• 药剂与工艺 •

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

彭　静[1, 2]，马益华[2]，陈　彦[1, 2*]，刘聪燕[2]，高　霞[1, 2]，周　静[2]

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院，江苏 南京　210028
2. 中国中医科学院江苏分院 中药组分与微生态研究中心，江苏 南京　210028

摘　要：目的　制备微球固定化蜗牛酶，优化微球固定化蜗牛酶的制备方法及其生物转化淫羊藿苷的工艺条件。**方法**　利用微乳化-凝胶法将蜗牛酶包埋固定于海藻酸钡中，单因素优化蜗牛酶的固定条件。考察微球固定化蜗牛酶生物转化淫羊藿苷的最适反应温度、pH 值、底物比、底物质量浓度，并与游离蜗牛酶比较，同时考察微球固定化蜗牛酶的酶学性质。**结果**　利用 1.0%海藻酸钠、1.0% $BaCl_2$ 及适量乳化剂（质量分数为 2.5%司盘-20 和 1.5%聚山梨酯 80），通过微乳化凝胶的方法制备微球固定化蜗牛酶。与游离蜗牛酶相比，微球固定化蜗牛酶的热稳定性、pH 值稳定性均增强。微球固定化蜗牛酶转化淫羊藿苷的最适条件：转化温度 50 ℃，pH 值 5，微球固定化蜗牛酶与淫羊藿苷质量比 3∶1，淫羊藿苷质量浓度为 0.4 mg/mL，转化时间为 2.0 h，经 3 次转化，转化率仍可保持（53.84±3.41）%。**结论**　微球固定化蜗牛酶转化淫羊藿苷工艺简单，酶学性质稳定，可重复使用，为淫羊藿苷生物转化的工业生产奠定基础。

关键词：微乳-凝胶法；固定化蜗牛酶；生物转化；淫羊藿苷；转化率

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2015)22 - 3326 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.007

Microspheres immobilized snailase prepared by method of microemulsion-coacervation for transform icariin

PENG Jing[1, 2], MA Yi-hua[2], CHEN Yan[1, 2], LIU Cong-yan[2], GAO Xia[1, 2], ZHOU Jing[2]

1. Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
2. Research Center of Multi-component of Chinese Materia Medica and Microecology, Jiangsu Branch, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective　To prepare microspheres immobilized snailase, then optimize the method for making microspheres immobilized snailase and the process conditions for transformation of icariin. **Methods**　The snailase was embedded in barium-alginate by the method of microemulsion-coacervation. The preparation process was optimized by orthogonal test. Moreover, to optimize and compare the conditions for transforming icariin, such as temperature, pH values, ratio of substrate, and concentration, and to investigate the properties of snailase. **Results**　Sodium alginates (1.0%), $BaCl_2$ (1.0%), and emulgator were used for making microspheres immobilized snailase by emulsified and immobilized method. Compared with the free snailase, the stability of temperature and pH value of microspheres immobilized snailase was improved. The optimized conditions of microspheres immobilized snailase were 50 ℃, pH 5, microspheres immobilized snailase mass ratio of 3∶1, icariin concentration of 0.4 mg/mL, conversion 2 h, conversion 3 times, transformational ratio up to (53.84 ± 3.41)%. **Conclusion**　Microspheres immobilized snailase is stable and reusable. Besides, the process of transform icariin is moderate, so it is important and fundamental for industrialization.

Key words: microemulsion-coacervation; immobilized snailase; bioconversion; icariin; conversions rate

收稿日期：2015-06-29

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81173557）；中国中医科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助（ZZ08080016）

作者简介：彭　静（1989—），女，硕士在读，研究方向为中药药剂学。Tel: 18351895657　E-mail: pengjing5657@163.com

*通信作者　陈　彦，女，博士，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: 13805157904　E-mail: ychen202@hotmail.com

