

MOFs 孔结构对固定化酶性能影响的研究进展

程凯鹏¹, 张申梦¹, 李立鑫¹, 魏梓悦¹, 黄霞辉¹, 赵俭波^{2*}

(1. 周口师范学院 化学化工学院, 河南 周口 466000; 2. 塔里木大学 化学化工学院, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要: 固定化酶是实现酶制剂产业化应用的有效途径, 载体是影响固定化酶催化效果的关键因素。金属有机框架 (MOFs) 是结构高度有序的多孔材料, 具有构效关系明确、孔结构均一、孔道性质与化学性质在原子层面可调、可设计和易化学修饰等特点, 近年来, 其作为酶载体方面的研究已有较大的进展。该文以 MOFs 孔结构对固定化酶性能的影响为主题, 分析了 MOFs 孔结构的影响因素, 总结了酶在笼型空穴与通道型孔这 2 种典型孔中负载的研究进展, 详细论述了 MOFs 孔结构对酶的固定化、活性等方面的影响。最后, 指出多级孔在固定化酶强化传质方面的特殊作用以及开发孔-酶匹配 MOFs 的重要性, 展望了利用 MOFs 自身催化能力在纳米尺度内构建高效化学-酶级联催化剂的发展优势, 以及通过调控微环境强化酶催化过程的可行性。

关键词: 固定化酶; 金属有机框架; 孔结构; 笼型空穴; 通道型孔

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 08-1647-11

Research progress in effect of MOFs pore structure on properties of immobilized enzymes

CHENG Kaipeng¹, ZHANG Shenmeng¹, LI Lixin¹, WEI Ziyue¹,
HUANG Xiahui¹, ZHAO Jianbo^{2*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466000, Henan, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China)

Abstract: Enzyme immobilization is an effective approach to promote its industrial applications, with the carrier the key influencing factor on the catalytic performance of immobilized enzymes. Metal-organic frameworks (MOFs), highly ordered porous materials with clear structure-function relationships, uniform pore size distribution, tunable and designable porosity at the atomic level, have made significant progress as enzyme carrier. This review focused on the influence of MOFs pore structure on their enzyme immobilization performance. Herein, the influencing factors on MOFs pore structure were analyzed, followed by research progress summarization on enzyme loading in cage-type cavities and channel-type pores with a detailed description on the influence of porosity on enzyme immobilization, enzyme activity etc. Finally, the special role of MOFs hierarchical-structure in enhancing mass transfer with immobilized enzymes and the importance of developing pore-enzyme matching MOFs were pointed out, while the development advantages of utilizing MOFs autocatalytic ability to construct high-efficiency chemical-enzyme cascade catalysts in nanometer scale and the feasibility of enhancing enzyme catalytic process by regulating microenvironment were discussed.

Key words: enzyme immobilization; metal-organic frameworks; pore structure; cage-type cavities; channel-type pores

收稿日期: 2023-09-25; 定用日期: 2023-10-30; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230813

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22268038); 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) 项目 (222102310430); 周口师范学院高层次人才科研启动经费资助项目 (ZKNUC2021017)

作者简介: 程凯鹏 (1990—), 男, 博士, E-mail: henuckp@163.com. 联系人: 赵俭波 (1982—), 男, 教授, E-mail: lain_1982@163.com.

酶是一种结构精细的大分子催化剂,具有传统化学催化剂不具备的高特异性、高活性的优点,是理想的工业催化剂^[1]。但是,酶制剂在使用中常面临着对操作环境敏感、与反应体系分离困难、长期催化活性降低、部分需要辅酶参与、生产成本高等普遍性问题^[2-6]。通过酶固定化的方法,将酶制剂限制在固相载体中,可以提高其对操作环境的耐受性,保持催化的稳定性,实现操作的连续性,是实现酶制剂在工业中应用的有效途径^[2,7-9]。其中,载体的选择与设计是关键。

自 1916 年酶固定化被提出以来,包括硅藻土、活性炭、分子筛、硅材料、聚合物、囊泡等多种多孔性材料都被用作酶载体^[10-11]。其中,金属有机框架(MOFs)作为具有周期性规整结构的多孔材料,受到了人们的广泛关注^[12-15]。MOFs 是金属(簇)与有机配体通过配位络合的方式形成的多孔材料,被用于多个领域^[16-18]。由于 MOFs 既满足载体所需的结构刚性与多孔性,又具备构效关系明确、孔结构均一、孔道性质与化学性质在原子层面可调可设计和易化学修饰等优势,因此是一种有前景的酶载体材料。

近年来,MOFs 固定化酶的研究已经取得了很大的进展,前人对此也进行了系统性综述,但主要集中在固定化方法与应用方面,对 MOFs 自身孔道结构与固定化酶间构效关系的总结较少^[2,15,19-23]。理想的酶载体既要有供酶负载的较大孔道,又要有保障传质的未被占据的互通孔道,所以 MOFs 自身孔

道结构是影响酶固定效果的重要因素。本文将综述不同孔道特点的 MOFs 固定化酶的研究进展,侧重于比较不同孔道结构对酶固定效果的影响,并对未来的发展作出展望。

1 MOFs 孔结构的影响因素分析

受限于 MOFs 产生机制,大部分 MOFs 为微孔材料,而酶作为生物大分子,较难实现孔内的负载,并且单一的孔道被酶占据后较难进行传质过程。因此,固定化酶载体需要为固定化酶提供合适的孔,还要为底物输送提供通道,如图 1A 所示。因此,具有介孔或者多级孔的 MOFs 才适合固定化酶。MOFs 形成孔道时,孔径通常与配体尺寸成正比,因此,延长配体尺寸是目前增大孔径的常用方式。而孔的形状或对称性才是影响孔径大小的关键因素^[14,24-25]。

MOFs 常见的 2 种孔为笼型空穴与通道型孔,在分析孔径时通常将二者近似看作正多边形以分析其尺寸,如图 1B 所示^[26]。对于边长为 a 的正 n 边形,其内切圆的直径 d (亦即孔径)可由公式: $d=a/\tan(\pi/n)$ 表示, a 作为孔横截面的边,与配体的长度成正比;孔径 d 与边长 a 和多边形的边数 n 存在关系。由此可知,与延长配体长度相比,增加多边形的数目更有益于增长最终孔径 d ,即对孔形状与对称性的调控将直接影响孔的尺寸与多级性。因此,本文将以笼型空穴与通道型孔为线索,探究不同孔结构性质与酶固定化效果的关系。

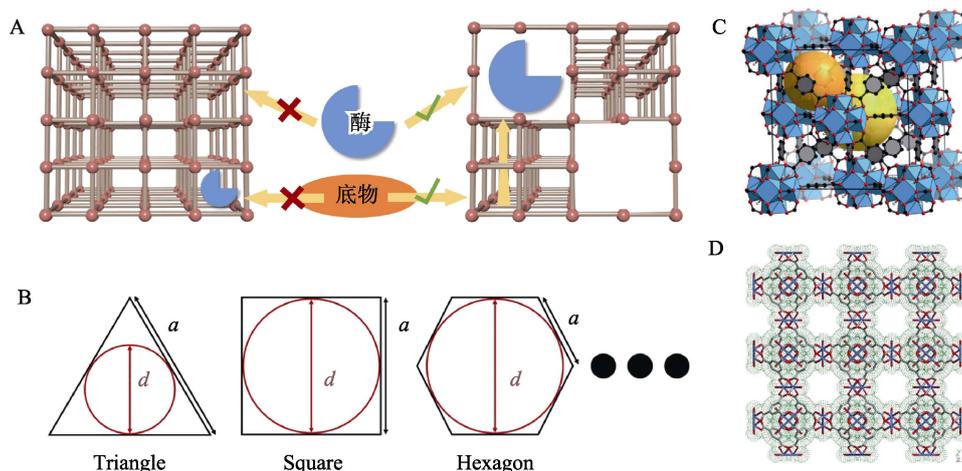


图 1 酶在不同孔结构 MOFs 固定化酶示意图(载体应既能将酶固定在其内部,又能为底物输送提供通道)(A)及正多边形中,内切圆直径与边长关系示意图(B)^[26];典型笼型空穴结构(UiO-66)示意图,四面体笼(橙色)、八面体笼(黄色)(C)^[27];典型通道型孔(HKUST-1)示意图,沿(100)晶面方向的六边形一维通道(D)^[28]

Fig. 1 Enzyme schematic diagram of enzyme immobilized on MOFs with different porous structures) (the carrier should both immobilize the enzyme within it and provide a channel for substrate delivery) (A), and relationship between edge and diameter in regular polygons (B)^[26]; Topology scheme of cage-type cavities [UiO-66, tetrahedral cavity (orange), octahedral cavity (yellow)] (C)^[27]; Topology scheme of channel-type pores [viewed down the (100) direction, showing nanochannels with fourfold symmetry] (D)^[28]

