91S高速破壁调理机：九阳股份有限公司；CXZ001玻璃层析柱：上海联塔仪器有限公司；NKCP-C蠕动泵：卡川尔流体科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 梨多酚氧化酶的提取

取100 g梨果肉切碎，加入100 mL预冷pH 5.4的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液（含1.00 g PVPP、0.20 g Vc、0.02922 g EDTA），匀浆5 min（3 min+2 min，间隔5 min）。4 ℃浸提12 h后，400目纱布过滤，8000 r/min离心30 min，收集上清液即得PPO提取液。

1.3.2 多酚氧化酶酶活力的测定

取2.5 mL pH 5.4柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲

液，加入 0.5 mL 0.01 mol/L 儿茶酚，25 ℃水浴恒温。加入 0.5 mL 酶液混匀，立即于 420 nm 处测定吸光值变化，每 30 s 记录一次。以活性曲线计算酶活，1 U 定义为 1 min 内吸光值变化 0.001 所需的酶量。

$$酶活\ /U=(\Delta A\times K)/(0.001\times v\times t) \quad (1)$$

式中：K 为稀释倍数；V 为反应酶液体积，mL；t 为反应时间，min。

1.3.3 绿茶浸提液的制备

茶叶碎进行 40 ℃烘干，研磨粉粹，过 80 目筛，置于干燥避光处保存。称取 5.0 g 绿茶粉，加入 250 mL pH 5.4 的柠檬酸－磷酸氢二钠缓冲液，于 90 ℃恒温水浴中浸提，每隔 5 min 搅拌一次，15 min 后纱布过滤，冷却至室温备用。

1.3.4 儿茶素和茶黄素含量的测定

样品前处理条件：参考 GB/T 30483−2013 茶叶中茶黄素的测定中的检测方法。HPLC 分析条件：流动相为 0.2% 乙酸水溶液（A）和乙腈（B），采用线性梯度洗脱，柱温 35 ℃，流速 1 mL/min，0～12 min 10～13% B，12～16 min 13～17% B，16～22 min 17% B，22～25 min 17～32% B，25～32 min 32% B，32～33 min 32～10% B，33～40 min 10% B。进样量为 10 μL，紫外检测波长为 278 nm [15]。色谱柱为 Agilent ZORBAX SB−C18（4.6×250 mm，5 μm）。

1.3.5 酶法合成茶黄素的单因素试验设计

测定茶汤中茶黄素含量，以提取率为试验指标，考察加酶量（20、30、40、50、60 mL）、反应时间（10、20、30、40、50 min）、反应温度（25、30、35、40、45 ℃）对茶黄素提取率的影响。其中，茶黄素、儿茶素的含量计算公式、儿茶素转化率计算公式、茶黄素合成率计算公式如下：

$$含量\ /\%=(C\times V)/M\times 100 \quad (2)$$

式中：C 为合成液中茶黄素或儿茶素的质量浓度，μg/mL；V 为合成液体积，mL；M 为加入的绿茶粉质量，m。

$$合成率\ /\%=C/(C_0-C_1)\times 100 \quad (3)$$

$$转化率\ /\%=(C_0-C_1)/C_0\times 100 \quad (4)$$

式中：C 为合成液中茶黄素质量浓度，μg/mL；C_0 为茶汤中儿茶素质量浓度，μg/mL；C_1 为合成液中儿茶素质量浓度，μg/mL。

1.3.5.1 不同酶添加量对生成茶黄素含量的影响 分别量取 20、30、40、50、60 mL 粗酶液于 250 mL 三角瓶中，调整绿茶原液 pH 为 5.4 后，分别加入 50 mL 绿茶原液，25 ℃、600 r/min 磁力搅拌反应 40 min。微波高温 30 s 灭酶，12000 r/min 离心 10 min 取上清，测定茶黄素和四种儿茶素的含量。

1.3.5.2 不同反应温度对生成茶黄素含量的影响 量取 50 mL 粗酶液于 250 mL 三角瓶中，分别调整绿茶原液 pH 为 5.4 后，各加入 50 mL 绿茶原液，分别在磁力搅拌器上进行搅拌，转速为 600 r/min，设置温度为 25、30、35、40、45 ℃，反应 40 min，取 20 mL 反应液，微波高温 30 s 灭酶，12000 r/min 离心 10 min 取上清，测定茶黄素和四种儿茶素的含量。

