

# 交联牛肝 $\beta$ -糖苷酶聚合物的制备、表征及应用

秦烨芝, 叶敏, 李宁, 宗敏华

(华南理工大学轻工与食品学院制浆造纸工程国家重点实验室, 广东广州 510640)

**摘要:** 牛肝  $\beta$ -糖苷酶是一种能催化核苷类化合物区域选择性糖基化反应合成二糖核苷的生物催化剂。在已有的研究报道中, 采用的生物催化剂都是游离酶, 不利于其大规模应用。交联酶聚合物(CLEAs)作为一种新型的无载体固定化酶, 具有制备简便、成本低、体积酶活高等优点。本文研究牛肝  $\beta$ -糖苷酶 CLEAs 的制备, 并对其酶学性质和结构进行了研究, 探讨了其在二糖核苷合成中的应用。最适的沉降剂、交联剂及交联时间分别为 70% 饱和度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、50% (V/V) 葡聚糖多醛及 8 h。在最适条件下, CLEAs 的活性回收率为 58%。该 CLEAs 的最适 pH、温度、 $V_{\max}$  及  $K_m$  分别为 8.5、60 °C、0.13  $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$  及 1.43 mM。并且该 CLEAs 具有较好的操作稳定性, 重复利用 6 批次后, 其催化合成 5'-O- $\beta$ -葡萄糖基-2'-脱氧尿苷的相对产率仅下降 20%。牛肝  $\beta$ -糖苷酶 CLEAs 呈无定形态。

**关键词:**  $\beta$ -糖苷酶; 交联酶聚合物; 二糖核苷

文章编号: 1673-9078(2015)10-210-214

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.035

## Preparation, Characterization, and Application of Cross-linked Enzyme Aggregates of $\beta$ -glycosidases from Bovine Liver

QIN Ye-zhi, YE Min, LI Ning, ZONG Min-hua

(State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:**  $\beta$ -glycosidase from bovine liver is a biocatalyst that can catalyze the synthesis of disaccharide nucleosides via regioselective glycosylation of nucleosides. In previous reports, the used biocatalysts were free enzymes, which limit the large-scale applications. As novel carrier-free immobilized enzymes, cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) have many advantages, such as easy preparation, low cost, and high enzyme volumetric activities. CLEAs of  $\beta$ -glycosidase from bovine liver were prepared, their enzymatic properties and structures were studied, and their application for the synthesis of disaccharide nucleoside was explored. The optimal precipitant, cross-linking agent and cross-linking time were 70% saturated ammonium sulfate, 50% (V/V) dextran polyaldehyde, and 8 h, respectively. Under optimal conditions, the activity recovery of CLEAs reached 58%. The optimal pH, temperature,  $V_{\max}$  and  $K_m$  of the CLEAs were 8.5, 60 °C, 0.13  $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$ , and 1.43 mM, respectively. Additionally, the CLEAs showed good operational stability. After they were reused for six batches, the relative yield in the CLEA-catalyzed synthesis of 5'-O- $\beta$ -glucosyl-2'-deoxyuridine had decreased only by 20%. The CLEAs had an amorphous structure.

**Key words:**  $\beta$ -glycosidase, cross-linked enzyme aggregates; disaccharide nucleosides

糖苷酶 (Glycosidases, EC 3.2), 又称糖基水解酶, 是一类催化糖苷键水解的酶。糖基转移酶 (Glycosyltransferases, EC 2.4) 和糖苷酶均具有转糖基化功能, 在合成各种活性糖苷化合物中扮演着重要角色<sup>[1,2]</sup>。糖基转移酶能特异地催化糖基从活性中间体 (如 UDP-衍生物) 转移到糖基受体上, 具有高度的选择性和催化效率, 但这类酶分离困难、来源有限、且需要昂贵的 UDP-糖苷作为活性糖基供体, 故该酶

收稿日期: 2014-12-08

基金项目: 珠江科技新星专项基金 (2012J2200011); 中央高校基本科研业务费项目 (2014ZG0045)

