高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

COF-LZU1在醋酸缓冲溶液中的合成及固定化酶研究

刘　孟，徐　毅，杨　帆，周　全，任　晶，任瑞鹏，吕永康
（太原理工大学化学与化工学院，省部共建煤基能源清洁高效利用国家重点实验室，太原 030024）

摘要　在醋酸缓冲溶液中于室温合成了COF-LZU1，并用于固定化漆酶和辣根过氧化物酶. 通过优化反应浓度、时间、缓冲溶液pH值、温度、洗涤溶剂和干燥方式等条件，在pH=4.5的醋酸缓冲溶液中，于室温下搅拌30 min，合成了具有高结晶度的COF-LZU1，其比表面积高达501 m^2/g，且具有较高的热稳定性(480 ℃). 在最优反应条件下，以COF-LZU1为载体，采用原位包埋法对漆酶和辣根过氧化物酶进行固定化，并对其性质进行了研究. 实验结果表明，固定化酶的活性高达84.26%和73.66%(相对于游离酶活性)，且在循环使用10次后，其相对活性仍保持约80%. 通过多个结合位点，COF-LZU1可有效稳定酶的活性构象，使其不易发生结构变形，提高了酶的热稳定性、pH稳定性和重复使用性等. 醋酸缓冲溶液是生化实验中常用的缓冲溶液，本研究中其既作为溶剂又作为催化剂，与现有合成方法相比，该方法更有利于提高生物分子的稳定性，并有望为固定化酶提供新的解决方案.

关键词　COF-LZU1；醋酸缓冲溶液；室温；固定化酶
中图分类号　O621.3　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20240368

Synthesis of COF-LZU1 in Acetate Buffer and Immobilized Enzyme Study

LIU Meng, XU Yi, YANG Fan*, ZHOU Quan, REN Jing, REN Ruipeng, LYU Yongkang*
(*College of Chemistry and Chemical Engineering*, *Taiyuan University of Technology*, *State Key Laboratory of Clean and Efficient Coal Utilization*, *Taiyuan* 030024, *China*)

Abstract　COF-LZU1 was synthesized in acetate buffer at room temperature and used to immobilize laccase and horseradish peroxidase. Firstly, by optimizing the reaction conditions such as reaction concentration, reaction time, pH value of the acetate buffer, reaction temperature, washing solvent and drying method. In acetate buffer, COF-LZU1 was synthesized with high crystallinity at pH=4.5 with stirring at room temperature for 30 min, which has high specific surface area up to 501 m^2/g, and higher thermal stability(480 ℃). Then, under the aforementioned optimal reaction conditions, laccase and horseradish peroxidase were immobilized by *in situ* embedding with COF-LZU1 as a carrier, and their properties were investigated, which showed that the enzyme activities after immobilization were as high as 84.26% and 73.66%(with respect to the free enzyme activity), and the relative activities were still maintained at about 80% after cycling for 10 times of use. Through multiple binding sites, COF-LZU1 effectively

收稿日期：2024-07-28. 网络首发日期：2024-10-14.
联系人简介：杨　帆，男，博士，讲师，主要从事有机多孔聚合物材料的合成与利用方面的研究. E-mail：yangfan@tyut.edu.cn
吕永康，男，博士，教授，主要从事生物法处理废水方面的研究. E-mail：lykang@tyut.edu.cn
基金项目：国家自然科学基金(批准号：21707098)、山西省应用基础研究计划项目(批准号：20210302124431)和吕梁市校地合作重点研发专项(批准号：2022XDHZ07)资助.
Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.21707098), the Applied Fundamental Research Program of Shanxi Province, China(No.20210302124431) and the Key Research and Development Program for College-local Governments Cooperation in Lvliang City, China (No.2022XDHZ07).

stabilized the active conformation of the enzyme, which made it less prone to structural deformation and improved the thermal stability, pH stability and reusability of the enzyme, etc. Acetate buffer is a commonly used buffer in biochemical experiments, which was used as both a solvent and a catalyst in the present experiments. Compared with the existing synthetic methods, the method has a better effect on the stability of biomolecules and is expected to provide a new solution for enzyme immobilization.

Keywords COF-LZU1; Acetate buffer; Room temperature; Immobilized enzyme

酶是一种天然催化剂，具有选择性好、催化效率高和绿色环保等优点[1]. 游离酶的生存环境较严苛，高温/pH过高或过低的环境均会导致酶的失活，且反应结束后不易与产物分离，难以回收利用，提高了反应成本. 为了解决上述问题，研究人员开发了酶固定化[2]、化学修饰[3]、定向进化[4]以及蛋白质和酶工程[5]等诸多方法. 其中，酶固定化技术是目前提高酶的稳定性和可重复利用性最简单有效的方法.

近年来，多种材料被用于酶固定化，主要包括聚合物[6]、二氧化硅[7]、水凝胶[8]、金属有机框架(MOFs)[9]和共价有机框架(COFs)[10]等. 其中，COFs材料是轻质元素(C，H，O，N和B等)通过可逆的共价键连接，形成的高度有序的多孔骨架材料[11]. 凭借其比面积高、结合位点丰富、结构可设计性强和稳定性高等优点[12]，COFs已成为固定化酶领域最理想的载体材料.

