

固定化纳米酶的研究进展

肖鹭^{1,2}, 周锦涛^{1,2}, 刘振¹, 熊涛¹, 娄文勇², 彭飞^{1,*}

(1.南昌大学食品学院, 江西 南昌 330036; 2.华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510000)

摘要: 游离酶因存在成本高、操作稳定性差、再利用困难等缺点在工业应用中受到限制, 将其固定在载体上是克服上述缺点的有效手段。纳米酶固定化技术于近10年兴起, 是一项具有巨大应用潜力的新兴技术。目前固定化酶已广泛应用于食品、医疗、环境治理等领域。本文系统且深入地综述基于蛋白-无机杂化纳米花、金属有机框架和纳米胶3种新型纳米材料固定化酶的最新研究与应用进展, 综合比较三者的优缺点, 并分析总结相应的适用酶, 最后提出级联酶固定化和新型固定化材料开发是固定化酶未来的发展趋势。

关键词: 固定化酶; 纳米花; 金属有机框架; 纳米胶; 纳米技术

Research Progress on Immobilized Nanoenzymes

XIAO Lu^{1,2}, ZHOU Jintao^{1,2}, LIU Zhen¹, XIONG Tao¹, LOU Wenyong², PENG Fei^{1,*}

(1. School of Food Science and Engineering, Nanchang University, Nanchang 330036, China;

2. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510000, China)

Abstract: The industrial application of free enzyme is limited due to its high cost, poor operational stability and difficult reuse. Immobilization on carrier is an effective way to overcome the limitation. Nanozyme immobilization technology has emerged in the past 10 years, which is an emerging technology with great potential. At present, immobilized enzymes have been widely used in several fields such as food, medical treatment, and environmental treatment. This article systematically summarizes the latest progress in the research and application of immobilized enzymes based on three new nanomaterials (protein-inorganic hybrid nanoflowers, metal organic frameworks and nanogels), comprehensively compares the advantages and disadvantages of the three nanomaterials, analyzes and summarizes their respective applicable enzymes, and finally points out that cascade enzyme immobilization and the development of new immobilized materials are the future trend for the development of immobilized enzymes.

Keywords: immobilized enzyme; nanoflowers; metal-organic frameworks; nanogels; nanotechnology

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220511-143

中图分类号: Q814.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)11-0205-09

引文格式:

肖鹭, 周锦涛, 刘振, 等. 固定化纳米酶的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(11): 205-213. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220511-143. <http://www.spkx.net.cn>

XIAO Lu, ZHOU Jintao, LIU Zhen, et al. Research progress on immobilized nanoenzymes[J]. Food Science, 2023, 44(11): 205-213. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220511-143. <http://www.spkx.net.cn>

酶是一种绿色、可持续的生物催化剂, 具有催化活性高、底物特异性好和选择性强等优势^[1], 已经广泛应用于食品、药品、纺织、生物燃料等重要领域^[2-3]。但是, 游离酶稳定性差、难以回收利用、使用成本高等缺点限制了其在工业生产中的应用^[4]。酶的固定化是解决上述

问题的重要技术之一^[5]。随着纳米技术的发展, 具有较大比表面积、化学与物理稳定性优异等特点的纳米材料被发现可作为固定酶的理想载体^[6]。由此, 大量新型纳米结构材料被开发用于固定酶, 例如聚合物纳米纤维^[7]、碳纳米管(carbon nanotube, CNT)^[8]、介孔二氧化硅^[9-10]、

收稿日期: 2022-05-11

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32101894); 大学生创新创业训练省级重点项目(202210403067); 江西省自然科学基金青年科学基金项目(20224BAB215041)

第一作者简介: 肖鹭(2000—)(ORCID: 0000-0003-0983-8793), 女, 硕士研究生, 研究方向为酶工程。

E-mail: xl2691915147@163.com

*通信作者简介: 彭飞(1990—)(ORCID: 0000-0001-5370-8676), 男, 讲师, 博士, 研究方向为生物催化与生物转化。

E-mail: pengf0129@foxmail.com

石墨烯和氧化石墨烯^[11]、磁性纳米颗粒^[12-14]、金属有机框架(metal-organic frameworks, MOFs)^[15-19]、金属纳米粒子^[20]、磁性纳米结构和杂化纳米花等^[21]。本文综合阐述基于蛋白-无机杂化纳米花、MOFs、纳米胶的固定化纳米酶的最新研究与应用进展, 以为固定化纳米酶的推广应用提供理论参考。

1 基于蛋白-无机杂化纳米花固定化酶

蛋白-金属离子杂化纳米花固定化酶是以酶-金属离子配位键为基础不断生长而得到的纳米级花状固定化酶。目前蛋白-无机杂化纳米花固定化技术已广泛用于制备单酶-金属离子杂化纳米酶和多酶-金属离子杂化纳米酶。

1.1 单酶-金属离子杂化纳米酶

Ge Jun等^[22]于2012年提出了蛋白-无机杂化纳米花的制备方法, 并且以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)-硫酸铜制备纳米花为例阐明了制备机理: 首先, Cu^{2+} 与蛋白质通过配位作用形成络合物, 同时与磷酸根形成晶核, 促进络合物与晶核形成聚集体(花瓣); 随后聚集体沿着花瓣四周生长成枝, 最终形成纳米花状的固定化纳米酶(图1)。研究结果显示, 该方法不仅适合于BSA, 还适用于漆酶(laccase, LAC)、碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)和脂肪酶等多种酶, 其中LAC- Cu^{2+} 杂化纳米酶和CA- Cu^{2+} 杂化纳米酶的活性分别较游离酶提升了5.5倍和1.6倍, 这可能是由于特殊的纳米花结构使固定化酶具有较高的比表面积和较小的传质阻力, 以及金属离子对酶分子具有活化作用^[23]。随后, 研究人员对此酶的固定化技术进行了广泛研究并制备了一系列高效、稳定的单酶-金属离子杂化纳米酶催化剂。例如, Zhang Baoliang等^[24]通过蛋白-无机杂化纳米花技术制备了脂肪酶/ $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 杂化纳米酶。利用该杂化纳米酶进行酯水解反应的活性是游离脂肪酶的近2.5倍, 并且其在重复使用8个批次后, 活性保留率仍高达94.5%。由此可见, 蛋白-无机杂化纳米花技术不仅可以提升酶的活性, 还可以提升其稳定性和重复利用率。

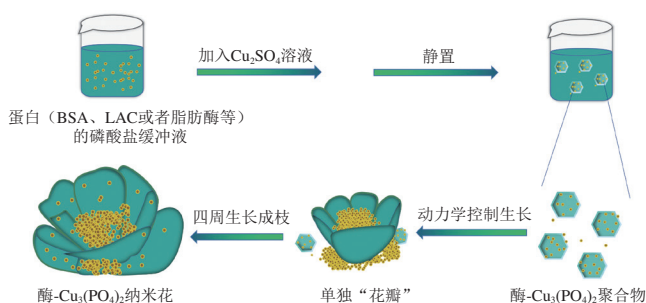


图1 磷酸铜杂化纳米花型固定化酶的形成示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the formation of copper phosphate hybrid nanoparticle immobilized enzymes

