邱荣慧, 李子翼, 李娇, 等. D-阿洛酮糖-3-差向异构酶交联聚集体的制备及其性质分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(7): 169−177. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020268
QIU Ronghui, LI Ziyi, LI Jiao, et al. Preparation and Properties Analysis of D-Allulose-3-Epimerase Cross-linked Enzyme Aggregates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(7): 169−177. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020268

·生物工程·

D-阿洛酮糖-3-差向异构酶交联聚集体的制备及其性质分析

邱荣慧[1,2], 李子翼[1,2], 李　娇[2], 王德培[1], 曾　艳[2,*], 孙媛霞[2]
（1.天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;
2.中国科学院天津工业生物技术研究所工业酶国家工程研究中心, 天津 300308）

摘　要: 本研究旨在利用交联酶聚集体（cross-linked enzyme aggregates，CLEAs）技术固定化瘤胃球菌来源的 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶（D-allulose-3-epimerase from *Ruminococcus* sp.，RDAE）。选择聚乙二醇 PEG4000 作为沉淀剂、葡聚糖醛作为交联剂，通过优化沉淀剂用量、交联剂用量与交联时间制备交联聚集体 RDAE-CLEAs。比较游离酶 RDAE 与固定化酶 RDAE-CLEAs 的酶学性质差异，并采用扫描电镜、红外光谱和分子动力学模拟分析固定化前后酶的结构变化。在不添加稳定剂的条件下，研究采用终质量分数 36 %（w/v）PEG4000 与终浓度 2.73 mg/mL 葡聚糖醛交联反应 4 h 制备的 RDAE-CLEAs 酶活保留率达到 55.88%。与游离酶相比，固定化酶在 pH6.0~7.5 和 30~55 ℃ 下的环境耐受性显著提升（P<0.05），重复使用 10 次后仍能保持 59.77% 的初始活性。结构分析显示 RDAE 在交联过程中发生了明显的构象变化，酶蛋白四聚体结构中的亚基结合紧密程度降低。本研究获得了重复使用性能良好的 RDAE-CLEAs，揭示了 RDAE 表面赖氨酸残基不仅为共价交联提供有效位点，还在维持酶蛋白四聚体刚性结构中发挥关键作用。基于四聚体刚性结构对 RDAE 热稳定性的重要影响，在避免破坏酶蛋白表面赖氨酸残基基础上开发新的交联策略对提高 RDAE-CLEAs 应用潜力具有积极意义。

关键词: D-阿洛酮糖-3-差向异构酶, 无载体固定化, 交联酶聚集体, 酶学性质, 分子模拟
中图分类号: Q814.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)07−0169−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020268
本文网刊:

Preparation and Properties Analysis of D-Allulose-3-Epimerase Cross-linked Enzyme Aggregates

QIU Ronghui[1,2], LI Ziyi[1,2], LI Jiao[2], WANG Depei[1], ZENG Yan[2,*], SUN Yuanxia[2]
（1.College of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2.National Engineering Research Center for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China）

Abstract: This study aimed to immobilize D-allulose 3-epimerase from *Ruminococcus* sp. (RDAE) using cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) technology. The immobilized enzyme (RDAE-CLEA) was prepared by optimizing the precipitant polyethylene glycol (PEG4000) concentration, cross-linker dextran aldehyde concentration, and cross-linking time. The enzymatic properties of the free enzyme (RDAE) and the immobilized enzyme (RDAE-CLEAs) were comparatively evaluated. Furthermore, the structural changes in RDAE before and after immobilization were analyzed using scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, and molecular dynamics simulations. In the absence of stabilizers, the RDAE-CLEAs prepared with 36% (w/v) PEG4000 and 2.73 mg/mL dextran aldehyde at 4 h achieved an enzyme activity recovery rate of 55.88%. Compared with the free enzyme, the immobilized enzyme exhibited siginificantly

收稿日期: 2025−03−03
基金项目: 国家重点研发计划（2022YFC2104900）; 山东省重点研发计划项目（2023CXGC010714）; 合成生物学海河实验室重大攻关项目（22HHSWSS00003）。
作者简介: 邱荣慧（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物工程, E-mail: 2296750447@qq.com。
*** 通信作者:** 曾艳（1982−）, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 功能糖与天然活性物质生物制造, E-mail: zeng_y@tib.cas.cn。

improved environmental tolerance (P<0.05) at pH6.0~7.5 and 30~55 ℃, retaining 59.77% initial activity after 10 reuse cycles. Structural analysis revealed that RDAE underwent significant conformational changes during cross-linking, and the binding tightness between subunits in the enzyme tetramer was reduced. The study developed RDAE-CLEAs with good reusability and elucidated the dual role of surface lysine residues in both facilitating covalent cross-linking and maintaining the rigidity of the tetrameric structure of RDAE. Considering the critical impact of tetramer rigidity on the thermal stability of RDAE, developing novel cross-linking strategies that preserve lysine residues on the enzyme surface would substantially improve the application potential of RDAE-CLEAs.

Key words: D-allulose-3-epimerase; carrier-free immobilization; cross-linked enzyme aggregates; enzymatic properties; molecular simulation

D-阿洛酮糖是 D-果糖的 C3 差向异构体，其甜度约为蔗糖的 70%，热量仅为 0.4 kcal/g。D-阿洛酮糖不仅口感接近蔗糖，容积、冰点和褐变能力等物理特性与蔗糖相似，同时具有预防肥胖、抗炎、抗高血脂、抗高血糖、抗氧自由基、保护神经等多种生理功能[1−2]。作为理想的蔗糖替代品，D-阿洛酮糖已通过美国、澳大利亚、新西兰、日本、韩国批准应用于食品[1]。目前，D-阿洛酮糖主要通过 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶（D-allulose 3-epimerase, DAE）催化 D-果糖发生 C-3 差向异构化获得[2−3]。2023 年，我国卫健委批准瘤胃球菌 *Ruminococcus* sp.来源的 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶（D-allulose 3-epimerase from *Ruminococcus* sp., RDAE）成为食品加工用酶制剂[4]，被食品行业视为 D-阿洛酮糖未来可能获得国内应用许可的重要信号。