作者简介: 秦烨芝 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物催化

通讯作者: 李宁, 博士, 副教授, 研究方向: 生物催化及生物质预处理

在有机合成中的应用受到一定的限制。相对而言, 糖苷酶来源广泛、较稳定、且底物谱宽, 可直接以非保护或非活化的糖作为糖基供体, 故广泛用于合成各种糖苷类化合物。

最近, 本课题组研究发现来源于牛肝的  $\beta$ -糖苷酶能高效催化核苷类化合物区域选择性糖基化合成各种二糖核苷<sup>[3-4]</sup>。研究发现, 核苷类药物的糖基化衍生物较之亲代化合物具有更低的毒副作用。例如, Abraham 等<sup>[5]</sup>以 Balb/c 小鼠为实验对象, 发现 5-氟尿苷的半乳糖衍生物的毒副作用比亲代化合物低 100 倍。同时, 二糖核苷是一类具有生物活性的天然产物, 迄今为止, 已从自然界分离得到 100 多种二糖核苷及其类似物<sup>[6]</sup>。但目前, 二糖核苷的酶法合成采用的酶均是游离酶,

导致稳定性差、回收难、成本高、易污染产物等问题。固定化酶能有效克服上述问题。固定化技术可分为有载体的和无载体的固定化技术。交联酶聚合物(cross-linked enzyme aggregates, CLEAs)是近年来出现的一种新型的无载体固定化技术,具有制备简便、成本低、体积酶活高等优点<sup>[7]</sup>;此外,相对于其它的无载体固定化技术如交联酶晶体,交联酶聚合物的制备无需繁琐的纯化、结晶过程,因而 CLEAs 更适宜于工业化应用。本文研究了牛肝  $\beta$ -糖苷酶 CLEAs 的制备、酶学性质和结构,并探讨了其在二糖核苷合成中的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

对硝基苯基  $\beta$ -D-葡萄糖糖苷(pNPGlc)由 Alfa Aesar 公司提供。2'-脱氧尿苷购于河南新乡拓新生化科技有限公司。高碘酸钠,购于上海展云化工有限公司。葡聚糖 T100,由广州市齐云生物技术有限公司提供。所用溶剂及其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

磁力搅拌器及恒温水浴锅,常州澳华仪器有限公司; Waters 高效液相色谱仪,配备 1525 二元泵和 2489 可变波长紫外检测器,美国 Waters 公司; XBridge<sup>TM</sup> C18 分析型色谱柱(4.6×250 mm),美国 Waters 公司; UV 2550 型紫外分光光度计,日本岛津公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 葡聚糖多醛的制备

1.65 g 葡聚糖溶解在 50 mL 蒸馏水中,加入 3.85 g 高碘酸钠,室温下搅拌反应。反应 90 min 后,装入透析袋(截留分子量为 12 ku)中,于蒸馏水中透析 2 h 以上,重复透析 5 次。

#### 1.3.2 交联酶聚合物的制备

在 10 mL 指头瓶中,分别加入一定量的沉降剂和葡聚糖多醛溶液,然后加入甘氨酸-NaOH 缓冲液(0.1 M, pH 9.0),使两者的体积总和为 3.4 mL。随后,缓慢滴加 0.6 mL 酶液(4.2 U),于 0 °C 下搅拌,每隔 4 h 取样 67  $\mu$ L,离心(14000×g) 5 min,沉淀蛋白用缓冲液洗涤若干次,直至洗涤液中检测不到酶活。测定 CLEAs 的活性回收率。

#### 1.3.3 CLEAs 活性回收率的测定

将 CLEAs 重悬于 1.8 mL 磷酸缓冲液(50 mM, pH 7.0)中,加入 0.2 mL 30 mM pNPGlc 混合均匀,置于

恒温水浴振荡器(45 °C, 200 r/min)反应 5 min 后,用 8 mL 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应,离心(14 000 g) 5 min,取上清液,在 402 nm 下读取吸光度值。基于对硝基苯酚的校正曲线,计算得到相应的酶活。 $\beta$ -糖苷酶活单位(U)定义为在 45 °C, pH 7.0 下,每分钟生成 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。活性回收率的计算方法:

