

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530146

漆酶/介体共固定系统催化茶多酚合成茶黄素

SYNTHESIS OF THEAFLAVINS FROM TEA

POLYPHENOLS CATALYZED BY LACCASE/MEDIATOR

CO-IMMOBILIZATION SYSTEM

学 生 姓 名:	黎 玮
校 内 导 师:	赵世光 (副教授)
校 外 导 师:	刘志刚 (高级工程师)
专 业 学 位 类 别:	生物与医药
研 究 方 向:	生物制药工程

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

黎玮

学位论文作者签名：

日期： 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：黎玮

指导教师签名：

日期：2024年5月30日

日期：2024年5月30日

漆酶/介体共固定系统催化茶多酚合成茶黄素

摘要

漆酶 (Laccase), 属于多酚氧化酶的一种, 能够以多种污染物为底物进行酶促氧化。在氧化反应过程中, 漆酶以空气中的氧为受体, 除了水以外, 无其他副产物产生, 因此被视为一种绿色高效的环保用酶。介体作为小分子化合物, 在漆酶催化反应中起到降低底物的高氧化还原电势的作用, 从而扩大漆酶催化底物的范围。由漆酶和介体共同参与的这种催化体系被称为漆酶/介体体系 (Laccase-mediator system, LMS)。茶黄素 (TFs) 是作为一种天然的活性成分, 具有优异的调节血脂、清除自由基和抗氧化、抗肿瘤、抗菌抗炎等功效, 是药物开发、功能食品和日用化工的理想天然材料。本文以甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA) 和多巴胺 (DA) 为修饰剂, 将漆酶和介体共固定在功能化的海藻酸盐复合材料上, 制备漆酶-介体共固定催化剂, 应用于催化茶多酚合成茶黄素; 研究共固定漆酶-介体系统催化茶多酚合成茶黄素的性能, 并评估催化产物的生物安全性。具体研究内容如下:

(1) 研究游离漆酶催化茶多酚合成茶黄素的最佳工艺。

使用游离漆酶催化茶多酚合成茶黄素, 并通过单因素和多因素实验得到最佳催化条件为: 漆酶添加量 0.1 mg, 底物浓度 1.34 mg/mL, pH 3.7、反应时间 47 min。在此基础上, 引入 LMS, 对添加介体的种

类和添加量进行初筛，确定 0.2 mmol/L 的 ABTS 为最佳适配介体。

(2) 制备共固定漆酶-介体水凝胶微球，应用于茶黄素酶促合成。

将漆酶和 ABTS 共固定在 GMA 和 DA 接枝修饰的海藻酸盐载体材料上，制备出直径 2 mm 左右，尺寸均一的共固定漆酶/介体水凝胶微球 Lac@PDG-Ca@ABTS。利用扫描电镜、傅里叶红外、荧光显微镜、EPR 等手段对催化剂微球进行表征，证明漆酶和介体成功共固定在功能化的载体上。漆酶、ABTS 经共固定后，其酸碱耐受能力、热稳定性和储存稳定性较游离漆酶都有显提高，且具备良好的可重复利用性，重复使用十次后，仍能保持 60%以上的活性。考察不同条件对共固定化微球制备效率及茶黄素合成产率的影响，获得共固定微球的最佳制备条件为：漆酶浓度 1.2 mg/mL，介体添加量 0.25 mM，固定化 pH 3.5，茶多酚浓度 1.5 mg/mL，共固定微球对茶多酚催化效果良好，茶黄素产率达到 42.48%，显著高于游离漆酶。

(3) 以细胞毒性为指标，评价催化产物的生物安全性。

通过 HepG2 细胞活力、细胞毒力和细胞周期能指标，评估共固定漆酶-介体微球催化茶多酚合成茶黄素催化产物的细胞毒活性。共固定微球 Lac@PDG-Ca@ABTS 获得的催化产物对 HepG2 存活率达到 84.15%，较游离组的细胞存活率显著提高；与原料茶多酚相比，共固定微球的细胞存活率仅降低了 5.4%，表明共固定化能有效封装漆酶和 ABTS，尤其是避免了高浓度游离 ABTS 对细胞的毒害，但是仍然表现出轻微泄露。Lac@PDG-Ca@ABTS+TPs 组与无 ABTS 的 Lac+TPs 组相比，二者红色荧光点数量和分布情况类似，且其细胞凋

亡影响较小，二者的细胞毒性相当，表明用固定微球中的 ABTS 泄露轻微，对细胞无显著毒害。

共固定漆酶-介体应用于茶黄素的催化合成，扩大了漆酶-介体系统多领域的应用，为茶黄素规模化制备及其他高值化学品的生物催化奠定了基础。

关键词：漆酶，介体，共固定化，茶黄素，生物催化

SYNTHESIS OF THEAFLAVINS FROM TEA POLYPHENOLS CATALYZED BY LACCASE/MEDIATOR CO-IMMOBILIZATION SYSTEM

ABSTRACT

Laccase, a type of polyphenol oxidase, is capable of enzymatic oxidation using a variety of pollutants as substrates. During the oxidation reaction, Laccase uses oxygen in the air as the receptor and produces no by-products except water, so it is regarded as a green and efficient enzyme for environmental protection. As small molecular compounds, mediators play a role in laccase-catalyzed reactions by lowering the high redox potential of the substrate, thus expanding the range of substrates catalyzed by laccase. This catalytic system involving both laccase and mediator is called laccase-mediator system (LMS). Theaflavins (TFs) are used as a natural active ingredient with excellent lipid regulation, free radical scavenging and antioxidant, anti-tumour, anti-bacterial and anti-inflammatory effects, making them ideal natural materials for drug development, functional foods and daily chemicals. In this paper, laccase and mediator were co-immobilized on functionalized alginate composites

using glycidyl methacrylate (GMA) and dopamine (DA) as modifiers to prepare laccase-mediator co-immobilized catalysts, which were applied to catalyze the synthesis of theaflavins from tea polyphenols; to study the performance of the co-immobilized laccase-mediator system in catalyzing the synthesis of theaflavins from tea polyphenols, and to evaluate the biosafety of the catalytic products. The details of the study are as follows:

(1) To study the optimal process of free laccase catalyzing the synthesis of theaflavins from tea polyphenols.

Free laccase was used to catalyze the synthesis of theaflavins from tea polyphenols, and the optimal catalytic conditions were obtained through one-way and multifactorial experiments as follows: the addition of 0.1 mg of laccase, the substrate concentration of 1.34 mg/mL, pH 3.7, and the reaction time of 47 min. On this basis, LMS was introduced, and the type and amount of additive mediator were screened, and the 0.2 mmol/L ABTS was determined to be the optimal adaptor mediator.

(2) Preparation of co-immobilized laccase-mediator hydrogel microspheres for the enzymatic synthesis of theaflavins.

Co-immobilized laccase and ABTS on GMA and DA graft-modified alginate carrier materials, co-immobilized laccase/mediator hydrogel microspheres Lac@PDG-Ca@ABTS were prepared with a diameter of about 2 mm and a uniform size, and the catalyst microspheres were characterized using scanning electron microscopy, Fourier infrared,

fluorescence microscopy, EPR, etc, which demonstrated that the laccase and the mediator were successfully co-immobilized on the functionalized carrier. carriers. After co-immobilization, the acid and alkali tolerance, thermal stability and storage stability of laccase and ABTS were significantly improved compared with those of free laccase, with good reusability, and the activity was still more than 60% after ten times of reuse. The effects of different conditions on the preparation efficiency of the co-immobilized microspheres and the synthesis yield of theaflavin were investigated, and the optimal preparation conditions for the co-immobilized microspheres were obtained as follows: the concentration of laccase was 1.2 mg/mL, the amount of mediator added was 0.25 mM, the immobilization pH was 3.5, and the concentration of tea polyphenol was 1.5 mg/mL. The co-immobilized microspheres showed a good catalytic effect on tea polyphenol, and the highest yield of theaflavin reached 42.48%, which was significantly higher than the yield of free laccase. free laccase.

(3) Evaluation of the biosafety of the catalytic products using cytotoxicity as an indicator.

The cytotoxic activity of the catalytic product of tea polyphenol synthesis of theaflavins catalyzed by co-immobilized laccase-mediator microspheres was evaluated by HepG2 cell viability, cytotoxicity and cell cycle energy indicators. Co-immobilized microspheres, Lac@

PDG-Ca@ABTS, obtained a catalytic product with 84.15% survival of HepG2, showed a significant increase in cell survival compared to the free group; the cell survival of co-immobilized microspheres was only reduced by 5.4% compared to the raw tea polyphenols, suggesting that co-immobilization effectively encapsulates laccase and ABTS, especially avoiding the toxicity of the high concentration of free ABTS to the cells, but still showed slight leakage. The Lac@PDG-Ca@ABTS+TPs group showed a similar number and distribution of red fluorescent dots and a smaller apoptotic effect compared to the Lac +TPs group without ABTS, and the cytotoxicity of the two was comparable, suggesting that the leakage of ABTS from immobilized microspheres was slight and did not have any significant toxicity to the cells.

The application of co-immobilized laccase-mediator to the catalytic synthesis of theaflavins expands the application of the laccase-mediator system in multiple fields, and lays the foundation for the large-scale preparation of theaflavins and the biocatalysis of other high-value chemicals.

Keywords: laccase, mediator, co-immobilization, theaflavins, biocatalysis

目录

摘要	I
ABSTRACT	IV
第一章 引言	1
1 茶黄素	1
1.1 茶黄素的结构与理化性质	1
1.1.1 茶黄素的形成机理	1
1.1.2 茶黄素的生物学活性	1
1.2 茶黄素的制备与合成	3
1.2.1 溶剂浸提	3
1.2.2 化学氧化	3
1.2.3 酶促合成	3
2 漆酶及其应用	5
2.1 漆酶的结构与功能	5
2.2 漆酶的催化机理	5
2.3 漆酶的应用	6
2.3.1 漆酶与造纸业	6
2.3.2 漆酶处理环境污染物	6
2.3.3 漆酶与食品工业	6
2.4 漆酶-介体系统 (LMS)	6
2.5 固定化技术应用于漆酶/介体	8
2.5.1 固定化方法	8
2.5.2 固定化载体	9
2.5.3 漆酶-介体共固定	10
3 课题的提出和主要研究内容	10
3.1 研究背景与意义	10
3.2 主要研究内容	11
第二章 游离漆酶催化茶多酚合成茶黄素	12
1 引言	12
2 实验试剂与仪器	12
3 实验方法	13

3.1 漆酶酶活测定方法	13
3.2 茶黄素的检测方法	13
3.3 漆酶催化茶多酚合成茶黄素单因素实验	14
3.3.1 漆酶添加量对合成茶黄素产率的影响	14
3.3.2 底物浓度对合成茶黄素产率的影响	14
3.3.3 反应时间对合成茶黄素产率的影响	14
3.3.4 反应 pH 对合成茶黄素产率的影响	15
3.4 漆酶催化茶多酚合成茶黄素多因素实验	15
3.5 介体种类筛选	15
3.6 介体添加量	15
4 结果和讨论	16
4.1 茶黄素检测方法的确定	16
4.1.1 茶多酚、茶黄素检测	16
4.1.2 茶黄素标准曲线绘制	16
4.2 漆酶催化合成茶黄素单因素实验	17
4.2.1 漆酶添加量对茶黄素产率的影响	17
4.2.2 底物浓度对茶黄素产率的影响	18
4.2.3 反应时间对茶黄素产率的影响	18
4.2.4 反应 pH 对茶黄素产率的影响	19
4.3 漆酶催化合成茶黄素多因素实验	19
4.4 介体种类筛选	22
4.5 介体添加量筛选	23
5 小结	24
第三章 共固定漆酶-介体系统催化茶多酚合成茶黄素	25
1 引言	25
2 实验试剂与仪器	25
3 实验方法	26
3.1 共固定漆酶-介体体系的制备	26
3.2 共固定漆酶酶活测定	26
3.3 共固定漆酶-介体的表征	27
3.3.1 扫描电子显微镜	27
3.3.2 傅里叶红外光谱	27

3.2.3 荧光显微镜	27
3.3.4 EPR	27
3.4 共固定漆酶-介体催化剂酶学性质研究	27
3.4.1 Lac@PDG-Ca@ABTS 热稳定性	27
3.4.2 Lac@PDG-Ca@ABTS 酸碱稳定性	27
3.4.3 Lac@PDG-Ca@ABTS 储存稳定性	28
3.4.4 Lac@PDG-Ca@ABTS 操作稳定性	28
3.5 共固定漆酶介体微球催化茶多酚合成茶黄素	28
3.5.1 不同条件对固定化效率的影响	28
3.5.2 茶黄素的催化合成	28
4 结果和讨论	28
4.1 表征	28
4.1.1 SEM	28
4.1.2 傅里叶红外光谱分析	29
4.1.3 荧光显微镜图谱分析	30
4.1.4 EPR 图谱	30
4.2 共固定漆酶-介体微球酶学性质研究	31
4.2.1 热稳定性	31
4.2.2 酸碱稳定性	32
4.2.3 储存稳定性	32
4.2.4 操作稳定性	33
4.3 不同条件对漆酶-介体共固定效率的影响	34
4.3.1 漆酶初始用量对共固定化酶活回收率及茶黄素产率的影响	34
4.3.2 介体添加量对茶黄素合成的影响	34
4.3.3 固定化 pH 对茶黄素合成的影响	35
4.3.4 催化反应中底物浓度对茶黄素产率的影响	35
4.3.5 茶黄素产率比较	36
5 小结	37
第四章 催化产物的体外安全性研究	38
1 引言	38
2 实验试剂与仪器	38
3 实验方法	38

3.1 细胞培养	38
3.2 细胞活力检测	39
3.3 不同催化体系产物对细胞活死状态的影响	39
3.4 不同催化体系产物细胞凋亡的影响	39
4 结果与讨论	40
4.1 催化产物对细胞活力的影响	40
4.2 催化产物对细胞活死状态的影响	41
4.3 催化产物对细胞凋亡的影响	42
5 小结	42
结论与展望	43
1 结论	43
2 展望	44
参考文献	45
个人科研成果	54
致谢	55

第一章 引言

1 茶黄素

1.1 茶黄素的结构与理化性质

1.1.1 茶黄素的形成机理

茶黄素（Teaflavins, TFs）是由茶叶中的多酚类物质（TPs）及其衍生物氧化缩合形成，是一类具有苯并卓酚酮结构的化合物^[1]。在红茶加工的揉捻过程中，茶叶细胞组织破碎，使得茶汁流出，其中的多酚类化合物附着在茶叶表面，与多酚氧化酶和空气充分接触后，进行酶促氧化生成茶黄素。茶黄素是由二羟基和三羟基 B 环的儿茶素的酶氧化和缩合形成的。该反应包括 B 环氧化为醌类化合物，然后在环上羰基加成和随后的脱羧之前，将没食子儿茶素醌加成到儿茶素醌上^[2]。目前已有约 20 多种茶黄素被成功分离鉴定，其中有四种最为常见，分别为：茶黄素（TF1）、茶黄素-3-没食子酸酯（TF2a）、茶黄素-3'-没食子酸酯（TF2b）和茶黄素-3, 3'-双没食子酸酯（TF3）（图 1-1）^[3]。

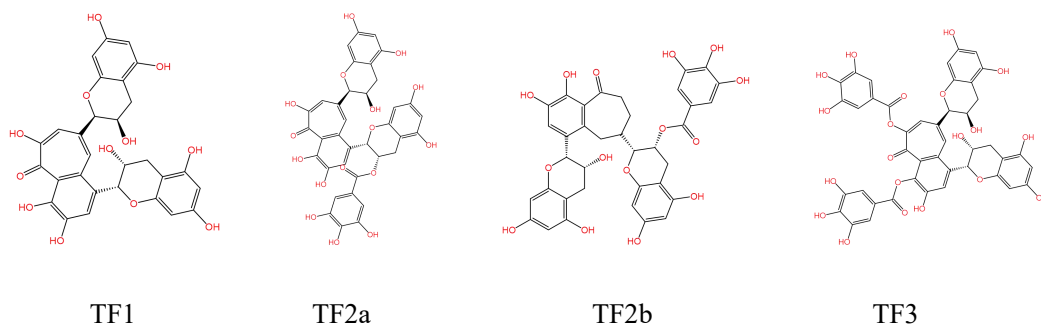


图 1-1 茶黄素单体结构式

Fig. 1-1 Chemical structures of TF1, TF2a, TF2b, and TF3

1.1.2 茶黄素的生物学活性

随着人们对红茶及茶保健品行业的关注，红茶中的有效成分正成为人们备受关注的研究热点^[4]。茶黄素对红茶的色、香、味等重要品质形成至关重要，是红茶汤色“亮”及茶汤“金圈”的主要成分基础。TFs 不仅决定了红茶的重要品质特征，作为一种天然的活性成分，更存在多种与人体健康相关的生理活性^[5]。

（1）抗氧化活性

茶黄素具有多种优异的生物活性，尤其以抗氧化性最为显著，能够清除自由

基、活性氧、螯合金属离子、抑制促氧化酶^[6,7]。茶黄素化学结构中的多羟基取代基具有较强供质子能力,使其能够有效清除自由基,是其氧化活性的结构基础。此外,茶黄素还能通过激活相关过氧化物酶的活性,间接发挥其抗氧化活性。不同茶黄素单体的抗氧化活性存在差异,根据其结构中羟基取代基的数量和位置,抗氧化特性按照 TF3>TF2a/TF2b>TF1 的方式变化^[8]。He 等^[9]比较了茶黄素单体与 EGCG 单体对羟基自由基的清除能力,结果证明茶黄素单体的清除自由基能力比 EGCG 更强,能有效保护 HPF-1 细胞,减少其自由基损伤,验证茶黄素的强抗氧化活性,发现茶黄素的抗氧化活性与其聚合程度有关。

(2) 抗肿瘤活性

小鼠动物模型、可移植肿瘤、致癌物引起的肿瘤模型中均验证了茶黄素的抗肿瘤活性在^[10]。茶黄素的抗肿瘤机理主要是:通过抑制致癌物质的诱发作用;通过调控细胞增殖和凋亡,抑制癌细胞转移等^[11]。Tu 等发现 TF3 可以特异性介导卵巢癌细胞 A2780 的凋亡,并阻滞 G2 期细胞,但对正常卵巢细胞不产生明显影响。TF3 在强力抑制顺铂耐药卵巢癌细胞的增殖的同时,且对正常的卵巢细胞毒性则较弱^[12]。Yang 等^[13]研究表明:0.3%的茶黄素可以显著抑制支气管上皮肿瘤细胞的增殖,且对肿瘤的多发性及体积同样具备抑制作用,抑制率分别达到 24%和 33%;表明茶黄素可以抑制支气管上皮肿瘤细胞的增生。

(3) 抗菌活性

茶叶具有抑菌效果的根本之一是其内含的茶黄素具有一定的抗菌活性^[14]。研究发现,茶黄素混合物能有优秀的抗菌效果,对肉毒芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、荚膜杆菌等作用显著,说明茶黄素单体之间可能具有协同抗菌作用^[15]。有研究表明,茶黄素的抑菌效果甚至已超过部分药用抗生素如万古霉素和四环素^[16]。