酶固定化技术有助于提升酶的稳定性及其对环境因素的耐受能力，同时固定化酶具备良好的可回收性和重复使用性，因此在酶工程研究领域备受关注。近年来，为提高 D-阿洛酮糖的酶法合成效率，除壳聚糖、海藻酸钠、离子树脂外，硅基载体[5−6]、金属有机材料骨架[7]、磁性复合粒子[8] 等新型材料以及仿生矿化[9−10]、SpyTag/SpyCatcher 体系共价连接[11] 等自组装固定化策略纷纷被用于 DAE 固定化。无载体固定化酶技术交联酶聚集体（cross-linked enzyme aggregates, CLEAs），通常利用交联剂所含醛基与酶蛋白沉淀聚集体表面的游离氨基发生反应形成水不溶性聚合物实现酶固定化，与上述载体固定化技术相比不需要对酶进行纯化，具有操作简单、成本低廉、单位质量酶活高等优点，已广泛应用于食品、医药、化工等领域[12−13]。然而，目前尚未有利用 CLEAs 技术固定 DAE 的研究报道。同时，CLEAs（交联酶聚集体）技术的研究主要集中于制备工艺的优化，旨在获得具有适宜粒径和较高催化性能的固定化酶，提高其在制备与应用过程中的操作稳定性，并改善底物传质效率，以满足大规模生产的需求。然而，关于 CLEAs 制备过程中酶蛋白结构变化与功能之间的关联机制，相关研究仍较为有限，缺乏深入解析[14]。

尽管 RDAE 的晶体结构尚未解析，AlphaFold2 系统预测其以同源四聚体形式存在。每个亚基含有 23 个赖氨酸残基，其中 2 个位于蛋白质内部（溶剂可及表面积<20Å^2）[15]，其余 21 个分布于酶分子表面，为 CLEAs 的制备提供了丰富的交联位点。此外，该酶的四聚体结构特征为研究 CLEAs 技术对酶结构-功能关系的影响提供了独特的结构基础和视角。因此，本研究拟采用 CLEAs 技术对 RDAE 进行固定，考察沉淀和交联条件对所获得的 RDAE-CLEAs 酶活性回收率的影响；对 RDAE 与 RDAE-CLEAs 的酶学性质与结构特征进行比较分析，同时通过分子动力学模拟分析 CLEAs 技术应用对 RDAE 结构稳定性的影响机理，以期为 CLEAs 酶固定化技术与 DAE 的固定化方法发展提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

RDAE 重组表达大肠杆菌　本实验室保藏；葡聚糖（分子量 150 kDa）、高碘酸钠（分析纯）　上海麦克林生化科技有限公司；聚乙二醇 PEG4000、二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒（BC0020）　北京索莱宝科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

DHP-9082 恒温振荡培养箱、DK-8D 型电热恒温水槽　上海一恒科学仪器有限公司；ScienTZ-11D 超声波细胞粉碎机　宁波新芝生物科技股份有限公司；PB-10 型 pH 计　德国赛多利斯股份有限公司；Agilent 1200 Series 高效液相色谱　安捷伦科技（中国）有限公司；SU 1510 冷场发射扫描电镜　日本株式会社日立公司；Thermo IS5 型傅里叶变换红外光谱仪　美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 RDAE 粗酶制备　将 RDAE 重组表达大肠杆菌以 1% 接种量接种 LB 培养基（含 100 μg/mL 氨苄）中，在 37 ℃、200 r/min 下培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8，添加终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG，16 ℃、200 r/min 下诱导培养 18 h。将获得的菌液在 6000 r/min 下离心 10 min，去除发酵上清液，用 50 mmol/L、pH7.5 PBS 缓冲液重悬菌体，使用高压均质破碎机在 810 bar 破碎，所得破碎液在 14000 r/min 下离心 30 min，将所得的上清液分装−80 ℃ 下保存，即为固定所需的粗酶液。

1.2.2 葡聚糖醛的制备　参考李彦洁等[16] 方法，将 1.65 g 葡聚糖和 3.85 g 高碘酸钠溶于 50 mL 蒸馏水中，30 ℃、220 r/min 下搅拌反应 1.5 h。置于截留分子量 1 kDa 的透析袋中透析 24 h，中途换水 3~4 次，

去除残余的高碘酸钠，冷冻干燥后备用。

1.2.3　RDAE 交联酶聚集体（RDAE-CLEAs）制备　取 100 μL 的 RDAE 粗酶液（蛋白浓度 40 mg/mL），在 4 ℃、低速搅拌下缓慢加入 900 μL 沉淀剂（使用 50 mmol/L、pH7.5 PBS 缓冲液配制的 PEG4000 溶液），低速搅拌 1 h 后，加入 100 μL 交联剂葡聚糖醛，继续搅拌进行交联。交联反应结束后，4 ℃、10000 r/min 离心 5 min 分离收集沉淀物，用 50 mmol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液重悬洗涤离心 3 次，获得交联酶聚集体。

1.2.4　RDAE 交联酶聚集体（RDAE-CLEAs）制备条件优化

1.2.4.1　沉降条件优化　按照 1.2.3 的方法，取 100 μL 的 RDAE 粗酶液（蛋白浓度 40 mg/mL），分别加入 900 μL 质量分数为 10%、20%、30%、40% 和 50% 的 PEG4000 溶液，使体系最终质量分数达到 9%~45%，用于酶蛋白沉淀。搅拌 1 h 后，4 ℃、10000 r/min 离心 5 min 分离收集沉淀物，使用 1 mL 的 10 mmol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液溶解沉淀，采用二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度计算酶回收率。

$$\text{酶回收率}(\%) = \frac{\text{沉淀酶蛋白量}}{\text{加入酶蛋白量}} \times 100$$

1.2.4.2　交联剂用量优化　按照 1.2.3 的方法，使用 900 μL 质量分数 40% 的 PEG4000 溶液沉淀 100 μL 的 RDAE 粗酶液（蛋白浓度 40 mg/mL），搅拌 1 h 后，分别加入 100 μL 的 10、20、30、40、50 mg/mL 葡聚糖醛至终浓度为 0.83~4.55 mg/mL，继续搅拌 6 h 进行交联。交联反应结束后 4 ℃、10000 r/min 离心 5 min 分离收集沉淀物，用 10 mmol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液重悬洗涤离心 3 次，测定形成的交联酶聚集体的酶活保留率。

$$\text{酶活保留率}(\%) = \frac{\text{交联后酶活力}}{\text{原始粗酶液活力}} \times 100$$

1.2.4.3　交联时间优化　取 100 μL 的 RDAE 粗酶液（蛋白浓度 40 mg/mL），在 4 ℃、低速搅拌下缓慢加入 900 μL 使用 50 mmol/L、pH7.5 PBS 缓冲液配制的质量分数 40% 的 PEG4000 溶液，搅拌 1 h 后，加入 100 μL 的 30 mg/mL 的葡聚糖醛，在交联反应进行 2、4、6、8、10 h 时取样，离心、洗涤后测定形成的交联酶聚集体酶保活留率。

