

固定化 α -L-鼠李糖苷酶水解朝藿定 C 制备淫羊藿苷研究

陈旺^{1,2}, 张月¹, 张宇航^{1,3}, 冯自立^{4,5*}, 袁洪超⁶ (1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000; 3. 陕西西凤酒股份有限公司, 陕西 宝鸡 721000; 4. 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心, 陕西 汉中 723000; 5. 秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室(培育), 陕西 汉中 723000; 6. 陕西金慧方中药科技有限公司, 陕西 镇巴 723600)

摘要:目的 制备 SBA-15 型介孔二氧化硅固定化 α -L-鼠李糖苷酶, 促进朝藿定 C 高效转化为淫羊藿苷。方法 通过氨基化和醛基化对 SBA-15 进行修饰, 将 α -L-鼠李糖苷酶共价偶联在 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 X 射线衍射 (XRD)、傅里叶变换红外光谱 (FT-TR)、氮气吸附与脱附、扫描电镜 (SEM) 及透射电镜 (TEM) 等对固定化酶进行表征; 以朝藿定 C 为底物, 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 制备固定化酶工艺的最佳 pH 值为 3.5, 温度为 35 °C, 时间为 4 h, 酶质量浓度为 8 mg · mL⁻¹; 固定化酶的酶活力为 198.6 μ mol · h⁻¹ · g⁻¹, 载酶量为 256.9 mg · g⁻¹, 最适酶解条件为 pH 值 4.5, 转化温度 50 °C, 底物质量浓度 0.5 mg · mL⁻¹, 转化时间 12 h, 酶解动力学参数最大反应速率 (V_{\max}) 为 0.505 μ g · min⁻¹, 米氏常数 (K_m) 为 0.787 mmol · L⁻¹, 循环利用 4 次后残余酶活在 65% 以上, 具有良好的稳定性。结论 制备的 SBA-15 固定化 α -L-鼠李糖苷酶载酶量高、转化能力强、重复利用性好, 可用于高效转化朝藿定 C 制备淫羊藿苷。

关键词:朝藿定 C; α -L-鼠李糖苷酶; 淫羊藿苷; SBA-15; 固定化

doi: 10.11669/cpj.2024.13.003 中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)13-1193-08

Preparation of Icariin by Hydrolyzing Epimedin C with Immobilized α -L-Rhamnosidase

CHEN Wang^{1,2}, ZHANG Yue¹, ZHANG Yuhang^{1,3}, FENG Zili^{4,5*}, YUAN Hongchao⁶ (1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China; 2. Shaanxi Province Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong 723000, China; 3. Shaanxi Xifeng Liquor Co., Ltd., Baoji 721000, China; 4. Qinba Mountain Area Collaborative Innovation Center of Bioresources Comprehensive Development, Hanzhong 723000, China; 5. Qinba State Key Laboratory of Biological Resources and Ecological Environment (Incubation), Hanzhong 723000, China; 6. Shaanxi Jinhui Fang Traditional Chinese Medicine Technology Company, Zhenba 723600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare the immobilized α -L-rhamnosidase on SBA 15 mesoporous silica to promote the efficient conversion of epimedin C to icariin. **METHODS** SBA-15 was modified through amination and aldehydeylation, and the α -L-rhamnosidase was covalently coupled onto SBA-15. The immobilization conditions were optimized using the enzyme loading capacity and relative enzyme activity as evaluation index. X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), N₂ adsorption-desorption analysis, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscope (TEM) were used to characterize the physico-chemical properties of immobilized α -L-rhamnosidase. Using epimedin C as substrate and free α -L-rhamnosidase as control, the optimal enzymatic hydrolysis conditions, enzymatic kinetic parameters and recyclability of the immobilized α -L-rhamnosidase were investigated. **RESULTS** The optimal pH was 3.5, the optimal temperature was 35 °C, the optimal immobilization time was 4 h and the optimal α -L-rhamnosidase concentration was 8 mg · mL⁻¹. The immobilized α -L-rhamnosidase showed a well-retained activity of 198.6 μ mol · h⁻¹ · g⁻¹ as well as a high enzyme loading capacity of 256.9 mg · g⁻¹ support. The optimum hydrolysis conditions were as follows: pH 4.5, conversion temperature 50 °C, substrate concentration 0.5 mg · mL⁻¹, and transformation time 12 h. The V_{\max} and K_m of the immobilized α -L-rhamnosidase was 0.505 μ g · min⁻¹ and 0.787 mmol · L⁻¹, respectively. After four cycles of reuse, the residual relative enzyme activity of the immobilized α -L-rhamnosidase was more than 65%, which showed good stability. **CONCLUSION** The immobilized α -L-rhamnosidase has a high enzyme loading capacity, strong enzyme activity and good reusability, which can be used for efficient conversion of epimedin C to icariin.

KEY WORDS: epimedin C; α -L-rhamnosidase; icariin; SBA-15; immobilization

基金项目:秦巴生物资源与生态环境重点实验室(培育)“市校共建”科研专项资助(SXC-2302, SXZC-2302)

作者简介:陈旺,男,博士,副教授 研究方向:天然产物结构改造与修饰研究 * **通讯作者:**冯自立,男,博士,教授 研究方向:天然药物有效成分开发 Tel: (0916)2649396

淫羊藿苷为传统中药淫羊藿(*Epimedium brevicornum*)的主要活性成分,具有显著的抗骨质疏松^[1]、抗肿瘤^[2]、神经细胞保护^[3]、抗炎^[4]和增强机体免疫力^[5]等多种药理作用。淫羊藿中另一个主要成分朝藿定 C 与淫羊藿苷母核结构相同,仅在 C-3 位置上多一个鼠李糖基;朝藿定 C 是淫羊藿中含量最高的黄酮苷类化合物,但表现出一定的毒性^[6]。淫羊藿苷作为淫羊藿的指标性成分,其药理活性优于朝藿定 C,且价格远高于朝藿定 C,因此水解朝藿定 C 制备淫羊藿苷具有重要意义。