包埋法是通过混合、浸渍或共沉积等方法将酶嵌入至固体材料中的酶固定化技术[13]. 包埋法适用于多种酶，不受酶的尺寸限制，不会改变酶的结构，且可最大限度地保存酶的活性. 2020年，Li等[14]将MOFs作为牺牲模板，二次构筑COFs胶囊包埋酶，首次制备了可定制化的酶@COF“核壳胶囊反应器”；2021年，Wang等[15]使用ZIF-90作为牺牲模板，制备了HRP封装的中空COF胶囊(HRP@COF)；2023年，Zhong等[16]采用相同策略，将葡萄糖氧化酶(GOx)和细胞色素c(Cyt c)封装在COF胶囊中，构建了GOx-Cyt c@COF材料；2022年，Chao等[17]在室温下将酶原位包埋在中空COFs材料中，合成了Trypsin@COF-LZU1；2023年，Zhang等[18]在COFs进行自我修复的过程中将酶包裹，制备了GOx@COF. 由于COFs的合成条件苛刻，目前采用直接包埋法制备固定化酶仍较困难.

COF-LZU1是一种亚胺键(C═N)连接的COFs材料，在水和大多数有机溶剂中稳定性高. 2011年，Ding等[19]以1,4-二氧六环为反应介质，醋酸水溶液(3 mol/L)为催化剂，于高温下合成了COF-LZU1；2016年，Peng等[20]利用连续流动法，在1,4-二氧六环和醋酸水溶液(3 mol/L)中，于室温下合成了COF-LZU1；2018年，Zhang等[21]开发了一种在CO_2/H_2O高压和室温下合成COF-LZU1的新方法；2023年，Liang等[22]在DMF和水溶液中，在室温下搅拌合成了COF-LZU1.

本文以醋酸缓冲溶液为反应溶剂，均苯三甲醛和对苯二胺为反应单体，通过优化COF-LZU1的合成条件，于室温下合成了具有高比表面积和高结晶度的COF-LZU1材料，并将其用于固定化漆酶和辣根过氧化物酶. 实验结果表明，固定化酶具有更高的稳定性. 本文在醋酸缓冲溶液中合成了COFs，为该领域研究提供了新的思路.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

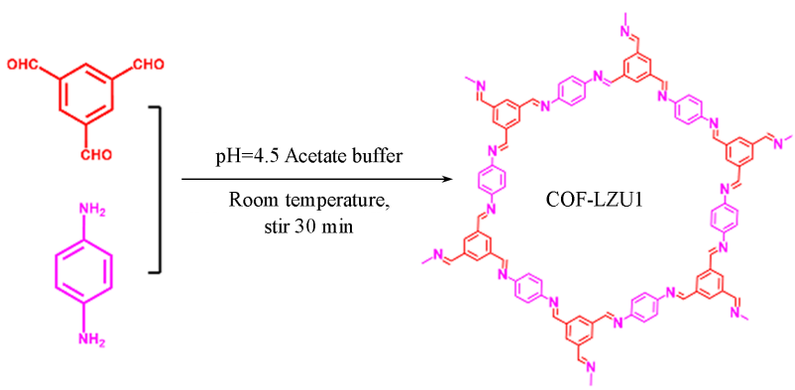
均苯三甲醛(BTCA，纯度99.81%)和2,2′-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS，纯度98%)，上海毕得医药科技股份有限公司；对苯二胺(PA，纯度99%)，上海阿达玛斯试剂有限公司；冰醋酸(分析纯)和无水乙酸钠(纯度99%)，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；甲醇(MeOH)，分析纯，上海泰坦科技股份有限公司；*N*,*N*-二甲基甲酰胺(DMF)，分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司；四氢呋喃(THF)，分析纯，江苏艾康生物医药研发有限公司；牛血清白蛋白(BSA，纯度98%)、Bradford试剂盒(纯度99.99%)和辣根过氧化物酶(HRP，200 U/mg)，生工生物工程(上海)股份有限公司；漆酶(Lac，10000 U/g)，天津希恩思生化科技有限公司.

Rigaku MiniFlex 600型X射线粉末衍射仪(PXRD)，日本Rigaku公司；Nicolet 6700型傅里叶变换红

外光谱仪(FTIR)，德国布鲁克红外仪器亚太有限公司；STA 409 PC型同步热分析仪，德国Netzsch公司；Hitachi S4800型扫描电子显微镜(SEM)，日本日立有限公司；Autosorb-IQ2型表面积和孔隙率分析仪，美国康塔仪器公司；752型紫外-可见分光光度计，上海频谱仪器有限公司；HZQ-F160型全温震荡培养箱，苏州培英实验设备有限公司.

1.2 实验过程

COF-LZU1的合成路线如Scheme 1所示. 将BTCA(32 mg，0.2 mmol)和PA(32 mg，0.3 mmol)分别分散于5 mL醋酸缓冲溶液(pH=4.5)中，超声5 min；将PA滴加至BTCA中，室温下搅拌30 min后，通过离心分离得到固体样品，用甲醇洗涤3次以上，至上层清液无色，再用甲醇/THF(体积比为1∶1)混合溶液索氏提取12 h，将样品在室温下干燥，得到黄色COF-LZU1固体.



Scheme 1 Synthesis of COF-LZU1

对COF-LZU1的合成条件，如反应物浓度、反应时间、醋酸缓冲溶液pH值、反应温度、洗涤溶剂和干燥方式等进行了优化.