2 笼型空穴 MOFs 酶固定化

空穴是 MOFs 的常见笼型孔, 可以为酶的固定化提供场所, 同时笼遍布较小尺寸窗口时, 各空穴可连通并且底物可达。如图 1C 所示的 UiO-66 的典型笼型空穴结构。当酶的尺寸与窗口大小匹配时, 酶可以穿过窗口进入更大的笼型空穴, 实现酶的固定化, 并且通常一个空穴仅能容纳一个酶, 这样可以避免因酶聚集而自聚合造成的活性损失。但是, 当酶各向尺寸比窗口更大时, 酶需要改变构象以穿过窗口进入笼型空穴。这种构象的变化存在风险, 可能会造成酶活性的不可逆降低。

MA 课题组^[29]于 2011 年首次使用具有介孔结构的笼型 Tb-MesoMOF 封装微过氧化物酶 (MP-11, 3.3 nm×1.7 nm×1.1 nm) 得到 MP-11@Tb-MOF。Tb-MesoMOF 具有内径分别为 3.9 和 4.1 nm 的 2 种笼型空穴, 同时存在连通空穴的 1.3、1.7 nm 五边形、六边形的微孔窗口和可促进底物传输的 0.9 nm 通道型孔, 如图 2a 所示。在浸渍过程中, MP-11 可沿着最短的尺寸方向通过多边形窗口进入空穴内部实现固定化。MP-11@Tb-MesoMOFs 表现出优于自由酶的催化活性, 其初始反应速率和 25 h 底物转化率分别为自由酶的 1.18 和 3.96 倍。并且这种单分散的酶在催化过程中速率稳定, 未观察到自由酶催化 30 min 后因自聚产生的反应速率降低现象。此外, MP-11@Tb-MesoMOFs 在催化过程中没有检出酶流失, 累计使用 7 次后, 活性仍可达 53%; 而对对照组 MP-11@MCM-41 由于酶流失, 第 3 次催化时活性下降至 28%。通过后续的分析, CHEN 等^[30]发现, MP-11 中的血红素基团与 Tb-MesoMOFs 配体中三嗪基团存在较强的 π - π 相互作用, 这种内部作用力抑制了酶在催化过程中的流失。

与 MP-11 不同, 分子尺寸大于 Tb-MesoMOF 窗口尺寸的肌红蛋白 (Mb, 2.1 nm×3.5 nm×4.4 nm)、细胞色素 C (Cyt C, 2.6 nm×3.2 nm×3.3 nm) 也可以进入到 Tb-MesoMOF 的笼型空穴中^[31-32]。CHEN 等^[32]通过光谱表征阐述了 Cyt C 通过改变构象穿过小窗口进入到空穴内部的过程 (图 2b), Cyt C 首先在载体外表面发生吸附, 这种吸附导致血红素基团中甲硫氨酸残基与 Fe 的化学键断裂及三级结构的改变, Cyt C 部分展开并通过迁移进入到空穴中。受 Cyt C 疏水残基与 Tb-MesoMOF 疏水空穴的作用, 前者以一种非自然的形态存在于 Cyt C@Tb-MesoMOF。类似的迁移过程也存在于 Mb@Tb-MesoMOF 的制备过程中, 不同的是, Mb@Tb-MesoMOF 表现出择形催化的能力^[31]。受酶分子尺寸限制, 空穴容纳 1 个 Mb 分子后较难继续进行底物传输, 因此, 只能

通过孔径为 0.9 nm 的通道型孔进行传质。当底物为 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS, 1.0 nm×1.7 nm) 时, 底物不能通过孔道到达催化位点, Mb@Tb-MesoMOF 不具有催化能力, 但它能催化氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, 0.57 nm×0.58 nm), 表现出底物择形性。这种择形特性在提高催化选择性、防止酶受外界干扰失活等方面都有较好的应用前景。

酶作为结构精密的大分子, 其构象的改变通常会造成功能的降低, Mb@Tb-MesoMOF 活性仅为自由酶的 50%, 因此, 如果拓展笼型空穴, 就可得到具有更大窗口的 MOFs 用以封装酶, 以便能更好地维持酶的活性。FENG 等^[26]通过改变 MIL-100 配体与金属节点作用力的对称性设计新配体, 合成了具有大窗口、2 种尺寸笼型空穴的 PCN-333, 并以此为基础实现了单酶、双酶的可控有序封装。M₃(μ_3 -O)(OH)(H₂O)₂ (M=Al、Fe) 与配体相连形成 PCN-333 的超四面体, 继而形成 3 种笼型空穴, 如图 2c 所示。PCN-333 最小空穴为上述超四面体, 腔内孔径 1.1 nm; 中等空穴由 20 个超四面体通过共用顶点的方式形成, 其五边形窗口尺寸为 2.59 nm、腔内孔径为 4.2 nm; 最大空穴由 24 个超四面体通过同样的方式形成, 同时具有 2.59 nm 的五边形窗口和 3.0 nm 的六边形窗口, 腔内孔径为 5.5 nm。这种酶载体的分级孔结构既提供了酶负载的场所, 又保留了体相与酶之间物质交换的通道, 是一种理想的酶载体。选择 3 种大小不同的酶 [辣根过氧化物酶 (HRP)、Cyt C 和 MP-11] 评价孔结构对酶固定的影响: 尺寸最大的 HRP (4.0 nm×4.4 nm×4.8 nm) 只能容纳在 5.5 nm 的空穴内, 尺寸中等的 Cyt C 可以容纳在 5.5、4.2 nm 的空穴内, 尺寸最小的 MP-11 可以容纳在 5.5、4.2、1.1 nm 的 3 种空穴中。并且受益于 PCN-333 丰富的孔道结构, 3 种酶的负载量分别可达 1.00 (HRP)、0.95 (Cyt C)、0.89 (MP-11) g/g。3 种固定化酶在缓冲液中的初始反应速率 (k_{cat} , min⁻¹) 比自由酶有明显下降, 但米氏常数 (K_m , mmol/L) 明显降低, 说明 3 种固定化酶对底物的亲和力更强, 较低的底物浓度即可达到较高的催化反应速率。此外, Cyt C@PCN-333 在水溶液中的 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m [L/(min·mmol)] 分别是自由酶的 1.80、28.97 倍, 表明其对环境的耐受性明显增强。

在上述单酶可控负载的基础上, LIAN 等^[33]设计合成了具有相同拓扑结构但空穴更大的 PCN-888 (具有 2.0、5.0、6.2 nm 的腔内尺寸和 2.5、3.6 nm 的窗口尺寸), 并选择葡萄糖氧化酶 (GOx, 6.0 nm×5.2 nm×7.7 nm)、HRP 构建高效级联催化剂, 如图

2d 所示。通过控制负载顺序, GOx 和 HRP 可分别封装在最大 (6.2 nm) 及中等空穴 (5.0 nm) 中, 并且留出最小空穴 (2.0 nm) 用于底物传输。这种有

