

## 磁性硅基壳聚糖微球固定化柚苷酶水解柚皮苷

徐杰<sup>1</sup>, 孙西同<sup>3</sup>, 李金<sup>1\*</sup>, 罗健<sup>1</sup>, 李坤峰<sup>1</sup>,  
石峰<sup>1</sup>, 田晶<sup>1</sup>, 费旭<sup>2</sup>, 徐龙权<sup>2</sup>

(1. 大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 大连工业大学 分析中心, 辽宁 大连 116034;  
3. 中国科学院 大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 在磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  外包覆一层  $\text{SiO}_2$ , 再在其外包裹壳聚糖制备出磁性硅基壳聚糖微球 (MSC), 对 MSC 进行环氧基修饰后用于柚苷酶的固定化研究, 并对磁性硅基壳聚糖微球固定化柚苷酶水解柚皮苷的 pH、温度、操作和储藏稳定性进行了考察。通过单因素实验, 确定了环氧基修饰的磁性硅基壳聚糖微球 (MSCE) 固定化柚苷酶的最佳工艺条件为: pH 3.0, 温度 30 °C, 时间 4 h、给酶量 57.48 U/mL。在该条件下, MSCE 固定化柚苷酶的载酶率、酶活回收率和酶比活力分别为 31.29%、88.92% 和 409.33 U/g。与游离柚苷酶相比, MSCE 固定化柚苷酶用于水解柚皮苷具有良好的 pH 稳定性和温度稳定性, 重复使用 7 次后仍具有 53.36% 的相对酶活力, 4 °C 条件贮存 30 d 后仍具有 80.97% 的相对酶活力。

**关键词:** 磁性材料; 壳聚糖; 生物高分子; 固定化; 柚苷酶; 生物工程

中图分类号: Q556 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2018) 11-1885-08

## Study on Hydrolysis of Naringin by Immobilized Naringinase on Magnetic Silica Chitosan Microspheres

XU Jie<sup>1</sup>, SUN Xi-tong<sup>3</sup>, LI Qian<sup>1\*</sup>, LUO Jian<sup>1</sup>, LI Kun-feng<sup>1</sup>, SHI Feng<sup>1</sup>,  
TIAN Jing<sup>1</sup>, FEI Xu<sup>2</sup>, XU Long-quan<sup>2</sup>

(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; 2. Instrumental Analysis Center, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; 3. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China)

**Abstract:** Magnetic silica chitosan microspheres (MSC) were prepared by orderly grafting  $\text{SiO}_2$  and chitosan layer on the surface of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles, and after modified with epoxy groups, the obtained microspheres (MSCE) were used for immobilization of naringinase. The pH, temperature, storage and operational stability of naringin hydrolysis by the immobilized naringinase were investigated. The optimal immobilization conditions were determined as follows: immobilization pH 3.0, immobilization temperature 30 °C, immobilization time 4 h, and crude naringinase broth activity 57.48 U/mL. Under these immobilization conditions, the binding efficiency, activity recovery rate and specific activity of the immobilized naringinase were 31.29%, 88.92% and 409.33 U/g, respectively. Comparing with free naringinase, the immobilized naringinase used for naringin hydrolysis showed better pH stability and thermal stability, and it retained 53.36% residual activity after seven consecutive operations and 80.97% residual activity after one month of storage.

**Key words:** magnetic materials; chitosan; biopolymer; immobilization; naringinase; biological engineering

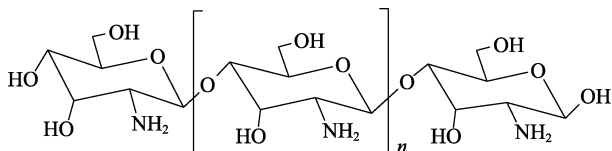
**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31601411); General Research Project of Liaoning Provincial Department of Education (L2015045)

收稿日期: 2017-11-07; 定用日期: 2018-02-12; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170909

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601411); 辽宁省教育厅科学研究一般项目 (L2015045)

作者简介: 徐杰 (1991—), 男, 硕士生。联系人: 李金 (1982—), 女, 讲师, 电话: 0411-86323646, E-mail: liqian19820903@163.com。

壳聚糖是一种天然生物高分子多糖<sup>[1]</sup>, 相比一般高分子, 生物高分子具有生物可降解、资源可再生、生物相容性好、低免疫原性等特点<sup>[2-3]</sup>, 因此可广泛应用于食品、医药、环保等领域。壳聚糖是甲壳素的部分脱乙酰基产物, 分子中含有丰富的羟基和氨基(分子结构见下式), 因此在一定条件下可以发生一系列共价结合反应<sup>[4]</sup>。



柚皮苷(Naringin)是一种双氢黄酮类化合物, 具有一定的苦味, 广泛存在于柑橘水果中, 为避免果汁制品的不良口感, 工业上主要采用柚苷酶进行脱苦处理<sup>[5]</sup>。同时, 柚皮苷及其分解产物具有抗炎、抗菌、抗癌和抗氧化等多种生物活性, 因此在医药、化妆品和食品工业具有很大的发展前景<sup>[5]</sup>。柚苷酶(Naringinase)是由 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶和 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶组成的复合酶, 其可将柚皮苷分两步水解: 首先,  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶将柚皮苷水解为鼠李糖和普鲁宁, 普鲁宁在 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的作用下进一步被水解为无苦味的柚皮素和葡萄糖<sup>[6]</sup>。与传统方法相比, 采用游离柚苷酶对柑橘果汁进行脱苦处理具有条件温和、操作简单高效、无污染等特点<sup>[5]</sup>, 但也存在稳定性差、无法回收再利用、纯酶制剂成本高等问题, 限制了其工业化生产, 因此研究者们对固定化酶技术展开了广泛的研究。雷生姣<sup>[7]</sup>等用壳聚糖固定化柚苷酶, 取得了一定效果; Awad<sup>[8]</sup>等用新型热稳定生物高分子材料固定化柚苷酶, 稳定性较好且重复使用率较高; Xiao<sup>[9]</sup>等用磁性纳米颗粒固定化柚苷酶, 达到与底物快速分离的目的, 但存在温度稳定性和耐酸性较差等问题。