(4) 抗炎活性

炎症是机体由于各种损伤因子的刺激产生的一种自我防御机制,慢性炎症与癌症存在一定的相关性^[17]。茶黄素可以通过降低脂多糖诱导的 IL-6 等因子的表达,抑制细胞内 NF- κ B 抑制蛋白降解,发挥抗炎作用^[18]。Hosokawa 等^[19]发现 TF3 能组织人牙龈成纤维细胞中 IL-6 的产生,能有效预防牙周炎的产生。

(5) 其他活性

茶黄素还兼备多种生理活性:如抗病毒活性,可有效抵御入侵的病毒^[20,21];

抗代谢活性，能抑制胰脂肪酶活性^[22]，减少脂肪消化，预防脂肪肝和肥胖^[23]；预防心脑血管疾病活性^[17]，能通过抗增殖抗血栓、维持血管内皮功能和血压稳定等机制发挥其作用^[24-26]。

1.2 茶黄素的制备与合成

茶黄素可通过溶剂浸提、化学氧化和酶促合成三种工艺制备。

1.2.1 溶剂浸提

溶剂提取是利用茶黄素和红茶中其他组分间不同溶剂体系分配系数的差异，实现茶黄素的选择性分离提取。浸提法主要有 Collier 法和 Ullah 法。Collier 法提取过程为：样品先以热水浸提后，直接过滤浓缩，再利用甲醇水溶解，以氯仿萃取杂质，进一步浓缩水相后，用乙酸乙酯多次萃取，最终浓缩得到茶黄素粗品。Ullah 法提取过程为：热水浸提后，过滤浓缩，氯仿除杂， NaH_2PO_4 和乙酸乙酯混合萃取，最后浓缩有机相后，干燥获得粗品茶黄素。两种方法的操作均相对简便，但由于茶黄素本身在红茶中含量较低，仅占其干重的 0.3-1.5%，采用溶剂浸提原料成本太高，加之溶剂浸提所得茶黄素含有与其理化性质类似的其他多酚、色素，后期需要高昂的纯化成本，在工业应用上难以实施，因此当前已经基本放弃了采用溶剂浸提获取茶黄素。

1.2.2 化学氧化

化学氧化法是指通过 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 CuSO_4 等试剂催化儿茶素氧化形成茶黄素^[27]。已有众多研究采用化学合成方法以无机氧化剂催化茶多酚或各种儿茶素单体合成茶黄素。Roberts 等^[28]通过 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和 NaHCO_3 对儿茶素碱性氧化，确定其氧化产物中存在茶黄素类物质生成。李立祥等^[29]比较了酸碱体系下 TFs 的合成实验，发现化学催化合成的茶黄素组分比例与自然发酵的茶汤有明显区别，酸性氧化体系中的产物主要成分是 TF2a，而碱性氧化体系中产物则是以单体 TF1 为主。单圣晔等^[30]分别采用了不同的酸碱氧化剂，氧化茶叶浸提液，以茶黄素含量为指标考察制备效果，证明碱性氧化剂的氧化效果较好。

化学氧化法虽然体系简单、可控性强，但其工艺复杂，氧化过程中酸碱试剂使用过量，化学氧化体系缺乏专一性，成分相对复杂，副产物较多，后续需要有机试剂萃取、分离，且存在一定安全风险，在工业应用上存在明显缺陷^[31]。

1.2.3 酶促合成

由于浸提法和化学氧化法均存在诸多缺点和不足,目前关注最多的是酶促合成法。相对于其他合成方法,酶促合成法具有特异性高、得率高、副反应少等优点,正成为茶黄素的主流合成方法。王坤波等^[32]利用从梨中分离纯化的多酚氧化酶通过酶促反应合成茶黄素,从儿茶素组成、温度、pH 等探究合成茶黄素的影响因素,建立了最佳反应参数模型。李适等^[33]人从毛栓菌中分离纯化多酚氧化酶,并用于茶黄素的酶促制备:与新鲜茶叶相比,毛栓菌多酚氧化酶酶促反应制备的 TF2a 占总体茶黄素比例较高,达到总茶黄素的 68%。

目前,酶法合成茶黄素主要酶种包括过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)。过氧化物酶依赖过氧化氢的存在,可催化底物氧化,广泛存在于动植物、微生物中。相较过氧化物酶,多酚氧化酶是茶黄素酶促合成中应用更广泛的酶。多酚氧化酶是一类含铜的蛋白酶,广泛分布存在于大多数动植物(梨、苹果、马铃薯、小麦、家蚕和昆虫)和真菌(灵芝菌、多孔菌、白腐菌和曲霉菌)^[34,35]。PPO 分为三类:(1)酪氨酸酶(Tyrosinase, EC.1.14.18.1),又称单酚氧化酶,是黑色素合成途径的限速酶^[36],主要存在于双胞蘑菇和巨大芽孢杆菌等。(2)儿茶酚酶(Catechol oxidase, EC.1.10.3.2),又称单酚氧化酶,主要来源于茶叶、苹果、蓝莓、番茄等自然界的植物之中^[37]。儿茶酚酶可催化邻苯二酚等双酚底物氧化生成醌类物质,导致果蔬褐化^[38,39]。(3)漆酶(Laccase, EC.1.10.3.1)。漆酶有四个特异性铜离子^[40],可催化酚、苯、胺等多种酚类及非酚类底物的氧化、分解、聚合,在生物合成领域已崭露头角。以上多酚氧化酶是红茶加工合成茶黄素的关键酶,在茶叶加工中可以通过调控 PPO 活性来控制红茶氧化儿茶素合成 TFs 的含量,从而影响茶叶风味、等级^[41,42],其催化过程如图 1-2。

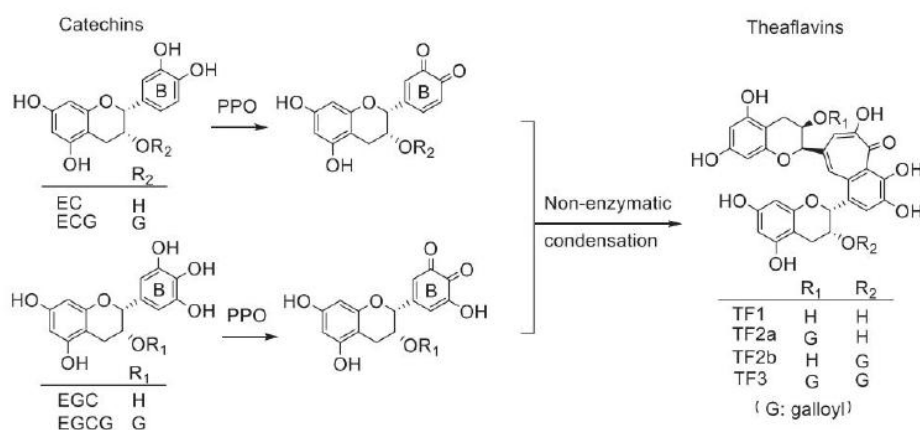


图 1-2 多酚氧化酶氧化儿茶素生成单体茶黄素^[42]

Fig. 1-2 Oxidation of catechins by polyphenol oxidase to produce monomeric theaflavins

2 漆酶及其应用

2.1 漆酶的结构与功能

漆酶（EC.1.10.3.1）是一种含多铜的多酚氧化酶，1883 年首次在日本漆树中发现^[43]。研究发现，自然界的高等植物、昆虫、细菌、真菌等生物均能分泌漆酶^[44]。Ducros 等^[45]首次研究报道了灰盖伞菌漆酶的晶体结构，随后，多个真菌漆酶的晶体三维结构得到深入研究解析，为漆酶的具体结构的认识奠定了基础。

漆酶分子通常由三个结构域和四个铜离子组成（图 1-3）。漆酶内部的四个铜离子分布于四个高度保守的结合位点上，是漆酶催化反应的活性位点^[46]。根据光谱学理论，可以将四个铜离子分为三类^[47-49]，即三个铜中心位点，分别是 I 型铜中心（含 1 个 T1 Cu 离子），以单电子受体存在，是决定漆酶电位的重要因素，也是底物结合位点；II 型铜中心（含 1 个 T2 Cu 离子），也是单电子受体，对酸碱度敏感度较高；III 型铜中心（含 2 个 T3 Cu 离子），是双电子受体，是具有抗磁性的偶合对。

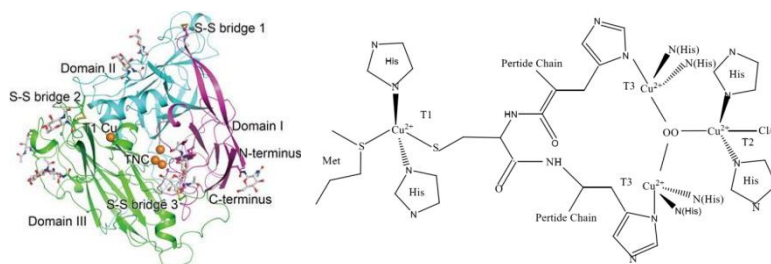


图 1-3 漆酶的三维结构示意图及漆酶活性中心示意图^[46]

Fig. 1-3 Schematic representation of the three-dimensional structure of laccase and the active center of laccase

2.2 漆酶的催化机理

漆酶属于单电子氧化酶，通过单电子反应催化不同类型底物氧化产生自由基，主要表现为自由基的形成和漆酶分子中四种铜离子的协同作用。漆酶可以通过 T1 铜介导的单电子吸附氧化还原底物形成自由基阳离子，进一步进行漆酶催化氧化。因为单电子底物的氧化与氧的四电子还原是配对的，所以可以理解漆酶的作用就像一个电池，储存每次氧化反应产生的电子来还原氧分子。因此，四个底物分子需要被氧化才能完成氧分子还原为水的过程；T1 铜位的 4 个单电子氧化的每个电子与结合的 O_2 分子一起转移到三核铜原子中心，氧分子在 T2/T3 三核区域被活化还原为水^[50]。底物在漆酶的催化作用下转换为自由基，不稳定的自由

基进一步解聚或者聚合形成新的氧化产物。以上催化氧化反应使漆酶在大分子底物的分解、小分子底物的氧化聚合等领域有极大的应用潜力。

2.3 漆酶的应用

漆酶催化底物广泛、反应过程环境友好,使其在环境污染物降解、大分子合成领域有着极大的应用前景^[51]。目前,涉及漆酶工业应用的研究,多集中在环境污染物、生物毒素等催化降解,尤其被广泛应用于造纸、污染物处理、食品加工、有机合成等行业^[52-54]。此外,漆酶在修复环境、印染加工和生物传感器等方面也多有研究^[55, 56]。

2.3.1 漆酶与造纸业

造纸行业中,纸浆中木质素含量的多少直接决定了造纸的质量高低;目前广泛使用的氯漂法会产生大量含有有机芳香族有毒化合物的工业废水,对环境造成很大的污染。漆酶能够有效脱除木质素,在纸浆生物漂白应用上存在着很大的发展前景^[57, 58]。

2.3.2 漆酶处理环境污染物

随着纺织工业的迅速发展,染料废水已成为主要水污染源之一。漆酶作为一种无毒无害、高效、反应条件温和且作用底物广泛的绿色生物酶,对于工业废水和染料副产物的降解都有着显著作用。漆酶可处理含氯酚类废水、染料和印刷行业废水、城市废水和受污染土壤等多种环境污染物。其中,漆酶对纺织、印染工业废水的处理更是收到了广泛、深入的关注。

2.3.3 漆酶与食品工业

漆酶能应用于饮料加工、食品烘烤等食品加工行业,可有效改善烘焙食品色泽和感官。啤酒、果蔬汁等饮品长期储存后会出现沉淀或者浑浊现象,这是由于其中含有的酚类或者芳胺类化合物与蛋白质结合形成大分子聚合物,造成饮品沉淀。漆酶则可以氧化果汁中的聚合物达到酚类的专一性去除,可有效防止果汁的浑浊的同时,改善了果汁的风味,提高了饮品的稳定性。如 Bezerra 等^[59]将漆酶固定在戊二醛修饰的纤维素上后用于苹果汁的净化,经过漆酶催化降解后果汁的色度和浑浊度分别降低了 61%和 29%。

2.4 漆酶-介体系统 (LMS)

漆酶可以催化多种酚类底物的氧化,但漆酶的氧化还原电势较低(0.5-0.8V),

只能氧化低氧化还原电势的酚类木质素结构,不能氧化高电位的酚类化合物和其他复杂的非酚类化合物。研究表明,一些小分子介质的加入可以介导漆酶与底物之间的氧化,进一步扩大漆酶的作用范围。漆酶与小分子介质的结合称为漆酶介质系统 (Laccase-mediator system, LMS), 其催化过程如图 1-4 所示。

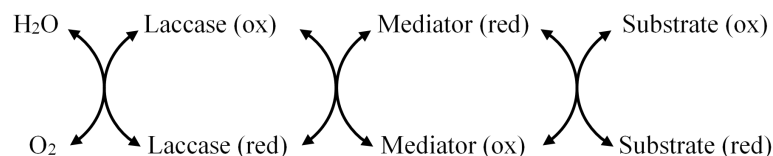


图 1-4 LMS 催化机制

Fig. 1-4 LMS catalytic mechanism

常用介体可分为人工合成介体和天然介体: 常用的人工合成介体有 2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、1-羟基苯并三唑(HBT)、盐酸异丙噻(PTC)、吩噻嗪 (PT) 等; 天然介体有丁香醛 (SA)、对香豆酸 (PCA)、3-羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA) 和乙酰香草酮 (VO) 等, 结构式如图 1-5。

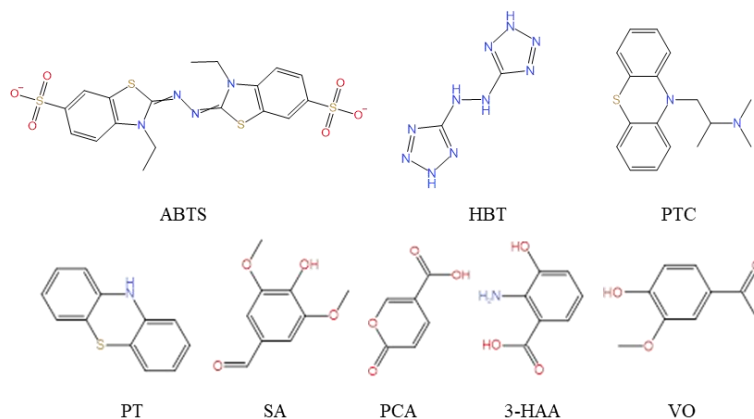


图 1-5 常用介体结构式

Fig. 1-5 Commonly used mediators formulas

迄今, LMS 系统已在纸浆漂白、染料脱色、污染物去除等方面得到广泛应用^[60]。Bourdnnais 等^[61]首次发现合成介体 ABTS 可以提高漆酶对木质素结构的催化效率。此外漆酶-HBT 系统不但可以提高纸浆漂白率, 还能有效去除胶黏物。胶黏物是废纸造纸中存在久远的技术难题, 其存在极大影响了纸机的运行效率, 漆酶-HBT 系统若能应用于工业生产, 则在提高效率的同时还能实现清洁生产。

漆酶能对多种染料直接脱色, 但不包括部分高电势的顽固染料, 利用 LMS 系统能够实现顽固染料的脱色降解^[62, 63]。Couto 等^[64]人在漆酶催化过程加入紫脲

酸(VIO)介体,能使酸性红 97 和酸性绿 26 两种顽固性染料迅速脱色,尤其是酸性红 97,3 min 内脱色率可达 90%。乙酰丁香酮(AS)、丁香醛(SA)被认为是脱色效果最佳的天然漆酶介体。Camarero 等^[58]人利用 AS、SA 参与反应的漆酶介体系统对高电势的活性黑、天空蓝两种顽固染料进行脱色,30min 内活性黑的脱色率达到 90%,天空蓝脱色率达到 30%。

随着经济迅速发展,工业污染问题日益严重,其中多氯芳香族化合物等污染物尤其突出。LMS 能氧化多种污染物转化成毒性较弱的不溶性沉淀,从而实现污染物的去除^[65]。Vandertol 等^[66]研究发现 ABTS 能辅助漆酶催化降解蒽,且在一定范围内降解率与介体添加量成正相关关系。漆酶-ABTS 系统能够有效降解土壤中的顽固除草剂—沙草隆^[67],土壤中的沙草隆自然降解 50 天后,仍会有 50% 以上的残留物,但经过漆酶-ABTS 系统处理 24h,能有效降解 90%。

迄今,LMS 系统已在纸浆漂白、染料脱色、污染物去除等方面得到广泛应用。然而,LMS 在工业化应用中存在一些问题。反应体系的漆酶与介体多为游离添加,造成漆酶与底物、产物无法有效分离,漆酶难以回收再利用;反应过程中生成的介体衍生物可能钝化漆酶活力;产物中残留的介体或介体衍生物容易造成二次污染。固定化技术为 LMS 体系中的漆酶、介体的可回收利用提供了有效的解决方案。

2.5 固定化技术应用于漆酶/介体

漆酶具有底物的广泛性和催化的专一性,且产物单一,来源广泛,反应条件温和,但游离漆酶对环境敏感,易失活,无法重复利用。通过固定化可以有效提高漆酶的稳定性和环境耐受性,扩大其应用范围。

2.5.1 固定化方法

(1) 吸附法:通过酶分子与载体间的静电作用、氢键或范德华力作用,可实现游离漆酶在载体上的固定。Cristova 等^[68]通过吸附法将漆酶固定在绿椰纤维上,发现固定化酶的稳定性相对于游离漆酶显著提高。Jia 等^[69]选择合成材料 Meso-MIL-53(Al)为骨架作为载体,对漆酶固定化,用来催化降解二氯苯氧氯酚,固定后的 Lac-MIL53(Al)活性回收率及稳定性都得到显著增强,经 8 次重复使用后仍能保持约 60 % 的活性。吸附法固定条件温和,使用成本低且对酶的影响较小,但由于酶和载体间作用力弱,可能会导致酶的脱落率较高。

(2) 包埋法: 利用载体材料的多孔结构特性可将酶包埋在载体中^[70], 反应条件温和, 且酶分子不与载体发生化学结合, 因此酶的结构分子几乎不会改变, 对酶的活性影响较小。姚稼灏等^[71]将甲酸脱氢酶(FDH)包埋在AP-微球内, 并探究了交联剂中 CaCl_2 和APTES的最佳浓度, 实验证明AP-微球可达到100%固定率, 且重复使用九次后仍保持FDH活性。但包埋法只适用于小分子的底物和产物, 避免在催化过程中由于产物堆积造成的扩散的限制性^[72]。

(3) 交联法: 使用功能交联剂使酶分子和载体通过共价交联的方式固定^[73], 交联剂两端的基团分别连接酶分子和载体上的活性基团, 如氨基、羧基等。目前使用广泛的交联剂有戊二醛、双胺联苯、双偶氮苯等。

