

交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶的制备表征及转化淫羊藿苷研究

李瑞云^{1,2,3}, 刘聪燕^{2,3}, 许 婷^{2,3}, 杨 茹^{2,3}, 陈 彦^{2,3*}

1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012

2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

3. 江苏省中医药研究院, 中药组分与微生态研究中心, 江苏 南京 210028

摘要: 目的 制备交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶, 并对其理化性质、酶解淫羊藿苷为宝藿苷 I 的最适酶解条件及酶学性能进行考察。方法 采用共价偶联法将蜗牛酶固定在戊二醛交联纳米 SiO₂ 上, 以相对酶活力为指标, 对固定化条件进行优化; 采用透射电镜 (TEM)、傅里叶红外光谱 (FTIR) 和元素分析法对固定化蜗牛酶的理化性质进行表征; 并以淫羊藿苷为底物, 以游离酶为对照, 考察固定化蜗牛酶的最适酶解条件及酶解动力学参数、重复利用性、热稳定性等酶学性能。结果 固定化蜗牛酶制备的最佳酶载比为 1 : 3, 固定化时间为 6 h; 其转化淫羊藿苷的最适酶解条件为 pH 5.0, 转化温度 60 ℃, 酶与底物质量比 1 : 2, 转化时间 12 h。固定化蜗牛酶的酶解动力学参数最大反应速率 ($V_{\max}$) 为 0.43 $\mu\text{g}/\text{min}$, 米氏常数 (K_m) 为 0.78 mmol/L, 重复使用 5 次后的相对酶活仍能保持在 70% 以上。结论 制备的交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶机械强度高、稳定性好, 不但可重复使用, 还可定向水解淫羊藿苷为活性更强的宝藿苷 I, 工艺简单易行, 转化效率高, 适宜于工业化生产。

关键词: 固定化蜗牛酶; 交联纳米 SiO₂; 生物转化; 淫羊藿苷; 宝藿苷 I

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-4904-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.010

Study on preparation, characterization, and transformation of icariin of immobilized snailase on nano-SiO₂

LI Rui-yun^{1,2,3}, LIU Cong-yan^{2,3}, XU Ting^{2,3}, YANG Ru^{2,3}, CHEN Yan^{2,3}

1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To prepare the immobilized snailase on cross-linked nano-SiO₂, characterize its physicochemical properties, and investigate the optimal conditions of hydrolyzing icariin to baohuoside I and enzymatic properties. **Methods** The snailase was immobilized on the glutaraldehyde cross-linked nano-SiO₂ by covalent coupling method. The immobilization conditions were optimized using the relative enzyme activity as the test index. Transmission electron microscopy (TEM), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and elemental analysis methods were used to characterize the physicochemical properties of immobilized snailase. Using icariin as the substrate and free enzyme as the control, the optimal enzyme conditions, enzymatic kinetic parameters, recyclability, and thermal stability of the immobilized snailase were also investigated. **Results** The optimal mass ratio of enzyme to carrier was 1 : 3 and the optimal immobilization time was 6 h for the preparation of the immobilized snailase. The optimum hydrolysis conditions of the immobilized snailase were as follows: pH 5.0, conversion temperature 60 ℃, mass ratio of enzyme to substrate 1 : 2, and transformation time 12 h. The $V_{\max}$ and K_m of the immobilized snailase was 0.43 $\mu\text{g}/\text{min}$ and 0.78 mmol/L, respectively. After repeated use for 5 times, the residual relative enzyme activity of the immobilized snailase maintained above 70%. **Conclusion** The immobilized snailase on cross-linked nano-SiO₂ has high mechanical strength, strong stability, and good reusability.

收稿日期: 2019-06-17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81703714); 江苏省科教强卫医学重点人才项目 (ZDRCA 2016036)

作者简介: 李瑞云 (1994—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药药剂学。Tel: 15256563721 E-mail: 1902802416@qq.com

*通信作者 陈 彦, 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事生物药剂学及中药新型给药系统研究。Tel: (025)52362155 E-mail: ychen202@hotmail.com

It can hydrolyze the icariin to the baohuoside I with a better activity. The hydrolysis process was simple, easy, and suitable for industrial production.