目前, 常用的固定化材料如海藻酸钠和壳聚糖等, 需要依靠自然沉降实现固液分离, 存在耐酸性差、分离速度慢和分离不彻底等问题<sup>[7-9]</sup>。为进一步提高固定化材料的耐酸性并实现固液快速分离, 本文以 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 为核包裹一层 $\text{SiO}_2$ <sup>[10-12]</sup>, 再包裹壳聚糖得到具有活性基团的磁性硅基壳聚糖微球, 并对磁性硅基壳聚糖微球固定化柚苷酶的催化、分离效果、重复利用性和储存稳定性进行了考察。本文工作为进一步探索酶固定化技术提供了基础数据, 同时对推动柚苷酶的工业化进程具有重要意义。

## 1 实验部分

### 1.1 主要材料与仪器

黑曲霉 FFCC uv-11, 由大连工业大学菌种保藏中心提供。

柚皮苷(质量分数 $\geq 98\%$ ), 宝鸡市方晟生物开发有限公司; 壳聚糖(脱乙酰度 $80\% \sim 95\%$ , BR)、硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , AR)、正硅酸四乙酯(TEOS, AR)、乙酸(AR)、吐温 80(CP)、氢氧化钠(NaOH, AR), 国药集团化学试剂有限公司; 六水合三氯化铁( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、氨水(质量分数 $25\%$ )、柠檬酸三钠、无水乙醇、液体石蜡、石油醚、环氧氯丙烷、硫代硫酸钠、柠檬酸、磷酸氢二钠、一缩二乙二醇, AR, 天津市大茂化学试剂厂; 戊二醛(质量分数 $50\%$ ), AR, 天津市光复精细化工研究所; 硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ ), AR, 天津市福晨化学试剂厂。

PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; SpectraMax Plus 384 型酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司; JSM 7800F 型场发射扫描电子显微镜, 日本电子株式会社; Spectrum 10 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Perkin Elmer 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 柚苷酶酶液的制备<sup>[13]</sup>

将 $4^\circ\text{C}$ 贮藏的黑曲霉 FFCC uv-11 转接到斜面培养基上, 于 $30^\circ\text{C}$ 恒温培养 96 h 得到成熟的孢子, 再用质量分数为 $0.9\%$ 的无菌生理盐水将孢子洗下, 测孢子悬液在 $600\text{ nm}$ 下的吸光度值( $\text{OD}_{600}$ ), 并用无菌生理盐水将其 $\text{OD}_{600}$ 调至 $0.200$ , 接着将孢子悬液以含量 $10\%$ (发酵培养基的体积为基准)的接种量接种至 $100\text{ mL}$ 的发酵培养基( $250\text{ mL}$ 锥形瓶)内, 在 $30^\circ\text{C}$ ,  $180\text{ r/min}$ 条件下培养 5 d, 得到的发酵液用冷冻离心机在 $4^\circ\text{C}$ 、 $6000\text{ r/min}$ 下离心 $10\text{ min}$ , 上清液再经抽滤得到所需柚苷酶酶液, 于 $4^\circ\text{C}$ 冷藏备用。

#### 1.2.2 磁性硅基壳聚糖微球(MSC)的制备

利用化学共沉淀法和溶胶-凝胶法制得磁性硅基纳米颗粒(MS)<sup>[14]</sup>, MSC微球的制备流程如图1所示。

将 $2.25\text{ g}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $1.61\text{ g}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 加入到盛有 $100\text{ mL}$ 去离子水的三口瓶中, 在通氮气的条件下将体系温度加热至 $85^\circ\text{C}$ 。在 $1000\text{ r/min}$ 下搅拌并快速加入 $10\text{ mL}$ 浓氨水, 待溶液变黑后加入 $153\text{ mg}$ 的柠檬酸三钠, 继续反应 $30\text{ min}$ 后, 产物用磁铁分离, 固相分别用去离子水和乙醇洗涤数次, 获得柠檬酸修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米颗粒, 干燥备用。然后, 将 $0.1\text{ g}$ 柠檬酸修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米颗粒均匀分散到含有 $40\text{ mL}$ 无水乙醇、 $10\text{ mL}$ 去离子水和 $1.2\text{ mL}$ 浓氨水的混合液中, 在 $300\text{ r/min}$ 下逐滴加入分散在 $30\text{ mL}$ 无水乙醇中的TEOS( $0.4\text{ mL}$ ), 室温反应 $12\text{ h}$ 。反应结束后, 产物分别用无水乙醇和去离子水洗涤数次, 获得磁性硅基纳米颗粒(MS), 干燥备用。