淫羊藿苷是中药淫羊藿中的主要黄酮类成分[1]，具有抗骨质疏松、调节免疫和抗肿瘤等多种药理活性[2-3]。研究发现，淫羊藿苷的代谢产物次级苷（宝藿苷）和苷元具有更强的药理作用[4]，因此有必要研究淫羊藿苷生物转化次级苷和苷元的方法，以便更稳定地获得淫羊藿次级苷和苷元。课题组前期利用海藻酸钡固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷，生物转化获得了次级苷和苷元，但由于海藻酸钡球体积较大（直径 2 mm 左右），容易将较多的底物和产物吸留于球的内部，影响产物的释放，从而影响转化反应的效率[5]。因此，本实验对前期研究进行改进，先将蜗牛酶交联，分散于海藻酸钠溶液中，再加入液体石蜡，利用高速搅拌的方法将混合溶液微乳化，最后通过 $BaCl_2$ 交联海藻酸羧酸基团将蜗牛酶固定于海藻酸钡中[6]。制备的海藻酸钡微球固定化蜗牛酶具有粒径小，比表面积大，与底物接触更加充分，具有减少对反应物吸附的优点，更有利于提高淫羊藿苷生物转化的效率。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；Shimadzu SS-550 扫描电子显微镜，日本岛津公司；Nano-ZS 型马尔文粒径测定仪，英国马尔文公司；Molecular Devices SpectraMax 190 酶标仪，上海美谷分子仪器有限公司；Mettler AL204 电子分析天平，瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司；Scilogex OS40Pro 顶置式电子搅拌器，美国 Scilogex 公司；THZ-82AHS 气浴恒温恒速振荡器，江苏金坛市金城国胜实验仪器厂；淫羊藿苷（批号 20110206）、宝藿苷 I（批号 20120222）对照品购自中国食品药品检定研究院，供定量测定用，质量分数均≥99%；淫羊藿苷原料药（批号 20100310，质量分数＞98%）、蜗牛酶，上海源叶生物科技有限公司；海藻酸钠、$BaCl_2$、戊二醛，国药集团化学试剂有限公司；甲醇、乙腈为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 酶活力的测定

以淫羊藿苷作为底物，在不同的反应温度（4、25、37、50、60、70 ℃），pH 值（2、3、4、5、6、7、8），底物比（1∶2、1∶1、2∶1、3∶1、4∶1），底物质量浓度（0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mg/mL）的条件下反应 1 h，取适量反应液，加 9 倍体积的甲醇终止反应，处理样品，HPLC 测定。酶的活力（U/mg）定义为在一定条件下，1 mg 酶每小时分解消耗淫羊藿苷的量[7-8]。按下列公式计算固定化酶的包封率、结合效率和相对酶活力。

相对酶活力＝酶活力/最大酶活力

最大酶活力为最适反应条件下的酶活力，按 100%计算

固定化酶的实际含酶量＝固定化酶的质量×固定化酶结合效率

包封率＝(加入游离酶总质量－未固定的酶质量)/游离酶的总质量

结合效率＝固定化酶的总酶活/使用的游离酶的总酶活

2.2 淫羊藿苷 HPLC 测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB C_{18} 柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-水系统，梯度洗脱：0～5 min，32%乙腈；5～7 min，32%～60%乙腈；7～12 min，60%乙腈；检测波长 270 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃，进样量 10 μL。

2.2.2 对照品与供试品溶液的制备 称取 105 ℃条件下，干燥至恒定质量的淫羊藿苷对照品 4.00 mg，置于 10 mL 量瓶中，甲醇溶解并定容，得到质量浓度为 400 μg/mL 的淫羊藿苷对照品储备液，于 4 ℃冰箱中保存，备用。

取经微球固定化蜗牛酶转化的淫羊藿苷混悬液 100 μL，加 900 μL 甲醇终止反应，涡旋后离心，取得上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即为供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密量取淫羊藿苷对照品储备液，用甲醇稀释成质量浓度为 200.0、100.0、50.0、25.0、12.5 μg/mL 的对照品溶液。按上述 HPLC 方法测定，以检测质量浓度为横坐标（X）、峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归分析，回归方程为 Y＝12.011 X＋19.036，r＝0.999 3，线性范围为 12.5～200.0 μg/mL。按公式计算淫羊藿苷的转化率。

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

2.3 微球固定化蜗牛酶的制备

称取 40 mg 的蜗牛酶溶于 10 mL 水中，加入 25%戊二醛使其体积分数为 0.1%，充分混匀后交联固定 20 min。将交联固定后的酶液与 90 mL 的海藻酸钠溶液混合均匀，使海藻酸钠的质量分数为 1.5%，蜗牛酶的终质量浓度为 0.4 mg/mL。然后，加入 2 倍体积的液体石蜡作为油相，用顶置式电子搅拌器以 1 000 r/min 的转速搅拌 30 min，进行微乳化。滴加司盘-20 至质量分数为 2.5%，聚山梨酯 80 至质量分数为 1.5%，继续以 1 000 r/min 的转速搅拌

