

“Yolk-shell”结构中高效双酶级联催化体系的构筑

蒋佳祺¹, 杨红霞¹, 闫梦飞¹, 史馨瑶¹, 李佳琪¹, 蒋育澄^{1,2}

(1. 陕西师范大学化学化工学院, 2. 陕西省大分子科学重点实验室, 西安 710119)

摘要 合成了一种生物-无机杂化材料 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8, 该材料以具有“蛋黄-壳(Yolk-shell)”结构的金属有机框架(MOF)为载体, 将葡萄糖氧化酶(GO_x)和氯过氧化物酶(CPO)封装在不同隔离空间中构建了双酶纳米反应器。“Yolk-shell”结构可为封装的酶提供纳米邻近效应, GO_x 催化底物原位生成的 H₂O₂ 可启动相邻的 CPO 催化反应, 有效减少了反应物的扩散阻力和 H₂O₂ 的分解和逃逸, 同时避免了两种酶催化反应的相互影响. 与均相缓冲液中的游离酶相比, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 的级联催化效率更高. 由于 MOF 的屏蔽效应, 酶的热稳定性和有机溶剂耐受性显著提高.“Yolk-shell”结构还可有效抑制材料重复使用过程中酶分子的泄漏, 经过 20 次重复使用后, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 仍可保持初始级联催化效率的 72%. 将 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 双酶级联反应生成的 HClO 应用于偶氮染料的高效脱色和水果保鲜. 在 1 mg/mL ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 水溶液中, 橙黄 G(0.3 mmol/L) 在 15 min 内可完成脱色(脱色率 >98%). 在新鲜草莓的杀菌保鲜实验中, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 也显示出良好效果. ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 双酶级联催化体系具有高效、稳定、温和及绿色的特点, 极具应用潜力.

关键词 “Yolk-shell”结构; 氯过氧化物酶; 葡萄糖过氧化物酶; 双酶级联催化

中图分类号 O614.2; Q814.9

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240272

Construction of Efficient Bienzyme Cascade Catalytic System by “Yolk-shell” Structure

JIANG Jiaqi¹, YANG Hongxia¹, YAN Mengfei¹, SHI Xinyao¹, LI Jiaqi¹, JIANG Yucheng^{1,2*}

(1. School of Chemistry & Chemical Engineering, 2. Key Laboratory of Macromolecular Science of Shaanxi Province, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract This work proposes a bio-composite, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8, which is constructed by “Yolk-shell” characteristic metal-organic framework (MOF) for specific division of glucose oxidase (GO_x) and chloroperoxidase (CPO) by encapsulating them at different compartments. The structure of “Yolk-shell” can provide nano-proximity effect for encapsulated enzymes. H₂O₂ generated *in situ* by GO_x immediately starts the enzymatic reaction of adjacent CPO, effectively reducing the diffusion resistance of reactants and the decomposition and escape of H₂O₂, and avoiding the interaction of the two enzymes during reuse. Compared with the free enzymes in the homogeneous buffer, the cascade catalytic efficiency of ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 is improved. Owing to the shielding effect provided by the MOF, the thermal stability and organic solvent tolerance of the enzyme is also greatly improved. The “Yolk-shell” structure also effectively inhibits the leakage of enzyme molecules during the reuse process of the material. After 20 reuses, the bio-composite ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 can keep 72% of the initial cascade efficiency. The cascade reaction of GO_x-CPO can generate HClO, which is applied in efficient decolorization of azo dye and fresh-keeping of

收稿日期: 2024-06-04. 网络首发日期: 2024-08-12.

联系人简介: 蒋育澄, 女, 博士, 教授, 主要从事酶工程方面的研究. E-mail: jyc@snnu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22273056)资助.

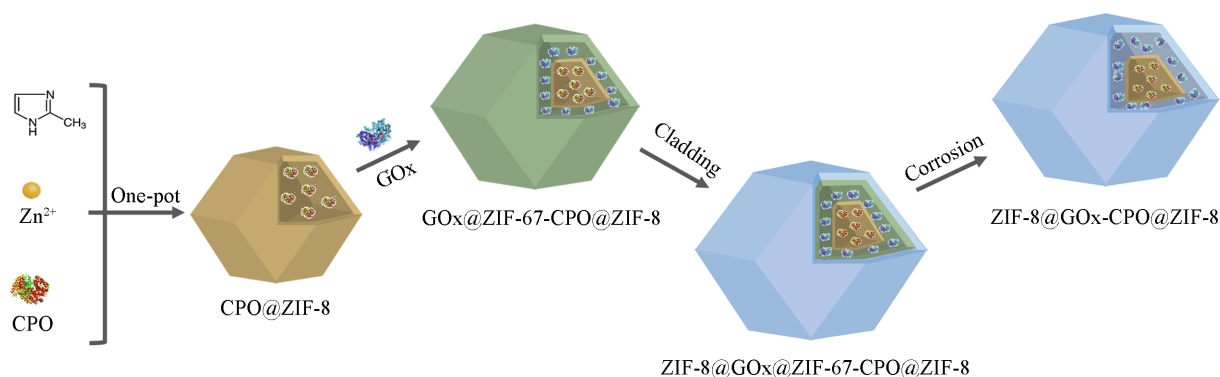
Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22273056).

fruit. The decolorization of azo dye orange G (0.3 mmol/L) was almost completed in only 15 min with 98% decolorization efficiency by 1 mg/L of ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8. ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8 bienzyme cascade catalytic system is efficient, stable, mild and green with great application potential.