1.2.5　酶活力测定　使用含 250 g/L D-果糖、适量游离酶（粗酶液）或交联酶聚集体、10 mmol/L PBS 缓冲液（pH7.5）和 1 mmol/L Mn^{2+}的催化体系测定酶活性，反应温度为 55 ℃，反应时间为 10 min。一个酶活力单位（U）定义为在 55 ℃ 和 pH7.5 条件下，每单位时间（1 min）产生 1 μmol D-阿洛酮糖。D-阿洛酮糖的含量采用高效液相色谱仪测定。色谱条件：色谱柱：Waters Sugar-PakTM 色谱柱（10 μm, 6.5 mm×300 mm），柱温：80 ℃，检测器：示差检测器。流动相：超纯水，流速为 0.4 mL/min。根据 D-阿洛酮糖的吸收峰面积和标准样品的峰面积计算相应糖样的含量。

1.2.6　酶学性质分析　分别在 30、40、50、55、60、70、80 ℃ 水浴中测定游离酶与交联酶聚集体的酶活力，以最高酶活力为 100%，计算相对酶活，确定最适温度。分别在 10 mmol/L、pH 为 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 的缓冲溶液中测定游离酶与交联酶聚集体的酶活力，以最高酶活力为 100%，计算相对酶活，确定最适 pH。将游离酶和交联酶聚集体置于 10 mmol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液中，55 ℃ 下保温不同时间（0~24 h）后，测定剩余酶活力，以最高酶活力为 100%，计算相对酶活，确定温度稳定性。

1.2.7　重复使用性测试　在 55 ℃ 和 pH7.5 条件下测定交联酶聚集体的酶活力，反应结束后离心回收交联酶聚集体，将回收的交联酶聚集体用 10 mmol/L、pH7.5 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次，继续反应。连续重复 10 次，设定第一次测试的酶活力为 100%，计算不同重复次数下的相对酶活（%）。

1.2.8　扫描电镜观察　使用导电胶将冷冻干燥的交联酶聚集体固定于电镜样品台上，在真空蒸发器中进行表面喷金处理后，采用冷场发射扫描电镜（SEM）观察样品表面形貌特征。

1.2.9　红外光谱　将冷冻干燥的游离酶与交联酶聚集体分别与溴化钾按 1∶50（w/w）的比例混合，研磨均匀后压片采集红外光谱。测试条件为扫描波数 500~4000 cm^{-1}，分辨率 4 cm^{-1}，扫描次数 48 次。使用 Peakfit 软件归属拟合游离酶与交联酶聚集体位于 1220~1330 cm^{-1} 的酰胺Ⅲ带各子峰与二级结构的对应关系，进行定量分析。

1.2.10　分子动力学模拟　利用 AlphaFold2（https://alphafoldserver.com/）构建获得 RDAE（GenBank 登录号：MBS6425357.1）的三维立体结构，利用 Chem3D v19.0 软件（PerkinElmer Inc., 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆市）获得交联剂葡聚糖醛的立体结构，随后利用薛定谔软件程序将葡聚糖醛配体对接到蛋白表面的赖氨酸残基位点，生成 RDAE-CLEAs 复合物结构[17−18]。采用 Amber 18 软件（University of California, 美国旧金山）的 GAFF2 小分子力场和 Amber ff14SB 蛋白质力场[19−21]，对 RDAE 和 RDAE-CLEAs 对接前后的体系进行 100 ns 的分子动力学模拟。系统置于 10Å的正六面体的 TIP3P 水模型中。加入 Na^+和 Cl^-使体系保持电中性。首先对体系进行能量最小化（1000 步最陡下降算法优化和 1000 步共轭梯度算法优化），然后将体系在 100 ps 内缓慢从 0 K 升温至 328 K。随后，在 328 K 的恒温温度和 1.0 atm 的压力下，将系统保持 50 ps 的密度平衡。将系统进一步平衡 10 ns，以获得稳定的压力和温度。最终，在 328 K、1.0 atm 的压力下，每个系

统进行 100 ns 的最终模拟。模拟中的非键作用的截断半径为 10Å, 采用 particle mesh Ewald(PME)方法处理长程静电相互作用, 采用 SHAKE 算法对氢键进行限制[22−23]。采用 VMD 软件(https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/)进行轨迹分析, 使用 Pymol 软件(Schrödinger, LLC, 美国纽约)对模型进行可视化。

1.3 数据处理

交联酶聚集体制备及其酶学性质测试实验设置 3 个平行, 结果以平均值±标准差表示。数据使用 SPSS 22.0 软件处理, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 并通过 Tukey's 检验进行事后多重比较, $P<0.05$ 为有显著性差异, 图像使用 Microsoft Office Excel 2021 绘制。

2 结果与分析

2.1 RDAE-CLEAs 制备优化

交联酶聚集体的制备包括酶蛋白沉淀和酶聚集体交联两个步骤。在酶蛋白沉淀中, 合适的沉淀剂不仅能高效地促使酶蛋白析出, 并且不会引入对酶活性有害的杂质。文献报道聚乙二醇能够有效促进蛋白沉淀保留酶活性, 并已应用于 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶纯化[24−25], 因此, 研究采用不同浓度的聚乙二醇 PEG4000 沉淀 RDAE, 测定所获得的蛋白聚集体的酶回收率。图 1a 为 AlphaFold2 模拟的 RDAE 结构。发现加入终质量分数 27%~45% 的 PEG4000, 蛋白溶液出现明显的浑浊现象。加入终质量分数 36% 的 PEG4000 进行蛋白沉淀时酶回收率最高, 为 41.93%(图 1b), 酶活保留率为 91.87%。这一结果与 Chen 等[26] 使用 PEG4000 沉淀蔗糖异构酶达到 46% 的酶回收率相似。说明非离子型直链大分子 PEG4000 可通过空间排斥效应和长链缠绕作用, 有效破坏蛋白质表面的水化层, 促进 RDAE 四聚体蛋白沉淀。然而, 过高浓度的 PEG4000 会显著增加溶液黏度, 影响混匀、离心及分离等操作步骤, 降低了蛋白沉淀的酶回收率。

