

铽基金属有机框架材料对过氧化氢酶的固定化及其性能评价

孙烨琳, 何 义, 李 杰, 张维冰, 张 磊*
(华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237)

摘要:开发了一种在铽基金属有机框架材料(Tb-MOF)中封装过氧化氢酶(CAT)制备固定化酶材料(CAT@Tb-MOF)的方法,制备的固定化酶材料负载量高达 302.3 mg/g。采用紫外-可见分光光度法和电子顺磁共振波谱法(EPR)对封装后的过氧化氢酶活性加以评价,结果发现其酶活保留率达 90%以上,且具有良好的环境适应性和重复使用性。MOFs 材料在生长过程中直接将酶包覆在其中,具有条件温和以及操作便捷的特点。在固定化过程中酶结构保持稳定,因此可以良好地保持酶活性,同时 MOFs 材料提供的微环境也保证了酶的环境适应性。在 80°C 下剩余酶活为 92.6%;经过 10 次循环使用后,固定化酶活性仍能保持在 90%;经过 50 d 贮藏,固定化酶活性仍保持在 50%左右。该方法所制备的固定化酶材料具有良好的稳定性,在工业应用领域具有广阔的应用潜力。

关键词:过氧化氢酶;固定化酶;金属有机框架材料;电子顺磁共振波谱

中图分类号:TQ426.97

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2025)07-0160-07

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2025.07.026

Immobilization of catalase by terbium-based metal organic frameworks and evaluation on its performance

SUN Ye-lin, HE Yi, LI Jie, ZHANG Wei-bing, ZHANG Lei*

(School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: A method is developed for encapsulating catalase (CAT) in terbium-based metal organic framework (Tb-MOF) materials to prepare an immobilized catalase material (CAT@Tb-MOF). The loading capacity of the immobilized catalase material reaches as high as 302.3 mg/g. The activity of catalase encapsulated is evaluated by means of UV-visible spectrophotometry and electron paramagnetic resonance spectroscopy, respectively. It is indicated that the retention rate of catalase activity exceeds 90%, and the material has good environmental adaptability and reusability. MOFs materials encapsulate catalase directly during the growth process, which has the characteristics of mild conditions and convenient operation. The catalase remains stable structure in the immobilization process, so the activity of catalase can be maintained well while the microenvironment provided by MOFs materials also ensures the environmental adaptability of the catalase. The remaining activity of catalase is 92.6% at 80°C. The activity of immobilized catalase still maintains at 90% after 10 cycles, and at about 50% after 50 days of storage. The prepared CAT@Tb-MOF has good stability, showing broad application potential in the field of industrial application.

Key words: catalase; immobilized enzyme; MOFs; electron paramagnetic resonance spectroscopy

固定化酶技术通过物理或化学方法将游离酶固定或限制于一定区域内,在保持其催化活性的同时,也能够提高酶的稳定性和重复使用性,已经在化工、生命科学等领域得到广泛应用^[1-2]。金属有机框架材料(MOFs)是由金属离子与有机配体通过配位作用形成的多孔骨架材料,具有规则的多孔、比表面积大等诸多优点,将其用作酶的固定化基质可以充分展示 MOFs 与酶两者的优势,更好地实现固定化酶的催化功能^[3-6]。原位合成法作为 MOFs 固定

化酶的一种重要手段,与合成后固定的方法相比,在保持酶活、防止酶的泄露等方面具有明显优势^[7]。

铽基 MOFs 材料的合成条件温和,在溶液中具有良好的分散性和稳定性,已经被应用于酶的固定化研究,且制备得到的固定化酶材料具有高的酶活性和稳定性。Mehta 等^[8]通过 EDC-NHS 碳二亚胺交联介导有机磷酸水解酶(OPH₆His)与有机连接子(BTC)之间的酰胺键连接实现 Tb-MOF 中酶的包埋,并用于有机磷农药检测的研究,取得了较好的结

收稿日期:2024-09-24;修回日期:2025-05-07

基金项目:国家重点研发计划(2021YFF0701900);上海市重点实验室经费(JKJ01241717)

作者简介:孙烨琳(2000-),女,硕士生,研究方向为固定化酶,yezilinin@163.com;张磊(1984-),男,博士,高级工程师,研究方向为固定化酶,通讯联系人,leizhang595@ecust.edu.cn。

果。Gong等^[9]先合成了Tb@mesoMOF,后将微过氧化物酶(MP-11)稳定封装在Tb@mesoMOF内,实现对H₂O₂的灵敏检测。过氧化氢酶(CAT)是一种常用的生物酶,其稳定性较差,对环境的敏感性也较强,现已有多种过氧化氢酶的固定化方法被研究开发^[10-14]。Liao等^[15]通过原位合成法将过氧化氢酶嵌入到ZIF-90中,增强了酶的稳定性,合成方法简便且在更广泛的条件下保持了过氧化氢酶的酶学性能。关于铽基金属有机框架材料应用于固定化酶的研究较少,目前报道的研究有通过交联剂连接酶与MOFs^[8],以及合成Tb-MOFs后进行封装的方法^[9]。