30 min，形成稳定的微乳。最后加入 $BaCl_2$ 溶液至终质量分数为 1.0%，用顶置式电子搅拌器以 500 r/min 的转速搅拌 30 min，静置过夜，用蒸馏水超声 30 min，重复 3～5 次，充分洗涤微球，离心分离，冷冻干燥，即得微球固定化蜗牛酶，置于 4 ℃冰箱中保存备用。

2.4 微球固定化蜗牛酶制备工艺的优化

2.4.1 海藻酸钡微球制备工艺的优化

（1）洗涤方法对海藻酸钡微球形成的影响：比较不同体积分数（0、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%）的乙醇洗涤微球以及用蒸馏水超声不同时间（10、20、30、40 min）洗涤微球对海藻酸钡微球制备的影响。

（2）$BaCl_2$ 质量分数对海藻酸钡微球形成的影响：比较不同质量分数（0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.5%、2.0%）的 $BaCl_2$ 溶液对微乳固化为微球的影响。

（3）海藻酸钠溶液质量分数对海藻酸钡微球形成的影响：$BaCl_2$ 溶液的质量分数为 1.0%，比较不同质量分数（0.5%、1.0%、1.5%、2.0%）的海藻酸钠溶液对海藻酸钡微球形成的影响。

由实验结果可知，随着乙醇体积分数的增大，超声洗涤时间的延长，制备的微球流动性增强。在乙醇体积分数为 80%、90%、100%时，经超声 30 min，重复 3～5 次后，制备的海藻酸钡微球的流动性较好。但在利用游离酶考察洗涤方法对酶活力的影响时，发现乙醇对酶活力的影响很大，乙醇体积分数达 50%以上时，酶活力几乎完全损失。与乙醇溶液超声洗涤相比，蒸馏水超声洗涤对酶活力影响较小，超声 30 min，重复 5 次后，酶活力仍可保持 90%以上，更适于固定化蜗牛酶微球的洗涤。当 $BaCl_2$ 质量分数大于 0.8%时，微乳被固化为微球，容易在体系中沉降分离；当海藻酸钠溶液质量分数为 1.0%时，超声洗涤后制得的海藻酸钡微球流动性最好，休止角可达 37.74°，在其余质量分数条件下微球的休止角均大于 42°，流动性较差。综上所述，选择海藻酸钠溶液质量分数为 1.0%，$BaCl_2$ 溶液质量分数为 1.0%，蒸馏水超声 30 min 洗涤微球，重复 3～5 次的方法制备海藻酸钡微球空白载体。

2.4.2 蜗牛酶溶液质量浓度对微球固定化蜗牛酶的影响 将蜗牛酶配制成质量浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mg/mL 的溶液，按“2.3”项方法制备微球固定化蜗牛酶。将蒸馏水超声洗涤液与离心上清液合并，均匀混合后利用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）法[9]测定吸光度值，以蜗牛酶质量浓度为横坐标（X），吸光度值为纵坐标（Y）绘制标准曲线。根据标准曲线计算海藻酸钡微球中包封的蜗牛酶总量，考察包封率。标准曲线为 Y＝0.000 9 X＋0.151 2，r＝0.999 1。另取游离酶和微球固定化蜗牛酶均按酶与淫羊藿苷质量比为 1∶1，进行酶解淫羊藿苷的实验，反应 1 h 后取样，均加入甲醇终止反应，HPLC 测定，计算酶的结合效率。

由表 1 可知，蜗牛酶溶液终质量浓度介于 0.1～0.4 mg/mL 时，在海藻酸钡球中的包封率逐渐增大，介于 0.5～1.0 mg/mL 时，其包封率逐渐减小，在终质量浓度为 0.4 mg/mL 时包封率最大为（71.25±3.57）%。蜗牛酶溶液终质量浓度介于 0.1～0.4 mg/mL 时，与海藻酸钡球的结合效率逐渐增大，介于 0.5～1.0 mg/mL 时，其结合效率逐渐减小，在终质量浓度为 0.4 mg/mL 时结合效率最大为（63.71±3.52）%。