α -L-鼠李糖苷酶(α -Rha)作用于 α -1、 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4 和 α -1,6 连接的鼠李糖苷键,可以特异性去除聚糖或者糖苷类化合物末端的 α -L-鼠李糖基^[7],生成新的低糖苷类化合物。已有文献^[8-13]报道多种微生物来源的游离 α -Rha 克隆及表达,可定向转化朝藿定 C 为淫羊藿苷。Yin^[14]报道利用游离 α -Rha 水解朝藿定 C 得到淫羊藿苷,从而提升巫山淫羊藿提取物中淫羊藿苷含量。本课题组前期优化了商品化 α -Rha 转化朝藿定 C 的方法,并进行克级放大制备高纯度淫羊藿苷^[15]。但以上方法所使用的酶多需要异源表达或者价格昂贵,游离 α -Rha 存在使用寿命短,难以回收和重复利用等问题,难以大规模工业化应用。因此,常使用吸附、包埋、交联和共价键结合等方法,将酶固定在合适的载体材料上来提高酶的稳定性和可重复利用性^[16]。

介孔二氧化硅(SBA-15)具有规整的六方有序孔道结构(5~30 nm)、大的比表面积且化学稳定性高,有良好的耐热性、机械性和耐化学性^[17],有利于其他化合物的分散和负载。SBA-15 表面含有丰富的硅醇羟基基团,有利于改性,是理想的酶固定化载体^[18],广泛用于医药^[19]、食品^[20]、生物清洁^[21]等多个领域。本研究通过共价键结合法将游离 α -Rha 固定在 SBA-15 载体上,先对固定化条件进行优化,再对其酶活回收率和重复利用性等进行考察,通过建立高效的 SBA-15 固定化游离 α -Rha (SBA-Rha) 水解朝藿定 C 工艺,为淫羊藿提取物高值化利用提供新的技术方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);AVANCE-III HD 600 MHz (德国布鲁克公司);LTQ-Orbitrap XL 型质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);Biotek Epoch 全波长酶标仪

(美国 Bio Tek 公司);VERTEX70 傅里叶红外光谱仪(FT-TR)[布鲁克(北京)科技有限公司];Thermo Scientific Apreo 2 型高性能场发射扫描电镜(SEM)(美国 Thermo Fisher 公司);JEM-2100P 型透射电子显微镜(TEM)(日本电子株式会社);Ultima IV 型 X 射线衍射仪(XRD)(日本理学株式会社);TRISTAR3020 比表面积与孔隙度分析仪(美国 Mike 公司);JA500 电子天平(上海衡平仪器仪表厂)。

1.2 材料

介孔二氧化硅(SBA-15)、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)、25%戊二醛(GA)(上海泰坦科技股份有限公司);淫羊藿苷对照品(陕西乐博生化科技有限公司,批号:191010,含量 $\geq 98\%$);朝藿定 C(含量 $\geq 98\%$)实验室自制^[22]; α -L-RHa (Megazyme 公司,批号:110501d);牛血清蛋白(BSA,陕西乐博生化科技有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析测定方法

2.1.1 酶活力测定 以朝藿定 C 为底物,在 50 °C、pH 4.5 磷酸盐缓冲液中与适量酶反应 1 h 后,加入 9 倍量的甲醇终止反应,0.22 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液 HPLC 检测,计算酶活力、相对酶活力、酶活回收率和朝藿定 C 转化率。

酶活力定义:在 50 °C 和 pH 4.5 的反应条件下,1 g 酶每小时水解朝藿定 C 的物质的量,表示为 $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。相对酶活力计算见公式 1。

相对酶活力 = 酶活力/最高酶活力 公式(1)

最高酶活力为同组实验中活力最高的值,计为 100%。

酶活回收率为固定化酶总活力占被固定的游离酶总活力的比率。

转化率为反应消耗掉的朝藿定 C 的比例。

色谱条件:色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m);流动为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 = 30:70;检测波长 270 nm;流速 1 mL · min⁻¹;柱温 30 °C;进样量 10 μ L。色谱图见图 1。

2.1.2 酶载量测定方法 采用二辛可宁酸(BCA)法,以牛血清蛋白(BSA)为对照测定蛋白量。以 BSA 质量浓度为横坐标(ρ),吸光度值(A)为纵坐标,得标准曲线: $A = 0.001 1\rho + 0.014 4, r^2 = 0.996 1$;BSA 在 25~2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与吸光度值(A)线性关系良好。在固定化酶制备结束后,离心取上清