Key words: immobilized snailase; cross-linked nano-SiO₂; biotransformation; icariin; baohuoside I

淫羊藿苷、宝藿苷 I 等异戊烯基黄酮苷均为小檗科淫羊藿属植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 中的主要活性成分, 具有显著的抗骨质疏松、抗肿瘤等药理作用^[1-8]。本课题组前期研究发现, 淫羊藿苷口服后在肠道会被肠道酶、肠道菌水解生成宝藿苷 I, 从而更好地发挥其药理作用^[9]。由于宝藿苷 I 在淫羊藿原药材中的含量很低^[10], 很难通过化学分离纯化的方法大量制备, 而淫羊藿中与宝藿苷 I 具有相同母核结构的淫羊藿苷含量却很高, 因此可采用体外酶解的方法水解掉淫羊藿苷 C-7 位葡萄糖基, 制备药理活性更强的宝藿苷 I。

蜗牛酶是从蜗牛的嗦囊和消化道中提取的一种含有纤维素酶、果胶酶、淀粉酶等 20 多种酶的混合酶, 具有很强的生物转化能力, 目前已经被广泛应用于多种中药活性成分的提取、制备研究^[11-14]。本课题组前期研究也发现, 蜗牛酶对淫羊藿苷的水解效率极高, 其酶解淫羊藿苷的产物主要包括宝藿苷 I、淫羊藿苷元和极少量的中间产物淫羊藿次苷 I^[15-18], 通过控制酶的加入量、反应时间等因素, 可实现蜗牛酶定向水解淫羊藿苷为单一产物宝藿苷 I 的目的。虽然蜗牛酶水解具有专一性强、反应条件温和、转化效率高、绿色环保等优点, 但游离酶存在酶易失活、不可回收、成本高等缺陷, 从而限制了其工业化应用^[19-20]。采用固定化技术将酶固定在壳聚糖^[21]、海藻酸盐^[22]、SiO₂^[23]等固体载体上反复使用, 不但能显著提高酶的稳定性, 还可实现酶的回收再利用, 从而降低生产成本, 利于工业化生产。其中, 纳米 SiO₂ 具有粒径小、比表面积大、化学稳定性好、机械强度高、表面易于改性、价廉易得等优点, 是制备固定化酶的理想载体^[24]。为了提高纳米 SiO₂ 对酶的固定能力, 本研究以 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 为硅烷偶联剂对纳米 SiO₂ 表面进行氨基改性, 再经戊二醛交联处理, 通过共价偶联反应制备交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶, 并采用透射电子显微镜 (TEM)、傅里叶红外光谱仪 (FTIR)、元素分析等方法对其理化性质进行表征, 同时以淫羊藿苷为底物, 考察比较了游离和固定化蜗牛酶的最适酶解条件、酶解动力学参数、重复利用性和热稳定性, 证明了交联纳米 SiO₂ 作为蜗牛酶固定化载体的可行性, 并通过建立高效、可重复利用的固定

化蜗牛酶酶解淫羊藿苷工艺, 为宝藿苷 I 的绿色工业化生产奠定实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Acquity ARC 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; MS205DU 十万分之一天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; IS10 傅里叶红外光谱仪、FLASH2000 元素分析仪、1510 MULTISKAN GO 酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司; 96 孔培养板, 美国 Corning 公司。

1.2 材料

淫羊藿苷、宝藿苷 I 对照品, 批号分别为 20110206、20120222, HPLC 测定质量分数均 ≥ 98%, 供含量测定用, 购于上海源叶生物科技有限公司; 淫羊藿苷元对照品, 批号 ZL2016110682, HPLC 测定质量分数 ≥ 98%, 供含量测定用, 南京泽朗生物科技有限公司; 蜗牛酶, 酶活力 ≥ 90 U/mg, 国药集团化学试剂有限公司; EY-QX1 型纳米 SiO₂, 安徽山河药用辅料股份有限公司; 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES), 阿拉丁试剂有限公司; BCA 试剂盒, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 甲苯, 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司; 25% 戊二醛水溶液, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析测定方法的建立

2.1.1 酶活力测定方法^[25] 以淫羊藿苷为底物, 在一定条件下振荡反应 1 h 后, 取适量反应液加入 9 倍量甲醇终止反应, 涡旋离心后, 取上清液经 HPLC 检测, 计算酶活力。

HPLC 色谱条件: 依利特 Supersil ODS2 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液 (75 : 25); 检测波长 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。理论塔板数: 淫羊藿苷为 1 293.00、宝藿苷 I 为 3 949.46、淫羊藿苷元为 4 835.00。

酶活力单位通常用国际单位 U 表示, 酶活力可定义为在 60 °C、pH 5.0 条件下, 1 g 酶每小时水解消耗淫羊藿苷的物质的量, 单位表示为 μmol/(h·g),