1.3.5.3 不同反应时间对生成茶黄素含量的影响 量取 50 mL 粗酶液于 250 mL 三角瓶中，分别调整绿茶原液 pH 为 5.4 后，分别加入 50 mL 绿茶原液，因缺少通氧设备，将三角瓶置于磁力搅拌器上进行搅拌，设置温度为 25 ℃，转速为 600 r/min，分别在反应 10、20、30、40、50 min 取 20 mL 反应液，微波高温 30 s 灭酶，12000 r/min 离心 10 min 取上清，测定茶黄素和四种儿茶素的含量。

1.3.6 响应面法优化茶黄素的合成

选取加酶量、反应时间和反应温度 3 个因素的合适水平进行 Box−Behnken 中心组合设计，采用响应面分析法对提取工艺进行优化。以合成液中茶黄素浓度为响应值，设计三因素两两交互的响应面分析实验，设计方案见表 1。

表 1 响应面设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface design

水平	因素		
	A（加酶量）/mL	B（时间）/min	C（温度）/℃
−1	30	10	25
0	40	20	30
1	50	30	35

1.3.7 茶黄素粗品的提取

将合成液用同体积三氯甲烷萃取，弃下层以除去咖啡碱等杂质，保留上层。将同体积乙酸乙酯加入分液漏斗中，振荡、静置萃取，取上层有机相液体。用同体积 2% 碳酸氢钠溶液除去部分茶红素后，取上层酯层在 40 ℃减压旋蒸浓缩，旋蒸至无有机溶剂，冷冻干燥，得茶黄素粗品。采用 2.3.4 测定方法测定其茶黄素含量，纯度计算公式如下：

$$纯度/\%=(C_1\times V)/M\times 100 \quad (5)$$

式中：C_1 为茶黄素质量浓度，μg/mL；V 为加水体积，mL；M 为加入的粗品茶黄素粉末质量，m。

1.3.8 茶黄素的动态纯化

预试验通过研究 TFs 在五种大孔树脂上的静态吸附动力学和静态吸附等温线特性，筛选出最优大孔树脂类型 XAD−16N。随后优化茶黄素在大孔树脂上的动态吸附工艺参数，如上样质量浓度、上样流速、解吸液梯度和体积。得到的最佳动态吸附工艺参数：上样流速 5 mL/min，上样质量浓度 5 mg/mL，解吸液洗脱梯度为 3 BV 水、6 BV 30% 乙醇、6 BV 60% 乙醇。

将预处理后的 XAD−16N 树脂装入玻璃层析柱中。用蠕动泵以 0.5 BV/min 的流速上样 5 mg/mL 的 TFs 溶液。吸附结束后，用 3 BV 水洗去未吸附的 TFs。然后，以 0.5 BV/min 的流速将 6 BV 的 30% 乙醇通过柱，以除去儿茶素。最后，用 6 BV 的 60% 乙醇以 0.5 BV/min 的流速洗脱 TFs。旋转蒸发冷冻干燥后，采用 HPLC 测定冻干粉中 TFs 的含量，计算纯度。

1.3.9 数据统计分析

每组实验重复 3 次，实验数据使用 Excel 采集，并采用 Origin 2021 和 Design−Expert 13 作图，其中 $P < 0.05$ 表示为差异显著。

2 结果与分析

2.1 梨多酚氧化酶的动力学曲线

酶动力学曲线如图 2 所示。

在前 20 min 内，酶液的吸光度值随反应时间的延长持续上升，并于 20 min 时达到峰值 0.601。此后，随着反应时间的进一步增加，多酚氧化酶的吸光度值趋于稳定，表明酶活力已达到最大值并保持恒定。因此，将吸光度值 0.601 与反应时间 20 min 代入酶活计算公式，得出梨来源的多酚氧化酶的酶活为 424.9 U/mL。这一结果与张颖 [18] 测定的香水梨酶活 493 U/mL 相近，进一步验证了实验数据的可靠性。