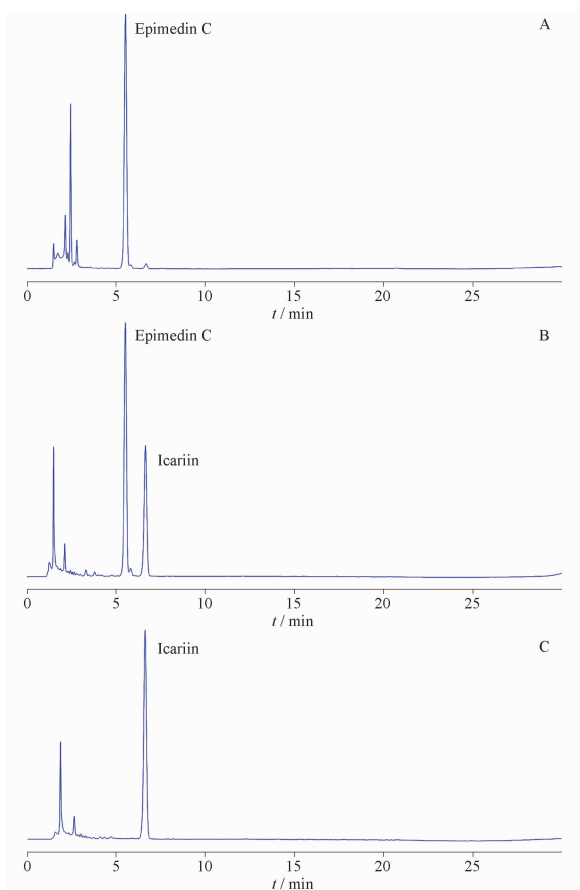
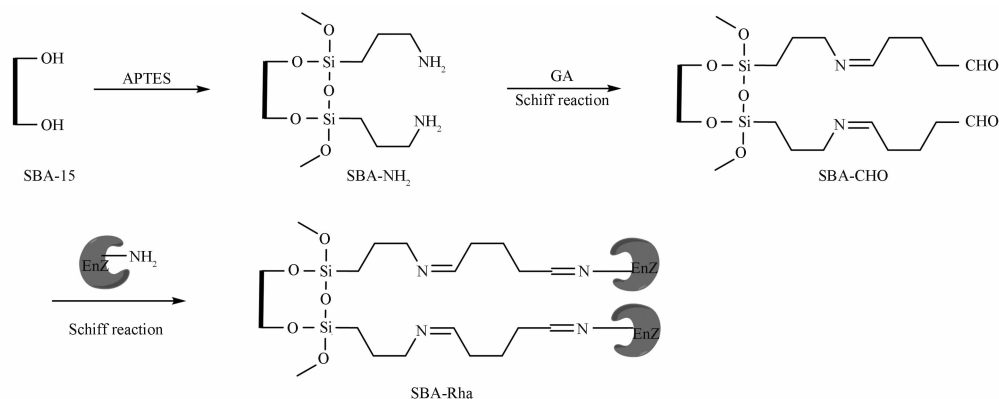


图1 朝藿定C(A)、酶转化2 h样品(B)和酶转化12 h样品(C)溶液的高效液相色谱(HPLC)图

Fig. 1 HPLC chromatograms of epimedini C(A), samples solution after 2 h conversion(B) and sample solution after 12 h conversion(C)



APTES - 氨丙基三乙氧基硅烷; GA - 戊二醛。

APTES - 3-aminopropyltriethoxysilane; GA - glutaraldehyde.

图2 介孔二氧化硅固定化鼠李糖苷酶(SBA-Rha)的制备过程示意图

Fig. 2 Principle scheme of preparation of SBA-Rha

2.2.3 固定化工艺优化 按“2.2.2”项下方法制备 SBA-Rha,分别考察不同固定化 pH 值(3.0、3.5、4.0、4.5、5.0)、温度(25、30、35、40、45 °C)、时间(2、

液,沉淀用蒸馏水洗涤3次,合并洗涤液与上清液,加水定容即为样品溶液。按 BCA 试剂盒方法在 562 nm处测定样品溶液 A 值,利用标准曲线和公式 2~3 计算载酶率和固定率。

$$\text{载酶量} = \frac{\text{被固定的酶量}}{\text{固定化酶的量}}$$

公式(2)

$$\text{固定率} = \frac{\text{被固定的酶量}}{\text{固定化过程中投入的总酶量}}$$

公式(3)

2.2 SBA-Rha 的制备工艺优化

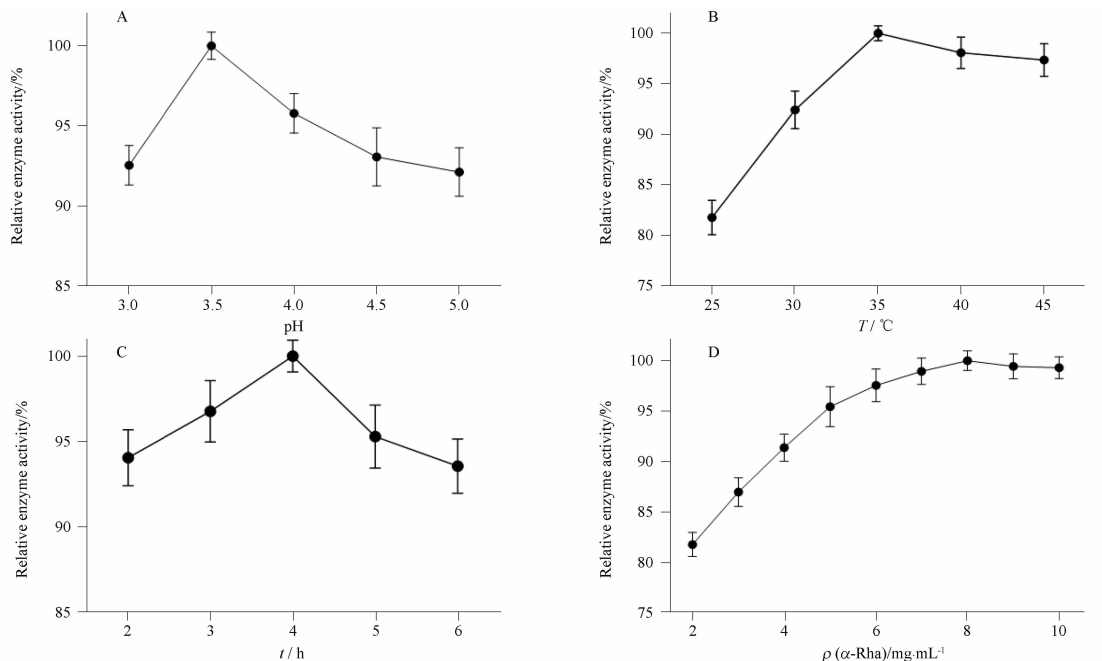
2.2.1 SBA-15 的改性 称取 1 g SBA-15,加 25 mL 无水甲苯和 4 mL APTES, N_2 保护下 110 °C 回流,反应 48 h。反应结束后 4 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,再依次使用无水甲苯、二氯甲烷、甲醇、水和甲醇进行洗涤,50 °C 真空干燥过夜,即得氨基改性的 SBA-15 (SBA-NH₂)^[23] 1.3 g。精密称取干燥的 SBA-NH₂ 1 g,加入 50 mL 的 7% GA 溶液,在 35 °C 下搅拌反应 4 h,反应结束后 4 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,超纯水离心洗涤 3 次,50 °C 真空干燥过夜,即得醛基改性的 SBA-15 (SBA-CHO) 1.35 g。