即 U/g。酶解反应的初速度 (v) 为在酶促反应初始阶段, 底物转化量 $< 5\%$ 时, 单位时间内淫羊藿苷的消耗量。

酶活回收率 = 固定化酶总活力 / 被固定的游离酶总活力

相对酶活力 = 酶活力 / 最高酶活力, 最高酶活力为同组实验中酶活力最高点的值, 计为 100%

转化率 = (反应初始淫羊藿苷量 - 反应终止淫羊藿苷量) / 反应初始淫羊藿苷量

2.1.2 酶固定量测定方法 以牛血清白蛋白 (BSA) 为对照品, 采用梯度稀释法配制质量浓度分别为 2 000、1 500、1 000、750、500、250、125、25 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。在固定化酶的制备反应结束后, 离心收集上清液, 沉淀物用蒸馏水洗涤 3 次, 合并洗涤液与上清液, 加水定容至刻度即为样品溶液。精密吸取各稀释质量浓度的 BSA 对照品溶液和待测样品溶液各 25 μL , 分别加入 200 μL BCA 工作液, 震荡混合 30 s 后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 在 562 nm 处测定吸光度 (A) 值。以 BSA 质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得标准曲线回归方程为 $Y = 0.0161X + 0.1405$, $R^2 = 0.9981$, BSA 在 25~1 500 $\mu\text{g/mL}$ 与 A 值呈良好的线性关系。将

待测样品溶液的 A 值代入方程, 计算固定化酶的载酶量和固定率。

载酶量 = 被固定的游离酶总量 / 制备所得固定化酶的总量

固定率 = 被固定的游离酶量 / 固定化过程中投入的总游离酶量

2.2 交联纳米 SiO_2 固定化蜗牛酶的制备及参数优选

2.2.1 交联纳米 SiO_2 的制备 将 1.5 g 纳米 SiO_2 均匀分散在 50 mL 溶有 50 mmol/L APTES 的甲苯中, 90 $^{\circ}\text{C}$ 下 600 r/min 搅拌 12 h, 抽滤分离产物, 乙醇洗涤 3 次后, 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 12 h, 得氨基化纳米 SiO_2 1.83 g, 产率为 91.4%; 取氨基化纳米 SiO_2 0.1 g 超声分散在 5 mL 0.25% 的戊二醛水溶液中, 室温下 600 r/min 磁力搅拌 1 h, 离心收集沉淀物, 用蒸馏水洗涤 3 次后, 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 12 h, 即得戊二醛交联纳米 SiO_2 0.10 g, 产率为 89.4%。

2.2.2 蜗牛酶的固定化 将交联纳米 SiO_2 超声分散在 5 mL pH 5.0 磷酸盐缓冲溶液中, 加入适量蜗牛酶溶解后, 室温下 600 r/min 磁力搅拌一定时间, 离心收集沉淀, 用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次, 37 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 12 h, 即得交联纳米 SiO_2 固定化蜗牛酶。固定化过程见图 1。

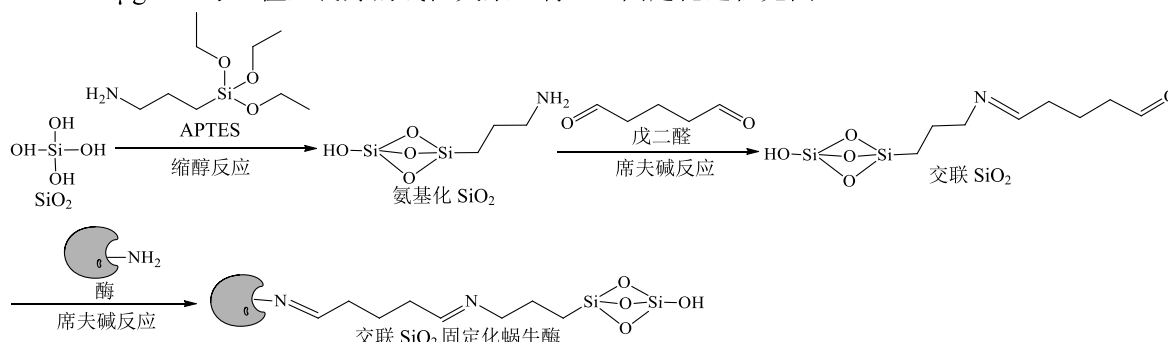


图 1 蜗牛酶在交联纳米 SiO_2 上的固定化过程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of immobilization process of snailase on cross-linked nano- SiO_2

2.2.3 固定化参数优选 按“2.2.2”项下方法制备固定化蜗牛酶, 分别考察不同酶载比 (1:3、1:5、1:7、1:9) 和固定化时间 (2、4、6、8、10 h) 对固定化蜗牛酶酶活力的影响, 结果不同酶载比时的固定化蜗牛酶酶活力 (相对酶活力) 分别为 $(100.00 \pm 5.08)\%$ 、 $(75.02 \pm 3.90)\%$ 、 $(66.65 \pm 3.37)\%$ 、 $(55.62 \pm 2.23)\%$ ($n=3$); 不同固定化时间的固定化蜗牛酶酶活力 (相对酶活力) 分别为 $(57.92 \pm 2.85)\%$ 、 $(47.50 \pm 2.50)\%$ 、 $(100.00 \pm 4.78)\%$ 、 $(63.65 \pm 3.92)\%$ 、 $(48.51 \pm 2.41)\%$ ($n=3$)。以相对酶活力为考察指标, 在酶投入量固定的条件下, 固定化蜗牛酶酶活力随载体投入量的