在单酶-金属离子杂化纳米花固定化酶的制备过程中, 金属离子的种类、数量等因素对单酶杂化纳米花的形态和酶活性具有重要影响。Sharma等^[25]比较了4种金属离子(Ag^+ 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Au^{3+})与脂肪酶制备的纳米花固定化酶的形态差异。结果表明, Ag^+ 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Au^{3+} 分别呈现出松散排列的花状纳米花瓣、密集排列的纳米花、纳米片和厚纳米花瓣4种形状。Wu Pan等^[26]利用5种不同的金属离子(Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+})对碱性果胶裂解酶PEL168突变体(pectate lyases 3, PEL3)进行蛋白-无机杂化。结果表明, PEL3/ $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 杂化纳米酶的相对活性最高, 是游离PEL3的2.5倍, 由此可见, 金属离子种类对单酶杂化纳米花的形态以及酶活性有至关重要的影响。此外, Wen Huan等^[27]将CA与 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 混匀, 通过配位相互作用制备了CA- Cu^{2+} / Zn^{2+} 杂化纳米花(CA-bimetallic hybrid nanoflowers, CANF), 并且发现CANF的活性分别是CA-铜离子杂化纳米酶和CA-锌离子杂化纳米酶的3倍和8倍。此外, CANF催化二氧化碳高效转化合成 CaCO_3 的产量较游离CA提高近5.2倍, 这对实现“双碳”目标具有重要的意义。同样, Patel等^[28]将LAC同时与 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 混匀, 通过蛋白-无机杂化纳米花技术制备LAC- $\text{Cu}_3/\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 杂化纳米酶(记为LAC- $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$)。结果表明, LAC- $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 的活性比LAC- Cu^{2+} 、LAC- Zn^{2+} 以及游离LAC分别高1.2、1.5、2.6倍; 使用LAC- $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 催化降解双酚A时发现其催化降解率分别是LAC- Cu^{2+} 、LAC- Zn^{2+} 的6.1倍和2.9倍。由此可知, 相较于单一金属离子杂化纳米酶和双金属离子杂化纳米酶, 3种及以上金属离子杂化纳米酶的研究较少, 并且杂化纳米酶活性和金属离子的数量可能存在着某种定向关系, 这些需要进一步深入研究。

虽然单酶-金属离子杂化纳米酶优点良多, 但是存在合成时间长、重复使用次数少、分离困难等问题。为此, 研究者们分别提出超声辅助固定化、戊二醛(glutaraldehyde, GA)交联强化酶稳定性以及构建磁性杂化纳米花固定化酶实现酶和产物快速分离等多种措施来解决上述难题。Batule等^[29]使用超声辅助LAC与 Cu^{2+} 杂化法制备了LAC- Cu^{2+} 杂化纳米酶, 并且发现经超声辅助处理杂化纳米酶的制备时间从3 d缩短到5 min内。此外, 经超声辅助的LAC- Cu^{2+} 杂化纳米酶催化降解丁香醛的活性较游离LAC提高了0.5倍, 由此可见, 超声处理不仅可以缩短杂化纳米酶的制备时间, 还可以增强杂化纳米酶的活性。Lee等^[30]则在制备了脂肪酶- Cu^{2+} 杂化纳米酶后借助GA对杂化纳米酶进行交联以强化其稳定性。结果显示, GA交联的脂肪酶- Cu^{2+} 杂化纳米酶在4次循环后的活性是未经GA交联的脂肪酶- Cu^{2+} 杂化纳米酶的7倍多, 并可以维持花状形态, 可见GA交联可在不影响

脂肪酶-Cu²⁺杂化纳米酶形态的情况下增强其重复使用性。Ren Weifan等^[31]依次将Fe₃O₄磁性纳米粒子和Cu²⁺加入到脂肪酶磷酸盐缓冲液中进行共沉淀,合成了脂肪酶-Cu₃(PO₄)₂磁性纳米颗粒。这种复合材料在外加磁场的作用下可以从反应体系中快速分离出来,且在连续催化合成4次乙酸苄酯后,产率仍保持在57.78%,具有良好的重复使用性。尽管单酶-金属离子杂化纳米酶具有超活性化作用,但是由于其刚性结构差、纳米花瓣过于柔软,一定程度上限了其应用范围^[32]。使用固定化载体可以有效地增强单酶-金属离子杂化纳米酶的刚性,提升其重复使用性和催化活性,目前较为热门的载体有CNT、氧化石墨(graphite oxide, GO)、纳米纤维膜、醋酸纤维素膜等。Li Kai等^[33]先使用CNT对洋葱伯克霍尔德氏菌脂肪酶(*Burkholderia cepacia* lipase, BCL)进行负载,然后通过蛋白-无机杂化纳米花技术制备BCL/CNT/Cu₃(PO₄)₂纳米酶。他们发现BCL/CNT/Cu₃(PO₄)₂的活性是游离脂肪酶的69倍,并且是BCL/Cu₃(PO₄)₂杂化纳米酶的52倍。此外,进行BCL/CNT/Cu₃(PO₄)₂催化酯的拆分反应时,该杂化纳米酶可以循环使用8次而没有明显的活性损失。由此可见,利用CNT负载纳米花固定化酶可以很好地提高纳米花固定化酶的催化活性和重复使用性。Li Hui等^[34]将GO、CNT与LAC、Cu²⁺混合,通过蛋白-无机杂化纳米花技术合成了GO-CNT-Cu²⁺-LAC杂化纳米酶,该杂化纳米酶活性相较游离LAC提高了15%,且室温下放置6d后,该杂化纳米酶活性仍保持在80%,约是游离LAC活性的2.7倍。此外该杂化纳米酶催化去除结晶紫和中性红染料去除率分别为70%和45%,比游离LAC具有更好的脱色效果。Luo Mengying等^[35]使用热熔挤挤出法制备了一款三维分层多孔纳米聚(乙烯醇-共-乙烯)纤维膜(hierarchically porous nanofibrous poly(vinyl alcohol-co-ethylene) membranes, HPNM),然后通过蛋白-无机杂化纳米花技术成功合成了LAC-Cu²⁺-HPNM杂化纳米酶。该材料在降解纺织染料方面表现出优异的催化降解性能,处理靛蓝胭脂红3h的降解效率高达99.5%,即使重复使用超过14次,对靛蓝胭脂红的催化降解效率仍高于98%,因此该材料在染料降解方面是一种很有开发前景的负载型杂化纳米花固定化酶。

由于单酶-金属离子杂化纳米酶具有较高的催化活性以及与磁性纳米粒子杂化后良好的重复使用性,所以单酶-金属离子杂化纳米酶在生物催化和染料脱色等领域应用较为广泛。Jiang Wei等^[36]基于蛋白-无机杂化纳米花技术制备了脂肪酶-Cu²⁺纳米花,该酶催化水解硝基苯辛酸盐时的活性是游离脂肪酶的2.7倍。此外,该酶催化葵花籽油转化为生物柴油的转化率高达96.5%,且在使用5个循环后使转化率保持在72.5%,可用于工业规模生物柴油生产。Sun Tingting等^[37]使用接枝N-(膦-甲基)亚氨基二乙酸