2.2.2 SBA-Rha 制备^[24] 精密称取 SBA-CHO 50 mg,加入一定 pH 值的 2 mL 磷酸盐缓冲液,加入适量 α -Rha,在一定温度下 200 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌反应一定时间。反应结束后 3 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,再用相应的磷酸盐缓冲液洗涤,离心收集沉淀,37 °C 下真空干燥过夜,即得 SBA-Rha,固定化过程见图 2。

3、4、5、6 h) 和酶质量浓度(2、3、4、5、6、7、8、9、10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对固定化酶活力和载酶量的影响,结果见图 3。当固定化 pH 值为 3.5、温度为 35 °C、时

间为 4 h、酶质量浓度为 $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, SBA-Rha 的酶活力最高; 在该条件下制备的固定化酶的酶活力

为 $198.6 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, 酶活回收率为 81.7%, 载酶量为 $256.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 载体, 固定率为 80.3%。



A - pH 值; B - 温度; C - 时间; D - 酶质量浓度。

A - pH; B - temperature; C - immobilization time; D - enzyme concentration.

图 3 不同固定化条件对 SBA-Rha 酶活力的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Effect of different immobilization conditions on the activity of SBA-Rha. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 SBA-Rha 的表征

2.3.1 XRD 分析 以 Cu 靶和 $K\alpha$ 靶线为测试源, 管电压 50 kV, 管电流 20 mA, 扫描区间 $2\theta = 0.6^\circ \sim 6^\circ$, 扫描速率 $1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$, 扫描步长 0.02° , 结果见图 4。经过修饰的载体在 2θ 为 $0.8^\circ \sim 2^\circ$ 处均有晶面指数, 分别为 (100)、(110) 和 (200) 面的 3 个衍射峰, 相对应的 2θ 值依次为 0.86° 、 1.48° 和 1.70° , 其 $(2\theta)^2$ 值的比约为 1:3:4, 说明经过修饰的 SBA-15 载体原有的高度有序的二维六方密堆积结构及六方对称性没有被破坏^[25]。但经过修饰之后的 3 个衍射峰强度有不同程度的减弱, 可能是由于其孔道被依次嫁接的大量氨基、醛基及酶所填充, 这说明了氨基、醛基及酶被成功地嫁接。

2.3.2 FI-TR 分析 按 1:150 精密称取待测样品和干燥的 KBr 充分研磨, 取 60~70 mg 置于压片机中, 于 10 MPa 下保压 2 min, 室温下扫描, 结果见图 5。SBA-NH₂ 在 2925 cm^{-1} 处出现了明显的特征吸收峰, 主要是由于 C-H 振动所产生的; 此外在 1491 cm^{-1} 处出现了 N-H 键的伸缩振动, 说明了 SBA-15 的硅烷化成功^[26]。SBA-CHO 在 2805 和 2933 cm^{-1} 处出现了微弱的特征吸收峰, 说明对载体进一步

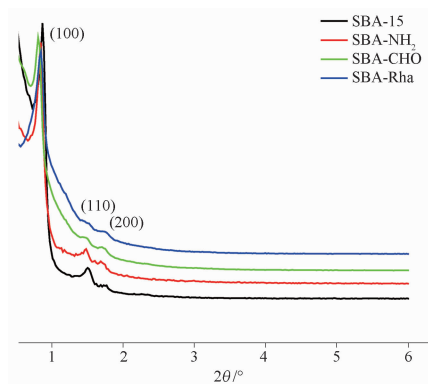


图 4 SBA-15、SBA-NH₂、SBA-CHO 和 SBA-Rha 的 X 射线衍射图

Fig. 4 X-Ray diffraction of SBA-15, SBA-15-NH₂, SBA-15-CHO and SBA-15-ENZ

完成了醛基的功能化。SBA-Rha 在 1614 cm^{-1} 处出现了明显的特征吸收峰, 这是由于 C=N 双键伸缩振动引起的, 表明 SBA-15 载体材料完成了相应的功能化及酶的固定化。

2.3.3 N₂ 吸附-脱附 取适量样品在 100°C 下脱气处理 12 h, 于液氮 (77 K) 下进行 N₂ 吸附-脱附实验。通过 BET 和 BJH 方法计算, 结果见表 1。修饰后的材料相比于未修饰的 SBA-15 平均孔径、总孔

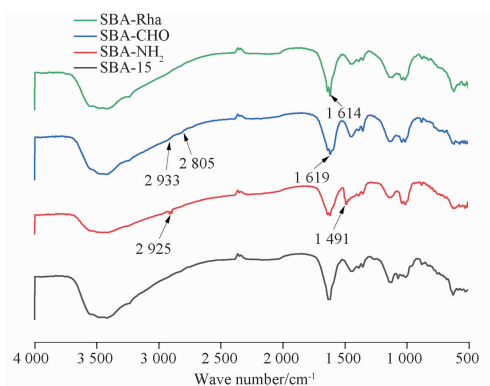


图5 SBA-15、SBA-NH₂、SBA-CHO 和 SBA-Rha 的傅立叶红外光谱仪 (FT-IR) 光谱图

Fig. 5 FI-IR spectra of SBA-15, SBA-NH₂, SBA-CHO and SBA-Rha

表1 SBA-15、SBA-NH₂、SBA-CHO 和 SBA-Rha 的平均孔径、总孔容及比表面积

Tab. 1 Mean pore diameter, total pore volume and BET surface area of SBA-15, SBA-NH₂, SBA-CHO and SBA-Rha

Sample	Mean pore diameter/nm	Total pore volume /cm ³ · g ⁻¹	BET surface area/m ² · g ⁻¹
SBA-15	10.73	1.26	338.38
SBA-NH ₂	9.33	0.81	293.24
SBA-CHO	7.42	0.52	253.64
SBA-Rha	6.20	0.40	226.14