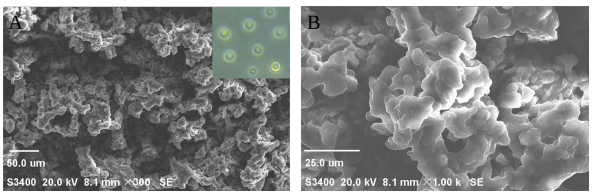
表 1 蜗牛酶溶液质量浓度对微球固定化蜗牛酶的影响（$\bar{x}\pm s$, n = 3）

Table 1 Effect of snailase at various concentration on microspheres immobilized snailase ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

质量浓度/(mg·mL^{-1})	微球固定化蜗牛酶包封率/%	微球固定化蜗牛酶结合效率/%
0.1	14.06±1.79	10.19±0.94
0.2	32.81±2.38	26.67±1.63
0.3	46.88±2.54	38.06±2.41
0.4	71.25±3.57	63.71±3.52
0.5	67.31±3.15	58.25±2.91
0.6	60.78±3.06	51.55±2.62
0.7	51.48±2.76	46.92±2.14
0.8	45.19±2.25	34.64±1.75
0.9	37.83±1.53	26.34±1.26
1.0	23.57±1.82	12.54±1.38

2.5 微球固定化蜗牛酶表面形态表征

利用 Shimadzu SS-550 扫描电子显微镜（SEM）观察微球固定化酶的表面结构。取样品粉末用固体导电胶带固定，镀金后，工作电压 15 kV，于真空条件下进行表征，见图 1。微球固定化酶表面呈现出不规则的多孔结构，具有比表面积大的特点，能够保证酶与底物充分接触，同时，微球固定化酶表



A、B 分别为不同显微倍数下的微球固定化蜗牛酶，图 A 中嵌入为 100 倍光学显微镜下微球形态图

A and B of microspheres immobilized snailase at different microscope magnification; the microsphere morphology in A is at 100 times light microscopes

图 1 微球固定化蜗牛酶的 SEM 图

Fig. 1 SEM photograph of microspheres immobilized snailase

面的多孔结构利于产物从微球中释放，可以提高固定化蜗牛酶的酶解速率。微球固定化酶经马尔文粒径仪测定，平均粒径为（157.33±2.01）μm（n=5）。

2.6 微球固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的工艺条件优化

2.6.1 微球固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的最适反应温度 称取适量游离及微球固定化蜗牛酶，在 pH 值为 5 的磷酸盐缓冲液中，分别于 4、25、37、50、60、70 ℃温度条件下，淫羊藿苷质量浓度 0.1 mg/mL，酶与淫羊藿苷质量比均为 3∶1，酶解淫羊藿苷，反应 1 h 后取样，均加入甲醇终止反应，HPLC 测定。由表 2 可知，游离和微球固定化蜗牛酶在 50 ℃条件下酶解淫羊藿苷时，二者的酶活力最高，因此，游离和微球固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的最适反应温度均为 50 ℃。与游离蜗牛酶相比，微球固定化蜗牛酶在不同反应温度下酶活力变化较小，在 25、37、60、70 ℃条件下，其相对酶活力均明显高于游离蜗牛酶。实验结果表明，酶经固定化后，酶反应的适宜温度范围变宽，更适合用于不同温度条件下的各种酶解转化反应。

表 2 反应温度对酶活力的影响（$\bar{x}\pm s$, n = 3)

Table 2 Effect of temperature on enzyme activity ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

温度/℃	相对酶活力/%	
	蜗牛酶	微球固定化蜗牛酶
4	23.86±1.14	24.31±1.25
25	27.77±1.26	42.89±1.84
37	48.89±1.63	71.78±2.56
50	100.00±2.99	100.00±3.21
60	29.86±1.37	68.51±2.67
70	26.34±1.41	64.21±2.48

