

壳聚糖交联介孔二氧化硅固定化 β -葡萄糖苷酶生物转化淫羊藿苷研究

刘聪燕^{1,2}, 李瑞云^{1,2}, 马程遥^{1,2}, 刘玉萍^{1,2}, 瞿 鼎^{1,2}, 李晓琦^{1,2}, 陈 彦^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 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 制备壳聚糖交联 SBA-15 型介孔二氧化硅 (SBA-15) 固定化 β -葡萄糖苷酶 (β -Glc), 促进淫羊藿苷高效转化为稀有宝藿苷 I。方法 采用吸附-交联法将 β -Glc 固定在壳聚糖交联 SBA-15 上, 以载酶量和相对酶活力为评价指标, 对其固定化条件进行优化; 采用透射电子显微镜 (TEM)、扫描电子显微镜 (SEM)、傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 和 N_2 吸附-脱附分析法对固定化酶进行表征, 并对其酶泄露行为进行考察; 以淫羊藿苷为底物, 以游离酶为对照, 考察固定化酶的最适酶解条件、酶解动力学和重复利用性。结果 制备交联 SBA-15 固定化 β -Glc 的最佳 pH 值为 6.0, 固定化时间为 8 h, 酶质量浓度为 7 mg/mL; 固定化酶的酶活力为 439.2 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$, 载酶量为 1.120 g/g 载体, 最适酶解条件为 pH 6.0, 转化温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 底物质量浓度 0.5 mg/mL, 转化时间 8 h, 酶解动力学参数最大反应速率 ($V_{\max}$) 为 10.24 $\mu\text{g}/\text{min}$, 米氏常数 (K_m) 为 16.15 mmol/L, 重复利用 5 次后残余酶活大于 80%。结论 制备的交联 SBA-15 固定化 β -Glc 载酶量高、转化能力强、重复利用性好, 可用于高效获取宝藿苷 I。

关键词: 淫羊藿苷; 宝藿苷 I; β -葡萄糖苷酶; 介孔硅; 固定化; 生物转化; 壳聚糖; 吸附-交联法; N_2 吸附-脱附分析法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)03-0685-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.010

Bioconversion of icariin by immobilized β -glucosidase in chitosan cross-linked mesoporous silica

LIU Cong-yan^{1,2}, LI Rui-yun^{1,2}, MA Cheng-yao^{1,2}, LIU Yu-ping^{1,2}, QU Ding^{1,2}, LI Xiao-qi^{1,2}, CHEN Yan^{1,2}

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

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

Abstract: Objective To prepare the immobilized β -glucosidase in chitosan cross-linked mesoporous silica, and improve the bioconversion of icariin to baohuoside I. **Methods** The β -glucosidase was immobilized in chitosan cross-linked mesoporous silica SBA-15 by adsorption-crosslinking method. The immobilization conditions were optimized using the enzyme loading capacity and relative enzyme activity as the test index. Transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and N_2 adsorption-desorption analysis were used to characterize the physicochemical properties of immobilized β -glucosidase, and the enzyme leakage was also investigated. Using icariin as substrate and free β -glucosidase as control, the optimal enzymatic hydrolysis conditions, enzymatic kinetic parameters and recyclability of the immobilized β -glucosidase were investigated. **Results** To prepare the immobilized β -glucosidase, the optimal pH was confirmed to be 6.0, the optimal immobilization time was 8 h and the optimal β -glucosidase concentration was 7 mg/mL. The immobilized β -glucosidase showed a well-retained activity of 439.2 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$ as well as a high enzyme loading capacity of 1.120 g/g support. The optimum hydrolysis conditions were as follows: pH 6.0, conversion temperature 50 $^{\circ}\text{C}$, substrate concentration 0.5 mg/mL, transformation time 8 h. The $V_{\max}$ and K_m of the immobilized β -glucosidase was 10.24 $\mu\text{g}/\text{min}$ and 16.15 mmol/L, respectively. After

收稿日期: 2020-10-12

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81703714); 国家自然科学基金青年项目 (81903858); 江苏省科教强卫医学重点人才项目 (ZDRCA 2016036); 江苏省中医药局科技项目 (YB201925)

作者简介: 刘聪燕 (1987—), 女, 助理研究员, 研究方向为中药制剂新技术和新方法。Tel: 15295757506 E-mail: liucongyan2007@126.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

five cycles of reuse, the residual relative enzyme activity of the immobilized β -glucosidase was more than 80%. **Conclusion** The immobilized β -glucosidase in chitosan cross-linked mesoporous silica has a high enzyme loading capacity, strong enzyme activity and good reusability, which is beneficial to the efficient production of baohuoside I.

