

doi:10.12301/spxb202200982

文章编号:2095-6002(2023)06-0039-13

引用格式:芦瑜涵,张成楠,李秀婷,等.基于无定形沸石-咪唑框架-8材料固定米根霉源脂肪酶研究[J].食品科学技术学报,2023,41(6):39-51.



LU Yuhan, ZHANG Chengnan, LI Xiuting, et al. Immobilization of lipase derived from *Rhizopus oryzae* based on amorphous zeolitic imidazolate framework-8 material [J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(6):39-51.

基于无定形沸石-咪唑框架-8材料固定米根霉源脂肪酶研究

芦瑜涵¹, 张成楠^{1,*}, 李秀婷^{1,2}, 徐友强¹, 李微微¹

(1. 北京工商大学 食品与健康学院/北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 北京 100048;

2. 北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048)

摘要:多级孔沸石-咪唑框架-8(zeolitic imidazolate framework-8, ZIF-8)材料相较于传统的 ZIF-8 材料具有更大的孔径,在固定化酶领域展现了较好的应用前景。目前,利用多级孔 ZIF-8 材料固定米根霉源脂肪酶(*Rhizopus oryzae* lipase, ROL)的效果仍不清楚。通过调节 ZIF-8 材料前驱体的初始物质的量比例,制备得到一种无定形 ZIF-8(amorphous zeolitic imidazolate framework-8, aZIF-8)材料,基于 ZIF-8 和 aZIF-8 材料,采用原位自封装法制备得到固定化脂肪酶 ROL@ZIF-8 和 ROL@aZIF-8。利用红外光谱仪、X-射线衍射仪和扫描电子显微镜等研究了 ZIF-8、aZIF-8、ROL@ZIF-8 及 ROL@aZIF-8 的形貌及结构差异,比较了在不同 ROL 质量浓度条件下制备的 ROL@aZIF-8 与相同质量浓度 ROL 的酶活力,考察了 ROL 和 ROL@aZIF-8 的酸碱稳定性、温度耐受性、储藏稳定性以及对邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)和邻苯二甲酸二异丁酯(diisobutyl phthalate, DIBP)的水解能力。结果表明,aZIF-8 材料呈现出包含十字花形、正方形、球形等多种形态的无定形形貌,是一种具有微孔和介孔的多级孔材料。在 ROL 的质量浓度为 4 mg/mL 的条件下制备的 ROL@aZIF-8 呈现最大酶活力,为 5.69 U/mg。在相同的 ROL 质量浓度条件下,aZIF-8 材料的疏水性及多级孔特性促使 ROL@aZIF-8 的酶活力比 ROL 高。ROL@aZIF-8 比 ROL 具有更好的碱稳定性、温度耐受性、储藏稳定性以及更高的对 DBP 和 DIBP 的水解能力。

关键词:脂肪酶;多级孔沸石-咪唑框架-8材料;固定化酶;原位自封装法;形貌

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

脂肪酶(triacylglycerol acyl hydrolases, EC 3.1.1.3)是一类丝氨酸水解酶,在微水和非水相中能够催化酯化、转酯、酯解等多种反应^[1-2],被认为是目前生物领域中最为重要的工业酶之一^[3],在食品和饲料等领域具有较大的商业价值^[4]。米根霉源脂肪酶(*Rhizopus oryzae* lipase, ROL)作为常用的商业

酶之一,能够改变甘油骨架连接的脂肪酸类型,在油脂加工、风味酯类物质合成和天然等同酯香料制备方面具有重要的应用^[5-8]。然而,游离的 ROL 存在化学稳定性差、回收困难和无法连续化操作等问题^[9-10],限制了其在工业中的实际应用。寻找提升 ROL 稳定性及可重复利用率,同时在最大程度上保

收稿日期:2022-10-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32001638;31830069)。

Foundation: National Natural Science Foundation of China (32001638;31830069).

第一作者:芦瑜涵,女,硕士研究生,研究方向为食品酶学。

*通信作者:张成楠,男,副教授,博士,主要从事食品生物技术方面的研究。

持其催化活性的方法,一直是研究者面对的艰巨任务与挑战^[11]。

固定化酶技术是解决生物酶稳定性差、回收困难等问题的有效方法之一^[12-14]。目前,研究人员已成功将 ROL 固定在 NKA-9 树脂、HPMC-PVA 膜、磁性纳米颗粒、苯乙烯-二乙烯基苯等多种基质上^[10, 15-17]。尽管基于这些载体制备的固定化 ROL 展现了稳定性提高及可重复利用等优点,但由于其大多采用吸附法制备,载体对酶分子的束缚较弱,在一定条件下容易出现酶渗漏、浸出等问题^[11]。沸石-咪唑框架-8 (zeolitic imidazolate framework-8, ZIF-8) 是以 Zn^{2+} 和咪唑连接体通过配位键自组装形成的一种金属有机骨架材料^[18-19]。ZIF-8 材料具有较大的比表面积、可调控的孔道尺寸及较强的化学和热稳定性等优点,在酶固定化领域备受关注^[20-21]。以 ZIF-8 材料为载体制备固定化酶的方法主要包括吸附法、共价交联法、孔隙封装法和原位自封装法^[11, 18]。原位自封装法是将酶加入 ZIF-8 材料的前驱体溶液中,在自组装形成 ZIF-8 材料的同时,直接把酶固定在 ZIF-8 内部^[18]。与吸附法制备的固定化酶相比,原位自封装法制备的固定化酶减少了酶渗漏、浸出等问题,其稳定性和可重复利用性提高。目前,基于 ZIF-8 材料利用原位自封装法已实现了产碱杆菌源脂肪酶、黑曲霉源脂肪酶和皱褶假丝酵母源脂肪酶的固定化^[22-24]。

尽管基于 ZIF-8 材料采用原位自封装法制备的固定化脂肪酶已展现了较好的应用前景,但是由于 ZIF-8 材料较小的孔径,酶的底物或产物在进出 ZIF-8 材料孔隙时会产生较大的传质阻力,降低固定化酶的催化效率^[22-25]。为了解决该问题,研究人员开发了多种具有更大孔径的 ZIF-8 材料。Feng 等^[26]在无水甲醇体系下合成了具有微孔(孔径 $< 2 \text{ nm}$) 和介孔(孔径为 $2 \sim 50 \text{ nm}$) 的多级孔 ZIF-8 材料,并基于此材料利用原位自封装法制备了包含细胞色素 C 和葡萄糖氧化酶的多酶催化纳米反应器。然而,由于 ROL 的甲醇耐受性较差,在固定化过程中 ROL 可能发生变性失活^[27]。Cui 等^[28]研究发现,在一定的前驱体初始物质的量比例条件下可以制备出具有介孔的十字花形状 ZIF-8 材料,利用此材料原位封装过氧化氢酶制备的固定化酶活性,比采用传统 ZIF-8 材料制备的固定化酶活性提高了 4 倍。Wu 等^[29]通过缺陷

法制备出具有微孔及介孔的多级孔 ZIF-8 材料,应用该材料通过原位自封装法制备了固定化葡萄糖氧化酶,其显示出比基于仅具有微孔的 ZIF-8 材料制备的固定化酶高 5 ~ 20 倍的表观活性。采用多级孔 ZIF-8 材料固定化酶不仅提高了酶的稳定性和可重复利用性,而且保持甚至提高了酶的催化活性。