作为Fe₃O₄磁性纳米粒子与Cu²⁺之间的桥梁,将Fe₃O₄磁性纳米粒子包裹在LAC-Cu²⁺杂化纳米酶的内部,成功地制备了LAC-Cu²⁺杂化磁性纳米酶,这种酶在最佳条件下催化降解孔雀绿13次和18次后,对孔雀绿的催化降解率分别保持在99%和90%左右,极具开发应用前景。此外,加入Fe₃O₄磁性纳米粒子的制备方法显著提高了纳米酶的可重用性^[38]。

1.2 多酶-金属离子杂化纳米酶

多酶级联反应是指多种酶在多个酶催化反应中高效协同工作,从而实现无中间产物、产物快速产出的反应。当前,多酶-金属离子杂化纳米酶级联反应凭借酶邻近效应以及底物通道的优势,已经成为工业开发中重要的技术之一,并且在药物、化妆品和营养化合物合成方面应用颇多^[39]。在多酶-金属离子杂化纳米酶级联反应中,多酶-金属离子杂化纳米酶的合成是重中之重,Han Juan等^[40]通过蛋白-无机杂化纳米花技术合成了葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOx)-Cu²⁺杂化纳米酶,然后通过Cu²⁺与葡萄糖淀粉酶(glucoamylase, GA)的氨基酸残基相互作用将GA吸附在GOx-Cu²⁺杂化纳米酶的表面,成功制备了具有分区结构的GA@GOx多酶纳米花。这种多酶杂化纳米花的酶活性是游离GA、GOx总酶活性的2.5倍,稳定性是游离GA、GOx整体的1.34倍。此外,将GA@GOx多酶纳米花应用于淀粉转化葡萄糖酸生产时,其80min内的转化率高达92.12%,是游离多酶体系转化率的近1.42倍,这说明GA@GOx杂化纳米酶在淀粉转化葡萄糖酸方面效果显著。此外,Han Juan等^[41]将由类弹性蛋白多肽(elastin-like polypeptide, ELP)和His标签组成的二元标记(ELP-His)整合到内切葡聚糖酶(endoglucanase, EG)、纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase, CBH)和β-葡糖苷酶(beta-glucosidas, BG)中,构建了3种重组酶,并将3种重组酶与Cu²⁺混合,通过蛋白-无机杂化纳米花技术合成了多酶-Cu²⁺杂化纳米酶,该多酶体系的米氏常数(K_m)、催化常数与K_m的比值分别为9.33g/L和0.0051L/(min·g),具有很高的底物亲和力和催化效率,此外,使用这种多酶体系催化水解微晶纤维素制备葡萄糖时,其总酶活性相较游离多酶体系提高了1.12倍,具有更高的催化效率,有望用于葡萄糖工业化生产。

2 基于MOFs材料的固定化纳米酶

MOFs是由金属离子(或团簇)与有机配体通过自组装配位形成的多孔晶体材料^[42],目前已被广泛应用于环境净化^[43]、气体贮存与分离^[44]、药物运输^[45]等多种领域。因其具有较大比表面积、高稳定性、可调孔隙率、

含有大量活性位点等特性,可以模拟天然酶的性质,而被视为理想的固定化酶载体。研究显示,将酶蛋白分子固定在MOFs上,可以有效提高酶的活性、可重复使用性、贮存性、化学和热稳定性、与底物的亲和力等。MOFs固定化酶根据制备方式分为基于原位封装的MOFs固定化酶、基于化学修饰的MOFs固定化酶和MOFs基复合材料固定化酶。

2.1 基于原位封装的MOFs固定化酶

基于原位封装的MOFs材料的金属中心包括主族元素、镧系金属、过渡元素等,其中应用较多的为锌、铈、铁、铜等离子^[46]。常用的MOFs载体有类沸石咪唑酯骨架材料(zeolitic imidazolate framework, ZIF)-8、氨基苯二酸锆(zirconium aminobenzenedicarboxylate, UIO-66-NH₂)、均苯三酸铁(trimesic acid, MIL-100-Fe)和偶氮苯四羧基铁(iron azobenzene tetracarboxylic, PCN-250)等^[47]。

近年来,基于MOFs的多酶系统因其高催化效率受到越来越多的关注,已在传感领域显示出广阔的应用潜力。Cheng Xiqing等^[48]通过仿生矿化作用将GOx原位封装在基于3D多孔导电铜泡沫(copper foam, CF)的MOFs中,得到GOx@Cu-MOF,以此制备高效检测葡萄糖的酶-电化学系统。其中GOx@Cu-MOF修饰电极显示出优异的催化活性和热稳定性。经80℃孵育后,电极GOx@Cu-MOF/CF的活性仍保持在约80%,而未加保护电极的活性降至原来的10%;该电极的K_m为0.51 mmol/L,远低于游离GOx(25.7 mmol/L),表明其对葡萄糖的亲合力较好,显示出较高的葡萄糖检测灵敏度。

Shomal等^[49]研究发现封装在ZIF-8中的脂肪酶较其游离态具有更加出色的稳定性,MOFs固定化酶在55~75℃的半衰期和酶活性较游离酶分别延长3.2倍和提高5.0倍。此外,该固定化酶在贮存25 d以及循环使用7批次后活性仍分别保留有90%和54%,表现出优异的贮藏稳定性和操作稳定性。Cai Xinyong等^[50]先将南极念珠菌脂肪酶B(*Candida antarctic lipase B*, CALB)原位封装在ZIF-8中获得酶纳米粒子,再通过物理吸附将该纳米粒子固定在大孔树脂上得到固定化酶CALB-ZIF8@D101,比活力高达38.4 U/mg。在70℃孵育10 h后,固定化CALB的活性是游离酶的7倍。此外,在重复使用10批次后,CALB-ZIF8@D101和游离CALB的活性分别保留84.2%和31.61%。Nadar等^[51]通过生物诱导矿化的静电自组装法将被脯氨酸活化的脂肪酶固定在ZIF-8中得到脂肪酶-脯氨酸-MOF纳米酶(图2)。该固定化技术使酶不仅在50~70℃时使热稳定性提升4倍,还使催化活性增强1.35倍,这主要是由于脯氨酸修饰增强了底物与酶活性中心的亲和性(K_m更低)。另外,在重复6个循环后,脂肪酶-脯氨酸-MOF比脂肪酶-MOF具有更高的活性保留率,