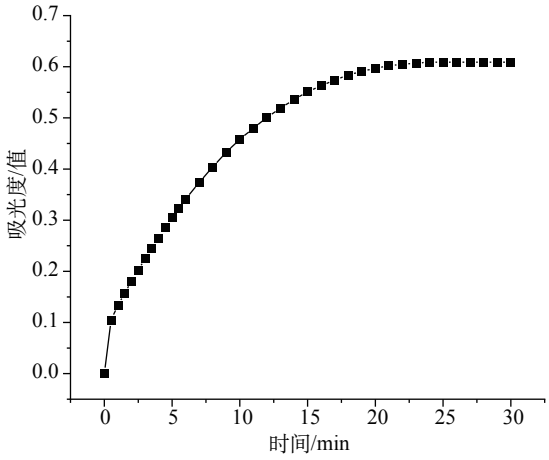


图 2 梨多酚氧化酶酶动力曲线图

Figure 2 Enzyme kinetic curve of pear polyphenol oxidase

2.2 加酶量对合成液中茶黄素含量的影响

探究加酶量对合成液中茶黄素含量的影响，见图 3 所示。

在固定反应时间 40 min 的条件下，茶黄素生成量与酶添加量呈现先促进后稳定的规律。当酶液添加量从 0 增加至 50 mL 时，总茶黄素浓度由初始的 66.41 μg/mL 显著提升至 166.25 μg/mL，增幅达 151%；其中 TF 含量波动最为剧烈，从 23.25 μg/mL 激增至 60.01 μg/mL，TFDG 的生成呈现特殊趋势，在酶量 30 mL 时达到峰值后开始下降，40 ～ 60 mL 时稳定在 23.08 μg/mL，较初始水平保持增长态势。底物转化分析表明，随着酶液添加量递增，四种主要儿茶素总量从 1343.93 μg/mL 持续降低至 105.92 μg/mL，整体转化效率达到 92.12%。特别是在酶液添加量为 50 mL 时，系统达到最佳平衡状态。反应前茶汤中儿茶素占比 6.72%、茶黄素仅占 0.33%；经 50 mL 酶液催化后，儿茶素锐减至 1.06%，而茶黄素占比跃升至 1.66%，折合每克茶粉可产出 16.6 mg 茶黄素。

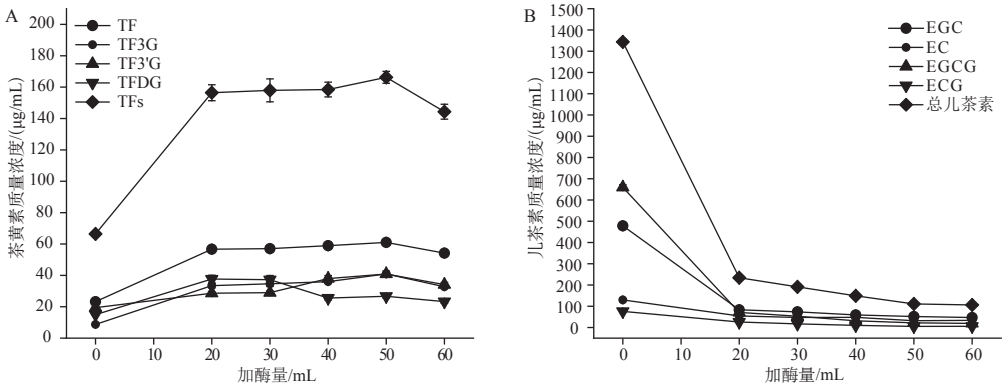


图 3　加酶量对合成液中茶黄素和儿茶素含量的影响图（A）茶黄素；（B）儿茶素

Figure 3　Effect of enzyme amount on theaflavins and catechins content in the synthesis solution: (A) theaflavins; (B) catechins

酶量和儿茶素含量的比例直接决定了儿茶素转化率以及茶黄素合成率[19]。适当增加儿茶素的浓度有利于化学平衡向产物方向进行，从而提高了反应物的转移率。但儿茶素浓度过大时，茶黄素可能会进一步转化为茶红素，从而降低了茶黄素的生成。此外，外源酶添加量与儿茶素添加量的比例偏低时，酶作用位点接触不足，反应速度变慢，在固定时间内难以充分生成产物；比例过高则会引发双重问题：过量的酶加速反应进程，导致茶黄素在固定时间内被过度氧化生成茶红素等副产物；同时过量酶液稀释底物浓度，间接抑制合成效率[20]。李大祥等人[21]研究表明儿茶素可发生苯骈环化反应而形成茶黄素，茶黄素还可转化成茶萘酚醌、脱氢茶黄素和高聚合物，例如茶红素。王坤波等人[22]利用梨果实多酚氧化酶将四种儿茶素氧化为茶黄素，分别选择了 25、50、75、100、125 和 150 mL 作为酶添加量进行单因素试验，试验结果表明当酶添加量在 25～75 mL 之间时，茶黄素总量及茶黄素各单体的含量随酶添加量增加而增加，在 75 mL 时，含量达到最大值，和本实验结果趋势吻合。综合考虑，本研究选择酶添加量为 50 mL 作为后续研究条件。