Keywords “Yolk-shell” structure; Chloroperoxidase; Glucose oxidase; Bienzymatic cascade catalysis

酶通常特异性地分布于细胞中而不是自由分布^[1]. 这些在细胞中的特定限域空间内有组织地分布的酶可有序、准确且高效地完成复杂的级联化学反应, 生成目标产物, 减小底物的扩散阻力, 避免无效级联^[2-4]. 酶在细胞中的纳米级多层次结构引起了广泛关注. 通过模拟细胞内的多级结构和纳米效应, 设计简单、高效和稳定的多酶级联催化体系, 有望实现甚至超越细胞的催化能力, 为传统工业催化提供新技术.

具有“Yolk-shell”结构的纳米材料在内核和外壳间存在间隙空间^[5-7], 可用于分区和储存等, 为内核与外壳间的协同作用提供了独特环境. 利用金属-有机框架(MOFs)构建高效酶催化体系已见报道^[8-10]. 在这些工作的启发下, 本文利用MOFs构建了具有“Yolk-shell”结构的纳米材料, 并以其为载体原位封装酶分子构筑了生物复合材料ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器. 封装在特定区域内的葡萄糖氧化酶(GOx)和氯过氧化物酶(CPO)可分别完成不同的酶催化反应, 从而提高多酶级联催化效率. 如Scheme 1所示. 在这种生物复合材料中, 由GOx催化反应产生的中间体H₂O₂可沿着“Yolk-shell”结构直接扩散至CPO, 进而引发CPO的氯化反应, 避免了中间物质扩散至溶液本体中, 从而提高双酶级联催化效率. 由于纳米邻近效应、区域化效应和限域效应, 与缓冲液中的游离酶相比, 在特定隔室的“Yolk-shell”结构MOFs中包封的GOx和CPO具有更高的级联效率和操作稳定性. GOx与CPO双酶级联反应生成的HClO在被用于橙黄G的氧化脱色和草莓的杀菌保鲜时均显示出良好效果.



Scheme 1 Construction of ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8 enzyme nanoreactor

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

参照文献^[11]方法, 从真菌(*Caldariomyces Fumago*)培养液中提取CPO, 提纯方法稍作改进, 萃取时以丙酮替代乙醇. CPO的催化活性通过2-二氟-5,5-二甲基-13-环己二酮(MCD)氯化反应检测. 结果表明, CPO的氯化活性为5600 U/mL^[12]. CPO的纯度 $R_z=1.10$ ($R_z=A_{398}/A_{280}=1.44$ 视为纯酶). GOx (300 U/mg)、2-甲基咪唑(2-MI, 分析纯)和 β -D-葡萄糖(分析纯), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 分析纯), 上海麦克林生化科技有限公司; 六水合硝酸钴[Co(NO₃)₂·6H₂O]、六水合硝酸锌[Zn(NO₃)₂·6H₂O]、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和染料橙黄G均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 异硫氰酸荧光素(FITC, 分析纯), Sigma-Aldrich有限公司; 罗丹明B(RhB, 分析纯), 北京索莱宝科技有限公司; 2-二氟-5,5-二甲基-13-环己二酮(MCD, 分析纯), Alfa Aesar公司.

SU8220型场发射扫描电子显微镜(SEM), 日本日立公司; JEM-2100型透射电子显微镜(TEM), 日

本电子有限公司; FV1200型激光共聚焦显微镜(CLSM), 日本奥林巴斯公司; Quanta 200型环境扫描电子显微镜, 美国FEI公司; Bruker D8 Advance型粉末X射线衍射仪(XRD), 德国布鲁克公司.

1.2 实验过程

1.2.1 CPO@ZIF-8的制备 参照文献[13, 14]方法制备CPO@ZIF-8. 将100 μL 0.23 mmol/L CPO加入至1.75 mL 750 mmol/L的2-MI与1.75 mL 550 $\mu\text{mol/L}$ CTAB的混合溶液中, 以500 r/min的转速搅拌5 min, 加入0.25 mL 90 mmol/L的 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 搅拌5 min后, 在室温下静置3 h. 用去离子水离心洗涤白色沉淀, 真空干燥后即得到CPO@ZIF-8, 产率(90 \pm 2)%.