活力回收率(%)=CLEAs 酶活/制备前酶液的活性×100%

#### 1.3.4 交联酶聚合物的最适 pH 和最适反应温度

1.8 mL 0.1 M 不同 pH 值的缓冲液(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液, pH 4.0 和 5.0; 磷酸缓冲液, pH 6.0~8.0; 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH 8.5~10.0)和 0.028 U 酶液或 CLEAs 混合均匀,然后快速加入 0.2 mL 30 mM pNPGlc 启动反应,置于恒温水浴振荡器(45 °C, 200 rpm)反应 10 min,用 8 mL 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应并离心(14000 g, 5 min),取上清液在 402 nm 读取吸光度值。

1.8 mL 甘氨酸-NaOH 缓冲液(0.1 M, pH 9.0 或 8.5, 分别用于酶液及 CLEAs 最适反应温度研究)和 0.028 U 酶液或 CLEAs 混合均匀,然后快速加入 0.2 mL 30 mM pNPGlc 启动反应,置于不同温度的恒温水浴振荡器(200 r/min)反应 10 min,用 8 mL 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应并离心(14000 g, 5 min),取上清液在 402 nm 读取吸光度值。结果为两次实验的平均值。

#### 1.3.5 交联酶聚合物的动力学参数

2 mL 含不同 pNPGlc 浓度(0.5、1、2、3、4 及 6 mM)的甘氨酸-NaOH 缓冲液(0.1 M, pH 9.0 或 8.5, 分别用于酶液及 CLEAs 动力学研究),置于恒温水浴振荡器中(45 °C, 200 r/min)预热 10 min,快速加入 0.028 U 酶液或 CLEAs 启动反应,反应 10 min 后用 8 mL 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应并在 402 nm 读取吸光度值。结果为两次实验的平均值,通过 Lineweaver-Burk 作图法求得酶液与 CLEAs 的  $V_{max}$  和  $K_m$ 。

#### 1.3.6 交联酶聚合物的操作稳定性

将 0.2 mmol pNPGlc(60 mg)和 0.4 mmol 2'-脱氧尿苷(91.2 mg)溶于 20 mL 甘氨酸-NaOH 缓冲液(0.1 M, pH 8.5),置于恒温水浴振荡器(40 °C, 200 r/min),充分混匀后,加入 1.0 U CLEAs 启动反应。定时取样 20  $\mu$ L,液相监测。糖苷彻底消耗时,终止反应。过滤,用蒸馏水洗涤 CLEAs 2 次,再用甘氨酸-NaOH 缓冲液(0.1 M, pH 8.5)洗涤 1 次,然后将 CLEAs 加入到新的反应体系中,并在相同反应条件下测定酶促 2'-脱氧尿苷糖基化反应的最大产率,重复数批次反应。

#### 1.3.7 交联酶聚合物的结构

将以 50% (V/V) 葡聚糖多醛为交联剂并在最适交联条件下制备的 CLEAs 冻干成固体粉末, 喷金后电镜扫描观察其微观结构。

### 1.3.8 数据分析

本文所报道的结果为两次独立实验结果的平均值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 沉降剂的筛选及其最适浓度优化

表 1 沉降剂对  $\beta$ -糖苷酶聚合物活性回收率的影响

Table 1 Effect of precipitants on activity recovery of  $\beta$ -glycosidase aggregates