2.3　反应温度对合成液中茶黄素含量的影响

温度是调控儿茶素氧化为茶黄素的关键因素之一，其通过影响多酚氧化酶的活性及反应体系中的溶氧量，进而显著作用于茶黄素的合成过程。本实验将 50 mL 粗酶液和 pH 为 5.4 的 50 mL 绿茶原液混合，设置温度为 25、30、35、40、45 ℃，反应 40 min，观察合成液中茶黄素含量的变化，实验结果如图 4 所示。

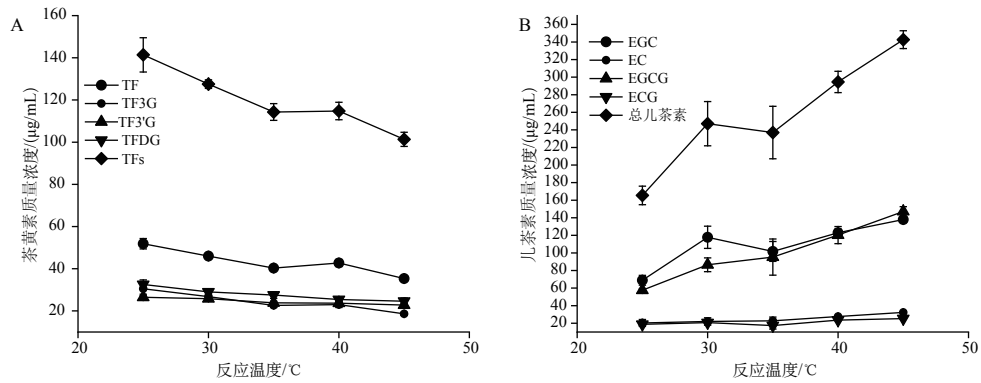


图 4　反应温度对合成液中茶黄素和儿茶素含量的影响图（A）茶黄素；（B）儿茶素

Figure 4　Effect of reaction temperature on theaflavins and catechins content in the synthesis solution: (A) theaflavins; (B) catechins

由图 4 可知，温度对茶黄素的合成具有显著调控作用。当温度从 25 ℃升至 45 ℃时，总茶黄素浓度由 141.39 μg/mL 逐渐下降至 101.34 μg/mL，其余各类茶黄素单体含量同步下降。与此同时，总儿茶素含量呈现上升趋势，其浓度从 162.82 μg/mL 上升至 330.99 μg/mL，转化效率由 87.88% 降至 75.37%。一方面，合适的活化能是底物完成酶促反应所必需的，低温意味着底物反应的活化能较低，高温可能会导致酶热变性 [23]。另一方面，这可能与酶促反应的供氧平衡有关，温度升高反应液中氧含量减少，常规供氧条件下易出现局部缺氧，导致氧化反应不均匀，进而抑制茶黄素积累。Robertson 等 [24] 研究显示，在不同供氧模式中，茶黄素形成的最适温度存在差异，强制通氧体系最适温度为 30 ℃，空气氧化体系则为 20 ℃。因此，本研究反应温度设置为 25 ℃。

2.4 反应时间对合成液中茶黄素含量的影响

50 mL 粗酶液混合 pH 为 5.4 的 50 mL 绿茶原液搅拌，设置温度为 25 ℃，分别反应 10、20、30、40、50 min，观察反应时间对茶黄素合成量的影响规律，结果如图 5 所示。

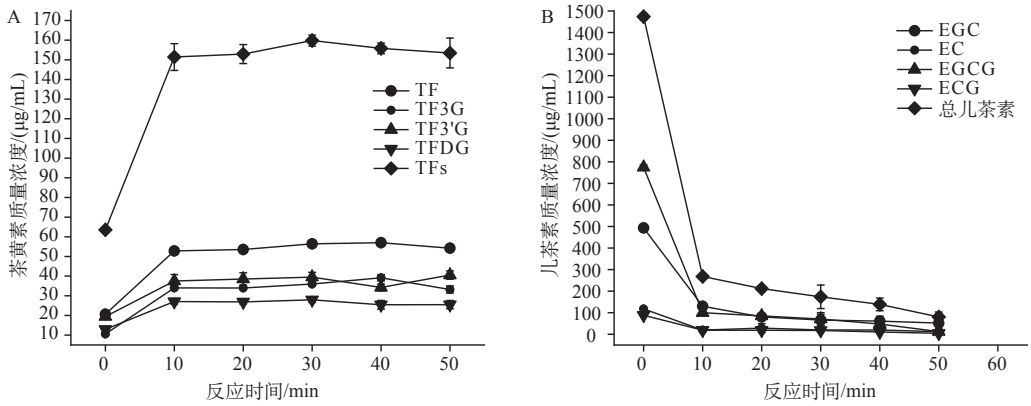


图 5 反应时间对合成液中茶黄素和儿茶素含量的影响图（A）茶黄素；（B）儿茶素

Figure 5 Effect of reaction time on theaflavins and catechins content in the synthesis solution：（A）theaflavins；（B）catechins