基于前期铽基金属有机框架材料的研究工作^[16-17],本研究将过氧化氢酶与铽基MOFs材料的合成单体一起加入到反应体系中,随着铽基MOFs材料的生长,酶被其表面吸附;随着铽基MOFs材料的进一步生长,酶被MOFs结构封装,得到固定化酶材料。采用紫外-可见分光光度法和电子顺磁共振波谱法对固定化酶活性进行评价,探究过氧化氢酶原位封装在Tb-MOF中方法的可行性及其对酶的影响。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

过氧化氢酶、二甲基吡啶N-氧化物(DMPO)、六水合硝酸铽[Tb(NO₃)₃·6H₂O,99.99%],购自上海麦克林生化科技股份有限公司;过氧化氢溶液(化学纯,30 wt%),购自国药集团化学试剂有限公司;牛血清白蛋白(BSA,98%),购自美国Sigma-Aldrich(St, Louis, MO)公司;均苯三甲酸(H₃BTC),购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

扫描电子显微镜(S-3400N,日本Hitachi公司生产);电子顺磁共振波谱仪(Bruker EMX-8/2.7型,X-波段,5 mm样品管,美国Norell公司生产);超纯水仪(Milli-Q,美国Millipore公司生产);傅里叶变换红外光谱仪(FI-IR 6700,美国Thermo Nicolet公司生产);紫外-可见分光光度计(UV,2550,日本Shimadzu公司生产);X射线粉末多晶衍射仪(XRD,日本RIGAKU公司生产)。

1.2 固定化过氧化氢酶的制备

1.2.1 Tb-MOF的制备

称取227 mg Tb(NO₃)₃·6H₂O溶于5 mL超纯水中,超声震荡5 min至溶解。再称取105 mg均苯三甲酸加入5 mL无水乙醇中,超声震荡至溶解。然

后将2种溶液混合在一起,放入磁力搅拌器中搅拌4 h后得到白色悬浊液。在8 000 r/min下离心10 min后收集所得到的白色沉淀,并用超纯水和无水乙醇分别洗涤3次后放入真空烘箱在50℃下干燥后得到所需样品Tb-MOF。

1.2.2 CAT@Tb-MOF的制备

称取75 mg过氧化氢酶溶于超纯水中,超声震荡至溶解,再将所得溶液加入按上述方法配制的均苯三甲酸乙醇溶液中,混合10 min后加入Tb(NO₃)₃水溶液,将混合溶液置于磁力搅拌器中轻轻搅拌4 h。将所得淡黄色悬浊液在8 000 r/min下离心10 min,得到淡黄色固体,收集上清液,并用超纯水洗涤所得固体材料3次,之后置于阴凉处晾干得到所需样品CAT@Tb-MOF。

1.3 CAT@Tb-MOF酶负载量测定

采用BCA蛋白定量试剂盒通过酶标仪测定离心后上清液中的酶浓度。以牛血清白蛋白为标准品测定标准曲线,进一步计算样品的酶负载量,如式(1):

$$\text{负载量}(\text{mg/g}) = [(m - m_1)/w] \times 100 \quad (1)$$

式中, w 为固定基质的重量,g; m 为负载前CAT的总量,mg; m_1 为负载后上清液中CAT的量,mg。

1.4 FOX试剂的配制

参考文献^[18]的方法,在10 mL 100 mmol/L的硫酸溶液中加入4.9 mg (NH₄)₂SO₄·FeSO₄·6H₂O,超声至溶解。之后分别称取910.85 mg D-山梨醇和3.36 mg二甲酚橙溶于一部分水中,将上述所得3种溶液混合,定容到50 mL,得到FOX试剂。

1.5 CAT与CAT@Tb-MOF的酶活测定

紫外-可见分光光度法:配制不同浓度的过氧化氢水溶液(0.02~0.1 mmol/L,pH=6.5),分别取150 μL加入2.85 mL FOX溶液,显色30 min后测量溶液在560 nm处的吸光度,绘制过氧化氢标准曲线。

称取一定量的过氧化氢酶溶于水中,配制成5 mg/mL的过氧化氢酶溶液备用;再称取含有与上述过氧化氢酶同等酶量的CAT@Tb-MOF溶于水中,配制成溶液备用;称取一定量Tb-MOF溶于水中配制成溶液备用。分别取上述3种溶液各100 μL加入2 mL含有H₂O₂的磷酸盐缓冲液中(0.06 mmol/L,pH=6.5),在常温下孵育30 min后离心,取150 μL上清液加入2.85 mL FOX溶液中,显色30 min后测量溶液在560 nm处的吸光度。