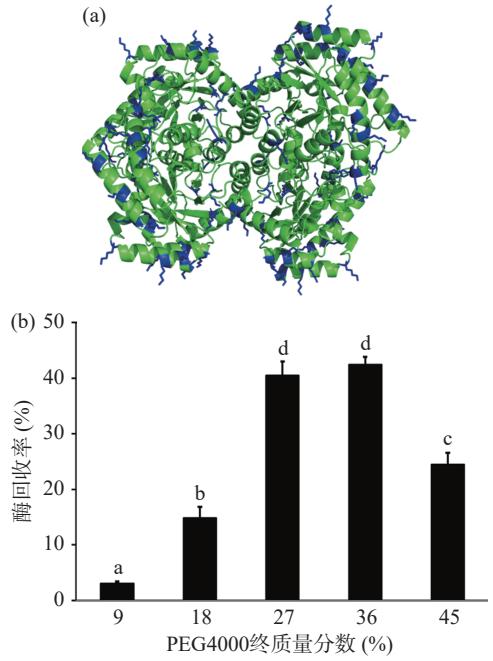


图 1 RDAE 的结构模拟及 PEG4000 终质量分数对 RDAE 蛋白沉淀回收影响

Fig.1 Predicted structure of RDAE and the effect of PEG4000 concentration on the recovery of RDAE in protein precipitation

注: (a)AlphaFold2 模拟的 RDAE 结构(蓝色: 赖氨酸残基), (b)不同 PEG4000 终质量分数下的酶回收率。不同小写字母代表差异显著($P<0.05$), 图 2~图 3 同。

研究前期发现利用戊二醛作为交联剂制备的 RDAE 交联酶聚集体的酶活丧失严重, 因此, 在确定使用 40% 的 PEG4000 作为沉淀剂后, 选用有利于保持酶原有结构和性能的葡聚糖醛作为交联剂[27], 并对其用量与交联时间进行优化。如图 2a 所示, 随着葡聚糖醛浓度的增加, RDAE 交联后的酶活保留率相应增加。当葡聚糖醛终浓度为 2.73 mg/mL 时, RDAE 交联效果最好, 酶活保留率达到 43.29%。如果继续增加葡聚糖醛用量, 酶活保留率降低。进一步优化交联时间, 如图 2b 所示, 交联时间过短时, RDAE 交联不够充分, 得到的交联酶聚集体的固体量较少, 酶活保留率低。当交联时间为 4 h 时, RDAE 交联效果最好, 酶活保留率达到 55.88%。再继续增加交联时间, 酶活保留率下降。推测交联剂用量过高与交联时间过长导致酶的空间结构发生变化失活[28]。Chen 等[26] 以 PEG4000 作为沉淀剂、葡聚糖醛作为交联剂制备蔗糖异构酶 CLEAs 时, 添加牛血清白蛋白可显著提高酶活保留率, 从 19.5% 提高至 31.2%。类似地, Charoenwongpaiboon 等[29] 和 Shah 等[30] 也分别在果聚糖蔗糖酶与脂肪酶的 CLEAs 制

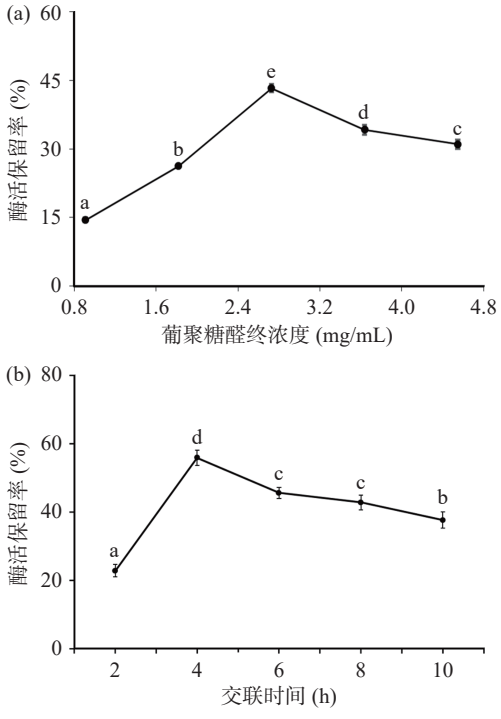


图 2 葡聚糖醛终浓度(a)与交联时间(b)对固定化酶 RDAE-CLEAs 酶活的影响

Fig.2 Effect of dextran aldehyde concentration (a) and cross-linking time (b) on the activity of RDAE-CLEAs

备中添加牛血清白蛋白作为稳定剂以补充氨基供体。相比之下, RDAE 在未添加外源蛋白的条件下亦能获得较高的酶活性保留率。推测原因在于 RDAE 含有较高比例的赖氨酸残基(摩尔含量达 7.9%), 且主要分布于酶分子表面, 这些残基不仅能作为有效的氨基供体, 与葡聚糖醛发生席夫碱反应形成共价键连接, 同时也有助于避免交联过程对酶活性中心产生干扰。

2.2　RDAE-CLEAs 酶学性质分析

如图 3a 与图 3b 所示, RDAE-CLEAs 的最适 pH 为 7.5, 最适温度为 60 ℃。在 pH6.0~7.5 与 30~55 ℃ 范围内, 其相对酶活均显著高于游离酶 RDAE (P<0.05)。这一特性与文献中报道的磷脂酶 D 交联酶聚集体相似, 后者在低 pH 条件下亦表现出较游离酶更佳的稳定性[31]。此外, 与固定在磁性二氧化硅基载体上的 DAE 相比[32], RDAE-CLEAs 在增强酸性耐受性的同时, 其碱性耐受性与游离酶相比无明显降低。在单糖生物转化过程中产生的非酶促副反应, 可在中温(30~55 ℃)及中性至弱酸性(pH6.0~7.0)条件下得到有效抑制[32−33]。RDAE-CLEAs 所展现的宽 pH 和温度适应性, 增强了其在不同 D-阿洛酮糖生物转化应用场景中的灵活性与适用性。55 ℃ 下温度稳定性测试结果表明, 游离酶与 RDAE-CLEAs 的酶活力随着保温时间延长逐渐降低, 在前 8 h 两者没有明显差异。但是继续延长保温时间, RDAE-CLEAs 的酶活力下降更加明显(图 3c)。说明与游离酶 RDAE 比较, 其交联酶聚集体 RDAE-CLEAs 在低 pH 与中温下的耐受性虽然有所提高, 温度稳定性却没有提高。de Freitas 等[34] 发现使用葡聚糖醛作为交联剂制备的 β-半乳糖苷酶交联聚集体在 60 ℃ 下的半衰期为 15.87 min, 低于游离酶的半衰期 22.24 min。此外, Kulkarni 等[35] 也发现其所制备的芳香酰胺酶的交联聚集体热稳定性低于游离酶, 推测这是由于交联酶聚集体中蛋白构象刚性发生变化所导致。