Key words: icariin; baohuoside I; β -glucosidase; mesoporous silica; immobilization; biotransformation; chitosan; adsorption-crosslinking method; N_2 adsorption-desorption analysis method

宝藿苷 I 是来源于小檗科淫羊藿属植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的一种稀有次级黄酮苷, 具有显著的抗肿瘤、抗骨质疏松等药理活性^[1-2], 但原植物中宝藿苷 I 的含量非常低, 只有 0.01%~0.25%, 而市售高纯度宝藿苷 I 的价格约为每克 7000 元人民币^[3]。淫羊藿苷是淫羊藿中含量最丰富的一种原型苷, 价廉易得, 由于其具有与宝藿苷 I 相同的 8-异戊烯基黄酮骨架, 通过体外酶生物转化的方法脱去其 C-7 位葡萄糖基, 即可制备药理活性更强的宝藿苷 I, 故其可作为获取宝藿苷 I 的原料药^[4-5]。

β -葡萄糖苷酶又称 β -D-葡萄糖苷水解酶 (EC 3.2.1.21, β -glucosidase, β -Glc), 是一种广泛存在于植物、动物和微生物中的纤维素水解酶。研究表明, 在温和的条件下, β -Glc 可定向水解淫羊藿苷为宝藿苷 I, 但存在价格昂贵、寿命短、易于变性或降解、难以回收和再利用等缺陷。采用吸附、包埋、交联、共价结合等方法将酶固定在适宜载体材料上, 可有效延长酶的使用寿命, 提高其重复利用性能, 降低生产成本^[6-8]。SBA-15 型介孔二氧化硅 (SBA-15) 具有高度有序的 2D 六边形通道结构、较宽的孔径分布 (5~30 nm) 和良好的机械化学性能, 是酶固定化的理想载体^[9-10]。本研究采用吸附-交联法制备壳聚糖 (chitosan, CS) 交联 SBA-15 固定化 β -Glc (SBA-Glc-CS), 通过对其理化性质、酶泄露行为、最适酶解条件、酶解动力学和重复利用性进行考察, 证明了 SBA-Glc-CS 促进淫羊藿苷高效转化为宝藿苷 I 的潜力, 从而为宝藿苷 I 的绿色工业化生产提供新的思路和技术方法。

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; 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; JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司; Tescan MAIA3 LM 超高分辨场发射扫描电镜 (SEM), 捷克 Tescan 公司; Nicolet iS10 傅里叶红外光谱仪 (FTIR)、1510 Multiskan GO 酶标仪, 美

国 Thermo Fisher Scientific 公司; TRISTAR3020 比表面积与孔隙度分析仪, 美国 Mike 公司。

1.2 材料

β -Glc, 酶活 ≥ 6 U/mg, 美国 Sigma 公司; SBA-15, 江苏先丰纳米材料科技有限公司; 壳聚糖, 脱乙酰度 $\geq 95\%$, 上海麦克林生物化学有限公司; 25% 戊二醛水溶液, 国药集团化学试剂有限公司; 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 $\geq 98\%$, 供含量测定用, 购于上海源叶生物科技有限公司; BCA 试剂盒, 美国 Thermo Fisher Scientific 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^[11-12]

2.1.1 酶活力测定方法 以淫羊藿苷为底物, 在 50 °C、pH 6.0 条件下与适量酶振荡反应 1 h 后, 加入 9 倍量甲醇终止反应, 涡旋离心后, 取上清液进行 HPLC 检测, 计算酶活力、相对酶活力、酶活回收率和淫羊藿苷转化率。

酶活力可定义为在 50 °C、pH 6.0 条件下, 1 g 酶每小时水解消耗淫羊藿苷的物质的量, 表示为 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g})$ 。

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

酶活回收率 = 固定化酶总活力 / 被固定的游离酶总活力
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

色谱条件: 依利特 Supersil ODS2 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液: 0~7 min, 70%甲醇; 7~8 min, 70%~80%甲醇; 8~20 min, 80%甲醇; 检测波长 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C, 进样量 10 μL 。HPLC 色谱图见图 1。

2.1.2 载酶量测定方法 采用二辛可宁酸 (BCA) 法, 以牛血清蛋白 (BSA) 质量浓度为横坐标 (X), 吸光度 (A) 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得标准曲线回归方程为 $Y = 0.0079X + 0.0096$, $R^2 = 0.9989$, 结果表明 BSA 在 2.8~166.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 A