1.3 Bradford蛋白浓度的测定

首先，将BSA标准溶液稀释至0.2 mg/mL，将考马斯亮蓝稀释至1×G250，在6个离心试管中分别加入5 mL考马斯亮蓝(1×G250)，分别向离心试管中加入0，100，200，300，400和500 μL 0.2 mg/mL BSA标准溶液，反应3 min后，用紫外-可见分光光度计检测595 nm处的吸光度值，绘制BSA浓度与溶液吸光度的标准曲线. 然后，按照上述方法测定负载前后溶液的吸光度值，利用标准曲线计算出溶液中BSA浓度.

1.4 BSA/Lac/HRP@COF-LZU1的制备

将BTCA(32 mg，0.2 mmol)和PA(32 mg，0.3 mmol)分别加入至5 mL醋酸缓冲溶液(pH=4.5)中，超声5 min；向BTCA溶液中加入BSA固体颗粒，孵育5 min，使用蠕动泵将PA溶液滴加至BTCA溶液中，搅拌30 min后，分别用H_2O，THF和MeOH离心洗涤3次，将样品在室温下干燥，得到黄色固体状BSA@COF-LZU1. 将BSA替换为Lac和HRP，所得产物即为Lac/HRP@COF-LZU1.

1.5 酶活性的测定

1.5.1 *Lac的测试方法* 参照文献[23]方法，向试管中加入1.9 mL醋酸缓冲溶液和ABTS(1 mL，0.5 mmol/L)，加入0.1 mL稀释后的Lac，用紫外-可见分光光度计测量420 nm处5 min内的吸光度值变化，重复测量3次，取平均值计算.

1.5.2 *HRP的测试方法* 参照文献[24]方法，向石英比色皿中加入一定体积的ABTS溶液和HRP溶液混合均匀，加入一定体积的H_2O_2溶液，混合均匀后立即放入紫外-可见分光光度计中，以水为参比，在3 min内测量3次420 nm处的吸光度值，取平均值得到样品的吸光度数据.

1.5.3 *Lac/HRP@COF-LZU1的测试方法* 取一定质量的Lac/HRP@COF-LZU1，通过测定Bradford蛋白浓度，估算出固体的蛋白含量. 将固体分别分散在最适pH的缓冲溶液(Lac的最适pH=4.0，HRP的最适pH=5.0)中，在摇床中孵育5 min(37 ℃，4000 r/min)，用0.22 μm滤膜过滤，采用紫外-可见分光光度计测量滤液的吸光度值.

固定化酶和游离酶的酶活性(Enzyme activity, U/g)采用下式计算:

$$\text{Enzyme activity} = \frac{\Delta\text{OD} \times 10^6 \times V_t}{\Delta t \times \varepsilon \times m} \quad (1)$$

式中: ΔOD(a. u.)为反应时间内在420 nm处吸光度变化值; Δt(min)为反应时间; V_t(mL)为反应溶液的体积; ε(36000 mol/cm)为摩尔消光系数; m(g)为游离酶或固定化酶的质量. 在本实验中, 酶(Lac和HRP)的活性单位的定义是每分钟将ABTS氧化为$ABTS^+$自由基所需酶的量. 固定化产率为固定化后酶活性与固定化前游离酶活性的百分比.

1.6 固定化酶参数的设定

将1.4节中反应后的混合物离心分离, 然后采用Bradford法测定溶液中的酶浓度.

固定化率(Immobilization rate, %)采用下式计算:

$$\text{Immobilization rate} = \frac{m_0 - c_e V_e}{m_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: m_0(mg)为反应前加入酶的质量; c_e(mg/mL)为反应后溶液中酶的浓度; V_e(mL)为溶液的体积.

负载量(Loading capacity, mg/g)采用下式计算:

$$\text{Loading capacity} = \frac{m_0 - c_e V_e}{m_{\text{COF}}} \quad (3)$$

式中: m_{COF}(g)为加入COF的质量.

1.7 稳定性测试

1.7.1 热稳定性、pH稳定性和环境耐受性测试 将Lac, HRP, Lac@COF-LZU1和HRP@COF-LZU1分别置于30, 40, 50, 60, 70和80 ℃水浴中孵化2 h后测试酶活性; 分别置于pH=2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9和10的缓冲溶液中孵化2 h后测试酶活性; 分别置于H_2O, 醋酸缓冲溶液和MeOH中孵化24 h后测试酶活性.

1.7.2 循环稳定性测试 在测试Lac@COF-LZU1和HRP@COF-LZU1的初始活性后, 将其离心洗涤3次. 向分离出的样品中重新加入缓冲溶液和底物, 并测试活性. 多次重复上述操作, 计算循环稳定性.

