

共价有机框架材料固定化酶的研究进展

金静^{1,2}, 张羽飞², 郑冬云^{1*}, 郑明明^{2*}

(1. 中南民族大学 生物医学工程学院, 湖北 武汉 430000; 2. 中国农业科学院 油料作物研究所, 湖北 武汉 430000)

摘要: 共价有机框架 (Covalent Organic Frameworks, COFs) 是一种新型的多孔材料, 具有结构规整、骨架稳定、孔径结构可调等特点, 被视为固定化酶的理想载体。我们综述了近 10 年来 COFs 材料作为载体, 通过物理吸附、共价连接、包埋的固定化策略制备固定化酶的研究进展与应用, 并讨论了 COFs 材料在酶固定化领域所面临的机遇和挑战。

关键词: 共价有机框架; 固定化酶; 物理吸附; 共价连接; 包埋

中图分类号: O643.36

文献标志码: A

DOI: 10.16084/j.issn1001-3555.2024.02.010

酶是一类天然的生物催化剂, 具有绿色、高效、催化条件温和等优点^[1-2], 在食品改良^[3-4]、药物合成^[5-6]、生物燃料开发和农业废料处理^[7]等领域具有广泛的应用前景^[8-9]。然而, 酶在高温、高压、强酸、强碱等极端条件下易失活; 传统机械搅拌带来的高剪切力易破坏酶的结构; 酶易溶于水, 难以从体系中分离和回收利用, 制约了大规模的工业化应用^[10]。通过将酶固载到多孔固体材料中, 提高酶的稳定性, 便于回收利用^[11], 甚至提高催化活性^[12], 是酶工业化应用的有效解决方案。近年来, 固定化酶技术得到了快速发展, 水凝胶^[13]、活性炭^[14]、介孔二氧化硅^[15]、金属有机框架 (MOFs)^[16] 和 COFs^[17] 等新型多孔材料^[18] 被广泛用于固定化酶载体进行研究。

水凝胶、活性炭等材料存在结构不稳定和酶易泄露的问题; MOFs 材料容易浸出金属离子且难以固定大尺寸的酶分子, 使用范围存在一定的局限性^[19]。COFs 作为一种新兴的结晶多孔聚合物, 自 2005 年由 Yaghi 等首次报道以来引起广泛关注, 在气体分离和存储、催化^[20]、化学传感^[21]、生物医学应用^[22] 和离子导体等^[23] 领域取得了令人瞩目的进展。COFs 由有机结构单元共价连接而成, 形成高度有序的二维 (2D) 或三维 (3D) 网络结构^[24]。通过精心设计可以制备出具有不同孔隙大小和形状的 COFs 材料, 特殊的官能团还可以提高 COFs 与酶的

相容性, 提供酶催化所需的微环境^[25]; 高孔隙率和连续稳定的孔道结构, 有利于底物传质, 提高反应速率。这些“定制化”特点使得 COFs 材料为酶的固定化提供了更好的平台, 是固定化酶的理想载体材料^[26]。

我们对近 10 年来 COFs 材料在固定化酶领域的应用进行了系统分类和综述, 主要讨论了 COFs 固定化酶的优势, 详细介绍了物理吸附、共价连接以及包埋固定酶的方法细节, 及其应用 (表 1)^[27-50], 以期对未来固定化酶载体的设计和应用提供参考。

1 COFs 的合成

随着研究的不断深入, 研究人员制备了大量的 COFs 材料, 连接方式和合成方法各有差异, 以下将从这两方面进行介绍。

1.1 COFs 的连接键

COFs 主要由非金属轻量元素 (C、H、O、N 和 B 等) 组成, 通过强共价键连接形成拓扑结构, 并通过连接单元的预先设计, 实现定制化的组成、成分和功能, 使其具备理想的孔隙结构以及理化特性^[51]。目前报道的 COFs 的稳定性主要取决于合成中使用的共价连接单元, 这些共价键是可逆或部分可逆的, 在生长过程中发生重排纠错, 形成有序结构^[52]。根据 COFs 连接单元之间的共价键的不同, 主