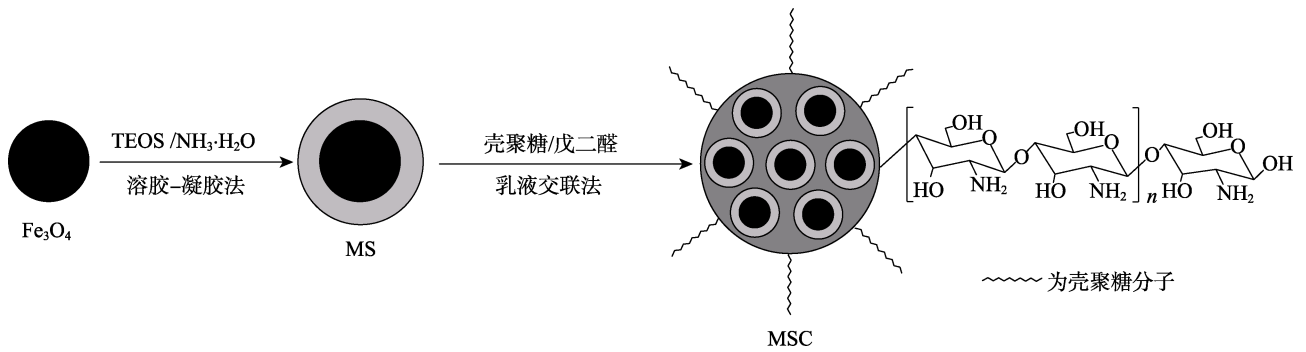


图 1 MSC 微球的制备示意图

Fig. 1 Preparation of MSC microspheres

利用乳液交联法制备 MSC 微球<sup>[15]</sup>。将 0.125 g 磁性硅基纳米颗粒 (MS) 均匀分散至 10 mL 由体积分数 5.0% 的乙酸-水溶液配成的质量分数 2.5% 的壳聚糖溶液中, 逐滴加入含有 60 mL 液体石蜡、1.8 mL 吐温 80 组成的乳化液中, 在 40 °C 水浴中 800 r/min 搅拌 30 min 后, 加入 2.0 mL 戊二醛, 1 h 后用 1 mol/L 的 NaOH 将体系 pH 调至 9.0, 继续反应 1 h。产物分别用石油醚、乙醇和去离子水洗涤数次, 获得磁性硅基壳聚糖微球 (MSC), 真空干燥备用。

1.2.3 环氧基修饰的磁性硅基壳聚糖微球 (MSCE) 固定化柚苷酶的制备

利用改进的方法进行磁性硅基壳聚糖微球 (MSC) 的环氧基修饰<sup>[16]</sup>, 修饰机制见图 2。

取 0.5 g MSC 微球加入到 50 mL 锥形瓶中, 再分

别加入 2.0 mL NaOH (1.5 mol/L)、2.0 mL 环氧氯丙烷体积分数为 50% 的水溶液和 2.0 mL NaBH<sub>4</sub> (0.6 g/L) 溶液, 在 40 °C 水浴摇床振荡反应 4 h。反应结束后, 用去离子水反复洗涤直至微球表面没有游离的 OH<sup>-</sup> 和环氧基, 得到环氧基修饰的磁性硅基壳聚糖微球 (MSCE)。检测方法如下: 取 3.0 mL 洗涤上清液, 加 1~2 滴酚酞, 振荡不变红则无 OH<sup>-</sup>; 再加 3.0 mL 硫代硫酸钠 (1.3 mol/L), 振荡不变红则无环氧基<sup>[17]</sup>。

取 5.0 g MSCE, 加入 50 mL 柚苷酶酶液, pH 调节为 3.0。在 30 °C、150 r/min 下恒温水浴振荡反应 4 h 进行固定化, 固定化机制见图 2。反应结束后, 产物用 pH 4.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (以下简称“缓冲液”) 洗涤数次, 布氏漏斗抽干, 得到 MSCE 固定化柚苷酶。

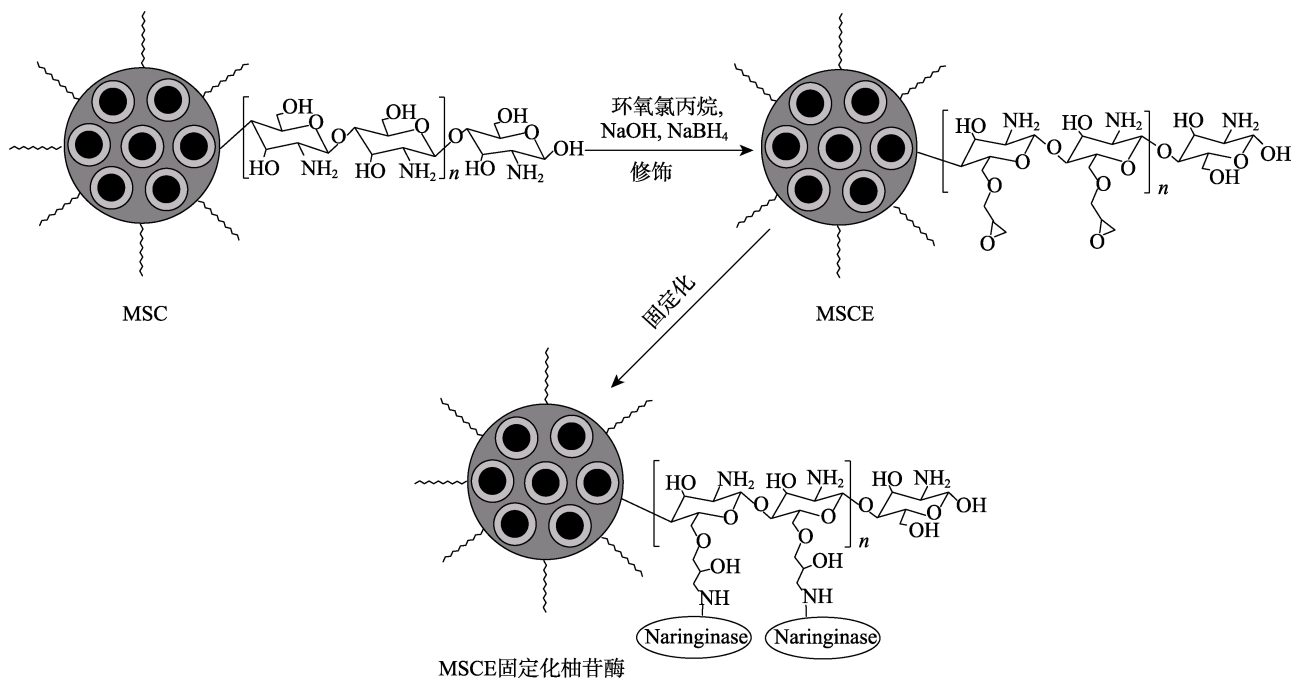


图 2 MSCE 固定化柚苷酶的制备示意图

Fig. 2 Preparation abridged general view of MSCE immobilized naringinase

### 1.2.4 MSCE 固定化柚苷酶水解柚皮苷的实验条件优化

反应 pH 优化实验方法：取 40 mg 的 MSCE 固定化柚苷酶和 0.2 mL 游离柚苷酶，加入 0.8 mL 由缓冲液配制的 pH 分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 的柚皮苷溶液，50 °C 下进行酶解反应，测其相对酶活力。

pH 稳定性实验方法：取 40 mg 的 MSCE 固定化柚苷酶，分别置于 pH 分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的缓冲液中，游离柚苷酶用缓冲液调至相应的 pH，同时在 4 °C 下保存 2 h，测其相对酶活力。