2 结果与讨论

2.1 合成条件的优化

2.1.1 反应物浓度 COFs是2个单体之间碰撞生成的无定形聚合物通过“自我修复”形成的共价有机多孔框架材料[25]. 因此, 当反应物浓度过高时, 无定形聚合物的合成速率较快, 无时间进行充分的“自我修复”, 使产物的结晶度降低. 当反应物浓度过低时, 单体分子间碰撞的概率显著降低, 使聚合物产率降低, 无充足的聚合物进行后续的“自我修复”, 导致产物的结晶度降低. 因此, 首先考察了反应物浓度的影响. 在10 mL醋酸缓冲溶液中(BTCA溶于5 mL醋酸缓冲溶液, PA溶于5 mL醋酸缓冲溶液), 加入不同总质量的单体(BTCA/PA摩尔比为2∶3), 保持其它反应条件不变, 通过PXRD测试比较产物的结晶度. 图1(A)为不同质量的单体在10 mL醋酸缓冲溶液(pH=4.5)中于室温下搅拌30 min后所得产物的PXRD谱图和COF-LZU1的标准模拟谱图. 位于2θ=4.88°, 8.25°, 10.34°, 12.28°和26.28°处的衍射峰可分别对应于(100), (110), (200), (210)和(001)晶面[26], 与COF-LZU1的标准模拟谱图衍射峰一致, 且无杂质峰, 表明已合成了COF-LZU1. 单体总质量为64 mg的产物PXRD谱图显示出强的衍射峰, 表明其具有较高的结晶度, 当单体总质量高于或低于64 mg时, 产物的PXRD谱图衍射峰与标准模拟谱图一致, 但衍射峰强度较弱. 因此, 在后续反应条件优化中, 均以10 mL醋酸缓冲溶液和64 mg单体(BTCA/PA摩尔比为2∶3)为条件进行实验.

2.1.2 反应时间 图1(B)为室温和常压下64 mg单体在10 mL pH=4.5的醋酸缓冲溶液中反应不同时间后所得产物的PXRD谱图, 产物的衍射峰与COF-LZU1标准模拟谱图一致. 随着反应时间(30 min~24 h)的延长, COF-LZU1的衍射峰强度增大, 表明结晶度明显提高. 图S1(见本文支持信息)为不同反

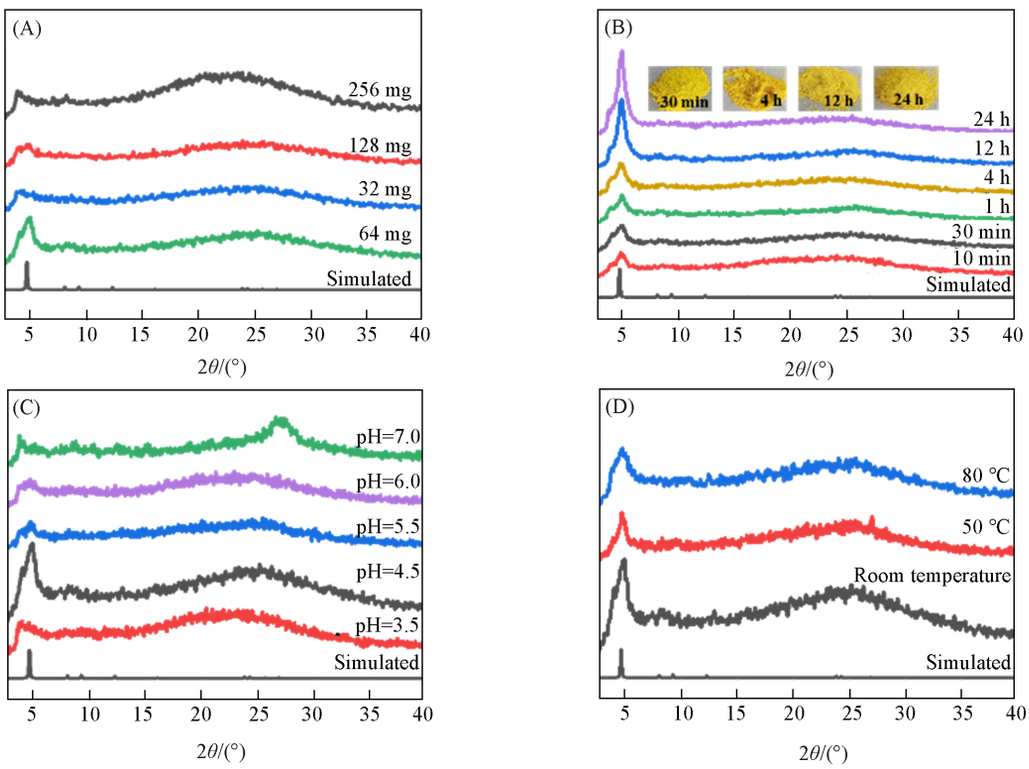


Fig. 1 PXRD patterns of COF-LZU1 synthesized at different concentrations(A), at different reaction times(B), in different pH values of acetate buffer(C), and at different temperatures(D)

Insets in (B) are the digital photos of the samples prepared at different time.

应时间制得的COF-LZU1的SEM照片，可见随着反应时间的延长，产物的形貌由球状逐渐变为纳米花状. PXRD和SEM表征结果表明，反应30 min时可合成出具有球形结构的COF-LZU1，明显比溶剂热法和其它室温合成方法快[19~22]. 随着反应时间的增长，聚合物可进行充分的“自我诊断”和“自我修复”，使产物的结晶度提高，最终形成具有高结晶度的COF-LZU1.

2.1.3 *醋酸缓冲溶液的pH值* 图1(C)为64 mg单体在10 mL不同pH值的醋酸缓冲溶液中于室温反应30 min后所得产物的PXRD谱图，可见，仅在pH=4.5时产物有较好的结晶度.