分别为72%和56%。这种简单的固定化策略为经济、绿色的多相生物催化剂的发展开辟了一个新的视角。

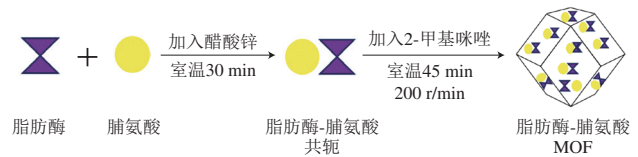


图2 采用自组装生物矿化的方法在MOFs材料ZIF-8上固定化脂肪酶的示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the immobilization of lipase on MOFs (ZIF-8) by self-assembly biomimetalization

2.2 基于化学修饰的MOFs固定化酶

一般情况下,MOFs配位不饱和金属位点上可结合活性物质以进行化学修饰,亦可通过金属节点或有机配体进行功能化^[46],常用于增强酶活性的效应物有氧离子和金属离子(Fe³⁺、Ca²⁺和Zn²⁺)。Xu Weiqing等^[52]通过酰胺化偶联反应将GOx固定在Fe-MOFs材料Fe-MIL-88B-NH₂上制得Fe-MOF-GOx,并利用纳米尺度邻近效应对葡萄糖进行了级联催化比色检测,以此制备了生物传感器。与Fe-MOF和GOx相比,Fe-MOF-GOx不仅具有更高的稳定性和可重复使用性,而且具有较宽的线性范围(1~500 μmol/L),对葡萄糖的检出限低至0.487 μmol/L。60 d后,生物传感器相对活性仍保持在初始活性的90%左右,且其检测结果与血糖仪的检测结果相对标准偏差小于5%,表明基于该固定方法的生物传感器在疾病诊断方面具有广阔的应用前景。Li Yan等^[53]首先通过叠氮-炔环加成反应在UiO-66-NH₂表面修饰聚甲基丙烯酸,合成得到UiO-66-NH₂@聚甲基丙烯酸,然后通过静电相互作用固定化果胶酶。在最佳固定化条件下,固定化果胶酶的活性及蛋白质负载量分别为1.215 U/mg和448.5 mg/g,且该固定化酶在连续8批次后剩余活性高达81%。

2.3 MOFs基复合材料固定化酶

MOFs-酶生物复合材料不仅提高了封装酶的稳定性和可重复使用性,而且扩大了它在其他领域的应用范围,但仍受到许多关键问题的限制,如其性能受限于生物分子构象和活性以及MOFs颗粒的大小、形态和结构不规则性等,因此,研究这些因素对开发MOFs基复合材料十分重要^[54]。由于MOFs导电性差和表面亲水性低,迄今为止大多数MOFs-酶电化学生物传感器的灵敏度较低。Liu Xuejiao等^[18]先将多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotube, MWCNT)复合材料分散在Nafion中,再按体积比1:1与ZIF-67(Co)悬浮液混合,然后与辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)水溶液混合,以此制备检测H₂O₂的ZIF-67(Co)-MWCNT-HRP传感器。与基于ZIF-67(Co)或MWCNT的HRP传感器相比,ZIF-67(Co)-MWCNT-HRP对亲水性

底物的亲和力明显增强 (K_m 降低约75%)，且检测 H_2O_2 的灵敏度提高了1.3倍。Nong Wenqian等^[55]在磁场的作用下将聚乙烯吡咯烷酮改性的 Fe_3O_4 负载到 NH_2 -MIL-88B (Fe)上，合成核壳纳米粒子，再通过酶促反应将溶菌酶共价固定到核壳纳米粒子表面，制备得到纳米酶抗菌材料。该材料集成了细菌捕获、磁性组装、溶菌酶水解、光触发热产生和香芹酚释放等特性，能够协同杀灭细菌。质量浓度100 $\mu g/mL$ 的该材料对 10^6 CFU/mL大肠杆菌或金黄色葡萄球菌的杀菌率为100%，且在体外无明显的动物细胞毒性，这表明基于该固定技术的材料在生物医学、环境和食品领域具有广阔的抗菌应用前景。Gao Xia等^[56]先基于Ni-MOF热分解制备了MOF衍生的分层结构多孔NiO (MOF-derived porous NiO with hierarchical structure, MHNiO)，再通过弱相互作用将HRP固定在MHNiO上，获得HRP@MHNiO。70 $^{\circ}C$ 孵育1 h后，HRP@MHNiO的活性比游离HRP高65.4%；经80、90、100 $^{\circ}C$ 处理后，HRP@MHNiO的相对酶活性分别为78.2%、72.8%和68.5%，而游离HRP完全失活；室温贮藏8周后，HRP@MHNiO的酶活性是游离HRP的2.5倍。

3种基于MOFs材料的固定化纳米酶技术的比较分析汇总如表1所示。

3 基于纳米胶的固定化酶

近年来，纳米凝胶作为一种有前景的蛋白质传递载体越来越受到研究人员的关注。纳米胶与传统聚合物胶束相比，具有粒径可调、交联密度可调、稳定性增强等突出性能^[57]，其三维亲水网络和高水浓度能促进生物分子的长期稳定性并提供合适的捕获支架^[58]，因此可作为固定化酶载体。

基于纳米胶的固定化纳米酶在研发生物传感器方面有诸多应用。Huang Jiajia等^[59]将具有分层多孔结构的PdCu纳米水凝胶用于固定HRP以获得PdCu@HRP。该团队利用PdCu@HRP和包裹在ZIF-8中的葡萄糖氧化酶，通过催化级联反应对癌胚抗原进行比色生物传感。结果表明，与游离HRP和PdCu相比，PdCu@HRP不仅提高了稳定性和可重用性，还显示出协同增强的活性。与此同时，

水凝胶的静电吸附作用使底物富集在酶附近，以此来增强催化活性。与基于HRP的传统酶联免疫吸附试验相比，基于该固定化方法的传感器检测灵敏度提高了约6.1倍，证明了其在临床诊断中的潜力。Liang Hao等^[60]先用 Zn^{2+} 和单磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) 制备凝胶纳米纤维，再共固定化GOx和HRP，得到复合材料GOx&HRP@Zn/AMP，以此材料制备高灵敏度和选择性的葡萄糖生物传感器，所得传感器的检出限为0.3 $\mu mol/L$ 。通过荧光标记法分析可知，GOx和HRP存在于每个 Zn^{2+} /AMP水凝胶中，且倾向于随机分布。GOx&HRP@ Zn^{2+} /AMP稳定性是游离酶的2倍。虽然两种体系的活性在高温下都迅速下降，但固定化体系的转变温度提高7.5 $^{\circ}C$ ，证明 Zn^{2+} /AMP纳米纤维可以保护GOx和HRP免受热和碱的钝化。在60 $^{\circ}C$ 下孵育80 min，固定化酶和游离酶的半衰期分别为70 min和38 min。固定化酶在15 d内保持了70%以上的初始活性，然而在相同条件下，游离酶在5 d后失去了50%以上的初始活性。Romero-Arcos等^[61]将LAC通过溶胶-凝胶法固定在二氧化钛/Nafion (TiO_2 /NAF)的纳米结构上，Nafion具有疏水的氟碳骨架和亲水阳离子交换位点，当与溶胶-凝胶二氧化钛混合时，形成有机-无机杂化基质固定LAC，记作 TiO_2 /NAF/LAC，由此开发了用于检测邻苯二酚化合物的LAC安培生物传感器。基于NAF/LAC和 TiO_2 /NAF/LAC的生物传感器检出限分别为2.5 $\mu mol/L$ 和0.75 $\mu mol/L$ ，后者灵敏度比前者高13%。贮藏22 d后，NAF/LAC、 TiO_2 /LAC和 TiO_2 /NAF/LAC生物传感器的活性保持率分别为58%、53%和69%，表明二氧化钛溶胶-凝胶膜对LAC活性保持非常有效。