电子顺磁共振波谱法:按照上述方法配制过氧化氢酶溶液、CAT@Tb-MOF溶液以及Tb-MOF溶

液备用。分别取相同体积的 3 种溶液加入 1 mmol/L H_2O_2 溶液中,加入 pH=5.5 的磷酸盐缓冲液配制成 1 mL 溶液,在常温下孵育 45 min 后取反应后的溶液加入 2 μ L DMPO 进行电子顺磁共振波谱测试,每个样品平行测试 3 次,分别记录谱图的二次积分面积^[19-21]。根据标准曲线比对出反应后过氧化氢浓度,进行酶活计算。

在一定条件下,每分钟分解 1 μ mol H_2O_2 时所消耗的酶量定义为 1 个过氧化氢酶活性单位(U),按式(2)计算:

$$\text{酶活}(U/mg^{-1}) = [(c_0 - c_1) \times V] / (m_{\text{CAT}} \times t) \quad (2)$$

式中, c_0 为初始过氧化氢的浓度, μ mol/L; c_1 为反应结束时过氧化氢的浓度, μ mol/L; V 为反应液总体积,mL; m_{CAT} 为加入过氧化氢酶的质量,mg; t 为反应时间,min。

酶活回收率计算公式见式(3):

$$\text{酶活回收率}(\%) =$$

$$(\text{固定化酶总酶活} / \text{加入游离酶总酶活}) \times 100 \quad (3)$$

1.6 CAT 与 CAT@Tb-MOF 的动力学参数

配制不同浓度的 H_2O_2 溶液(0.01~0.06 mmol/L),在 25 $^{\circ}$ C、pH=6.5 的磷酸盐缓冲溶液中,分别加入含相同酶量的 CAT 和 CAT@Tb-MOF 溶液进行酶解反应,反应 30 min 后离心,取上清液 150 μ L 加入 2.85 mL FOX 试剂,显色 30 min 后测得溶液在 560 nm 处的吸光度。计算得到不同底物浓度溶液的初始反应速率,以底物浓度的倒数为横坐标,以初始反应速率的倒数为纵坐标作图,得到双倒数曲线,从而计算出动力学常数 K_m 与 V_m 。

1.7 最适反应条件及稳定性研究

配制 pH 为 2.5~11.5 的磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L),根据酶活测定步骤,在其他条件相同的情况下,测定不同 pH 下溶液在 560 nm 下的吸光度,以最高酶活为 100%,其他酶活以最高酶活的百分比表示,测定游离酶和固定化酶的最适反应 pH。表示方法同上,测定游离酶和固定化酶在 20~70 $^{\circ}$ C 的最适反应温度。

将一定量 CAT 及 CAT@Tb-MOF 分别放在 pH=2.5、3.5、10.5、11.5 的磷酸盐缓冲盐溶液中孵育 5 min,后加入 0.06 mmol/L H_2O_2 溶液,根据酶活测定步骤,保持其他条件相同,测定溶液在 560 nm 下的吸光度,以最适 pH 下酶活为 100%,测定游离酶及固定化酶溶液的剩余酶活,评价游离酶和固定化酶的酸碱稳定性。再将一定量 CAT 及 CAT@Tb-MOF 分别置于 80 $^{\circ}$ C 水浴锅里热处理 5 min,加入

0.06 mmol/L H_2O_2 溶液进行酶促反应,方法同上,以最适温度下的酶活为 100%,测定游离酶及固定化酶溶液的剩余酶活,评价游离酶和固定化酶的热稳定性。在 4 $^{\circ}$ C 下将一定量 CAT@Tb-MOF 储存 10、20、30、50 d,置于 0.06 mmol/L H_2O_2 溶液中进行酶促反应,根据酶活测定步骤,保持其他条件相同,测定溶液在 560 nm 下的吸光度,以初始酶活为 100%,测定固定化酶溶液的剩余酶活,研究固定化酶的贮藏稳定性。

1.8 CAT@Tb-MOF 的重复使用性

取固定化过氧化氢酶 CAT@Tb-MOF 加入 H_2O_2 溶液进行酶促反应,反应 30 min 后离心分离固定化酶,用超纯水清洗 3 次后重新分散于 H_2O_2 溶液中进行反应,重复上述步骤。通过 FOX 法测定反应液中剩余的过氧化氢,计算固定化酶溶液的剩余酶活。

2 结果与讨论

2.1 材料的表征

为了更清楚地观察到材料的表面形貌,使用扫描电子显微镜对 Tb-MOF 和 CAT@Tb-MOF 进行了表征,结果如图 1(a)、(b) 所示。载体 Tb-MOF 是长方体结构,当固定了过氧化氢酶后,载体 Tb-MOF 的形貌未发生较大变化,由于酶的封装造成其表面及条型结构黏连处变得凹凸不平。