2.6.2 微球固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的最适反应 pH 值 称取适量游离及微球固定化蜗牛酶，在最适反应温度下，分别于不同 pH 值（2、3、4、5、6、7、8）条件的磷酸盐缓冲液中，淫羊藿苷质量浓度 0.1 mg/mL，酶与淫羊藿苷质量比均为 3∶1，酶解淫羊藿苷，反应 1 h 后取样，均加入甲醇终止反应，HPLC 测定。由表 3 可知，游离和微球固定化蜗牛酶在 pH 6 的磷酸盐缓冲液中酶解淫羊藿苷时，二者的酶活力最高，但在实验过程中发现，在反应 pH 值大于 6 时，微球固定化蜗牛酶有逐渐溶涨和溶解的趋势，不利于其大规模生产应用，这与海藻酸钡的 pH 敏感性有关[10]。因此，选择微球固定化蜗牛酶的最适反应 pH 值为 5。与游离蜗牛酶相比，微球固定化蜗牛酶在不同反应 pH 值下酶活力变化较小，在极端 pH 值（2、3）条件下微球固定化蜗牛酶的相对酶活均高于游离蜗牛酶，具有显著性差异。实验结果表明酶经固定化后，酶反应的适宜 pH 值范围变宽，可以有效提高酶在不同 pH 值条件下的稳定性。

表 3 反应 pH 值对酶活力的影响（$\bar{x}\pm s$, n = 3)

Table 3 Effect of pH values on enzyme activity ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

pH 值	相对酶活力/%	
	蜗牛酶	微球固定化蜗牛酶
2	4.40±0.97	11.82±1.26
3	8.46±1.13	43.30±1.82
4	21.30±1.99	60.65±1.75
5	77.76±2.68	87.35±2.51
6	100.00±3.36	100.00±3.14
7	70.83±2.79	68.31±2.83
8	28.57±1.64	52.71±2.09

2.6.3 微球固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的最适底物比 称取适量游离及微球固定化蜗牛酶，在最适反应温度和最适反应 pH 值条件下，淫羊藿苷质量浓度为 0.1 mg/mL，酶与淫羊藿苷质量比分别为 1∶2、1∶1、2∶1、3∶1、4∶1，酶解淫羊藿苷，反应 1 h 后取样，均加入甲醇终止反应，HPLC 测定。由表 4 可知，游离蜗牛酶在与淫羊藿苷质量比为 1∶2 时，酶活力最高，随着酶与淫羊藿苷质量比的增加，游离蜗牛酶酶活力逐渐降低；微球固定化蜗牛酶在与淫羊藿苷质量比为 3∶1 时，相对酶活力最高。因此，游离蜗牛酶酶解淫羊藿苷的最适酶与淫羊藿苷质量比为 1∶2，微球固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的最适

表 4 不同酶与底物质量比对酶活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

Table 4 Effect of different reaction ratios on enzyme activity ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

酶与底物质量比	相对酶活力/%	
	蜗牛酶	微球固定化蜗牛酶
1∶2	100.00±3.47	45.17±2.07
1∶1	56.90±2.39	64.95±2.79
2∶1	29.34±1.78	78.05±3.14
3∶1	20.39±1.84	100.00±3.56
4∶1	17.78±1.17	93.79±3.77

酶与淫羊藿苷质量比为 3∶1。实验结果表明，与游离蜗牛酶相比，微球固定化蜗牛酶在酶解体系中不易出现饱和作用。

2.6.4 微球固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的最适底物质量浓度 称取适量游离及微球固定化蜗牛酶，在最适反应温度、最适反应 pH 值、最适酶与淫羊藿苷质量比条件下，淫羊藿苷质量浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mg/mL，酶解淫羊藿苷，反应 1 h 后取样，均加入甲醇终止反应，HPLC 测定。由表 5 可知，随着淫羊藿苷质量浓度的增大，游离和微球固定化蜗牛酶的酶活力均逐渐减小。与游离蜗牛酶相比，在淫羊藿苷质量浓度增大的过程中，微球固定化蜗牛酶酶活力降低趋势缓慢。这与淫羊藿苷在水中的溶解度有关，淫羊藿苷水溶性差，在低质量浓度条件下，与酶接触更加充分，转化效率较高。从酶解转化淫羊藿苷总量的角度考虑，在相同条件下，淫羊藿苷转化的量随淫羊藿苷质量浓度的增加而增加。因此，综合考虑淫羊藿苷的酶解速率和淫羊藿苷转化的总质量，实验最终选择淫羊藿苷的质量浓度为 0.5 mg/mL。

表 5 不同底物质量浓度对酶解淫羊藿苷的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

Table 5 Effect of substrate at various concentration on enzymatic hydrolysis icariin ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