(4) 共价结合法: 将酶分子上的基团通过共价结合的方式固定在载体上^[74], 是目前普遍使用的酶固定化方法, 有良好的稳定性和可重复性, 但反应比较剧烈, 操作复杂, 需要根据特定的酶选择合适的载体。周磊等^[75]以纳米纤维素膜为载体通过共价结合固定化辣根过氧化物酶, 研究证明固定化酶的最大载酶量为88.27mg/g, 且pH稳定性、热稳定性、储存稳定性和重复使用性相对于游离酶都有了显著提高。

2.5.2 固定化载体

固定化酶中载体的选择至关重要, 载体的结构和功能直接影响了酶的活性。选择固定化载体时应考虑充分^[76]: 载体会不会与底物反应; 载体是否存在与酶结合的基团; 载体是否稳定能够重复多次使用; 载体是否无毒无害且成本低廉。适宜的载体不仅可以提高酶活及酶的稳定性, 还可以简化固定过程, 从而进一步实现工业化生产。迄今, 天然高分子材料海藻酸钠成为固定化载体的热门选择之一。

海藻酸钠是一种天然多糖, 具有一定的稳定性、溶解性粘性和安全性^[77]。海藻酸钠的分子存在多个亲水性基团, 如羟基和羧基。G嵌段(α -L-古洛糖醛酸)与这些亲水性基团结合, 形成亲水性空间。当海藻酸钠在溶液中与 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 等离子共存时, 这些离子会占据亲水空间的中心, 并与G嵌段上的羧基氧原子发生配位作用, 从而形成一个三维网状凝胶结构, 类似于一个“蛋壳”^[78]。

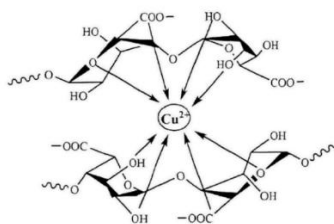
图 1-6 海藻酸铜凝胶的蛋盒结构^[78]

Fig. 1-6 Egg cartridge structure of copper alginate gels

2.5.3 漆酶-介体共固定

Jahangiri 等^[79]将聚甲基丙烯酸酯、三乙二醇二丙烯酸酯和 ABTS 的混合物在 -20℃ 冷冻，然后以 12 kGy 的辐射剂量照射混合物至使聚合反应达到交联 ABTS 的效果。并应用于双酚 a 的催化降解。Sun 等人^[80]研究了丙烯酰胺与氧化还原介质乙酰丙酮聚合，然后将漆酶包埋在壳聚糖凝胶中，制造出一种共同固定的催化剂，用于孔雀石绿的脱色。然而，通过辐照和聚合固定介质很难控制辐照剂量，而且容易改变介质的化学性质，失去其原有的氧化还原特性。

Gao 等^[81]合成了氨基功能化的磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒，通过戊二醛交联将漆酶和 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧 (TEMPO) 共同固定。尽管漆酶和 TEMPO 的共吸附催化特性均未发生变化，但在催化 16 小时后，紫红素的脱色率仍达到 68.8%。传统的交联剂（如戊二醛）会与酶的氨基发生剧烈反应，这可能会导致漆酶的结构刚性发生变化。Gu 和 Xue 等人^[82, 83]构建了功能化纤维素和海藻酸钙来共同固定漆酶和介质，消除了 99.7% 的吡啶和 100% 的介质。然而，共同固定化系统的应用仍然受到漆酶来源、介质类型匹配和固定化效率等因素的影响。

3 课题的提出和主要研究内容

3.1 研究背景与意义

红茶中的茶黄素含量低，仅占其干重的 0.3%-1.5%，利用红茶原料直接提取茶黄素，成本高、纯度低且乙酸乙酯等有机溶剂消耗大。化学氧化法被应用于茶黄素的制备，存在酸碱试剂用量大、副产物多等不足。内源或外源多酚氧化酶氧化制备茶黄素反应条件温和，催化效率高，被认为是最具备潜力的茶黄素工业化生产技术。

目前，漆酶-介体共固定的研究相对较少，且多应用于污染物降解，鲜有应用于茶黄素的合成。本研究以化学修饰法在海藻酸盐上分别接枝 GMA 及 PDA，

利用 GMA、PDA 上的环氧基团、酚羟基进行漆酶的共价固定，同时以包埋方式固定小分子介体，最终制备漆酶-介体共固定催化剂，应用于催化低值茶多酚原料合成高值茶黄素，并评价催化产物生物安全性，实现催化剂的可回收再利用，为茶黄素的规模化制备奠定基础。论文的技术路线如图 1-6。

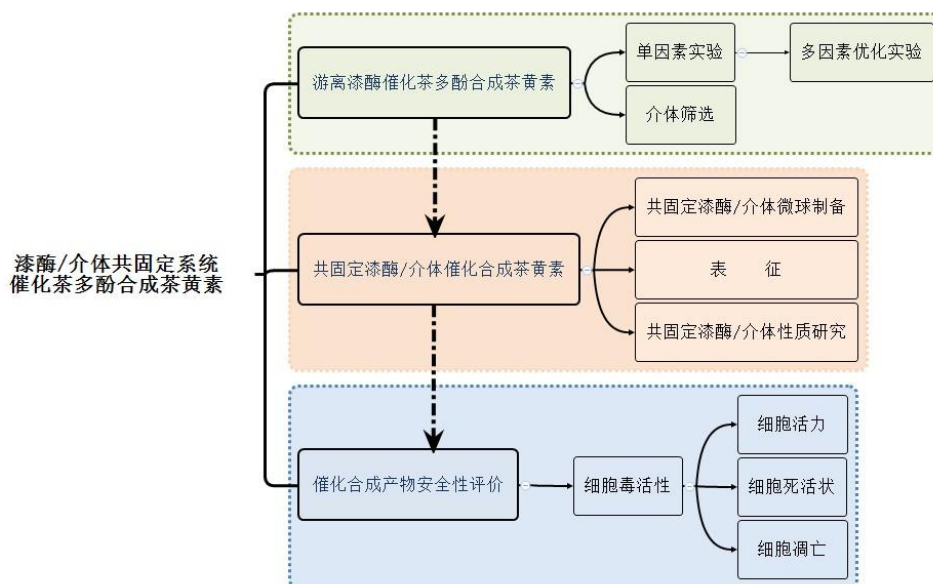


图 1-7 技术路线

Fig. 1-7 Technology route

3.2 主要研究内容

(1) 研究漆酶催化底物茶多酚生成茶黄素的可行性。以游离漆酶为催化剂，考察漆酶用量、底物浓度、反应时间及 pH 等因素对茶黄素生成的影响，获得游离漆酶催化茶多酚合成茶黄素的工艺参数。并对介体的种类和添加量进行初筛，获得备用介体，用于后继漆酶-介体共固定。

(2) 制备漆酶-介体共固定微球，应用于茶黄素酶促合成。以海藻酸钙为载体，经多巴胺、甲基丙烯酸缩水甘油酯对其进行功能化修饰后，制备双功能载体，实现漆酶-介体的共固定，获得共固定化水凝胶微球 Lac@PDG-Ca@ABTS。通过 FT-IR、SEM、EPR、荧光显微镜等手段进行表征验证；研究共固定化微球的稳定性，以及不同条件对共固定效率及茶黄素产率的影响。

(3) 评价催化产物的生物安全性。通过 HepG 细胞的相关指标如细胞活性、细胞周期和细胞凋亡，探究共固定漆酶-介体微球催化茶多酚合成茶黄素的催化产物的体外安全性。

第二章 游离漆酶催化茶多酚合成茶黄素

1 引言

漆酶是一类糖蛋白氧化酶，可以利用空气中氧气作为电子受体，直接生成 H_2O 。漆酶是一种洁净的生物降解的途径，在纺织印染废水脱色、环境污染物降解、精细化工合成等领域具有广阔的应用潜力，但是漆酶自身氧化还原电势较低，对于氧化还原电势较高的分子作用较小。一些小分子化合物可以充当介体，使漆酶通过电子转移，作用于高电位底物，进而实现漆酶的高效催化氧化。

本部分以游离漆酶为催化剂，考察漆酶用量、底物浓度、反应时间及 pH 等因素对共固定化效率及茶黄素生成的影响，获得游离漆酶催化茶多酚合成茶黄素的工艺参数。并对介体的种类和添加量进行初筛，获得备用介体，用于后继漆酶-介体共固定。

2 实验试剂与仪器

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagents

名称	纯度	供应商
茶多酚	AR	麦克林
茶黄素	GR	上海同田
茶黄素 -3-没食子酸酯	GR	上海同田
茶黄素 -3'-没食子酸酯	GR	上海同田
茶黄素双没食子酸酯	GR	上海同田
甲醇	色谱级	阿拉丁
乙腈	色谱级	阿拉丁
2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸	AR	阿拉丁
1-羟基苯并三唑	AR	阿拉丁
2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧	AR	阿拉丁
乙酰香草酮	AR	阿拉丁
对香豆酸	AR	阿拉丁
丁香醛	AR	阿拉丁
香草醛	AR	阿拉丁
乙酰丁香酮	AR	阿拉丁
漆酶	/	合肥博美生物

表 2-2 实验仪器
Table 2-2 Experimental instruments

名称	型号	供应商
电子天平	BS-124S	北京赛多利斯
纯水仪	Milipore Elix 3	美国 MILIPORE 公司
电动搅拌器	HD2004W	上海司乐仪器公司
恒温水浴锅	HH-4	金坛市科杰仪器厂
恒温振荡培养箱	ZQZY-78BV	上海知楚仪器有限公司
超声波清洗机	KQ-400KDB	昆山市超声仪器有限公司
精密 pH 计	LE438	上海精密科学仪器有限公司
微型涡旋混合仪	WH-3	上海沪西公司
高效液相色谱仪	LC-20A	日本岛津公司

3 实验方法

3.1 漆酶酶活测定方法

以 ABTS 为底物,反应体系内包括 1.8 mL pH 4.5 的 50 mM 琥珀酸钠缓冲液、0.8 mL 1 mM ABTS、0.4 mL 适当稀释的酶液,在 30°C 水浴条件下反应 30 min,在 420 nm 处测定吸光度,以灭活的酶液反应混合液为对照,一个酶活力单位(U)定义为:在上述条件下,每分钟催化氧化 1 μmol ABTS 所需要的酶量.计算公式如下所示:

$$\text{酶活 (U)} = \frac{V_T \times \Delta A \times 10^{-6}}{\epsilon \times V_s \times \Delta t} \times n$$

其中 $\epsilon=3.6 \times 10^4 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$; ΔA : 吸光度的变化值; Δt : 反应时间; V_T : 酶反应液总体积; V_s : 反应液中酶液体积; n : 酶液稀释倍数。试验重复 3 次,取平均值。

3.2 茶黄素的检测方法

茶黄素标准储备液:取 1 mg 的茶黄素标准品,用乙腈配置成浓度为 1 mg/mL 的母液, -20°C 避光保存。

茶黄素液相标准液:将上述的标准储备液稀释成 100、200、500、1000、5000 ng/mL 的标准液。

参考国标 GBT30483,通过高效液相法检测茶黄素含量:通过素高效液相色谱

谱法检测：色谱柱：Shim-packGIST-C18 液相色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）。流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，流动相 B 为乙腈溶液。流速 0.8 mL/min，进样量 20 μL，检测波长 280 nm，柱温 30℃。梯度洗脱设置见表 2-3。

表 2-3 HPLC 洗脱梯度

Table 2-3 HPLC elution gradients

流动相	时间/min								
	0	6	10	25	35	40	49	49.01	50
A/%	8	8	15	25	25	27	27	8	8
B/%	92	92	85	75	75	73	73	92	92

茶黄素含量计算公式如下所示：

$$\text{茶黄素含量}(\%) = \frac{A \times f_{std} \times V \times d}{m \times 10^6 \times \omega} \times 100$$

式中： A -所测样品中被测成分的峰面积； f_{std} -所测成分的校正因子（μg/mL）； V -样品体积（mL）； d -稀释因子； m -样品量（g）； ω -样品的干物质含量（%）

3.3 漆酶催化茶多酚合成茶黄素单因素实验

选取漆酶添加量、底物浓度、反应时间、反应 pH 四个因素进行单因素实验，以反应体系中茶黄素产率指标，研究不同因素的变化对合成茶黄素的影响。

3.3.1 漆酶添加量对合成茶黄素产率的影响

探究漆酶添加量对漆酶催化合成茶黄素的影响，在 50 mL 1 mg/mL 茶多酚溶液中分别添加 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mg 漆酶，在 30℃，200 r/min 条件下反应 45 min。反应结束后，将整个反应体系以 30 s 微波终止反应，3000 rpm 下离心 10 min 后，取上清，过 0.45 μm 滤膜后，通过高效液相色谱检测茶黄素产率。

3.3.2 底物浓度对合成茶黄素产率的影响

探究底物浓度对漆酶催化合成茶黄素的影响，分别在 50 mL 0.5、1、1.5、2、2.5 mg/mL 茶多酚溶液中添加 0.1 mg 漆酶，在 30℃，200 r/min 条件下反应 45 min。反应结束后，将整个反应体系 30s 微波终止反应，以 3000 rpm 离心 10 min 后取上清，过 0.45 μm 滤膜后通过高效液相色谱检测茶黄素产率。

3.3.3 反应时间对合成茶黄素产率的影响

探究反应时间对漆酶催化合成茶黄素的影响，在 50 mL 1.4 mg/mL 茶多酚溶

液中添加 0.1 mg 漆酶，分别在 30℃，200 r/min 条件下反应 15、30、45、60、75 min。反应结束后，将整个反应体系 30 s 微波终止反应，以 3000 rpm 离心 10 min 后取上清，过 0.45 μm 滤膜后通过高效液相色谱检测茶黄素产率。

3.3.4 反应 pH 对合成茶黄素产率的影响

探究反应 pH 对漆酶催化合成茶黄素的影响，在 50 mL pH 分别为 2.8、3.6、4.4、5.2、6 的 1.4 mg/mL 茶多酚溶液中添加 0.1 mg 漆酶，在 30℃，200 r/min 条件下反应 45 min。反应结束后，将整个反应体系 30s 微波终止反应，以 3000 rpm 离心 10 min 后取上清，过 0.45 μm 滤膜后通过高效液相色谱检测茶黄素产率。

3.4 漆酶催化茶多酚合成茶黄素多因素实验

为了探究漆酶催化合成茶黄素的最优条件，在单因素的基础上，以漆酶添加量、底物浓度、反应时间、反应 pH 为因素，茶黄素产率为评价指标，设计四因素三水平响应面实验。表 2-4 为响应面实验因素水平。

表 2-4 响应面试验因素水平
Table 2-4 Response surface test factor level

水平	因素			
	A 漆酶添加量	B 底物浓度	C 反应时间	D
	/mg	mg/mL	/min	pH
-1	0.05	1	30	3
0	0.1	1.4	45	3.5
1	0.15	1.8	60	4

3.5 介体种类筛选

选取八种天然和人工合成小分子介体分别为 ABTS、HBT、TEMPO、VO、SA、VA、AS、PCA。将小分子介体添加到漆酶催化茶多酚体系中，形成漆酶-介体系统（LMS）应用于催化茶多酚合成茶黄素。50 mL 反应体系由 1.4 mg/mL 茶多酚、0.2 mM 介质和 0.1 mg 漆酶组成。在 30℃ 的恒温振荡器中以 200 r/min 的速度反应 45 分钟后，测量茶黄素的产率，以评估由不同介质组成的 LMS 对黄素合成的影响，并为后续的共同固定化获得最佳介质。

3.6 介体添加量

探究介体添加量对漆酶催化茶多酚合成茶黄素的影响。在 50 mL 含有 1.4 mg/mL 茶多酚、0.1 mg 漆酶的反应体系中分别添加 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mmol/L 的介体，在 30℃，200 r/min 条件下反应 45 min。反应结束后，将整个反应体系

30 s 微波终止反应，以 3000 rpm 离心 10 min 后取上清，过 0.45 μm 滤膜后通过高效液相色谱检测茶黄素产率。

4 结果和讨论

4.1 茶黄素检测方法的确定

4.1.1 茶多酚、茶黄素检测

结果如图 2-1，根据出峰时间判断图 2-1 (a) 中的六个主峰分别为 GA、EGC、C、EC、EGCG、ECG，是茶多酚中的主要儿茶素成分。茶多酚在漆酶的催化作用下生成的各种茶黄素单体如图 2-1 (b) 所示，根据出峰时间判断，分别为 TF (TF1)、TFDG (TF3)、TF3G (TF2a)、TF3'G (TF2b)。

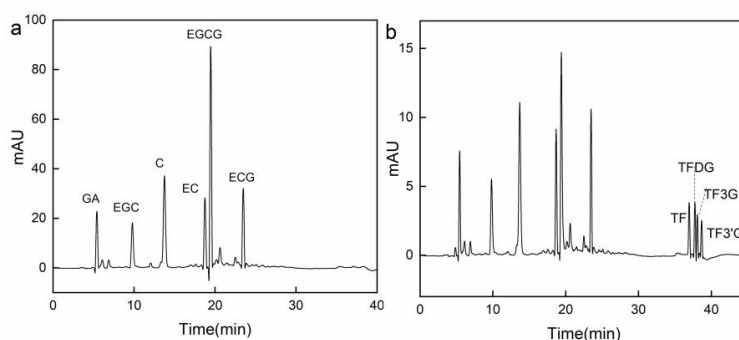


图 2-1 茶多酚(a)、茶黄素 (b) 高效液相色谱图
Fig.2-1 HPLC of tea polyphenols (a) and theaflavins (b)

4.1.2 茶黄素标准曲线绘制

高效液相法检测茶黄素含量。如图 2-2 通过对茶黄素四种单体标准品的保留时间进行比较确定待测样品中的四个单体峰，用相应的标准曲线计算茶黄素含量。

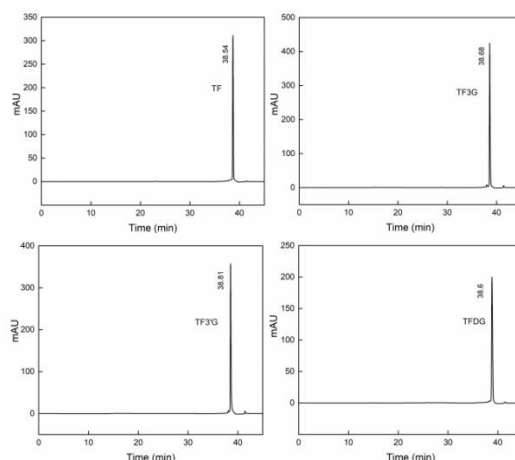


图 2-2 茶黄素四种单体高效液相色谱图
Fig.2-2 HPLC of four monomers of theaflavins

对茶黄素四种单体标准液进行高效液相检测，图 2-3 是绘制的茶黄素四种单体的标准曲线，茶黄素单体含量与峰面积呈线性关系，且误差较小，可以用该曲线来计算茶黄素含量。