收稿日期: 2023-11-27; 修回日期: 2024-01-16。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32272271, 31972038); 国家重点基础研究发展计划 (2021YFD2100303); 湖北省自然科学基金 (2021CFB209) (National Natural Science Foundation of China, NSFC(32272271, 31972038); National Key Research and Development Program of China (2021YFD2100303); Natural Science Foundation of Hubei Province(2021CFB209))。

作者简介: 金静 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为固定化酶催化。E-mail: 2021120704@mail.scuec.edu.cn (Jin Jing (1998-), female, master degree candidate, mainly engaged in research of enzyme immobilization catalysis. E-mail: 2021120704@mail.scuec.edu.cn)。

* 通信联系人, E-mail: wintercloud@mail.scuec.edu.cn; zhengmingming@caas.cn。

表 1 报道的部分 COFs 固定化酶应用

Table 1 Part of COFs reported for immobilized enzyme application

COFs	Pore size /nm	Enzyme	Method	Application	Ref.
COF-DhaTab	3.7	trypsin	physical adsorption	hydrolysis of BAPAN to <i>p</i> -nitroaniline	[27]
COF-OMe	3.3	lipase PS	physical adsorption	kinetic resolution of <i>l</i> -phenylethanol	[28]
COF-ETTA-EDDA	3.98,1.42	lipase PS	physical adsorption	chiral separation, t ester exchange	[29]
COF-BTDH		pectinase	physical adsorption	hydrolysis of ginsenosides	[30]
COF1		acetylcholinesterase (AChE)	physical adsorption	electrochemical sensing	[31]
TPMM COFs	1.6	α -amylase	physical adsorption	starch hydrolysis	[32]
COF@GOx&CAT		glucose oxidase (GOx), catalase (CAT)	physical adsorption	inhibition of tumor cells	[33]
COF-DhaTab		AChE	physical adsorption	detection of malathion	[34]
MG@TpPa-1		trypsin	covalent linkage	proteolysis	[35]
COF 1	3.7	biomolecules	covalent linkage	chiral separation	[36]
PPF-2	1.1	lipase CALB	covalent linkage	enzymatic esterification	[37]
H-COF-OMe	3.36	laccase	covalent linkage	tetracycline degradation	[38]
Fe ₃ O ₄ @COF		HRP	covalent linkage	electrochemical sensing	[39]
SNW-1		cellulase	covalent linkage	chiral separation	[40]
COFETTA-TPAL	3.06,0.87	microperoxidase-11 (MP-11) and glucose oxidase (GOD)	covalent linkage	ratiometric electrochemical biosensing	[41]
TatDha-COF	3.2	trypsin	covalent linkage	proteolysis	[42]
ZPF-2@COF-42-B	1.9	GOx, catalase (CAT)	entrapment	cascade reactions	[43]
ZIF-90@COF		HRP	entrapment	detection of SARS-CoV-2 RNA	[44]
ZPF-1@COF		GOx, Cyt c	entrapment	glucose detection	[45]
COF-LZU1		trypsin	entrapment	electrochemical sensing	[46]
TAPB-DMTA COF	3.3	GOx, horseradish peroxidase (HRP)	entrapment	cascade reaction	[47]
Tp-Pa,Tp-TAPB	1.8,3.2	GOx	entrapment	antibacterial performance	[48]
DhaTph	2.0	lipase	entrapment	enzymatic esterification	[49]
COF-MCs-SH		lipase CALB	entrapment	enzymatic esterification	[50]

要可以分为含硼类、三嗪环类以及亚胺类 COFs (图 1). 含硼类 COFs 材料具有高度结晶性和可调控的孔结构, 通常由含有硼氧键的化合物作为构建单元组装而成, 但硼氧键在水、弱酸和碱性条件下并不稳定性, 一定程度上限制其在固定化酶领域的应用^[53-54]. 三嗪类 COFs 通常具有良好的溶剂稳定性、

热稳定性, 使其在吸附、分离和催化等领域具有良好的性能^[55]. 与其他 COFs 相比, 三嗪类 COFs 的结晶度和比表面积相对较低, 限制了其在某些吸附和催化反应中的活性和效率^[56]. 亚胺键是研究最多的一类连接方式, 亚胺类^[57]COFs 材料稳定性适中, 单体数量众多, 可以实现对孔隙、形状和化学特性的