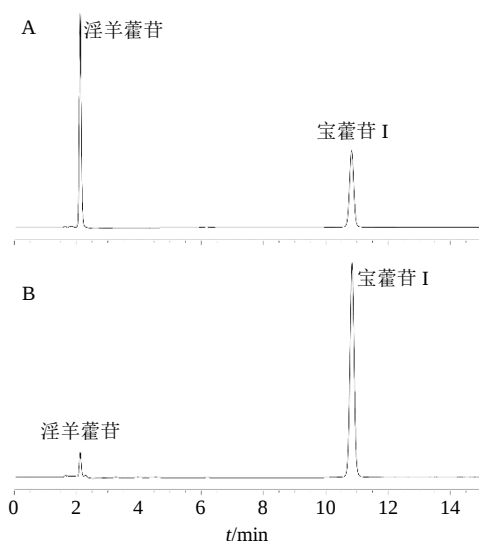


图 1 混合对照品 (A) 和酶水解样品 (B) 溶液的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of mixed standard solution (A) and sample solution after enzymatic hydrolysis (B)

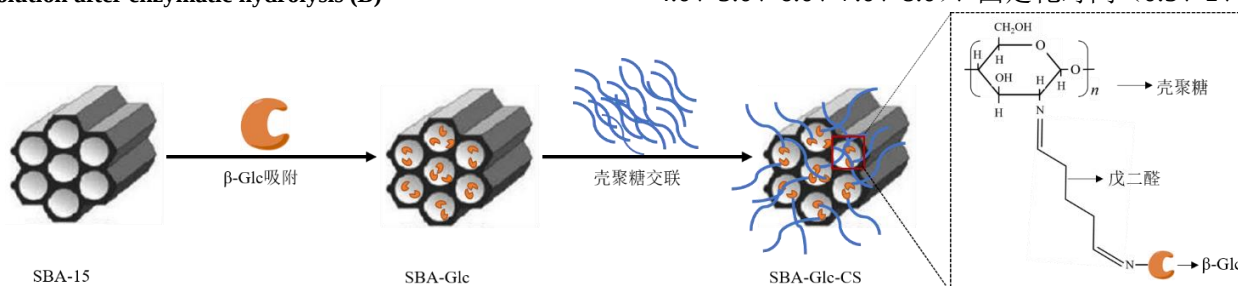


图 2 SBA-Glc-CS 的制备过程示意图

Fig. 2 Principle scheme of preparation of SBA-Glc-CS

3、6、8、12 h) 和酶质量浓度 (1、2、3、4、5、6、7、8、9 mg/mL) 对固定化酶酶活性和载酶量的影响, 结果分别见表 1~3。当固定化 pH 值为 6.0、固定化时间为 8 h、酶质量浓度为 7 mg/mL 时, SBA-Glc-CS 的酶活力最高, 在该条件下制备的固定化酶的酶活力为 439.2 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$, 酶活回收率为

表 1 固定化 pH 值对 SBA-Glc-CS 酶活性和载酶量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of immobilization pH values on enzyme activity and loading capacity of SBA-Glc-CS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

pH 值	相对酶活力/%	载酶量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
3.0	22.1 $\pm$ 3.2	945.7 $\pm$ 25.2
4.0	69.2 $\pm$ 4.3	945.4 $\pm$ 34.7
5.0	87.3 $\pm$ 2.6	954.1 $\pm$ 34.5
6.0	100.0 $\pm$ 1.9	947.5 $\pm$ 27.4
7.0	66.0 $\pm$ 3.9	878.4 $\pm$ 24.3
8.0	63.4 $\pm$ 2.5	853.5 $\pm$ 25.8

值呈良好的线性关系。

将待测样品溶液的 A 值代入回归方程, 计算固定化酶的载酶量和固定率。

载酶量 = 被固定的酶量/固定化酶的量

固定率 = 被固定的酶量/固定化过程中投入的总酶量

2.2 SBA-Glc-CS 的制备工艺优化

2.2.1 固定化 β-Glc 的制备 取适量 SBA-15 超声分散在 2 mL 具有一定 pH 值的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中, 加入适量 β-Glc 后, 室温下 200 r/min 震荡孵育一定时间, 再分别加入 0.2 mL 壳聚糖溶液 (5 mg/mL, 0.5% 稀盐酸溶液溶解) 和 0.2 mL 1.0% 戊二醛溶液, 室温下磁力搅拌 1 h, 离心收集沉淀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥过夜, 即得壳聚糖交联 SBA-15 固定化 β-Glc (SBA-Glc-CS)。固定化过程见图 2。