增加呈下降趋势, 当酶载比为 1:3 时, 酶活力最高; 而随固定化时间延长, 固定化蜗牛酶酶活力呈先上升后下降趋势, 在 6 h 时酶活力最高。因此, 制备固定化蜗牛酶的最佳酶载比为 1:3, 固定化时间为 6 h, 按“2.1.1”项下方法测得其酶活力为 151.0 U/g, 酶活回收率为 91.0%。BCA 法测得固定化蜗牛酶的载酶量为 214.5 mg/g, 固定率为 81.8%, 上述结果表明交联纳米 SiO_2 不但能高效固定蜗牛酶, 还能较好地保持其酶活力。

2.3 交联纳米 SiO_2 固定化蜗牛酶表征

2.3.1 TEM 表征 取适量超声分散后的样品溶液滴于铜网上, 滤纸吸除多余液体, 室温下干燥后,

立即置于 TEM 下观察样品的外观形貌, 拍照, 结果见图 2。制备的氨基化纳米 SiO₂、交联纳米 SiO₂、交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶形态均为类球形, 粒径约 15 nm, 呈现一定的团聚现象。

2.3.2 FTIR 表征 取适量样品和 KBr 按一定比例混合均匀, 经压片机压制成透明薄片后, 在傅里叶

红外光谱仪上再进行测试。从图 3 可以看出氨基化纳米 SiO₂、交联纳米 SiO₂、交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶 3 个样品在 470、805、1 100 cm⁻¹ 均有明显的吸收峰, 此 3 个峰为纳米 SiO₂ 的特征吸收峰, 分别归属于 Si-O-Si 的弯曲振动、对称伸缩振动和反对称伸缩振动; 1 545 cm⁻¹ 处的吸收峰是 N-H 的不

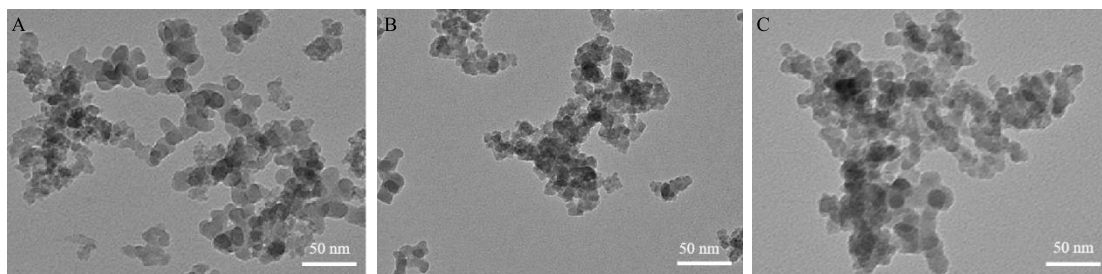


图 2 氨基化纳米 SiO₂ (A)、交联纳米 SiO₂ (B)、交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶 (C) 的 TEM 表征图

Fig. 2 TEM images of aminated nano-SiO₂ (A), cross-linked nano-SiO₂ (B), and immobilized snailase on cross-linked nano-SiO₂ (C)

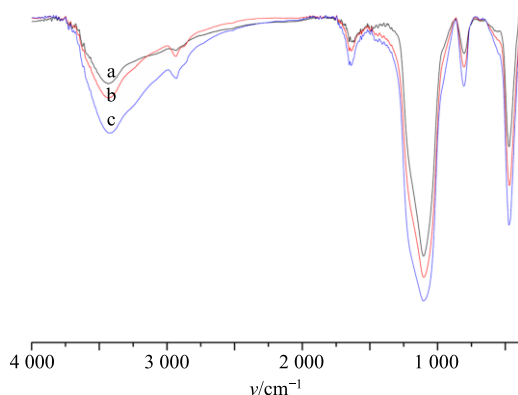


图 3 氨基化纳米 SiO₂ (a)、交联纳米 SiO₂ (b)、交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶 (c) 的 FTIR 表征图

Fig. 3 FTIR spectrum of aminated nano-SiO₂ (a), cross-linked nano-SiO₂ (b), and immobilized snailase on cross-linked nano-SiO₂ (c)