1.2.2 GO_x@ZIF-67-CPO@ZIF-8的制备 参照文献[15]方法制备GO_x@ZIF-67-CPO@ZIF-8. 将CPO@ZIF-8超声分散于1 mL水中, 以500 r/min的转速搅拌, 加入1.75 mL 750 mmol/L 2-MI溶液、1.75 mL 550 $\mu\text{mol/L}$ CTAB溶液和100 μL GO_x溶液, 搅拌5 min后再加入0.25 mL 90 mmol/L $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 搅拌1 min. 在室温下静置1 h, 离心洗涤, 将得到的蓝色固体真空干燥, 得到固体GO_x@ZIF-67-CPO@ZIF-8, 产率(88 \pm 3)%.

1.2.3 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器的制备 参照文献[16]方法制备ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8, 将GO_x@ZIF-67-CPO@ZIF-8超声分散于2.5 mL 30 mmol/L 2-MI甲醇溶液中, 加入2.5 mL 30 mmol/L $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的甲醇溶液, 在500 r/min转速下搅拌后在室温下静置1 h, 得到ZIF-8@GO_x@ZIF-67-CPO@ZIF-8. 将上述材料分散于体积比为1:1的水与甲醇的混合溶液中, 静置解离1 h, 以刻蚀掉材料中的ZIF-67, 即得到具有“Yolk-shell”结构的ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器, 真空干燥后计算得产率为(92 \pm 2)%.

1.2.4 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器的热稳定性测试 将5 mg ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器与5 mg等摩尔比的游离酶GO_x和CPO分别加入至磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH=2.75, 1 mL)中, 于50, 60, 70, 80和90 $^{\circ}\text{C}$ 下温育3 h, 以MCD转化为2,2-二氯-5,5-二甲基-1,3-环己二酮(DCD)的氯化量为考察指标, 测试其在不同温度下温育后的活性, 并与温育前的活性进行对比, 以保留的相对活性评估其热稳定性.

1.2.5 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器的有机溶剂耐受性测试 将5 mg ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8酶纳米反应器与5 mg等摩尔比的游离酶GO_x和CPO分别加入至1 mL不同体积分数(5%~30%)的DMF溶液中, 放置3 h, 以MCD转化为DCD的氯化量为考察指标, 通过测试不同混合溶剂中放置前后的活性变化, 评估体系对有机溶剂的耐受性.

1.2.6 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器的重复使用性测试 在1 mL磷酸缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=2.75)中加入5 mg ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8、底物 β -D-葡萄糖和MCD, 反应15 min后用磷酸缓冲溶液洗涤材料3次, 用于下一次催化反应. 将第一次使用时测得的催化活性视为100%, 后续每次测得的保留活性与之相比为相对活性, 用来评价ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8的重复使用性能. 每个数据点至少重复3次, 误差小于5%.

1.2.7 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器对染料橙黄G的脱色性能测试 将配制的5 mg/mL ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8溶液分散于磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH=2.75)中, 进行浓度梯度稀释, 得到10, 100, 250, 500和1000 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 加入底物 β -D-葡萄糖、KCl和0.3 mmol/L橙黄G染料, 总反应体积为1.5 mL, 在一定温度下恒温振荡, 反应15 min后离心, 检测上层清液在478 nm处的吸光度, 利用式(1)计算染料脱色率(η , %):

$$\eta = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 和 A_t 分别为染料初始吸光度值和染料在 t 时刻的吸光度值.

1.2.8 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器对果蔬的杀菌保鲜性能测试 挑选大小均匀、成熟度适中、颜色相近且无虫害、无机械伤的市售新鲜草莓, 分别用自来水、含20 mmol/L KCl和5 mg/mL ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8的去离子水溶液和不含KCl的5 mg/mL ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8的去离子水溶液在草莓表面进行均匀涂抹, 在室温下, 将处理后的草莓在超净台中放置. 记录放置了5 d和9 d的草

莓表面变化情况.

2 结果与讨论

2.1 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8的表征

利用场发射扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)对ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8的结构进行表征,结果如图1所示.图1(A)中的ZIF-8纳米颗粒呈菱形十二面体结构,尺寸约为146 nm,具有良好的分散性.在其表面延伸生长了ZIF-67后,继续生长了ZIF-8作为外壳.图1(B)和(C)表明,延伸生长ZIF-67后的纳米粒子表面光滑,结构完整,尺寸约为350 nm.用甲醇与水的混合溶液将材料中间层的ZIF-67刻蚀掉后,得到了“Yolk-shell”结构的ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8[图1(D)].