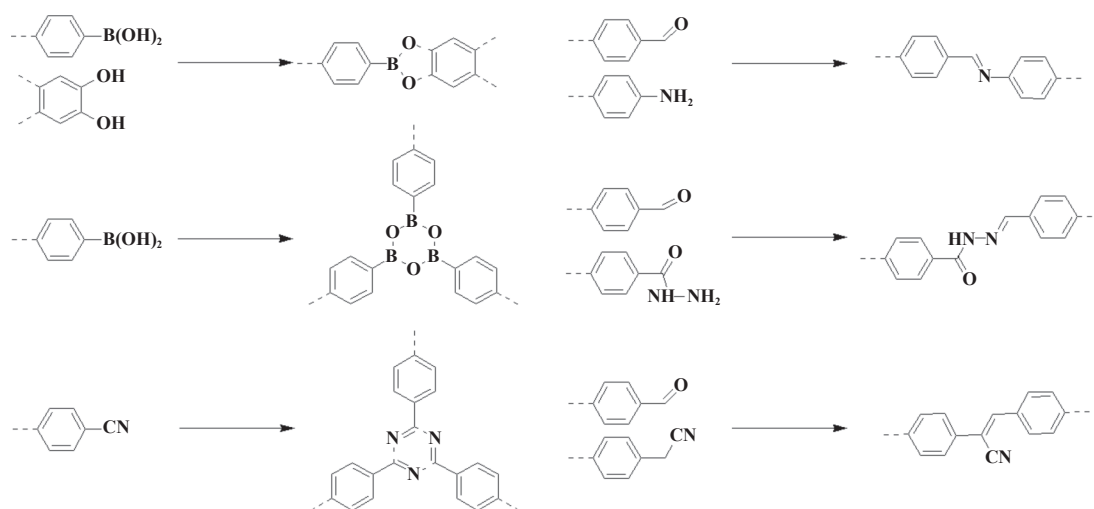


图 1 COFs 的主要成键类型

Fig.1 The major bond type of COFs

调控, 经过氢键异构化或还原反应后稳定性进一步提高^[58]. 目前, 亚胺键 COFs 是固定化酶的研究与应用主流材料^[59].

1.2 COFs 的合成方法

目前, 已报道了多种 COFs 的合成方法^[60], 如溶剂热法^[61]、室温合成法^[62]、微波法^[63]、超声化学法^[64]、离子热法^[65]、机械化学合成法等^[66]、界面合成法^[67]. 其中, 溶剂热法^[61]需要单体在密封容器中高温 (80~130 °C) 反应 3~7 d. 温度和压力对于溶剂热法制备的 COFs 材料的结晶度起着关键作用, 单体的溶解度和反应可逆性也对晶体成核和生长速率等具有决定性的影响. 室温合成法^[62]是近年来开发的一种操作简单且更加环保的合成方法^[68], 不需要苛刻的合成条件, 适合规模化制备 COFs 材料, 但材料的结晶性较差. 微波法^[63]是一种以微波照射作为替代能源的方法, 具有反应速度快、产物结晶度高、产率高等优势^[69]. 相较于其他方法, 微波法可以跟踪反应进程, 控制反应的温度和压力, 是一种简单、经济的合成手段. 超声化学法^[64]通过超声波辐照使溶液产生震荡和剧烈的气泡形成和坍塌, 从而引发化学反应, 超声波的机械效应和热效应能够促进反应物之间的混合和扩散, 加快反应速率. 离子热法^[70]具有反应条件可调控、反应速率较快、产物纯度较高的优点, 离子液体还可以对反应过程起到模板作用, 促进 COFs 的形成和稳定. 机械化学合成法^[66]是一种简单、安全、环保的合成方法, 通常使用球磨研磨仪或振荡球磨仪等装置进行反应, 但合成的 COFs 结晶度和孔隙率略差. 界面合成法^[71]通

常使用两种或更多种不同的前体分子, 将它们置于界面上进行反应, 可在较温和的条件下进行, 避免了高温或强酸碱条件可能引发的副反应, 是一种简单且可重复的合成方法. 综上所述, COFs 的合成方法多种多样, 各有特点, 未来还会开发出更多新方法, 以满足不同领域对 COFs 材料的需求.