反应温度优化实验方法：取 40 mg 的 MSCE 固定化柚苷酶和 0.2 mL 游离柚苷酶，加入 0.8 mL 由 pH 4.5 缓冲液配制的柚皮苷溶液，分别在 40、45、50、55、60、65、70 °C 下进行酶解反应，测其相对酶活力。

温度稳定性实验方法：取 40 mg MSCE 固定化柚苷酶和 0.2 mL 游离柚苷酶，分别置于 40 和 60 °C 恒温水浴中分别保存 0、2、4、6、8 h，测其相对酶活力。

操作稳定性实验方法：在最适反应温度及 pH 下，重复使用 MSCE 固定化柚苷酶(制备方法见 1.2.3 节)进行水解柚皮苷实验，检测其活性的变化，以首次测定的酶活力为 100%，计算各相对酶活力。

贮藏稳定性实验方法：将 MSCE 固定化柚苷酶(制备方法见 1.2.3)和游离柚苷酶分别在 4 °C 下贮存 30 d，每 5 d 测一次酶活力，以贮藏前(第 0 d)的酶活力为 100%，计算各相对酶活力。

### 1.2.5 柚苷酶酶活力的测定

采用改进的 Davis 法<sup>[18]</sup>：将 0.8 mL 0.8 g/L 由 pH 4.5 缓冲液配制的柚皮苷溶液加入到含有 40 mg 固定化柚苷酶(或 0.2 mL 游离柚苷酶)的反应体系中，置于 50 °C 恒温水浴中反应 30 min，取 0.1 mL 反应酶解液，加入含有 5 mL 一缩二乙二醇(体积分数为 90%)和 0.1 mL NaOH 溶液(4 mol/L)的试管中，混合均匀后静置 10 min，于 420 nm 处测定溶液的吸光度值。

柚苷酶酶活力(U)的定义：在 pH 4.5、50 °C 的条件下，每分钟降解 1 μg 柚皮苷所需的酶量为一个酶活力单位。酶比活力(U/g 或 U/mL)的定义：在 pH 4.5、50 °C 条件下，1 g 固定化柚苷酶(或 1 mL 游离柚苷酶)所表现出的酶活力。相对酶活力按下式计算。

相对酶活力/% = 酶活力/最高酶活力×100 (1)

### 1.2.6 固定化柚苷酶载酶率及酶活回收率的计算<sup>[19]</sup>

固定化柚苷酶的载酶率(B)按公式(2)进行

计算。

$$B/\% = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100 \quad (2)$$

式中：B 代表载酶率，%； $A_0$  是指固定前酶液中的总酶活力，U； $A_1$  是指固定后上清液中剩余的总酶活力，U。

固定化柚苷酶的酶活回收率(R)按公式(3)进行计算。

$$R/\% = A_2/(A_0 - A_1) \times 100 \quad (3)$$

式中：R 代表酶活回收率，%； $A_0$  和  $A_1$  如公式(2)所指； $A_2$  是指固定化柚苷酶表现的总酶活力，即酶解反应测得的总酶活力，U。

## 1.3 表征

分别用扫描电子显微镜(SEM)和红外光谱(FTIR)对磁性硅基壳聚糖微球(MSC)进行表征。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MSC 的表征与性能分析

#### 2.1.1 SEM 表征

MSC 的 SEM 图见图 3。由图 3a 可知，本文制备所得的 MSC 微球形状较规则，粒径约为 200 μm；同时，由图 3b 可以看出，MSC 微球表面具有许多微孔结构。微球呈球形、分布均一，尺寸小、比表面积大，且具有微孔结构，使该微球更容易对酶进行固定化<sup>[20]</sup>。

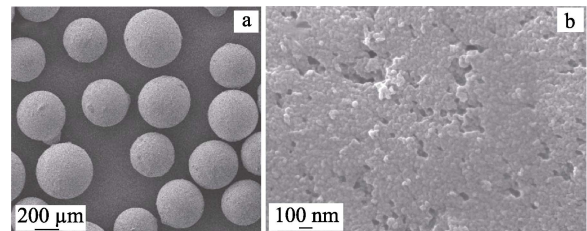


图 3 MSC 微球的扫描电镜图  
Fig. 3 SEM images of MSC microspheres

#### 2.1.2 FTIR 表征

$Fe_3O_4$ 、MS 和 MSC 的 FTIR 结果如图 4 所示。图 4a 是  $Fe_3O_4$  的红外光谱图，568  $cm^{-1}$  处对应 Fe—O 的伸缩振动吸收峰，2920  $cm^{-1}$  处的弱峰对应柠檬酸 C—H 的伸缩振动吸收峰，3367  $cm^{-1}$  处对应 O—H 的伸缩振动吸收峰<sup>[10]</sup>。图 4b 是磁性硅基纳米颗粒(MS)的红外光谱图，801 和 1092  $cm^{-1}$  处分别对应 Si—O—Fe 和 Si—O 的伸缩振动吸收峰，是相对于  $Fe_3O_4$  红外光谱图新出现的峰，说明  $SiO_2$  通过化学键成功包覆在  $Fe_3O_4$  表面上<sup>[10]</sup>。在 MSC 的红外光谱图(图 4c)中，2925 和 2856  $cm^{-1}$  处两个新增的峰对应 MSC 微球表面 C—H 的伸缩振动吸收峰，1570  $cm^{-1}$  处对应 N—H 的弯曲振动吸收峰，说明

MS 颗粒表面成功包覆了壳聚糖<sup>[21]</sup>。此外, 1714  $\text{cm}^{-1}$  处的弱峰表明存在来自于醛基的  $\text{C}=\text{O}$ <sup>[22]</sup>。