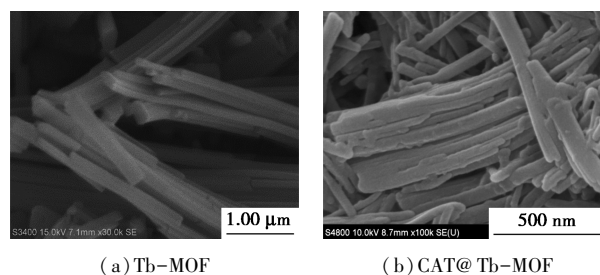
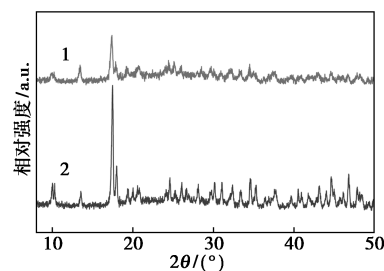


图 1 Tb-MOF 固定化酶前后的扫描电镜图

如图 2 所示,Tb-MOF 及 CAT@Tb-MOF 的衍

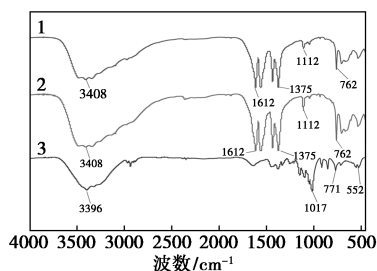


1—CAT@Tb-MOF; 2—Tb-MOF

图 2 Tb-MOF 和 CAT@Tb-MOF 的 XRD 图

射峰位置基本一致,这表明酶的固定化过程对 Tb-MOF 晶体结构未造成显著影响,但是衍射峰的强度有所降低,这可能是因为酶的封装使 Tb-MOF 的晶体表面变钝,结晶度降低,这与扫描电子显微镜图相符。

CAT、Tb-MOF 和 CAT@Tb-MOF 的 FT-IR 光谱如图 3 所示。过氧化氢酶在 1017 cm^{-1} 附近显示 C—O 酰胺 I 特征带, Tb-MOF 和 CAT@Tb-MOF 样品分别在 1612 cm^{-1} 和 1375 cm^{-1} 频率范围显示羧基不对称和对称振动特征带^[20-21]。酶封装后, CAT@Tb-MOF 对比 Tb-MOF 在 1112 cm^{-1} 附近的条带强度减弱,其他无明显变化,表明 CAT 在 Tb-MOF 结构内进行封装,与 XRD 结果进一步印证过氧化氢酶被原位封装到铽基金属有机框架结构中。



1—CAT@Tb-MOF; 2—Tb-MOF; 3—CAT

图 3 CAT@Tb-MOF, Tb-MOF 和 CAT 的红外光谱图

2.2 过氧化氢酶固定化初始浓度的优化

为了优化载体的负载量以实现高酶活性,研究了 Tb-MOF 固定不同初始浓度的过氧化氢酶的负载量。随着过氧化氢酶浓度的增加, Tb-MOF 的最高负载量可达 302.3 mg/g , 见表 1。相较于其他载体, Tb-MOF 的负载能力较高。

表 1 不同载体固定化过氧化氢酶的负载量

载体	负载量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	参考文献
SiO_2 纳米颗粒	156.8	[22]
Fe-CF	16.7	[23]
Zn-MOF-74	80.0	[24]
Tb-MOF	302.3	本研究

2.3 游离酶及固定化酶活性研究

2.3.1 CAT 和 CAT@Tb-MOF 酶活性测定

过氧化氢可以氧化 FOX 试剂中的 Fe^{2+} , 产生的 Fe^{3+} 进一步与 FOX 试剂中的二甲酚橙络合, 使溶液颜色由黄色变为紫红色, 通过紫外-可见分光光度计测量溶液在 560 nm 下的吸光度值可以实现溶液中过氧化氢的定量检测。如图 4 所示, 在 $0.02\sim$

0.10 mmol/L 的范围内, 过氧化氢浓度标准曲线为 $y=0.2023+10.13x$, 其中 y 为吸光度, x 为过氧化氢浓度; $R^2=0.9996$ 。随着 H_2O_2 溶液浓度的增加, 溶液由黄色变成紫红色, 且溶液浓度越高紫红色越深。根据酶活计算公式, CAT@Tb-MOF 固定化酶活性为 14.792 U/mg 。与其他参考文献的研究结果相比, 本研究的固定化酶回收率较高, 为 91% , 见表 2。采用原位封装法固定游离酶, 固定化条件温和, 减少了固定化过程中酶的失活, 将酶封装在 MOF 内部来提供限域空间以减少酶构象的变化、降低酶的浸出, 使得 CAT@Tb-MOF 固定化酶具有较高的酶活回收率^[7]。