容及比表面积均显著下降,这可能是由于嫁接的氨基、醛基及酶占用了介孔分子筛部分内部空间,导致经过修饰的材料特征值均有不同程度的下降。这与 FI-IR 表征的数据结果一致,说明 α-Rha 被成功地固定在 SBA-15 的介孔中。

2.3.4 SEM 和 TEM 观察 取适量待测样品表面喷金处理,置于 SEM 下观察拍照,电压 15 kV,分辨率 1 nm,SEM 结果见图 6。可以清楚地观察到载体 SBA-15、SBA-NH₂、SBA-CHO 和 SBA-Rha,其介孔分子筛表面总体形貌都呈现出原有的棒状结构,这与 XRD 表征数据结果一致,说明功能化和酶固定化后的 SBA-15 载体材料原有的结构仍保持不变。

取适量样品粉末,用无水乙醇超声分散后,滴于铜网上,室温干燥后,置于 TEM 下观察拍照,TEM 结果见图 7。SBA-15、SBA-NH₂、SBA-CHO 和 SBA-Rha 的 SEM 图均呈典型的具有一定长度的蠕虫状结构。TEM 图显示 4 个样品都存在均一有序的长通道介孔结构,SBA-Rha 的表面呈现一些不透明的阴影,可能与酶的固定有关。

2.4 SBA-Rha 水解朝藿定 C 的最适条件

以游离酶为参照,取适量 SBA-Rha 和游离

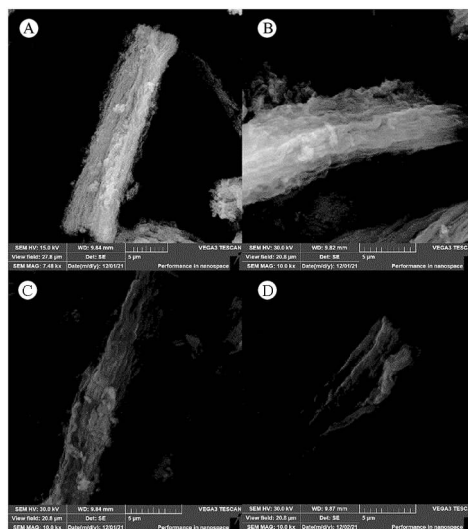


图6 SBA-15 (A)、SBA-NH₂ (B)、SBA-CHO (C) 和 SBA-Rha (D) 的高性能发射扫描电镜 (SEM) 表征图

Fig. 6 SEM images of SBA-15 (A), SBA-NH₂ (B), SBA-CHO (C) and SBA-Rha (D)

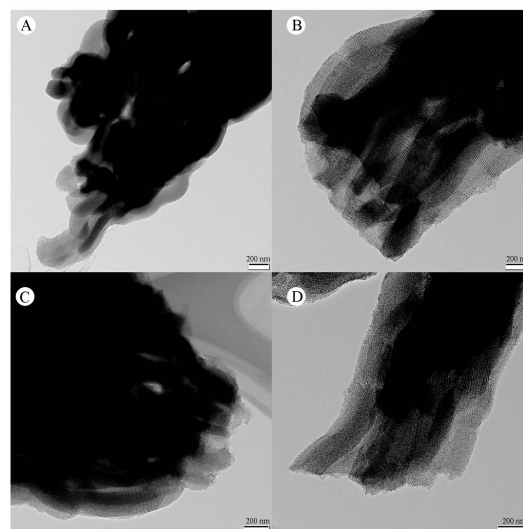


图7 SBA-15 (A)、SBA-NH₂ (B)、SBA-CHO (C) 和 SBA-Rha (D) 的透射电子显微镜 (TEM) 表征图

Fig. 7 TEM images of SBA-15 (A), SBA-NH₂ (B), SBA-CHO (C) and SBA-Rha (D)

α-Rha,按“2.1.1”项下方法测定不同 pH 值(3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)、温度(40、45、50、55、60 ℃)、底物质量浓度(0.2、0.3、0.5、0.8、1.0、1.5 mg · mL⁻¹)条件下 SBA-Rha 和游离 α-Rha 的酶活力,计算相对酶活;以朝藿定 C 转化率为指标,考察 SBA-Rha 和游离 α-Rha 的最适酶解时间(2、4、6、8、12、16 h),结果见表 2~5。SBA-Rha 和游离 α-Rha 的最适 pH 值均为 4.5;最适温度均为 50 ℃;最适底物质量浓度游离 α-Rha 为 0.8 mg · mL⁻¹,SBA-Rha 为 0.5 mg · mL⁻¹;游离 α-Rha 和 SBA-Rha 的最适酶

解时间分别为 8 和 12 h,朝藿定 C 的转化率均在 95% 以上,且酶解产物均为淫羊藿苷。在最适水解温度下延长酶解时间至 24 h 时游离 α -Rha 反应体系中出现副产物淫羊藿次苷 I,这说明游离 α -Rha 具有较高的酶活性,可将 C-3 位的鼠李糖苷键进一步水解;而 SBA-Rha 反应体系中未有副产物产生。

表 2 游离 α -Rha 和 SBA-Rha 的最适酶解 pH 值考察。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Optimal pH of free and immobilized α -Rha. $n=3, \bar{x} \pm s$

pH	Relative enzyme activity/%	
	Free α -Rha	SBA-Rha
3.5	53.2 \pm 2.6	48.5 \pm 4.2
4.0	84.4 \pm 3.4	79.3 \pm 3.5
4.5	100 \pm 2.4	100 \pm 2.6
5.0	89.7 \pm 3.8	85.1 \pm 2.8
5.5	78.6 \pm 2.7	75.9 \pm 3.4
6.0	61.2 \pm 3.1	67.7 \pm 3.3

表 3 游离 α -Rha 和 SBA-Rha 的最适酶解温度考察。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 3 Optimal temperature of free and immobilized α -Rha.