2.2.2 固定化参数优选 按“2.2.1”项下方法制备固定化 β-Glc, 分别考察不同固定化 pH 值 (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、固定化时间 (0.5、1、2、

表 2 固定化时间对 SBA-Glc-CS 酶活性和载酶量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of immobilization time on enzyme activity and loading capacity of SBA-Glc-CS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

时间/h	相对酶活力/%	载酶量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
0.5	86.2 $\pm$ 2.5	931.9 $\pm$ 25.3
1.0	80.6 $\pm$ 4.0	973.0 $\pm$ 34.8
2.0	69.8 $\pm$ 2.1	924.7 $\pm$ 26.4
3.0	66.7 $\pm$ 3.4	962.8 $\pm$ 24.1
6.0	62.9 $\pm$ 2.5	970.5 $\pm$ 20.9
8.0	100.0 $\pm$ 3.6	951.7 $\pm$ 34.3
12.0	32.4 $\pm$ 2.9	935.1 $\pm$ 26.6

93.7%, 载酶量为 1.120 g/g 载体, 固定率为 92.8%, 结果表明壳聚糖交联 SBA-15 不但可高效固定 β-葡萄糖苷酶, 还能较好地保持其酶活力。

2.3 SBA-Glc-CS 的质量评价

2.3.1 SEM 和 TEM 观察 取适量干燥样品粉末,

表3 固定化酶质量浓度对 SBA-Glc-CS 酶活力和载酶量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of immobilization enzyme concentration on enzyme activity and loading capacity of SBA-Glc-CS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

酶质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	相对酶活力/%	载酶量/(mg·g ⁻¹)
1.0	39.6±3.2	194.5±7.7
2.0	28.6±2.1	392.6±18.5
3.0	69.4±2.3	564.1±26.3
4.0	63.6±3.1	763.2±25.8
5.0	64.2±2.2	947.5±28.7
6.0	81.0±4.4	1 046.3±32.9
7.0	100.0±2.7	1 120.5±30.4
8.0	74.1±2.5	1 314.1±48.6
9.0	74.3±3.6	1 417.3±42.5

置于 SEM 下观察并拍照；取适量样品粉末，用无水乙醇超声分散后，滴于铜网上，于室温干燥后，立即置于 TEM 下观察并拍照；结果见图 3。SBA-15 和 SBA-Glc-CS 的 SEM 图均呈典型的具有一定长度的蠕虫状结构，TEM 图显示 2 个样品均存在均一有序的长通道介孔结构，SBA-Glc-CS 的表面呈现一些不透明的阴影，可能与壳聚糖交联有关。

2.3.2 FTIR 分析 取适量样品与 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进行测试，结果见图 4。SBA-15 和 SBA-Glc-CS 均在 462、800、1100 cm⁻¹ 处呈现 SiO₂ 的特征吸收峰，分别归属于 Si-O-Si 的弯曲振动、