序的固定化可以有效减小中间物的传质距离, 避免无效扩散。动力学分析发现, PCN-888-en (固定化级联催化剂) 最大反应速率是自由酶的 1.92 倍。

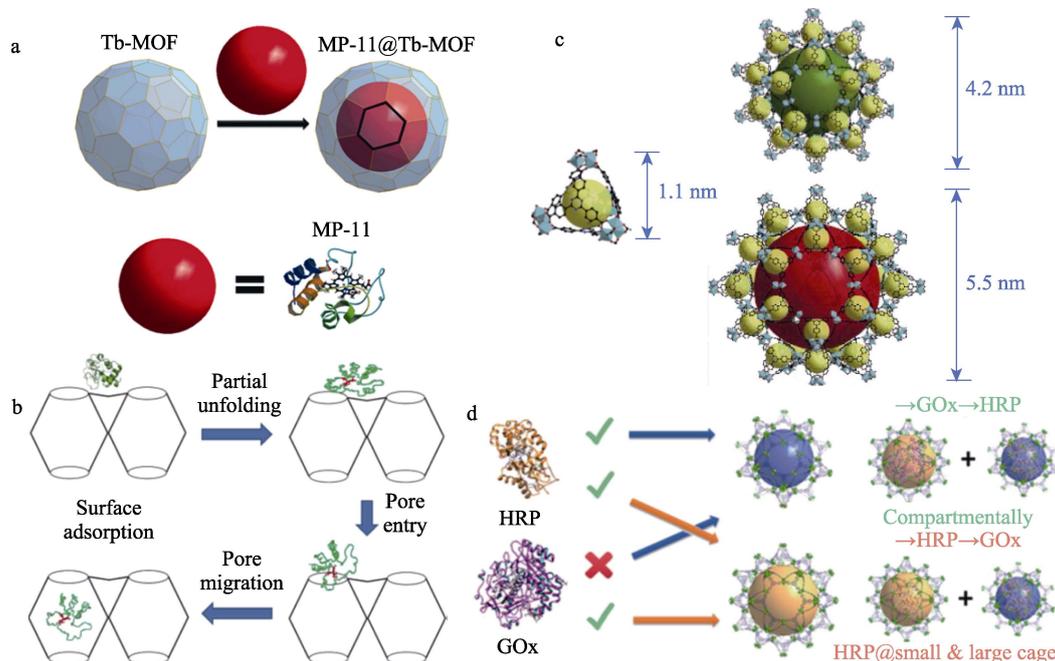


图 2 Tb-MesoMOF 空穴结构与封装 MP-11 示意图 (a)^[29]; Cyt C 通过改变构象穿过小窗口进入 Tb-MesoMOF 示意图 (b)^[32]; 超四面体空腔为基础形成多元笼型空穴示意图 (c)^[26]; 通过改变负载顺序实现双酶定点负载示意图 (d)^[33]
Fig. 2 Schematic diagram of Tb-MesoMOF cavity and encapsulation of MP-11 (a)^[29]; Schematic diagram of migration process of Cyt C into Tb-MesoMOF cavity through narrow windows (b)^[32]; Schematic diagram of super tetrahedral unit and large cavities of PCN-333 (c)^[26]; Schematic diagram of fixed point loading of double enzymes by changing loading orders (d)^[33]

目前, 具备与酶适配空穴和窗口的 MOFs 仍较少, 绝大部分的 MOFs 为孔径 < 2 nm 的微孔结构, 酶较难进入到孔道内部, 因此, 通过不同形式的孔径调控, 开发更多的 MOFs 用于固定化酶, 是一个重要的发展方向。文献^[34]报道, 笼型空穴的尺寸主要和构筑单元的数目以及共用单元连接度有关, 构筑单元数目越多, 且共用单元连接度越小, 则笼型空穴越大 (图 3a、b)。在此基础上又合成出具有 3.8 nm 空穴的 MOF-808 和具有 4.9、6.0 nm 空穴的 MOF-919, 并考察二者对胰岛素的负载能力, 其负载量可分别达到 2.80、3.79 nmol/g。该工作以小尺寸配体为基础构筑单元数目与单元连接度, 所得 MOFs 的孔径与配体尺寸比可达 15, 为其他介孔 MOFs 的设计和制备提供了依据。

使用模板剂是另一种调控孔结构的途径。ZIF-8 是生物友好、制备简单的具有笼型空穴孔结构的 MOFs, 在生物医药、催化、分离等领域都有广阔的应用前景。ZIF-8 由 0.34 nm 的六元环窗口通过共用顶点的方式形成 1.1 nm 空穴, 酶不能穿过该狭小窗口, 也不能占据空穴, 因此, 不能通过浸渍的方式固定化酶。CHENG 等^[35]前期通过引入水凝胶模板

剂, 形成了多级孔 ZIF-8 (HZIF-8), 它既保留了 ZIF-8 的微孔孔道用于底物传输, 又具有介孔孔道实现酶的孔内固定化, 如图 3c 所示。HZIF-8 的介孔孔径为 6.2~27.5 nm, 介孔孔体积分数在 45.97%~59.17% 内可调, 通过调控可得到最适载体以减少传质阻力, 强化催化过程。在 GOx 和 HRP 固定化双酶级联催化 ABTS 氧化的模型反应中, 其催化效率 (k_{cat}/K_m) 是自由双酶的 7.7 倍, 并且累计使用 20 批次后酶活仍保持 50% 以上, 同时, 该固定化酶对环境温度与 pH 具有更强的耐受性。

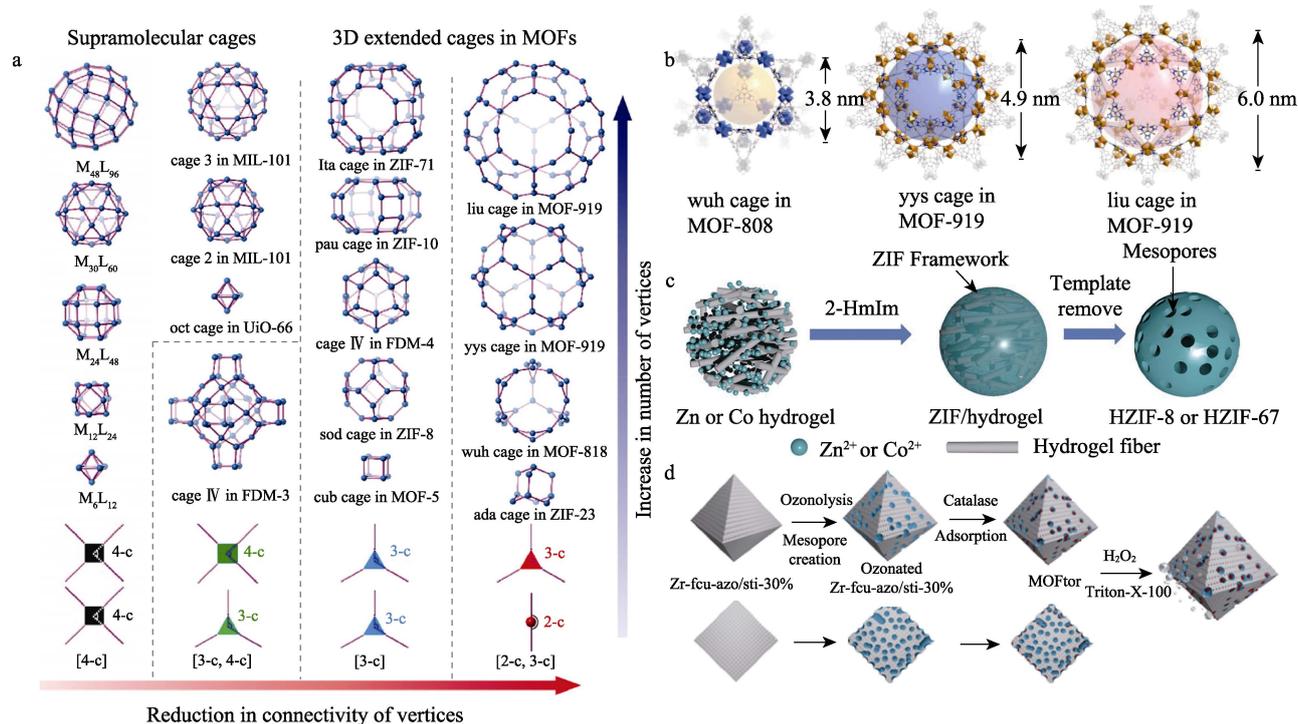
除此之外, 微流控技术^[36]、调控配体-金属比例^[37]、水腐蚀^[38]、鞣酸腐蚀^[39]等方式都可得到多级孔 ZIF-8, 得益于多级孔 ZIF-8 丰富的孔道结构, 相应的载酶催化效果也都有了明显的提升。但是这种随机性的孔道生成方式不利于更深入地探究孔结构与酶固定化间的关系。

与随机的多级孔生成方式不同, 周宏才课题组^[40]提出了混合配体制备规整周期性多级孔 MOFs 的方法: 根据混合配体与金属配位稳定性的差异, 通过热解除去热不稳定性配体——金属配位物质产生结构缺陷, 从而形成具有周期性规整结构的多级孔

MOFs。UiO 型 MOFs 虽然是一类适用范围广、稳定性强的 MOFs, 但它仅具有 0.6 nm 的空穴, 不能实现酶的封装。YANG 等^[41]以偶氮苯-4,4-二羧酸 (H_2azo) 和 4,4-二苯乙烯二羧酸 (H_2sti) 为混合配体, 制备微孔 UiO 型 MOFs, 后续除去 sti-Zr 配位物而形成规整的介孔 UiO-66 (图 3d)。UiO-66 具有可容纳过氧化氢酶 (CAT) 的介孔, 当 H_2O_2 存在时, $CAT@UiO-66$ 可在酶催化产生 O_2 的推动作用下喷射式前进。这种引入缺陷的方法适用于多种 MOFs, 可以将更多具有微孔结构的 MOFs 改造为适宜的酶载体。在合成

UiO-66 的过程中引入十二烷酸作为调节剂, 也能形成热敏型配位结构, 由此产生多级孔结构 UiO-66 可用于酶固定化^[42-43]。ZHAO 等^[44]通过构筑胶束, 也得到了多级孔 UiO 型酶载体, 并实现药物的靶向释放。