底物质量浓度/(mg·mL^{-1})	蜗牛酶相对酶活力/%	微球固定化蜗牛酶相对酶活力/%	淫羊藿苷转化量/%
0.1	100.00±3.17	100.00±3.33	22.61±4.66
0.2	83.72±3.05	93.16±3.14	42.13±4.28
0.3	63.28±2.18	84.93±2.67	57.61±5.34
0.4	51.73±2.82	75.19±3.89	68.10±5.78
0.5	49.94±2.66	65.08±2.45	73.57±4.90
0.6	47.14±1.36	56.92±2.93	77.21±5.86
0.7	43.24±2.04	52.34±3.58	82.84±4.16
0.8	43.46±2.49	47.74±1.96	88.61±5.92
0.9	42.03±2.33	46.42±1.87	94.46±3.74
1.0	43.20±2.41	44.23±2.77	100.00±5.54

2.7 微球固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的酶学性质表征

2.7.1 微球固定化蜗牛酶热稳定性的考察 称取适量游离及微球固定化蜗牛酶置于不同温度（50、60、70、80、90、100 ℃）条件下放置 1 h 后，然后在最适反应条件下进行酶解反应 1 h 后取样，加入甲醇终止反应，HPLC 测定。由表 6 可知，在不同的温度条件下，游离及微球固定化蜗牛酶的稳定性变化趋势基本相似，但与游离蜗牛酶相比，微球固定化蜗牛酶的热稳定性均有所提高，且在 60、70、80 ℃温度条件下有显著性差异。说明酶经固定化后具有更好的热稳定性，利于酶在大规模生产中的使用和保存。

表 6 酶的热稳定性 ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

Table 6 Thermal stability of enzyme ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

温度/℃	蜗牛酶相对酶活力/%	微球固定化蜗牛酶相对酶活力/%
50	100.00±2.87	100.00±2.96
60	74.43±2.91	89.42±2.83
70	48.71±2.32	69.41±2.61
80	17.39±1.96	38.62±2.57
90	10.31±1.54	12.70±1.35
100	1.48±1.33	2.47±1.37

2.7.2 微球固定化蜗牛酶 pH 值稳定性的考察 称取适量游离及微球固定化蜗牛酶置于不同 pH 值（2、3、4、5、6、7、8）的磷酸盐缓冲液中，在最适的反应温度条件下保温 1 h，然后在最适反应条件下进行酶解反应 1 h 后取样，加入甲醇终止反应，HPLC 测定。由表 7 可知，微球固定化蜗牛酶在 pH 值为 6 的磷酸缓冲盐中稳定性最强，具有最大相对酶活力为（100.00±4.36）%，在 pH 值为 5 的磷酸缓冲盐中相对酶活为（94.18±3.52）%。与游离蜗牛酶相比，微球固定化蜗牛酶在不同的 pH 值下均保留了较高的酶活力，微球固定化蜗牛酶对 pH 值的耐受性增强。

2.7.3 微球固定化蜗牛酶贮藏稳定性的考察 将微球固定化蜗牛酶分别置于 4、25 ℃条件下保存，每周取样 1 次在最适反应条件下反应，测定固定化蜗

牛酶的酶活，连续测定 4 周，考察微球固定化蜗牛酶的贮藏稳定性。由表 8 可知，微球固定化蜗牛酶在 4 ℃条件下贮藏 7 d 后，酶活力保持约 90%，贮藏 28 d 后，酶活力保持约 50%，则其保存 1 周内，微球固定化蜗牛酶可保持其最佳酶活状态，最长保存时间为 28 d。微球固定化蜗牛酶在 25 ℃条件下贮藏 7 d 后，酶活力保持约 80%，贮藏 28 d 后，酶活力保持约 40%，则其保存 1 周内，微球固定化蜗牛酶保持其最佳酶活状态，最长保存时间为 21 d。

表 7 酶的 pH 值稳定性 ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3)

Table 7 Stability of enzyme pH values ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3)

pH 值	蜗牛酶相对酶活力/%	微球固定化蜗牛酶相对酶活力/%
2	6.48±2.34	26.98±2.03
3	10.79±2.56	52.36±2.97
4	30.17±2.76	77.39±3.14
5	76.34±3.15	94.18±3.52
6	100.00±4.24	100.00±4.36
7	73.53±4.09	76.67±4.99
8	40.92±2.88	51.23±3.04

表 8 微球固定化蜗牛酶在 4、25 ℃下的贮藏稳定性 ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3)