Peng Huan等^[62]在水包油乳液中以聚乙二醇(3-氨基丙基)和支链聚乙烯亚胺为模型交联剂，将水溶性反应共聚物聚(*n*-乙烯基吡咯烷酮-co-*n*-甲基丙烯氧基琥珀酰亚胺)与荧光增强蛋白和纤维素酶直接化学交联，获得不同荧光增强蛋白负载量和不同交联密度的生物荧光纳米凝胶 (cellulase-conjugated nanogels, CNG) (图3)。荧光增强蛋白用来指示纤维素酶的位置，纳米凝胶为均匀的球形，粒径为87.9~227.3 nm，且交联度高的纳米凝胶更紧凑，颗粒尺寸更小。CNG4、CNG6、CNG8和CNG10的 α -螺旋的相对含量分别为23.4%、

表1 3种基于MOFs材料的固定化纳米酶技术的比较分析

Table 1 Comparative analysis of three immobilized nanoenzyme technologies based on MOFs materials

基于MOFs材料的固定化纳米酶	特点	优势	参考文献
基于原位封装的MOFs固定化酶	在制备材料时加入酶，形成纳米级的二维MOFs；它能提供更加丰富的活性位点，以最小的扩散障碍促进底物分子接近其表面的活性位点，从而改善二维MOFs在催化和传感应用中的性能	1) 具有良好的溶液分散性能；2) 扩散速率高；3) 易于设计	[46]
基于化学修饰的MOFs固定化酶	将功能性物种引入原合成MOFs以进行化学修饰，其不改变MOFs的形态和晶型，但会降低MOFs表面的正电荷密度，从而增加显色底物的亲和力和酸碱稳定性	1) 提供更多的催化活性中心；2) 热稳定性和结构稳定性良好	[46,52-53]
MOFs基复合材料固定化酶	将具有催化活性的客体引入MOFs的孔隙空间或部分稳定在MOFs表面，从而形成MOFs复合材料；介孔结构有利于负载大量的高活性金属基团，提高纳米复合物中活性位点的密度	1) 不同成分之间的协同作用使催化性能增强；2) 提高封装酶的稳定性；3) 提高可重复使用性；4) 扩大了在其他领域的应用范围	[46,54-56]

16.7%、10.5%和7.9%，CNG4纳米凝胶的 α -螺旋含量最高，催化活性也最高。荧光共振能量转移分析结果表明，交联度较低的纳米凝胶具有较高的底物转运率，更容易接近酶的活性位点，蛋白质处于更强的去折叠状态，从而导致更高的酶活性。4℃下贮存3周后，游离酶的活性下降40%以上，而固定化酶的剩余活性均保持在77%以上。与盐酸胍（guanidinium chloride, GCI）、尿素、丙酮共孵育后，固定化酶的活性分别为游离酶的1.7、1.3、1.6倍。Ji Xiaotian等^[63]基于硫醇-二硫键交换反应制备酶-聚合物杂化纳米凝胶。随着猪胰脂肪酶（pocine pancreas lipase, PPL）含量的增加，纳米凝胶的临界溶解温度（the lower critical solution temperature, LCST）由低向高转变。当温度低于LCST时，PPL分子位于纳米凝胶的壳层中，当温度高于LCST时，PPL分子嵌入纳米结构中。游离PPL和固定化酶的最适温度分别为35、42℃；60℃培养后，游离酶仅保持43%的活性，而固定化后的保留率为55%~75%。Zou Bin等^[64]基于功能性离子液体改性和聚合固定化设计了一种新型集成型脂肪酶纳米凝胶。在对硝基苯棕榈酸酯水解反应中，固定化后的皱褶假丝酵母脂肪酶（*Candida rugosa* lipase, CRL）纳米凝胶具有较好的耐碱性、耐热性和耐有机溶剂性；贮存7周后，天然CRL活性保留率为（17.5±1.7）%，纳米凝胶中CRL的活性保留率为（97.3±1.8）%，表明新型纳米凝胶固定化酶是一种优良的生物催化剂。Fusco等^[58]合成了一种胶凝三肽FmocPhe3，三肽结构中的Fmoc和苯环通过 π - π 叠加作用形成了水凝胶网络，促进了LAC的物理包覆以及与碳基电极表面的相互作用。基于该固定化方法的水凝胶纳米复合石墨生物传感器（底物为邻苯二胺）的检出限为1 $\mu\text{mol/L}$ ，动态响应范围为1~250 $\mu\text{mol/L}$ ，线性范围为5~30 $\mu\text{mol/L}$ 。

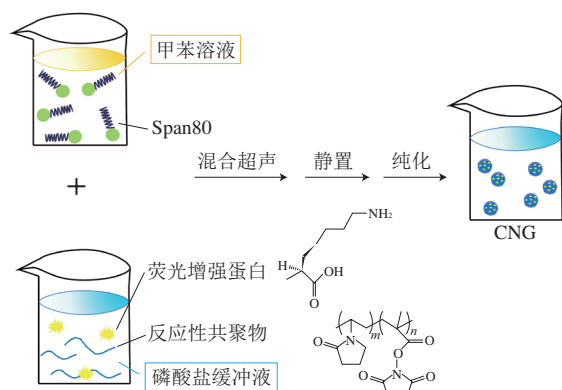


图3 在W/O乳液中交联制备生物杂化纳米凝胶的示意图
Fig. 3 Flow chart of the preparation of biohybrid nanogel by crosslinking in W/O emulsion