在原位自封装过程中,酶分子表面的电荷分布、酶分子与 ZIF-8 材料间形成的氢键、疏水相互作用等显著影响 ZIF-8 材料的成核、生长及组装,进而影响固定化酶的形貌及催化活性^[11, 28, 30]。Liang 等^[19]基于 ZIF-8 材料采用原位自封装法固定脂肪酶、尿素酶、葡萄糖脱氢酶等不同酶时发现,固定化酶因酶的结构差异呈现不同的形貌特征。Chen 等^[31]比较了利用 ZIF-8 材料原位自封装葡萄糖氧化酶、细胞色素 C、辣根过氧化物酶、过氧化氢酶、尿酸氧化酶和乙醇脱氢酶制备的固定化酶的催化性能,发现酶的表面净电荷对固定化酶的固载率和酶活力具有较大影响。目前,利用多级孔 ZIF-8 材料采用原位自封装法固定 ROL 的效果仍不清楚。本研究拟通过调节前驱体初始物质的量的比例,制备无定形 ZIF-8 (aZIF-8) 材料,希望获得一种具有更大孔径的 aZIF-8 材料。采用原位自封装法固定米根霉源脂肪酶,制备固定化脂肪酶 ROL@ aZIF-8, 研究 ZIF-8、aZIF-8、ROL@ aZIF-8 及采用 ZIF-8 材料固定化 ROL (ROL@ ZIF-8) 的形貌及结构差异,比较游离 ROL 与 ROL@ aZIF-8 的热稳定性、酸碱耐受性、贮存稳定性及对邻苯二甲酸二丁酯 (dibutyl phthalate, DBP) 和邻苯二甲酸二异丁酯 (diisobutyl phthalate, DIBP) 的水解能力,以期基于多级孔 ZIF-8 材料制备固定化脂肪酶提供更多的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ROL、2-甲基咪唑、醋酸锌、异丙醇和对硝基苯酚丁酸酯 (*p*-nitrophenyl butyrate, *p*-NPB), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic Acid, EDTA), 西陇科学股份有限公司; DBP 和 DIBP, 国药集团化学试剂有限公司。实验所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

CR 22N 型多用途冷冻离心机、jsm7610f 型扫描

电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM)、Jem2100p 型透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM)、扫描透射电镜-能量色散 X 射线光谱仪 (scanning transmission electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometry, STEM-EDX), 日本日立公司; Free zone 4.5 plus 型真空冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; Nicolet IS50 型傅里叶变换红外光谱仪 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR), 赛默飞世尔科技有限公司; D8advance 型 X-射线衍射仪 (X-ray diffraction, XRD), 布鲁克公司; N_2 吸附解吸仪, 美国康塔公司; Theta Flex 型水接触角仪, 瑞典百欧林公司; 电感耦合等离子体发射光谱仪 (inductively coupled plasma optical emission spectrometer, ICP-OES)、7890B 型气相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 aZIF-8、ROL@ aZIF-8、ZIF-8 及 ROL@ ZIF-8 的制备

1.3.1.1 aZIF-8 及 ROL@ aZIF-8 的制备

参考 Wu 等^[29]的方法并适当修改。将 1 mL 20 mmol/L 的醋酸锌溶液逐滴加至 1 mL 33.8 mmol/L 的 2-甲基咪唑溶液中, 立刻加入 80 μ L、5 mg/mL 的 ROL 溶液, 在 300 r/min 下反应 30 min。反应结束后用去离子水洗涤沉淀物 3 次, 收集沉淀, 冷冻干燥 12 h, 得到 ROL@ aZIF-8。在相同条件下不添加 ROL 溶液制备 aZIF-8 材料。

1.3.1.2 ZIF-8 及 ROL@ ZIF-8 的制备

参考梁鑫等^[24]的方法并适当修改。将 20 mL 1 mol/L 的 2-甲基咪唑溶液与 80 mg 的 ROL 混合均匀, 加入 2 mL 0.5 mol/L 的醋酸锌溶液, 在 300 r/min 下反应 30 min。反应结束后用去离子水洗涤沉淀物 3 次, 收集沉淀, 冷冻干燥 12 h, 得到 ROL@ ZIF-8。在相同条件下不添加 ROL 溶液制备 ZIF-8 材料。

1.3.2 aZIF-8、ROL@ aZIF-8、ZIF-8 及 ROL@ ZIF-8 的形貌及结构观察

取一定量的 aZIF-8、ROL@ aZIF-8、ZIF-8 以及 ROL@ ZIF-8 样品, 研磨至均匀粉末。采用 XRD、SEM 和 TEM 观察样品形貌和晶体结构; 采用 FT-IR、STEM-EDX 及 ICP-OES 分析样品中元素组成、分布及比例; 采用 N_2 吸附解吸仪测定温度为 77 K 时样品的 N_2 吸附解吸等温线, 计算 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 面积、孔径分布和孔隙体积; 采用水接

触角仪分析样品的亲疏水性。

1.3.3 ROL 和 ROL@ aZIF-8 酶活力的测定

ROL 和 ROL@ aZIF-8 酶活力的测定方法参考 Qi 等^[32]的方法并稍加修改。将一定量的 ROL 和 ROL@ aZIF-8 加入 pH 值为 7.5 的 1 mL 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液中, 与 1 mL 2 mg/mL 溶于异丙醇中的 *p*-NPB 溶液混匀后, 在室温条件下反应 5 min。反应结束后, 加入 1 mL 终止液 (40 g NaOH 和 93.5 g EDTA 溶于 1 L 去离子水中) 终止反应, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下离心收集上清液, 在 405 nm 波长处测定吸光值。酶活力单位定义为: 每分钟释放 1 μ mol 对硝基苯酚 (*p*-nitrophenol, *p*-NP) 所需的 ROL 和 ROL@ aZIF-8 的质量, 以 U/mg 表示。

1.3.4 不同质量浓度的 ROL 与 ROL@ aZIF-8 酶活力的测定

采用不同质量浓度 (3、4、5、6、7 mg/mL) 的 ROL 溶液分别制备 ROL@ aZIF-8, 分析 ROL@ aZIF-8 与相同质量浓度 ROL 的酶活力。

1.3.5 不同条件下 ROL 与 ROL@ aZIF-8 酶活力的测定

1.3.5.1 不同 pH 值条件下 ROL 与 ROL@ aZIF-8 酶活力的测定

将 ROL 以及 ROL@ aZIF-8 置于不同 pH 值 (7.5、8、9、10) 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液中, 在室温下保温 60 min, 测定其酶活力。

1.3.5.2 不同温度条件下 ROL 与 ROL@ aZIF-8 酶活力的测定

将 ROL 以及 ROL@ aZIF-8 置于 pH 值为 7.5 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液中, 在不同温度 (30、40、50、60、70 $^{\circ}$ C) 下保温 60 min, 测定其酶活力。

1.3.5.3 不同储藏时间条件下 ROL 与 ROL@ aZIF-8 酶活力的测定

将 ROL 以及 ROL@ aZIF-8 置于 pH 值为 7.5 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液中, 在 4 $^{\circ}$ C 下储藏不同时间 (0、2、4、6、8、10、15、20、25 d), 测定其酶活力。

1.3.6 ROL 及 ROL@ aZIF-8 水解 DBP 和 DIBP 能力的测定

以 pH 值为 7.4 的 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液为缓冲体系, 将 0.78 mL Tris-HCl 缓冲液、200 μ L 50 mg/mL 的 ROL 溶液或 50 mg ROL@ aZIF-8, 以及 20 μ L 10 g/L 的 DBP 和 DIBP 混合溶液充分混合, 在 150 r/min、37 $^{\circ}$ C 条件下反应 2 h。反应结束后, 使用正己烷 (含内标油酸乙酯) 萃取, 进行气相色谱分

析。分析条件:安捷伦 HP-INNO WAX 色谱柱,80 ℃ 保持 3 min,以 20 ℃/min 的速率升至 250 ℃,保持 22.5 min。以未加入 ROL 溶液或 ROL@ aZIF-8 的催化反应体系中的 DBP 和 DIBP 残余量为 100%,计算 ROL 以及 ROL@ aZIF-8 对 DBP 和 DIBP 的分解率。

1.4 数据处理

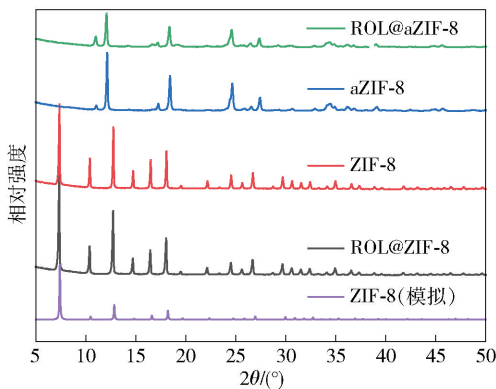
数据以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。采用 SPSS 25 统计软件经单因素方差分析进行数据比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 ZIF-8、aZIF-8、ROL@ ZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 的形貌比较