2 COFs 固定化酶的方法

自 2015 年 Banerjee 等^[27]首次发表有关介孔 COFs 固定胰蛋白酶 (trypsin) 的研究以来^[72], COFs 固定化酶的研究趋势稳定增长, 展现出巨大的潜力 (图 2). 根据酶和载体的不同连接方式, COFs 固定化酶方法主要分为: 物理吸附、共价连接和包埋^[73].

2.1 物理吸附

通过范德华力、氢键或静电相互作用将酶吸附在 COFs 的表面或孔隙中^[74], 是目前应用最为广泛的固定化方法. 这种方法反应条件温和, 适用于多种 COFs 材料, 得到的固定化酶具有较高的固载量和生物催化活性. 然而, 由于 COFs 孔道尺寸限制, 能够吸附的酶种类有限, 同时, 物理吸附的结合力较弱^[75], 在重复利用或洗涤过程中酶易发生泄漏.

2015 年, Banerjee 等^[27]首次采用物理吸附法制备了 COFs 固定化酶的复合材料. 通过无模板法一步合成中空介孔球形 COF-DhaTab, 采用物理吸附法将与孔径大小接近的 trypsin 固载到 COF-DhaTab 的孔道中 (图 3(a)), 固载量可达 $15.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$. 在 N-苯甲酰-L-精氨酸 4-硝基苯胺 (BAPAN) 水解过程中, 固定化酶活性仅为游离酶的 60% (表 2), 这可能

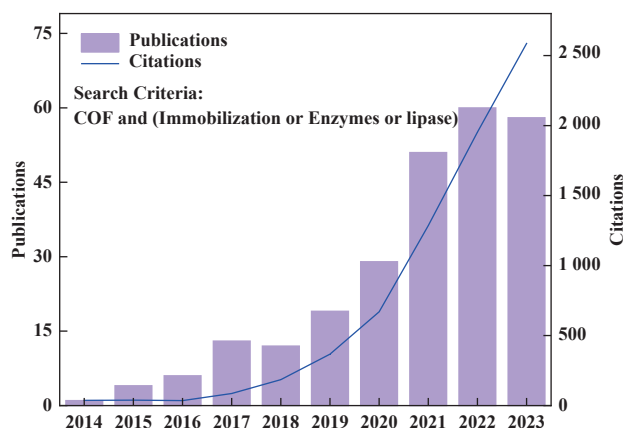


图 2 COFs 固定化酶近 10 年研究进展 (来自 Web of Science)

Fig.2 Recent progress on COFs in immobilized enzymes in recent 10 years (from Web of Science)

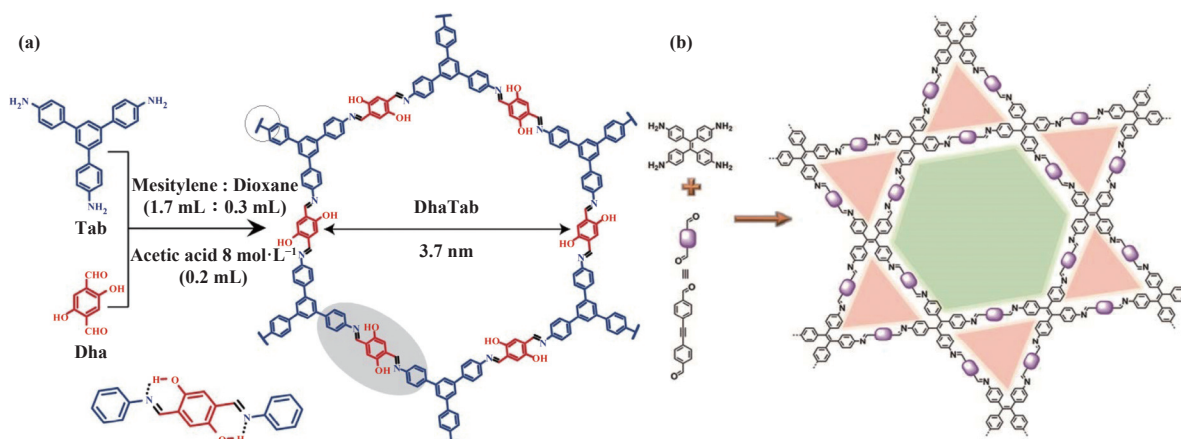
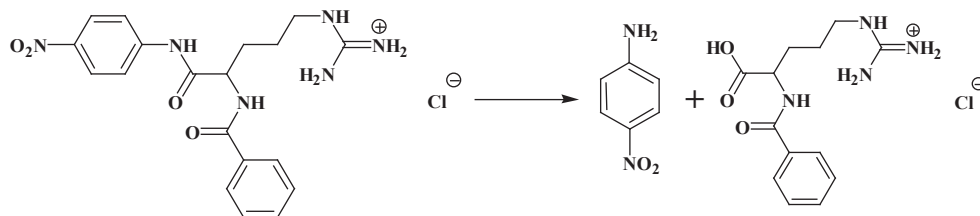
图 3 (a) COF-DhaTab 制备示意图^[27]; (b) COF-ETTA-EDDA 合成示意图^[29]Fig.3 (a) Preparation of COF-DhaTab^[27]; (b) The synthetic procedure for COF-ETTA-EDDA^[29]