Table 8 Storage stability of microspheres immobilized snailase at 4 ℃ and 25 ℃ ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3)

贮藏时间/d	相对酶活力/%	
	4 ℃	25 ℃
0	100.00±0.91	100.00±1.07
7	89.45±1.02	82.36±1.11
14	78.67±0.84	68.25±1.28
21	63.41±1.15	51.64±0.76
28	49.71±1.23	37.57±0.98

2.7.4 微球固定化蜗牛酶重复利用性的考察 在微球固定化蜗牛酶酶解淫羊藿苷的最佳条件下，考察不同时间点（0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 h）淫羊藿苷的转化率。再取微球固定化蜗牛酶于最适反应条件下酶解淫羊藿苷，在酶解 2.0 h 取样，加入甲醇终止反应，HPLC 测定。将上述微球固定化蜗牛酶从酶解体系中分离，蒸馏水充分洗涤 3 次后，在相同的条件下反应，HPLC 测定，重复上述步骤，考察使用次数对微球固定化蜗牛酶的影响。由表 9 可知在微球固定化酶酶解淫羊藿苷的最佳反应条件下，0.5、1.0 h 后淫羊藿苷的转化率分别为（37.31±2.80）%、（71.22±3.26）%，反应 2.0 h 后淫羊藿苷酶解完全，则在微球固定化蜗牛酶重复利用性考察实验中，选择酶解淫羊藿苷 2.0 h 取样测定。实验结果得到微球固定化蜗牛酶重复 3 次转化淫羊藿苷的转化率分别为（100.00±4.18）%、（72.96±2.66）%、（53.84±3.41）%。在重复使用 3 次过程中，微球固定化蜗牛酶对淫羊藿苷的平均转化率为 75.61%。经过多次使用后微球固定化蜗牛酶的形态发生改变，不易与酶解体系分离，对淫羊藿苷的转化率和重复使用有所影响。

表 9 不同时间微球固定化蜗牛酶对淫羊藿苷的转化率 ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3)

Table 9 Conversion of icariin by microspheres immobilized snailase at different time ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3)

时间/h	淫羊藿苷转化率/%
0	0±0
0.5	37.31±2.80
1.0	71.22±3.26
2.0	100.00±5.07
4.0	100.00±3.44
6.0	100.00±5.02
8.0	100.00±4.79

2.8 优化条件下淫羊藿苷生物转化工艺的验证

称取微球固定化蜗牛酶 3 份，分别与 3 份淫羊藿苷在 50 ℃条件下，在 pH 值为 5 的磷酸盐缓冲液中，淫羊藿苷质量浓度 0.5 mg/mL，酶与淫羊藿苷质量比均为 3∶1，酶解淫羊藿苷，转化时间 2.0 h，均转化 3 次。HPLC 测定，微球固定化蜗牛酶转化淫羊藿苷的平均转化率分别为（74.88±0.17）%、（74.90±0.13）%、（74.83±0.19）%，表明微球固定化蜗牛酶转化淫羊藿苷的工艺稳定性，重复性好。

2.9 转化产物的结构鉴定

微球固定化蜗牛酶转化淫羊藿苷的产物，利用 MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 进行分析，经 MS 图谱分析得，宝藿苷 I 质谱图中有准分子离子峰 $[M+H]^+$ *m*/*z* 515.4、$[M+Na]^+$ *m*/*z* 537.5 和 $[M+K]^+$ *m*/*z* 553.4，与宝藿苷 I 相对分子质量相吻合。另外宝藿苷 I 二级质谱中有脱去鼠李糖得到的离子碎片（*m*/*z* 369.2）。淫羊藿苷元质谱图中有准分子离子峰 $[M+H]^+$ *m*/*z* 369.1，与淫羊藿苷元相对分子质量相吻合，另外淫羊藿苷元二级质谱中脱去-C_4H_7 得到 *m*/*z* 313.3 的离子碎片。^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 测定数据与