在原位自封装过程中,前驱体的初始物质的量比例不同,会形成具有不同形貌及结构的 ZIF-8 材料^[28-29]。在本研究中,ZIF-8 材料是在 2-甲基咪唑和醋酸锌(前驱体)初始物质的量比例为 20:1 的条件下制备获得,而 aZIF-8 材料是在 2-甲基咪唑和醋酸锌初始物质的量比例为 1.69:1.00 的条件下制备获得。ROL@ ZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 分别是在 ZIF-8 和 aZIF-8 材料组装过程中加入 ROL 制备获得。对 ZIF-8、ROL@ ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 进行了晶体结构和形貌分析,分析结果见图 1 至图 3。由图 1 可见,ZIF-8 材料和 ROL@ ZIF-8 在 2θ 为 7.40° 、 10.41° 、 12.78° 、 14.74° 、 16.50° 和 18.07° 处出现强峰,其衍射峰分布规律与基于理论数据模拟的 ZIF-8 材料一致,且相对强度相似^[33-34];而 aZIF-8 材料和 ROL@ aZIF-8 在 2θ 为 11.05° 、 12.14° 、 17.25° 和 18.43° 处出现强峰,这与 ZIF-8 材料和 ROL@ ZIF-8 衍射峰分布规律具有明显差异,表明相较于 ZIF-8 材料和 ROL@ ZIF-8,aZIF-8 材料和 ROL@ aZIF-8 的晶体结构发生了明显改变^[35]。由图 2(a)和(c)可见,ZIF-8 材料呈现出规则的多面体形貌,而 aZIF-8 材料呈现出包含十字花形、正方形、球形等多种形态的无定形形貌。微观结构分析结果与形貌分析结果一致[图 3(a)和(c)]。研究发现,在 2-甲基咪唑和醋酸锌的初始物质的量比例为 4:1 以及更高的条件下,ZIF-8 材料呈现出规则的菱形十二面体结构,这与我们的研究结果相似^[23, 29]。Cui 等^[28]研究发现,在 2-甲基咪唑和硝酸锌的初始物质的量比例为

1.6:1.0 的条件下,catalase@ ZIF-8 呈现十字花形的聚合物形貌,而在 2-甲基咪唑和硝酸锌的初始物质的量比例为 1.8:1.0 的条件下,catalase@ ZIF-8 呈现多面体形貌。这表明,aZIF-8 材料的无定形形貌是因为在相对低的前驱体初始物质的量比例条件下制备获得的。



θ 表示 X 射线的入射角度。

图 1 ROL@ aZIF-8、aZIF-8、ZIF-8、ROL@ ZIF-8 和模拟 ZIF-8 的 XRD 分析

Fig. 1 XRD analysis of ROL@ aZIF-8, aZIF-8, ZIF-8, ROL@ ZIF-8 and simulated ZIF-8

尽管 ROL@ ZIF-8 也呈现出多面体形貌,但相较于 ZIF-8 材料,ROL@ ZIF-8 的边界变得凹凸不平,并且面积有轻微的减小[图 2(b)、图 3(b)]。ROL@ aZIF-8 呈现出与 aZIF-8 材料相似的无定形形貌,但其形态更加多样[图 2(d)、图 3(d)]。为了确证 ROL@ ZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 中是否含有 ROL,对 ROL、ZIF-8、ROL@ ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 进行了红外光谱分析(图 4)。由图 4 可见,ZIF-8、ROL@ ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 均在波数为 560 cm^{-1} 和 $1\,308\text{ cm}^{-1}$ 处出现特异吸收峰。位于 560 cm^{-1} 处的吸收峰是 Zn-N 拉伸振动产生的,而位于 $1\,350 \sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 2-甲基咪唑振动产生的。这些结果说明,ZIF-8、ROL@ ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 结构中存在 Zn^{2+} 与 2-甲基咪唑^[36-37]。ROL@ ZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 均在 $1\,600 \sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$ 处出现蛋白质酰胺键的特异吸收峰,而 ZIF-8 以及 aZIF-8 未观察到相应的吸收峰,表明 ROL 已成功固定在 ZIF-8 和 aZIF-8 材料上^[35, 38-39]。这些结果表明,在固定化 ROL 后,与 ZIF-8 和 aZIF-8 材料相比,ROL@ ZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 的形貌发生了改变^[19, 40-41]。

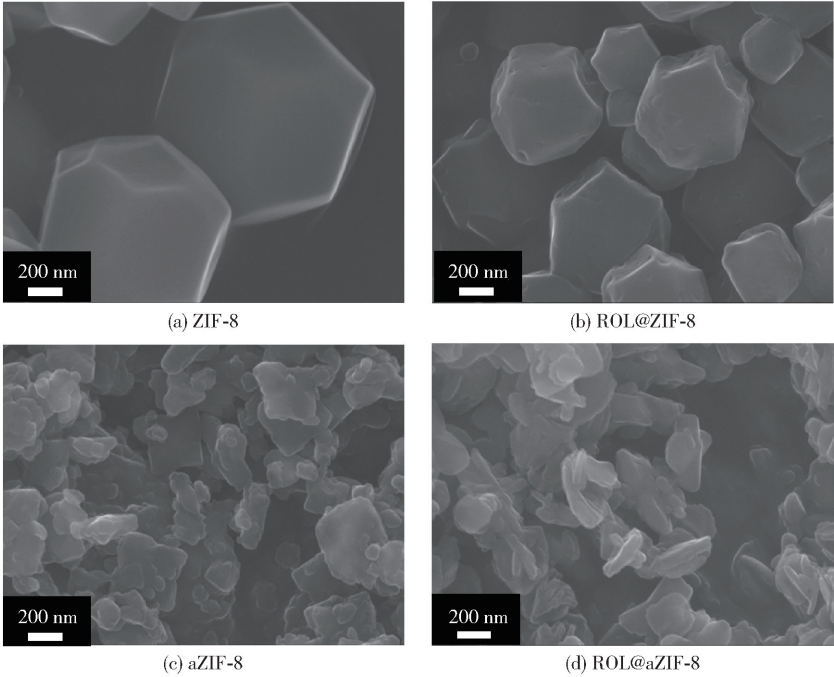


图 2 ZIF-8、ROL@ ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 的形貌分析

Fig. 2 Conformational analysis of ZIF-8, ROL@ ZIF-8, aZIF-8 and ROL@ aZIF-8

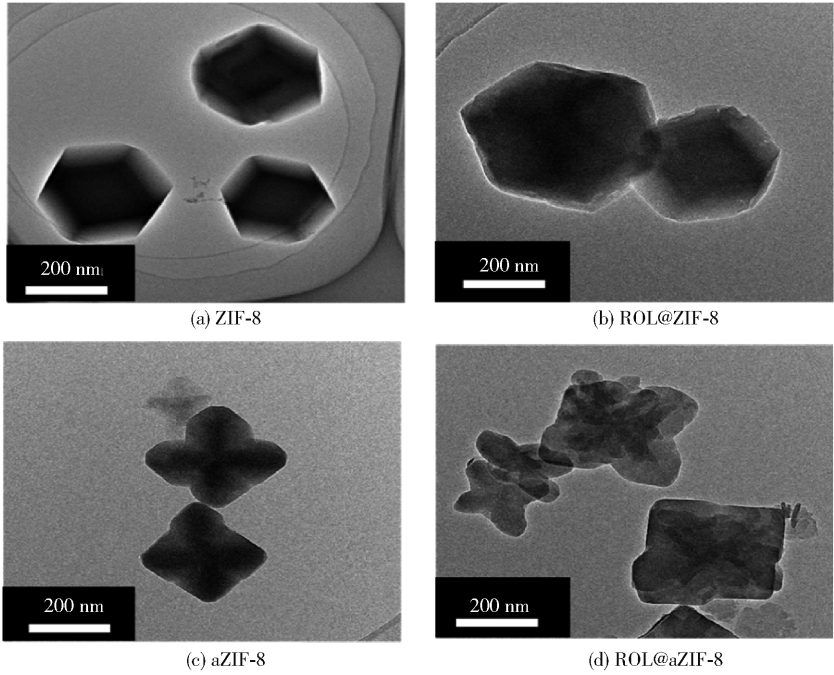


图 3 ZIF-8、ROL@ ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 的微观结构分析

Fig. 3 Microstructural analysis of ZIF-8, ROL@ ZIF-8, aZIF-8 and ROL@ aZIF-8

2.2 ZIF-8、aZIF-8、ROL@ ZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 的结构比较

ZIF-8 材料形貌的改变往往伴随着其结构的变化^[28-29]。利用 STEM-EDX 及 ICP-OES 对 ZIF-8、ROL@ ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 中 Zn 和 N 元