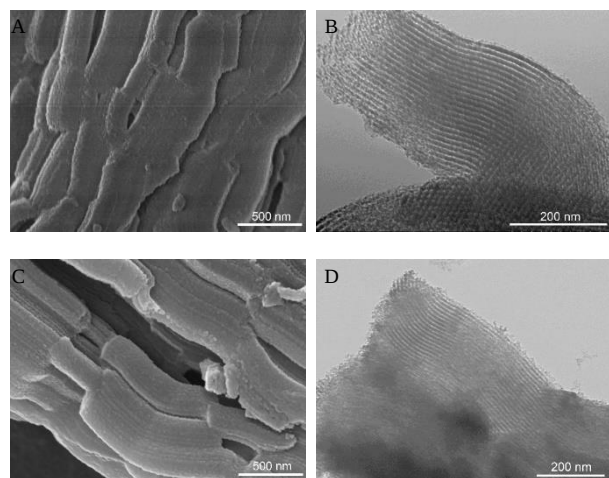


图3 SBA-15和SBA-Glc-CS的SEM (A, C) 和TEM (B, D) 表征图

Fig. 3 Representative SEM (A, C) and TEM (B, D) images of SBA-15 and SBA-Glc-CS

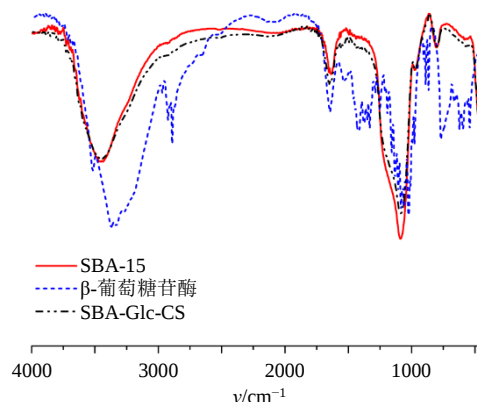


图4 SBA-15、β-Glc 和 SBA-Glc-CS FTIR 表征图

Fig. 4 FTIR spectrum of SBA-15, β-glucosidase and SBA-Glc-CS

对称伸缩振动和反对称伸缩振动；β-Glc 在 1653、1545、1260 cm⁻¹ 处存在 3 个特征吸收峰，分别归属于酶蛋白的酰胺 I 带 (C=O 伸缩振动)、酰胺 II 带 (N-H 伸缩振动，C-N 弯曲振动) 和酰胺 III 带 (N-H 弯曲振动，C-N 伸缩振动)。SBA-Glc-CS 在 1653、1409 cm⁻¹ 处存在的特征吸收峰可分别归属于 β-Glc 分子的酰胺 I 带 (C=O 伸缩振动) 和氨基酸侧链上 -CH₃ 中 C-H 对称伸缩振动，表明 β-Glc 被成功固定；此外，SBA-Glc-CS 在 1640 cm⁻¹ 处存在 1 个振动强度较弱的特征吸收峰，可归属于壳聚糖交联过程中戊二醛的醛基与壳聚糖、酶分子中氨基发生席夫碱反应时生成的 C=N 双键的伸缩振动，表明壳聚糖交联成功。

2.3.3 N₂ 吸附-脱附分析 取适量样品经 100 °C 脱气处理过夜后，于液氮 (-196 °C) 下测定其 N₂ 吸附-脱附等温线，结果见图 5。SBA-15 和 SBA-Glc-CS 的吸脱附曲线均呈典型的 IV 型曲线，且均具有 H1 滞留环，表明 2 种样品均存在均匀分布的介孔，酶的固定化过程不会改变 SBA-15 的介孔骨架结构。采用 BET 法计算 SBA-15 和 SBA-Glc-CS 的比表面积分别为 468.4、313.1 m²/g，采用 BJH 法计算 SBA-15 的孔容、孔径分别为 1.22 cm³/g 和 8.8 nm，SBA-Glc-CS 的孔容、孔径分别为 0.74 cm³/g 和 8.2 nm，SBA-Glc-CS 的比表面积、孔容、孔径均较 SBA-15 显著降低，表明酶被成功地固定在 SBA-15 的介孔中。

2.3.4 酶泄露评价 分别称取适量 SBA-Glc 和 SBA-Glc-CS，均匀分散在 pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液中，置于恒温气浴振荡器中 (50 °C，200 r/min) 孵育 0.5、1、1.5、2、2.5、3、6、9、12、24 h，于各个

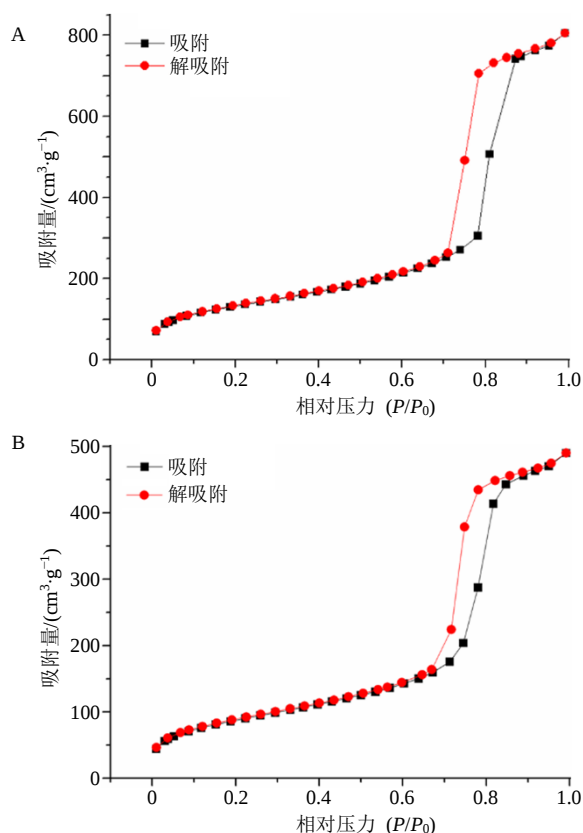


图 5 SBA-15 (A) 和 SBA-Glc-CS (B) 的 N₂ 吸附-脱附等温线和孔径分布图

Fig. 5 N₂ adsorption-desorption isotherms and pore size distributions of SBA-15 (A) and SBA-Glc-CS (B)