$n=3, \bar{x} \pm s$

T /°C	Relative enzyme activity/%	
	Free α -Rha	SBA-Rha
40	43.2 \pm 2.5	50.3 \pm 3.4
45	78.6 \pm 3.5	73.7 \pm 3.6
50	100 \pm 2.8	100 \pm 3.2
55	86.9 \pm 3.1	88.4 \pm 3.7
60	80.1 \pm 3.3	79.8 \pm 3.7

表 4 游离 α -Rha 和 SBA-Rha 的最适底物质量浓度考察。

$n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 4 Optimal substrate concentration of free and immobilized α -Rha. $n=3, \bar{x} \pm s$

ρ (Substrate) /mg \cdot mL ⁻¹	Relative enzyme activity/%	
	Free α -Rha	SBA-Rha
0.2	55.4 \pm 3.8	66.7 \pm 3.4
0.3	72.1 \pm 2.9	85.4 \pm 2.5
0.5	84.7 \pm 2.5	100 \pm 2.3
0.8	100 \pm 2.1	78.6 \pm 3.6
1.0	79.2 \pm 2.7	59.5 \pm 3.8
1.5	70.8 \pm 3.2	42.3 \pm 4.4

表 5 游离 α -Rha 和 SBA-Rha 的最适酶解时间考察。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 5 Optimal hydrolysis time of free and immobilized α -Rha. $n=3, \bar{x} \pm s$

t (Hydrolysis) /h	Conversion ratio of epimedini C/%	
	Free α -Rha	SBA-Rha
2	67.5 \pm 2.4	24.3 \pm 2.6
4	83.7 \pm 2.9	32.6 \pm 2.1
6	96.9 \pm 2.7	58.7 \pm 2.7
8	99.2 \pm 1.9	81.6 \pm 2.2
12	100 \pm 2.2	99.7 \pm 1.7
16	100 \pm 2.3	100 \pm 2.4

2.5 SBA-Rha 的酶学性能研究

2.5.1 酶水动力学参数 按“2.1.1”项下酶活测定方法,配制不同质量浓度梯度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg \cdot mL⁻¹)的朝藿定 C 底物,分别加入适量游离 α -Rha 或 SBA-Rha,在最佳水解条件下反应 8 h,HPLC 测定,计算朝藿定 C 的水解量,用 Lineweaver-Burk 双倒数法求出最大反应速率(K_m)和米氏常数(V_{max})。游离酶和 SBA-Rha 的 $1/V$ 和 $1/S$ 均呈现良好的线性关系(图 8)。根据米氏方程计算可得 $V_{max\text{游离酶}} = 0.738 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $V_{max\text{固定化酶}} = 0.505 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$; $K_{m\text{游离酶}} = 0.457 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $K_{m\text{固定化酶}} = 0.787 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 $K_{m\text{游离酶}} < K_{m\text{固定化酶}}$,表明 α -Rha 经 SBA-15 固定化后对底物朝藿定 C 亲和力下降。可能是由于固定导致酶的活性中心柔性结构降低,刚性增强,导致固定化酶的活性降低,从而使两者之间的 K_m 值产生差异。

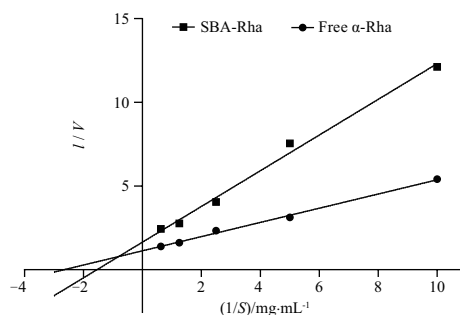


图 8 反应初速率与底物浓度的 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线

Fig. 8 Lineweaver-Burk double reciprocal fitting curve of initial reaction rate and substrate concentration

2.5.2 重复利用性 取适量 SBA-Rha 和朝藿定 C 溶液,按“2.4”项下最适酶解条件反应 16 h,离心,洗涤,收集沉淀物加入朝藿定 C 继续反应,重复上述操作 4 次;按“2.1.1”项下方法测定酶活力。结果 4 次实验的相对酶活力分别为(100.0 \pm 2.4)%、(77.7 \pm 3.2)%、(70.9 \pm 2.5)%和(65.2 \pm 2.8)% ($n=3$)。SBA-Rha 在重复利用 4 次后的残余相对酶活力仍保持在 70% 以上,表明经 SBA-15 的固定化可显著提高 α -Rha 的利用率。

2.5.3 稳定性及耐受性 SBA-Rha 的温度、pH 及贮藏稳定性研究参考文献[27]进行。SBA-Rha 分别在不同的温度下水浴保存 1 h;在不同 pH 值的 PBS 溶液中 30 °C 下水浴保存 1 h;固体粉末形式 4 °C 下储存相对应的时间,而后分别测定并计算相对酶活力。SBA-Rha 对水解产物的耐受性研究参考文献[28]进行,在酶活力测定反应体系中加入一定量

的淫羊藿苷使之达到相对应的浓度,再加入 SBA-Rha 测定并计算相对酶活力,结果见图 9。SBA-Rha 在 50 ℃ 以下、pH 4.0~5.0、4 ℃ 下储存 30 d 的条件下