素分布及比例进行了研究,分析结果见图 5 和表 1。由图 5 可见,ZIF-8、ROL@ ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 中 Zn 和 N 元素分布均匀^[40]。由表 1 可见,ZIF-8 材料和 ROL@ ZIF-8 中 N 与 Zn 的物质的量比为 4.58 和 4.35,而 aZIF-8 材料和 ROL@ aZIF-8 中

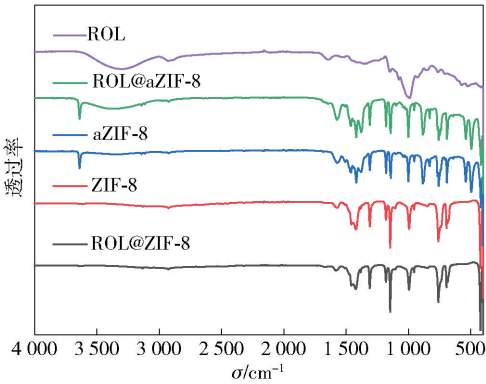
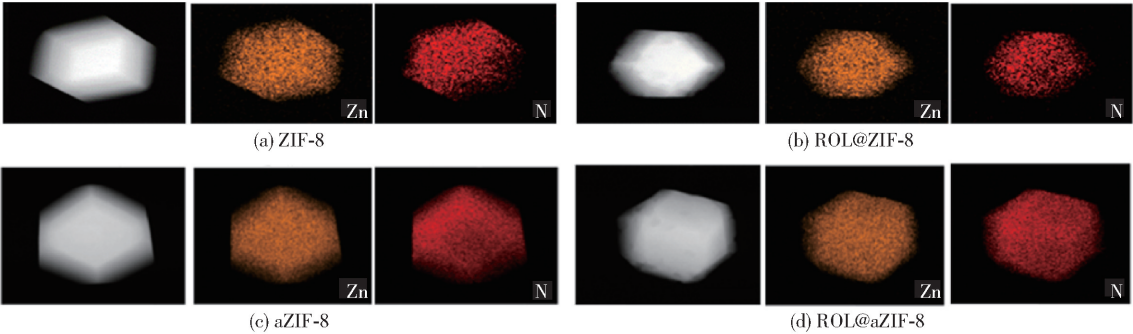


图4 ROL、ROL@aZIF-8、aZIF-8、ZIF-8 和 ROL@ZIF-8 的红外光谱分析

Fig.4 Infrared spectral analysis of ROL, ROL@aZIF-8, aZIF-8, ZIF-8 and ROL@ZIF-8

N 与 Zn 的物质的量比则降至 1.53 和 1.94。这表明在 ZIF-8 材料和 ROL@ZIF-8 中,平均一个锌离子与 4.3~4.5 个氮原子配位,而在 aZIF-8 材料和 ROL@aZIF-8 中,平均一个锌离子与 1.5~1.9 个氮原子配位。Wu 等^[29]研究发现,与仅具有微孔的 ZIF-8 材料相比,具有微孔及介孔的多级孔 ZIF-8 材料的 N 与 Zn 的物质的量比例降低,这与本研究结果相似。当锌离子与相对较少的氮原子配位时,ZIF-8 材料会出现结构缺陷,导致其孔径变大甚至出现介孔^[29]。为了探究 ZIF-8、ROL@ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@aZIF-8 的孔径大小,利用 N₂ 吸附法测定了其 N₂ 吸附-解吸等温线、孔径分布及比表面积,分析结果见图 6、图 7 和表 2。由图 6 可见,随相对压力的增加,不同材料及固定化 ROL 的 N₂ 吸附量呈现不



黄色表示 Zn 元素的分布,红色表示 N 元素的分布。

图5 ZIF-8、ROL@ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@aZIF-8 的 STEM-EDX 分析

Fig.5 STEM-EDX analysis of ZIF-8,ROL@ZIF-8,aZIF-8 and ROL@aZIF-8

表 1 ZIF-8、aZIF-8、ROL@ZIF-8 和 ROL@aZIF-8 中的 N 和 Zn 元素比例
Tab.1 Ratio of N and Zn elements in ZIF-8, aZIF-8, ROL@ZIF-8 and ROL@aZIF-8

组别	m/mg	w(N)/%	w(Zn)/%	n(N)/n(Zn)
ZIF-8	2.012 0	25.81	26.15	4.58
aZIF-8	2.211 0	11.98	36.46	1.53
ROL@ZIF-8	1.925 0	25.26	26.93	4.35
ROL@aZIF-8	2.344 0	16.33	39.06	1.94

同的变化趋势。通过与 6 种类型 N₂ 吸附-解吸等温线的标准形状比较发现,ZIF-8 材料和 ROL@ZIF-8 的 N₂ 吸附-解吸等温线呈现出 I 型吸附等温线特征,表明 ZIF-8 材料和 ROL@ZIF-8 的微孔性质;而 aZIF-8 和 ROL@aZIF-8 的 N₂ 吸附-解吸等温线呈现出 II 型吸附等温线特征,表明 aZIF-8 材料和

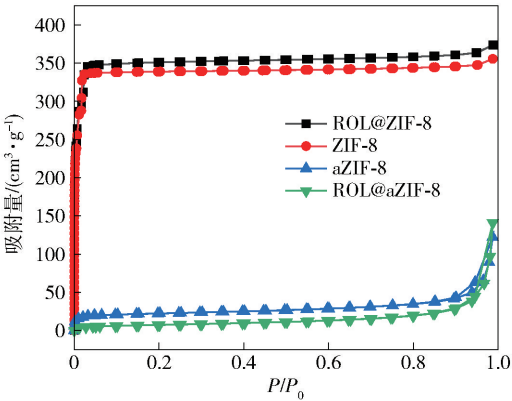


图6 ROL@ZIF-8、ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@aZIF-8 的 N₂ 吸附-解吸等温线

Fig.6 N₂ adsorption-desorption isotherm of ROL@ZIF-8, ZIF-8,aZIF-8 and ROL@aZIF-8