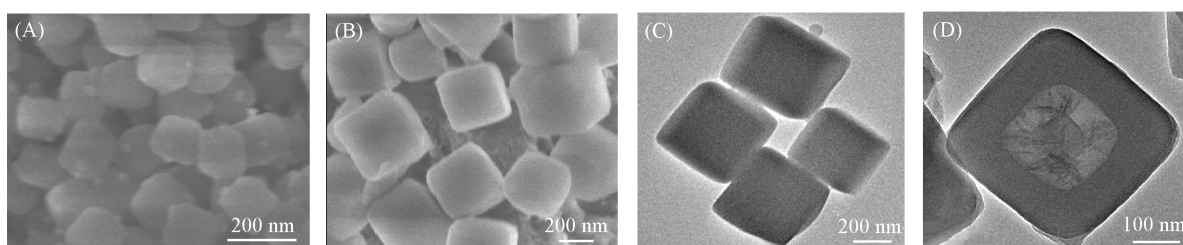


Fig. 1 SEM images of ZIF-8(A) and ZIF-8@GO_x@ZIF-67-CPO@ZIF-8(B), TEM images of ZIF-8@GO_x@ZIF-67-CPO@ZIF-8(C) and ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8(D)

以异硫氰酸荧光素(FITC)标记CPO(FITC-CPO),以罗丹明B(RhB)标记GO_x(RhB-GO_x),进行了激光共聚焦显微镜检测(CLSM).图2(A)为纯材料照片,图2(B)中显示的绿色荧光为FITC标记的CPO,图2(C)中的红色荧光为RhB标记的GO_x,叠加图[图2(D)]表明,CPO与GO_x均被负载于“Yolk-shell”材料中.

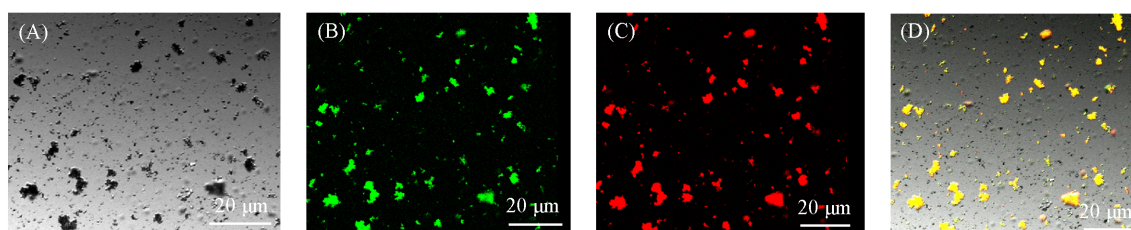


Fig. 2 CLSM images of ZIF-8(A), ZIF-8@GO_x-FITC-CPO@ZIF-8(B), ZIF-8@RhB-GO_x-CPO@ZIF-8(C) and overlay(D)

EDS能谱测试结果如图3和表1所示.ZIF-8纳米粒子中存在C,N和Zn元素[图3(A)].由于酶分子中含有大量N元素,负载CPO后N元素含量增加说明CPO被引入[图3(B),表1].在CPO@ZIF-8表面延伸生长含有GO_x的ZIF-67后,Co元素含量增加,Zn元素含量减少[图3(C),表1],这是因为在生长ZIF-67后,在高速离心洗涤过程中材料存在损失.经甲醇与水的混合溶液刻蚀后,Co元素含量降低

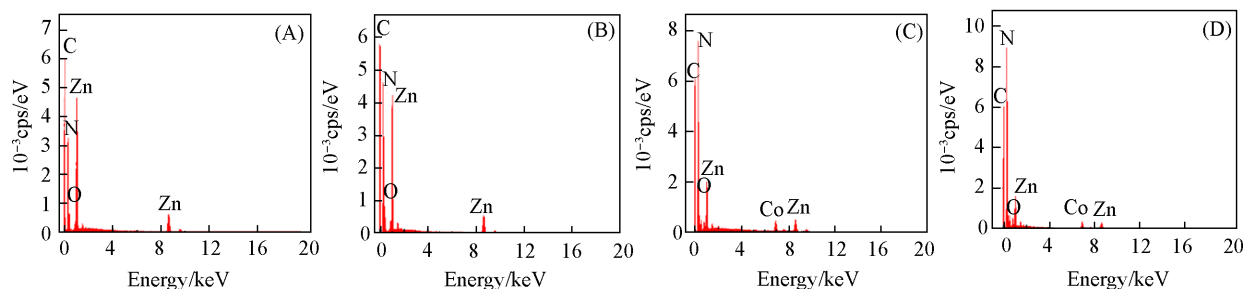


Fig. 3 EDS analysis of different enzyme reactor

(A) ZIF-8; (B) CPO@ZIF-8; (C) ZIF-8@GO_x@ZIF-67-CPO@ZIF-8; (D) ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8.

Table 1 Results of EDS analysis of different enzyme reactors

Element	ZIF-8		CPO@ZIF-8		ZIF-8@GO _x @ZIF-67-CPO@ZIF-8		ZIF-8@GO _x -CPO@ZIF-8	
	Mass fraction	Atomic fraction	Mass fraction	Atomic fraction	Mass fraction	Atomic fraction	Mass fraction	Atomic fraction
C	46.31	60.80	48.68	60.46	49.09	62.54	59.06	68.21
N	27.54	31.00	31.70	33.76	22.35	24.41	20.41	20.30
O	2.55	2.51	1.86	1.73	8.60	8.23	10.67	9.29
Zn	23.60	5.69	17.75	4.05	13.86	3.24	5.82	1.24
Co	—	—	—	—	6.09	1.58	4.04	0.96

[图3(D), 表1], 这是因为在刻蚀过程中钴离子从ZIF-67中解离, 生成片状无定形氢氧化钴, 并作为支撑物残留于ZIF-8空腔结构内. 上述结果表明, 在“Yolk-shell”结构中, CPO和GO_x已被引入至不同腔室中, 双酶纳米反应器被成功制备.