### 2.1.3 MSC 的磁分离性能

MSC 的磁分离性能结果如图 5 所示。图 5a 是分散在去离子水中的 MSC, 在外加磁场下, MSC 微球在 2 s 内被吸附在管壁上, 如图 5b 所示, 说明 MSC 微球具有良好的磁分离性能。所以, 在后续酶催化及转化应用中, 当施加外加磁场作用时, 固定化酶与处理液可以实现快速分离。

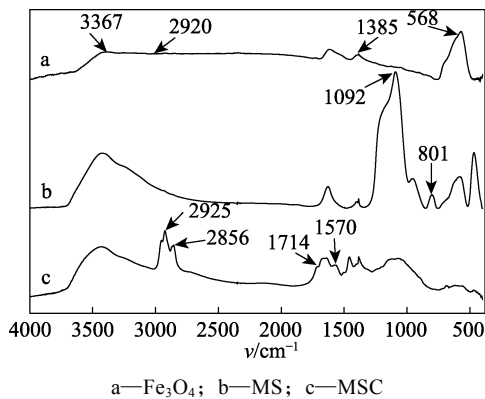


图 4  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、MS 和 MSC 的红外图谱  
Fig. 4 FTIR spectra of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , MS and MSC

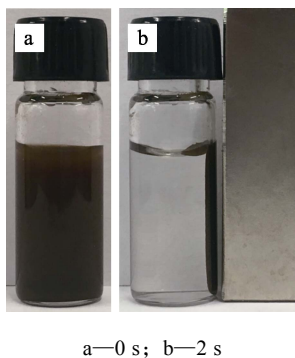


图 5 MSC 的磁分离性能  
Fig. 5 Magnetic separation performance of MSC

## 2.2 MSCE 固定化柚苷酶工艺优化

### 2.2.1 柚苷酶液 pH 对固定化柚苷酶酶活力的影响

用不同 pH 的缓冲液将酶液 pH 调至 2.5~4.5, 分别进行固定化柚苷酶实验, 实验方法同 1.2.3 节, 结果见图 6。由图 6 可知, pH 在 2.5~3.0 内, 固定化柚苷酶的活力随着 pH 的增加而升高; 但 pH 超过 3.0 以后, 固定化柚苷酶的活力随着 pH 的增加而逐渐减小。这是因为在一定 pH 范围内, pH 升高有利于环氧基的激活, 并与酶分子的氨基反应, 但 pH 过高会促进环氧基的开环, 使其降解<sup>[23]</sup>, 从而导致固定化效率的降低。因此, 选择 pH 3.0 为最佳固定化 pH。

### 2.2.2 固定化温度对固定化柚苷酶酶活力的影响

温度升高会促进环氧基的活化, 但同时也会促进环氧基的水解和交联副反应的发生<sup>[23]</sup>。本文考察

了固定化温度对 MSCE 固定化柚苷酶酶活力的影响, 实验方法同 1.2.3 节, 结果见图 7。由图 7 可知, 温度从 15  $^{\circ}\text{C}$  升到 30  $^{\circ}\text{C}$  时, 固定化柚苷酶的酶活力随之增加, 这是因为环氧基活化反应增加的速率大于环氧基水解和交联副反应发生的速率; 在 30  $^{\circ}\text{C}$  以后, 随着温度的升高, 固定化柚苷酶的酶活力有所下降, 这是因为环氧基的水解和交联副反应的发生相对于活化反应有更强的优势, 环氧基的降解导致固定化效率的降低<sup>[23]</sup>。因此, 选择 30  $^{\circ}\text{C}$  为最佳固定化温度。

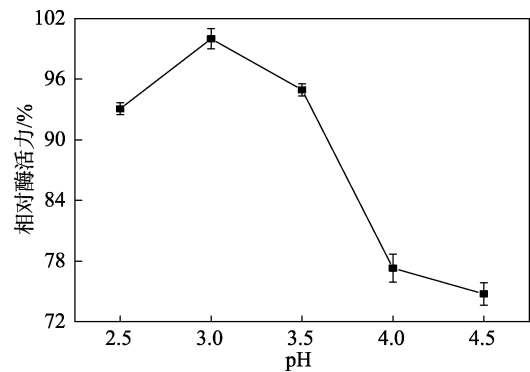


图 6 柚苷酶液 pH 对 MSCE 固定化柚苷酶酶活力的影响  
Fig. 6 Effect of pH of naringinase solution on the activity of the MSCE immobilized naringinase

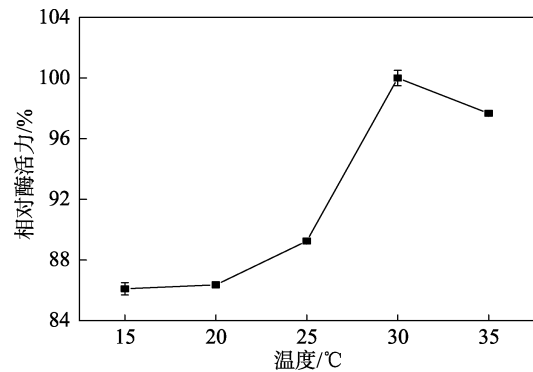


图 7 固定化温度对 MSCE 固定化柚苷酶酶活力的影响  
Fig. 7 Effect of immobilization temperature on the activity of the MSCE immobilized naringinase

### 2.2.3 固定化时间对固定化柚苷酶酶活力的影响

考察了固定化时间对 MSCE 固定化柚苷酶酶活力的影响, 实验方法同 1.2.3 节, 结果见图 8。由图 8 可知, 固定化柚苷酶的活力在 1~4 h 内是随着时间的增加而升高, 4 h 后再继续延长固定时间, 固定化柚苷酶的酶活力反而下降。这是因为当固定时间达到 4 h 时, 载体载酶量趋于饱和, 继续延长固定时间使过多的酶附着在载体表面, 增加了酶分子间的空间位阻效应, 并使部分酶分子进入孔隙深处, 导致其与底物结合减弱, 酶活下降<sup>[24]</sup>。因此, 选择 4 h 为最佳固定时间。