表 2 Trypsin 和 COF-DhaTab 固定化酶的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of trypsin, and trypsin immobilized in COF-DhaTab



Materials	Enzyme loading / ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	$[E]$ / ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	V_{\max} / ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	K_m / ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	K_{cat} / (s^{-1})
Trypsin	—	2.14×10^{-7}	2.47×10^{-7}	1.20	1.15
Trypsin loaded COF	15.5	1.70×10^{-6}	9.70×10^{-7}	0.43	0.57

是由于底物与孔道中的酶传质受阻所致。

2018年,马胜前等^[28]使用二甲氧基对苯二甲醛(DMTP)和1,3,5-三(4-氨基苯基)-苯(TPB)合成一种新型的介孔COFs-OMe。通过物理吸附法固定脂肪酶PS,用于1-苯乙醇手性拆分。为了研究不同

材料对孔隙微环境和固载酶的影响,将其与具有相似孔径和空间结构的COF-V、介孔硅(MCM-41)、介孔MOF(PCN-128)进行比较,结果表明介孔COFs材料对酶具有更好的亲和力,稳定有序的孔道不仅易于酶的扩散和固定,还可以避免酶的失

活. 接着将疏水性 COFs-OMe 和具有羟基亲水官能团的 COF-ONa、COF-OH 进行对比, 发现疏水的孔

隙环境有利于酶分子的扩散和生存, 固载量和稳定性也更高 (表 3).

表 3 6 种固定化酶的结构参数, 固载量和 1-苯乙醇动力学拆分性能

Table 3 Structural parameters, solid loading, and dynamic kinetic resolution of 1-phenylethanol of six immobilized enzyme materials

Materials	Specific surface area $/(m^2 \cdot g^{-1})$	Pore volume $/(cm^3 \cdot g^{-1})$	Loading capacity $/(mg \cdot mg^{-1})$	Conversion /%	Enantiomeric excess /%
Lipase@COF-OMe	784	0.59	0.89	49, 0.5 h	>99.5
Lipase@COF-OH	756	0.75	0.75	29, 0.5 h	>99.5
Lipase@COF-ONa	854	0.60	0.59	13, 0.5 h	>99.5
Lipase@COF-V	455	0.31	0.78	49, 0.5 h	>99.5
Lipase@MCM-41	712	0.66	0.35	9, 15 h	>99.5
Lipase@PCN-128y	1 295	0.89	0.64	14, 15 h	>99.5

2019 年, 马胜前团队^[29]通过调整 COFs 的孔隙结构, 合成了分层多孔 COFs(COF-ETTA-EDDA) 材料 (图 3(b)). 采用物理吸附法将脂肪酶 PS 固定在 COF-ETTA-EDDA 较大的孔, 较小的孔隙用于底物和产物传递. 在酶促仲醇动力学拆分中, 分层双孔 COFs 在 80 min 可转化 50%, 单孔 COFs 需要 100 min, 而游离酶 15 h 转化率仅 15%, 证明 COF-ETTA-EDDA 具有高效的催化能力和对底物更好的亲和力. 接着又通过催化三酰基甘油酯与脂肪酸乙酯的酯交换反应, 证明分层多孔 COFs 催化效率更高, 解决制备生物柴油时副产物导致孔道堵塞、抑制催化效率的问题, 同时增强酶对有害副产物和变性剂的抵抗力.