ROL@aZIF-8存在微孔和介孔^[42-43]。由图 7 可见,ZIF-8 材料和 ROL@ZIF-8 的孔径分布在 1~2 nm,

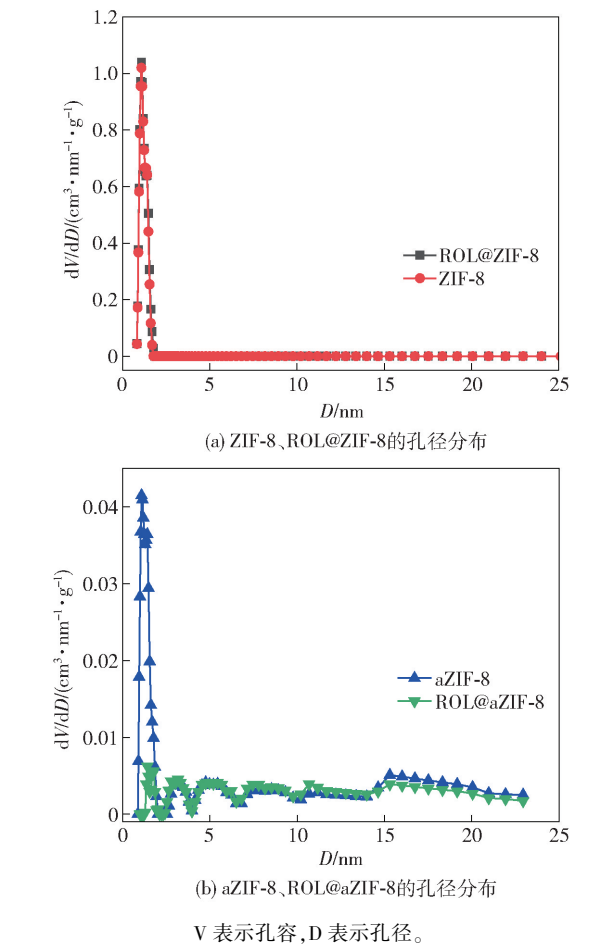


图 7 ZIF-8、ROL@ ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 的孔径分布

Fig. 7 Pore size distribution of ZIF-8, ROL@ ZIF-8, aZIF-8 and ROL@ aZIF-8

表 2 ZIF-8、aZIF-8、ROL@ ZIF-8 和 ROL@ aZIF-8 的 BET 表面积和孔隙体积

Tab.2 BET surface area and pore volume of ZIF-8, aZIF-8, ROL@ ZIF-8 and ROL@ aZIF-8

组别	BET 比表面积/ ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	孔隙体积/ ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)
ZIF-8	1 569.431	0.549 7
aZIF-8	83.897	0.189 0
ROL@ ZIF-8	1 569.159	0.577 5
ROL@ aZIF-8	26.261	0.217 7

表明 ZIF-8 材料和 ROL@ ZIF-8 形成了微孔;而 aZIF-8 材料和 ROL@ aZIF-8 的孔径分布在 1~20 nm,表明 aZIF-8 材料和 ROL@ aZIF-8 中既存在微孔又存在介孔。由表 2 可见,相较于 ZIF-8 材料和 ROL@ ZIF-8, aZIF-8 材料和 ROL@ aZIF-8 的 BET

比表面积和孔隙体积均出现显著减小,这可能是因为,在相对低的前驱体初始物质的量比例条件下, aZIF-8 材料出现结构缺陷,造成 BET 比表面积减小和孔容下降^[29]。本研究结果表明,通过调节前驱体的物质的量比例制备得到的 aZIF-8 材料是一种具有微孔和介孔的多级孔材料。

2.3 酶质量浓度对 ROL@aZIF-8 酶活力的影响

为探究利用 aZIF-8 材料采用原位自封装法固定 ROL 的效果,本研究比较了在不同 ROL 质量浓度条件下制备的 ROL@ aZIF-8 与相同质量浓度的 ROL 的酶活力差异,分析结果见图 8。由图 8 可见,当 ROL 的质量浓度从 3 mg/mL 增加到 4 mg/mL 时, ROL@ aZIF-8 催化 *p*-NPB 水解的能力逐渐增强;当 ROL 的质量浓度从 4 mg/mL 增加到 7 mg/mL 时, ROL@ aZIF-8 的酶活力逐渐减弱。在 ROL 的质量浓度为 4 mg/mL 的条件下制备的 ROL@ aZIF-8 呈现最大酶活力,为 5.69 U/mg。通过与文献报道的固定化 ROL 的酶活力相比较,本研究中制备的 ROL@ aZIF-8 的酶活力处于最高水平^[10, 13, 15-17, 44-48]。在相同质量浓度条件下,ROL@ aZIF-8 的酶活力比 ROL 高,表明利用 aZIF-8 材料采用原位自封装法固定 ROL 可以增强酶的催化活性。

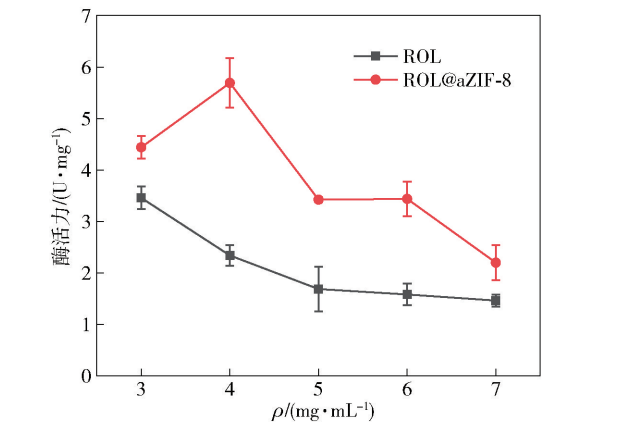


图 8 酶质量浓度对 ROL 和 ROL@aZIF-8 酶活力的影响

Fig. 8 Effects of enzyme mass concentrations on enzymatic activities of ROL and ROL@aZIF-8

ROL@ aZIF-8 催化活性增强的效果可能与 ROL“盖子”结构的构象变化有关^[49-51]。ROL 具有由两亲性氨基酸组成的“盖子”结构^[52]。“盖子”结构具有独特的打开-闭合构象变化现象^[52]。当“盖子”结构处于闭合构象时,ROL 的催化中心会被“盖子”盖住,阻止了底物进入催化中心,表现为酶的催化活性较低;当“盖子”结构处于打开构

象时,底物和产物可以较容易地进出催化中心,表现为酶的催化活性大幅提高^[53-54]。研究发现,当使用疏水性的载体固定化脂肪酶时,脂肪酶的“盖子”结构可以处于稳定的打开构象,固定化脂肪酶表现出较高的催化活性^[53-56]。为探究 ROL@aZIF-8 催化活性增强效果的可能原因,本研究比较了 ZIF-8、ROL@ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@aZIF-8 的亲疏水性差异,分析结果见图 9。由图 9 可见,ZIF-8 材料和 aZIF-8 材料均具有较强的疏水性,aZIF-8 材料的疏水性相较于 ZIF-8 材料减弱。这表明利用 aZIF-8 材料固定化 ROL 可能诱导 ROL 的“盖子”结构处于打开构象,从而使 ROL@aZIF-8 的催化活性提高^[49-50]。疏水性的载体可能在固

定化过程中诱导酶的聚集,导致固定化酶催化活性的下降^[57]。aZIF-8 材料的疏水性相较于 ZIF-8 材料减弱可能有助于减少在固定化过程中 ROL 的聚集,促使固定化酶的催化活性保持甚至提高^[57]。由图 9 可知,ROL@ZIF-8 和 ROL@aZIF-8 均呈现出亲水性,这可能是由于在固定化 ROL 后,ROL 增强了材料的亲水性^[29]。ROL@aZIF-8 中因结构缺陷形成的多级孔结构可能造成部分的 ROL 暴露于固定化酶表面,导致 ROL@aZIF-8 的亲水性相较于 ROL@ZIF-8 增强,这也同时促使了底物更容易与 ROL 的催化活性中心结合^[29]。本研究结果表明,aZIF-8 材料的疏水性及多级孔特性对 ROL@aZIF-8 催化活性的增强有重要的促进作用。