与模板法得到的多级孔 MOFs 相似, 上述产生多级孔的方式都不能改变原有空穴的尺寸, 只能在原有空穴引入较大的孔道, 酶通常只能固定在空穴的间隔内, 因此原有空穴仍具有传质功能。这种固定方式可能会减弱酶与载体间的作用力, 存在催化过程中酶流失的风险。



其中, M_mL_n 中 m 和 n 代表金属 (M) 和配体 (L) 数; Ita、pau、sod、cub、liu、yys、wuh、ada、fcu 为 3D 结构中笼名称; 2/3/4-c 为同一顶点被共用次数; d 中 30% 代表 $n(H_2azo) : n(H_2sti) = 7 : 3$; 2-HmIm 为 2-甲基咪唑; MOFtor 为 MOF-motor

图 3 笼型空穴节点数与节点连接度对空穴尺寸与结构的影响 (a)^[34]; 小配体通过大节点数和低连接度形成 MOF-818 和 MOF-919 的空穴结构图 (b)^[34]; 通过模板剂得到多级孔 ZIF-8 示意图 (c)^[35]; 通过混合配体得到多级孔八面体型 UiO-66 示意图 (d)^[41]

Fig. 3 Effect of the number of cage cavity joints and joint connection degree on hole size and structure (a)^[34]; Hole structure diagrams of MOF-818 and MOF-919 formed by small ligands with large nodule number and low connectivity (b)^[34]; Schematic diagram of mesopores of ZIF-8 by hydrogel template removing (c)^[35]; Schematic representation of hierarchically porous octahedron UiO-66 by mixing ligands (d)^[41]

3 通道型孔道酶固定化

通道型孔是 MOFs 另一种常见孔道, 是指在某一维度的尺寸远大于其他维度尺寸的孔道。与笼型 MOFs 类似, 通道型 MOFs 也可以具有分级的孔道、孔壁窗口 (图 1D)。

PISKLAK 等^[45]最早将 MP-11 固定到具有一维通道型孔道的 Cu-MOF 中, 该 MOFs 较大的四边形通道孔径为 2.2 nm, 并且在垂直于该通道方向上存

在孔径为 0.9 nm 的层间狭缝型孔。MP-11 进入到 2.2 nm 孔道中后, 对环境的耐受性有了很大的提升, MP-11@Cu-MOF 在 N,N -二甲基甲酰胺 (DMF) 中催化底物的转化率约是自由酶的 7 倍。但对 MP-11 耐受性提高的原因和孔道对固定化酶性能的影响未作更深入的研究。

理想的酶载体应既能封装酶以提高其对环境的耐受性, 又能够为底物、中间物、产物在反应基质、酶之间的运输提供通道。FARHA 课题组^[46-49]

提出了多级孔结构 MOFs 固定化酶的策略, 并合成了 NU-100X (X=0~7) 系列的 MOFs (图 4a)。该系列 MOFs 既具有大的通道以容纳酶(图 4a 紫色六边形所示), 又具有不能被酶占据的小通道用于传质(图 4a 蓝色三角形所示), 并且通道壁面有窗口, 可实现孔道间的互通(图 4a 黄色四边形所示)。NU-1000 是第 1 个具有上述多级孔结构的 MOFs, 其具有平行的 0.9 nm 三角形通道和 3.3 nm 六边形通道, 前者不会被酶堵塞用以传质, 后者尺寸比角质酶 (Cuiinase, 3.0 nm×3.0 nm×4.5 nm) 略大, 用以实现酶的固定化^[47]。Cuiinase@NU-1000 在常规缓冲

液中表现出与自由酶相当的初始催化速率, 当反应体系中加入尿素、四氢呋喃等对酶危害较大的物质时, 前者仍能表现出很好的催化能力。通过对固定化酶的底物可达性系统分析, 结果表明, NU-1000 固定化酶时, 酶占据最大通道后, 底物仍通过三角形通道与四边形孔壁窗口在横纵 2 个维度维持传质。为了证实此观点, 分别选择分子尺寸不同的荧光物质异硫氰酸荧光素 (FITC, 1.0 nm×0.8 nm×0.5 nm)、4-羧基苯基吡啶 (TCPP, 1.6 nm×1.6 nm×0.2 nm) 为模拟底物, 考察二者在荧光标记固定化酶 Cut647@NU-1000 中的传质情况。

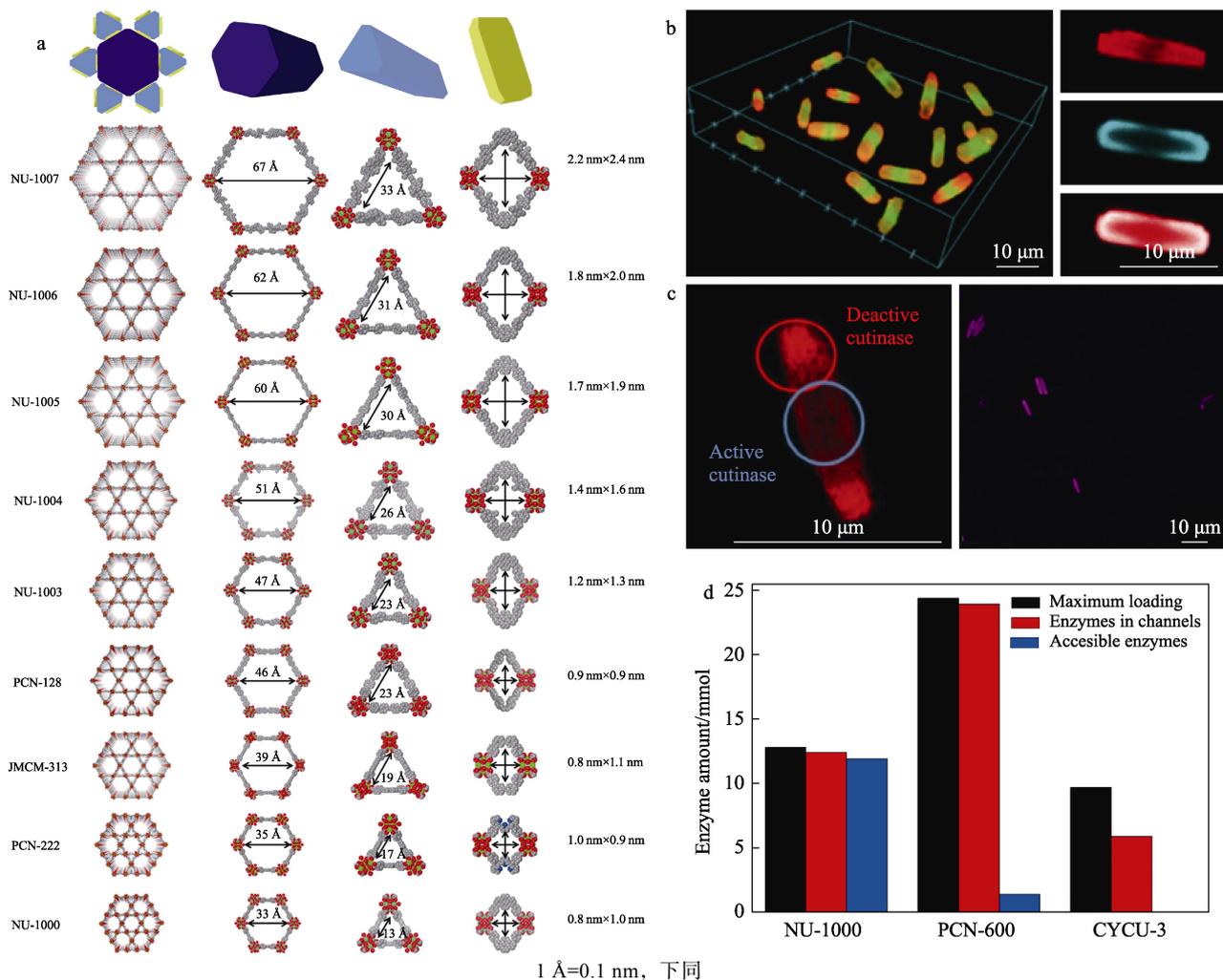


图 4 NU-100X 系列孔结构示意图 (a)^[46]; 固定化酶后模拟底物 FITC 的荧光 3D 重构图 (左)、荧光标记 Cut647@NU-1000 共聚焦显微镜图 (右上)、固定化酶后模拟底物 TCPP 的共聚焦显微镜图 (右中)、Cut647@NU-1000 与 TCPP 共聚焦显微镜重叠图 (右下) (b)^[47]; 同时负载有活性与灭活角质酶的 NU-1000 共聚焦显微镜图 (左, 有活性酶在通道内部, 无活性酶在通道进出口)、上述固定化酶催化 60 s 后产物荧光图 (右) (c)^[47]; 不同孔结构对底物可达性影响图 (d)^[47]