水凝胶在生物分析装置中有广阔的应用前景，然而它也受一定因素的影响，其中之一是锚定生物催化剂的选择性较差。一些团队期望通过改变纳米凝胶结构来解决该问题，并取得了良好效果。Peng Huan等^[57]通过吡啶二硫化物官能化的水溶性反应性共聚物的原位交联合成酶-纳米凝胶，实现了新型氧化还原性酶-纳米凝胶的高效包封和酶活性的可逆调节。纤维素酶包封在纳米凝胶中后，其酶活性大大降低，但在 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 的二硫苏糖醇（dithiothreitol, DTT）溶液中活性迅速恢复，主要缘于加入DTT后，二硫键交联网络发生降解而引起酶的释放。该固定方法为酶的可逆激活/失活开辟了新的可能性，并为靶向蛋白质治疗和生物技术应用开辟了新的方向。Humenik等^[65]诱导纳米膜涂层表面的重组蜘蛛丝蛋白自组装而形成纤维基纳米水凝胶，选择人凝血酶作为模型靶标。利用互补DNA序列改变核酸适配体二级结构使活性凝血酶释放，证实了蜘蛛丝纳米水凝胶的可寻址功能化。另一个限制因素是缺乏合适的固定技术，开发新技术迫在眉睫。San等^[66]证明了通过结合固定化和射频处理可以增强纳米生物催化剂的功能。以包封肽酶Pepa-2 nm铂纳米粒（encapsulated aminopeptidase Pepa-2 nm platinum nanoparticles, PepA-PtNPs）作为多功能纳米生物催化剂，利用金属螯合将其固定在水凝胶中，可显著提高催化能力、热稳定性、极端pH耐受性、有机溶剂耐受性和可重复使用性等。对水凝胶固定的PepA-PtNPs进行射频处理后，其催化能力比固定的PepA提高了2.5倍。Xu Li等^[67]先以四甲氧基硅烷和甲基三甲氧基硅烷为原料，通过碱催化聚合法制备 SiO_2 纳米粒子，再对黑曲霉脂肪酶进行固定。在最佳条件下，固定化脂肪酶保留了92%的负载蛋白和94%的酶活性。特性分析实验结果表明，固定化脂肪酶的热稳定性和极端pH值稳定性远高于其自由形态，具有很大的工业应用潜力。

3种新型纳米材料固定化酶的比较分析如表2所示。

4 结语

纳米酶固定化技术在过去的十多年里快速发展，目前已经成为一项具有巨大商业潜力的新兴技术，这在很大程度上得益于生物学、蛋白质工程、材料科学等的发展和进步。然而，尽管纳米酶固定化技术优点很多，但是固定化后仍然存在酶的活性降低、载体不易回收等问题，这严重阻碍了纳米酶固定化技术工业化生产的应用。因此，深入研究改进酶的固定化过程，例如探究蛋白-无机杂化纳米花固定化酶中金属离子对固定化过程的影响，调控基于MOFs材料的固定化纳米酶中复合金属的组成比例，进一步避免酶活性位点的破坏，提高生物催化剂的选择性至关重要，此外需要研究酶固定化时与

表2 3种新型纳米材料固定化酶的比较分析

Table 2 Comparative analysis of immobilized enzymes on three novel nanomaterials

固定化纳米酶	优点	缺点	适用酶	参考文献
基于蛋白-无机杂化纳米花固定化酶	1) 具有超酶活性; 2) 催化效果好、产物得率高; 3) 重复使用性较好; 4) 合成时间较短	1) 刚性结构差, 花瓣过于柔软, 使用载体后有所改善; 2) 用于合成纳米花的金属离子的种类太少; 3) 部分金属离子(例如Ca ²⁺)对杂化纳米酶的酶活性有抑制作用; 4) 目前多酶-金属杂化纳米酶和酶-多金属杂化纳米酶的研究太少	1) 单酶-金属杂化纳米酶: 脂肪酶、LAC、CA、PEL3等 2) 多酶-金属杂化纳米酶: GOx-GA、EG、CBH和BG等	[25-41]
基于MOFs材料的固定化纳米酶	1) 提高酶活性; 2) 提高可重复使用性; 3) 增强贮存性; 4) 提高化学和热稳定性; 5) 增强与底物的亲和力	1) 活性、功能客体分子封装的活性有待提升; 2) 有些MOFs复合物的颗粒较大、生长不均匀以及催化位点利用率较低; 3) 如何调控复合金属的组成比例, 以改变形貌结构、微观结构、催化活性等有待解决	脂肪酶、GOx、HRP、果胶酶、溶菌酶	[46-56]
基于纳米胶的固定化酶	1) 其三维亲水网络和高水浓度能促进生物分子的长期稳定性并提供合适的捕获支架; 2) 粒径可调; 3) 交联密度可调; 4) 稳定性增强	1) 锚定生物催化剂的选择性较差; 2) 缺乏合适的固定技术	HRP、脂肪酶、LAC、GOx、纤维素酶	[57-67]

载体的适应性关系, 例如在进行蛋白-无机杂化纳米花固定化酶与载体的杂化时应该要注意加入载体后是否增强了刚性但是抑制了酶活性或者降低了催化效率, 以及如何选择更合适的载体材料; 在制备基于MOFs材料的固定化纳米酶时, 如何解决MOFs复合物的颗粒较大、生长不均匀以及催化位点利用率较低的问题。

对于多步催化反应产物的制备, 要使纳米酶固定化技术工业应用具有良好的经济效益, 使用多酶级联催化无疑是当前最好的选择, 不断探究新型多酶共固定化方式, 构建多酶级联催化体系, 通过底物通道以及多酶的邻近效应实现中间物的无缝衔接, 能够提高多酶级联催化反应产物产率, 将多酶级联反应和合适的载体材料进行结合或许会延长级联多酶的使用寿命, 提升其经济价值。此外, 纳米酶的固定化研究还需要不断开发新型材料, 从基因层面增强酶的稳定性、重复利用性以及生物功能, 这对生物医药、食品工业、检测等领域有着深远的影响。

参考文献:

[1] ZHANG M F, ZHANG Y, YANG C K, et al. Enzyme-inorganic hybrid nanoflowers: classification, synthesis, functionalization and potential applications[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 415: 129075. DOI:10.1016/j.cej.2021.129075.

[2] LANCASTER L, ABDALLAH W, BANTA S, et al. Engineering enzyme microenvironments for enhanced biocatalysis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(14): 5177-5186. DOI:10.1039/c8cs00085a.

[3] CIPOLATTI E P, VALÉRIO A, HENRIQUES R O, et al. Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(106): 104675-104692. DOI:10.1039/c6ra22047a.

[4] CAO S L, XU P, MA Y Z, et al. Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers[J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2016, 37(11): 1814-1823. DOI:10.1016/s1872-2067(16)62528-7.

[5] LIU D M, CHEN J, SHI Y P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 102: 332-342. DOI:10.1016/j.trac.2018.03.011.

[6] LIU D M, DONG C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 92: 464-475. DOI:10.1016/j.procbio.2020.02.005.

[7] WANG Z G, WAN L S, LIU Z M, et al. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: an overview[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 56(4): 189-195. DOI:10.1016/j.molcatb.2008.05.005.

[8] FENG W, JI P J. Enzymes immobilized on carbon nanotubes[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 889-895. DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.07.007.

[9] CARLSSON N, GUSTAFSSON H, THÖRN C, et al. Enzymes immobilized in mesoporous silica: a physical-chemical perspective[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2014, 205: 339-360. DOI:10.1016/j.cis.2013.08.010.

[10] ZHANG L Q, SUN Y. Poly(carboxybetaine methacrylate)-grafted silica nanoparticle: a novel carrier for enzyme immobilization[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 132: 122-129. DOI:10.1016/j.bej.2018.01.013.

[11] ADEEL M, BILAL M, RASHEED T, et al. Graphene and graphene oxide: functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 1430-1440. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.144.

[12] BILAL M, ZHAO Y P, RASHEED T, et al. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 2530-2544. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.025.