稳定。水解产物耐受性方面,只有产物在较高浓度时才会影响酶活力。表明 SBA-Rha 有良好的温度、pH 及贮藏稳定性,对水解产物也具有良好的耐受性。

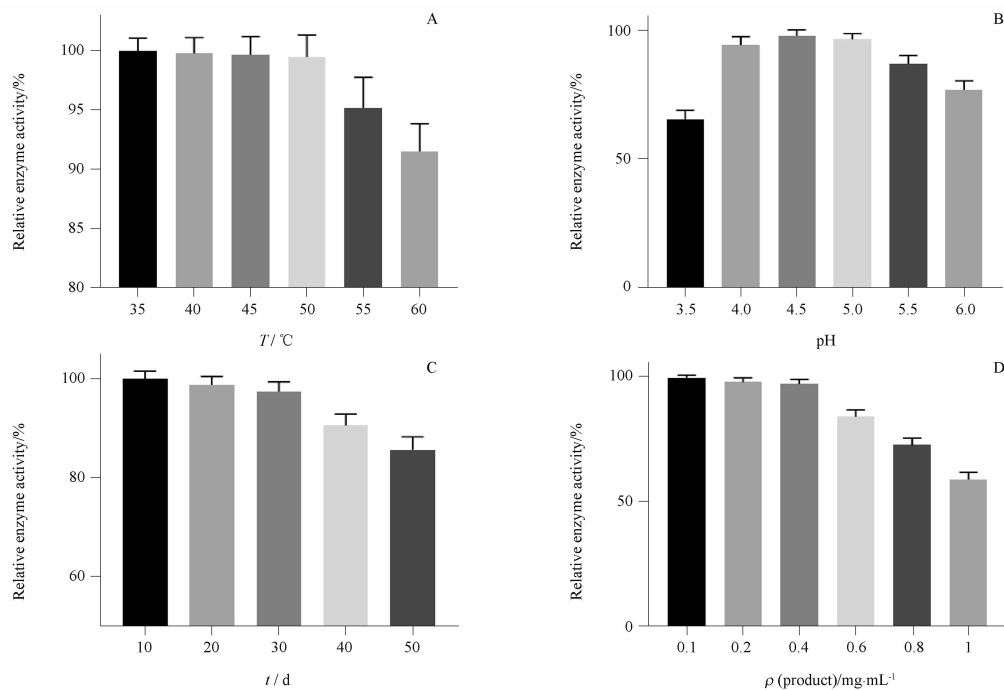


图 9 SBA-Rha 的温度稳定性(A)、pH 稳定性(B)、贮藏稳定性(C)和水解产物耐受性(D)。n=3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 9 The temperature tolerance(A), pH tolerance(B), storage stability(C) and hydrolysate tolerance(D) of SBA-Rha. n=3, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

介孔二氧化硅 SBA-15 具有较大的比表面积和较好的机械强度及稳定性,且价廉易得,是制备固定化酶的理想载体。本实验先以 APTES 对其进行氨基化修饰,再以 GA 为偶联剂与 SBA-15 表面修饰的氨基发生席夫碱反应引入醛基;最终在温和的反应条件下 α -Rha 分子上的氨基与 SBA-15 载体材料上的醛基再次发生席夫碱反应,从而使 α -Rha 以共价键的方式牢固地结合在 SBA-15 载体材料上。经表征数据 FI-IR 和 N_2 吸附与脱附表明 SBA-15 载体已完成了基团的功能化修饰及酶的固定化;XRD 和 SEM 数据表明经修饰和酶固定化后载体 SBA-15 原有的六方介孔和棒状结构保持不变。

本研究最优固定化条件 pH 值为 3.5、温度为 35 ℃、时间为 4 h、酶质量浓度为 8 mg · mL⁻¹ 时,SBA-Rha 的酶活力最高,这与酶的自身性质有关。本研究制备的 SBA-Rha 酶活力为 198.6 μ mol · h⁻¹ · g⁻¹、酶活回收率为 81.7%、载酶量为 256.9 mg · g⁻¹、固定率为 80.3%,虽然酶活力较游离酶有所下降,但依然保持了较高水平。固定化酶的活性高、载酶量大,说明固

定化过程基本不影响酶的活性,表明 SBA-15 是固定 α -Rha 的理想载体。固定化酶的最适条件为 pH 4.5,转化温度 50 ℃,底物质量浓度 0.5 mg · mL⁻¹,转化时间 12 h。与游离酶相比,固定化酶的最适 pH 值和最适温度不变,但最适底物浓度降低、水解时间变长,这可能是固定化酶对底物的亲和力降低(K_m 较大),继而导致了酶水解速率的降低(V_{max} 变小),水解时间延长。但游离酶在长时间或高底物浓度情况下水解朝藿定 C 时会产生副产物淫羊藿次苷 I,这是由于淫羊藿苷 3 位的鼠李糖基进一步被水解,该现象与文献 [28-29] 报道一致;而固定化酶的水解产物单一,更有利于水解朝藿定 C 制备活性较强的淫羊藿苷。固定化酶在每次循环利用后都会有活性衰减,酶活力下降可能的原因是载体材料孔道的封闭、部分酶脱落和部分酶活性的丧失^[30]。SBA-Rha 循环利用 4 次后残余酶活在 65% 以上,此时固定化酶已经无法在 12 h 内完成朝藿定 C 的水解,但只需要通过延长水解时间依然可以完成水解且无副产物生成。这表明固定化酶具有一定的机械强度,重复利用多次后依然能保持大部分原有的性能,大大提高了酶的利用率,总体酶解

效率更高。稳定性及耐受性研究表明,SBA-Rha 具有良好的温度、pH 值及贮藏稳定性,对水解产物也具有良好的耐受性。

本研究的固定化酶还可以应用于淫羊藿提取物中朝藿定 C 的水解,因此可直接用于高含量淫羊藿提取物的生产,SBA-Rha 将淫羊藿提取液中的朝藿定 C 直接水解为淫羊藿苷,提高淫羊藿苷含量的同时极大地减少了后续分离纯化工作,节约成本、保护环境。上述建立的固定化酶水解朝藿定 C 制备淫羊藿苷的方法,实现了酶的重复利用,提高了 α -L-鼠李糖苷酶的利用率,在一定程度上降低了生产成本,减少了副产物的生成,利于工业化生产,同时为淫羊藿资源的高值化利用提供了新的技术方法和实验依据。