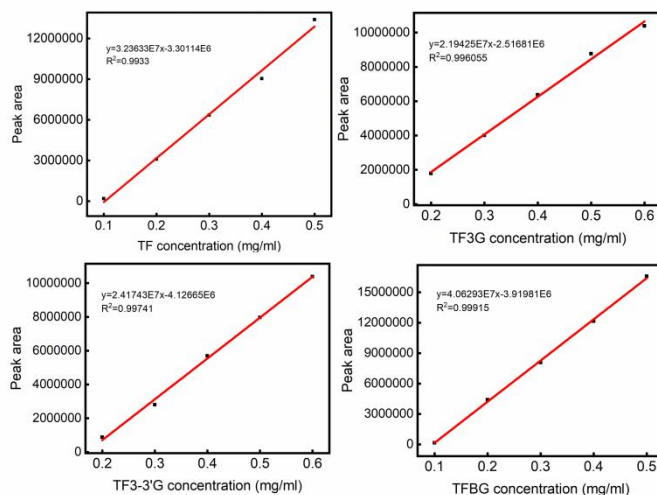


图 2-3 茶黄素四种单体标准曲线

Fig.2-3 Standard curve of four monomers of theaflavin

4.2 漆酶催化合成茶黄素单因素实验

4.2.1 漆酶添加量对茶黄素产率的影响

作为生物催化剂，漆酶的添加量是影响催化效率的重要因素，添加量较少无法达成最佳催化效果，添加量过多可能会导致酶的空间位阻过大降低漆酶活力。如图 2-4，当漆酶添加量从 0.05 mg 增加到 0.1 mg 时，茶黄素产率有明显提高，达到最大值，继续提高漆酶添加量时，茶黄素产率却逐渐减少，可能是因为过量漆酶在反应体系中，增加了酶分子的空间阻力，从而抑制漆酶酶活，导致茶黄素产率下降，且过量漆酶可能将茶黄素进一步氧化成茶红素、茶褐素等，导致茶黄素产率降低。

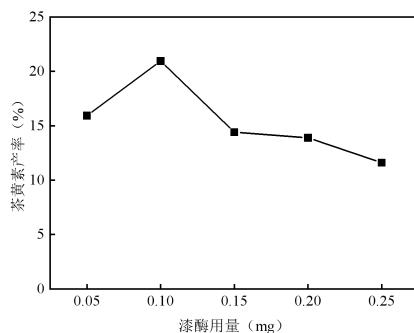


图 2-4 漆酶添加量对茶黄素产率的影响

Fig.2-4 Effect of laccase addition on the yield of theaflavin

4.2.2 底物浓度对茶黄素产率的影响

在一定的酶浓度条件下，底物浓度与酶活性之间存在显著的正相关关系，但由于茶多酚不仅是反应的底物，还是漆酶的天然变性剂和沉淀剂，高浓度的底物会使某些酶失去活性，使其失去正常的催化作用，而如果底物的浓度太低，则无法达到最大的酶催化效果。如图 2-5，当底物浓度在 0.5-1.5 mg/mL 间，产率随着底物浓度的增加而增加，在 1.5 mg/mL 时达到最大值，当底物浓度继续增加时，茶黄素产率随之减小，此时反应中可能出现底物抑制现象。

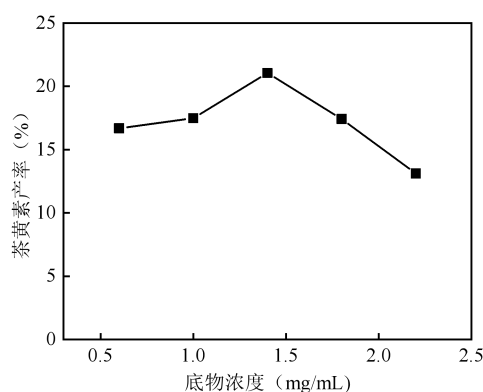


图 2-5 底物浓度对茶黄素产率的影响

Fig.2-5 Effect of substrate concentration on the yield of theaflavins

4.2.3 反应时间对茶黄素产率的影响

通过苯骈环化作用，儿茶素首先被氧化为邻醌，然后通过邻醌间的配对聚合，产生茶黄素，茶黄素可以通过氧化作用而产生茶红素和茶褐素，所以必须对反应时间进行控制，如图 2-6，随着反应时间增加，茶黄素产率逐渐提高，在 45 min 达到最高值后开始下降，可能是因为反应时间过长后，导致茶多酚转化成茶黄素后进一步转化成茶红素等其他产物，不利于定向合成茶黄素。

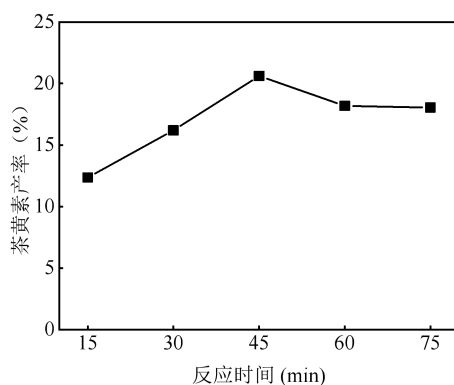


图 2-6 反应时间对茶黄素产率的影响

Fig.2-6 Effect of response time on the yield of theaflavins

4.2.4 反应 pH 对茶黄素产率的影响

酶作为活性蛋白质，受外界酸碱环境影响很大，pH 值的细微偏差会引起酶活性位点的离子化，从而导致酶活力下降；如果发生更大的偏差，会扰乱维持酶三维结构的许多非共价键，从而使酶发生退化，导致酶蛋白的变性。如图 2-7，当反应 pH 从 2.8 增大到 3.6 时，茶黄素产率显著提高，但当 pH 继续增加时，茶黄素产率呈下降趋势，说明漆酶在酸性条件下活性更高，且茶多酚和茶黄素的化学机构决定了其在碱性条件下的不稳定性，进一步导致茶黄素产率下降。

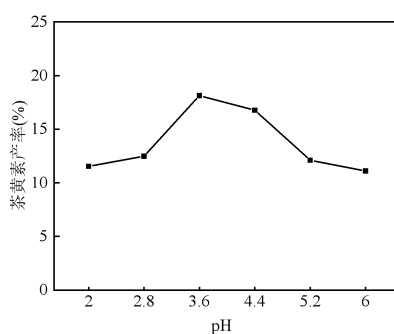


图 2-7 反应 pH 对茶黄素产率的影响

Fig.2-7 Effect of Reaction pH on the yield of theaflavins

4.3 漆酶催化合成茶黄素多因素实验

在单因素实验的基础上，选择漆酶添加量 (A)，底物浓度 (B)，酸碱度 (C) 和反应时间 (D) 四个因素进行响应面优化设计，并以茶黄素产率 (Y) 为响应指标，按照下表进行酶促茶多酚合成茶黄素实验。通过 Design-Expert12.0.3.0 软件对表 2-5 进行数据分析。

表 2-5 响应面实验设计及结果

Table 2-5 Response surface test design and results

试验号	A 漆酶添加量	B 底物浓度	C pH	D 反应时间	茶黄素产率 (%)
1	0.1	2	2.8	45	24.57
2	0.05	2	3.6	30	23.23
3	0.05	1	3.6	45	23.35
4	0.15	1.5	3.6	60	22.57
5	0.05	1.5	2.8	45	21.25
6	0.05	1.5	4.4	60	23.35
7	0.1	1	2.8	45	22.02
8	0.1	1.5	3.6	45	26.79
9	0.1	1	4.4	45	24.79

10	0.1	1.5	4.4	45	21.35
11	0.05	2	4.4	45	22.68
12	0.1	1.5	3.6	30	20.36
13	0.1	1.5	4.4	30	22.57
14	0.05	1.5	3.6	30	22.02
15	0.1	1	3.6	60	24.24
16	0.1	1.5	2.8	45	21.81
17	0.1	1.5	4.4	45	22.57
18	0.15	2	3.6	60	22.8
19	0.1	1	3.6	45	22.8
20	0.15	1.5	3.6	45	26.79
21	0.1	1.5	2.8	30	21.46
22	0.1	1.5	2.8	60	22.91
23	0.15	1.5	3.6	45	26.79
24	0.1	1.5	3.6	60	22.57
25	0.15	1.5	3.6	45	27.12
26	0.15	1	3.6	30	22.91
27	0.1	1.5	3.6	45	27.23
28	0.1	2	3.6	45	22.02
29	0.1	2	3.6	45	21.81

实验结果方差分析如表 2-6 所示，P 值小于 0.0001，说明优化效果极显著，模型有效。失拟项 P 值为 $0.0997 > 0.05$ ，不显著，说明模型没有失拟，则该回归模型成立，可用于本次实验的优化。从各因素显著性水平差异可知，底物浓度（B）、酸碱度（C）对茶黄素产率存在显著差异，漆酶添加量（A）、反应时间（D）对茶黄素产率的影响存在极显著差异。

表 2-6 回归模型方差分析
Table 2-6 Variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	101.99	14	7.28	51.27	< 0.0001	significant
A-漆酶添加量	1.47	1	1.47	10.35	0.0062	
B-底物浓度	0.7500	1	0.7500	5.28	0.0375	
C-酸碱度	0.9020	1	0.9020	6.35	0.0245	
D-反应时间	2.89	1	2.89	20.35	0.0005	
AB	0.0289	1	0.0289	0.2034	0.6589	
AC	0.1089	1	0.1089	0.7664	0.3961	

AD	0.6889	1	0.6889	4.85	0.0449	
BC	5.43	1	5.43	38.21	< 0.0001	
BD	0.7744	1	0.7744	5.45	0.0350	
CD	0.1122	1	0.1122	0.7898	0.3892	
A ²	58.21	1	58.21	409.71	< 0.0001	
B ²	12.77	1	12.77	89.89	< 0.0001	
C ²	29.69	1	29.69	208.97	< 0.0001	
D ²	30.88	1	30.88	217.36	< 0.0001	
Residual	1.99	14	0.1421			
Lack of Fit	1.81	10	0.1805	3.93	0.0997	not significant
Pure Error	0.1839	4	0.0460			
Cor Total	103.98	28				

以茶黄素产率为响应值，通过计算得出的漆酶添加量（A），底物浓度（B），酸碱度（C）和反应时间（D）之间交互作用的响应面图，结果见图 2-8。如图所示，所选范围内，漆酶添加量与底物浓度、漆酶添加量与 pH、pH 与反应时间对茶黄素产率的影响不产生显著影响。而漆酶添加量与时间、底物浓度与反应时间对茶黄素产率的交互影响达到显著水平，底物浓度和 pH 则达到了极显著水平。以上诸因素间交互作用显著。

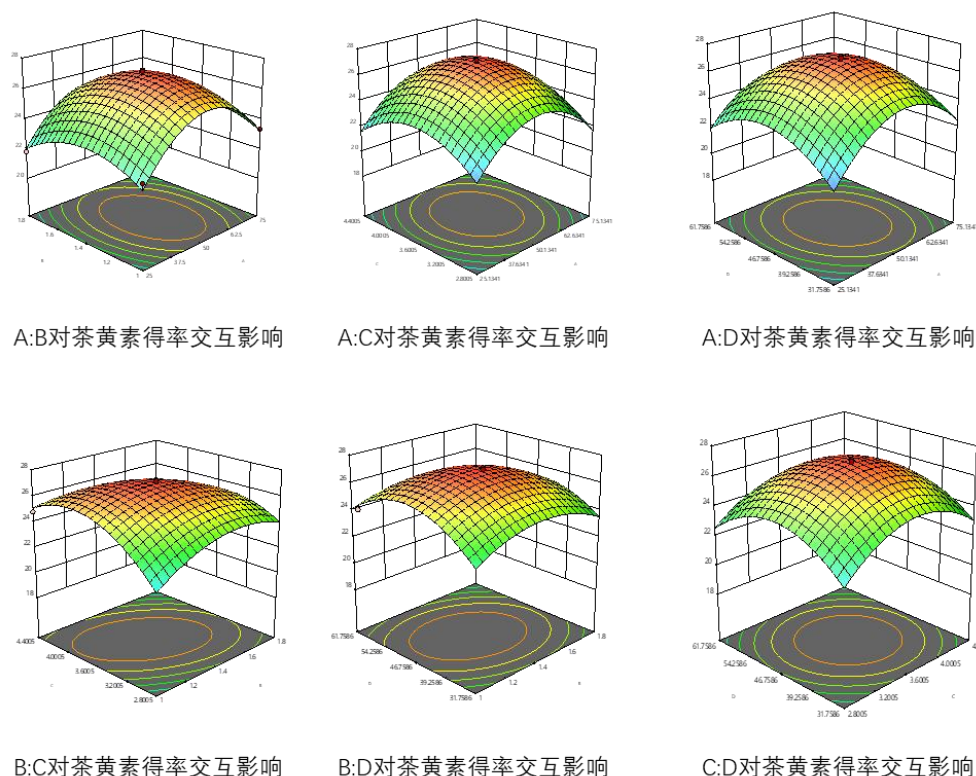


图 2-8 各因素交互影响响应面图

Fig.2-8 Response surface plots of the interaction of factors

通过 Design-Expert12.0.3.0 软件对响应面结果进行回归方程拟合，得到的多项式为

$$Y=26.944+0.35A-0.25B+0.2741C+0.4908D-0.0849AB+0.165AC-0.415AD-1.165BC-0.44BD-0.1675CD-2.99575 A^2-1.40325B^2-2.1395C^2-2.182D^2$$

，相关系数 $R^2=0.9809$ 。

得到最优条件：漆酶添加量为 0.103 mg，底物浓度为 1.339 mg/mL，pH 3.683、反应时间 46.78 min，且预测的茶黄素产率为 27.016%。考虑实际操作的可性，将此条件微调至：漆酶添加量为 0.1 mg，底物浓度为 1.34 mg/mL，pH 3.7 和反应时间为 47 min，通过验证试验检测的茶黄素产率为 26.47%，与预测值误差 2%，说明优化条件结果是可靠的。

4.4 介体种类筛选

八种典型人工和天然小分子介体在游离 LMS 体系中对漆酶催化茶多酚合成茶黄素的影响如图 2-9 所示。漆酶自身具有催化茶多酚合成茶黄素的能力，产率约为 24.52%，介体加入后，不同程度影响茶黄素的合成率。PCA 显著抑制茶黄素的合成。HBT、TEMPO、SA、VA 对茶黄素产率无显著影响。AS、VO 可显著提升茶黄素产率，尤其以 0.2mM ABTS 加入将茶黄素产率提高了 52.65%。

LMS 的催化效率跟介体自由基的稳定性密切正相关。普遍认为，介体化学结构上取代基的供电子能力越强，介体自由基越稳定，这提供了其与漆酶更高的反应活性。取代酚具有与漆酶相当的电学电势，漆酶对酚类化合物的反应活性因苯环上的供电子取代基的存在而增强，这些取代基降低了它们的电学电势。VO、AS 是天然酚类物质，属于苯氧自由基，其酚羟基邻位有供电子的 $-H_3CO$ 取代基，促进了苯自由基的稳定性，这降低了其发生聚合、重排等反应的几率，使其可被漆酶快速氧化，进而通过电子传递实现对底物茶多酚的快速氧化，因此 VO、AS 显著促进了茶黄素的合成效率。ABTS 属于 N 自由基，其苯环结构中的 2 个 $-SO_3^-$ 基团具有更强烈的供电子能力，这增大了 ABTS 中 N 自由基的电子云密度，使其能维持稳定且与漆酶的反应活性更强，因此协助漆酶催化茶多酚合成茶黄素的效率最高。考虑到成本、毒性等多方面因素，采用 ABTS 为添加介体。

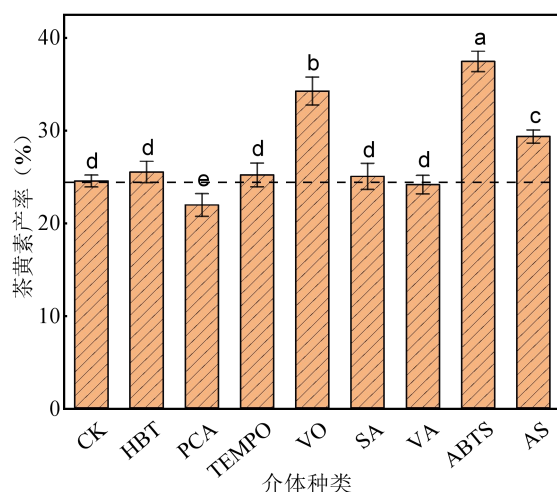


图 2-9 介体种类筛选

Fig.2-9 Medium type screening

4.5 介体添加量筛选

LMS 系统中，介体是一类电子传递的中介体，承担了间接催化氧化的角色。以 ABTS 为例，漆酶首先氧化 ABTS，ABTS 失去电子形成了氧化态的阳离子自由基 ($ABTS^+$)，然后， $ABTS^+$ 进攻底物获得电子使自身被还原，重新恢复成初始还原态的 ABTS。这样，ABTS 就在一个循环内完成了再生，底物因为失去电子而被氧化。虽然介体自身在 LMS 系统中能完成还原态和氧化态的循环互变，其本身并不被消耗，但其添加量直接影响其与漆酶的适配。

以介体添加量作为影响因素，探究体系对茶多酚催化效果的影响，如图 2-10

所示当介体浓度在 0.1-0.2 mmol/L 时，随着介体添加量的增加，漆酶对茶多酚的催化效果不断增加，在 0.2 mmol/L 时，茶黄素产率达到最大为 38.6%，当介体添加量继续增加时，相对于单独漆酶，其对茶多酚的催化效率仍在提高但提高的程度再不断降低，因此过高的介体浓度会抑制反应进行，因此选取 0.2 mmol/L 作为 ABTS 最适添加量。

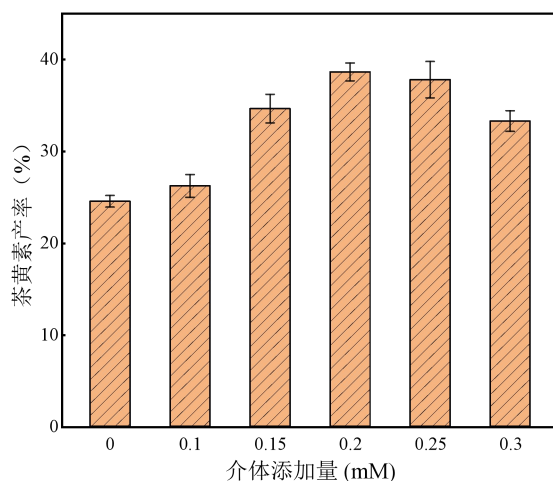


图 2- 10 介体添加量的筛选

Fig.2-10 Screening of mediator additions

5 小结

本章节构建了茶多酚和茶黄素的检测方法，确定了高效液相色谱检测条件。使用游离漆酶催化茶多酚合成茶黄素，并通过单因素和多因素实验得到最佳催化条件为：漆酶添加量 0.1 mg，底物浓度 1.34 mg/mL，pH 3.7、反应时间 47 min，在此条件下通过验证试验得到的茶黄素产率为 26.47%。实验证明介体的加入对漆酶催化茶多酚合成茶黄素起促进作用，对选择的天然和人工合成小分子介体的种类和添加量进行筛选，最终确定 ABTS 为添加介体，且最适添加量为 0.2 mmol/L，为后续的实验奠定实验基础。