Fig. 4 Schematic diagram of pore structures in NU-100X (a)^[46]; Fluorescence 3D reconstruction of simulated substrate FITC after immobilized enzyme (left), confocal microscope image of fluorescence label Cut647@NU-1000 (top right), confocal microscope image of simulated substrate TCPP after immobilized enzyme (middle right), overlapping image of Cut647@NU-1000 and TCPP confocal microscope (bottom right) (b)^[47]; Confocal microscope image of NU-1000 loaded with both active and inactivated keratinase (left, active enzyme in the channel, non-active enzyme in the channel inlet and outlet), fluorescence image of the product catalyzed by the immobilized enzyme for 60 s (right) (c)^[47]; Effects of different pore structures on substrate accessibility (d)^[47]

通过 3D 重构,证实了 FITC 均匀分布在 Cut647@NU-1000 内外,而 TCPP 不能进入到 Cut647@NU-1000 内部,如图 4b 所示。并且,使用活性及灭活角质酶分别固定在 NU-1000 内外时,固定化酶仍表现出催化活性,说明底物可达孔道内部,如图 4c 所示。与 PCN-600 (具有唯一尺寸通道孔,孔壁有窗口)固定角质酶相比,NU-1000 负载量小,但底物可达率超过 90%,而 PCN-600 固定酶的底物可达率仅为 6%;并且,CYCU-3 (具有 2 种尺寸通道孔,孔壁无窗口)固定角质酶全部不可达,没有催化活性,如图 4d 所示。

接着,FARHA 课题组^[48]使用相同的理念将比角质酶尺寸更大的有机磷酸酐酶(OPAA, 4.4 nm×4.4 nm×7.8 nm)固定到具有 4.6 nm 六边形通道型孔的 PCN-128y 中,经 70 °C 干燥后的 OPAA@PCN-128y 固体粉末室温保存 3 d 后,底物催化转化率只降低约 5%,远高于对照组的自由酶。但是,可能受底物传输效率的影响,OPAA@PCN-128y 初始催化速率仅约为自由酶的 30%。为进一步通过调控孔结构促进传质,又设计并合成了具有 4.4 nm 六边形通道孔、1.7 nm 三角形通道孔、1.2 nm×1.3 nm 孔壁窗口的 NU-1003^[49],其最大孔可以容纳 OPAA,其他孔道不能被酶占据,可以增强底物传质过程;同时,

如图 5a 所示,调节载体颗粒大小能减小底物在孔道内的传质距离,改善催化效果。因此,可对 NU-1003 的晶粒尺寸在 300~10000 nm 范围内调节。通过上述孔道结构与晶粒大小的优化,OPAA@NU-1003-300 nm 的初始酶促反应速率可达自由酶的 3.15 倍(图 5b~d)。反应底物在孔内的扩散是造成固定化酶初始反应速率小于自由酶的一个重要原因。在本体系中,晶粒尺寸最大的 OPAA@NU-1003-7000 nm 在反应前 2 min 的催化速率较慢。当晶粒尺寸减小到 2000、1000 nm 时,固定化酶初始反应速率有较大的提高,并且 10 min 内即可达到反应平衡,但该速率仍比自由酶略低。进一步减小晶粒尺寸,OPAA@NU-1003-300 nm 初始反应速率明显高于自由酶,并且先于自由酶达到底物 100% 的转化率(图 5c)。此外,OPAA@NU-1003-300 nm 在模拟人体酸碱性的条件下分解最强神经毒性甲氟磷酸频那酯(梭曼毒气, GD)时, GD 半衰期仅为 2 min,OPAA@NU-1003-300 nm 表现出远高于大晶粒固定化酶的初始反应速率,并且是自由酶的 3.15 倍(图 5d)。随着晶粒尺寸的降低,固定化酶初始反应速率明显提升,说明减小载体尺寸有助于降低反应物在颗粒内部的扩散阻力,能够让更多的底物快速接触到孔内的酶,从而达到更高的催化速率。

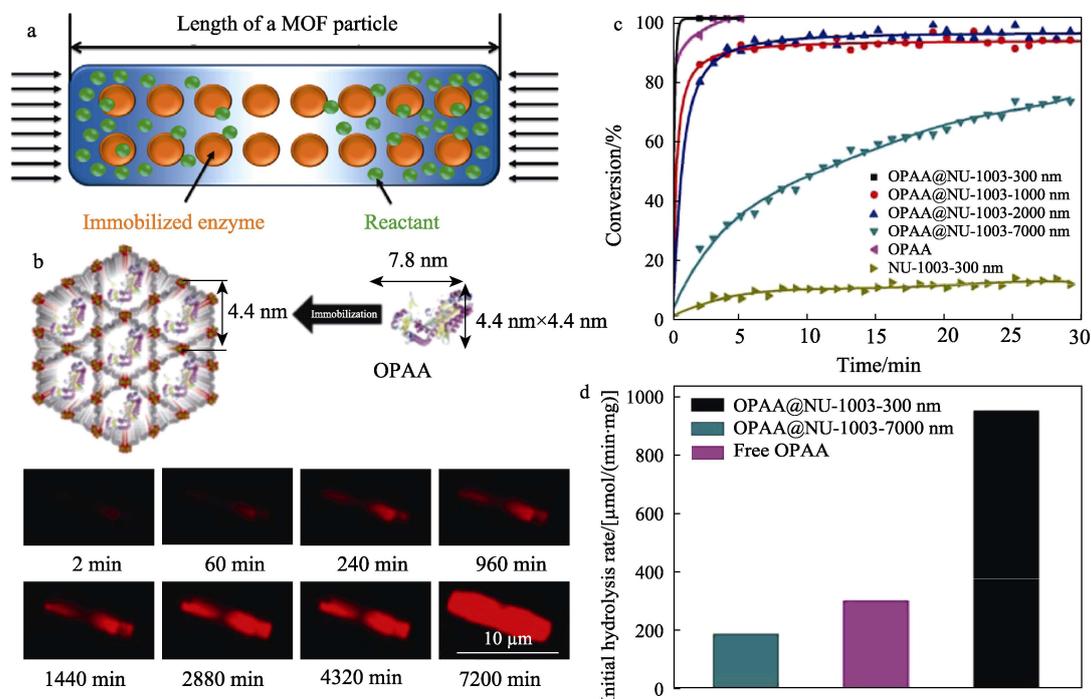


图 5 酶在 MOFs 孔道内均一负载及反应物从体相向孔内扩散示意图 (a); 时间对 OPAA 在 NU-1003 中负载影响的共聚焦显微镜图 (b); 晶粒尺寸对 NU-1003 固定化酶催化神经毒素亚磷酸二异丙酯 (DFP) 的影响 (c); 不同形式酶催化分解 GD 初始反应速率的对比 (d)^[49]

Fig. 5 Schematic diagram of homogeneous loading of enzymes in MOFs pores and diffusion of reactants from bulk to pore and influence of carrier size on mass transfer in pore (a); Confocal microscope images of the effect of time on OPAA loading in NU-1003 (b); Effect of grain size on neurotoxin diisopropyl phosphite (DFP) catalyzed by NU-1003 immobilized enzyme (c); Comparison of initial reaction rates of GD catalyzed by different enzymes (d)^[49]

除孔道物理尺寸因素外，载体与孔道的化学微环境也对固定化酶有重要的作用，它不仅通过亲疏水性以及带电性影响酶的固定化，还会通过影响酶在孔内的迁移过程对酶的负载量造成影响。近期，SHA 等^[50]使用丝氨酸与三甲基甘氨酸对 NU-1000 的化学微环境进行调控，系统探究了除孔道结构外的载体化学微环境对模型酶泛素 [1.9 nm×1.9 nm×2.4 nm，等电点 (PI) 为 6.79] 固定化的影响，如图 6a 所示。丝氨酸与三甲基甘氨酸具有伯胺、季铵基团，可以调控载体的静电微环境，同时，羟基与甲基可以调控载体的亲疏水性。通过三甲基甘氨酸 (NU-1000-Betaine)、丝氨酸 (NU-1000-Serine) 修饰以及去除金属 Zr 位点的甲基 (NU-1000-FF)，3 种载体的结晶完整性、孔结构与形貌相差不明显，但带电性与亲疏水性区别较大。NU-1000-Betaine、NU-1000-Serine 的 Zeta 电位比 NU-1000-FF 更正，说明二者可以提供更强的静电相互作用；氨基丰富的 NU-1000-Betaine 水接触角更小，亲水性更强，NU-1000-FF 次之，NU-1000-Serine 最弱。此外，为了最直观地考察孔道亲疏水性对酶负载的影响，进行了水蒸气吸附等温线测试，该曲线的拐点越靠左，则孔道亲水性越强，结果与水接触角测试结果一致。通过热力学分析，泛素的负载量与负载过程焓变有较明显的线性关系，负载过程焓降越大，则负载