由图 5 可知，随着反应时间的增加，茶黄素的含量先升后降，在前 10 min 茶黄素大量生成，四种单体中 TF 含量最高，TF3’G 含量次之，TFDG 含量最低。与此同时，四种儿茶素大量消耗，反应 10 min 时转化率为 81.81%。随后，10～30 min 内茶黄素含量缓慢上升，反应 30 min 时合成液中茶黄素浓度最高为 159.79 μg/mL，相比较反应 10 min 时茶黄素浓度涨幅为 5.5%。30～50 min 茶黄素含量缓慢下降，是由于茶黄素的氧化合成继续进行，不断被转化为茶红素和茶褐素等物质。植物体外酶促合成茶黄素的过程包含生成和降解两个阶段，反应时间对产物的积累具有显著影响。茶黄素含量随反应时间呈现先上升后下降的趋势，其变化规律符合二次曲线特征 [25]。袁斌 [26] 选用皇冠梨粗酶液对儿茶素进行酶促合成茶黄素，研究结果表明 TFs 浓度随着反应时间增加呈先上升后缓慢下降趋势，和本试验反应趋势一致。因此，结合生成茶黄素含量和儿茶素转化率综合选取 30 min 作为本试验的反应时间。

2.5 响应面法优化酶法合成茶黄素的工艺

2.5.1 响应面模型方差及显著性检验

回归方差分析及显著性检验结果，由表 3 可知。该回归方程模型极显著（$P<0.01$），失拟项不显著（$P>0.05$），说明模型可靠。其中 B、C、B^2 和 A^2 的 P 值＜ 0.01，表明它们极其影响茶黄素浓度。而 A、AC 和 C^2 的 P 值＜ 0.05，说明其影响茶黄素浓度显著。根据分析可以得到三个因素对茶黄素生成影响程度 B（时间）＞ C（温度）＞ A（加酶量）。

表 3　响应面 Box−Behnken 实验设计及结果

Table 3　Response surface Box−Behnken experimental design and results

序号	加酶量 /mL	时间 /min	温度 /℃	茶黄素浓度 /(μg/mL)
1	30	10	30	80.40
2	50	10	30	95.23
3	30	30	30	131.03
4	50	30	30	137.92
5	30	20	25	128.99
6	50	20	25	153.15
7	30	20	35	120.88
8	50	20	35	116.38
9	40	10	25	92.52
10	40	30	25	150.51
11	40	10	35	84.24
12	40	30	35	136.48
13	40	20	30	143.74
14	40	20	30	140.97
15	40	20	30	146.13
16	40	20	30	151.08
17	40	20	30	148.15

表 4　模型方差检验结果

Table 4　Model variance analysis results

方差来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值	显著性
回归模型	9521.67	9	1057.96	46.03	＜0.0001	**
A−加酶量	214.08	1	214.08	9.31	0.0185	*
B−时间	5178.61	1	5178.61	225.33	＜0.0001	**
C−温度	564.14	1	564.14	24.55	0.0016	**
AB	15.80	1	15.80	0.6874	0.4344	
AC	205.39	1	205.39	8.94	0.0202	*
BC	8.25	1	8.25	0.3589	0.5680	
A^2	462.35	1	462.35	20.12	0.0028	**
B^2	2505.01	1	2505.01	109.00	＜0.0001	**
C^2	136.19	1	136.19	5.93	0.0451	*
残差	160.88	7	22.98	\	\	
失拟项	99.98	3	33.33	2.19	0.2319	
净误差	60.89	4	15.22	\	\	
总误差	9682.54	16	\	\	\	

注：** 表示 $P < 0.01$，相关性极显著，* 表示 $P < 0.05$，相关性显著

2.5.2　各因素响应面结果分析

利用 Design−Expert 13 软件构建因素加酶量（A）、时间（B）、温度（C）与茶黄素浓度（Y）的二次多项回归方程，得到回归方程如下：Y=146.02+5.17A+25.44B−8.40C−1.99AB−7.17AC−1.44BC−10.48A^2−24.39B^2−5.69C^2。其中 A、B、C 分别是加酶量、时间、温度的编码值。为了更直观的观察了解实验自变量与合成率的关系，绘制响应面结果，如图 6 所示。