2.1.4 *反应温度* 图1(D)为64 mg单体在10 mL pH=4.5的醋酸缓冲溶液中，在不同温度下反应30 min后所得产物的PXRD谱图. 可见，随着温度的升高，样品的衍射峰半峰宽变宽，即升高温度不利于增加COF-LZU1的结晶度. 这是因为反应温度升高促进了醋酸电离，从而增强了醋酸缓冲溶液的酸性. 由图1(C)可见，pH过高或过低均会降低产物的结晶度. 因此，在pH=4.5的醋酸缓冲溶液中，最适反应温度为室温.

2.1.5 *洗涤溶剂* 图S2(见本文支持信息)为采用不同洗涤溶剂处理后产物的PXRD谱图. 可见，用THF/DMF与MeOH处理后样品的PXRD谱图中无杂峰，表明使用这两种洗涤溶剂可得到纯组分COF-LZU1. MeOH价格低且对环境污染较小，因此选用MeOH作为洗涤溶剂.

2.1.6 *干燥方式* 图S3(见本文支持信息)为不同干燥方式处理后产物的PXRD谱图. 可见，干燥方式不同，结晶度有明显差异. 自然风干处理得到的产物的结晶度显著高于80 ℃真空烘箱处理得到的产物，因此选用的干燥方式为自然风干.

2.2 COF-LZU1的表征

由图2(A)可见，合成的产物具有较强的衍射峰，表明其具有较高的结晶度. 位于2θ=4.88°，8.25°，10.34°，12.28°，16.14°和26.28°处的衍射峰可分别对应于(100)，(110)，(200)，(210)和(001)晶面，且无杂质峰，与COF-LZU1标准模拟谱图一致[26].

由图S4(见本文支持信息)可见，COF-LZU1在1580 cm^{-1}处显示出强的C═N伸缩峰，表明形成了亚

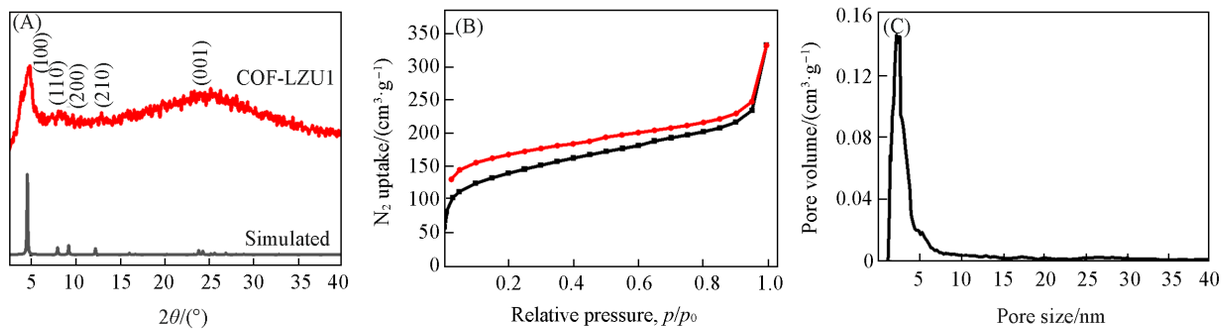


Fig. 2 PXRD patterns(A), N_2 adsorption-desorption isotherms(B) and DFT pore size distributions of COF-LZU1(C)

胺键. 与反应物BTCA和PA的FTIR谱图相比，COF-LZU1的醛基带(1620 cm^{-1})和氨基带(3420 cm^{-1})明显减弱且略有偏移，这是因为醛与伯胺缩合形成了亚胺键[26]. 1620和3420 cm^{-1}处的峰可分别对应于COF-LZU1末端残留的醛基和氨基.

在77 K下进行了氮气吸附-脱附测试. 如图2(B)所示，COF-LZU1的氮气吸附-脱附等温线是典型的I型吸附等温线，表明具有微孔结构，通过计算得出COF-LZU1的BET(Brunauer-Emmett-Teller)比表面积为501 m^2/g，远高于溶剂热法合成的COF-LZU1的比表面积(410 m^2/g)[19]. 图2(C)为使用Density functional theory(DFT)计算得到的孔径分布图，孔径主要集中在2.50 nm处.

由图S5(见本文支持信息)可见，COF-LZU1具有良好的热稳定性，耐受温度高达430 ℃. 在240~440 ℃范围内有微小失重，可能是因为产物边缘存在少量未反应的醛基和氨基，其在高温下被分解. 在480 ℃时失重明显，说明COF-LZU1骨架开始坍塌. 与溶剂热法制备的COF-LZU1(高于310 ℃时骨架坍塌分解)相比[19]，在醋酸缓冲溶液中合成的COF-LZU1具有更好的热稳定性.

2.3 Lac/HRP@COF-LZU1的表征

由于Lac/HRP与BSA的分子量相近，所以选取BSA作为模型蛋白进行测试以研究酶固定化情况. 由图S6(见本文支持信息)可见，随BSA浓度的增大，BSA@COF-LZU1的固定化率先增大后减小，当BSA浓度为5 mg/mL时，BSA@COF-LZU1的固定化率最大，负载量为362 mg/g. 因此，Lac/HRP固定化实验的初始浓度选择5 mg/mL.