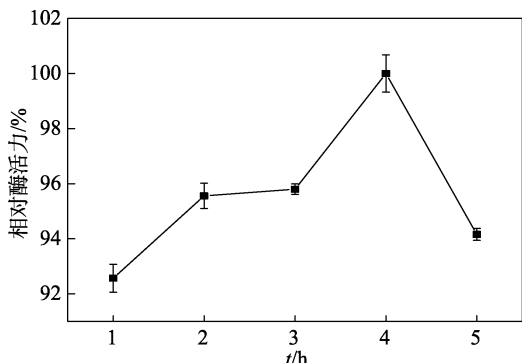


图 8 固定化时间对 MSCE 固定化柚苷酶酶活力的影响  
Fig. 8 Effect of immobilization time on the activity of the MSCE immobilized naringinase

2.2.4 给酶量对固定化柚苷酶酶活力的影响

考察了给酶量对 MSCE 固定化柚苷酶酶活力的影响, 实验方法同 1.2.3 节, 结果见图 9。由图 9 可知, 给酶量在达到 57.48 U/mL 之前, 固定化柚苷酶的酶活力随着给酶量的增大而迅速增加; 达到 57.48 U/mL 之后, 继续加大给酶量对固定化柚苷酶酶活力的影响并不明显。这是因为一定量的磁性硅基壳聚糖微球表面壳聚糖所含的活性团是一定的<sup>[25]</sup>, 当给酶量为 57.48 U/mL 时, 载体的结合位点达到饱和, 部分酶分子进入孔隙深处, 底物难以与其接触, 导致酶活增加缓慢甚至略微下降。因此 MSCE 固定化柚苷酶的最佳给酶量为 57.48 U/mL。

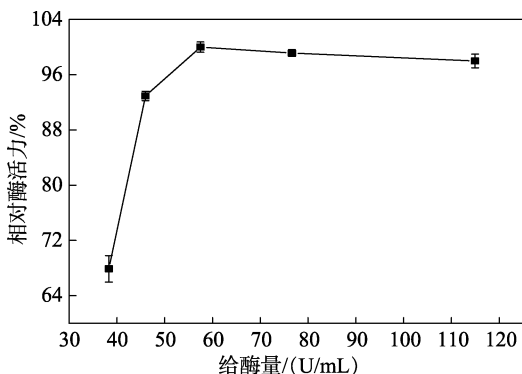


图 9 给酶量对 MSCE 固定化柚苷酶酶活力的影响  
Fig. 9 Effect of crude naringinase broth activity on the activity of the MSCE immobilized naringinase

2.3 最佳条件下 MSCE 固定化柚苷酶的参数测定

以上固定化工艺参数优化的结果表明, 在最佳条件下, 利用 MSCE 进行柚苷酶的固定化, 其载酶率、酶活回收率和酶比活力分别为 31.29%、88.92% 和 409.33 U/g。相比 Xiao<sup>[9]</sup>等的研究, 在磁性纳米颗粒表面包裹 SiO<sub>2</sub> 和壳聚糖后再用于柚苷酶的固定化, 其酶活回收率和酶比活力分别提高了 8.60% 和 10.83 倍, 不仅具有在外加磁场下与底物快速分离的性能, 还具有耐酸的性质, 同时还减少了磁性纳米颗粒对酶的直接热传递, 有利于提高其热稳定性。

2.4 MSCE 固定化柚苷酶水解柚皮苷的酶学性质研究

2.4.1 MSCE 固定化柚苷酶的最佳反应 pH 及 pH 稳定性

MSCE 固定化柚苷酶与游离柚苷酶水解柚皮苷实验的最佳反应 pH 及 pH 稳定性的研究结果见图 10。

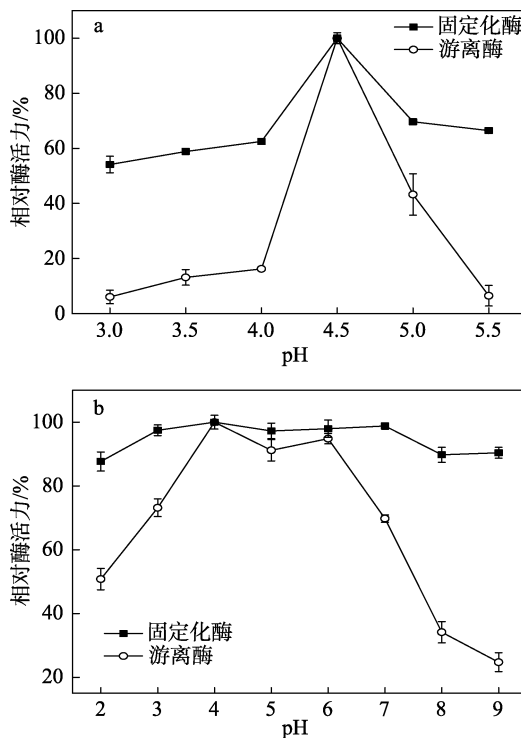


图 10 MSCE 固定化柚苷酶与游离柚苷酶水解柚皮苷实验的最佳反应 pH (a) 及 pH 稳定性 (b)

Fig. 10 Optimum pH (a) and pH stability (b) of MSCE immobilized naringinase and free naringinase in naringin hydrolysis experiment

由图 10a 可知, MSCE 固定化柚苷酶与游离柚苷酶的最佳反应 pH 均为 4.5, 但游离柚苷酶受 pH 的影响波动较大, 这说明 MSCE 固定化柚苷酶对其最佳反应 pH 没有明显影响, 并初步认为 MSCE 固定化柚苷酶较游离柚苷酶的 pH 稳定性好。由图 10b 可知, MSCE 固定化柚苷酶的相对酶活力在 pH 2.0~9.0 内几乎趋于稳定, 而游离柚苷酶的相对酶活力波动非常大。这说明 MSCE 固定化柚苷酶有较好的 pH 稳定性。

2.4.2 MSCE 固定化柚苷酶的最佳反应温度及温度稳定性

MSCE 固定化柚苷酶与游离柚苷酶水解柚皮苷的最佳反应温度及温度稳定性的研究结果见图 11。由图 11a 可知, MSCE 固定化柚苷酶与游离柚苷酶的最佳反应温度均为 50 °C, 在相同温度下 MSCE 固定化柚苷酶较游离柚苷酶的相对酶活力更高, 说明 MSCE 固定化柚苷酶对其最佳反应温度没有明显