量越高 (图 6b)。进一步分析发现，泛素表面含有较多的亲水性基团，热力学上更倾向于和亲水性强的孔道通过极性的相互作用发生焓降，负载过程的焓降与不同载体水蒸气吸附等温线拐点间良好的线性关系也证实了这一点。同时，热力学分析发现，NU-1000 系列更适合在 pH=5.5 的环境中负载，但实验结果显示，该条件下泛素负载量远低于热力学平衡量，仅约为 pH=7.5 时负载量的 10% (图 6c)。除了热力学的影响，化学微环境造成的传质过程改变也会影响泛素的负载量。通过实验分析发现，由于载体与泛素在酸性环境中亲和力更强，泛素到达通道型孔的进口后，存在较大的向内迁移阻力，因此孔道内部并未充分负载，导致 pH=5.5 时负载量低于理论值。该工作揭示了酶与载体间最根本的作用关系，为酶载体材料的理性设计提供了依据。

NU-100X 系列研究的成果之一就是其被广泛用于制备 MOF-酶复合物，并取得了优良的催化效果。以 CO₂ 资源化领域为例，甲酸脱氢酶 (FDH, 4 nm×6 nm×11 nm) 是一种常见的羧化酶，能够在常温下实现 CO₂ 加氢，但这个过程会消耗等物质的量的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)，后者可以在胞内通过代谢再生，但此加氢过程在胞外进行时对 NADH 的消耗在经济上是不合算的。

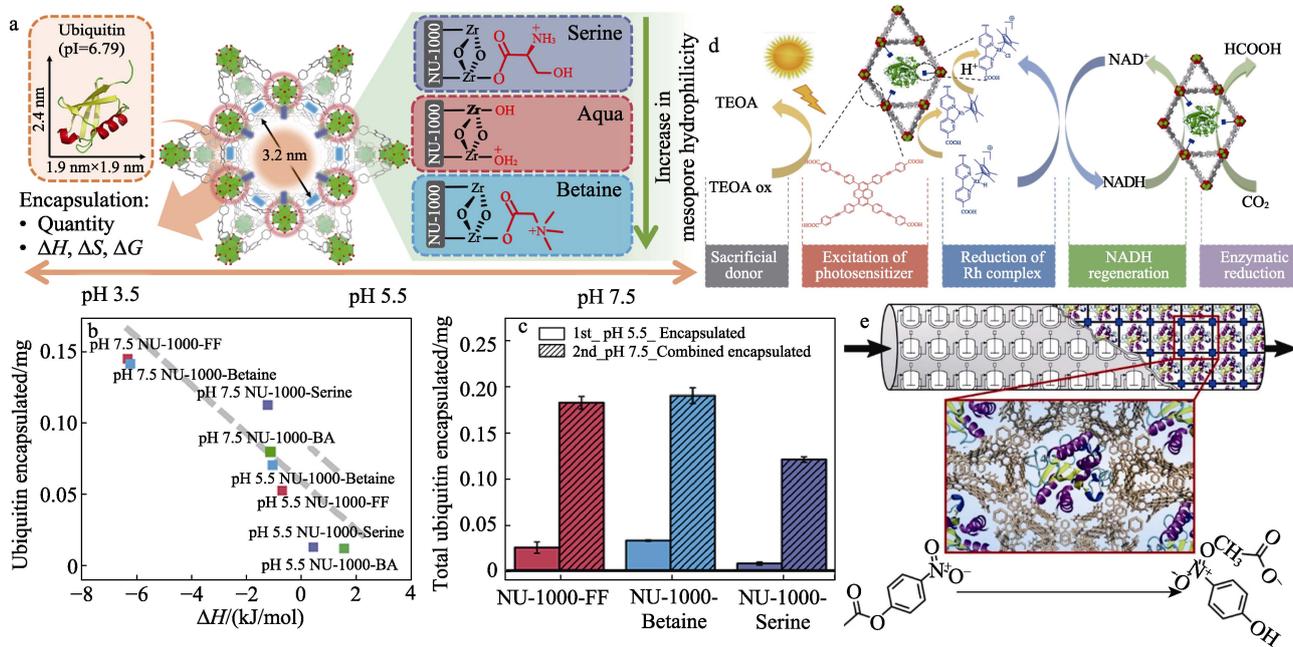


图 6 泛素结构以及不同小分子对 NU-1000 微环境调控示意图 (a)^[50]; 泛素负载量与负载过程焓变的关系 (NU-1000-BA 为苯甲酸修饰 NU-1000) (b)^[50]; 不同 pH 时泛素在不同载体中的负载量 (c)^[50]; FDH@Rh-NU-1006 通过酶-化学级联催化 CO₂ 还原反应示意图 (d)^[51]; CALB@NU-1000 构建柱反应器示意图 (e)^[52]

Fig. 6 Structure of ubiquitin and regulation of NU-1000 microenvironment by different small molecules (a)^[50]; Relationship between ubiquitin loading capacity and enthalpy change during loading (Benzoic acid-modified NU-1000 is denoted as NU-1000-BA) (b)^[50]; Loading capacity of ubiquitin in different carriers at different pH (c)^[50]; Schematic diagram of CO₂ reduction via an enzyme-chemical cascade catalyzed by FDH@Rh-NU-1006 (d)^[51]; Schematic diagram of column reactor constructed by Enzyme-NU-1000 (e)^[52]

因此, CHEN 等^[51]以具有光敏特性且孔结构与 FDH 匹配的 NU-1006 (6 nm 六边形通道型孔) 为载体, 通过配位作用将电子媒介 Rh Complex [Cp*Rh(bpy)Cl, Cp*代表五甲基环戊二烯, bpy 代表联吡啶] 锚定在载体 Zr₆ 金属簇, 在可见光的驱动下消耗牺牲剂三乙醇胺 (TEOA) 实现 NADH 的再生以供 FDH 使用。通过光催化过程与酶催化过程在同一载体的狭小空间内耦合, 各催化位点位置固定且距离很近, 反应物的传质阻力非常小, 该 FDH@Rh-NU-1006 催化剂再生 NADH 速率可达 28 mmol/(L·h), 24 h 内产甲酸的转换频率 (TOF) 值可达 865 h⁻¹, 反应示意图见图 6d。NU-1006 不仅为酶催化提供场所, 自身也表现出与酶催化级联的光化学催化能力, 并且全过程在 10 nm 孔道内完成, 实现了高效 NADH 的原位再生与 CO₂ 转化。GREIFENSTEIN 等^[52]将脂肪酶 (CALB) 封装到 NU-1000 的通道孔内, 并将 CALB@NU-1000 负载到 HPLC 色谱柱内得到连续反应器。受益于 NU-1000 独特的

孔结构, 该反应器在水相中的稳定性提高了 30 倍, 并且时空产率比对照组高 1 个数量级 (图 6e)。IRMOF-74 系列是另一种通道型孔道经过系统性调控的 MOFs。DENG 等^[25]通过延长配体的方式, 合成了 IRMOF-74 系列材料。该类 MOFs 具有六边形一维通道型孔, 其中 IRMOF-74-XI 六边形对角距离可达 9.8 nm (图 7)。该工作分析了一系列不同大小的客体分子尺寸与 IRMOF-74 通道孔尺寸的匹配性, 其中绿色荧光蛋白 (GFP, 5.2 nm×7.7 nm) 不通过构象转化就可以负载到 IRMOF-74-IX 的六边形通道内 (7.2 nm), 通过共聚焦显微镜证实了 GFP 负载到通道内部, 并且仍保留其荧光性。但并未系统分析 IRMOF-74 孔结构对酶活的影响。除此之外, HKUST-1 是另一种常见的通道型 MOFs, 也常被用作酶的载体。但 HKUST-1 的六边形通道孔径仅为 0.9 nm, 常通过表面吸附或共沉淀固定化酶。也有报道首先对 HKUST-1 进行孔改造, 再将酶固定在上述六边形通道间的缝隙中^[53-57]。