REFERENCES

- [1] LONG L, WANG X, LEI Y, *et al.* Icarin: a potential alternative against osteoporosis [J]. *Nat Prod Commun*, 2022, 17 (11): 1-15.
- [2] LIU Y, YANG H, XIONG J, *et al.* Icarin as an emerging candidate drug for anticancer treatment: current status and perspective [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 113991.
- [3] JIN J, WANG H, HUA X, *et al.* An outline for the pharmacological effect of icariin in the nervous system[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 842: 20-32.
- [4] LUO Z, DONG J, WU J. Impact of icariin and its derivatives on inflammatory diseases and relevant signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108861.
- [5] SHEN R, WANG J H. The effect of icariin on immunity and its potential application[J]. *Am J Clin Exp Immunol*, 2018, 7(3): 50-56.
- [6] ZHONG R, CHEN Y, LING J, *et al.* The toxicity and metabolism properties of herba epimedii flavonoids on laval and adult zebrafish [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2019, 3745051. DOI:10.1155/2019/3745051.
- [7] YADAV V, YADAV P K, YADAV S, *et al.* α -L-Rhamnosidase: a review[J]. *Process Biochem*, 2010, 45(8): 1226-1235.
- [8] WU T, PEI J, GE L, *et al.* Characterization of a α -L-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* with high catalytic efficiency of epimedin C[J]. *Bioorg Chem*, 2018, 81: 461-467.
- [9] LYU Y, ZENG W, DU G, *et al.* Efficient bioconversion of epimedin C to icariin by a glycosidase from *Aspergillus nidulans*[J]. *Bioresource Technol*, 2019, 289: 121612. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121612.
- [10] ZHANG S, LU C, CAO S, *et al.* Efficient production of icariin and baohuoside I from *Epimedium Folium* flavonoids by fungal α -L-rhamnosidase hydrolysing regioselectively the terminal rhamnose of epimedin C[J]. *Biotechnol Biofuels Bioprod*, 2023, 16(1): 107.
- [11] XIE J, ZHAO J, ZHANG N, *et al.* Efficient production of isoquercetin, icariin and icariside II by a novel thermostable α -L-rhamnosidase PodoRha from *Paenibacillus odorifer* with high α -1, 6- α -1, 2-glycoside specificity [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2022, 158: 110039. DOI:10.1016/j.enzmictec.2022.110039.
- [12] LOU H, LIU X, LIU S, *et al.* Purification and characterization of a novel α -L-rhamnosidase from *Papiliotrema laurentii* ZJU-L07 and its application in production of icariin from epimedin C[J]. *J Fungi*, 2022, 8(6): 644.
- [13] LU C, ZOU K, GUO B, *et al.* Linker-peptide-mediated one-step purification and immobilization of α -L-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* for direct biotransformation from epimedin C to icariin [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2023, 162: 110131. DOI:10.1016/j.enzmictec.2022.110131.
- [14] YIN M N. The research on measurement and transformation of active components in *Epimedium wushanense* T. S. Ying [D]. Chongqing: Chongqing University, 2019.
- [15] CHEN W, ZHANG Y, ZHANG Y H, *et al.* Preparation process for icariin by hydrolysis of epimedin with α -L-rhamnosidase[J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2023, 45(8): 2472-2476.
- [16] NISHA S, KARTHICK A, GOBI N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme[J]. *Chem Sci Rev Lett*, 2012, 1(3): 148-155.
- [17] HOANG V T, HUANG Q, ÉIC M, *et al.* Structure and diffusion characterization of SBA-15 Materials [J]. *Langmuir*, 2005, 21 (5): 2051-2057.
- [18] VERMA P, KUWAHARA Y, MORI K, *et al.* Functionalized mesoporous SBA-15 silica: recent trends and catalytic applications[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(21): 11333-11363.
- [19] LIU C Y, LI R Y, MA C Y, *et al.* Bioconversion of icariin by immobilized β -glucosidase in chitosan cross-linked mesoporous silica[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52(3): 685-691.
- [20] YUSHKOVA E D, NAZAROVA E A, MATYUHINA A V, *et al.* Application of immobilized enzymes in food industry[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(42): 11553-11567.
- [21] LIOU T H, CHEN G W, YANG S. Preparation of amino-functionalized mesoporous SBA-15 nanoparticles and the improved adsorption of tannic acid in wastewater[J]. *Nanomaterials*, 2022, 12(5): 791.
- [22] ZHANG Y H, CHEN W, FENG Z L, *et al.* Optimized rapid preparation of epimedin C from *Epimedium wushanense* T. S. Ying [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2021, 52(9): 1191-1198.
- [23] FEI X, CHEN S, LIU D, *et al.* Comparison of amino and epoxy functionalized SBA-15 used for carbonic anhydrase immobilization [J]. *J Biosci Bioeng*, 2016, 122(3): 314-321.
- [24] SALIS A, PISANO M, MONDUZZI M, *et al.* Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2009, 58(1): 175-180.
- [25] ZHANG H, ZOU Y, SHEN Y, *et al.* Dominated effect analysis of the channel size of silica support materials on the catalytic performance of immobilized lipase catalysts in the transformation of unrefined waste cooking oil to biodiesel [J]. *Bio Energy Res*, 2014, 7(4): 1541-1549.
- [26] KANNAN K, JASRA R V. Immobilization of alkaline serine endopeptidase from *Bacillus licheniformis* on SBA-15 and MCF by surface covalent binding[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2009, 56 (1): 34-40.
- [27] LU Y, SONG Y, PENG L, *et al.* Construction of immobilized enzymes with yeast and metal-organic frameworks for enhanced biocatalytic activities [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15 (29): 35552-35564.
- [28] XU H, LIANG H. Chitosan-regulated biomimetic hybrid nanoflower for efficiently immobilizing enzymes to enhance stability and by-product tolerance[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 220: 124-134.
- [29] HUANG J J, HU H X, LU Y J, *et al.* Computer-aided design of α -L-Rhamnosidase to increase the synthesis efficiency of icariside I [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 926829. DOI:10.3389/fbioe.2022.926829.
- [30] RODRIGUES R C, ORTIZ C, BERENQUER-MURCIA Á, *et al.* Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization [J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(15): 6290-6307.

(收稿日期:2023-06-20)