表 2 不同载体固定化过氧化氢酶的酶活回收率

固定化方法	载体	酶活回收率/%	参考文献
共价结合法	MIL-125-NH ₂	78.9	[25]
原位封装法	CaCO_3 微球	72.0	[26]
交联法	Fe-CF	35.0	[23]
交联法	壳聚糖	21.3	[27]
原位封装法	Tb-MOF	91.0	本研究

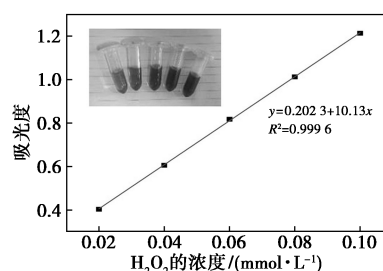
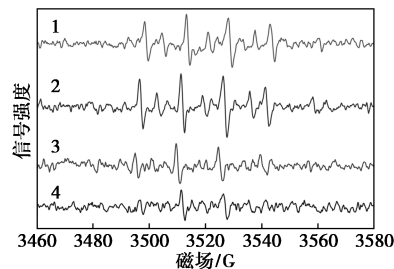


图 4 FOX 法测得不同浓度 H_2O_2 溶液与对应吸光度的标准曲线

如图 5 所示, H_2O_2 在一定条件下可以产生羟基自由基, 在电子顺磁共振波谱中出现明显的峰面积比为 $1:2:2:1$ 的羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 信号。在过氧化



1— H_2O_2 ; 2— H_2O_2 +Tb-MOF;
3— H_2O_2 +CAT@Tb-MOF; 4— H_2O_2 +CAT

图 5 Tb-MOF、CAT@Tb-MOF 和 CAT 分别加入 H_2O_2 溶液后的 EPR 光谱图

氢溶液中加入 CAT 或者 CAT@ Tb-MOF 后,由于酶的催化作用, H_2O_2 含量减少,·OH 的信号强度明显减弱,而载体材料 Tb-MOF 对羟基自由基的信号并无显著影响。

如图 6 所示,EPR 测试结果表明,过氧化氢溶液中的羟基自由基信号的二次积分面积与其浓度存在较好的线性关系,其浓度标准曲线为 $y = 1.547 43 + 44.296 14x$,其中, y 为 EPR 峰二次积分面积, x 为过氧化氢浓度; $R^2 = 0.97$, RSD 小于 3%,标准曲线具有良好的重复性。

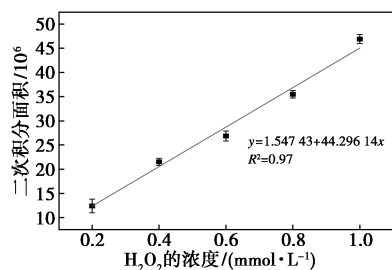


图 6 EPR 法测得不同浓度 H_2O_2 溶液与二次积分面积的标准曲线

利用电子顺磁共振波谱对 CAT 与 CAT@ Tb-MOF 的评价如图 7 所示,由标准曲线及酶活计算公式可得,CAT 的酶活为 15.936 U/mg,CAT@ Tb-MOF 的酶活为 15.225 U/mg。FOX 法及 EPR 法定过氧化氢酶及固定化过氧化氢酶活力的结果如表 3 所示。

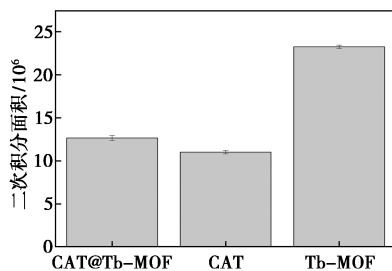


图 7 Tb-MOF、CAT@ Tb-MOF 和 CAT 分别加入 H_2O_2 溶液后的 EPR 二次积分面积对比

表 3 EPR 法和 FOX 法测得酶活结果的对比

	FOX 法/ ($U \cdot mg^{-1}$)	EPR 法/ ($U \cdot mg^{-1}$)	RSD / (%, $n = 3$)
CAT	16.262	15.936	1.99
CAT@ Tb-MOF	14.792	15.225	2.98

2.3.2 游离酶及固定化酶动力学参数研究

通过改变底物浓度来计算游离过氧化氢酶和固定化过氧化氢酶的动力学参数,见图 8,得到二者的 K_m 值分别为 0.302 2、0.053 6 $\mu mol/L$ 。 K_m 值表示

酶对底物的亲和力。固定化后过氧化氢酶对底物的 K_m 值降低,表明固定化后过氧化氢酶对底物的亲和力增加,这可能与固定化载体 Tb-MOF 产生的微环境有关^[4]。游离过氧化氢酶和固定化过氧化氢酶的 V_{max} 分别为 0.033 6、0.001 7 $\mu mol/(L \cdot s)$ 。 V_{max} 值的降低可能与过氧化氢酶微环境的改变以及位阻和构象的改变有关^[7]。