时间点分别取样 200 μ L, 同时补加 200 μ L 缓冲液, 取出的样品经离心后取上清液测定泄漏的 β -Glc 含量, 结果见图 6。未进行壳聚糖交联的 SBA-Glc 随着孵育时间的延长, 存在明显的酶泄漏现象, 其 24 h 的累计泄漏率高达 18.7%, 而经壳聚糖交联后的 SBA-Glc-CS 的 24 h 累计泄漏率仅为 1.4%, 表明壳聚糖交联可有效改善固定化酶的酶泄漏现象。

2.4 固定化 β -Glc 酶解淫羊藿苷的最适条件考察

按“2.1.1”项下方法测定不同 pH 值 (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、温度 (25、37、50、60 $^{\circ}$ C)、底物质量浓度 (0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mg/mL) 条件下固定化和游离 β -Glc 的酶活力, 计算相对酶活; 以淫羊藿苷转化率为指标, 考察固定化和游离 β -Glc 的最适酶解时间 (0.5、1、2、4、6、8、10、12 h), 结果见表 4~7。固定化和游离 β -Glc 的最适 pH 值均为 6.0, 最适温度游离酶为 60 $^{\circ}$ C, 固定化酶为 50 $^{\circ}$ C, 最适底物质量浓度均为 0.5 mg/mL, 游离 β -Glc 和固定化 β -Glc 的最适酶解时间分别为 4 h 和 8 h, 淫羊藿苷的转化率均在 95% 以上, 且酶解

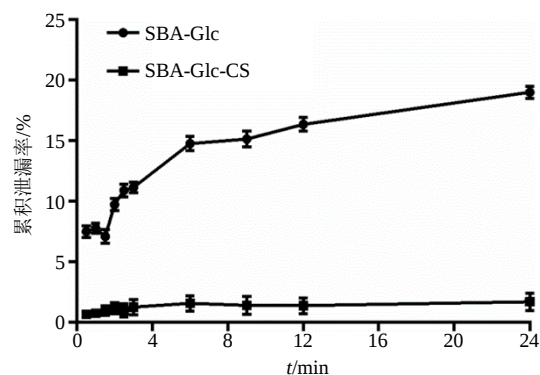


图 6 固定化 β -Glc 的累计泄漏率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Cumulative leakage rate of immobilized β -glucosidase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 4 游离与固定化 β -Glc 的最适酶解 pH 值考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

pH 值	相对酶活力/%	
	游离酶	固定化酶
4.0	20.6 $\pm$ 3.5	38.8 $\pm$ 4.8
5.0	93.1 $\pm$ 2.6	62.6 $\pm$ 3.7
6.0	100.0 $\pm$ 2.7	100.0 $\pm$ 3.2
7.0	54.8 $\pm$ 4.3	93.3 $\pm$ 5.4
8.0	7.3 $\pm$ 3.6	64.7 $\pm$ 3.1

表 5 游离与固定化 β -Glc 的最适酶解温度考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度/ $^{\circ}$ C	相对酶活力/%	
	游离酶	固定化酶
25	13.9 $\pm$ 3.6	75.6 $\pm$ 3.4
37	28.4 $\pm$ 4.9	78.3 $\pm$ 3.7
50	80.9 $\pm$ 3.3	100.0 $\pm$ 4.6
60	100.0 $\pm$ 3.7	63.1 $\pm$ 2.9

产物均为宝藿苷 I。

2.5 固定化 β -Glc 的酶学性能考察

2.5.1 酶解动力学参数 按“2.2.1”项下酶活测定方法, 分别称取适量游离和固定化 β -Glc, 水解不同质量浓度 (1.0、1.25、1.50、1.75、2.0 mg/mL) 淫羊藿苷, 测定并计算在酶促反应初始阶段 (淫羊藿苷转化量 $< 5\%$) 单位时间内淫羊藿苷的消耗量, 既得酶解反应的初速度 (V)。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 $V_{\max}$ 。