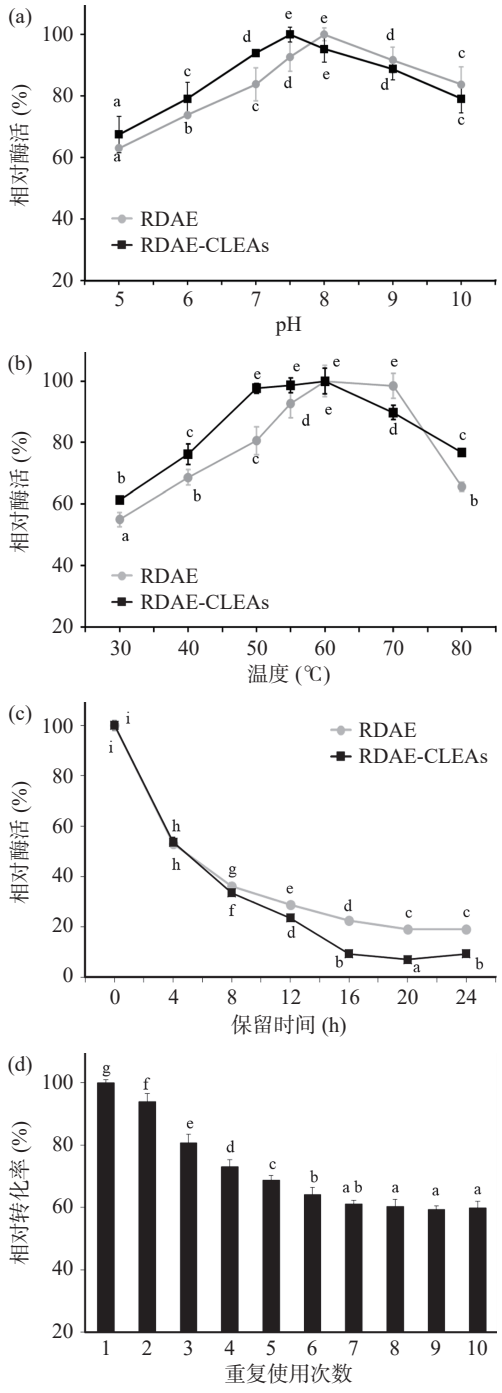


图 3　固定化酶 RDAE-CLEAs 酶学性质分析

Fig.3　Enzymatic properties of immobilized enzyme RDAE-CLEAs

注: (a)最适 pH; (b)最适温度; (c)温度稳定性; (d)重复使用性。

重复使用稳定性是衡量无载体固定化酶优劣的关键因素。如图 3d 所示, RDAE-CLEAs 显示出中等的使用稳定性, 其相对转化率随着使用次数增加而减小, 但重复使用 5 次后相对转化率趋向稳定, 循环 10 次后的相对转化率保持 59.77%, 优于分别用磁性金属-有机框架纳米粒子[36] 与二氧化钛纳米粒子固定的 DAE[37], 后两者重复使用 8 次后的相对转化率均低于 50%。

2.3　RDAE-CLEAs 结构表征研究

Schoevaart 等[38] 将 CLEAs 根据其微观形貌分为Ⅰ型和Ⅱ型两种典型结构。Ⅰ型呈规则球形, 具有较高的孔隙率, 有利于底物分子的扩散; Ⅱ型由于聚集方式较为松散, 形成不规则的大颗粒, 其内部结构较为致密, 孔隙较少。SEM 观察显示与表面平滑的游离酶不同, RDAE-CLEAs 具有粗糙、多孔的无定形结构, 呈典型的海绵状形态, 归类为Ⅱ型 CLEAs (图 4)。尽管传统观点认为Ⅰ型 CLEAs 由于其丰富的内部通道具有更优的传质效率, Wang 等[39] 在研究纤维二糖差向异构酶 CLEAs 时发现, 类似于 RDAE-CLEAs 的多层网络结构(Ⅱ型)能够促进底物与酶分子的有效接触, 表明在特定条件下Ⅱ型 CLEAs 仍能保持良好的传质性能。

红外光谱分析发现 RDAE-CLEAs 除包含来源于交联剂葡聚糖醛骨架位于 3400 cm^{-1} 的 O-H 伸缩振动峰与 1103 cm^{-1} 的葡萄糖残基 C-4 位置上

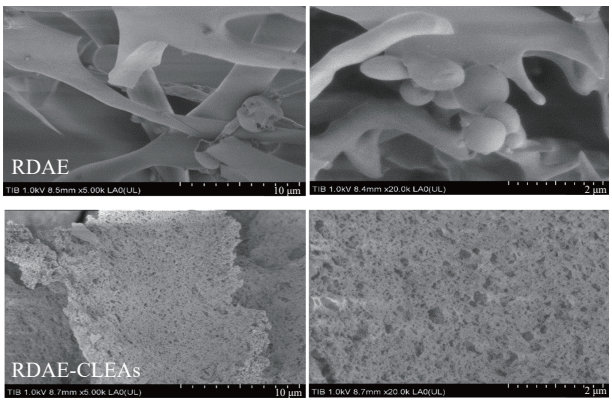


图 4　扫描电镜观察的 RDAE 与 RDAE-CLEAs 微观形貌

Fig.4　Microscopic morphology of RDAE and RDAE-CLEAs observed by SEM

C-O 键伸缩振动峰等信号[40]外，原酶蛋白位于 1650 cm^{-1} 的酰胺 I 带 C=O 伸缩振动峰向低波数方向移动至 1632 cm^{-1}，位于 1366 cm^{-1} 的 C-N 伸缩振动峰向低波数方向移动至 1362 cm^{-1}，并且吸收强度明显增加（图 5a），表明酶蛋白通过共价键合被葡聚糖醛有效交联[41−42]。