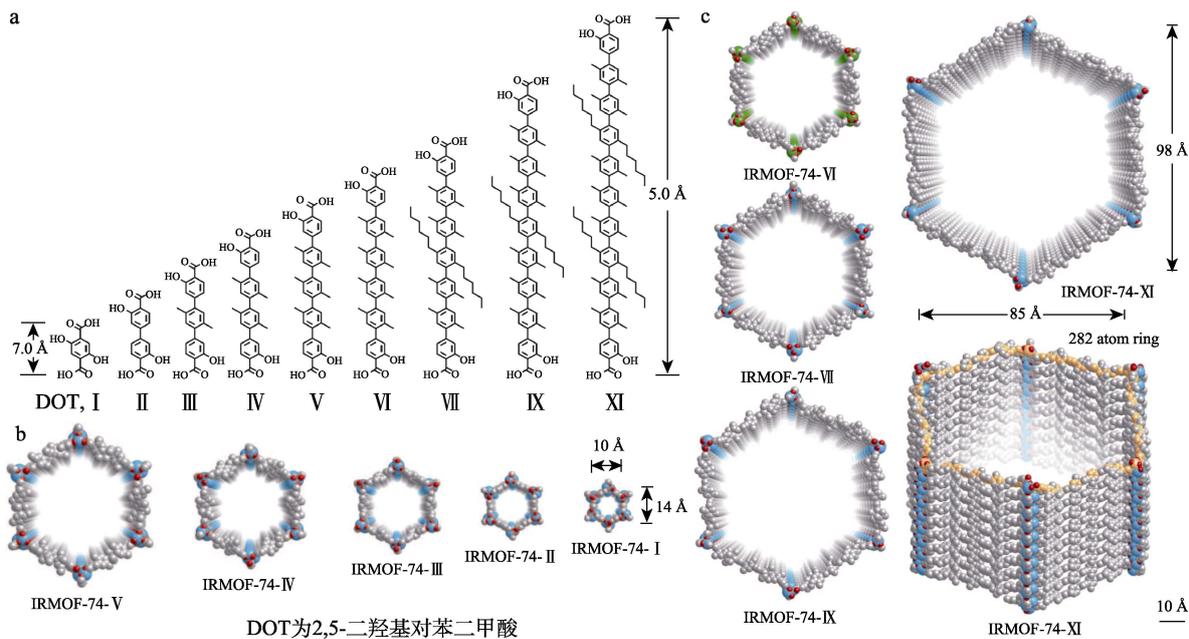


图 7 IRMOF-74 系列配体结构图 (a); IRMOF-74 系列六边形通道孔尺寸对比图 (b~c)^[25]

Fig. 7 Structure diagram of IRMOF-74 series ligands (a); hexagonal channel hole size comparison of IRMOF-74 series (b~c)^[25]

4 结束语与展望

MOFs 作为一种有前景的酶载体, 近年来的研究取得了较大的进展, 但系统性分析孔结构对酶固定的影响较少。本文以此为侧重点, 分别介绍了笼型空穴与通道型孔的调控与固定化酶间的构效关系, 并得出以下结论与展望。

(1) 单一孔道结构的 MOFs 不适宜固定化酶, 需开发具有分级孔结构的 MOFs。笼型孔穴可将单个酶分子固定在 1 个笼中, 有效避免因为酶聚集而

自聚导致的活性降低, 同时载体自身与酶的弱作用力可以避免酶在催化过程中的流失。相应的, 酶占据空穴后, 抑制了反应物与产物通过该空穴进行的输送, 造成固定化酶催化能力降低。与笼型孔穴不同的是, 通道型孔道可允许物质通过孔道首尾两端进出, 有效抑制了无效扩散, 因此, 物质的传质阻力相对更小。但是, 酶在通道内的聚集可能会堵塞通道, 造成无效负载或传质阻力增大。因此, 需要解决酶占据空穴/通道后的传质问题。分级孔结构的 MOFs 既为酶负载提供场所, 又保留空余孔道作为

物质运输通道, 因此, 该类型的开发是一个值得关注的方向。

(2) 以减小传质阻力为目标导向进行 MOFs 结构设计, 强化传质与催化过程。与自由酶可以和底物直接接触不同, 底物需要经过孔内扩散才能到达固定化酶并与之发生反应, 因此, 固定化酶的 k_{cat} 常略小于自由酶。但多孔性载体在催化过程中也会富集底物, 因此, 会造成固定化酶对底物的亲和力增加, K_{m} 明显降低, 即更低的体相底物浓度即可达到较高的催化速率。因此, 固定化酶的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 通常较自由酶有所提升, 即催化过程得到强化。以缩短孔内传质距离, 减小孔内传质阻力为目标, 进行孔结构设计, 将进一步提高初始反应速率, 强化催化效果。此外, 对于多酶级联体系, 孔结构会直接影响酶在载体中的分布, 通过设计, 减小级联酶的距离, 避免中间物无效扩散并缩短传质距离, 将极大地增强固定化多酶的催化效果。

(3) 发挥 MOFs 自身的催化能力, 构建化学-酶级联催化剂。构成 MOFs 的金属节点具有一定的催化活性, 部分 MOFs 表现出了类酶活性。因此, MOFs 既可作为酶的载体, 又可作为化学催化剂, 与酶进行级联反应, 形成化学-酶级联催化剂。与纯酶级联不同的是, 化学-酶级联催化剂中酶的种类减少, 成本大大降低, 并且化学催化剂对环境耐受性和催化稳定性远胜于酶。因此, 选择合适的 MOFs, 在完成酶固定化的同时实现化学催化剂对酶制剂的取代, 将级联反应限制在数纳米尺度内, 将极大强化催化过程, 实现降本增效作用。但是, 与酶活性匹配的 MOFs 并不一定具备匹配的孔结构, 因此, 可能需要在保留 MOFs 催化活性的基础上对其孔结构进行调控, 以实现高效化学-酶级联催化剂的设计与制备。

(4) 调节孔道微环境, 强化催化过程。酶与载体间的弱相互作用不仅可以有效减少固定化酶在催化过程中的流失, 还可以强化催化过程。孔道的亲疏水性、酸碱性和带电性都会影响酶负载量与形态, 还会对底物在酶周围的聚集状态产生影响, 从而影响固定化酶的催化效果。此外, 对微环境的调控还可以使多酶均处于较适宜的催化条件。例如: HRP 与 GOx 的最适宜的 pH 有差异, 通过聚电解质对载体的修饰, 可使二酶在同一载体中分别处于最适宜的 pH 状态, 从而强化催化过程。因此, 对酶微环境进行精细调控, 为酶催化营造最适宜的环境值得深入研究。

参考文献:

- [1] BORNSCHEUER U T, HUISMAN G W, KAZLAUSKAS R J, *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis[J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 185-194.
- [2] WANG K Y, ZHANG J Q, HSU Y C, *et al.* Bioinspired framework catalysts: From enzyme immobilization to biomimetic catalysis[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(9): 5347-5420.
- [3] SHELDON R A, VAN P S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(15): 6223-6235.
- [4] RODRIGUES R C, ORTIZ C, BERENGUER M A, *et al.* Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(15): 6290-6307.
- [5] WANG S S (王舒舒), WANG Y H (王俞涵), YANG X (杨旭), *et al.* Synthesis of lignosterol oleate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized on magnetic nanocomposites[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(1): 124-129.
- [6] LI M M, QIAO S, ZHENG Y L, *et al.* Fabricating covalent organic framework capsules with commodious microenvironment for enzymes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(14): 6675-6681.
- [7] DICOSIMO R, MCAULIFFE J, POULOSE A J, *et al.* Industrial use of immobilized enzymes[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(15): 6437-6474.
- [8] BOLIVAR J M, WOODLEY J M, FERNANDEZ L R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization[J]. *Chemical Society Reviews*, 2022, 51: 6251-6290.
- [9] FENG Y M, XU Y, LIU S C, *et al.* Recent advances in enzyme immobilization based on novel porous framework materials and its applications in biosensing[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 459: 214414.
- [10] XU K L, CHEN X X, ZHENG R C, *et al.* Immobilization of multi-enzymes on support materials for efficient biocatalysis[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 660.
- [11] THANGARAJ B, SOLOMON P R. Immobilization of lipases-A review. Part II: Carrier materials[J]. *Chembioeng Reviews*, 2019, 6(5): 167-194.
- [12] WANG X L, LAN P C, MA S Q. Metal-organic frameworks for enzyme immobilization: Beyond host matrix materials[J]. *ACS Central Science*, 2020, 6(9): 1497-1506.
- [13] LIANG W B, WIED P, CARRARO F, *et al.* Metal-organic framework-based enzyme biocomposites[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(3): 1077-1129.
- [14] FURUKAWA H, CORDOVA K E, O'KEEFFE M, *et al.* The chemistry and applications of metal-organic frameworks[J]. *Science*, 2013, 341(6149): 1230444.
- [15] LIAN X Z, FANG Y, JOSEPH E, *et al.* Enzyme-MOF (metal-organic framework) composites[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(11): 3386-3401.
- [16] XING E Z (邢恩正), LIU X M (刘秀明), GONG J X (巩继贤). Regulation of catalytic performance and application of enzyme/MOFs composites[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(4): 775-782, 837.
- [17] LI L R (李亮荣), LIANG J (梁娇), PENG J (彭建), *et al.* Research progress of photocatalytic water splitting for hydrogen production using MOF based catalysts[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(3): 553-564, 696.
- [18] WANG T, LIN E, PENG Y L, *et al.* Rational design and synthesis of ultramicroporous metal-organic frameworks for gas separation[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2020, 423: 213485.
- [19] DU Y J, JIA X T, ZHONG L, *et al.* Metal-organic frameworks with different dimensionalities: An ideal host platform for enzyme@MOF composites[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 454: 214327.
- [20] LI J J, YIN L, WANG Z F, *et al.* Enzyme-immobilized metal-organic frameworks: From preparation to application[J]. *Chemistry-An Asian Journal*, 2022, 17(21): e202200751
- [21] YE N, KOU X X, SHEN J, *et al.* Metal-organic frameworks: A new platform for enzyme immobilization[J]. *ChemBioChem*, 2020, 21(18):