沉降剂	浓度(V/V)/%	活性回收率 <sup>a</sup> /%
对照	0	100
丙酮	67	26 ± 2
乙醇	50	19 ± 1
甲醇	50	25 ± 3
异丙醇	67 <sup>b</sup>	39 ± 3
正丙醇	67 <sup>b</sup>	51 ± 2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	70 <sup>b,c</sup>	97 ± 3
叔丁醇	67 <sup>b</sup>	32 ± 1
乙腈	50	21 ± 2
二噁烷	50	24 ± 1
二甲基亚砜	50	0
PEG 6000	67 <sup>d</sup>	20 ± 2

注: <sup>a</sup> 聚集体重新溶解后的活性回收率; <sup>b</sup> 最适沉降剂浓度;

<sup>c</sup> 饱和度; <sup>d</sup> 重量百分比。

首先, 我们选取了 11 种沉降剂进行研究(表 1)。结果表明, 在 70% 饱和度的硫酸铵中, 酶蛋白的活力回收率最高, 而以正丙醇、异丙醇、叔丁醇为沉降剂时, 酶活力回收率次之, 其他试剂则效果更差, 有的甚至检测不出活性, 其原因可能是牛肝  $\beta$ -糖苷酶对有机溶剂异常敏感<sup>[8]</sup>, 沉降过程中引起了酶的不可逆失活。例如, 以丙酮、甲醇和乙腈为沉降剂, 酶聚合物的活性回收率分别为 26%、25% 和 21%, 而以二甲基亚砜(DMSO)为沉降剂时, 牛肝  $\beta$ -糖苷酶聚合物则完全变性失活。在此基础上, 我们对硫酸铵、正丙醇、异丙醇、叔丁醇的最适浓度进行了系统的优化, 得到这些沉降剂的最适浓度分别为 70% 饱和度、67%、67% 及 67% (数据未显示)。

### 2.2 葡聚糖多醛的浓度及交联时间对 CLEAs

活性回收率的影响

交联剂及其浓度、交联时间是影响 CLEAs 活性回收率的重要因素。交联剂的种类诸多, 最常用的是戊二醛, 因其分子量小, 价格低廉、来源便捷而备受青睐<sup>[9-10]</sup>。然而, 以戊二醛为交联剂时, 在最佳交联条件(戊二醛浓度为 20 mM, 交联时间为 12 h), 牛肝  $\beta$ -糖苷酶 CLEAs 的酶活回收率仅为 35%, 这表明交联过程中酶严重失活, 这与 Mateo 等报道的结果类似<sup>[11]</sup>。因此, 为避免小分子、高活性的戊二醛导致酶的失活, 我们尝试以高分子量的葡聚糖多醛作为交联剂。

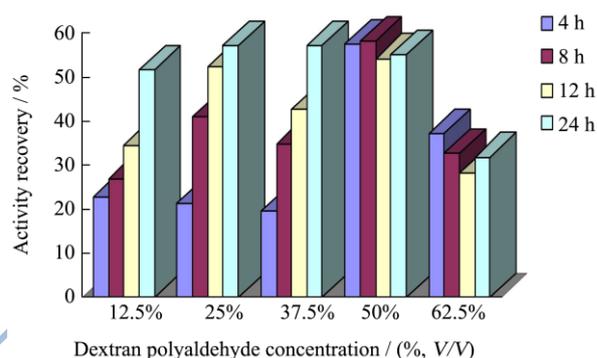


图 1 葡聚糖多醛的浓度及交联时间对 CLEAs 活性回收率的影响

Fig.1 Effects of dextran polyaldehyde concentration and cross-linking time on activity recovery of CLEAs

注: 误差范围均低于 4%。

如图 1 所示, 以葡聚糖多醛为交联剂时, 牛肝  $\beta$ -糖苷酶 CLEAs 的活性回收率得以显著提高。研究表明, 活性回收率先随着葡聚糖多醛浓度的增加而增大, 当葡聚糖多醛的浓度为 50% (V/V) 时, CLEAs 的活性回收率达最大 (57%)。最近, Kim 等也发现利用葡聚糖多醛替代小分子戊二醛, 能有效提高甲酸脱氢酶 CLEAs 的活性回收率<sup>[12]</sup>。继续增大交联剂浓度, 导致活性回收率下降。此外, 当交联剂浓度较低时, 交联时间的延长有利于增强交联强度。综合考虑交联强度以及活性回收率, 我们确定葡聚糖多醛的最佳浓度为 50% (V/V) 时, 最适交联时间为 8 h。此时, CLEAs 的活性回收率为 58%。