影响, 并初步认为 MSCE 固定化柚苷酶的温度稳定性比游离柚苷酶好。由图 11b 和 11c 可知, 在 40 和 60 °C 下, 随着保温时间的增加, MSCE 固定化柚苷酶的相对酶活力下降趋势较游离柚苷酶缓和, 说明 MSCE 固定化柚苷酶有较好的温度稳定性。

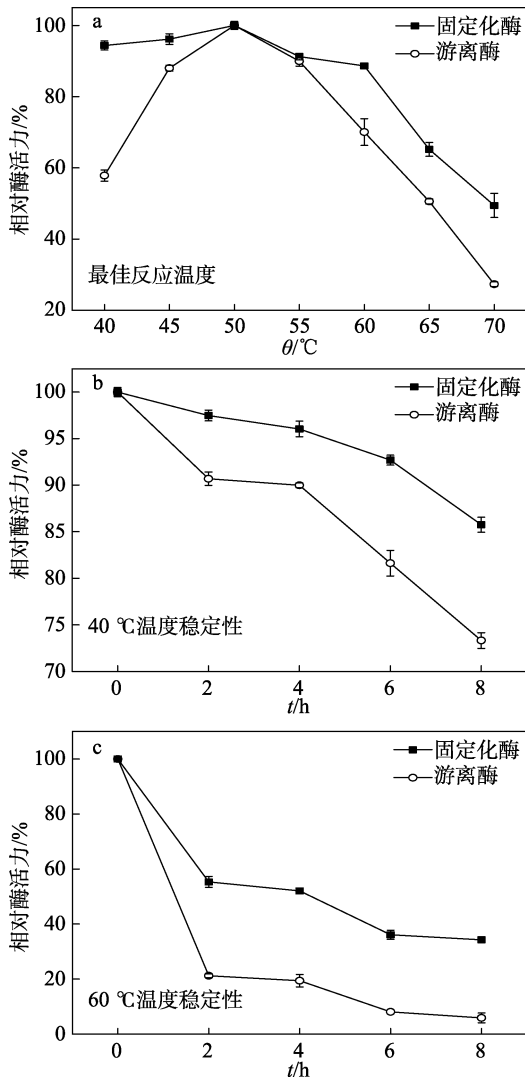


图 11 MSCE 固定化柚苷酶与游离柚苷酶水解柚皮苷实验的最佳反应温度及温度稳定性

Fig. 11 Optimal reaction temperature and thermal stability of MSCE immobilized naringinase and free naringinase in naringin hydrolysis experiment

#### 2.4.3 MSCE 固定化柚苷酶的操作稳定性

MSCE 固定化柚苷酶操作稳定性的研究结果见图 12。

由图 12 可知, 经过 7 次循环使用, MSCE 固定化柚苷酶的相对酶活力为 53.36%, 且经过第 6 次使用后 MSCE 固定化柚苷酶的相对酶活力趋于稳定。这说明 MSCE 固定化柚苷酶具有良好的操作稳定性。

#### 2.4.4 MSCE 固定化柚苷酶的储藏稳定性

MSCE 固定化柚苷酶与游离柚苷酶的贮藏稳定

性实验结果见图 13。如图 13 所示, MSCE 固定化柚苷酶在贮存 25 d 以后酶活趋于稳定, 贮存 30 d 之后仍保留 80% 以上的相对酶活力; 然而游离柚苷酶在贮存 30 d 之后仅约 30% 的相对酶活力, 期间酶活下降较快。因此, MSCE 固定化柚苷酶有较好的贮藏稳定性。

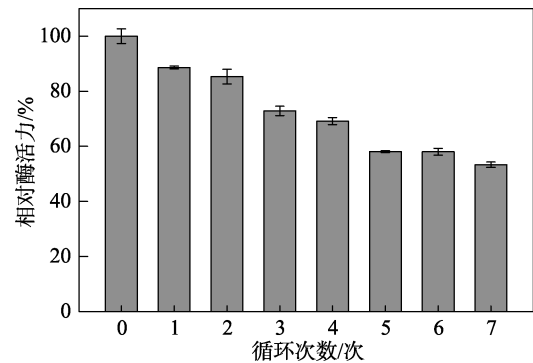


图 12 MSCE 固定化柚苷酶的操作稳定性

Fig. 12 Operational stability of MSCE immobilized naringinase

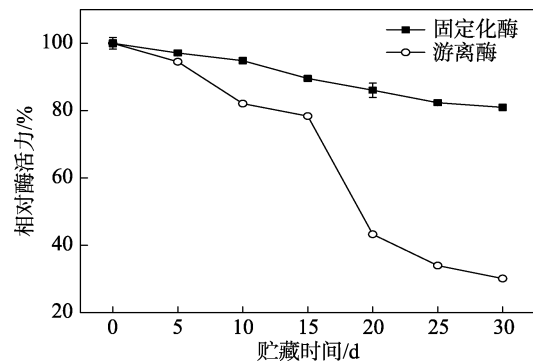


图 13 MSCE 固定化柚苷酶与游离柚苷酶的贮藏稳定性  
Fig. 13 Storage stability of MSCE immobilized naringinase and free naringinase

### 3 结论

依次用化学共沉淀法、溶胶-凝胶法和乳液交联法制得磁性硅基壳聚糖微球, 再进行环氧基修饰后用以固定化柚苷酶。通过对磁性硅基壳聚糖微球的表征和磁性能研究可知, 该磁性硅基壳聚糖微球成功包覆了壳聚糖和具有耐酸性质的  $\text{SiO}_2$ , 粒径约为 200  $\mu\text{m}$ , 表面具有许多微孔结构, 且具有良好的磁分离性能。通过单因素实验, 确定了环氧基修饰的磁性硅基壳聚糖微球 (MSCE) 固定化柚苷酶的最佳工艺条件为: pH 3.0、温度 30 °C、时间 4 h、给酶量 57.48 U/mL。通过最佳条件, 测得 MSCE 固定化柚苷酶的载酶率、酶活回收率和酶比活力分别为 31.29%、88.92% 和 409.33 U/g; 水解柚皮苷重复使用 7 次后, 仍具有 53.36% 的相对酶活力; 4 °C 贮存 30 d 之后, 还具有 80.97% 的相对酶活力, 说明 MSCE