由图3可见，与COF-LZU1相比，固定化Lac/HRP后的COF-LZU1的衍射峰位置均未发生变化且无其它杂质峰，仅在2θ=4.88°处的衍射峰强度略微降低. 这说明酶的包埋并未改变COF-LZU1的结晶性质，进一步表明材料的稳定性较高.

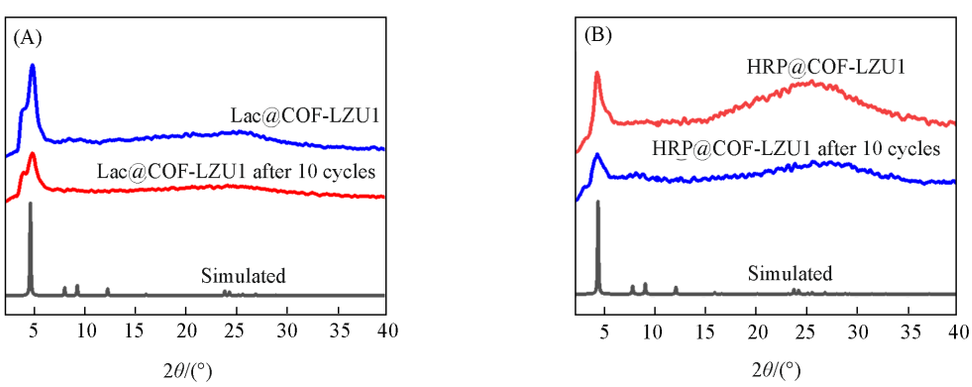


Fig. 3 PXRD patterns of Lac@COF-LZU1, Lac@COF-LZU1 after 10 cycles(A), HRP@COF-LZU1 and HRP@COF-LZU1 after 10 cycles(B)

由图S7(A)(见本文支持信息)可见，Lac@COF-LZU1在1657 cm^{-1}处出现了可归属于Lac C═O的伸缩振动峰；3370 cm^{-1}处的峰变宽，这是由于Lac的—NH_2和—OH伸缩振动重叠所致[27]. 由图S7(B)(见本文支持信息)可见，HRP@COF-LZU1在1658 cm^{-1}处出现了可归属于HRP C═O的峰[22]；3300 cm^{-1}处的峰变宽是由于HRP的N—H和O—H伸缩振动重叠所致，说明Lac/HRP已负载至COF-LZU1中，且

Lac/HRP@COF-LZU1仍维持球形形貌，球直径略微增大(见本文支持信息图S8).

2.4 Lac/HRP@COF-LZU1的催化性能

Lac是可将苯酚类物质氧化成活性自由基，并将其转化为苯醌的生物大分子. HRP通过催化过氧化物和供氢体生成水和氧化物，常用的供氢体有TMB，OPD和ABTS等. 本文以ABTS为显色剂，以H_2O_2为辣根过氧化物酶底物，测试了游离Lac，游离HRP和Lac/HRP@COF-LZU1的活性. 结果表明，Lac@COF-LZU1的酶活性为游离酶的84. 26%，HRP@COF-LZU1的酶活性为游离酶的73. 66%.

2.5 Lac/HRP@COF-LZU1的稳定性

酶活性稳定性是酶在催化过程中的一个重要参数，对酶的热稳定性、pH稳定性、环境耐受性和循环稳定性进行了测试[28].

2.5.1 热稳定性 将游离酶分别置于30，40，50，60，70和80 ℃环境中恒温2 h后，测试其活性. 如图S9(A)和(B)(见本文支持信息)所示，在5 min内测定其吸光度值(OD)，并计算出OD随时间(t)变化的曲线斜率，即为酶活性. 将HRP/Lac@COF-LZU1分别置于30，40，50，60，70和80 ℃环境中恒温2 h后，测试其活性. 由图4(A)可见，在40 ℃时游离Lac和Lac@COF-LZU1的活性最高；当温度低于或高于40 ℃时酶的活性下降，但游离酶失活速率更快，这是由于游离酶结构高度异变所致；而COF-LZU1作为载体，可阻止结构快速异变. 由图4(B)可见，在30 ℃时游离HRP和HRP@COF-LZU1的活性最高；当温度高于30 ℃时酶的活性下降，但固定化后酶的失活速率明显低于游离酶，稳定性更高. 这是因为COF-LZU1对酶的结构起到了保护作用，延缓了酶活性的降低.