对称伸缩振动, 说明氨基化纳米 SiO₂ 氨基化成功; 氨基化纳米 SiO₂ 在 1 630 cm⁻¹ 处的吸收峰是与游离水相关的 H-O-H 键的弯曲振动吸收峰; 交联纳米 SiO₂、交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶在 1 640 cm⁻¹ 处的吸收峰归属于席夫碱中 C=N 键的伸缩振动, 表明醛基化成功, 交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶的振动强度强于交联纳米 SiO₂, 可能是酶分子肽键中 C=O 伸缩振动在此处的叠加; 3 个样品在 2 930 cm⁻¹ 处的吸收峰归属于 -CH₃、-CH₂ 的伸缩振动; 氨基化纳米 SiO₂、交联纳米 SiO₂ 在 3 434 cm⁻¹ 处的吸收峰归属于 Si-OH 的伸缩振动, 但交联纳米 SiO₂ 的振动强度强于氨基化纳米 SiO₂, 可能与交联纳米 SiO₂ 中席夫碱的 N-H 伸缩振动在此处的叠加有关, 交联纳米

SiO₂ 固定化蜗牛酶在 3 413 cm⁻¹ 的振动强度强于交联纳米 SiO₂, 可能与酶分子羧基中 O-H 伸缩振动在此处的叠加有关, 结果表明酶被成功地固定在交联纳米 SiO₂ 上。

2.3.3 元素分析 用 FLASH2000 元素分析仪对氨基化纳米 SiO₂、交联纳米 SiO₂、交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶中的 C、H、N 元素的含量进行测定, 元素分析结果如表 1 所示。氨基化纳米 SiO₂ 中 N 元素的含量为 1.92%, 表明氨基被成功接枝到纳米 SiO₂ 上; 交联纳米 SiO₂ 中 C 元素的含量较氨基化纳米 SiO₂ 明显升高约 1.3 倍, 表明戊二醛交联纳米 SiO₂ 制备成功; 而交联纳米 SiO₂ 固定化蜗牛酶中 N、C、H 元素的含量均明显高于其他 2 组, 与交联纳米 SiO₂ 相比, N 元素含量升高 0.5 倍, C 元素含量升高 0.3 倍, H 元素含量升高 0.2 倍, 表明蜗牛酶被成功固定在交联纳米 SiO₂ 载体上。

2.4 固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的最适条件考察

以游离酶为参照, 取适量固定化蜗牛酶和游离蜗牛酶, 按“2.1.1”项下方法测定不同 pH 值 (2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)、温度 (25、

表 1 元素分析结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Elemental analysis results ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	N/%	C/%	H/%
氨基化纳米 SiO ₂	1.92 ± 0.12	4.10 ± 0.11	1.66 ± 0.17
交联纳米 SiO ₂	1.58 ± 0.04	9.42 ± 0.01	1.89 ± 0.01
交联纳米 SiO ₂ 固定化蜗牛酶	2.39 ± 0.07	11.93 ± 0.11	2.32 ± 0.04

37、50、60、70 °C)、酶与底物质量比(1:2、1:1、2:1、4:1)条件下固定化和游离蜗牛酶的酶活力,计算相对酶活力,并以淫羊藿苷转化率为指标,考察固定化和游离蜗牛酶的最适酶解时间(1、3、6、12、24 h),结果见表 2~5。固定化和游离蜗牛酶的最适 pH 值均为 5.0,最适温度均为 60 °C,最适酶与底物质量比均为 1:2(表 2~4),表明固定化过程基本不影响酶的催化活性。由表 5 可知,游离蜗牛酶在 3 h 时基本酶解完全淫羊藿苷,酶解产物有 2 个,主要为宝藿苷 I(775.4 μg)和淫羊藿苷元(46.2 μg),随着酶解时间的延长,宝藿苷 I 的生成量在减少,而淫羊藿苷元的生成量在增加,酶解 24 h 时,产物组成中宝藿苷 I 的量减少为 486.4 μg,而淫羊藿苷元的量增加为 258.3 μg。固定化蜗牛酶在 12 h 时基本酶解完全淫羊藿苷,酶解产物只有宝藿苷 I,酶解 24 h 时,宝藿苷 I 的含量高达 956.4 μg,表明固定化蜗牛酶可以定向转化淫羊藿苷为宝藿苷 I。

表 2 游离蜗牛酶与固定化蜗牛酶的最适酶解 pH 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Optimal enzymatic hydrolysis pH of free and immobilized snail enzyme ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

pH 值	蜗牛酶相对酶活力/%	
	游离	固定化
2	17.32 ± 1.09	40.33 ± 1.87
3	21.30 ± 0.64	43.75 ± 0.96
4	47.29 ± 2.47	97.45 ± 2.78
5	100.00 ± 1.43	100.00 ± 4.34
6	67.25 ± 3.24	90.02 ± 2.90
7	58.81 ± 2.72	65.09 ± 2.01
8	55.17 ± 2.93	45.16 ± 2.52
9	54.04 ± 2.50	33.39 ± 1.57
10	57.24 ± 2.65	21.32 ± 1.13