[13] LIU X, LEI L, LI Y F, et al. Preparation of carriers based on magnetic nanoparticles grafted polymer and immobilization for lipase[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 56(3): 142-149. DOI:10.1016/j.bej.2011.05.013.

[14] ZHANG J G, MAO H L, LI M L, et al. Cyclodextrin glucosyltransferase immobilization on polydopamine-coated Fe₃O₄ nanoparticles in the presence of polyethyleneimine for efficient β-cyclodextrin production[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 150: 107264. DOI:10.1016/j.bej.2019.107264.

[15] CUI J D, REN S Z, SUN B T, et al. Optimization protocols and improved strategies for metal-organic frameworks for immobilizing enzymes: current development and future challenges[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, 370: 22-41. DOI:10.1016/j.ccr.2018.05.004.

[16] LIANG S, WU X L, XIONG J, et al. Metal-organic frameworks as novel matrices for efficient enzyme immobilization: an update review[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2020, 406: 213149. DOI:10.1016/j.ccr.2019.213149.

[17] HU Y L, DAI L M, LIU D H, et al. Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme/

- MOFs[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 91: 793-801. DOI:10.1016/j.rser.2018.04.103.
- [18] LIU Xuejiao, CHEN Wanwan, LIAN Meiling, et al. Enzyme immobilization on ZIF-67/MWCNT composite engenders high sensitivity electrochemical sensing[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019, 833: 505-511. DOI:10.1016/j.jelechem.2018.12.027.
- [19] RAFIEI S, TANGESTANINEJAD S, HORCAJADA P, et al. Efficient biodiesel production using a lipase@ZIF-67 nanobioreactor[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 334: 1233-1241. DOI:10.1016/j.cej.2017.10.094.
- [20] SAEI A A, DOLATABADI J E N, NAJAFI-MARANDI P, et al. Electrochemical biosensors for glucose based on metal nanoparticles[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 42: 216-227. DOI:10.1016/j.trac.2012.09.011.
- [21] BILAL M, IQBAL H M N. Armoring bio-catalysis via structural and functional coordination between nanostructured materials and lipases for tailored applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 166: 818-838. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.239.
- [22] GE Jun, LEI Jiandu, ZARE R N. Protein-inorganic hybrid nanoflowers[J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(7): 428-432. DOI:10.1038/nnano.2012.80.
- [23] LEI Z X, GAO C L, CHEN L, et al. Recent advances in biomolecule immobilization based on self-assembly: organic-inorganic hybrid nanoflowers and metal-organic frameworks as novel substrates[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(11): 1581-1594. DOI:10.1039/c7tb03310a.
- [24] ZHANG Baoliang, LI Peitao, ZHANG Hepeng, et al. Preparation of lipase/Zn₃(PO₄)₂ hybrid nanoflower and its catalytic performance as an immobilized enzyme[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 291: 287-297. DOI:10.1016/j.cej.2016.01.104.
- [25] SHARMA N, PARHIZKAR M, CONG W, et al. Metal ion type significantly affects the morphology but not the activity of lipase-metal-phosphate nanoflowers[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(41): 25437-25443. DOI:10.1039/c7ra00302a.
- [26] WU Pan, LUO Feifan, LU Zhenghui, et al. Improving the catalytic performance of pectate lyase through pectate lyase/Cu₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers as an immobilized enzyme[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 280-287. DOI:10.3389/fbioe.2020.00280.
- [27] WEN Huan, ZHANG Lei, DU Yingjie, et al. Bimetal based inorganic-carbonic anhydrase hybrid hydrogel membrane for CO₂ capture[J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2020, 39: 101171. DOI:10.1016/j.jcou.2020.101171.
- [28] PATEL S K S, CHOI H, LEE J K. Multimetal-based inorganic-protein hybrid system for enzyme immobilization[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7(16): 13633-13638. DOI:10.1021/acssuschemeng.9b02583.
- [29] BATULE B S, PARK K S, KIM M I, et al. Ultrafast sonochemical synthesis of protein-inorganic nanoflowers[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 137-142. DOI:10.2147/ijn.s90274.
- [30] LEE H R, CHUNG M, KIM M I, et al. Preparation of glutaraldehyde-treated lipase-inorganic hybrid nanoflowers and their catalytic performance as immobilized enzymes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 105: 24-29. DOI:10.1016/j.enzmictec.2017.06.006.
- [31] REN Weifan, LI Yao, WANG Jihui, et al. Synthesis of magnetic nanoflower immobilized lipase and its continuous catalytic application[J]. *New Journal of Chemistry*, 2019, 43(28): 11082-11090. DOI:10.1039/c8nj06429f.
- [32] 冯慧, 韩娟, 黄文睿, 等. 纳米花型酶-无机杂化固定化酶研究进展[J]. *化学通报*, 2021, 84(12): 1263-1273. DOI:10.14159/j.cnki.0441-3776.2021.12.004.
- [33] LI Kai, WANG Jianhua, HE Yaojia, et al. Carbon nanotube-lipase hybrid nanoflowers with enhanced enzyme activity and enantioselectivity[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 281: 87-98. DOI:10.1016/j.jbiotec.2018.06.344.
- [34] LI Hui, HOU Jingwei, DUAN Linlin, et al. Graphene oxide-enzyme hybrid nanoflowers for efficient water soluble dye removal[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 338: 93-101. DOI:10.1016/j.jhazmat.2017.05.014.
- [35] LUO Mengying, LI Mufang, JIANG Shan, et al. Supported growth of inorganic-organic nanoflowers on 3D hierarchically porous nanofibrous membrane for enhanced enzymatic water treatment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 381: 120947. DOI:10.1016/j.jhazmat.2019.120947.
- [36] JIANG Wei, WANG Xinghuo, YANG Jiebing, et al. Lipase-inorganic hybrid nanoflower constructed through biomimetic mineralization: a new support for biodiesel synthesis[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2018, 514: 102-107. DOI:10.1016/j.jcis.2017.12.025.
- [37] SUN Tingting, FU Meihua, XING Jinfeng, et al. Magnetic nanoparticles encapsulated laccase nanoflowers: evaluation of enzymatic activity and reusability for degradation of malachite green[J]. *Water Science and Technology*, 2020, 81(1): 29-39. DOI:10.2166/wst.2020.068.
- [38] FU M H, XING J F, GE Z Q. Preparation of laccase-loaded magnetic nanoflowers and their recycling for efficient degradation of bisphenol A[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 651: 2857-2865. DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.10.145.
- [39] HWANG E T, LEE S. Multienzymatic cascade reactions via enzyme complex by immobilization[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(5): 4402-4425. DOI:10.1021/acscatal.8b04921.
- [40] HAN Juan, LUO Peng, WANG Lei, et al. Construction of a multienzymatic cascade reaction system of coimmobilized hybrid nanoflowers for efficient conversion of starch into gluconic acid[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(13): 15023-15033. DOI:10.1021/acscami.9b21511.
- [41] HAN Juan, FENG Hui, WU Jiacong, et al. Construction of multienzyme co-immobilized hybrid nanoflowers for an efficient conversion of cellulose into glucose in a cascade reaction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(28): 7910-7921. DOI:10.1021/acs.jafc.1c02056.
- [42] LI B, WEN H M, CUI Y J, et al. Emerging multifunctional metal-organic framework materials[J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(40): 8819-8860. DOI:10.1002/adma.201601133.
- [43] MA X J, CHAI Y T, LI P, et al. Metal-organic framework films and their potential applications in environmental pollution control[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(5): 1461-1470. DOI:10.1021/acs.accounts.9b00113.
- [44] LI B, WEN H M, ZHOU W, et al. Porous metal-organic frameworks for gas storage and separation: what, how, and why?[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2014, 5(20): 3468-3479. DOI:10.1021/jz501586e.
- [45] 赖欣宜, 王志勇, 郑永太, 等. 纳米金属有机框架材料在药物递送领域的应用[J]. *化学进展*, 2019, 31(6): 783-790. DOI:10.7536/PC181029.
- [46] 陈思怡, 陈垦, 由天辉, 等. 金属有机框架纳米酶的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2021, 48(1): 6-23. DOI:10.16476/j.pibb.2020.0282.