### 2.3 牛肝 $\beta$ -糖苷酶 CLEAs 的最适 pH 及最适

温度

缓冲液 pH 影响着酶的离子化, 从而影响着酶的活性和选择性。由图 2a 可知, 牛肝  $\beta$ -糖苷酶粗提液的最适 pH 为 9.5, 在 pH 7.5 处有一个峰, 呈双钟型曲线, 这表明牛肝粗提液中至少存在两种能催化 pNPGlc 水解的糖苷酶, 而且这两种酶的最适 pH 相差较大。而 CLEAs 的最适 pH 向酸性范围偏移, 为 8.5, 在 pH

6.5 处有另一个峰, pH 曲线也是双钟型。由图 2b 可知, 游离酶和 CLEAs 的最适温度分别为 55 °C 和 60 °C, 这表明固定化能一定程度上增强酶的热稳定性。

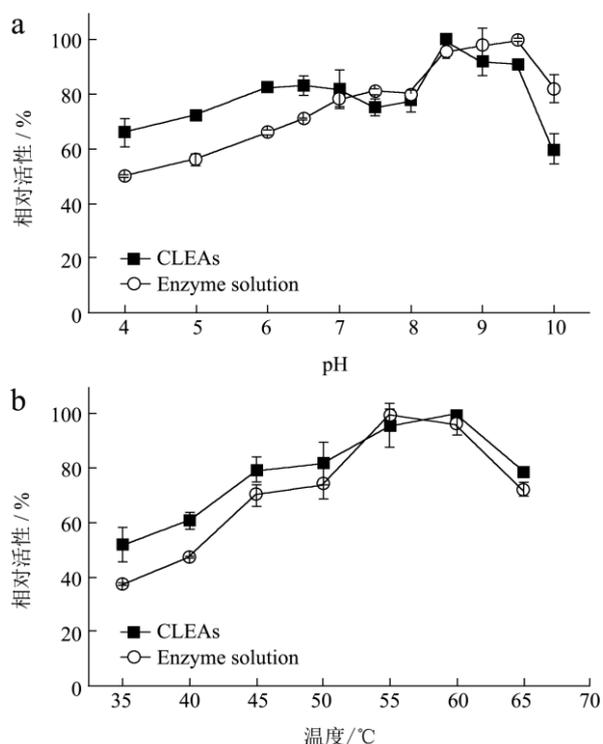


图 2 β-糖苷酶及其 CLEAs 的最适 pH (a) 及最适温度 (b)

Fig.2 Optimal pH (a) and temperature (b) of β-glycosidase solution and its CLEAs

### 2.4 表观动力学参数

表 2 牛肝 β-糖苷酶粗提液和 CLEAs 表观动力学参数

Table 2 Apparent kinetic parameters of the crude extract of β-glycosidases from bovine liver and CLEAs

酶	$V_{max}$ /[ $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$ ]	$K_m$ /mM	$V_{max}/K_m$ /[ $\times 10^{-3} \text{L}/(\text{min mg})$ ]
β-糖苷酶粗提液	0.25 ± 0.02	0.77 ± 0.10	0.33 ± 0.02
CLEAs	0.13 ± 0.01	1.43 ± 0.06	0.09 ± 0.01