第三章 共固定漆酶-介体系统催化茶多酚合成茶黄素

1 引言

漆酶和介体共同参与催化降解底物的体系叫做漆酶-介体体系 (LMS)。迄今, LMS 系统已在纸浆漂白、染料脱色、污染物去除等方面得到广泛应用。然而, LMS 在工业化应用中存在一些问题。反应体系的漆酶与介体多为游离添加, 造成漆酶与底物、产物无法有效分离, 漆酶难以回收再利用; 反应过程中生成的介体衍生物可能钝化漆酶活力; 产物中残留的介体或介体衍生物容易造成二次污染。针对以上问题, 固定化技术为 LMS 体系中的漆酶、介体的可回收利用提供了有效的解决方案。

本章节以海藻盐为载体材料, 通过化学合成法将 GMA 和 DA 接枝到海藻酸钙上, 使介体和漆酶共同固定到载体上, 得到共固定漆酶-介体水凝胶微球 Lac@PDG-Ca@ABTS。通过 FT-IR、SEM、EPR、荧光显微镜等手段进行表征验证; 研究共固定化微球的稳定性, 以及不同条件对共固定效率及茶黄素产率的影响。

2 实验试剂与仪器

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagents

名称	纯度	供应商
海藻酸钠	AR	上海生工
盐酸多巴胺	AR	麦克林
甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)	AR	麦克林
N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)	AR	麦克林
1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳	AR	麦克林
二亚胺盐酸盐(EDC)		
过硫酸钾	AR	麦克林

其他试剂同 2.1

表 3-2 主要仪器
Table 3-2 Main instruments

名称	型号	供应商
真空冷冻干燥机	SJIA-10N-50A	宁波双嘉仪器有限公司
透射电子显微镜	JSM-6700F	日本 JEOL 公司
傅里叶变换红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
荧光倒置显微镜	TS2R-FL	日本 Nikon 公司

其他仪器同 2.1

3 实验方法

3.1 共固定漆酶-介体体系的制备

在三颈烧瓶中加入 0.5 g 的海藻酸钠和 45 mL 去离子水，60 °C，500 rpm 的条件下搅拌至完全溶解。在氮气的保护下，依次加入 45 mg 过硫酸钾和 200 uL GMA，搅拌 2 h 使其充分溶解。室温冷却静置 30 min 后，加入 113 mg EDC 和 67 mg NHS 搅拌活化 40 min，将 150 mg 多巴胺加入烧瓶中继续反应 4 h，反应结束后加入 5 mL 2 mM ABTS 反应 30 min，随后将 50 mg 漆酶加入到体系中搅拌 30 min 得到胶状液体，静置除去溶液中的气泡，最后将溶胶通过 0.55 mm 注射器滴入到 4%的 CaCl₂ 溶液中，滴速为 1 mL/min，固化交联 40 min，去离子水洗涤三次，得到共固定漆酶-介体微球 Lac@PDG-Ca@ABTS。

3.2 共固定漆酶酶活测定

以 ABTS 为底物，取 1.0 g 共固定漆酶-介体微球在离心管中，加入 4.5 mL 琥珀酸缓冲溶液（pH=5），水浴锅中（40°C）预热 40 min 后，加入 0.5 mL 1 mM ABTS 溶液反应 3 min，在 420 nm 波长条件下测量上清液的吸光度，以灭活的漆酶-介体微球反应混合液为对照^[84]。单位漆酶活性为每 min 氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量。公式如下

$$\text{酶活 (U)} = \frac{V_T \times \Delta A \times 10^{-6}}{\varepsilon \times M_G \times t} \times n$$

其中 $\varepsilon=3.6 \times 10^4$ L/mol·min； ΔA ：吸光度的变化值； Δt ：反应时间； V_T ：总反应体积； M_G ：加入固定化漆酶的质量； n ：酶液稀释倍数。试验重复 3 次，取平均值。

相对酶活：酶活性的最大值表示为 100%，并计算每批实验的相对活性。

$$\text{酶活回收率为: } R(\%) = \frac{A_0}{A} \times 100。$$

式中 R 是固定化漆酶的总酶活回收率(%), A_0 是固定化漆酶的总酶活(U), A 是初始的游离漆酶总酶活(U)

3.3 共固定漆酶-介体的表征

3.3.1 扫描电子显微镜

将制备好的共固定漆酶-介体微球通过冷冻干燥机冻干后, 进行喷金处理, 在电子显微镜下观察小球表面和横截面的形貌特征。

3.3.2 傅里叶红外光谱

取适量充分干燥的 Lac@PDG-Ca@ABTS 微球和溴化钾放入研钵中研磨均匀后放入模具中压制成片, 然后上机进行测试, 扫描范围为 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 。

3.2.3 荧光显微镜

取适量漆酶用磷酸盐缓冲液溶解, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 1 mg/ml 的罗丹明 B 染色剂, 在 4°C 摇床中避光反应 24 h, 待染色完成后使用截取分子量为 3500 Da 的透析膜透析 48 h, 除去未与酶结合的荧光染料。然后冷冻干燥除去全部水分, 按照上述 3.2.1 固定化方法制备共固定漆酶微球, 分别用磷酸盐缓冲液和水洗涤三次过滤得到荧光分子标记的固定化微球。最后, 将荧光标记的固定化微球在 488 nm 激发光下进行观察分析。

3.3.4 EPR

利用电子顺磁共振鉴别共固定漆酶-介体催化剂和游离 LMS 体系中的自由基。具体操作为: 将 10 mg laccase + 10 mg ABTS 粉末和 1.0 g (湿重) Lac@PDG-Ca@ABTS 微球分别加入到醋酸盐缓冲溶液中, 进行 EPR 测试。仪器操作条件为: 微波功率为 20.00 mW , 微波频率为 9.853 GHz , 中心场强为 3510 G , 扫描宽度为 200 G 。

3.4 共固定漆酶-介体催化剂酶学性质研究

3.4.1 Lac@PDG-Ca@ABTS 热稳定性

将共固定漆酶和游离漆酶分别置于 pH 4.5 50 mM 磷酸盐缓冲液中, 分别在 $30\sim 70^\circ\text{C}$ 水浴条件下存放 1 h 后, 测定其相对活性。

3.4.2 Lac@PDG-Ca@ABTS 酸碱稳定性

将游离漆酶和共固定漆酶分别置于 10 mL 50 mM 的 pH 为 3.5、4、4.5、5、

5.5、6 的缓冲液中，4℃保存 12 h 后测量漆酶相对活性，探究其酸碱稳定性。

3.4.3 Lac@PDG-Ca@ABTS 储存稳定性

将制备的共固定漆酶和游离漆酶分别储存在 50 mM 磷酸盐缓冲液 (pH=4.5) 中 4℃的条件下，每三天测量一次酶活，计算相对活性，探究其储存稳定性。

3.4.4 Lac@PDG-Ca@ABTS 操作稳定性

将湿重 1.0 g 共固定漆酶介体微球在 50 mL 反应体系中催化 1 mg/mL 茶多酚，于 30℃摇床中在 200 r/min 条件下反应 45 min，反应结束后，过滤收集共固定微球，用去离子水分别冲洗三次后，再次重复使用，进行前述催化反应，共 12 个周期，分别计算茶黄素产率和酶活回收率，探究其操作稳定性。

3.5 共固定漆酶介体微球催化茶多酚合成茶黄素

3.5.1 不同条件对固定化效率的影响

为考察不同共固定条件下所得微球对茶黄素产率及酶活回收率的影响，在共固定微球制备过程中分别改变漆酶用量 (0.2-1.6 mg/mL)、介体浓度 (0.15-0.3 mM)、固定化 pH (pH 3.0-6.0) 制备不同的共固定化微球，用于催化不同浓度的茶多酚底物 (0.5-3.0 mg/mL)，检测茶黄素产率及漆酶酶活回收率，用于评价其固定化效率。

3.5.2 茶黄素的催化合成

按照 3.5.1 各因素的取值范围，将 1.0 g 共固定漆酶介体微球与配置好的茶多酚溶液一起放入 250 mL 锥形瓶中震荡反应，反应结束后离心取上清，将上清液 0.45 μm 微孔滤膜过滤后，检测茶黄素产率。

4 结果和讨论

4.1 表征

4.1.1 SEM

LMS 微球的表面及横截面结构如图 3-1 所示，可以观察到微球呈规则状球形结构，表面有一定不规则性和粗糙度，该结构可以更好的与底物反应。微球尺寸较为均匀，均为 2 mm 左右，便于催化结束后与底物分离，实现催化剂的回收再利用。横截面为蜂窝状层状结构，可产生较大的比表面积和分散度这种结构可以增加漆酶的附着位点，有利于提高材料对酶的固定化性能，同时增大与催化底物的接触位点，更利于底物的流动与结合。

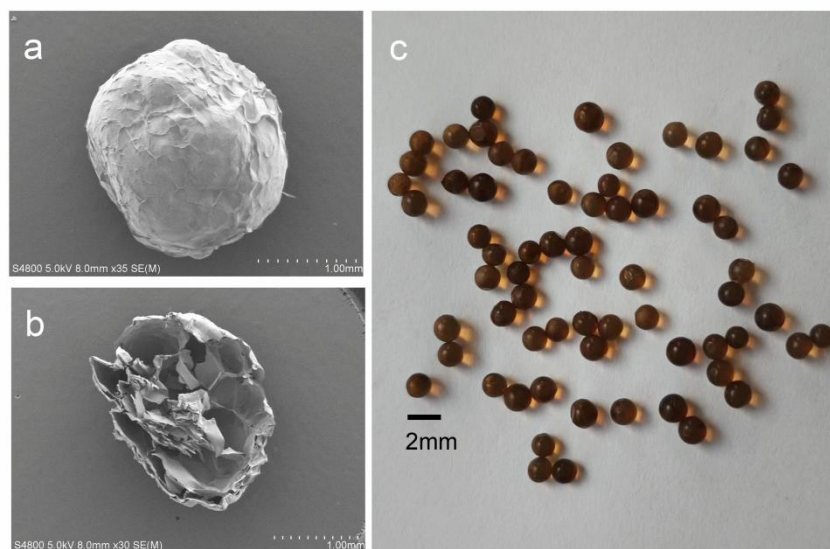


图 3- 1 Lac@PDG-Ca@ABTS 微球 (a) 及其横截面 (b) 的 SEM 照片。

Lac@PDG-Ca@ABTS 微球实物照片 (c)

Fig 3-1 SEM images of Lac@PDG-Ca@ABTS microspheres (a) and their cross-section (b).

Lac@PDG-Ca@ABTS microsphere (c)

4.1.2 傅里叶红外光谱分析

如图 3-2 结合共固定漆酶-介体微球和各单组分光谱可知, 1630 cm^{-1} 和 1418 cm^{-1} 处的吸收峰对应于海藻酸钠羟基羧酸盐基团的不对称和对称拉伸震动^[85]。 1080 cm^{-1} 、 892 cm^{-1} 、 615 cm^{-1} 的峰是 ABTS 中磺酸盐基团的伸缩振动峰和弯曲振动峰^[86], 表明 ABTS 已经被成功封装在以海藻酸钠为基质的材料中。 3420 cm^{-1} 处的吸收峰是漆酶中氨基基团的 N-H 伸缩震动^[87], 证明漆酶被有效固定到载体材料中。此外, 甲基丙烯酸缩水甘油酯上的环氧基团特征带 (917 cm^{-1}) 非常弱^[88], 这说明漆酶的加入打开了 GMA 上的环氧基团。在 1436 cm^{-1} 和 1632 cm^{-1} 出的吸收峰与多巴胺上的 C-N 键和羰基的伸缩震动有关^[89], 这表明甲基丙烯酸缩水甘油酯和多巴胺已经有效地结合到海藻酸钠复合体材料上, 实现了漆酶和介体的固定化。

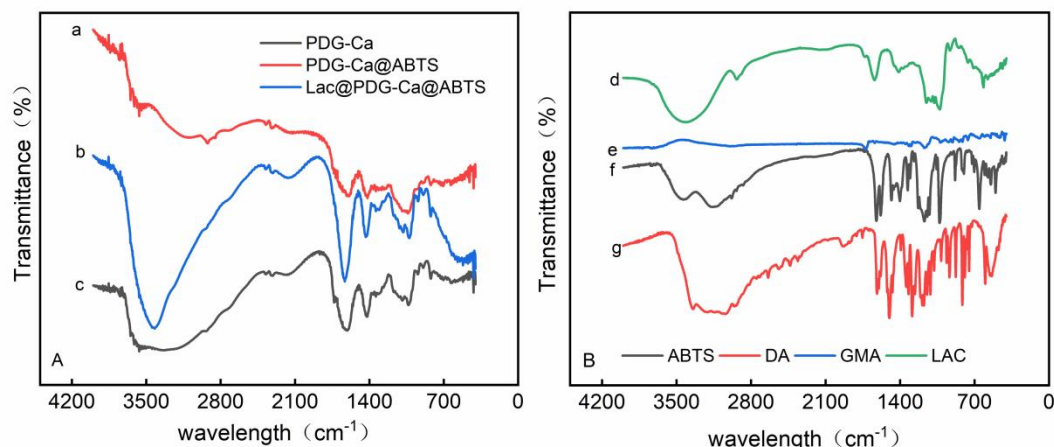


图 3-2 FT-IR 光谱: A-共固定漆酶介体微球光谱 (a) PDG-Ca、(b) PDG-Ca@ABTS、(c) Lac@PDG-Ca@ABTS; B-单组分光谱 (d) Lac、(e) GMA (f) ABTS (g) DA

Figure 3-2 FT-TR spectra: (a) PDG-Ca, (b) PDG-Ca@ABTS, (c) Lac@PDG-Ca@ABTS of A-co-fixed laccase-mediator microspheres; B-one-component spectra (a) Lac, (b) GMA (c) ABTS (d) DA

4.1.3 荧光显微镜图谱分析

漆酶用罗丹明 B 染色处理后, 在荧光显微镜中呈红色荧光, 如图 3-3, 荧光染色的漆酶呈扩散状分散在微球内部, 可能是因为胶状溶质通过滴入 4% 的 Ca^{2+} 溶液的方式形成微球, 造成以上分散状态。通过显微镜观察 Lac@PDG-Ca@ABTS 呈规则状球体, 通过微球 (A) 和截面 (B) 对比, 发现微球内部有明显荧光积累, 证明漆酶被成功固定在载体上

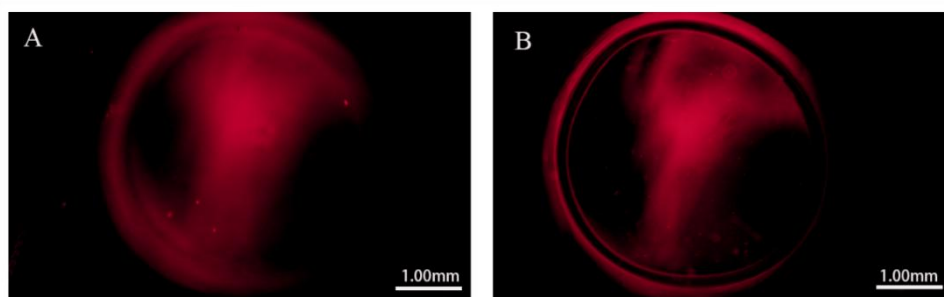


图 3-3 共固定漆酶-介体微球 (A) 及截面 (B) 荧光图谱

Figure 3-3 Co-immobilized laccase-mediator microspheres (A) and cross-section (B) fluorescence patterns

4.1.4 EPR 图谱

Lac@PDG-Ca@ABTS 和 free laccase+ABTS 的 EPR 测试如图 3-4 所示, 在游离漆酶中检测到一个强 ABTS 自由基信号, 表明 ABTS 能够在漆酶的作用下被氧化成为 ABTS 自由基。在共固定漆酶介体催化剂 Lac@PDG-Ca@ABTS 中同样检测到相同的自由基信号, 说明经过固定处理后, 漆酶仍然能够氧化还原介体产

生自由基。这同时证明漆酶和介体成功共同固定在海藻酸钙微球中，并且载体中的 ABTS 分子仍能保持其作为介体的氧化还原特性。但共固定微球中的自由基信号较弱，可能是因为固定后漆酶和介体的空间位阻增大导致自由基信号减弱^[90]。

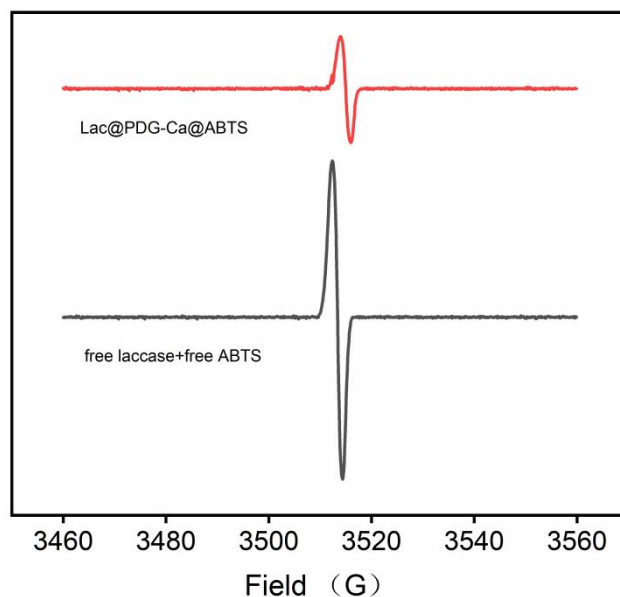


图 3-4 Lac@PDG-Ca@ABTS 和 free laccase+ABTS 的 EPR 图

Figure 3-4 EPR plots of Lac@PDG-Ca@ABTS and free laccase+ABTS

4.2 共固定漆酶-介体微球酶学性质研究

4.2.1 热稳定性

如图 3-5，游离漆酶在 40℃表现最大相对活性，而共固定漆酶在 45℃达到最大相对活性，表明其温度耐受性有所提升。经不同温度处理后，在 30-65℃范围内，共固定化微球的相对酶活均高于游离漆酶，表现出更优异的温度稳定性。Viswanath^[91]等报道，大多数真菌漆酶在 35℃-70℃之间具有最佳活性，游离漆酶的最佳活性发挥温度为 35℃、40℃和 50℃^[92]；而固定化漆酶的较佳活性发挥温度较游离漆酶有所提高，分别在 40℃、50℃和 60℃^[93]。漆酶-介体共固定化过程中的化学接枝辅助物理包埋可提升漆酶天然形态下的构象稳定性，有效减少漆酶热变性^[94]，因此表现出了更稳定的相对活性和更广泛的底物催化温度适应性。