固定化柚苷酶具有良好的操作稳定性和贮藏稳定性。总之，由于磁性硅基壳聚糖微球不仅比表面积大，还具有很好的磁分离性能，因此磁性硅基壳聚糖微球在固定化柚苷酶方面具有很好的发展前景，为其进一步的工业化发展提供了基础数据和技术准备。

#### 参考文献：

- [1] Li Yanli (李艳丽). The preparation and characterization of biopolymer hydrogels[D]. Nanjing: Southeast University (东南大学), 2016.
- [2] Karthikeyan O P, Chidambaramavathy K, Cirés S, *et al.* Review of sustainable methane mitigation and biopolymer production[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2015, 45(15): 1579-1610.
- [3] Nitta S K, Numata K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(1): 1629-1654.
- [4] Yang H, Yuan B, Lu Y B, *et al.* Preparation of magnetic chitosan microspheres and its applications in wastewater treatment[J]. *Science in China Series B: Chemistry*, 2009, 52(3): 249-256.
- [5] Şekeroğlu G, Fadiloğlu S, Göğüş F. Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin[J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 224(1): 55-60.
- [6] Ribeiro M H. Naringinases: occurrence, characteristics, and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(6): 1883-1895.
- [7] Lei Shengjiao (雷生姣), Yu Haili (余海立), Huang Chao (黄超), *et al.* Cross-linked chitosan as a carrier for immobilization of naringinase [J]. *Food Science (食品科学)*, 2013, 34(23): 233-238.
- [8] Awad G E A, Abd El Aty A A, Shehata A N, *et al.* Covalent immobilization of microbial naringinase using novel thermally stable biopolymer for hydrolysis of naringin[J]. *Biotechnology*, 2016, 6(1): 1-10.
- [9] Xiao A F, You H Y, Wu C Z, *et al.* Immobilization and characterization of naringinase from *aspergillus aculeatus* onto magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles[J]. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 2015, 7(9): 770-778.
- [10] Sun X T, Yang L R, Li Q, *et al.* Amino-functionalized magnetic cellulose nanocomposite as adsorbent for removal of Cr(VI): Synthesis and adsorption studies[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 241(1): 175-183.
- [11] Liu Y D, Fang F F, Choi H J. Core-shell-structured silica-coated magnetic carbonyl iron microbead and its magnetorheology with anti-acidic characteristics[J]. *Colloid and Polymer Science*, 2011, 289(11): 1295-1298.
- [12] Ren Y, Abbood H A, He F B, *et al.* Magnetic EDTA-modified chitosan/SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> adsorbent: Preparation, characterization, and application in heavy metal adsorption[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 226(12): 300-311.
- [13] Lian Meng (廉萌), Li Qian (李金), Tian Jing (田晶), *et al.* Process optimization of naringinase production improved by fungi co-culture [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities (高校化学工程学报)*, 2017, 31(2): 394-400.
- [14] Sun X T, Li Q, Yang L R, *et al.* Chemically modified magnetic chitosan microspheres for Cr(VI) removal from acidic aqueous solution[J]. *Particuology*, 2016, 26(3): 79-86.
- [15] Jiang D S, Long S Y, Huang J, *et al.* Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 25(1): 15-23.
- [16] Ren Jiaoyan (任娇艳), Kang Xiaoyan (康小燕), Chen Yun (陈云), *et al.* Immobilization of xanthine oxidase on magnetic chitosan microspheres and study of its enzymatic properties[J]. *Modern Food Science and Technology (现代食品科技)*, 2016, 32(12): 66-73.
- [17] Shi Qinghong (史清洪), Peng Guanying (彭冠英), Sun Shu (孙舒), *et al.* Process intensification and characterization of agarose gel activation with epichlorohydrin[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering (过程工程学报)*, 2007, 7(4): 743-746.
- [18] Davis W B. Determination of flavanones in citrus fruits[J]. *Analytical Chemistry*, 1947, 19(7): 476-478.
- [19] Cui Peiwu (崔培梧), Li Jilie (黎继烈), Xiao Zuowei (肖作为), *et al.* Immobilization of *Penicillium* sp. Naringinase on epoxy resin[J]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2014, 40(5): 87-92.
- [20] Wang Y J, Wang X H, Luo G S, *et al.* Adsorption of bovin serum albumin(BSA) onto the magnetic chitosan nanoparticles prepared by a microemulsion system[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(9): 3881-3884.
- [21] Zhu H Y, Jiang R, Xiao L, *et al.* Preparation, characterization, adsorption kinetics and thermodynamics of novel magnetic chitosan wrapping nanosized  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and multi-walled carbon nanotubes with enhanced adsorption properties for methyl orange[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(14): 5063-5069.
- [22] Sun X T, Yang L R, Xing H F, *et al.* Synthesis of polyethylenimine-functionalized poly (glycidyl methacrylate) magnetic microspheres and their excellent Cr(VI) ion removal properties[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 234(19): 338-345.
- [23] Zhang Hailong (张海龙), Qiao Xin (乔昕), Yao Hongjuan (姚红娟), *et al.* Synthesis of peptide-ligand affinity chromatography media with controllable ligand density[J]. *Chemical Reaction Engineering and Technology (化学反应工程与工艺)*, 2007, 23(4): 289-295.
- [24] Hu B, Pan J, Yu H L, *et al.* Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(9): 1019-1024.
- [25] Diab M A, El-Sonbati A Z, Al-Halawany M M, *et al.* Thermal stability and degradation of chitosan modified by cinnamic acid[J]. *Open Journal of Polymer Chemistry*, 2012, 2(1): 14-20.