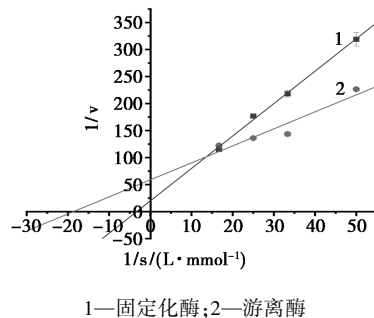
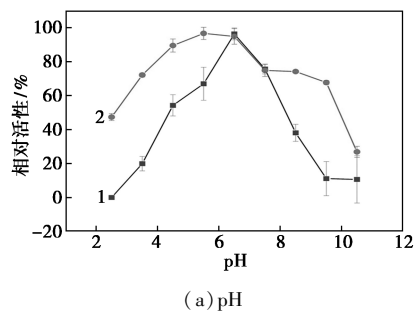


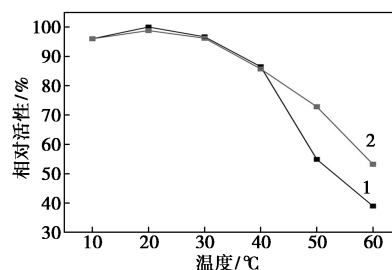
图 8 CAT 和 CAT@ Tb-MOF 的 Lineweaver-Burk 图

2.4 游离酶及固定化酶的酶促反应条件优化

图 9 为 pH 和温度对 CAT 和 CAT@ Tb-MOF 酶活性的影响。由图 9(a)可见,游离酶在 pH=6.5 时获得最大酶活,因此其最适反应 pH 为 6.5;而固定化酶在 pH=5.5 时有最大酶活,其最适反应 pH 为 5.5。最适 pH 条件的改变可能是由于微环境表面电荷的影响。偏离最适 pH 时,随着 pH 的增高或降低,游离酶和固定化酶的酶活保留率皆出现不同程



(a) pH



(b) 温度

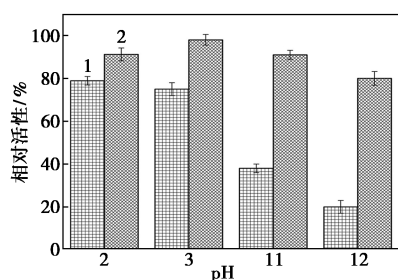
1—CAT;2—CAT@ Tb-MOF

图 9 pH 和温度对 CAT 和 CAT@ Tb-MOF 酶活性的影响

度的下降,这是因为酶活性中心相关基团会受溶液 pH 值的影响出现不同程度的解离,若偏离最适解离 pH 会影响酶活性中心与底物的结合,导致酶活性的降低。而固定化酶由于被 Tb-MOF 封装,其三级结构更加稳定,使得 pH 的变化对固定化酶活性影响相比游离酶更小,固定化酶表现出更好的稳定性。由图 9(b)可见,游离酶和固定化酶均在 20℃ 时表现出最高酶活,因此 CAT 和 CAT@Tb-MOF 的最适酶促反应温度均为 20℃。

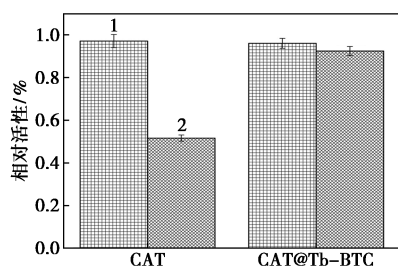
2.5 游离酶及固定化酶的稳定性

图 10 为游离酶和固定化酶的稳定性。从图 10(a)中可以看出,不论体系 pH 较低还是较高,固定化酶的稳定性均比游离酶的稳定性高,这可能是由于固定化后酶与载体的相互作用导致酶周围的微环境发生了改变,提高了酶的耐酸性和耐碱性,有利于实现极端条件下的应用。由图 10(b)可以看出,固定化酶和游离酶在 40℃ 条件下处理 5 min 后,酶活均变化不大,证明游离过氧化氢酶和固定化过氧化氢酶在 40℃ 条件下均有良好的稳定性;固定化酶在高温 80℃ 条件下处理 5 min 后,酶活仅略有下降,剩余酶活为 92.6%,而游离酶的酶活力比 25℃ 时降低将近一半,说明 Tb-MOF 对过氧化氢酶的封装能稳定酶的三级结构,提高酶的耐热性。由图 10(c)可见,固定化酶经历 10 个循环后仍保留了原始活性的 90%,具有良好的重复使用性。由图 10(d)得知,固定化酶在 4℃ 下保存 1 个月之后,其剩余酶活仍有 80%;在储存 50 d 后,剩余酶活接近半衰期,由此可