通过将第三个因素设定在中心水平，三维响应曲面图可以表示另外两个变化因素之间的主要效应和交互效应 [26]。响应面图越陡峭、等高线越接近椭圆，则两因素之间交互作用越强 [27]。图 6（B）反映加酶量和反应温度的交互作用，响应面开口向下并存在最高值，响应面图陡峭，等高线形状最接近椭圆，说明两者交互作用显著，这与模型方差分析结果相吻合。图 6（A）反映加酶量和反应时间的交互作用，等高线形状接近圆形，两者交互作用不明显。图 6（C）反映反应时间和反应温度间交互作用，响应面图开口向下，且较为陡峭，说明两者间存在一定交互作用。

运用 Design−Expert 软件对最优结果进行筛选，在等级范围内最优结果：加酶量为 40.288 mL、反应时间为 26.233 min、反应温度为 29.211 ℃，此时茶黄素有最高浓度 153.864 μg/mL。

2.5.3　验证实验

根据回归方程预测出茶黄素合成的最优实验条件为酶添加量 40.288 mL、反应时间为 26.233 min、反应温度为 29.211 ℃，得到的茶黄素浓度最高为 153.864 μg/mL。为了验证其准确性，实际进行试验条件为加酶量 40 mL，反应时间 26 min，反应温度 29 ℃，进行 4 次重复实验得到茶黄素浓度为：173.63±1.69 μg/mL，与理论预测值比高 19.77 μg/mL。同时与单因素分析得到的结果相比，茶黄素浓度提升 7.38 μg/mL，说明运用响应面法明显优化了酶法合成茶黄素的工艺条件。

2.6　**茶黄素粗品的提取**

将合成液用三氯甲烷、乙酸乙酯、2% 碳酸氢钠溶液依次萃取后，旋蒸、冻干，得茶黄素粗品。使用 HPLC 测定粗品中茶黄素和儿茶素含量，进而计算其纯度。得到粗品茶黄素纯度为 30.12±2.23%。