文献报道基本一致[11-12]，表明淫羊藿苷转化产物为宝藿苷 I 和淫羊藿苷元。

3 讨论

本实验采用乳化法将蜗牛酶固定于海藻酸钡微球中，相较于常规的制备方法，微球固定化蜗牛酶的粒径显著减小至 157.33 μm，与传统海藻酸钡球相比，粒径减小了 1/10，增加了与底物接触的比表面积，利于转化反应的进行，减少反应物非特异性吸附于球内的作用，使反应物容易释放到溶剂体系中[13]。实验主要对微球固定化蜗牛酶生物转化淫羊藿苷进行了研究，对游离蜗牛酶与微球固定化蜗牛酶的酶学性质做出了比较，归纳总结微球固定化蜗牛酶不同条件下的酶活力变化趋势，为以后进一步考察工业化的高底物浓度、低酶用量的淫羊藿苷高效转化过程提供参考依据。

实验得出，虽然蜗牛酶固定化后有一定的酶活损失，但经固定化后蜗牛酶对温度、pH 的耐受性明显增强，对环境要求简单，扩大了蜗牛酶生物转化的适用范围[14]。酶经固定化后，在酶解体系中为不溶性物质，与溶于酶解体系的游离酶相比，不容易出现饱和现象，减弱了酶饱和作用的影响，从而使酶活力得到充分发挥[15]。此外，固定化酶具有可以重复循环使用，延长酶使用寿命的优点，是其可用于大规模生产的重要条件之一。固定化酶在使用过程中，可以利用离心、过滤的方法与底物分离，减少了分离纯化产物的步骤，大大缩短了生产周期，减少了生产成本[16-17]。通过本实验的研究，改进了海藻酸钡固定化蜗牛酶的制备方法，得到具有多孔结构的海藻酸钡微球固定化蜗牛酶，克服了传统制备方法固定化酶球体积大、比表面积小、底物与酶接触少、吸留作用强等缺点，提高了蜗牛酶对淫羊藿苷的转化效率，为固定化蜗牛酶在医药生产领域中更广泛的应用提供了理论基础和实践经验。

参考文献

[1] 贾东升, 赵江丽, 施 峰, 等. 淫羊藿苷元磷脂复合物的制备及其固体分散体研究 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1449-1453.

[2] 高孟婷, 马芳芳, 吴少辉, 等. 淫羊藿苷的药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(18): 9623-9625.

[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] 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.

[5] Bi H, Liang Q, Busnel J M, *et al*. Kinetics of proteolytic reactions in nanoporous materials [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(10): 4685-4692.

[6] 王梦亮, 李万丽. 固定化 β-葡萄糖苷酶催化合成红景天甙的研究 [J]. 生物技术, 2009, 19(1): 68-70.

[7] 张 斌, 孙 倩, 任延鹏, 等. 海藻酸钠固定化 β-葡萄糖醛酸苷酶的研究 [J]. 中国食品添加剂, 2011(1): 110-115.

[8] 李艳丽, 陈列忠, 陶瑛妮. 壳聚糖固定化茶皂素脱色酶及其酶学性质的研究 [J]. 浙江农业科学, 2014, 1(3): 387-389.

[9] 周志军, 李策生, 李陶敬, 等. 检测人凝血因子Ⅷ蛋白质含量的 BCA 法的优化及验证 [J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(10): 1488-1492.

[10] 潘利华, 罗建平, 查学强, 等. 海藻酸钠固定化 β-葡萄糖苷酶的制备及其性质研究 [J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2007, 30(10): 1331-1335.

[11] 李 枫, 刘永濬. 宝藿苷-I, VI, VII 和宝藿素的分离和结构研究 [J]. 药学学报, 1988, 23(10): 739-748.

[12] 孙欣光, 黄文华, 郭宝林, 等. 宝藿苷 I 纯度标准物质的研制 [J]. 化学分析计量, 2014, 23(2): 1-5.

[13] Gupta M N, Kaloti M, Kapoor M, *et al*. Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2011, 39(2): 98-109.

[14] 李彦锋, 李军荣, 伏莲娣. 固定化酶的制备及应用 [J]. 高分子通报, 2001(2): 13-17.

[15] Ma J F, Zhang L H, Liang Z, *et al*. Immobilized enzyme reactors in proteomics [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2011, 30(5): 691-702.

[16] Zhang X, Guan R F, Wu D Q, *et al*. Enzyme immobilization on amino-functionalized mesostructured cellular foam surfaces, characterization and catalytic properties [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2005, 33(1): 43-50.

[17] Khoshnevisan K, Bordbar A K, Zare D, *et al*. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability [J]. *Chem Eng J*, 2011, 171(2): 669-673.