表 3 游离蜗牛酶与固定化蜗牛酶的最适酶解温度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Optimal enzymatic hydrolysis temperature of free and immobilized snailase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度/°C	蜗牛酶相对酶活力/%	
	游离	固定化
25	41.54 ± 0.84	43.67 ± 2.19
37	71.92 ± 2.98	61.14 ± 3.52
50	64.97 ± 3.22	84.24 ± 3.33
60	100.00 ± 1.49	100.00 ± 3.74
70	61.27 ± 3.47	81.39 ± 4.61

表 4 游离蜗牛酶与固定化蜗牛酶的最适酶与底物质量比 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Optimal mass ratio of enzyme to substrate of free and immobilized snailase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

酶与底物质量比	蜗牛酶相对酶活力/%	
	游离	固定化
1:2	100.00 ± 1.29	100.00 ± 1.70
1:1	53.71 ± 2.67	69.61 ± 3.48
2:1	28.08 ± 0.33	42.18 ± 2.05
4:1	15.46 ± 1.12	24.51 ± 1.29

表 5 游离蜗牛酶与固定化蜗牛酶的最适酶解时间 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Optimal enzymatic hydrolysis time of free and immobilized snailase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

酶解时间/h	淫羊藿苷转化率/%	
	游离蜗牛酶	固定化蜗牛酶
1	96.44 ± 4.20	18.46 ± 0.87
3	97.40 ± 4.36	36.99 ± 1.53
6	98.88 ± 3.50	67.24 ± 4.90
12	99.34 ± 3.08	94.14 ± 3.39
24	102.40 ± 3.98	95.07 ± 3.49

2.5 固定化蜗牛酶的酶学性能考察

2.5.1 酶解动力学参数 分别称取适量的固定化蜗牛酶和游离蜗牛酶,水解不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL)的淫羊藿苷,按“2.1.1”项下方法测定酶解反应的初速度 v 。以底物浓度的倒数(1/[S])为横坐标,以酶解反应初速度的倒数(1/V)为纵坐标,采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,根据求导后的米氏方程 $1/V = K_m/(V_{\max}[S]) + 1/V_{\max}$ (K_m 为米氏常数, [S] 为底物浓度, $V_{\max}$ 为最大反应速率)计算 K_m 和 $V_{\max}$ 。结果见表 6,2 种酶的 1/V 和 1/[S] 均呈现良好的线性拟合关系,游离蜗牛酶的 K_m 值明显低于固定化蜗牛酶,表明蜗牛酶经交联纳米 SiO₂ 固定后对底物淫羊藿苷的亲合力有所下降,但最大反应速率相差不大。

2.5.2 热稳定性考察 分别称取适量的固定化蜗牛酶和游离蜗牛酶,在不同的温度(60、70、80、90 °C)条件下孵育 2 h 后,按“2.1.1”项下方法测定酶活力,结果见表 7。游离和固定化蜗牛酶的相对酶活力均随温度的升高呈下降趋势,在温度达到 90 °C 时,两者的相对酶活力均低于 30%,在此过程中固定化蜗牛酶的热稳定性较游离蜗牛酶并未显著提高($P > 0.05$)。

表 6 游离和固定化蜗牛酶的酶解动力学参数

Table 6 Enzymolysis kinetic parameters of free and immobilized snailase

样品	方程	r^2	$K_m/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$V_{\max}/(\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1})$
游离蜗牛酶	$Y=0.537\ 3\ X+2.218\ 5$	0.965 4	0.36	0.45
固定化蜗牛酶	$Y=1.219\ 9\ X+2.346\ 2$	0.949 6	0.78	0.43

表 7 游离蜗牛酶与固定化蜗牛酶的热稳定性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Thermal stability of free and immobilized snailase ($\bar{x} \pm s, n=3$)

温度/℃	蜗牛酶相对酶活力/%	
	游离	固定化
60	100.00±3.98	100.00±5.50
70	46.18±2.63	39.62±1.71
80	38.29±1.12	31.82±1.78
90	18.27±0.62	27.37±1.02

2.5.3 重复利用性考察 取适量固定化蜗牛酶与淫羊藿苷按“2.4”项下最适酶解水解条件反应后，离心，洗涤，收集沉淀物加入淫羊藿苷继续反应，重复上述操作 5 次，按“2.1.1”项下方法测定酶活力，结果见表 8，固定化蜗牛酶在重复利用 5 次后其相对酶活力仍能保持在 70%以上，表明固定化蜗牛酶可显著提高蜗牛酶的利用效率，实现淫羊藿苷的高效生物转化。