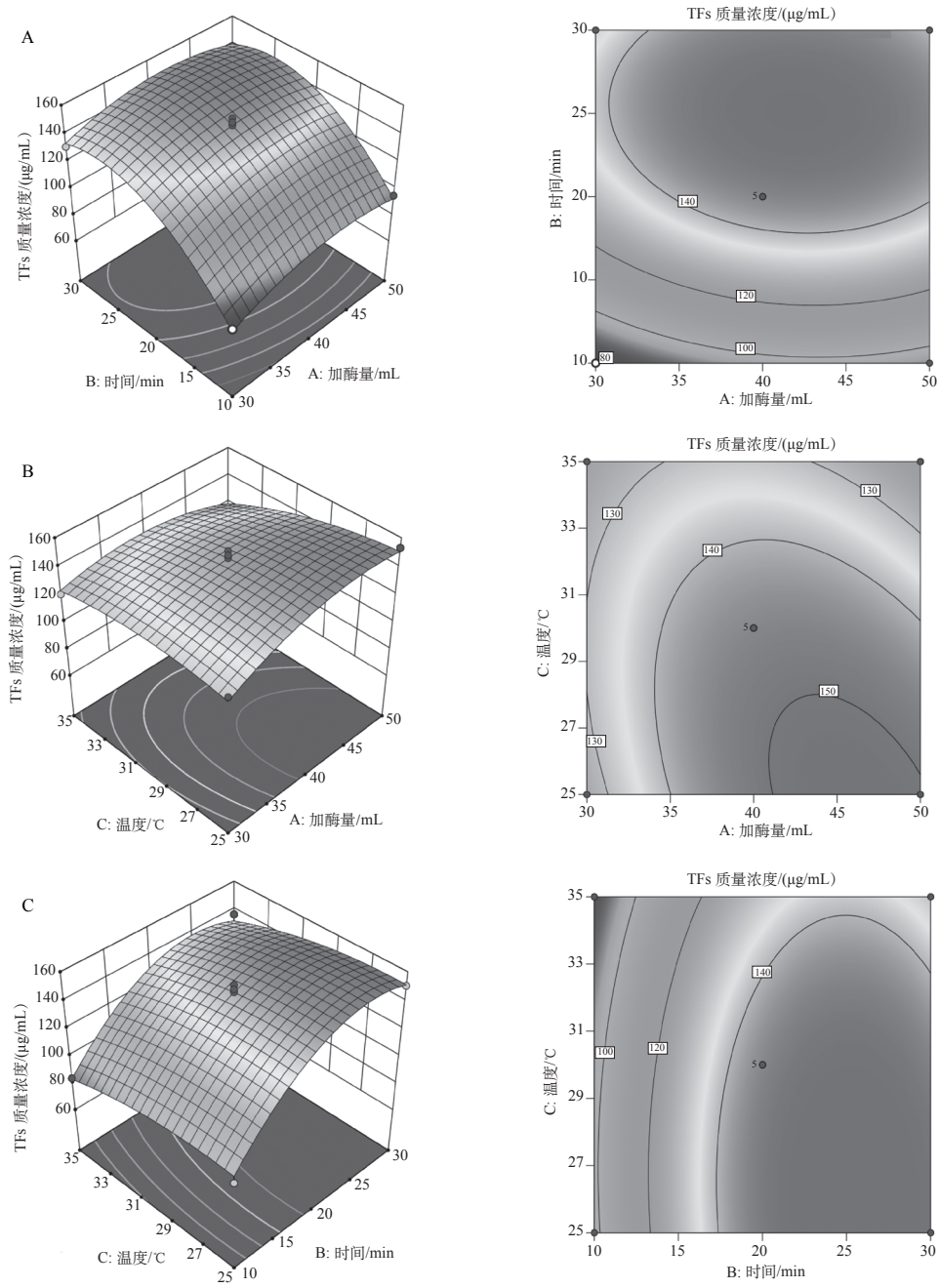


图 6 （A）加酶量和反应时间交互作用对茶黄素浓度的响应面图；（B）加酶量和反应温度交互作用对茶黄素浓度的响应面图；（C）反应温度和反应时间交互作用对茶黄素浓度的响应面图

Figure 6 （A）response surface plot of the interactions between enzyme amount and reaction time on theaflavin concentration；（B）response surface plot of the interaction between enzyme dosage and reaction temperature on theaflavin concentration；（C）response surface plot of the interaction between reaction temperature and reaction time on theaflavin concentration

2.7 茶黄素的分离纯化

将预处理后的 XAD−16N 树脂装柱后，以 0.5 BV/min 流速上样 5 mg/mL 茶黄素溶液，随后依次用 3 BV 水洗脱杂质、30% 和 60% 乙醇各 6 BV 分步洗脱。收集 60% 乙醇洗脱液经浓缩、冻干后，通过 HPLC 检测茶黄素浓度，计算纯度。纯化后茶黄素纯度提升 2.92 倍。

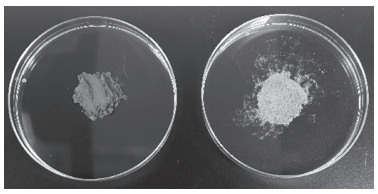


图 7　样品纯化前后对比图（左，纯化前；右，纯化后）
Figure 7　Sample comparison of before and after purification（left：before purification；right：after purification）

3　结论

本研究以川产低等级绿茶和丰水梨为原料，利用丰水梨多酚氧化酶粗酶液催化茶汤中的儿茶素氧化合成茶黄素。通过单因素试验和响应面优化法确定最佳合成条件：50 mL 茶汤添加 40 mL 酶液，29 ℃反应 26 min，茶黄素合成量达 173.63±1.69 μg/mL，儿茶素转化率 92.18%，合成率 14.02%，相当于每克绿茶粉生成 15.6 mg 茶黄素。粗茶黄素粉纯度为 30.23%±2.09%。XAD−16N 树脂动态吸附参数为上样流速 5 mL/min、质量浓度 5 mg/mL，解吸梯度为 3 BV 水、6 BV 30% 乙醇和 6 BV 60% 乙醇，纯化后茶黄素纯度提升 2.92 倍。该研究为茶黄素的酶促合成与树脂纯化提供了理论依据。