由表 2 可知, β-糖苷酶经固定化后,  $K_m$  值由 0.77 mM 上升至 1.43 mM, 并且 CLEAs 的  $V_{max}$  约是牛肝 β-糖苷酶溶液的 52%, 从而导致催化效率 ( $V_{max}/K_m$ ) 的下降[0.32 vs. 0.09 × 10<sup>-3</sup> L/(min mg)], 其原因可能是 β-糖苷酶固定化后形成的交联酶聚合物存在较大的传质阻力, 这可以通过后面的 CLEAs 扫描电镜图进行印证。CLEAs 呈无定形结构, 且聚集成簇, 由于受到邻近酶分子的屏蔽作用, 导致有效酶活性中心数的下降; 此外, 由于此固定化酶是通过交联法制备得到, 故在交联过程中交联剂可能会通过非特异性的方式与酶分子上的关键氨基酸残基反应, 从而导致酶催化效率的

降低<sup>[11]</sup>。

### 2.5 操作稳定性实验

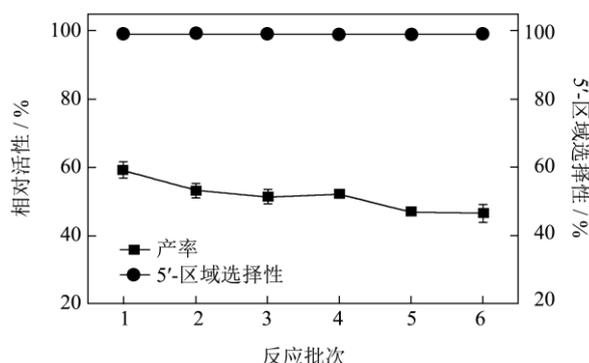


图 3 CLEAs 的操作稳定性

Fig.3 Operational stability of CLEAs

固定化酶技术的主要目标是设计可重复使用的生物催化剂, 故重复利用是固定化酶的重要特性之一, 其直接影响生产过程中的成本<sup>[7]</sup>。在此, 我们以 2'-脱氧尿苷区域选择性葡萄糖基化为模型反应, 探讨牛肝 β-糖苷酶 CLEAs 的操作稳定性。如图 3 所示, 牛肝 β-糖苷酶 CLEAs 催化核苷糖基化反应不同批次间的产率变化不大, 重复使用 6 批次后, 产率为 47%, 较第一批次的产率 59% 仅下降了 12%, 相对产率下降约 20%, 这表明该固定化酶具有较好的可重复利用性。同时, 酶的区域选择性无变化, 均保持在 99% 以上。

### 2.6 β-糖苷酶 CLEAs 的结构形态

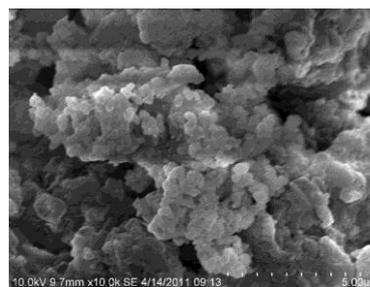


图 4 牛肝 β-糖苷酶 CLEAs 电镜扫描图

Fig.4 Scanning electron microscope image of CLEAs

利用扫描电镜, 我们对牛肝 β-糖苷酶 CLEAs 的结构形态进行了研究。如图 4 所示, CLEAs 呈无定形态, 聚合物表面存在颗粒状结构, 累加成簇并向外伸展。Schoevaart 等<sup>[12]</sup>曾利用电镜扫描对 12 种不同酶的 CLEAs 结构进行研究, 归纳出两种类型的结构: (1) 均一结构, 通常呈“球形”, 聚合物表面没有糖基化且高疏水性; (2) 无定形结构, 聚集成簇, 聚合物表面被糖基化且带有大量的亲水残基。根据电镜扫描图可知, 牛肝 β-糖苷酶 CLEAs 的结构属于第二种形态, 这与来源于西梅的 β-葡萄糖苷酶 CLEAs 结构类似<sup>[14]</sup>。