图4为样品的粉末X射线衍射(XRD)谱图. 结果表明, 酶分子的引入未影响“Yolk-shell”结构, 说明材料结构较稳定, 不易坍塌, 有利于酶的负载.

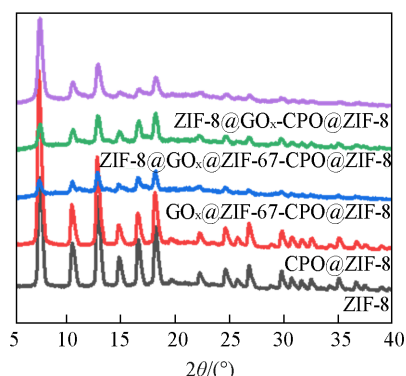


Fig. 4 XRD patterns of different enzyme reactor

2.2 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8中GO_x-CPO的级联催化效率

在ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8中, GO_x和CPO被包埋于各自的密闭空间内, 且相邻分布. GO_x催化葡萄糖与氧气产生的H₂O₂扩散至CPO的活性中心以启动CPO的酶催化反应. 与在溶液中以游离态自由分布的GO_x和CPO相比, 在ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8中产生的H₂O₂扩散距离更小, 这种“邻近效应”提高了两种酶之间的酶催化级联反应效率. 同时, “Yolk-shell”结构可抑制H₂O₂的分解及其从反应区域的“逃逸”. 此外, 将两种酶分子限制在不同空间内还可防止相互干扰, 从而减少副产物. 本文研究了影响双酶纳米反应器中酶催化级联效率的因素并通过调控优化了反应器.

双酶在杂化材料中的摩尔比及底物葡萄糖的浓度均会影响双酶反应器的级联催化效率. 如图5(A)所示, 当CPO与GO_x的摩尔比较大时, 由于GO_x与底物β-D-葡萄糖反应产生H₂O₂的量较少, 影响了CPO进行催化反应的效率, 反应物转化率较低; 当CPO与GO_x的摩尔比较小时, 由于产生的H₂O₂量过多, 不能被CPO及时消耗, 使酶分子周围H₂O₂堆积, 造成局部浓度升高, CPO活性中心过度氧化而变性失活^[17,18], 反应物转化率也较低.

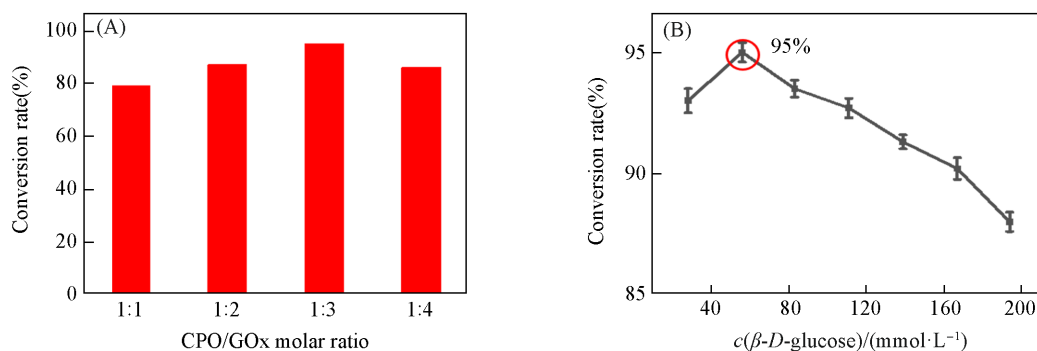


Fig. 5 Influencing factors of ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8

(A) β-D-glucose substrate concentration is 56 mmol/L; (B) molar ratio of CPO to GO_x is 1:3.

底物葡萄糖的浓度也是影响催化级联效率的重要因素, 葡萄糖浓度过小或过大会影响GO_x在催化过程中产生H₂O₂的量, 从而影响转化率[图5(B)]. 基于对上述影响因素的考虑, 选择的最优条件为: CPO与GO_x摩尔比为1:3, β-D-葡萄糖浓度为56 mmol/L. 在此条件下, 与游离酶相比, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8的级联催化效率从83%提高至95%.

2.3 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8的稳定性

生物酶在实际反应环境中的稳定性与其产业化应用密切相关. 生物酶分子在高温下会产生解螺旋等现象, 导致其变性失活; 而有机溶剂会破坏酶分子表面的水化层, 导致其不稳定. 因此, 本文考察了ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器的热稳定性及对有机溶剂的耐受性.

将ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8酶反应器与等摩尔量的游离酶GO_x和CPO分别置于50~90 °C水浴中, 3 h后检测催化活性并与其温育前的活性相比(相对活性). 由图6可知, 游离酶在不同温度下保留的相对活性均低于ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8. 在70 °C时, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8可保留85%的相对活性, 而游离酶仅有52%的相对活性; 在90 °C时, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8可保留61%的相对活性, 而游离酶仅剩下8%的相对活性. 热稳定性的提高是因为“Yolk-shell”结构为包埋于其中的酶分子提供了屏蔽空间, 使酶分子构象不随温度的升高而改变, 从而有利于维持活性.

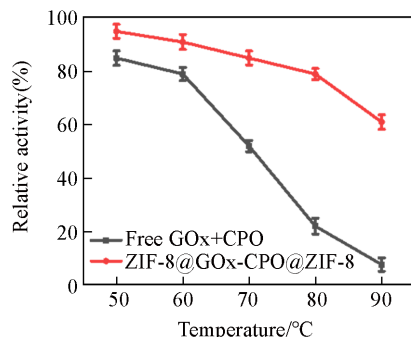


Fig. 6 Thermal stability of ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 and free GO_x+CPO

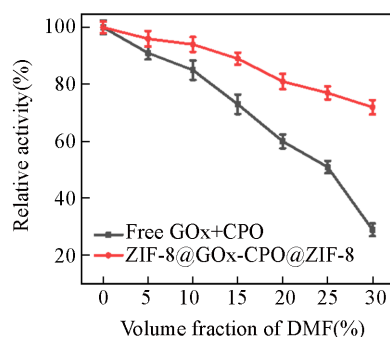


Fig. 7 Tolerance of ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 and free GO_x+CPO to organic solvents

The solvents are DMF-H₂O mixtures with different DMF volume fractions.

以DMF为有机溶剂的代表, 检测了ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8对有机溶剂的耐受性. 将ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8与等摩尔量的游离酶分别于不同体积分数的DMF-H₂O混合溶剂中静置3 h后检测其保留的相对催化活性. 由图7可以看出, 当DMF体积分数为20%时, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8可保留81%的相对活性, 而游离酶仅保留60%的相对活性; 当DMF体积分数为30%时, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8可保留72%的相对活性, 而游离酶仅保留29%的相对活性. 上述结果证明, “Yolk-shell”结构对酶分子具有保护作用, 避免了酶分子直接暴露于有机溶剂中, 有效提高了其有机溶剂耐受性.

2.4 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8的重复使用性

重复使用性的提高可降低使用成本, 对生物酶的产业化应用至关重要. 如图8所示, 在重复使用10次后, 与首次使用的催化活性相比, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8可保留86%的相对活性; 重复使用20次后, 仍可保留72%的相对活性. 实验结果表明, “Yolk-shell”结构可有效防止酶分子的泄露, 与报道的数据^[19-23]相比, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8的重复使用性具有明显优势(表2).

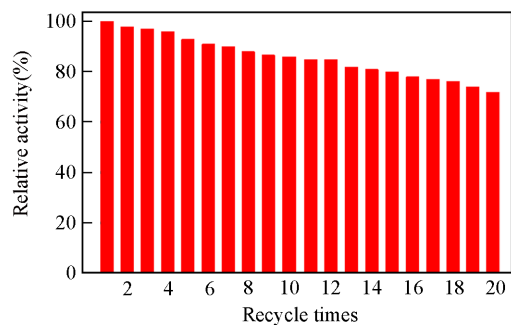


Fig. 8 Reusability of ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8

Table 2 Contrast of the reusability of different enzyme reactors

Enzyme-(Carrier)	Recycle times	Relative activity (%)	Ref.
CBH&EG&BGL-(SA@yeast)	7	75.0	[19]
P450&GDH-(MENCs)	5	67.0	[20]
FDH&BDH-(SiO ₂)	8	51.7	[21]
Xylan&FPase-(chitosan)	8	23.0	[22]
Xylan&Lichenase-(SiO ₂)	10	68.0	[23]
GO _x &CPO-(ZIF-8)	20	72.0	This work

2.5 ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8对橙黄G染料的脱色

当溶液中存在KCl时, ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8中GOx与CPO的双酶级联反应产生的高活性HClO可氧化降解偶氮染料橙黄G, 从而实现脱色^[24]. 如图9(A)所示, 当浓度为1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器对橙黄G的脱色率达98%. 如图9(B)所示, 当反应时间为80 min时, ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器对橙黄G的脱色率达98%. 与已报道的数据^[25-28]相比, ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8双酶纳米反应器的染料脱色效果十分突出(表3).