- 2585-2590.
- [22] LIANG S, WU X L, X J, *et al.* Metal-organic frameworks as novel matrices for efficient enzyme immobilization: An update review[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2020, 406: 213149.
- [23] MA L, JIANG F B, FAN X, *et al.* Metal-organic-framework-engineered enzyme-mimetic catalysts[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(49): 2003065.
- [24] FURUKAWA H, KO N, GO Y B, *et al.* Ultrahigh porosity in metal-organic frameworks[J]. *Science*, 2010, 329(5990): 424-428.
- [25] DENG H X, GRUNDER S, CORDOVA, K E. *et al.* Large-pore apertures in a series of metal-organic frameworks[J]. *Science*, 2012, 336(6084): 1018-1023.
- [26] FENG D W, LIU T F, SU J, *et al.* Stable metal-organic frameworks containing single-molecule traps for enzyme encapsulation[J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 5979.
- [27] TRICKETT C A, GAGNON K J, LEE S Y, *et al.* Definitive molecular level characterization of defects in UiO-66 crystals[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(38): 11162-11167.
- [28] CHUI S S Y, LO S M F, CHARMANT J P H, *et al.* A chemically functionalizable nanoporous material $[\text{Cu}_3(\text{TMA})_2(\text{H}_2\text{O})_3]_n$ [J]. *Science*, 1999, 283(5405): 1148-1150.
- [29] LYKOURINOU V, CHEN Y, WANG X S, *et al.* Immobilization of MP-11 into a mesoporous metal-organic framework, MP-11@mesoMOF: A new platform for enzymatic catalysis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(27): 10382-10385.
- [30] CHEN Y, HAN S Y, LI X, *et al.* Why does enzyme not leach from metal-organic frameworks (MOFs)? Unveiling the interactions between an enzyme molecule and a MOF[J]. *Inorganic Chemistry*, 2014, 53(19): 10006-10008.
- [31] CHEN Y, LYKOURINOU V, HOANG T, *et al.* Size-selective biocatalysis of myoglobin immobilized into a mesoporous metal-organic framework with hierarchical pore sizes[J]. *Inorganic Chemistry*, 2012, 51(17): 9156-9158.
- [32] CHEN Y, LYKOURINOU V, VETROMILE C, *et al.* How can proteins enter the interior of a MOF? Investigation of cytochrome C translocation into a MOF consisting of mesoporous cages with microporous windows[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(32): 13188-13191.
- [33] LIAN X Z, CHEN Y P, LIU T F, *et al.* Coupling two enzymes into a tandem nanoreactor utilizing a hierarchically structured MOF[J]. *Chemical Science*, 2016, 7(12): 6969-6973.
- [34] LIU Q, SONG Y Y, MA Y H, *et al.* Mesoporous cages in chemically robust MOFs created by a large number of vertices with reduced connectivity[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(1): 488-496.
- [35] CHENG K P, SVEC F, LYU Y Q, *et al.* Hierarchical micro- and mesoporous Zn-based metal-organic frameworks templated by hydrogels: Their use for enzyme immobilization and catalysis of knoevenagel reaction[J]. *Small*, 2019, 15(44): 1902927.
- [36] HU C, BAI Y X, HOU M, *et al.* Defect-induced activity enhancement of enzyme-encapsulated metal-organic frameworks revealed in microfluidic gradient mixing synthesis[J]. *Science Advances*, 2020, 6(5): eaax5785.
- [37] WU X L, YUE H, ZHANG Y Y, *et al.* Packaging and delivering enzymes by amorphous metal-organic frameworks[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5165.
- [38] CHEN S Y, LO W S, HUANG Y D, *et al.* Probing interactions between metal-organic frameworks and freestanding enzymes in a hollow structure[J]. *Nano Letters*, 2020, 20(9): 6630-6635.
- [39] LIANG J Y, GAO S, LIU J, *et al.* Hierarchically porous biocatalytic MOF microreactor as a versatile platform towards enhanced multienzyme and cofactor-dependent biocatalysis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(10): 5421-5428.
- [40] FENG L, YUAN S, ZHANG L L, *et al.* Creating hierarchical pores by controlled linker thermolysis in multivariate metal-organic frameworks[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(6): 2363-2372.
- [41] YANG Y H, ARQUÉ X, PATIÑO T, *et al.* Enzyme-powered porous micromotors built from a hierarchical micro- and mesoporous UiO-type metal-organic framework[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(50): 20962-20967.
- [42] CAI G R, JIANG H L. A modulator-induced defect-formation strategy to hierarchically porous metal-organic frameworks with high stability[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(2): 563-567.
- [43] WANG Z, HU S G, YANG J, *et al.* Nanoscale Zr-based MOFs with tailorable size and introduced mesopore for protein delivery[J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(16): 1707356.
- [44] ZHAO L W, YANG J, GONG M, *et al.* Specific screening of prostate cancer individuals using an enzyme-assisted substrate sensing platform based on hierarchical MOFs with tunable mesopore size[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(37): 15145-15151.
- [45] PISKLAK T J, MACÍAS M, COUTINHO D H, *et al.* Hybrid materials for immobilization of MP-11 catalyst[J]. *Topics in Catalysis*, 2006, 38: 269-278.
- [46] LI P, CHEN Q S, WANG T C, *et al.* Hierarchically engineered mesoporous metal-organic frameworks toward cell-free immobilized enzyme systems[J]. *Chem*, 2018, 4(5): 1022-1034.
- [47] LI P, MODICA J A, HOWARTH A J, *et al.* Toward design rules for enzyme immobilization in hierarchical mesoporous metal-organic frameworks[J]. *Chem*, 2016, 1(1): 154-169.
- [48] LI P, MOON S Y, GUELTA M A, *et al.* Encapsulation of a nerve agent detoxifying enzyme by a mesoporous zirconium metal-organic framework engenders thermal and long-term stability[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(26): 8052-8055.
- [49] LI P, MOON S Y, GUELTA M A, *et al.* Nanosizing a metal-organic framework enzyme carrier for accelerating nerve agent hydrolysis[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(10): 9174-9182.
- [50] SHA F R, XIE H M, SON F A, *et al.* Rationally tailored mesoporous hosts for optimal protein encapsulation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(30): 16383-16390.
- [51] CHEN Y J, LI P, ZHOU J W, *et al.* Integration of enzymes and photosensitizers in a hierarchical meso-porous metal-organic framework for light-driven CO₂ reduction[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(4): 1768-1773.
- [52] GREIFENSTEIN R, BALLWEG T, HASHEM T, *et al.* MOF-hosted enzymes for continuous flow catalysis in aqueous and organic solvents[J]. *Angewandte Chemie*, 2022, 61(18): e202117144.
- [53] CHEN C P, XU H Q, ZHAN Q, *et al.* Preparation of novel HKUST-1-glucose oxidase composites and their application in biosensing[J]. *Microchimica Acta*, 2023, 190(1): 10.
- [54] ZHANG R Z, WANG L, HAN J, *et al.* Improving laccase activity and stability by HKUST-1 with cofactor *via* one-pot encapsulation and its application for degradation of bisphenol A[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 383: 121130.
- [55] LYU X F, FENG C Y, LI S F, *et al.* Tyrosinase@HKUST-1: A super stable biocatalyst efficient for catecholic product synthesis[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 1-12.
- [56] SHOMAL R, DU W, AL-ZUHAIR S. Immobilization of lipase on metal-organic frameworks for biodiesel production[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(2): 107265.
- [57] CUN J E, FAN X, PAN Q Q, *et al.* Copper-based metal-organic frameworks for biomedical applications[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2022, 305: 102686.