### 3 结论

结果表明,沉降剂对牛肝 $\beta$ -糖苷酶聚合物活性回收率影响显著,当沉降剂为有机溶剂时,活性回收率均较低,这主要是因为有机溶剂导致了 $\beta$ -糖苷酶不可逆失活。类似地,交联剂对牛肝 $\beta$ -糖苷酶 CLEAs 的活性回收率有显著的影响,当交联剂为小分子戊二醛时,最高酶活回收率仅为 35%,但当用高分子多醛(葡聚糖多醛)替代戊二醛时,能明显提高 CLEAs 的活性回收率。 $\beta$ -糖苷酶经固定化后,其最适 pH 向酸性范围略有偏移,最适反应温度由 55 °C 升至 60 °C,并且酶与底物的亲和力略有降低。本研究制备的牛肝 $\beta$ -糖苷酶 CLEAs 具有较好的可重复利用性,可望用于二糖核苷等生物活性化合物的大规模合成。

### 参考文献

- [1] Nguyen Huy T, Sohng J K. Recent biotechnological progress in enzymatic synthesis of glycosides [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2013, 40(12): 1329-1356
- [2] Bojarov P, Kren V. Glycosidases: a key to tailored carbohydrates [J]. Trends Biotechnol., 2009, 27(4): 199-209
- [3] Yan L Q, Li N, Zong M H. First and facile enzymatic synthesis of  $\beta$ -fucosyl-containing disaccharide nucleosides through  $\beta$ -galactosidase-catalyzed regioselective glycosylation [J]. J. Biotechnol., 2012, 164(2): 371-375
- [4] Yan L Q, Li N, Zong M H. First enzymatic galactosylation of acyclic nucleoside drugs by  $\beta$ -galactosidase: Synthesis of water-soluble  $\beta$ -D-galactosidic prodrugs [J]. Biotechnol. Bioprocess Eng., 2014, 19(4): 586-591
- [5] Abraham R, Aman N, von Borstel R, et al. Conjugates of COL-1 monoclonal antibody and  $\beta$ -D-galactosidase can specifically kill tumor cells by generation of 5-fluorouridine from the prodrug  $\beta$ -D-galactosyl-5-fluorouridine [J]. Cell Biochem. Biophys., 1994, 24(1): 127-133
- [6] Efimtseva E V, Kulikova I V, Mikhailov S N. Disaccharide nucleosides as an important group of natural compounds [J]. Mol. Biol., 2009, 43(2): 301-312
- [7] Sheldon R A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, 92(3): 467-477
- [8] 叶敏,刘秋萍,李宁,等.混合溶剂体系中牛肝 $\beta$ -半乳糖苷酶催 5-氟-2'-脱氧尿苷区域选择性半乳糖基化反应[J].催化学报,2011,32(6):1063-1068  
YE Min, LIU Qiu-Ping, LI Ning, et al. Regioselective galactosylation of floxuridine catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from bovine liver in co-solvent systems [J]. Chinese J. Catal., 2011, 32(6): 1063-1068
- [9] 陈磊,李宁,宗敏华.交联 $\beta$ -葡萄糖苷酶聚集体的制备及应用[J].现代食品科技,2011,27(10):1217-1120  
CHEN Lei, LI Ning, ZONG Min-Hua. Preparation and application of cross-linked  $\beta$ -glucosidase aggregates [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(10): 1217-1120
- [10] Talekar S, Joshi A, Joshi G, et al. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates [J]. RSC Adv., 2013, 3: 12485-12511
- [11] Mateo C, Palomo J M, van Langen L M, et al. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates [J]. Biotechnol. Bioeng., 2004, 86(3): 273-276
- [12] Kim M H, Parka S, Kim Y H, et al. Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates [J]. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2013, 97: 209-214
- [13] Schoevaart R, Wolbers MW, Golubovic M, et al. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) [J]. Biotechnol. Bioeng., 2004, 87(6): 754-762
- [14] Chen L, Hu Y D, Li N, et al. Cross-linked enzyme aggregates of  $\beta$ -glucosidase from *Prunus domestica* seeds [J]. Biotechnol. Lett., 2012, 34(9): 1673-1678