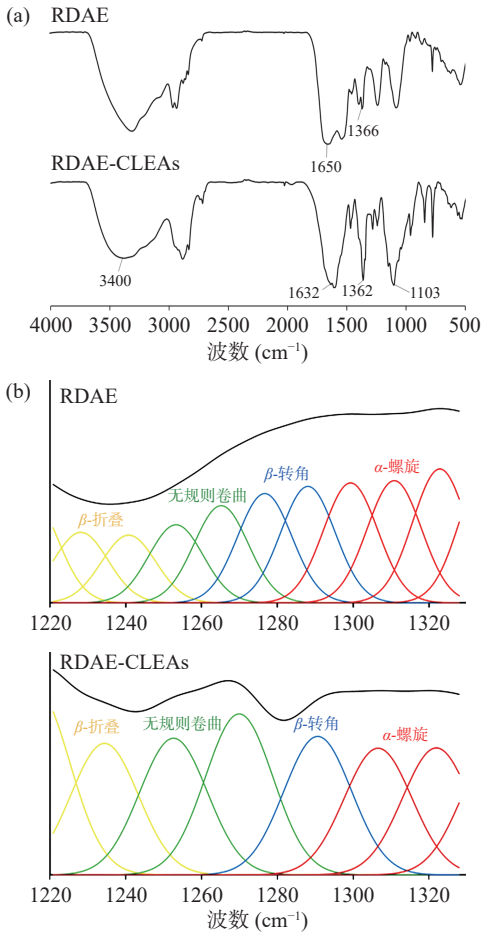


图 5　RDAE 与 RDAE-CLEAs 的红外光谱表征

Fig.5　Infrared spectroscopy characterization of RDAE and RDAE-CLEAs

注：(a)傅里叶红外光谱；(b)酰胺Ⅲ带拟合光谱分析。

进一步利用红外光谱考察 RDAE 与 RDAE-CLEAs 的蛋白质二级结构变化，由于水容易对 1600~1700 cm^{-1} 的蛋白质酰胺 I 带信号产生干扰[43]，选择位于 1220~1330 cm^{-1} 的蛋白质酰胺Ⅲ带信号通过 Peakfit 软件进行拟合表征[44]。如图 5b 所示，RDAE-CLEAs 中的 β-折叠（1220~1250 cm^{-1}）与无规则卷曲（1255~1270 cm^{-1}）较 RDAE 分别增长了 5.96% 与 12.62%，β 转角（1270~1295 cm^{-1}）与 α-螺旋（1295~1330 cm^{-1}）分别减少了 7.98% 与 10.60%。α-螺旋与 β-折叠作为蛋白质二级结构的主要形式，对蛋白质的热稳定性具有重要影响[45]。α-螺旋与 β-折叠含量显著变化说明在 RDAE-CLEAs 中酶蛋白原有的刚性结构被破坏，而无规卷曲含量的显著增加说明蛋白质的二级结构的随机性增强[46]，因此可能导致 RDAE-CLEAs 的热稳定性没有提升。

2.4　RDAE-CLEAs 的分子动力学模拟分析

为进一步解析 CLEAs 技术对 RDAE 蛋白结构及其热稳定性影响的作用机制，在红外光谱分析酶蛋白二级结构变化的基础上，对 RDAE 与 RDAE-CLEAs 三级结构进行分子动力学模拟分析。

在分子动力学模拟中，均方根偏差（Root Mean Square Deviation，RMSD）是衡量蛋白质分子结构变化程度的重要指标，温度因子（B-factor）反映蛋白质中各原子因热运动而发生的偏离程度，回转半径（Radius of Gyration，Rg）则用于描述体系的结构致密度。这三个参数能够反映分子的稳定性[47−49]。为探讨 RDAE-CLEAs 在热稳定性上未见提升的原因，利用分子动力学模拟分析了 RDAE 与 RDAE-CLEAs 中的 RMSD、B-factor 和 Rg 差异。如图 6a 所示，RDAE 的 RMSD 值略低于 RDAE-CLEAs，并且在 10 ns 左右开始收敛，逐渐保持稳定。对比 RDAE 与 RDAE-CLEAs 的 B-factor，发现在与交联剂分子结合的 RDAE-CLEAs 中，Loop1（E246-I261）、Loop2（W262-M276）以及 Loop3（W553-M567）的 B-factor 值较 RDAE 更高，表明这些区域的残基位置变化较大，柔性较强，可能对酶的稳定性不利（图 6b）。观察 RDAE 与 RDAE-CLEAs 体系中 Rg 的变化（图 6c），RDAE 的蛋白体积较为稳定，而 RDAE-CLEAs 中蛋白体积变化较大。说明在 RDAE-CLEAs 中，分子发生较大构象变化，结构较为松散。这一结果与红外光谱二级结构分析一致，说明表面赖氨酸残基在维持 RDAE 四聚体结构的稳定性中发挥关键作用。然而，在 RDAE-CLEAs 的制备过程中，这些赖氨酸残基与葡聚糖醛发生交联反应，破坏了四聚体的刚性结构，导致酶构象稳定性下降，固定化酶的热稳定性未有提高。这也表明，即使来自赖氨酸残基的游离氨基不位于酶的催化活性中心，其在维持蛋白质高级结构中仍可能发挥重要功能。因此，在 CLEAs 的交联过程中，应加强对酶蛋白整体结构的了解，谨慎调控非催化位点赖氨酸残基的参与程度，以避免对酶整体结构稳定性的破坏。