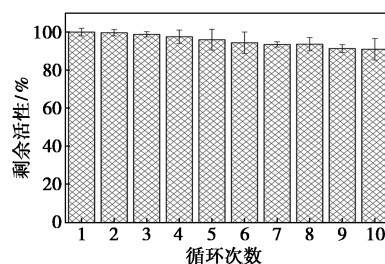
1—CAT; 2—CAT@Tb-MOF

(a) 酸碱稳定性

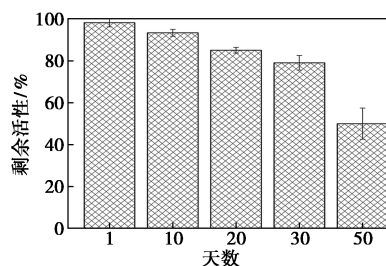


1—40℃; 2—80℃

(b) 热稳定性对比图



(c) 固定化酶的重复使用性



(d) 固定化酶的贮藏稳定性

图 10 游离酶和固定化酶的稳定性

见固定化酶具有良好的贮藏稳定性,游离酶和载体的结合使其三级结构更加稳定^[25]。

3 结论

本研究发展了一种基于钷基金属有机框架材料固定化过氧化氢酶的方法,制备得到性能优良的固定化酶材料,并对其酶学性能加以评价。材料的制备方法简单、绿色、稳定,且固定化酶的负载量高达 302.3 mg/g。固定化过程几乎不影响酶活性,酶活的保留率高达 90% 以上。采用原位封装法将过氧化氢酶封装在 MOFs 中,限制了酶构象的变化,大大提高了过氧化氢酶的稳定性和重复使用性。所研究的方法不仅可以为其他酶的固定化制备提供了一条可行的途径,也为固定化材料的工业化制备提供了一种潜在发展方向。

参考文献

- [1] Maghraby Y R, El-Shabasy R M, Ibrahim A H, *et al.* Enzyme immobilization technologies and industrial applications[J]. ACS Omega, 2023, 8(6): 5184–5196.
- [2] 陈海欣, 张赛男, 赵力民, 等. 固定化酶: 从策略到材料设计[J]. 生物加工过程, 2020, 18(1): 88–95.
- [3] Elif O, Ozge C, Idris S, *et al.* Synergistic role of carbon quantum dots in the activity and stability of *Candida rugosa* lipase encapsulated within metal-organic frameworks (ZIF-8) [J]. Materials Today Communications, 2022, 30: 103066.
- [4] Lyu F, Zhang Y, Zare R N, *et al.* One-pot synthesis of protein-embedded metal-organic frameworks with enhanced biological activities[J]. Nano Letters, American Chemical Society, 2014, 14(10):