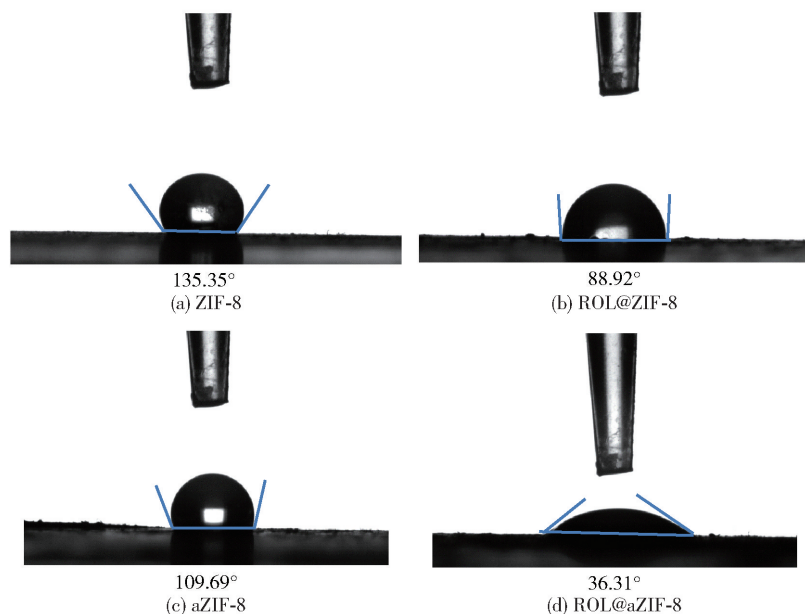


图 9 ZIF-8、ROL@ZIF-8、aZIF-8 和 ROL@aZIF-8 的接触角分析

Fig. 9 Contact angle analysis of ZIF-8, ROL@ZIF-8, aZIF-8 and ROL@aZIF-8

2.4 不同条件下 ROL 和 ROL@aZIF-8 酶活力的比较

2.4.1 pH 值对 ROL 和 ROL@aZIF-8 酶活力的影响

pH 值对 ROL 和 ROL@aZIF-8 酶活力的影响,实验结果见图 10。由图 10 可见,在 pH 值为 7.5 ~ 10.0 时,固定化酶 ROL@aZIF-8 的酶活力均高于游离脂肪酶 ROL,表明固定化酶比游离酶具有更好的碱耐受性。这可能是由于 aZIF-8 材料和 ROL 间通过疏水相互作用、范德华相互作用和氢键等创造了一个保护酶分子的微环境从而改善了酶的碱稳定性^[30, 39]。

2.4.2 温度对 ROL 和 ROL@aZIF-8 酶活力的影响

温度对 ROL 和 ROL@aZIF-8 酶活力的影响,实验结果见图 11。由图 11 可见,在 30 ~ 70 °C 下保温 1 h 后,ROL@aZIF-8 比 ROL 具有更高的酶活力,这表明固定化酶比游离酶具有更好的温度耐受性,这可能是因为 aZIF-8 材料对 ROL 产生的保护作用^[28-29]。

2.4.3 储藏时间对 ROL 和 ROL@aZIF-8 酶活力的影响

储藏时间对 ROL 和 ROL@aZIF-8 酶活力的影响,实验结果见图 12。由图 12 可见,随储藏时间的

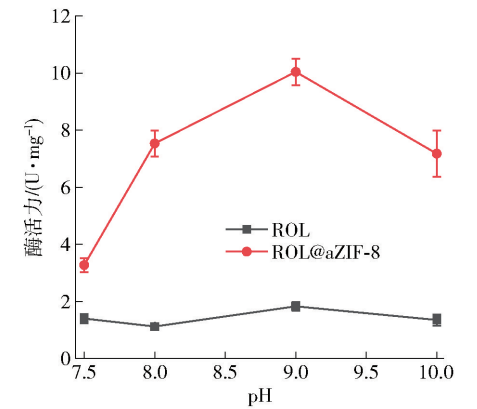


图 10 pH 值对 ROL 和 ROL@ aZIF-8 酶活力的影响
Fig. 10 Effect of pH on enzymatic activities of ROL and ROL@ aZIF-8

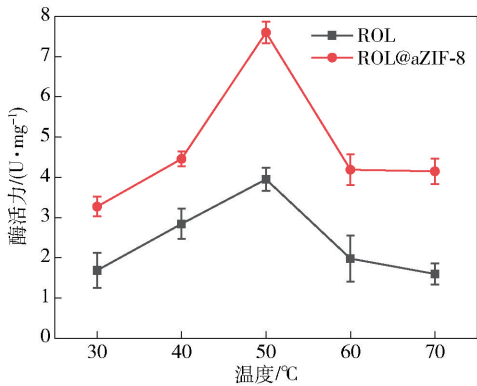


图 11 温度对 ROL 和 ROL@ aZIF-8 酶活力的影响
Fig. 11 Effect of temperature on enzymatic activities of ROL and ROL@ aZIF-8

延长, ROL@ aZIF-8 和 ROL 的酶活力均下降, 但 ROL@ aZIF-8 的酶活力降低幅度相较于 ROL 较小。在经过 25 d 储藏后, ROL@ aZIF-8 的酶活力降至其初始酶活力的 30.5%, 而 ROL 的酶活力降至其初始酶活力的 20.4%, 表明 ROL@ aZIF-8 比 ROL 具有更好的储藏稳定性。储藏稳定性的提高可能是因为 aZIF-8 材料包裹在 ROL 周围, 防止 ROL 水解和聚合以及环境对酶活性位点的破坏, 从而使酶活力降低减缓^[2, 51]。Cheng 等^[58] 研究发现, 利用 Cu-BTC 金属有机骨架材料采用原位自封装法制备的固定化脂肪酶在经过 20d 的储藏后仍保持了 97.1% 的酶活力。Nadar 等^[23] 研究发现, 利用 ZIF-8 材料采用原位自封装法制备的固定化脂肪酶在经过 25 d 的储藏后酶活力降低了 10%。与这些固定化脂肪酶相比, ROL@ aZIF-8 的储藏稳定性较弱, 原因可能是由于 aZIF-8 材料的结构缺陷降低了

ROL@ aZIF-8 在苛刻条件下的稳定性^[10]。

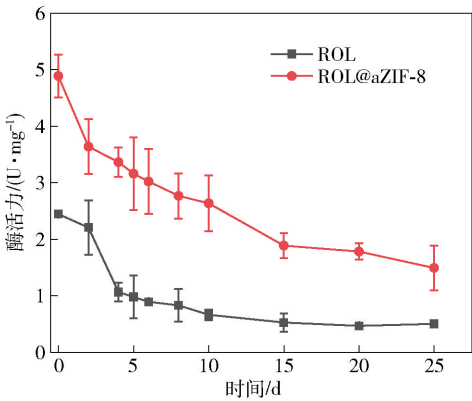
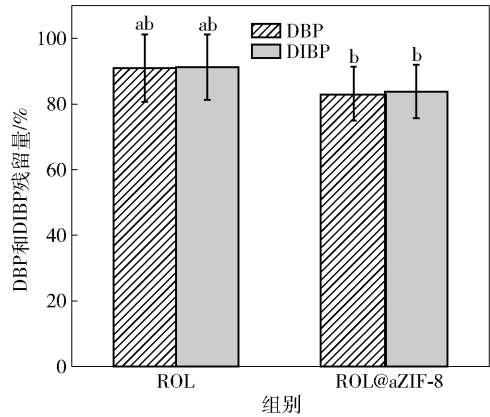


图 12 储藏时间对 ROL 和 ROL@ aZIF-8 酶活力的影响
Fig. 12 Effect of storage time on enzymatic activities of ROL and ROL@ aZIF-8

2.5 ROL和 ROL@ aZIF-8 对 DBP 和 DIBP 水解能力的比较

DBP 和 DIBP 是塑化剂的典型代表, 具有较强的生殖毒性, 即使微量摄入也会造成脂质代谢异常, 诱发肥胖病, 干扰免疫和过敏反应等^[59-60]。利用生物酶法水解 DBP 和 DIBP 具有条件温和、效率高和不产生二次污染等优势^[59-60]。为了进一步探究 ROL@ aZIF-8 催化活性增强的效果, 本研究比较了 ROL 和 ROL@ aZIF-8 对 DBP 和 DIBP 的水解能力, 分析结果见图 13。由图 13 可见, ROL@ aZIF-8 催化 DBP 和 DIBP 水解 2 h 后, DBP 和 DIBP 的残留量分别为 83.7% 和 83.1%, 而 ROL 催化水解 2 h 后, DBP 和 DIBP 的残留量分别 90.8% 和 91.2%。这表