3 讨论

纳米 SiO_2 是一种白色无定形粉末，具有特殊的结构层次、良好的机械强度、较大的比表面积和较强的物理化学稳定性，且价廉易得、安全无毒，是制备固定化酶的理想载体。纳米 SiO_2 表面存在大量活性硅羟基，可与含有特定官能团（氨基、巯基、环氧基、乙烯基等）的硅烷偶联剂反应，从而实现纳米 SiO_2 的表面功能化^[26]。本实验先以 APTES 为硅烷偶联剂对纳米 SiO_2 表面进行氨基改性，再以戊二醛为交联剂，在温和的反应条件下，使其先与氨基

表 8 游离蜗牛酶与固定化蜗牛酶的重复利用性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Reusability of free and immobilized snailase ($\bar{x} \pm s, n=3$)

重复次数	蜗牛酶相对酶活力/%	
	游离	固定化
1	100±1.81	100.00±4.11
2	0	75.80±5.12
3	0	74.53±2.87
4	0	62.05±4.67
5	0	70.40±2.28

基化纳米 SiO_2 表面的氨基发生 Schiff 碱反应形成交联纳米 SiO_2 并引入醛基；交联纳米 SiO_2 上的醛基再与蜗牛酶分子上的氨基发生 Schiff 碱反应，从而使蜗牛酶以共价结合的方式牢固地固定在交联纳米 SiO_2 上^[27-28]。本课题组在前期研究中，以天然高分子材料海藻酸盐作为酶固定化载体，制备了尺寸大小不同的海藻酸钡球/微球固定化蜗牛酶^[18,25]，并将其成功应用于淫羊藿黄酮的生物转化，但由于海藻酸盐凝胶本身机械强度较差，在重复利用的过程中容易吸水膨胀甚至破裂，继而导致酶的泄露，影响其重复利用。而本研究制备的交联纳米 SiO_2 固定化酶具有较好的机械强度，重复利用多次后依然保持原有形态和性能，总体酶解效率更高。此外，与利用物理吸附作用制备的固定化酶相比，采用共价结合法制备的交联纳米 SiO_2 固定化酶更稳定，酶不易泄露，且能较好地保持其催化活性。

蜗牛酶经交联纳米 SiO_2 固定后，酶活回收率达到 91.0%，虽然较游离酶有所下降，但依然保持了较高的酶活力，说明固定化过程基本不影响酶的构象和活性中心。与游离蜗牛酶相比，固定化蜗牛酶的最适反应 pH 值、温度、酶与底物质量比均保持不变，但完全水解等量淫羊藿苷需要的时间变长(12 h)，这可能与固定化酶与底物的亲和力较小有关 (K_m 较大)，导致酶解速率变慢，但其酶解产物单一，更有利于获取活性更强、吸收更好、纯度更高的宝藿苷 I，而游离蜗牛酶的酶解产物较为复杂，包括宝藿苷 I 和淫羊藿苷元，且随酶解时间的延长，淫羊藿苷元的生成量在增加，而宝藿苷 I 的生成量在减少，这可能与游离蜗牛酶与底物的亲和力较大有关 (K_m 较小)，酶解过程中生成的宝藿苷 I 又进一步被快速水解为淫羊藿苷元，因此游离蜗牛酶水解淫羊藿苷难以获取高纯度的宝藿苷 I。固定化蜗牛酶的热稳定性较游离蜗牛酶没有明显提高，推测原因可能是蜗牛酶本身具有较好的耐热性能，所以经固定化后热稳定性提升不明显。固定化蜗牛酶可通过离心、滤过等方法与产物分离，且重复利用 5 次后，残余酶活力依然保持在 70%以上，大大提高了蜗牛酶的利用效率，在一定程度上降低生产成本，