- 5761–5765.
- [5] Alvarado-Ramírez L, Machorro-García G, López-Legarrea A, *et al.* Metal-organic frameworks for enzyme immobilization and nanozymes: A laccase-focused review[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 70: 108299.
- [6] 徐冉, 李智慧, 吴一楠, 等. 金属有机骨架材料固定化酶的研究进展[J]. *材料导报*, 2021, 35(S2): 285–293.
- [7] Nadar S S, Vaidya L, Rathod V K. Enzyme embedding metal-organic framework (Enzyme-MOF): de novo immobilization method[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 149: 861–876.
- [8] Mehta J, Dhaka S, Bhardwaj N, *et al.* Application of an enzyme encapsulated metal-organic framework composite for convenient sensing and degradation of methyl parathion[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 290: 267–274.
- [9] Gong C, Chen J, Shen Y, *et al.* Microperoxidase-11/metal-organic framework/macroporous carbon for detecting hydrogen peroxide[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(83): 79798–79804.
- [10] Shieh F K, Wang S C, Yen C I, *et al.* Imparting functionality to biocatalysts via embedding enzymes into nanoporous materials by a de novo approach: Size-selective sheltering of catalase in metal-organic framework microcrystals[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(13): 4276–4279.
- [11] Ofoedu C E, You L, Osuji C M, *et al.* Hydrogen peroxide effects on natural-sourced polysaccharides: Free radical formation/production, degradation process, and reaction mechanism—A critical synopsis[J]. *Foods*, 2021, 10(4): 699.
- [12] Jing Y, Li J, Zhang X, *et al.* Catalase-integrated metal-organic framework with synergetic catalytic activity for colorimetric sensing[J]. *Environmental Research*, 2022, 207: 112147.
- [13] Grigoras A G. Catalase immobilization—A review[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 117: 1–20.
- [14] 徐娟, 常雁红, 罗晖. 过氧化氢酶的研究和固定化及其应用进展[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(34): 12035–12038.
- [15] Liao F S, Lo W S, Hsu Y S, *et al.* Shielding against unfolding by embedding enzymes in metal-organic frameworks via a de novo approach[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(19): 6530–6533.
- [16] Sun M, Zhong Z, Wang Y, *et al.* Dual functional lanthanide-MOF probes composites based on hydroxyapatite nanowires as fluorescent sensor for detection of ascorbic acid[J]. *Microchimica Acta*, 2023, 190: 89–98.
- [17] Sun M, Zhang L, Xu S, *et al.* Carbon dots-decorated hydroxyapatite nanowires-lanthanide metal-organic framework composites as fluorescent sensors for detection of dopamine[J]. *Analyst*, 2022, 147(5): 947–955.
- [18] Ou P, Wolff S P. A discontinuous method for catalase determination at ‘near physiological’ concentrations of H₂O₂ and its application to the study of H₂O₂ fluxes within cells[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1996, 31(1/2): 59–67.
- [19] Roberts J G, Voinov M A, Schmidt A C, *et al.* The hydroxyl radical is a critical intermediate in the voltammetric detection of hydrogen peroxide[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(8): 2516–2519.
- [20] Elkhanoufi S, Stefania R, Alberti D, *et al.* Highly sensitive “Off/On” EPR probes to monitor enzymatic activity[J]. *Chemistry*, 2022, 28(17).
- [21] 郑榕萍, 潘铁英, 史新梅, 等. 标准曲线法测定煤中自由基含量[J]. *波谱学杂志*, 2011, 28(2): 259–264.
- [22] Du Y, Gao J, Zhou L, *et al.* MOF-based nanotubes to hollow nanospheres through protein-induced soft-templating pathways[J]. *Advanced Science*, 2019, 6(6): 1801684.
- [23] 陈爽, 宋娜, 廖学品, 等. 以 Fe(III) 改性胶原纤维为载体固定过氧化氢酶[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1076–1081.
- [24] Wei T H, Wu S H, Huang Y D, *et al.* Rapid mechanochemical encapsulation of biocatalysts into robust metal-organic frameworks[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5002.
- [25] Wang Z, Liu Y, Li J, *et al.* Efficient immobilization of enzymes on amino functionalized MIL-125-NH₂ metal organic framework[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2022, 27(1): 135–144.
- [26] 陈佳琳, 刘刚, 孙梦梦, 等. 固载过氧化氢酶微球清除家庭漂白后残留过氧化氢的研究[J]. *日用化学工业*, 2021, 51(11): 1045–1051.
- [27] 柯尊柱, 张朝晖, 陈小龙. 一种嗜热嗜碱过氧化氢酶的分选纯化和固定化[J]. *化工学报*, 2011, 62(10): 2885–2892. ■
- [16] Sun M, Zhong Z, Wang Y, *et al.* Dual functional lanthanide-MOF probes composites based on hydroxyapatite nanowires as fluorescent sensor for detection of ascorbic acid[J]. *Microchimica Acta*, 2023, 190: 89–98.
- [19] Liu X Y, Shen C, Gao N, *et al.* Concentrated electrolytes based on dual salts of LiFSI and LiODFB for lithium-metal battery[J]. *Electrochimica Acta*, 2018, 289: 422–427.
- [20] 徐东伟. 环状磺酸酯基电解液添加剂在锂离子电池中的反应及机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2024.
- [21] Liu Y, Qi C, Cai D D, *et al.* TaC-modified LiFePO₄/C composite as cathode material for high-performance lithium-ion batteries[J]. *Ionics*, 2023, 29(6): 2191–2198. ■

(上接第 159 页)

- [16] Quan Y Z, Liu Q S, Liu M C, *et al.* Flame-retardant oligomeric electrolyte additive for self-extinguishing and highly-stable lithium-ion batteries: Beyond small molecules[J]. *Journal of Energy Chemistry*, 2023, 84: 374–384.
- [17] Jaumann T, Balach J, Langklotz U, *et al.* Lifetime vs. rate capability: Understanding the role of FEC and VC in high-energy Li-ion batteries with nano-silicon anodes[J]. *Energy Storage Materials*, 2017, 6: 26–35.
- [18] Han Y Y, Fang R Y, Lu C W, *et al.* LiF-rich interfacial protective layer enables air-stable lithium metal anodes for dendrite-free lithi-

um metal batteries[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(26): 31543–31551.

- [19] Liu X Y, Shen C, Gao N, *et al.* Concentrated electrolytes based on dual salts of LiFSI and LiODFB for lithium-metal battery[J]. *Electrochimica Acta*, 2018, 289: 422–427.
- [20] 徐东伟. 环状磺酸酯基电解液添加剂在锂离子电池中的反应及机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2024.
- [21] Liu Y, Qi C, Cai D D, *et al.* TaC-modified LiFePO₄/C composite as cathode material for high-performance lithium-ion batteries[J]. *Ionics*, 2023, 29(6): 2191–2198. ■