2020 年, Sahu 等^[32]通过缩合反应制备 TPMM COFs, 将 α -淀粉酶通过物理吸附法固定在 TPMM COFs 中, 制备了一种用于淀粉分解的高效生物催化剂, α -淀粉酶的固载量约为 $550 mg \cdot g^{-1}$, 固定后 TPMM COFs 的比表面积从 $135.29 m^2 \cdot g^{-1}$ 减少到 $99 m^2 \cdot g^{-1}$. 由于 TPMM COF 载体的保护作用, 固定化的 α -amylase 相比游离酶表现出更高的热稳定性和重复使用性, 在 10 次循环后仍保持了 74% 的初始活性. 在酶动力学中, 固定化酶的 K_m 值低于游离酶, 表明固定化酶的亲和力更高. (表 4)

表 4 游离和固定化 α -淀粉酶的动力学参数

Table 4 Kinetic parameters for free and immobilize α -amylase

Materials	K_m $/(mg \cdot mL^{-1})$	V_{max} $/(mg \cdot min^{-1})$
Free α -amylase	16.98	2.82
Immobilized α -amylase	7.10	1.36

2022 年, Wei 等^[30]通过 1,3,5-三糖醛和邻苯二酰胺 (BTDH) 缩合合成 COF-BTDH, 通过氢键固定果胶酶 (pectinase) 得到 COF-BTDH@pectinase, 固载量为 $0.8 mg \cdot g^{-1}$, 提高酶的催化效率. Niu 等^[31]用 2,3,5,6-四氨基苯醌 (TABQ) 和六水环己烷 (HKH) 合成富含丰富碳基的二维导电 COF1, 通过氢键将乙酰胆碱酯酶 (AChE) 固定, 制备玻碳电极 (GC)/COF1/(AChE). COF1 的碳基活性位点能够促进酶的固定并提高酶的活性, 继而产生更强的电流信号. 该生物传感器用于对氧磷酸甲酯的检测, 检测限 (LOD) 为 $1.4 ng \cdot mL^{-1}$, 具有灵敏度高, 性能稳定的优点.

这些研究表明物理吸附法制备 COFs 固定化酶的复合材料固载量较高, 能够提高酶活性, 具有溶剂耐受性、热稳定性和重复使用性, 为生物催化领域的研究和应用提供了有潜力的新途径^[76-77].

2.2 共价连接

酶分子表面存在的羧基、氨基、环氧基等官基团, 可以通过共价键与 COFs 表面存在官能团链接^[78]制备固定化酶. 经共价键连接的 COFs 固定化酶具有更高的稳定性和重复使用性, 不存在酶泄漏的风险, 但共价连接可能会导致酶结构的扭曲, 酶活会一定程度的下降^[79]. 因此, 在选择固定化酶的方法时, 需权衡各种因素, 并根据具体应用需求做出选择.

2017 年, Shen 等^[35]通过热溶剂法在磁性石墨烯 (MG) 表面用 1,3,5-三甲酰基间苯三酚 (Tp) 和 1,4-二氨基苯 (Pa-1) 生长 COFs, 制备了一种由 COFs 包覆 MG 的新型载体 (MG@TpPa-1), 以戊二

醛为偶联剂, 共价连接 trypsin, 获得 MG@ TpPA-1-trypsin(图 4(a)), 负载量高达 $268 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. 成功应用于模型蛋白和真实样品 trypsin 的消化, 在 5 min 内可鉴定出牛血清蛋白 68 个肽段, 序列覆盖率为

89%, 甚至在 2 min 内实现对 BSA 的完全消化. 重复 12 次实验后, BSA 序列覆盖率仍高达 86%, 展现经共价键连接的 COFs 固定化酶优异的稳定性和重复使用性.