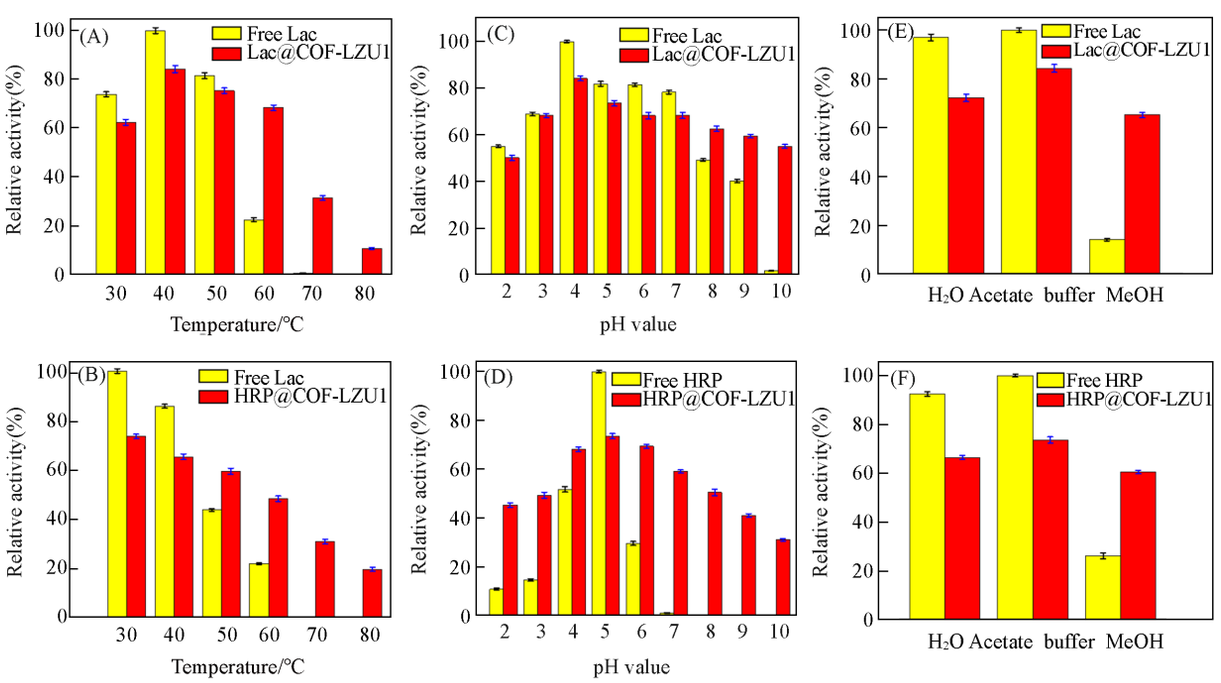


Fig. 4 Relative activity of free Lac and Lac@COF-LZU1(A), free HRP and HRP@COF-LZU1(B) at different temperatures, relative activity of free Lac and Lac@COF-LZU1(C), free HRP and HRP@COF-LZU1(D) at different pH values, relative activity of free Lac and Lac@COF-LZU1 (E), free HRP and HRP@COF-LZU1 in different environments(F)

2.5.2 pH稳定性 将游离Lac/HRP分别置于pH=3，4，5，6，7，8，9和10的环境中恒温2 h后，测试其活性. 如图S9(C)和(D)(见本文支持信息)所示，在5 min内测定其吸光度值(OD)，并计算出OD随时间(t)变化的曲线斜率，即为酶活性. 将Lac/HRP@COF-LZU1分别置于pH=3，4，5，6，7，8，9和10的环境中恒温2 h后，测试其活性. 由图4(C)可见，当pH=4时酶的活性最高；当pH高于或低于4时游离酶快速失活，而Lac@COF-LZU1的活性更稳定，这是因为COFs材料对酶的保护作用使活性保持稳定.

由图4(D)可见，当pH=5时酶的活性最高；当pH大于或小于5时酶的活性下降，但HRP@COF-LZU1活性的下降速率明显低于游离HRP，这是因为COF-LZU1对酶的结构具有保护作用，有利于维持酶的活性.

2.5.3 环境耐受性 将游离Lac/HRP分别置于H_2O，醋酸缓冲溶液和MeOH中恒温24 h后，测试其活性. 如图S9(E)和(F)(见本文支持信息)所示，在5 min内测定其吸光度值(OD)，并计算出OD随时间(t)变化的曲线斜率，即为酶活性. 由图4(E)和(F)可见，在MeOH中孵育24 h后游离Lac/HRP快速失活，而Lac/HRP@COF-LZU1仍保持活性稳定，说明COFs材料在部分有机溶剂中可维持酶的稳定性.

2.5.4 循环稳定性 COFs的合成方法复杂且成本较高，因此对固定化后的酶@COFs进行循环稳定性测试十分重要. 如图5所示，酶@COFs在循环使用10次后，其相对活性约为80%. 由图3和图S7(见本文支持信息)可见，循环使用10次后Lac/HRP@COF-LZU1仍具有良好的结晶性，无其它杂质峰，且循环使用10次后的Lac/HRP@COF-LZU1仍为球形(图S8，见本文支持信息)，与循环使用前的材料相比，结构基本无变化，说明酶@COFs具有良好的可重复使用性与稳定性.

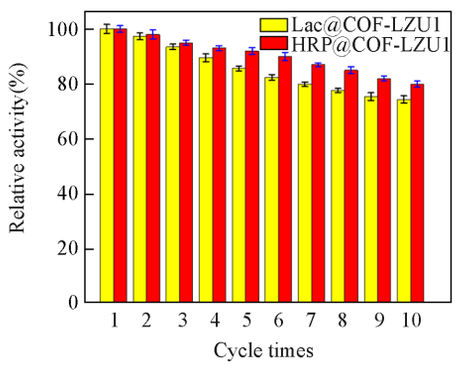


Fig. 5 Cyclic stability testing of Lac@COF-LZU1 and HRP@COF-LZU1

3 结 论

通过优化反应条件，在醋酸缓冲溶液中制备了COF-LZU1. 实验结果表明，COF-LZU1具有良好的结晶度和热稳定性(480 ℃)以及高的比表面积(501 m^2/g). COF-LZU1负载Lac/HRP后，主体材料的孔隙保持开放，有利于反应物扩散至活性位点，使其保持较高的生物活性. 固定化酶具有较高的热稳定性和pH稳定性等，循环使用10次后仍保持约80%的活性. 醋酸缓冲溶液在反应过程中既作为反应溶剂，又作为催化剂，显著减少了有机溶剂的使用量，同时避免了外加催化剂. 本文为COFs材料的绿色快速合成提供了新的思路和途径，为固定化酶领域研究开拓了新方向.