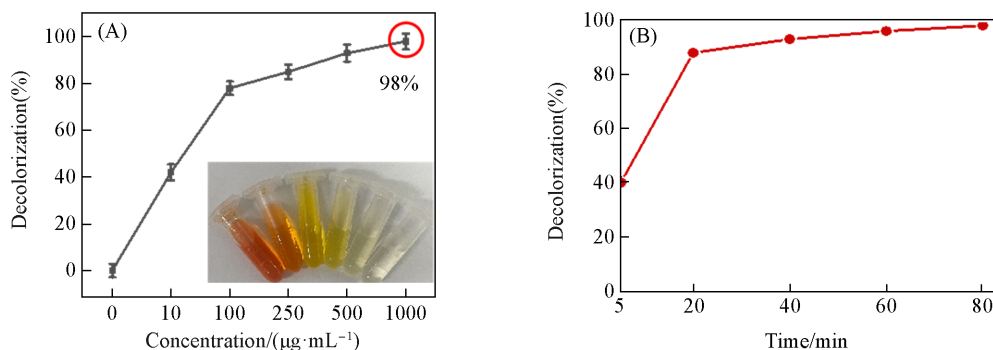


Fig. 9 Decolorization effect of ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8 on orange G

(A) Effect of ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8 concentration on degradation rate, the reaction time is 80 min. The inset shows the effect of decolorization at different time. (B) Effect of reaction time on degradation rate, the concentration of ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8 is 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Table 2 Comparison of decolorization efficiency data of dyes

Enzyme	Dye type	Degradation rate(%)	Ref.
Ligninolytic enzyme	Congo red	96	[25]
Laccase	RB5	93	[26]
NADH-DCIP	Orange T4LL	90	[27]
Laccase	RBBR	94	[28]
GOx-CPO	Orange G	98	This work

2.6 ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8对果蔬的杀菌保鲜性能

将ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8应用于水果保鲜. 挑选合适的草莓并进行预处理, 如图10所示, 将草莓分别用自来水、不含KCl的ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8的去离子水(DI water)溶液及含有KCl的ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8的去离子水溶液冲洗后, 于室温下置于超净台中并每隔4 d进行观察. 放置5 d后, 经自来水和不含KCl的ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8的去离子水溶液处理的草莓表面变黄变皱且开始腐败, 而经含有KCl的ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8的去离子水溶液处理后的草莓表面无明显变化; 放置9 d后, 经自来水和不含KCl的ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8的去离子水溶液处理的草莓表面已有大量细菌, 完全变质, 而经含有KCl的ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8的去离子水溶液处理后的草莓表面仅有轻微脱水现象. 草莓中含有丰富的糖类和蛋白质, 利于微生物的生长繁殖. 实验结果表明, 在KCl存在时, ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8双酶级联反应产生的HClO不仅可与细菌的细胞壁发生反应, 还可渗入细胞内与蛋白质发生氧化反应, 杀死草莓表面的微生物, 有效抑制了微生物的生长, 从而延长了草莓的保鲜时长.

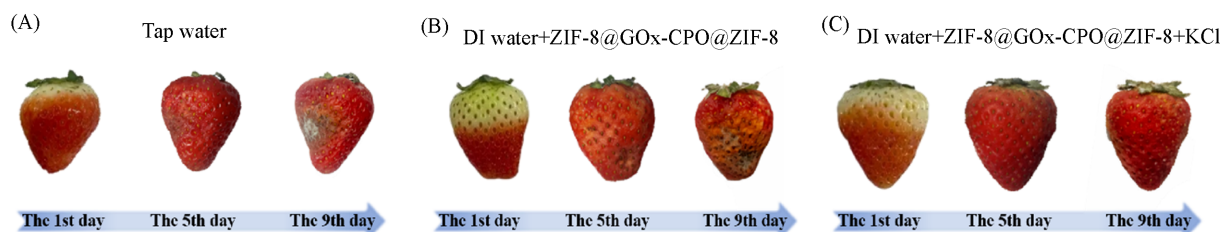


Fig. 10 Fresh-keeping effect of ZIF-8@GOx-CPO@ZIF-8 on strawberry

3 结 论

制备了生物-无机杂化材料 ZIF@GO_x-CPO@ZIF, 并基于该杂化材料构筑了一种高效的多酶级联反应体系. ZIF@GO_x-CPO@ZIF 具有“Yolk-shell”结构, 可为封装在不同隔离空间中的双酶 GO_x 和 CPO 提供纳米“邻近效应”, 有效地减少了反应物的扩散阻力及中间产物 H₂O₂ 的分解和逃逸, 同时避免了两种酶催化反应的相互影响, 使双酶级联催化效率提高. 由于 MOF 提供的屏蔽效应, 酶的热稳定性和有机溶剂耐受性显著提高. “Yolk-shell”结构还可有效抑制材料在重复使用中酶分子的泄漏, 经过 20 次重复使用后, ZIF-8@GO_x@CPO@ZIF-8 仍可保持初始级联催化效率的 72%. ZIF-8@GO_x@CPO@ZIF-8 中 GO_x 与 CPO 的双酶级联反应可生成 HClO, 可用于偶氮染料的高效脱色和水果保鲜. 在 1 mg/mL 的 ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 溶液中, 橙黄 G (0.3 mmol/L) 在 15 min 内可完成脱色 (脱色率 > 98%); 在新鲜草莓的杀菌保鲜实验中, ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 也具有良好效果. ZIF-8@GO_x-CPO@ZIF-8 双酶级联催化体系高效、稳定、温和且绿色, 极具应用潜力.