不同小写字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。
图 13 ROL 和 ROL@ aZIF-8 对 DBP 和 DIBP 的水解能力分析
Fig. 13 Hydrolytic capacities analysis of ROL and ROL@ aZIF-8 on DBP and DIBP

明与 ROL 相比,ROL@aZIF-8 对 DBP 和 DIBP 的水解能力有一定程度提高。

3 结 论

本研究通过调节 2-甲基咪唑和醋酸锌的初始物质的量比例,制备了一种 aZIF-8 材料,采用原位自封装法将 ROL 固定在 aZIF-8 材料中,制备出 ROL@aZIF-8。研究结果表明,aZIF-8 材料是一种具有微孔和介孔的多级孔材料。aZIF-8 材料和 ROL@aZIF-8 均呈现出包含十字花形、正方形、球形等多种形态的无定形形貌。在 ROL 的质量浓度为 4 mg/mL 的条件下制备的 ROL@aZIF-8 具有最大酶活力,为 5.69 U/mg。在相同的 ROL 质量浓度条件下,ROL@aZIF-8 的酶活力比 ROL 高,其原因与 aZIF-8 材料的疏水性及多级孔特性密切相关。与 ROL 相比,ROL@aZIF-8 具有更好的碱稳定性、温度耐受性、储藏稳定性以及对 DBP 和 DIBP 更高的水解能力。本研究旨在为基于多级孔 ZIF-8 材料制备固定化脂肪酶提供理论依据。

参考文献:

- [1] WANG Y, WEI D Q, WANG J F. Molecular dynamics studies on T1 lipase: insight into a double-flap mechanism [J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2010, 50(5): 875–878.
- [2] CUI C X, LI L J, LI M J. Improvement of lipase activity by synergistic immobilization on polyurethane and its application for large-scale synthesizing vitamin A palmitate [J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2019, 49(5): 485–492.
- [3] LIU J H, ZHANG Y Y. Optimization of lipase production by a mutant of *Candida antarctica* DSM-3855 using response surface methodology [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46(4): 695–701.
- [4] SCHMID A, DORDICK J S, HAUER B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow [J]. Nature, 2001, 409(6817): 258–268.
- [5] BHANDARI K, CHAURASIA S P, DALAI A K, et al. Purification of free DHA by selective esterification of fatty acids from tuna oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2013, 90(11): 1637–1644.
- [6] LONDONO-HERNANDEZA L, RAMIREZ-TOROB C, RUIZA H A, et al. *Rhizopus oryzae*-ancient microbial re-source with importance in modern food industry [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 257: 110–127.
- [7] DHAKE K P, DESHMUKH K M, PATIL Y P, et al. Improved activity and stability of *Rhizopus oryzae* lipase via immobilization for citronellol ester synthesis in supercritical carbon dioxide [J]. Journal of Biotechnology, 2011, 156:46–51.
- [8] 孟冠男,刘亚,雷声,等. 杂醇油酶法制备天然等同酯香料的研究[J]. 食品科学技术学报,2021,39(3): 80–88.
- [9] MENG G N, LIU Y, LEI S, et al. Preparation of natural equivalent ester aromas with lipase catalysis of fusel oil [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(3):80–88.
- [10] ZHAO K, DI Q J, CAO X, et al. Production of biodiesel using immobilized lipase and the characterization of different co-immobilizing agents and immobilization methods [J]. Sustainability, 2016, 8(9): 764.
- [11] LI C, ZHANG G F, LIU N, et al. Preparation and properties of *Rhizopus oryzae* lipase immobilized using an adsorption-crosslinking method [J]. International Journal of Food Properties, 2016, 19(8): 1776–1785.
- [12] 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.
- [13] ZHANG C, WANG X R, HOU M, et al. Immobilization on metal-organic framework engenders high sensitivity for enzymatic electrochemical detection [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9: 13831–13836.
- [14] SANI F, MOKHTAR N F, ALI M S M, et al. Enhanced performance of immobilized *Rhizopus oryzae* lipase on coated porous polypropylene support with additives [J]. Catalysts, 2021, 11(3): 303.
- [15] PALOMO J M, FILICE M, ROMERO O, et al. Improving lipase activity by immobilization and post-immobilization strategies [J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 1051: 255–273.
- [16] DHAKE K P, TAMBADE P J, QURESHI Z S, et al. HPMC-PVA film immobilized *Rhizopus oryzae* lipase as a biocatalyst for transesterification reaction [J]. ACS Catalysis, 2011, 1(4): 316–322.
- [17] PASHANGHEH K, AKHOND M, KARBALAEI-HEIDARI H R, et al. Biochemical characterization and sta-

- bility assessment of *Rhizopus oryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105: 300–307.
- [17] VILAS BOAS R N, CERON A A, BENTO H B S, et al. Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil [J]. Biomass and Bioenergy, 2018, 119: 61–68.
- [18] AN H D, LI M M, GA J, et al. Incorporation of biomolecules in metal-organic frameworks for advanced applications [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2019, 384: 90–106.
- [19] LIANG K, RICCO R, DOHERTY C M, et al. Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules [J]. Nature Communications, 2015, 6(1): 1–8.
- [20] RAJA D S, LIU W L, HUANG H Y, et al. Immobilization of protein on nanoporous metal-organic framework materials [J]. Comments on Inorganic Chemistry, 2015, 35(6): 331–349.
- [21] HU Y L, ZHOU H, DAI L M, et al. Lipase immobilization on macroporous ZIF-8 for enhanced enzymatic biodiesel production [J]. ACS Omega, 2021, 6(3): 2143–2148.
- [22] HE H, HAN H, SHI H, et al. Construction of thermophilic lipase-embedded metal-organic frameworks via biomimetic mineralization: a biocatalyst for ester hydrolysis and kinetic resolution [J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2016, 8(37): 24517–24524.
- [23] NADAR S S, RATHOD V K. Encapsulation of lipase within metal-organic framework (MOF) with enhanced activity intensified under ultrasound [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 108: 11–20.
- [24] 梁鑫, 张成楠, 周威, 等. ZIF-8 原位自封装固定化脂肪酶的研究 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(5): 1–8.
- LIANG X, ZHANG C N, ZHOU W, et al. Study on immobilization of lipase by *in-situ* encapsulation in ZIF-8 [J]. Food Research and Development, 2021, 42(5): 1–8.
- [25] ZHANG X L, TU R X, LU Z, et al. Hierarchical mesoporous metal-organic frameworks encapsulated enzymes: progress and perspective [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2021, 443: 214032.
- [26] FENG Y X, DU Y J, Kuang G L, et al. Hierarchical micro-and mesoporous ZIF-8 with core-shell superstructures using colloidal metal sulfates as soft templates for enzyme immobilization [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2022, 610: 709–718.
- [27] SHIMAA E H, HEMMAT M A, KHADIGA A A, et al. Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in biodiesel production [J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2021, 19:1.
- [28] CUI J D, FENG Y X, LIN T, et al. Mesoporous metal-organic framework with well-defined cruciate flower-like morphology for enzyme immobilization [J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2017, 9(12): 10587–10594.
- [29] 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): 1–8.
- [30] PRASANNA J P, SUBODH A K, MARUTI J D, et al. Molecular modeling insights into metal-organic frameworks (MOFs) as a potential matrix for immobilization of lipase: an *in silico* study [J]. Biology, 2023, 12: 1051.
- [31] CHEN G S, KOU X X, HUANG S M, et al. Modulating the biofunctionality of metal-organic framework-encapsulated enzymes through controllable embedding patterns [J]. Angewandte Chemie-international Edition, 2020, 59(7): 2867–2874.
- [32] QI L, LUO Z G, LU X X. Biomimetic mineralization inducing lipase-metal-organic framework nanocomposite for pickering interfacial biocatalytic system [J]. ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 2019, 7(7): 7127–7139.
- [33] WANG D F, YANG P Q, CHEN C W, et al. Simultaneously removal of Cr(VI) and Cd(II) from water using a flower-like primary battery nanosystem [J]. Science of the Total Environment, 2021, 765: 142735.
- [34] NGUYEN L T L, LE K K A, PHAN N T S. A zeolite imidazolate framework ZIF-8 catalyst for friedel-crafts acylation [J]. Chinese Journal of Catalysis, 2012, 33(4): 688–696.
- [35] WANG Q Q, ZHANG X P, HUANG L, et al. GOx@ZIF-8 (NiPd) nanoflower: an artificial enzyme system for tandem catalysis [J]. Angewandte Chemie: International Ed in English, 2017, 56(50): 16082–16085.
- [36] ATIROGLU V, ATIROGLU A, OZACAR M. Immobilization of α -amylase enzyme on a protein metal-organic framework nanocomposite: a new strategy to develop the reusability and stability of the enzyme [J].