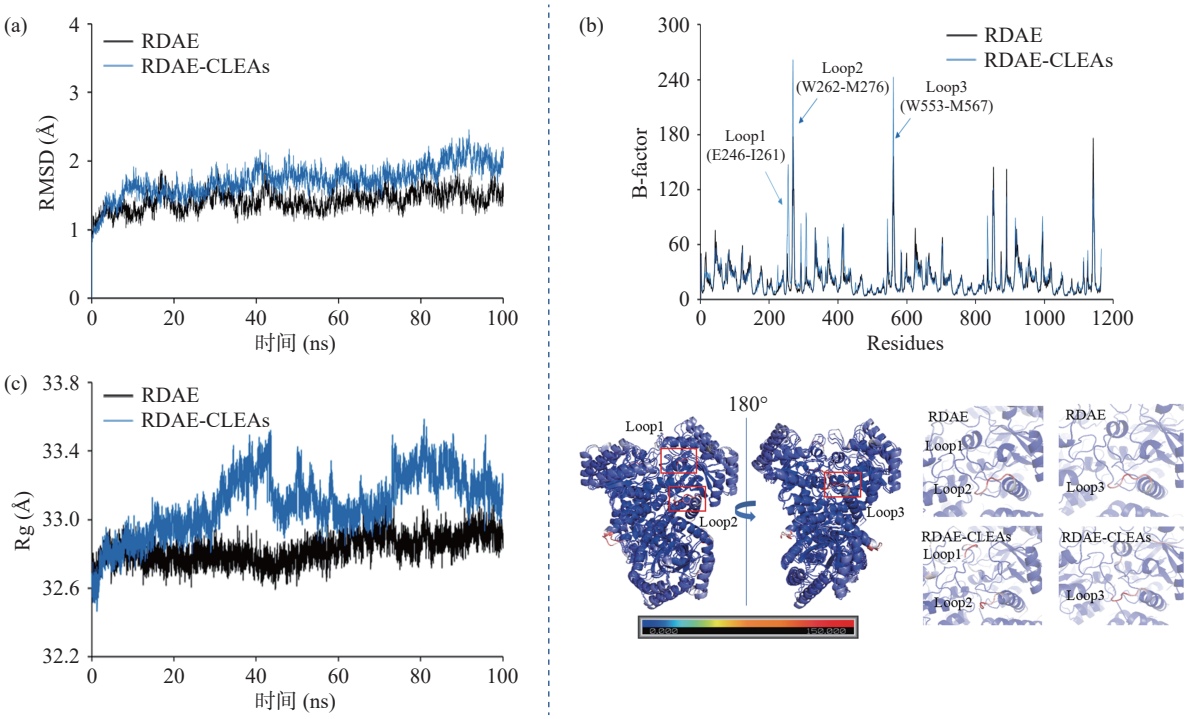


图 6　RDAE 与 RDAE-CLEAs 的分子动力学模拟分析

Fig.6　Molecular dynamics simulation of RDAE and RDAE-CLEAs

注：(a)RMSD 值；(b)B 因子值；(c)回转半径。

3　结论

研究采用 PEG4000 作为沉淀剂、葡聚糖醛作为交联剂，通过制备交联酶聚集体(CLEAs)的方法对 RDAE 进行固定化，并对沉淀剂浓度、交联剂用量与交联时间进行了优化。优化条件下制备的 RDAE-CLEAs 在弱酸性至中性 pH(6.0~7.5)与中温(30~55 ℃)条件下表现出优于游离酶的耐受性，且具有良好的重复使用性能。红外光谱分析和分子动力学模拟结果表明，RDAE 表面的赖氨酸残基与葡聚糖醛发生共价交联，破坏了酶蛋白的四聚体结构，导致 RDAE-CLEAs 的热稳定性未有提升。后续研究可以通过改变交联剂种类或交联方式，以减少对 RDAE 表面赖氨酸残基以及酶蛋白四聚体结构的破坏，从而改善 RDAE-CLEAs 的性能。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] HU M, LI M, JIANG B, et al. Bioproduction of D-allulose: Properties, applications, purification, and future perspectives[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(6): 6012−6026.

[2] ZHANG W, CHEN D, CHEN J, et al. D-allulose, a versatile rare sugar: Recent biotechnological advances and challenges[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(22): 5661−5679.

[3] XIE X, LI C, BAN X, et al. D-allulose 3-epimerase for low-calorie D-allulose synthesis: Microbial production, characterization, and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2024: 1−20.

[4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.《关于蓝莓花色苷等 14 种“三新食品”的公告》(2023 年第 3 号), 2023-05-06. [National Health Commission of the People's Republic of China. Announcement on 14 'New Food Ingredients', including blueberry anthocyanins, 2023-05-06.]

[5] XIAO Z, ZHAO Z, JIANG B, et al. Enhancing enzyme immobilization: Fabrication of biosilica-based organic-inorganic composite carriers for efficient covalent binding of D-allulose 3-epimerase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 265: 130980.

[6] XIAO Z, ZHANG R, XIANG L, et al. Functionalized mesoporous biosilica for immobilizing D-allulose 3-epimerase: A multienzyme cascade strategy for calorie reduction in fruit tea drinks[J]. Food Bioscience, 2024, 62: 105331.

[7] LI Z, LIU T, PEI W, et al. Immobilization of a novel D-allulose 3-epimerase from *Bacillus cihuensis* within metal-organic frameworks[J]. Food Bioscience, 2024, 59: 104202.

[8] XIAO Z, JIANG B, XIANG L, et al. Tailored magnetic silica-immobilized D-allulose 3-epimerase with enhanced stability and recyclability for efficient D-allulose production[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 284: 137896.

[9] TANG H, CHEN Y, FAN D, et al. Designable immobilization of D-allulose 3-epimerase on bimetallic organic frameworks based on metal ion compatibility for enhanced D-allulose production[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 273: 133027.

[10] GAO X, FANG S, MA X, et al. Customized self-assembled bimetallic hybrid nanoflowers promoting the robustness of D-allulose 3-epimerase[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 484: 149453.

[11] GAO X, WEI C, QI H, et al. Directional immobilization of D-allulose 3-epimerase using SpyTag/SpyCatcher strategy as a ro-