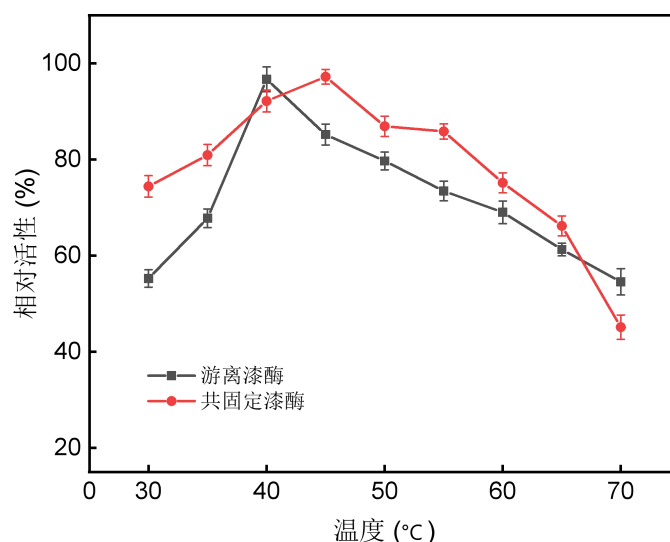


图 3-5 游离漆酶与固定化漆酶的热稳定性

Fig. 3-5 Thermal stability of free laccase and immobilized laccase

4.2.2 酸碱稳定性

pH 对漆酶相对活性的影响结果如图 3-6 所示, 游离漆酶最大相对活性 pH 为 4.5, 经固定化后, 其最大相对活性对应的 pH 值偏移至 4.0。暗示漆酶对酸性环境的抵抗力增强^[95], 更有利于偏酸性环境的催化反应。这种 pH 偏移可能得益于载体自身的化学稳定性及酶与海藻酸钠表面的静电相互作用和氢键^[69], 此外, 固定化降低了漆酶分子构象发生剧烈转变的可能性, 增强了漆酶对 pH 变化的耐受性。

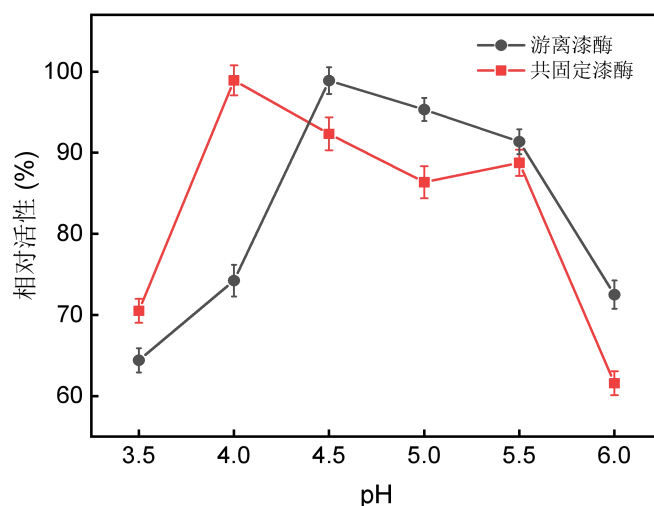


图 3-6 游离漆酶与固定化漆酶的 pH 稳定性

Fig.3-6 The pH stability of free laccase and immobilized laccase

4.2.3 储存稳定性

如图 3-7 所示, 储存周期内游离漆酶和共固定漆酶的相对活性均随时间延长

而减少。然而，共固定漆酶的稳定性明显高于游离漆酶。15 天后，仍能保留约 71% 的活性，而游离漆酶在相同条件下，0-3 天相对活性保持稳定，3-15 天呈较大下降趋势，储存 15 天后游离漆酶相对活性仅有 28.6%。共固定漆酶的储存性能提升，是由于酶分子固定在载体材料上后分子间作用力增强，酶分子的活性中心更加稳定^[96]，且固定化酶的活性位点可被载体底物保护，也有助于提高储存稳定性^[97]。

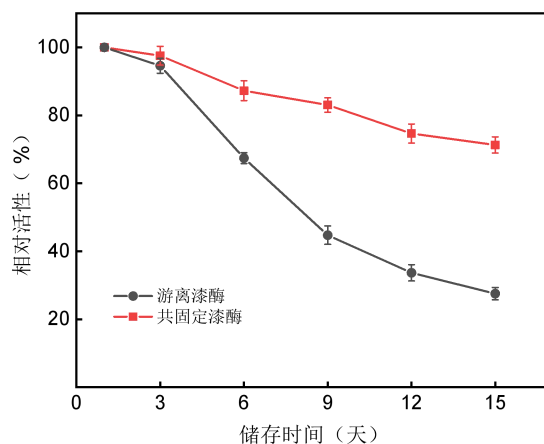


图 3-7 游离漆酶与固定化漆酶的储存稳定性

Fig. 3-7 Storage stability of free laccase and immobilized laccase

4.2.4 操作稳定性

与游离漆酶相比，共固定漆酶可以更容易的从底物中分离并重复使用，大大降低催化剂的使用成本。如图 3-8，共固定化微球经十次重复使用后，仍能保持 60% 以上的活性，尤其是前三轮回收后重复使用，催化茶多酚能力几乎没有衰减，茶黄素产率维持在 37% 左右。表明漆酶-介体被有效固定在微球中，可重复回收应用于茶黄素规模化制备。

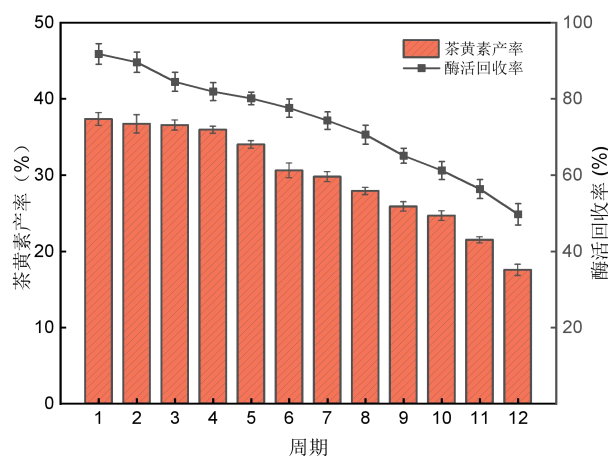


图 3-8 固定化酶的重复使用性

Fig. 3-8 Reusability of immobilized enzyme

4.3 不同条件对漆酶-介体共固定效率的影响

4.3.1 漆酶初始用量对共固定化酶活回收率及茶黄素产率的影响

共固定化中，漆酶初始添加量影响酶活回收率如图 3-9。当漆酶添加量在 0.2-1.2 mg/mL 间，随着漆酶添加量的增加，酶活回收率持续提高，最高达到 79%。同时，相应的茶黄素产率也同步提高，最高产率为 33%。继续增加漆酶添加量，酶活回收率及茶黄素产率基本维持平稳，漆酶添加量过高时 (>1.2 mg/mL)，共固定载体的结合位点可能会拥挤，并且可能产生空间位阻^[98]，从而抑制漆酶与载体的相互作用，造成酶活回收率及茶黄素产率的小幅下降。

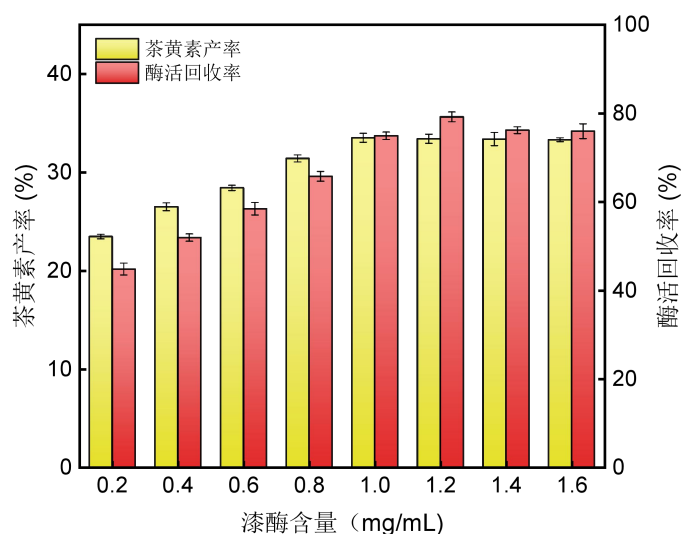


图 3-9 漆酶初始用量对共固定化酶活回收率及茶黄素合成的影响

Fig. 3-9 Effect of laccase content on the efficiency of theaflavin synthesis

4.3.2 介体添加量对茶黄素合成的影响

在共固定过程中，漆酶与介体的配比十分重要，合适的介体添加量能使共固定漆酶-介体微球更好的发挥催化作用。图 3-10 所示不同介体添加量下共固定化微球催化茶多酚生产茶黄素的时间进程。随着介体添加量的增加，共固定漆酶-介体微球对茶多酚的催化效率同时随着催化时间的延长而逐渐提高，0.25 mM ABTS、4 h 的茶黄素产率达到 42.1%，继续提高介体添加量到 0.3 mM，3.5 h 后的茶黄素产率达到 42.2%，4 h 后达到 42.48%，基本维持不变，无显著提升。可能是因为固定化微球中 0.25 mM ABTS 已可以产生足够的自由基来推动漆酶催化茶多酚，而过量 ABTS 被漆酶氧化后可能会产生中间产物，攻击漆酶的活性位点，钝化酶活^[99]。

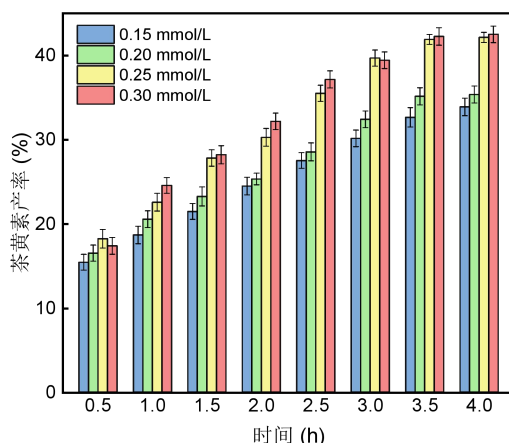


图 3-10 介体添加量对共固定化微球催化生成茶黄素产率的影响

Fig. 3-10 Effect of mesocosm concentration on the efficiency of theaflavin synthesis

4.3.3 固定化 pH 对茶黄素合成的影响

共固定化环境的 pH 显著影响茶黄素的产率，如图 3-11，过酸过碱的固定化反应体系都会降低酶活回收率，整体上，偏酸性环境更利于漆酶-ABTS 的共固定和茶黄素的合成，最适共固定反应 pH 值为 4 时，此时酶活回收率最大，达到 85.6%；pH 为 3.5 时，茶黄素产率则最大，达到 33.8%，此时的酶活回收率为 78.8%。共固定漆酶介体微球中存在 ABTS 自由基，而 ABTS 自由基在酸性条件下更容易保持其稳定性，说明 ABTS 的存在可以一定程度上补偿因 pH 改变而导致的酶-底物催化性能下降。

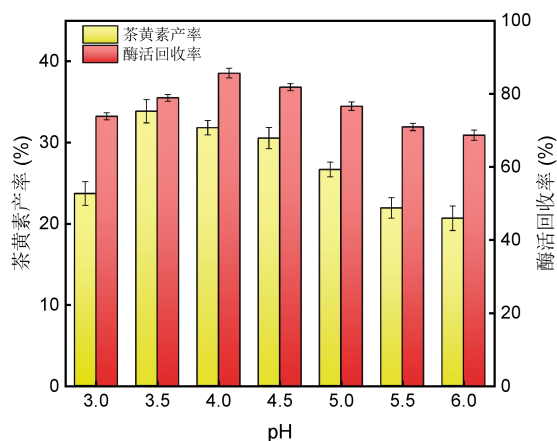


图 3-11 固定化 pH 对共固定化酶活回收率及茶黄素合成的影响

Fig. 3-11 Effect of immobilized pH on the efficiency of theaflavin synthesis

4.3.4 催化反应中底物浓度对茶黄素产率的影响

图 3-12 考察了 0.5~3 mg/mL 的茶多酚浓度对固定化微球催化生成茶黄素产率的影响。在相同反应条件下，不同浓度的茶多酚催化效率随共固定漆酶-介体催化剂催化反应时间的延长而增加，反应 3 h 后茶黄素产率增加幅度较小，基本

达到饱和状态。当茶多酚浓度为 0.5 mg/mL, 1.5 mg/mL 时, 底物浓度增长相同时间条件下, 茶黄素产率增高, 但当茶多酚浓度为 2.5 mg/mL, 3 mg/mL 时, 茶黄素产率下降, 低浓度的茶多酚转化效率要明显强于高浓度的, 可能是因为高浓度的底物对催化剂产生一定抑制作用, 且随着底物浓度增加抑制程度越大。

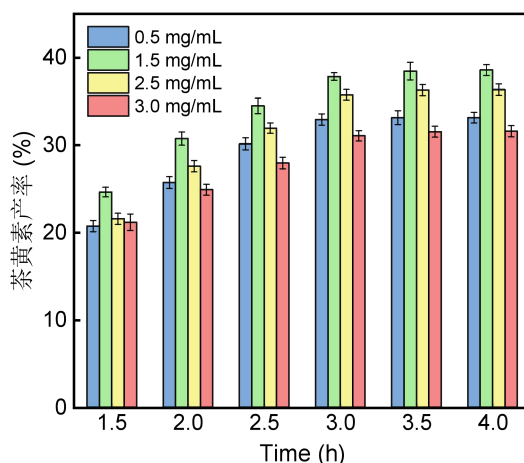


图 3-12 底物浓度对茶黄素合成效率的影响

Fig. 3-12 Effect of substrate concentration on the efficiency of theaflavin synthesis

4.3.5 茶黄素产率比较

茶黄素具有宝贵的营养、药理价值, 但成品茶中的茶黄素含量极低, 仅占其干重的 0.3-1.5%, 采用溶剂浸提原料成本太高, 加之溶剂浸提所得茶黄素含有与其理化性质类似的其他多酚、色素, 后期需要高昂的纯化成本, 在工业应用上难以实施, 因此当前已经基本放弃了采用溶剂浸提获取茶黄素。最近的一篇关于茶叶中提取 TFs, 提取率约为 32.5%。人们采用化学合成方法以 $K_3Fe(CN)_6$ 、 $Fe_2(SO_4)_3$ 等无机氧化剂催化茶多酚或各种儿茶素单体合成茶黄素。李立祥等对茶多酚进行酸性氧化, 茶黄素产率最高达到 29.8%。王坤波等使用碱性氧化剂 $K_3Fe(CN)_6:NaHCO_3$ 催化合成茶黄素, 产率 10.14%。化学合成主要在早期应用于茶黄素合成的机理和路线科学探究。因其工艺复杂, 副产物较多, 后续需要有机试剂萃取、分离, 在工业应用上存在缺陷。而且目前尚未见对化学合成法制得茶黄素的毒性残留研究, 这在食品、医药领域使用中存在潜在风险。

酶促合成因特异性高、副反应少等优点正成为茶黄素的主流合成方法。多为研究者分别以茶多酚、单体儿茶素为原料采用具有多酚氧化功能的酶催化合成了茶黄素, 因催化工艺的不同, 茶黄素的产率有一些差异。茶黄素化学或酶法合成中, 原料分为两种类型: 纯品儿茶素单体和包含多种儿茶素单体混合物的茶多酚,

不同的研究者采用了多种不同的茶黄素计算方法，包括质量/体积百分比（g/L、m/V），也有质量百分比（m:m，%），甚至也有直接以反应体系中茶黄素的绝对质量表示（m）。此外，在计算产率时，有的是以茶多酚底物为参照，有的是以某种儿茶素单体为参照。产率计算方式的多样化导致茶黄素产率的横向比较尚缺乏统一的标准。根据文献已提供的数据进行换算，得到了一些茶黄素产率的数据（表 3-3）。我们的研究中，茶黄素产率可达到 42.48%，具有明显优势。

表 3-3 酶促合成茶黄素/茶黄素单体产率比较

Table 3-3 Yield of TFs/TF synthesise by enzymatic catalysis

原料/底物	酶	TFs/TF 产率 (%)	文献
EGCG/ECG	Polyphenol oxidase from tea leaves	33.74% (TFDG)	[100]
EGCG/ECG	Tyrosinase	29.6% (TFDG)	[101]
EGCG/ECG	Polyphenol oxidase from apple	18.2% (TFDG)	[100]
TPs	Polyphenol oxidase from <i>Trametes trogii</i>	10.19% (TFs)	[33]
TPs	Polyphenol oxidase from <i>bergamot yam</i>	10.8 (TFs)	[102]
TPs	Polyphenol oxidase	15.05 (TFs)	[103]

5 小结

本章节以海藻酸钙为载体，多巴胺和甲基丙烯酸缩水甘油酯对其进行功能化修饰，将漆酶和 ABTS 共固定在功能化载体上，得到共固定漆酶-介体微球 Lac@PDG-Ca@ABTS。通过 FTIR、SEM、EPR、荧光显微镜等表征证明漆酶、介体成功固定在在载体材料上，且共固定漆酶显著提高了酶的储存稳定性和操作稳定性，提高了漆酶应对更广泛 pH 值和温度的能力。确定共固定微球的最佳制备条件是漆酶初始用量 1.2 mg/mL，介体添加量 0.25 mM，固定化 pH 3.5，用以催化 1.5 mg/mL 的茶多酚合成茶黄素，实验中茶黄素产率可达到 42.48%。

用共固定漆酶-介体微球催化茶多酚合成茶黄素，在提高茶黄素产率的同时实现催化剂的可重复利用。后继可以深入研究漆酶和介体的具体固定机制，并针对其进行优化，进一步提升其固定效率和安全性。本章研究将共固定漆酶介体催化剂应用于茶黄素合成，提高茶黄素产率，为实现茶黄素的工业应用奠定基础。

第四章 催化产物的体外安全性研究

1 引言

利用制备的共固定漆酶-介体催化剂催化茶多酚合成茶黄素，其催化产物的安全性探究对该方法的工业化应用具有重大意义，目前茶黄素因具有多种与人体健康有关的潜在功能，被广泛使用为功能性天然药物。因此催化产物的安全性是催化剂能否大规模使用的重要基础之一。

本部分通过 HepG 细胞的相关指标如细胞活性、细胞周期和细胞凋亡，探究共固定漆酶-介体微球催化茶多酚合成茶黄素的催化产物的体外安全性。

2 实验试剂与仪器

表 4-1 实验试剂

Table 4-1 Experimental reagents

名称	供应商
CCK-8 检测试剂盒	碧云天
PI 细胞周期试剂盒	碧云天
AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒	碧云天
人肝细胞癌 (HepG2) 细胞	中国科学院上海细胞库
DMEM 培养基	碧云天
胎牛血清	碧云天
青霉素和链霉素双抗	碧云天

表 4-2 主要仪器

Table 4-2 Main instruments

名称	型号	供应商
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州安泰公司
CO ₂ 细胞恒温培养箱	150i	美国 Thermo 公司
流式细胞仪	CytoFLEX	贝克曼公司
荧光倒置显微镜	TS2R-FL	日本 Nikon