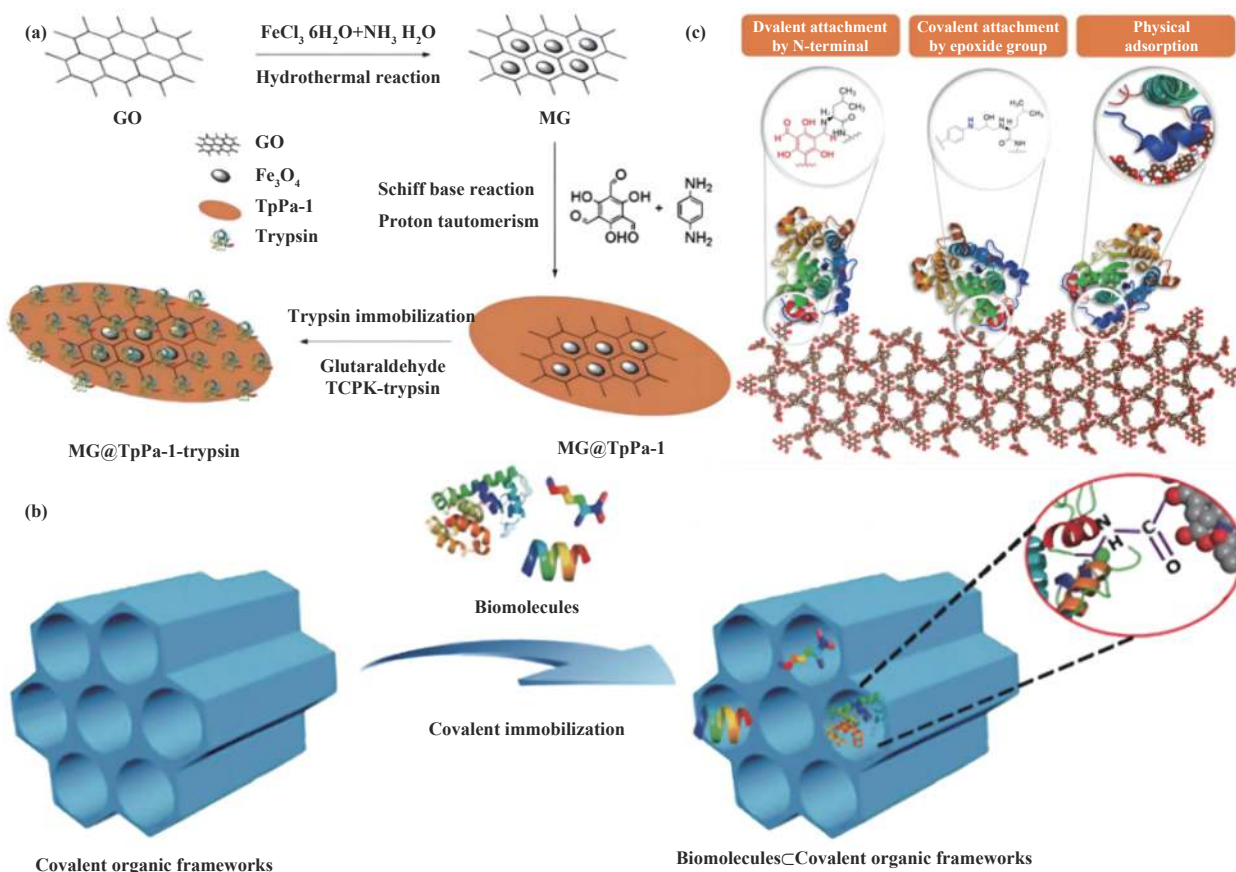


图 4 (a) MG@ TpPA-1-trypsin 合成^[35]; (b) Biomolecule<COF 1 组装^[36], (c) CALB@PPF-2 3种不同连接方式示意图^[37]
Fig.4 The schematic representation of (a) Preparation of MG@ TpPA-1-trypsin^[35]; (b) Covalently immobilizing biomolecules into COFs^[36]; (c) Three different immobilization strategies on COFs^[37]