bust biocatalyst for synthesizing D-allulose[J]. Food Chemistry, 2023, 401: 134199.
[12] CHEN N, CHANG B, SHI N, et al. Cross-linked enzyme aggregates immobilization: preparation, characterization, and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(3): 369−383.
[13] COSTA I O, MORAIS J R F, de MEDEIROS D J M, et al. Enzyme immobilization technology as a tool to innovate in the production of biofuels: a special review of the cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) strategy[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 117: 110300.
[14] 陈翠翠, 何腊平, 郑佳, 等. 交联酶聚集体性能改善研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 298−303,308. [CHEN C, HE L, ZHENG J, et al. Research progress of cross-linked enzyme aggregates improvement[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(22): 298−303,308.]
[15] GOVERDE C A, PACESA M, GOLDBACH N, et al. Computational design of soluble and functional membrane protein analogues[J]. Nature, 2024, 631: 449−458.
[16] 李彦洁, 高静, 姜艳军, 等. 过氧化酶与葡萄糖氧化酶复合交联酶聚集体的制备与应用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(17): 1−7. [LI Y, GAO J, JIANG Y, et al. Preparation and application of combi-CLEAs of unspecific peroxygenase and glucose oxidase[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(17): 1−7.]
[17] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with alpha fold[J]. Nature, 2021, 596(7873): 583−589.
[18] FRIESNER R A, BANKS J L, MURPHY R B, et al. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2004, 47(7): 1739−1749.
[19] JAKALIAN A, BUSH B L, JACK D B, et al. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method[J]. Journal of Computational Chemistry, 2000, 21(2): 132−146.
[20] MAIER J A, MARTINEZ C, KASAVAJHALA K, et al. Ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB[J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2015, 11(8): 3696−3713.
[21] WANG J, WOLF R M, CALDWELL J W, et al. Development and testing of a general amber force field[J]. Journal of Computational Chemistry, 2004, 25(9): 1157−1174.
[22] RYCKAERT J P, CICCOTTI G, BERENDSEN H J C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes[J]. Journal of Computational Physics, 1977, 23(3): 327−341.
[23] ESSMANN U, PERERA L, BERKOWITZ M L, et al. A smooth particle mesh Ewald method[J]. The Journal of Chemical Physics, 1995, 103(19): 8577−8593.
[24] PONS ROYO M D, JUNGBAUER A. Polyethylene glycol precipitation: fundamentals and recent advances[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2025, 13: 1−20.
[25] YOSHIHARA A, KOZAKAI T, SHINTANI T, et al. Purification and characterization of D-allulose 3-epimerase derived from *Arthrobacter globiformis* M30, a GRAS microorganism[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(2): 170−176.
[26] CHEN N, CHANG B, SHI N, et al. Robust and recyclable cross-linked enzyme aggregates of sucrose isomerase for isomaltulose production[J]. Food Chemistry, 2023, 399: 134000.
[27] TACIAS-PASCACIO V G, ORTIZ C, RUEDA N, et al. Dextran aldehyde in biocatalysis: More than a mere immobilization system[J]. Catalysts, 2019, 9(7): 622.
[28] 吴春玲, 李璠, 马超, 等. 酸性木聚糖酶交联酶聚集体的制备条件优化[J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(5): 48−54. [WU C, LI F, MA C, et al. , Optimizing preparation conditions of cross-linked acid-stable xylanase aggregates[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 34(5): 48−54.]
[29] CHAROENWONGPAIBOON T, WANGPAIBOON K, PICHYANGKURA R. Cross-linked levansucrase aggregates for fructooligosaccharide synthesis in fruit juices[J]. LWT, 2021, 150: 112080.
[30] SHAH S, SHARMA A, GUPTA M N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder[J]. Analytical Biochemistry, 2006, 351(2): 207−213.
[31] 陈宁, 延文星, 路福平, 等. 磷脂酶 D 交联聚集体的制备及其酶学性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5): 1−7. [CHEN N, YAN W X, LU F P, et al. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates of phosphorlipase D[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(5): 1−7.]
[32] JIA D X, SUN C Y, JIN Y T, et al. Properties of D-allulose 3-epimerase mined from *Novibacillus thermophilus* and its application to synthesis of D-allulose[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 148: 109816.
[33] HAI A, ALYAMMAHI J, BHARATH G, et al. Extraction of nutritious sugar by cell membrane permeabilization and electroporation of biomass using a moderate electric field: Parametric optimization and kinetic modeling[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2024, 14(16): 19187−19202.
[34] de FREITAS L A, DE SOUSA M, RIBEIRO L B, et al. Magnetic CLEAs of *β*-galactosidase from *Aspergillus oryzae* as a potential biocatalyst to produce tagatose from lactose[J]. Catalysts, 2023, 13(2): 306.
[35] KULKARNI N H, MULEY A B, BEDADE D K, et al. Cross-linked enzyme aggregates of arylamidase from *Cupriavidus oxalaticus* ICTDB921: Process optimization, characterization, and application for mitigation of acrylamide in industrial wastewater[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43: 457−471.
[36] XUE K, LIU C L, YANG Y, et al. Immobilization of D-allulose 3-epimerase into magnetic metal-organic framework nanoparticles for efficient biocatalysis[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(8): 144.
[37] DEDANIA S R, PATEL V K, SONI S S, et al. Immobilization of *Agrobacterium tumefaciens* D-psicose 3-epimerase onto titanium dioxide for bioconversion of rare sugar[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 140: 109605.
[38] SCHOEVAART R, WOLBERS M W, GOLUBOVIC M, et al. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 87(6): 754−762.
[39] WANG M, WANG H, FENG Y, et al. Preparation and characterization of sugar-assisted cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of recombinant cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(29): 7712−7721.
[40] PURAMA R K, GOSWAMI P, KHAN A T, et al. Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(1): 30−35.
[41] YIP Y S, MANAS N H, JAAFAR N R, et al. Combined

cross-linked enzyme aggregates of cyclodextrin glucanotransferase and maltogenic amylase from *Bacillus lehensis* G1 for maltooligosaccharides synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242: 124675.

[42] LIU X, ZHENG H, LI Y, et al. A novel bacterial cellulose aerogel modified with PGMA via ARGET ATRP method for catalase immobilization[J]. Fibers and Polymers, 2019, 20: 520−526.

[43] 谢孟峡, 刘媛. 红外光谱酰胺Ⅲ带用于蛋白质二级结构的测定研究[J]. 高等学校化学学报, 2003(2): 226−231. [XIE M X, LIU Y. Studies on amide Ⅲ infrared bands for the secondary structure determination of proteins[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2003(2): 226−231.]

[44] LI T, GONG X, YANG G, et al. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of cellulase with improved catalytic activity, adaptability and reusability[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2022, 45(5): 865−875.

[45] RAHBAN M, ZOLGHADRI S, SALEHI N, et al. Thermal stability enhancement: Fundamental concepts of protein engineering strategies to manipulate the flexible structure[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 214: 642−654.

[46] LI H, TAN X, XIA X, et al. Improvement of thermal stability of oyster (*Crassostrea gigas*) ferritin by point mutation[J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128879.

[47] CHI H, WANG Y, XIA B, et al. Enhanced thermostability and molecular insights for L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* via structure-and computation-based rational design[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(45): 14499−14509.

[48] ZHANG W, DAI Q, HUANG Z, et al. Identification and thermostability modification of the mesophilic L-asparaginase from *Limosilacobacillus secaliphilus*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2024, 196(6): 3387−3401.

[49] SHI H, FU M, ZHANG T, et al. Rational design of formate dehydrogenase for enhanced thermal stability and catalytic activity in bioelectrocatalysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(42): 23333−23344.