3 实验方法

3.1 细胞培养

将冻存的 HepG2 细胞，在 37℃ 水浴条件下解冻，离心去除冻存液，加入 DMEM 培养基（10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗）中充分溶解，然后转移至培养皿中，在 37℃ 5% CO₂ 恒温培养箱中培养至细胞密度达到 80%~90%，吸出培养基，加入 2 mL PBS 轻微摇晃清洗 1-2 次，去除悬浮的死细胞。再加入 1 mL 胰蛋白酶消化 1-2 min，消化结束后放置显微镜下观察细胞形态，确认消化完全后，加入 2 mL 培养基终止消化，用移液枪将细胞吹落收集至离心管中，1500 rpm/min，离心 5 min，小心吸走上清后加入培养基使得细胞重悬，转移至培养皿中，细胞传代可根据细胞数量和需求进行一传二或一传三。待细胞培养两代或三代后状态稳定后，可以用于后续实验。

3.2 细胞活力检测

使用 CCK-8 法检测细胞活力。将对数期 HepG2 细胞以 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔细胞培养板中培养 24 h，加入 10 μ L 不同催化体系产物（A: Lac@PDG-Ca@ABTS+TPs，B: Lac +ABTS+TPs，C: Lac +TPs，D: Lac@PDG-Ca@ABTS+ H₂O，E: TPs，F: Blank-H₂O）继续培养 24 h 后，在每个孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液培养 4 h 后在 450 nm 处测定每个孔的吸光度，并按照下式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率(RGR)} = \frac{\text{实验组 OD} - \text{空白组 OD}}{\text{对照组 OD} - \text{空白组 OD}} \times 100\%$$

3.3 不同催化体系产物对细胞活死状态的影响

使用 Annexin V-FITC 和 PI 双染观察不同催化体系产物对细胞活死状态的影响。将对数期 HepG2 细胞以 1×10^6 个细胞/孔接种于 6 孔细胞培养板中培养 24 h，随后加入 100 μ L 不同催化体系产物（A: Lac@PDG-Ca@ABTS + TPs，B: Lac + ABTS + TPs，C: Lac + TPs，D: Lac@PDG-Ca@ABTS，E: TPs，F: Blank- H₂O）培养 24 h 后。分别收集每个孔内上清的悬浮细胞和用不含 EDTA 的胰酶消化收集的贴壁细胞，将上述收集的细胞离心去除培养基，用 PBS 清洗 2~3 次，吸出上清后加入 50 μ L 的 Annexin V-FITC 和 20 μ L 的 PI 染色液，震荡将其与细胞混匀，室温避光孵育 30 min，反应结束后去除染料加入 100 μ L PBS 重悬细胞，通过流式细胞仪观察检测。

3.4 不同催化体系产物细胞凋亡的影响

采用 Annexin V-FITC 和 PI 双染法对细胞的凋亡情况进行测定。将处于对数期的 HepG2 细胞按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板细胞培养板中，待细胞长至九成满后，更换培养基后加入 100 μL 不同催化体系产物(A: Lac@PDG-Ca@ABTS + TPs, B: Lac + ABTS + TPs, C: Lac + TPs, D: Lac@PDG-Ca@ABTS, E: TPs, F: Blank- H_2O)，培养 24 h 后。按照 3.1.3 的方法，将处理好的细胞，吸除上清后加入 100 μL Binding Buffer 重悬细胞，加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 10 μL 的 PI 染色液，震荡将其与细胞混匀，室温避光孵育 15 min，反应结束后 400 μL Binding Buffer 重悬细胞，通过流式细胞仪观察检测。

4 结果与讨论

4.1 催化产物对细胞活力的影响

实验中分别探究不同催化体系产物对 HepG2 细胞的影响。图 4-1 为不同催化体系产物同一时间对 HepG2 细胞活性的影响。

TPs 处理组 (E) 细胞的存活率达到 95.35%，与空白组 (F) 无显著性差异，表明 TPs 对 HepG2 细胞无毒。共固定微球 Lac@PDG-Ca@ABTS (D) 和 Lac+TPs (C) 表现出轻微的细胞损伤，这表明共固定微球自身存在着一定的漆酶或 ABTS 泄露，可能抑制了细胞的生长。但是这种损伤是轻微的，因为仅比 TPs 组分别下降了 4.5% and 6.7%。游离催化系统 Lac + ABTS + TPs (B) 的产物对 HepG2 细胞的生长抑制最强烈，细胞存活率仅为 77.03%，较空白对照组降低了 20.4%，这源于游离状态下的大量的 ABTS 对细胞的毒害。当漆酶-介体经共固定后 (A)，其催化产物对 HepG2 存活率达到 84.15%，较游离组的细胞存活率显著提高 ($P < 0.05$)。同时，与 TPs 组 (E) 相比，共固定微球的细胞存活率仅降低了 5.4%。综上所述，共固定化能有效封装漆酶和 ABTS，尤其是避免了高浓度游离 ABTS 对细胞的毒害，但是仍然表现出轻微泄露。

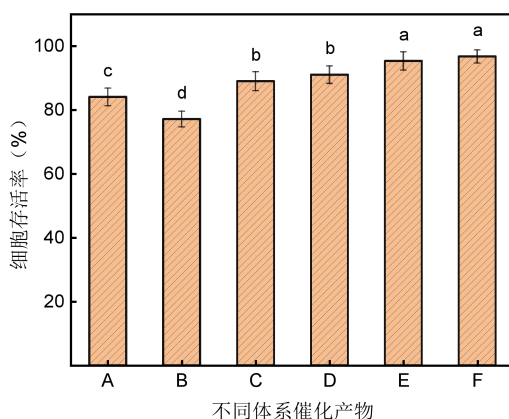


图 4-1 不同催化体系产物对细胞活性的影响 (A: Lac@PDG-Ca@ABTS + TPs, B: Lac + ABTS+TPs, C: Lac + TPs, D: Lac@PDG-Ca@ABTS, E: TPs, F: Blank-H₂O)

Fig. 4-1 Effect of the products of different catalytic systems on cellular activity

4.2 催化产物对细胞活死状态的影响

将不同催化体系产物处理后的细胞加入 Annexin V-FITC 和 PI 进行染色，通过显微镜的观察可见，活细胞会显示绿色荧光，死细胞会显示红色荧光细胞死活状态的直观观察结果如图 4-2 所示。与空白组 (F)、TPs 组 (E) 比较，其他各组的死细胞数量均有不同程度的上升，尤其是 Lac + ABTS + TPs (B) 的红色荧光点数量明显增多，这表明游离状态下的 ABTS 对细胞有很大的毒性。Lac@PDG-Ca@ABTS + TPs 组 (A) 中也出现红色死细胞，表明经共固定化的漆酶和介体可能发生了 ABTS 泄露，导致一些细胞死亡^[104]。但是同时，Lac@PDG-Ca@ABTS + TPs 组与无 ABTS 的 Lac + TPs 组相比，二者红色荧光点数量和分布情况类似，二者的细胞毒性相当，这表明用固定微球中的 ABTS 泄露是轻微的，这与图 4-1 中的细胞存活率数据一致，二者细胞存活率数值仅相差 4.93%。

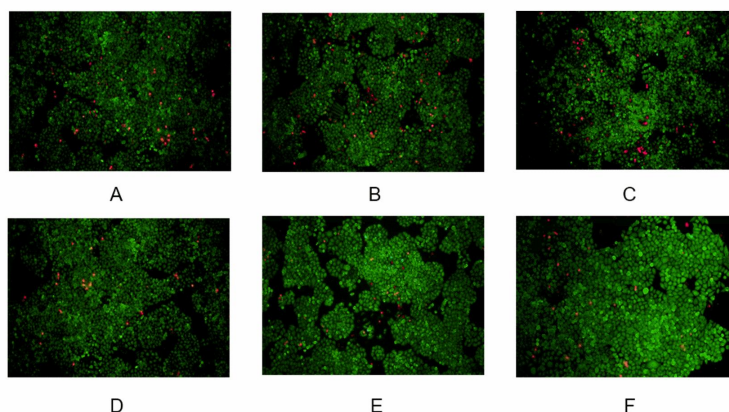


图 4-2 不同催化体系产物对细胞活死的影响 (A: Lac@PDG-Ca@ABTS + TPs, B: Lac + ABTS + TPs, C: Lac + TPs, D: Lac@PDG-Ca@ABTS, E: TPs, F: Blank-H₂O)

Fig. 4-2 Effect of the products of different catalytic systems on cell viability and death

4.3 催化产物对细胞凋亡的影响

图 4-3 是 HepG2 细胞受到不同催化体系产物处理下的细胞凋亡结果图，如图可以看出三类细胞，正常细胞（左下限）、早期凋亡细胞（右下限）、晚期凋亡细胞及坏死细胞（右上限）。B-游离漆酶+介体的处理组相比其他处理组活细胞较少，为 72.12%，而 A-共固定漆酶介体催化剂处理组和 C-游离漆酶处理组活细胞较多，分别为 82.87%和 84.31%，表明游离 ABTS 由于自身毒性对细胞活性有一定损伤，影响细胞凋亡，但经共固定后，与对照组区别不大，说明对细胞凋亡影响较小，侧面证明介体被有效固定在载体上，验证了共固定漆酶-介体催化剂催化产物的安全性。

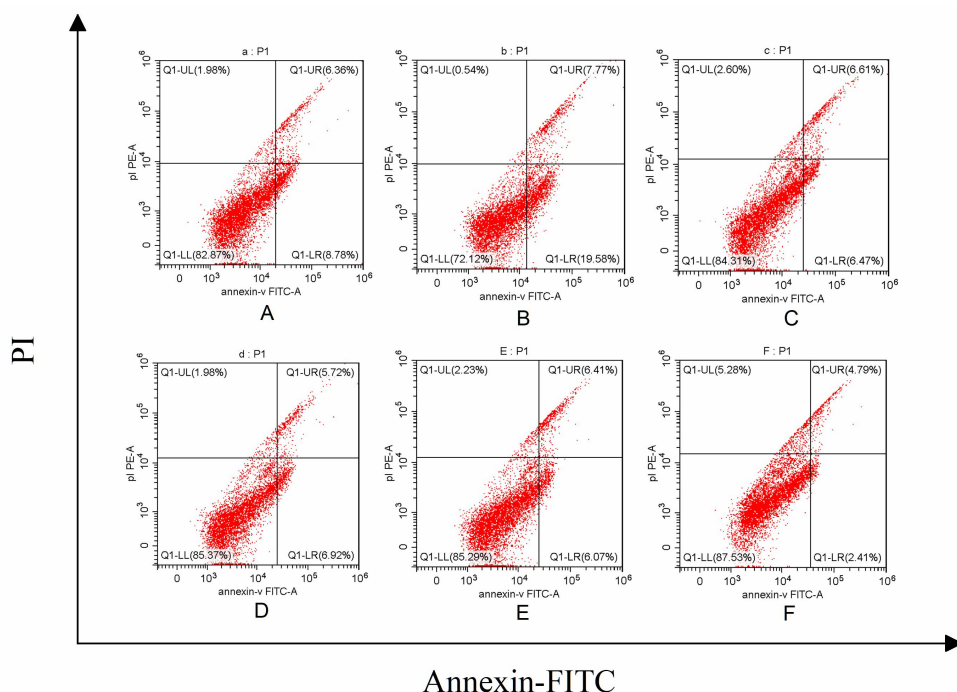


图 4-3 不同催化体系产物对细胞凋亡的影响 (A: Lac@PDG-Ca@ABTS + TPs, B: Lac + ABTS + TPs, C: Lac + TPs, D: Lac@PDG-Ca@ABTS, E: TPs, F: Blank-H₂O)

Fig. 4-3 Effect of products of different catalytic systems on apoptosis

5 小结

本章节验证了共固定漆酶-介体催化剂催化茶多酚合成茶黄素催化产物的体外安全性和抗氧化活性。通过催化产物对 HepG2 细胞的细胞活性、细胞毒力和细胞周期能指标，验证了催化产物的安全性，共固定漆酶-介体催化剂应用中存在轻微泄露，但程度轻微，对细胞无毒害。综上，共固定漆酶-介体催化剂对茶多酚的催化产物具备良好生物安全性，为后续工业应用提供理论基础。

结论与展望

1 结论

以低值茶多酚为原料,开展了酶促氧化合成茶黄素的研究。首先利用游离漆酶验证了茶多酚酶促氧化合成茶黄素的可行性,通过单因素和多因素实验获得了最佳的催化条件,在此基础上引入漆酶-介体系统(LMS)的概念,筛选出与漆酶适配的最佳介体 ABTS。通过 GMA 和 DA 对海藻酸钠进行接枝修饰,得到双功能化的符合载体材料,将其用于漆酶和介体的共固定化,制备得到共固定漆酶-介体催化剂 Lac@PDG-Ca@ABTS,并应用于催化茶多酚合成茶黄素。对共固定漆酶-介体微球进行表征及酶学性质进行探究,评估了催化产物的细胞毒性,得出结论如下所述:

(1) 使用游离漆酶催化茶多酚合成茶黄素,通过高效液相色谱法检测茶黄素含量,确定茶黄素检测方法为:色谱柱: Shim-packGIST-C18 液相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)。流动相 A 为 0.1% (v/v) 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈溶液。流速设置为 0.8 mL/min,调整进样量为 20 μ L,设置检测波长为 280 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C。通过单因素试验分别探究漆酶添加量、底物浓度、反应时间和反应 pH 对漆酶催化茶多酚合成茶黄素的影响,并通过多因素实验,最终确认,最优催化条件为漆酶添加量为 0.1 mg,底物浓度为 1.34 mg/mL, pH 3.7 和反应时间为 47 min,茶黄素产率达到 26.47%。再次基础上对 LMS 系统的介体种类和介体添加量进行筛选,确认 LMS 中添加介体为 ABTS,为后续实验奠定基础。

(2) 将漆酶和介体共固定在 GMA 和 DA 双功能化修饰的海藻酸钠载体上,得到共固定漆酶-介体催化剂 Lac@PDG-Ca@ABTS,通过 FTIR、SEM、EPR、荧光显微镜等表征结果,证明漆酶和介体被成功固定化与载体中。研究了共固定催化剂的酶学性质,与游离漆酶相比,共固定化酶的热稳定性、酸碱稳定性都有明显改善,且共固定化酶具备较高的储存稳定性和可重复性,在 4 $^{\circ}$ C 条件下储存 15 天后仍保留约 71% 的活性,且重复十次循环后,还可以保持 60% 的活性。将其应用于催化茶多酚合成茶黄素,考察不同共固定条件下所得微球对茶黄素产率及酶活回收率的影响,在共固定微球制备过程中分别改变漆酶用量、介体浓度、固定化 pH 制备不同的共固定化微球,用于催化不同浓度的茶多酚底物,检测茶黄素产率及漆酶酶活回收率。结果证明共固定化催化剂对茶黄素的催化效果优异,

茶黄素最高产率达到 42.48%，显著高于游离漆酶催化效果，且具备可重复性。

(3) 通过探究催化产物对 HepG2 细胞的相关指标，研究催化产物的体外安全性，结果证明催化过程中漆酶和介体存在轻微泄露，但对细胞无毒害作用，保证了催化产物的体外安全性。

2 展望

本文制备了双功能化修饰的复合载体，并在此基础上合成共固定漆酶-介体载体。目前漆酶介体系统主要应用于纸浆漂白、染料脱色和污染物降解，在生物催化合成领域的应用还很少，本文将其应用于催化茶多酚合成茶黄素，并对其催化产物的安全性进行探究，有利于促进漆酶介体系统在生物催化领域的进一步研究，但本文的研究再深度上存在一定不足，今后可以对其进一步改善：

(1) LMS 系统中，介体参与反应的机制非常复杂，可分为 3 类，包括电子转移 ((Electron transfer, ET)、氢原子转移(Hydrogen atom transfer, HAT)以及化学离子机制(Ionic mechanism type)。目前，众多介体参与的漆酶催化氧化反应机制尚缺乏系统研究。本文选用了 8 中介体，茶多酚原料中含有 4 中儿茶素单体，经漆酶/介体协同催化生成的茶黄素产物中含有 4 种主要的茶黄素单体，这给彻底弄清不同介体的氧化化学性质以及它们与茶多酚的相互反应过程带来了挑战，后续可以开展介体的来源、结构、介体的氧化还原电位等研究，以解释不同介体带来的茶黄素合成效率间的差异。

(2) 固定化载体的材料差异以及固定化技术的多样性决定了漆酶/介体共固定化效率的高低。本研究中漆酶与载体实现共价结合，共价键的作用使得固定化酶的三维结构更加稳定，且载体基质的作用保护了漆酶的活性位点，限制了生物催化剂的构象变化，提高了催化剂的储存稳定性。然而，介体以何种方式被共固定在载体上，除了物理包埋作用外，在介体和载体间是否有化学键作用，以及介体于漆酶之间在空间上是否发生了彼此相互影响，仍需深入研究。

(3) 茶黄素可作为一种潜在的食品添加辅料、食品添加剂、医药原料等。酶促合成的茶黄素有极高的安全性要求。如何优化漆酶和介体在载体上的固定化方式，提高漆酶和介体的固定效果，最大程度减少共固定催化剂中介体的泄露至关重要；合成产物的抗氧化、抗肿瘤等功能活性仍需深入开展相关研究。

参考文献

- [1] 薛金金, 尹鹏, 张建勇, 等. 植物源多酚氧化酶氧化儿茶素形成茶黄素和聚酯型儿茶素的研究[J]. 食品工业科技. 2019, 40(20): 76-81.
- [2] 缪凤, 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.
- [3] Liang S, Wang F, Chen J, et al. Optimization of a tannase-assisted process for obtaining teas rich in theaflavins from *Camelia sinensis* leaves [J]. Food Chemistry: X, 2022, 13:100203.
- [4] Aneja R, Odoms K, Denenberg A G, et al. Theaflavin, a black tea extract, is a novel anti-inflammatory compound [J]. Critical care medicine, 2004, 32(10): 2097-103.
- [5] Gao X Q, Xia L Y, Fan Y Q, et al. Evaluation of coloration, nitrite residue and antioxidant capacity of theaflavins, tea polyphenols in cured sausage [J]. Meat Science, 2022, 192:108877.
- [6] Shan Z, Nisar M F, Li M, et al. Theaflavin chemistry and its health benefits [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 6256618.
- [7] Wu Y Y, Li W, Xu Y, et al. Evaluation of the antioxidant effects of four main theaflavin derivatives through chemiluminescence and DNA damage analyses [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2011, 12(9): 744-51.
- [8] Yoshida H, Ishikawa T, Hosoi H, et al. Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein [J]. Biochemical pharmacology, 1999, 58(11): 1695-703.
- [9] He J T, Xu L, Yang L, et al. Anti-oxidative effects of catechins and theaflavins on glutamate-induced HT22 cell damage [J]. Rsc Advances, 2019, 9(37): 21418-28.
- [10] Mohanty S, Adhikary A, Chakrabarty S, et al. Operation 'p53 Hunt' to combat cancer: theaflavins in action [J]. Frontiers in bioscience (Scholar edition), 2012, 4(1): 300-20.
- [11] Lahiry L, Saha B, Chakraborty J, et al. Contribution of p53-mediated Bax transactivation in theaflavin-induced mammary epithelial carcinoma cell apoptosis [J]. Apoptosis : an international journal on programmed cell death, 2008, 13(6): 771-81.
- [12] Tu Y-Y, Tang A-B, Watanabe N. The theaflavin monomers inhibit the cancer cells growth in