利于工业化生产,同时也为固定化酶在中医药领域的应用奠定了实验基础。

参考文献

- [1] 詹 扬, 韦英杰, 孙 娥, 等. 二维斑马鱼模型联合色谱技术评价朝藿定 A 及其代谢物宝藿苷 I 抗骨质疏松活性 [J]. 药学学报, 2014, 49(6): 932-937.
- [2] 李 英, 王俨如, 张小强, 等. 淫羊藿中不同部位及单体化合物对 A β 25-35 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5206-5210.
- [3] 蒋凌云, 刘光明, 陈可欣. 淫羊藿苷的提取、分离和抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 353-358.
- [4] 武卫党, 慈小燕, 魏滋鸿, 等. 淫羊藿苷元对临床重要药物转运体抑制作用研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(6): 986-991.
- [5] Liu K P, Wang L F, Li Y, *et al.* Preparation, pharmacokinetics, and tissue distribution properties of icariin-loaded stealth solid lipid nanoparticles in mice [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(2): 170-174.
- [6] Yan H M, Zhang Z H, Jia X B, *et al.* D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate/Solutol HS15 mixed micelles for the delivery of baohuoside I against non-small-cell lung cancer: Optimization and *in vitro*, *in vivo* evaluation [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11: 4563-4571.
- [7] Wang L F, Lu A, Liu X X, *et al.* The flavonoid baohuoside-I inhibits cell growth and downregulates survivin and cyclin D1 expression in esophageal carcinoma via β -catenin-dependent signaling [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(5): 1149-1156.
- [8] 严红梅, 贾晓斌, 张振海, 等. 维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯对宝藿苷 I 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 384-388.
- [9] 高 霞, 刘 璇, 陈 彦, 等. 淫羊藿总黄酮的生物转化过程分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4079-4083.
- [10] Han S, Xie Y Y, Wang Y M. Comparative study on chemical quality of main species of epimedium [J]. *Acta Pharm Sinc*, 2012, 47(4): 502-507.
- [11] 于兆慧, 刘其媛, 崔 莉, 等. 微球固定化蜗牛酶转化人参皂苷 Rb₁ 制备人参稀有皂苷 compound K 研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3092-3097.
- [12] 李学坤, 李 莉, 田盼盼, 等. 响应面法优化微波辅助蜗牛酶提取女贞子黄酮 [J]. 化学工程, 2014, 42(3): 6-10.
- [13] 胡英杰, 樊蕴华, 肖敏勋, 等. 蜗牛酶水解牛蒡子苷制备苷元的研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(6): 473-475.
- [14] 张亚洲, 王 涛, 宋 强, 等. 蜗牛酶促毛蕊异黄酮苷转化成毛蕊异黄酮的条件研究 [J]. 中国药业, 2015(19): 21-23.
- [15] Liu C Y, Gao X, Liu Y P, *et al.* Icariin combined with snailase shows improved intestinal hydrolysis and absorption in osteoporosis rats [J]. *Biomed Pharmacother* 2017, 94: 1048-1056.
- [16] 高 霞, 陈 彦, 王 莹, 等. 淫羊藿苷仿生酶解过程的多因素考察 [J]. 药学学报, 2013, 48(11): 1716-1721.
- [17] 彭 静, 马益华, 陈 彦, 等. 固定化蜗牛酶同时生物转化淫羊藿中 4 种黄酮苷 [J]. 中成药, 2016, 38(9): 1984-1990.
- [18] 彭 静, 马益华, 陈 彦, 等. 微乳化-凝胶法制备微球固定化蜗牛酶并生物转化淫羊藿苷研究 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3326-3332.
- [19] Datta S, Christena L R, Rajaram Y R S. Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials [J]. *Biotechnology*, 2013, 3(1): 1-9.
- [20] Liu D M, Chen J, Shi Y P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2018, 102: 332-342.
- [21] Bilal M, Iqbal H M N, Hu H, *et al.* Enhanced biocatalytic performance and dye degradation potential of chitosan-encapsulated horseradish peroxidase in a packed bed reactor system [J]. *Sci Total Environ*, 2017, 575: 1352-1360.
- [22] Bilal M, Iqbal M, Hu H, *et al.* Mutagenicity and cytotoxicity assessment of biodegraded textile effluent by Ca-alginate encapsulated manganese peroxidase [J]. *Biochem Eng J*, 2016, 109: 153-161.
- [23] Patel S K, Kalia V C, Choi J H, *et al.* Immobilization of laccase on SiO₂ nanocarriers improves its stability and reusability [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2014, 24(5): 639-647.
- [24] 张育淇, 刘晓贞, 李 云, 等. 氨基功能化大孔 SiO₂ 固定化漆酶 [J]. 宁波大学学报: 理工版, 2015, 28(2): 108-113.
- [25] 彭 静, 马益华, 陈 彦, 等. 固定化 β -葡萄糖苷酶和蜗牛酶生物转化淫羊藿苷效率的比较研究 [J]. 药学学报, 2015, 50(12): 1652-1659.
- [26] Bruehwiler D. Postsynthetic functionalization of mesoporous silica [J]. *Nanoscale*, 2010, 2(6): 887-892.
- [27] Zheng P, Wang J, Lu C, *et al.* Immobilized β -glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose [J]. *Process Biochem*, 2013, 48(4): 683-687.
- [28] Gao S, Wang Y, Diao X, *et al.* Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15 [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(11): 3830-3837.