表 6 游离与固定化 β -Glc 的最适底物质量浓度考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Optimal substrate concentration of free and immobilized β -glucosidase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

底物浓度/ (mg·mL ⁻¹)	相对酶活力/%	
	游离酶	固定化酶
0.25	59.8±4.1	80.6±3.6
0.50	100.0±3.7	100.0±3.2
0.75	83.7±3.6	84.3±2.1
1.00	70.2±3.6	60.8±4.6
1.50	76.4±4.3	45.6±4.8

表 7 游离与固定化 β -Glc 的最适酶解时间考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 7 Optimal hydrolysis time of free and immobilized β -glucosidase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

时间/h	淫羊藿苷转化率/%	
	游离酶	固定化酶
0.5	75.5±3.3	9.8±4.9
1.0	88.1±2.8	21.1±5.6
2.0	92.3±3.7	42.8±4.5
4.0	96.5±4.6	70.3±5.1
6.0	95.8±3.0	88.6±4.3
8.0	97.4±3.5	95.5±4.6
10.0	97.8±3.2	98.6±2.9
12.0	98.1±2.7	99.1±2.0

结果见表 8, 2 种酶的 $1/V$ 均和 $1/[S]$ 呈良好的线性拟合关系, 与游离酶相比, 固定化 β -Glc 的 K_m 值变大, V_{max} 值变小, 表明 β -Glc 经固定后对淫羊藿苷的亲合力有所下降。

2.5.2 重复利用性考察 取适量固定化 β -Glc 与淫羊藿苷按“2.4”项下最适酶解条件反应后, 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 5 次实验的相对酶活力分别为 (100.0±2.1)%、

(89.2±4.5)%、(84.0±3.2)%、(82.9±3.1)%、(81.0±2.7)% ($n=3$), 固定化 β -Glc 在重复利用 5 次后的残余相对酶活力仍保持在 80% 以上, 而游离酶只能利用 1 次, 结果表明经交联 SBA-15 固定化可显著提高 β -Glc 的利用效率, 促进淫羊藿苷的高效生物转化。

3 讨论

物理吸附是一种简单、温和、经济的酶固定化方法, 酶分子通过氢键、范德华力、静电等作用被载体固定化, 由于作用力较弱且不影响酶的活性位点, 从而保持了固定化酶较高的酶活回收率, 但也存在酶易泄漏、稳定性较差等问题^[13-14]。吸附-交联法是目前最常用的一种复合固定化方式, 该方法可以使酶在较为温和的条件下被固定化, 既能较好地保持酶活力, 又能防止酶泄漏^[15-16]。

SBA-15 是一种具有二维立方体棒状结构的介孔硅, 其特殊的长通道介孔为酶的吸附固定提供了较大的空间。研究表明, 介孔二氧化硅的孔径与酶的装载量、酶活力、稳定性密切相关, 若孔径显著小于待固定酶的分子尺寸, 则酶大部分都不能进入孔道内, 造成载酶量偏低; 若孔径显著大于待固定酶的分子尺寸, 则通过吸附作用固定的酶很容易从孔道中泄漏, 造成酶活力下降和稳定性变差, 因此根据不同酶的分子尺寸选择适宜孔径的介孔硅至关重要^[17-18]。此外, 固定化溶液 pH 值、吸附时间、酶浓度等因素也会显著影响固定化酶的载酶量和酶活力, 但载酶量越高, 酶活力却不一定越高, 这可能是由于过多的酶分子拥挤在介孔二氧化硅的孔道里, 反而阻碍了底物分子与酶的充分接触反应^[9]。

本研究选用的 SBA-15 经 N_2 吸附-脱附分析测定其孔径为 8.8 nm, 稍大于 β -Glc 的分子尺寸 (相对分子质量 130 000, 6.7 nm)^[19], 在最优条件下制备的固定化 β -Glc 的载酶量高达 1.120 g/g 载体, 酶活力高达 439.2 μ mol/(h·g), 表明 SBA-15 是固定 β -Glc 的理想载体。为了改善酶的泄漏, 本研究以广泛应用的天然壳聚糖为介孔封堵剂, 发现适量的壳聚糖交联可显著降低固定化 β -Glc 的酶泄漏量, 同时还能较好地保持其酶活力^[20-21]; 在交联过程中, 壳聚糖的用量需要控制, 交联量过低则无法改善酶泄漏, 交联量过高则会堵住介孔, 不利于底物分子进入孔道与酶发生反应。与游离酶相比, 经壳聚糖交联 SBA-15 固定化的 β -Glc 酶解淫羊藿苷的最适反应 pH 值、底物浓度保持不变, 最适温度有所降