- p>
vitro [J].
- Acta Biochimica et Biophysica Sinica*
- , 2004, 36(7): 508-12.
- [13] Luo T, Jiang J-G. Anticancer effects and molecular target of theaflavins from black tea fermentation in vitro and in vivo [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(50): 15052-65.
- [14] 郑沛, 张羽, 汪飒. 茶黄素对变异链球菌浮游细菌和生物膜的体外抑制作用[J]. *上海口腔医学*. 2021, 30(01): 33-7.
- [15] 李立祥, 萧伟祥. 茶黄素制取与分离研究进展[J]. *中国茶叶加工*. 2000, (04): 29-33.
- [16] Friedman M, Henika P R, Levin C E, et al. Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*[J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(2): 354-61.
- [17] Karunakaran D, Nguyen M A, Geoffrion M, et al. RIPK1 expression associates with inflammation in early atherosclerosis in humans and can be therapeutically silenced to reduce nf-kb activation and atherogenesis in mice [J]. *Circulation*, 2021, 143(2): 163-77.
- [18] Wu Y T, Jin F J, Wang Y L, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of theaflavin-3,3'-digallate on lipopolysaccharide-induced inflammation [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 794: 52-60.
- [19] Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, et al. Tea polyphenols inhibit IL-6 production in tumor necrosis factor superfamily 14-stimulated human gingival fibroblasts [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54: S151-S8.
- [20] Clark K J, Grant P G, Sarr A B, et al. An in vitro study of theaflavins extracted from black tea to neutralize bovine rotavirus and bovine coronavirus infections [J]. *Veterinary microbiology*, 1998, 63(2-4): 147-57.
- [21] Ohba M, Oka T, Ando T, et al. Antiviral effect of theaflavins against caliciviruses [J]. 2016, 70: 443-7.
- [22] Lin J-K, Lin-Shiau S-Y. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols [J]. *Molecular nutrition & food research*, 2006, 50(2): 211-7.
- [23] 孙世利, 凌彩金, 刘军, 等. 茶多酚与茶黄素对前脂肪细胞 3T3-L1 增殖与分化的影响[J]. *广东农业科学*. 2011, 38(12): 137-9.
- [24] Negishi H, Xu J-W, Ikeda K, et al. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *The Journal of nutrition*, 2004,

- 134(1): 38-42.
- [25] Saito A, Nakazato R, Suhara Y, et al. The impact of theaflavins on systemic-and microcirculation alterations: The murine and randomized feasibility trials [J]. The Journal of nutritional biochemistry, 2016, 32: 107-14.
- [26] Luo X Y, Takahara T, Hou J, et al. Theaflavin attenuates ischemia-reperfusion injury in a mouse fatty liver model [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2012, 417(1): 287-93.
- [27] 凌甜, 刘仲华. 儿茶素酶促制备茶黄素的研究进展[J]. 茶叶通讯. 2014, 41(02): 3-5+21.
- [28] Roberts E A H, Smith R F J J O T S O F, Agriculture. The phenolic substances of manufactured tea. IX[J]. The Spectrophotometric Evaluation Of Tea Liquors. 1963, 14: 689-700.
- [29] 李立祥 萧伟祥. 茶多酚双液相氧化制取茶色素工艺研究[J]. 南京农业大学学报. 2004, (02): 99-104.
- [30] 单圣晔, 阮美娟, 杨立伟, 等. 利用茶渣制备茶黄素工艺的研究[J]. 天津科技大学学报. 2010, 25(01): 13-5.
- [31] 王洪新, 孙军涛, 吕文平, 等. 茶黄素的制备、分析、分离及功能活性研究进展[J]. 食品与生物技术学报. 2011, 30(01): 12-9.
- [32] 王坤波. 茶黄素的酶促合成、分离鉴定及功能研究 [D], 2007.
- [33] 李适, 刘仲华, 黄建安, 等. 毛栓菌多酚氧化酶酶学性质及茶黄素的酶促合成研究[J]. 茶叶科学. 2008, (05): 326-30.
- [34] 张琪, 刘军红. 枸杞多酚氧化酶研究进展[J]. 安徽农业科学. 2022, 50(15): 16-8.
- [35] 夏瑜, 张珍林, 闵运江, 等. 铁皮石斛鲜花中多酚氧化酶的酶学特性[J]. 食品工业. 2022, 43(09): 117-20.
- [36] Son K H, Baek J, Jeong J, et al. Enhancement of Melanin Synthesis by the Branch Extracts of Vaccinium oldhamii through Activating Tyrosinase Activity in B16F10 Melanoma Cells [J]. Korean Journal of Plant Resources, 2018, 31(5): 547-53.
- [37] Queiroz C, Mendes Lopes M L, Fialho E, et al. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control[J]. Food Reviews International, 2008, 24: 361 - 75.
- [38] 苏菲烟, 雷激, 刘江, 等. 雪梨多酚氧化酶酶学特性及其果汁褐变控制技术研究[J]. 食品科技. 2020, 45(02): 303-10.

- [39] Wang Z, Yuan J, Yang J, et al. Effects of guankou grape polyphenol oxidase on enzymatic browning [J]. Journal of food processing and preservation ,2021,46(1):16127.
- [40] 唐禄鑫, 王雅娴, 彭明意, 等. 真菌漆酶及其生产固定化与应用[J]. 菌物学报. 2023, 42(09): 1821-37.
- [41] Tan J-F, Weidong D, Lu M, et al. Study of the dynamic changes in the non-volatile chemical constituents of black tea during fermentation processing by a non-targeted metabolomics approach [J]. Food Research International ,2016, 79: 106-13.
- [42] Zhu K, Ouyang J, Huang J, et al. Research progress of black tea thearubigins: a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition ,2020, 61: 1556 - 66.
- [43] Yoshida H. LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of tokio [J]. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1883, 43(0): 472-86.
- [44] Forootanfar H, Faramarzi M A. Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications [J]. Biotechnology Progress, 2015, 31(6): 1443-63.
- [45] Ducros V R M-A, Brzozowski A M, Wilson K S, et al. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution [J]. Nature Structural & Molecular Biology,1998, 5: 310-6.
- [46] Schückel J, Matura A, Van Pée K H. One-copper laccase-related enzyme from *Marasmius* sp.: purification, characterization and bleaching of textile dyes [J]. Enzyme Microb Technol, 2011, 48(3): 278-84.
- [47] Palmer A E, Lee S K, Solomon E I. Decay of the Peroxide Intermediate in Laccase: Reductive Cleavage of the O-O Bond [J]. Journal of the American Chemical Society, 2001, 123(27): 6591-9.
- [48] Garavaglia S, Cambria M T, Miglio M, et al. The structure of *Rigidoporus lignosus* Laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair [J]. Journal of molecular biology, 2004, 342(5): 1519-31.
- [49] Hakulinen N, Kiiskinen L-L, Kruus K, et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site [J]. Nature Structural & Molecular Biology,2002, 9: 601-5.
- [50] Baldrian P. Fungal laccases - occurrence and properties [J]. FEMS microbiology reviews, 2001, 26: 137-62.

- 2006, 30(2): 215-42.
- [51] Thurston C F J M. The structure and function of fungal laccases [J]. Microbiology Society, 1994, 140: 19-26.
- [52] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry [J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(5): 219-26.
- [53] Rodríguez Couto S, Toca Herrera J L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review [J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(5): 500-13.
- [54] Calafell M, Díaz C, Hadzhiyska H, et al. Bio-catalyzed coloration of cellulose fibers [J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2007, 25: 336 - 40.
- [55] Torrecilla J S, Mena M L, Yáñez-Sedeño P, et al. Field determination of phenolic compounds in olive oil mill wastewater by artificial neural network [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 38(2): 171-9.
- [56] Gamella M, Campuzano S, Reviejo A J, et al. Electrochemical Estimation of the Polyphenol Index in Wines Using a Laccase Biosensor [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(21): 7960-7.
- [57] Lin Y. Application of enzymes in pulp and paper industry[J]. Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology, 2014, 30(1): 83-9.
- [58] Camarero S, Ibarra D, Martínez Á T, et al. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(5): 1264-71.
- [59] Bezerra T M D S, Bassan J C, Santos V T D O, et al. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice [J]. Process Biochemistry, 2015, 50(3): 417-23.
- [60] Kenealy W R, Jeffries T W, Goodell B S, et al. Enzyme processes for pulp and paper: a review of recent developments, F, 2003 [C].
- [61] Bourbonnais R, Paice M G. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation [J]. FEBS Letters, 1990, 267(1): 99-102.
- [62] Claus H, Faber G, König H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(6): 672-8.
- [63] Call H P, Mücke I J J O B. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process) [J]. Journal of Biotechnology ,

- 1997, 53: 163-202.
- [64] Couto S R, Sanromán M Á. The effect of violuric acid on the decolourization of recalcitrant dyes by laccase from *Trametes hirsuta* [J]. *Dyes and Pigments*, 2007, 74(1): 123-6.
- [65] Amjad Ali K, Qayyum H. Potential of plant polyphenol oxidases in the decolorization and removal of textile and non-textile dyes [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(4): 396-402.
- [66] Vandertol-Vanier H A, Vazquez-Duhalt R, Tinoco R, et al. Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriopsis gallica* laccase [J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2002, 29(5): 214-20.
- [67] Maruyama T, Komatsu C, Michizoe J, et al. Laccase-mediated oxidative degradation of the herbicide dymron [J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(2): 426-30.
- [68] Cristóvão R O, Tavares A P M, Brígida A I S, et al. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 72: 6-12.
- [69] Jia Y, Chen Y, Luo J, et al. Immobilization of laccase onto meso-MIL-53(Al) via physical adsorption for the catalytic conversion of triclosan [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 184: 109670.
- [70] Caruso F, Trau D W, Möhwald H, et al. Enzyme encapsulation in layer-by-layer engineered polymer multilayer capsules [J]. *Langmuir*, 2000, 16: 1485-8.
- [71] 姚稼灏, 薛雅鞠, 赵永亮, 等. 多孔纳米材料固定化酶研究进展[J]. *微生物学通报*. 2020, 47(07): 2177-92.
- [72] 潘晓榕, 王艳, 周培根. 吸附交联法和包埋法固定壳聚糖酶的比较研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*. 2007, (03): 419-22.
- [73] 朱以华, 古宏晨, 王胜林, 等. 表面功能化磁性微球的制备及在核酸分离与固定化酶中的应用[J]. *中国医学科学院学报*. 2002, (02): 118-23.
- [74] 宋建彬. 以壳聚糖为载体固定化青霉素酰化酶的研究[J]. *化工进展*. 2004, (02): 181-4.
- [75] 周磊, 刘新华, 李长龙, 等. 静电纺 PMACAA 纳米纤维膜固定化辣根过氧化物酶的研究 [J]. *化工新型材料*. 2015, 43(04): 139-42.
- [76] 芦英俊. 固定化漆酶在处理难降解含酚废水中的特性研究 [D], 2019.
- [77] 刘文婷. 海藻酸钠-羧甲基纤维素钠复合材料固定化漆酶的制备优化及应用 [D], 2021.

- [78] Martinsen A, Skjåk-Braek G, Smidsrød O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads [J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1989, 33(1): 79-89.
- [79] Jahangiri E, Reichelt S, Thomas I, et al. Electron Beam-Induced Immobilization of Laccase on Porous Supports for Waste Water Treatment Applications [J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 11860-82.
- [80] Sun H, Huang W, Yang H, et al. Co-immobilization of laccase and mediator through a self-initiated one-pot process for enhanced conversion of malachite green [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, 471: 20-8.
- [81] Gao Z, Yi Y, Zhao J, et al. Co-immobilization of laccase and TEMPO onto amino-functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and its application in acid fuchsin decolorization [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5: 1-8.
- [82] Yaohua G, Ping X, Feng J, et al. Co-immobilization of laccase and ABTS onto novel dual-functionalized cellulose beads for highly improved biodegradation of indole [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 365: 118-24.
- [83] Xue P, Liu X, Gu Y, et al. Laccase-mediator system assembling co-immobilized onto functionalized calcium alginate beads and its high-efficiency catalytic degradation for acridine [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 196.
- [84] 黄新健, 陶喜洋, 武占省, 等. 膨润土掺杂海藻酸铜球包埋漆酶及其降解染料特性[J]. *纺织高校基础科学学报*. 2023, 36(01): 18-25+35.
- [85] Abd El-Ghaffar M A, Hashem M S, El-Awady M K, et al. pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89(2): 667-75.
- [86] Song H-K, Palmore G T R. Conductive polypyrrole via enzyme catalysis [J]. *The journal of physical chemistry B*, 2005, 109(41): 19278-87.
- [87] Fathali Z, Rezaei S, Faramarzi M A, et al. Catalytic phenol removal using entrapped cross-linked laccase aggregates [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 122: 359-66.
- [88] Barsbay M, Kodama Y, Güven O. Functionalization of cellulose with epoxy groups via γ -initiated RAFT-mediated grafting of glycidyl methacrylate [J]. *Cellulose*, 2014, 21(6): 4067-79.

- [89] Xiao Y L, Zai J T, Li X M, et al. Polydopamine functionalized graphene/NiFe₂O₄ nanocomposite with improving Li storage performances[J]. Nano Energy, 2014, 6: 51-8.
- [90] Reszka K J, Britigan B E. Doxorubicin inhibits oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) by a lactoperoxidase/H₂O₂ system by reacting with ABTS-derived radical [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2007, 466(2): 164-71.
- [91] Viswanath B, Rajesh B, Janardhan A, et al. Fungal laccases and their applications in bioremediation [J]. Enzyme research, 2014, 2014: 163242.
- [92] Olajuyigbe F M, Fatokun C O. Biochemical characterization of an extremely stable pH-versatile laccase from *Sporothrix carnis* CPF-05 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 94: 535-43.
- [93] Noreen S, Asgher M, Hussain F, et al. Performance Improvement of Ca-Alginate Bead Cross-Linked Laccase from *Trametes versicolor* IBL-04 [J]. Bioresources, 2016, 11(1): 558-72.
- [94] Asgher M, Wahab A, Bilal M, et al. Delignification of Lignocellulose Biomasses by Alginate–Chitosan Immobilized Laccase Produced from *Trametes versicolor* IBL-04 [J]. Waste and Biomass Valorization, 2017, 9(11): 2071-9.
- [95] Simón-Herrero C, Naghdi M, Taheran M, et al. Immobilized laccase on polyimide aerogels for removal of carbamazepine [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 376: 83-90.
- [96] Zhu Y, Kaskel S, Shi J, et al. Immobilization of *Trametes versicolor* Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres [J]. Chemistry of Materials, 2007, 19: 6408-13.
- [97] Qiu X, Wang S, Miao S, et al. Co-immobilization of laccase and ABTS onto amino-functionalized ionic liquid-modified magnetic chitosan nanoparticles for pollutants removal [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 401.
- [98] Ur Rehman H, Aman A, Nawaz M A, et al. Immobilization of pectin depolymerising polygalacturonase using different polymers [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 127-33.
- [99] Dong Z, Tan J, Pinelo M, et al. Engineering Mussel-Inspired Coating on Membranes for Green Enzyme Immobilization and Hyperstable Reuse [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2022, 61(15): 5042-53.

- [100]谷记平, 刘仲华, 黄建安, 等. 单双液相下不同多酚氧化酶源对酶性合成茶黄素的影响[J]. 茶叶科学. 2007, (01): 76-82.
- [101]周晶辉, 刘昌伟, 张盛, 等. 一种基于儿茶素的多酚氧化酶交联聚集体制备及其高效催化合成茶黄素-3,3'-双没食子酸酯研究[J]. 茶叶科学. 2023, 43(03): 377-88.
- [102]汤凯, 陈尉怡, 占剑峰, 等. 佛手山药多酚氧化酶提取及酶促合成茶黄素研究[J]. 中国食品添加剂. 2023, 34(03): 27-32.
- [103] 王坤波, 黄建安. 儿茶素体外氧化制备茶黄素的研究[J]. 茶叶科学. 2004, (01): 53-9.
- [104] Li C, Li Z, Sun Y. Facile co-immobilization of laccase and mediator by polyethyleneimine-induced biomimetic mineralization for dye removal [J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, 199:109067.

个人科研成果

[1] Wei L, Shengxian C, Yongqi L, et al. Co-immobilization of laccase-mediator system to catalyze the synthesis of theaflavins from tea polyphenols[J]. Results in Engineering, 2024(22): 102062.

致谢

时光匆匆，如白驹过隙，转眼间，我的硕士生涯已临近尾声。在这漫长而又转瞬即逝的时光里，我经历了无数的挑战与成长，收获了数不尽的感动与感悟。在此，我想尽我所能，向所有在我求学道路上给予过我帮助和支持的人们，表达我最真挚、最深厚的感激之情。

首先，我要衷心感谢我的导师-赵世光老师。从论文的选题到研究方法的确定，从框架的搭建到内容的完善，导师都给予了我悉心的指导和耐心的教诲。导师严谨的治学态度、渊博的知识储备和敏锐的学术洞察力，一直激励着我不断追求卓越。在我遇到困难和挫折时，导师总是给予我鼓励和支持，让我有勇气和信心克服重重难关。导师的言传身教，不仅让我在学术道路上不断成长，更让我明白了做人的道理和责任，导师之恩，没齿难忘。

我还要感恩我的父母。是你们给予了我生命，辛勤养育我长大。你们默默地付出，为我创造了良好的生活条件，让我能够安心学习。你们的爱是我前进的动力，是我坚强的后盾。每当我遇到困难想要放弃时，想起你们的期望和付出，我就有了坚持下去的力量。

而我最想感谢的是我的朋友们，我们一起度过了无数个挑灯夜战的日子，共同分享着喜怒哀乐。其中尤其感谢韩肋撒、郑鹏、郜远、汪锡武，你们不仅是我科研生活中互相支持互相鼓励的依靠，更是我日常生活中不可或缺的小伙伴，是你们让我的研究生生活变得丰富多彩，充满了欢声笑语。毕业分别之际即将来临，虽然我们将会各奔东西，但希望无论我们在哪，彼此间的友谊永不褪色。

我还要感谢学校的各位老师，如钱森和老师、薛正莲老师、王洲老师。是你们的辛勤教导，让我在知识的海洋里畅游，为我的学术研究打下了坚实的基础。

最后，我要感谢那个一直努力拼搏的自己。在这几年的求学道路上，我经历过迷茫、困惑、挫折，但我始终没有放弃，一直努力前行。我感谢自己的坚持和努力，让我能够不断超越自己，取得今天的成绩。

硕士生涯的结束，对我而言并不是终点，而是一个新的起点。我将带着这份感恩和责任，继续前行，努力为社会做出自己的贡献。

再次向所有关心、支持和帮助过我的人，表示我最衷心的感谢！