支持信息见http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20240368.

参 考 文 献

[1] Liang W. B., Wied P., Carraro F., Sumby C. J., Nidetzky B., Tsung C. K., Falcaro P., Doonan C. J., *Chem. Rev.*, **2021**, *121*(3), 1077—1129
[2] Sriwong K. T., Matsuda T., *Org. Process Res. Dev.*, **2022**, *26*(7), 1857—1877
[3] Díaz-Rodríguez A., Davis B. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2011**, *15*(2), 211—219
[4] Zhao H. M., Chockalingam K., Chen Z. L., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, *13*(2), 104—110
[5] Lemay-St-Denis C., Doucet N., Pelletier J. N., *Protein Eng. Des. Sel.*, **2022**, *35*, gzac015
[6] Veronese F. M., *Biomaterials*, **2001**, *22*(5), 405—417
[7] Llopis-Lorente A., Lozano-Torres B., Bernardos A., Martínez-Máñez R., Sancenón F., *J. Mater. Chem. B*, **2017**, *5*(17), 3069—3083
[8] Liang H., Jiang S. H., Yuan Q. P., Li G. F., Wang F., Zhang Z. J., Liu J. W., *Nanoscale*, **2016**, *8*(11), 6071—6078
[9] Ji Y., Wu Z. Z., Zhang P., Qiao M., Hu Y., Shen B. X., Li B. Z., Zhang X., *Biochem. Eng. J.*, **2021**, *169*, 107962
[10] Kumar S., Kulkarni V. V., Jangir R., *ChemistrySelect*, **2021**, *6*(41), 11201—11223
[11] Zhao X. J., Pachfule P., Thomas A., *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*(12), 6871—6913
[12] Feng X., Ding X. S., Jiang D. L., *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*(18), 6010—6022
[13] Maghraby Y. R., El-Shabasy R. M., Ibrahim A. H., Azzazy H. M. E. S., *ACS Omega*, **2023**, *8*(6), 5184—5196
[14] Li M. M., Qiao S., Zheng Y. L., Andaloussi Y. H., Li X., Zhang Z. J., Li A., Cheng P., Ma S. Q., Chen Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*(14), 6675—6681
[15] Wang M. H., Lin Y. X., Lu J. Y., Sun Z. W., Deng Y., Wang L., Yi Y. X., Li J. L., Yang J., Li G. X., *Chem. Eng. J.*, **2022**, *429*, 132332

[16] Zhong C., Li G. R., Tian W. C., Ouyang D., Ji Y., Cai Z. W., Lin Z. A., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2023**, *15*(7), 10158—10165
[17] Chao H., Zhou Z. X., He W. T., Li M., Yuan X. Y., Su P., Song J. Y., Yang Y., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, *14*(18), 20641—20651
[18] Zhang Y. F., Xing C. Y., Mu Z. J., Niu Z. R., Feng X., Zhang Y. Y., Wang B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, *145*(24), 13469—13475
[19] Ding S. Y., Gao J., Wang Q., Zhang Y., Song W. G., Su C. Y., Wang W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*(49), 19816—19822
[20] Peng Y. W., Wong W. K., Hu Z. G., Cheng Y. D., Yuan D. Q., Khan S. A., Zhao D., *Chem. Mater.*, **2016**, *28*(14), 5095—5101
[21] Zhang F. Y., Zhang J. L., Zhang B. X., Tan X. N., Shao D., Shi J. B., Tan D. X., Liu L. F., Feng J. Q., Han B. X., Yang G. Y., Zheng L. R., Zhang J., *ChemSusChem*, **2018**, *11*(20), 3576—3580
[22] Liang J. Y., Ruan J. F., Njegic B., Rawal A., Scott J., Xu J. T., Boyer C., Liang K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(23), e202303001
[23] Cao Z. Y., Zang J. P., Jia H., Li X. G., Wang P., *Acta Agric. Boreali Sin.*, **2011**, *26*(2), 76—80(曹志艳, 藏金萍, 贾慧, 李旭光, 王平. 华北农学报, **2011**, *26*(2), 76—80)
[24] Liu S. J., *ShangHai HuanJing KeXueJi*, **2016**, (2), 125—130(刘思佳. 上海环境科学集, **2016**, (2), 125—130)
[25] Wilson A., Gasparini G., Matile S., *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*(6), 1948—1962
[26] Fan H. W., Gu J. H., Meng H., Knebel A., Caro J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*(15), 4083—4087
[27] Tang Y., Li W. Y., Muhammad Y., Jiang S. L., Huang M. Y., Zhang H. Z., Zhao Z. X., Zhao Z. X., *Chem. Eng. J.*, **2021**, *421*(1), 129743
[28] Hou Q. Z., Rooman M., Pucci F., *J. Chem. Theory Comput.*, **2023**, *19*(12), 3664—3671

(Ed.: X, V, K)