- Food Chemistry, 2021, 349: 129127.
- [37] ZHANG M, SHANG Q G, WAN Y Q, et al. Self-template synthesis of double-shell TiO_2 @ ZIF-8 hollow nanospheres via sonocrystallization with enhanced photocatalytic activities in hydrogen generation [J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2019, 241: 149–158.
- [38] CAO S L, XU H, LI X H, et al. Papain@ magnetic nanocrystalline cellulose nanobiocatalyst: a highly efficient biocatalyst for dipeptide biosynthesis in deep eutectic solvents [J]. ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 2015, 3(7): 1589–1599.
- [39] WANG J, ZHAO G, YU F. Facile preparation of Fe_3O_4 @ MOF core-shell microspheres for lipase immobilization [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016, 69: 139–145.
- [40] ULU A. Metal-organic frameworks (MOFs): a novel support platform for ASNase immobilization [J]. Journal of Materials Science, 2020, 55(14): 6130–6144.
- [41] AHNAN M, LI K, XU L, et al. X-shaped ZIF-8 for immobilization *Rhizomucor miehei* lipase via encapsulation and its application toward biodiesel production [J]. Catalysts, 2018, 8(3): 96.
- [42] BARRETT E P, JOYNER L G, HALENDA P P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances: I. computations from nitrogen isotherms [J]. Journal of the American Chemical society, 1951, 73(1): 373–380.
- [43] PARK J, LEE M, FENG D, et al. Stabilization of hexaaminobenzene in a 2D conductive metal-organic framework for high power sodium storage [J]. Journal of the American Chemical society, 2018, 140(32): 10315–10323.
- [44] KHARRAT N, BENALI Y, MARZOUK S, et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: comparison with the free enzyme [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(5): 1083–1089.
- [45] ESMI F, NEMATIAN T, SALEHI Z, et al. Amine and aldehyde functionalized mesoporous silica on magnetic nanoparticles for enhanced lipase immobilization, biodiesel production, and facile separation [J]. Fuel, 2021, 291: 120126.
- [46] NEMATIAN T, SHAKERI A, SALEHI Z, et al. Lipase immobilized on functionalized superparamagnetic few-layer graphene oxide as an efficient nanobiocatalyst for biodiesel production from *Chlorella vulgaris* bio-oil [J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 57.
- [47] ZHAO J F, LIN J P, YANG L R, et al. Enhanced performance of *Rhizopus oryzae* lipase by reasonable immobilization on magnetic nanoparticles and its application in synthesis 1,3-diacylglycerol [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 188(3): 677–689.
- [48] LUO Y X, JIN D, HE W J, et al. A SiO_2 microcarrier with an opal-like structure for cross-linked enzyme immobilization [J]. Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2021, 37(48): 14147–14156.
- [49] ZHONG L, FENG Y X, HU H T, et al. Enhanced enzymatic performance of immobilized lipase on metal organic frameworks with superhydrophobic coating for biodiesel production [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2021, 602: 426–436.
- [50] 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.
- [51] DU Y J, GAO J, LIU H J, et al. Enzyme@ silica nanoflower@ metal-organic framework hybrids: a novel type of integrated nanobiocatalysts with improved stability [J]. Nano Research, 2018, 11(8): 4380–4389.
- [52] YU X W, XU Y, XIAO R. Lipases from the genus *Rhizopus*: characteristics, expression, protein engineering and application [J]. Progress in Lipid Research, 2016, 64: 57–68.
- [53] RUEDA N, SANTOS J C S, TORRES R, et al. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads [J]. RSC Advances, 2015, 5: 11212.
- [54] MANOEL E A, SANTOS J C S, FREIRE D M, et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 71: 53–57.
- [55] PALOMO J M, MUNOZ G, FERNANDEZ-LORENTE G, et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 19–20: 279–286.
- [56] FERNANDEZ-LORENTE G, CABRERA Z, GODOY C, et al. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties [J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 1061–1067.
- [57] LIANG W B, XU H S, CARRARO F, et al. Enhanced activity of enzymes encapsulated in hydrophilic metal-organic frameworks [J]. Journal of the American Chemi-

- cal Society, 2019, 141: 2348–2355.
- [58] CHENG Q, CHI X, LIANG Y, et al. Immobilization of lipase in Cu-BTC MOF with enhanced catalytic performance for resolution of *N*-hydroxymethyl vince lactam [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 195(2): 1216–1230.
- [59] YAN Z Z, DING L P, ZOU D D, et al. Characterization of a novel carboxylesterase with catalytic activity toward di(2-ethylhexyl) phthalate from a soil metagenomic library [J]. Science of the Total Environment, 2021, 785: 147260.
- [60] HUANG H, ZHANG X Y, CHEN T L, et al. Biodegradation of structurally diverse phthalate esters by a newly identified esterase with catalytic activity toward di(2-ethylhexyl) phthalate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(31): 8548–8558.

Immobilization of Lipase Derived from *Rhizopus oryzae* Based on Amorphous Zeolitic Imidazolate Framework-8 Material

LU Yuhan¹, ZHANG Chengnan^{1,*}, LI Xiuting^{1,2}, XU Youqiang¹, LI Weiwei¹

(1. School of Food and Health/Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing 100048, China)

Abstract: Hierarchical porous zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) materials have larger pore sizes compared with conventional ZIF-8 materials, and show better application prospects in the field of immobilized enzymes. At present, the effect of immobilizing *Rhizopus oryzae* lipase (ROL) using hierarchical porous ZIF-8 material remains unclear. In this study, an amorphous zeolitic imidazolate framework-8 (aZIF-8) material was prepared by adjusting the initial molar ratio of the precursor of ZIF-8 material, and the immobilized lipase ROL@ZIF-8 and ROL@aZIF-8 were prepared by *in situ* self-encapsulation based on the ZIF-8 and aZIF-8 materials, respectively. The morphological and structural differences of ZIF-8, aZIF-8, ROL@ZIF-8 and ROL@aZIF-8 were investigated by using infrared spectroscopy, X-ray diffractometer and scanning electron microscope, etc. The enzyme activities of ROL@aZIF-8 prepared under different ROL mass concentrations were compared with those of the same mass concentration of ROL. The acid-alkali stability, temperature tolerance, storage stability, and hydrolysis ability of ROL and ROL@aZIF-8 against dibutyl phthalate (DBP) and diisobutyl phthalate (DIBP) were investigated. The results showed that the aZIF-8 material presented an amorphous morphology containing various forms such as cruciate flower-like, square, and spherical, and was a hierarchical porous material with micropores and mesopores. ROL@aZIF-8 prepared at ROL mass concentration of 4 mg/mL showed the maximum enzyme activity of 5.69 U/mg. The hydrophobicity and hierarchical porous properties of the aZIF-8 material contributed to the higher enzyme activity of ROL@aZIF-8 than that of ROL at the same mass concentration of ROL. ROL@aZIF-8 showed better alkali stability, temperature tolerance, storage stability, and higher hydrolytic capacity for DBP and DIBP than ROL.

Keywords: lipase; hierarchical porous zeolitic imidazolate framework-8 material; immobilized enzyme; *in situ* encapsulation method; morphology