参考文献：

[1] Takemoto M，Takemoto H. Synthesis of theaflavins and their functions [J]. Molecules，2018，23（4）：918.
[2] Liu Y F，Wang D Y，Li J，et al. Research progress on the functions and biosynthesis of theaflavins [J]. Food Chemistry，2024，450：139285.
[3] Wu D，Chen R H，Zhang W J，et al. Tea and its components reduce the production of uric acid by inhibiting xanthine oxidase [J]. Food & Nutrition Research，2022，66：8239.
[4] Noor Mohammadi T，Maung A T，Sato J，et al. Mechanism for antibacterial action of epigallocatechin gallate and theaflavin−3，3’−digallate on *Clostridium perfringens*. [J]. Journal of Applied Microbiology，2019，126（2）：633−640.
[5] Mhatre S，Srivastava T，Naik S，et al. Antiviral activity of green tea and black tea polyphenols in prophylaxis and treatment of COVID−19：A review [J]. Phytomedicine，2021，85：153286.
[6] Zhang Y H，Liu W L，Wang X Y，et al. Nanozyme−enabled treatment of cardio− and cerebrovascular diseases [J]. Small，2023，19（13）：2204809.
[7] Chen Y，Luo L Y，Hu S S，et al. The chemistry，processing，and preclinical anti−hyperuricemia potential of tea：A comprehensive review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2023，63（24）：7065−7090.
[8] 刘仲华，张盛，刘昌伟，等 . 茶叶功能成分利用“十三五”进展及“十四五”发展方向 [J]. 中国茶叶，2021，43（10）：1−9.
[9] Liu Q，Xun G H，Feng Y. The state−of−the−art strategies of protein engineering for enzyme stabilization [J]. Biotechnology Advances，2019，37（4）：530−537.
[10] Subramanian N，Venkatesh P，Ganguli S，et al. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，1999，47（7）：2571−2578.
[11] 谷记平，刘仲华，黄建安，等 . 酶性氧化合成茶黄素条件优化的研究 [J]. 茶叶科学，2006，26（4）：285−290.
[12] Cai H L，Zhong Z H，Chen Y R，et al. Genes cloning，sequencing and function identification of recombinant polyphenol oxidase isozymes for production of monomeric theaflavins from *Camellia sinensis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2023，240：124353.
[13] Teng J，Liu Y，Zeng W，et al. *In vitro* enzymatic synthesis of a monomeric theaflavin using a polyphenol oxidase isozyme from tea（*Camellia sinensis*）leaf [J]. International Journal of Food Science & Technology，2022，57（9）：5621−5631.
[14] Li D，Dong L，Li J Y，et al. Optimization of enzymatic synthesis of theaflavins from potato polyphenol oxidase [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering，2022，45(6)：1047−1055.
[15] Lei S C，Xie M H，Hu B，et al. Effective synthesis of theaflavin−3，3'−digallate with epigallocatechin−3−O−gallate and epicatechin gallate as substrates by using immobilized pear polyphenol oxidase [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2017，94（Pt A）：709−718.
[16] Zeng J，Du G，Shao X，et al. Recombinant polyphenol oxidases for production of theaflavins from tea polyphenols [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2019，134：139−145.
[17] 国家标准化管理委员会，国家质量监督检验检疫总局 . 茶叶中茶黄素的测定 − 高效液相色谱法：GB/T 30483−2013 [S]. 北京：中国标准出版社，2014.
[18] 张颖 . 酶促氧化制备茶黄素及其性质研究 [D]. 天津：天津科技大学，2010.
[19] 王坤波，刘仲华，赵淑娟，等 . 儿茶素组成和理化条件对茶黄素酶催化合成的影响 [J]. 茶叶科学，2007，27(3)：192−200.
[20] Xu J，Wei Y，Huang Y，et al. Current understanding and future perspectives on the extraction，structures，and regulation of muscle function of tea pigments [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2023，63（33）：11522−11544.
[21] 李大祥，宛晓春，杨昌军，等 . 茶儿茶素氧化机理 [J]. 天然产物研究与开发，2006，18（1）：171−181.
[22] 王坤波 . 茶黄素的酶促合成、分离鉴定及功能研究 [D]. 长沙：湖南农业大学，2007.
[23] Sun H J，Wang J，Tao X M，et al. Purification and characterization of polyphenol oxidase from rape flower [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2012，60(3)：823−829.
[24] Robertson A. Effects of physical and chemical conditions on the *in vitro* oxidation of tea leaf catechins [J]. Phytochemistry，1983，22（4）：889−896.
[25] 徐洪梅 . 梨多酚氧化酶生物催化合成茶黄素及其在茶叶深加工中的应用研究 [D]. 杭州：浙江工业大学，2013.
[26] 袁斌 . 茶黄素的酶促氧化制备与纯化技术研究 [D]. 长沙：湖南农业大学，2020.
[27] Nazemi R，Ashoori S，Moghadasi J. Investigating the performance of non−damaging hybrid gel to mitigate lost circulation in fractured formations：A comprehensive study using Box−Behnken design [J]. Geoenergy Science and Engineering，2023，226：211730.
[28] Li Z P，Lu D G，Gao X J. Optimization of mixture proportions by statistical experimental design using response surface method−A review [J]. Journal of Building Engineering，2021，36：102101.