参 考 文 献

- [1] Nielsen J., *Science*, **2015**, 349(6252), 1050—1051
- [2] Wheeldon L., Minteer S. D., Banta S., Barton S. C., Atanassov P., Sigman M., *Nat. Chem.*, **2016**, 8, 299—309
- [3] Lim S. I., Yang B., Jung Y., Cha J., Cho J., Choi E. S., Kim Y. H., Kwon I., *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 39587
- [4] Feng D., Liu T. F., Su J., Bosch M., Wei Z., Wan W., Yuan D., Chen Y. P., Wang X., Wang K., Lian X., Gu Z. Y., Park J., Zou X., Zhou H. C., *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 5979
- [5] Sun X. H., Han J., Guo R., *Front. Chem.*, **2020**, 8, 606044
- [6] Jia Y. L., Yin G. L., Lin Y. H., Ma Y., *Inorg. Chem. Commun.*, **2022**, 136, 109137
- [7] Chiang C. Y., Zhou W., *RSC Adv.*, **2021**, 11(47), 29108—29114
- [8] Yuan S., Feng L., Wang K., Pang J., Bosch M., Lollar C., Sun Y., Qin J., Yang X., Zhang P., Wang Q., Zou L., Zhang Y., Zhang L., Fang Y., Li J., Zhou H. C., *Adv. Mater.*, **2018**, 30(37), 1704303
- [9] Lian X., Fang Y., Joseph E., Wang Q., Li J., Banerjee S., Lollar C., Wang X., Zhou H. C., *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46(11), 3386—3401
- [10] Zhang Y., Lai L., Liu Y., Chen B., Yao J., Zheng P., Pan Q., Zhu W., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, 14(5), 6453—6464
- [11] Morris D. R., Hager L. P., *J. Bio. Chem.*, **1966**, 241(8), 1763—1768
- [12] Hager L. P., Morris D. R., Brown F. S., Eberwein H., *J. Bio. Chem.*, **1966**, 241(8), 1769—1777
- [13] Li Y. H., Zhou H., Dai L. M., Liu D. H., Al-Zuhair S., Du W., *ACS Omega*, **2022**, 7(1), 274—280
- [14] Shieh F. K., Wang S. C., Yen C. I., Wu C. C., Dutta S., Chou L. K., Morabito J. V., Hu P., Hsu M. H., Wu K. C. W., Tsung C. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(13), 4276—4279
- [15] Man T. T., Xu C. X., Liu X. Y., Li D., Tsung C. K., Hao P., Wan Y., Li L., *Nat. Commun.*, **2022**, 13, 305
- [16] Rösler C., Aijaz A., Turner S., Filippousi M., Shahabi A., Xia W., Van Tendeloo G., Muhler M., Fischer R. A., *Chem. Eur. J.*, **2016**, 22(10), 3304—3311
- [17] Park J. B., Clark D. S., *Biotechnol. Bioeng.*, **2006**, 93(6), 1190—1195
- [18] Jin R. X., Li C. N., Zhi L. F., Jiang Y. C., Hu M. C., Li S. N., Zhai Q. G., *Carbohydr. Res.*, **2013**, 370, 72—75
- [19] Yin W. H., Wang X. P., Liao Y., Ma L. X., Qiao J., Liu H., Song X., Liu Y., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2022**, 10, 849542
- [20] Yin L., Guo X., Liu L., Zhang Y., Feng Y., *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2018**, 4(6), 2095—2099
- [21] Peng F., Chen Q. S., Zong M. H., Lou W. Y., *Mol. Catal.*, **2021**, 510, 111673
- [22] Amaro-Reyes A., Díaz-Hernández A., Gracida J., García-Almendárez B. E., Escamilla-García M., Arredondo-Ochoa T., Regalado C., *Catalysts*, **2019**, 9(11), 966
- [23] Ge H. H., Liu X., Yuan H., Zhang G. Y., *Enzyme. Microb. Technol.*, **2023**, 164, 110169
- [24] Zhang J., Feng M., Jiang Y., Hu M., Li S., Zhai Q., *Chem. Eng. J.*, **2012**, 191, 236—242
- [25] Olajuyigbe F. M., Afere F. P., Adetuyi O. Y., Fatokun C. O., *Biocatal. Biotransformation*, **2022**, 40(5), 351—364
- [26] Wang H. R., Han S. R., Wang J. Y., Yu S. Y., Li X. Y., Lu L., *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2021**, 44(4), 727—735
- [27] Dawkar V. V., Jadhav U. U., Tamboli D. P., Govindwar S. P., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2010**, 73(7), 1696—1703
- [28] Lu L., Zhao M., Zhang B. B., Yu S. Y., Bian X. J., Wang W., Wang Y., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, 74, 1232—1239

(Ed.: X, K, V, M)