- [47] ZHOU M, JU X, ZHOU Z, et al. Development of an immobilized cellulase system based on metal-organic frameworks for improving ionic liquid tolerance and *in situ* saccharification of bagasse[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019, 7(23): 19185-19193. DOI:10.1021/acssuschemeng.9b05175.
- [48] CHENG Xiqing, ZHOU Jinhong, CHEN Jiayu, et al. One-step synthesis of thermally stable artificial multienzyme cascade system for efficient enzymatic electrochemical detection[J]. Nano Research, 2019, 12(12): 3031-3036. DOI:10.1007/s12274-019-2548-8.
- [49] SHOMAL R, OGUBADEJO B, SHITTU T, et al. Advances in enzyme and ionic liquid immobilization for enhanced in MOFs for biodiesel production[J]. Molecules, 2021, 26(12): 3512. DOI:10.3390/molecules26123512.
- [50] CAI Xinyong, ZHANG Mengjie, WEI Wei, et al. The Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by ZIF-8 encapsulation and macroporous resin adsorption: preparation and characterizations[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(2): 269-276. DOI:10.1007/s10529-019-02771-6.
- [51] NADAR S S, RATHOD V K. Immobilization of proline activated lipase within metal organic framework (MOF)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 152: 1108-1112. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.199.
- [52] XU Weiqing, JIAO Lei, YAN Hongye, et al. Glucose oxidase-integrated metal-organic framework hybrids as biomimetic cascade nanozymes for ultrasensitive glucose biosensing[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(25): 22096-22101. DOI:10.1021/acscami.9b03004.
- [53] LI Yan, LIU Jiangtao, ZHANG Kehu, et al. UiO-66-NH₂@PMAA: a hybrid polymer-MOFs architecture for pectinase immobilization[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2018, 57(2): 559-567. DOI:10.1021/acs.iecr.7b03398.
- [54] LIU J, LIANG J Y, XUE J Y, et al. Metal-organic frameworks as a versatile materials platform for unlocking new potentials in biocatalysis[J]. Small, 2021, 17(32): 2100300. DOI:10.1002/smll.202100300.
- [55] NONG Wenqian, CHEN Yinglu, LÜ Danyu, et al. Metal-organic framework based nanozyme hybrid for synergistic bacterial eradication by lysozyme and light-triggered carvacrol release[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 431: 134003. DOI:10.1016/j.cej.2021.134003.
- [56] GAO Xia, DING Yu, SHENG Yude, et al. Enzyme immobilization in MOF-derived porous NiO with hierarchical structure: an efficient and stable enzymatic reactor[J]. ChemCatChem, 2019, 11(12): 2828-2836. DOI:10.1002/cctc.201900611.
- [57] PENG Huan, RÜBSAM K, JAKOB F, et al. Reversible deactivation of enzymes by redox-responsive nanogel carriers[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2016, 37(21): 1765-1771. DOI:10.1002/marc.201600476.
- [58] FUSCO G, CHRONOPOULOU L, GALANTINI L, et al. Evaluation of novel Fmoc-tripeptide based hydrogels as immobilization supports for electrochemical biosensors[J]. Microchemical Journal, 2018, 137: 105-110. DOI:10.1016/j.microc.2017.10.002.
- [59] HUANG Jiajia, JIAO Lei, XU Weiqing, et al. Immobilizing enzymes on noble metal hydrogel nanozymes with synergistically enhanced peroxidase activity for ultrasensitive immunoassays by cascade signal amplification[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(28): 33383-33391. DOI:10.1021/acscami.1c09100.
- [60] LIANG Hao, JIANG Shuhui, YUAN Qipeng, et al. Co-immobilization of multiple enzymes by metal coordinated nucleotide hydrogel nanofibers: improved stability and an enzyme cascade for glucose detection[J]. Nanoscale, 2016, 8(11): 6071-6078. DOI:10.1039/c5nr08734a.
- [61] ROMERO-ARCOS M, GARNICA-ROMO M G, MARTÍNEZ-FLORES H E. Electrochemical study and characterization of an amperometric biosensor based on the immobilization of laccase in a nanostructure of TiO₂ synthesized by the sol-gel method[J]. Materials, 2016, 9(7): 543. DOI:10.3390/ma9070543.
- [62] PENG Huan, RÜBSAM K, JAKOB F, et al. Tunable enzymatic activity and enhanced stability of cellulase immobilized in biohybrid nanogels[J]. Biomacromolecules, 2016, 17(11): 3619-3631. DOI:10.1021/acs.biomac.6b01119.
- [63] JI Xiaotian, LIU Jinchuan, LIU Li, et al. Enzyme-polymer hybrid nanogels fabricated by thiol-disulfide exchange reaction[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 148: 41-48. DOI:10.1016/j.colsurfb.2016.08.043.
- [64] ZOU Bin, YAN Yan, XIA Jiaojiao, et al. Enhancing bio-catalytic activity and stability of lipase nanogel by functional ionic liquids modification[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 195: 111275. DOI:10.1016/j.colsurfb.2020.111275.
- [65] HUMENIK M, PREIB T, GÖDRICH S, et al. Functionalized DNA-spider silk nanohydrogels for controlled protein binding and release[J]. Materials Today Bio, 2020, 6: 100045. DOI:10.1016/j.mtbio.2020.100045.
- [66] SAN B H, HA E J, PAIK H J, et al. Radiofrequency treatment enhances the catalytic function of an immobilized nanobiohybrid catalyst[J]. Nanoscale, 2014, 6(11): 6009-6017. DOI:10.1039/c4nr00407h.
- [67] XU Li, KE Caixia, HUANG Ying, et al. Immobilized *Aspergillus niger* lipase with SiO₂ nanoparticles in sol-gel materials[J]. Catalysts, 2016, 6(10): 149. DOI:10.3390/catal6100149.