表 8 游离和固定化 β -Glc 的酶解动力学参数Table 8 Enzymatic kinetic parameters of free and immobilized β -glucosidase

样品	方程	r^2	K_m / (mmol·L ⁻¹)	V_{max} / (μ g·min ⁻¹)
游离 β -Glc	$Y=0.2314X+0.0540$	0.9156	6.33	18.52
交联固定 化 β -Glc	$Y=1.0677X+0.0977$	0.9941	16.15	10.24

低, 酶解等量淫羊藿苷所需时间变长, 这可能是由于固定化过程在一定程度上影响了酶的活性中心, 降低了酶与底物的亲和力 (K_m 变大), 继而导致酶解速率变慢 (V_{max} 变小), 酶解时间延长。但固定化 β -Glc 具有制备工艺简单、载酶量高、易于分离、稳定性好、可重复利用等优势, 在循环利用 5 次后的剩余酶活依然保持在 80% 以上, 总体酶解效率较游离酶 (只能利用 1 次) 显著提高, 促进了淫羊藿苷在体外高效转化为宝藿苷 I, 该研究为获取活性更强的中药稀有次级苷或苷元提供了新的技术方法和实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xi Y, Jiang T, Yu J, *et al.* Preliminary studies on the anti-osteoporosis activity of baohuoside I [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108850.
- [2] Ni F B, Tang H J, Wang C, *et al.* Baohuoside I inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells via mTOR/S6K1-caspases/Bcl2/bax apoptotic signaling [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 10609-10621.
- [3] 韩笋, 谢媛媛, 王义明, 等. 淫羊藿属主要资源种类的化学品质比较研究 [J]. *药学学报*, 2012, 47(4): 502-507.
- [4] Shen Y P, Wang H Y, Lu Y, *et al.* Construction of a novel catalysis system for clean and efficient preparation of baohuoside I from icariin based on biphasic enzymatic hydrolysis [J]. *J Clean Prod*, 2018, 170: 727-734.
- [5] Shen Y, Wang M, Zhou J, *et al.* Eco-efficient biphasic enzymatic hydrolysis for the green production of rare baohuoside I [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2019, 131: 109431.
- [6] Liu D M, Chen J, Shi Y P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2018, 102: 332-342.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Gao S L, Wang Y J, 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.
- [10] Bhange P, Sridevi N, Bhange D S, *et al.* Immobilization of bile salt hydrolase enzyme on mesoporous SBA-15 for co-precipitation of cholesterol [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 63: 218-224.
- [11] 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.
- [12] 李瑞云, 刘聪燕, 许婷, 等. 交联纳米 SiO_2 固定化蜗牛酶的制备表征及转化淫羊藿苷研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(20): 4904-4910.
- [13] Izrael Živković L T, Živković L S, Babić B M, *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia [J]. *Biochem Eng J*, 2015, 93: 73-83.
- [14] 王清爽, 翟庆洲. MCFs 吸附纤维素酶的研究 [J]. *化学研究与应用*, 2017, 29(8): 1155-1163.
- [15] Liu D M, Chen J, Shi Y P. Tyrosinase immobilization on aminated magnetic nanoparticles by physical adsorption combined with covalent crosslinking with improved catalytic activity, reusability and storage stability [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1006: 90-98.
- [16] 耿梦华, 陈晟, 吴敬, 等. 吸附交联法固定化蔗糖异构酶及其在异麦芽酮糖制备中的应用 [J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(4): 104-110.
- [17] 栾嘉瑶, 高亦鲲, 王梦洋, 等. 介孔二氧化硅载体对蛋白药物载药释药及提高酶降解稳定性的初步研究 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2018, 35(4): 259-264.
- [18] Singh R K, Tiwari M K, Singh R, *et al.* From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 1232-1277.
- [19] Gómez J M, Romero M D, Fernández T M, *et al.* Immobilization of β -glucosidase in fixed bed reactor and evaluation of the enzymatic activity [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2012, 35(8): 1399-1405.
- [20] Xiang X, Ding S, Suo H, *et al.* Fabrication of chitosan-mesoporous silica SBA-15 nanocomposites via functional ionic liquid as the bridging agent for PPL immobilization [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 182: 245-253.
- [21] 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.

[责任编辑 郑礼胜]