2018年, 马胜前等^[36]使用 1,3,5-三-(4-氨基苯基)三嗪 (TAPT) 和 1,2,4,5-苯四酸酐 (PMDA) 进行缩合反应, 制备了比面积为 $714 \text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, 孔隙大小为 3.7 nm 的 COF 1. 采用 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二酰亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 作为交联剂, 将一系列生物分子上(溶菌酶、三肽、氨基酸)的氨基与 COF 1 进行共价偶联, 形成 Biomolecule<COF 1 的结构(图 4(b)). 共价连接得到的 Biomolecule<COF 1 性能明显优于吸附法, 并且实现对多种手性分子的分离. 以溶菌酶为例, 与传统的物理吸附法相比, 该方法获得了更高的负载量(共价连接为 $22 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, 物理吸附为 $12 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), 更低的泄漏量 (1.0%). 在壳聚糖水解和溶菌微球菌细胞壁分解实验中保留 90% 以上的催化活性(表 5),

且在 5 次循环后, 催化活性不变.

2019年, Esteves 等^[37]研究了不同固定化方法对酶固载量和催化活性的影响. 使用 1,3,5-三甲酰基间苯三酚 (TFP) 和四-(4-氨基苯基)甲烷 (TTA) 缩合制备亚胺键连接的 COFs(PPF-2), 在合成过程中过量添加 TTA 或 TFP 单体, 在材料表面预留了醛基 (PPF-2-CHO) 或氨基 (PPF-2-NH₂) 用于酶的固定化. 作者探索了 3 种固定化方法: PPF-2-CHO 共价连接脂肪酶, 得到固定化酶 CALB@PPF-2-CHO; 将环氧氯丙烷作为交联剂共价连接 PPF-2-NH₂ 和脂肪酶, 得到 CALB@PPF-2-NH₂; 采用物理吸附法得到 CALB@PPF-2(图 4(c)). CALB@PPF-2-NH₂ 的固载量最高 ($3.9 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), CAL-B@PPF-2 和 CAL-B@PPF-2-CHO 的固载量分别为 3.1 和 $1.2 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 在油

表 5 COF 1, Lysozyme@COF 1 和游离酶催化壳聚糖水解脱和溶菌微球菌细胞壁分解结果

Table 5 Results for chitosan hydrolysis and *Micrococcus lysodeikticus* cell wall decomposition catalyzed by COF 1, Lysozyme@COF 1, and free lysozyme

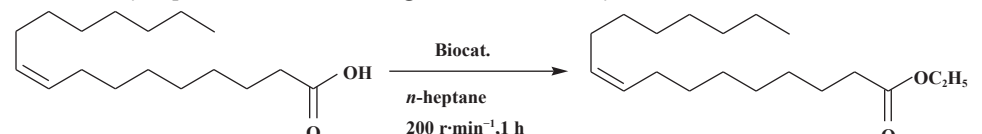
Materials	Rate for chitosan $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$	Conversion for chitosan / %	Rate for micrococcus lysodeikticus cell $/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	Conversion for micrococcus lysodeikticus cell / %
COF 1	0.0	0.0	0.0	0.0
Lysozyme COF 1	1.4	37.2	9.7×10^{-4}	76.0
Free lysozyme	1.5	41.0	1.1×10^{-3}	80.7

酸与乙醇酯化反应中均表现出比游离酶更高的催化活性(表 6)、热稳定性和重复使用性。尽管物理吸附

可以实现酶的高效固定,但共价键结合的固定化酶具有更好的催化活性、热稳定性和重复使用性。

表 6 CAL-B@PPF-2 和游离酶对油酸酯化反应的催化性能

Table 6 Catalytic performance of CAL-B@PPF-2 and free enzyme on oleic acid esterification reaction



Materials	Enzyme loading $/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	Immobilization efficiency / %	Initial rate $/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$	Specific activity $/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$
Free enzyme	—	—	6.7	22.3
CAL-B@PPF-2	3.1	70	1.8	58.1
CAL-B@PPF-2-CHO	1.2	27	3.4	283.3
CAL-B@PPF-2-NH ₂	3.9	88	4.6	117.9

2021 年, Tang 等^[38] 用 TAPB 和 DMTP 通过界面合成法制备 H-COF-OMe 复合材料, 以戊二醛为偶联剂共价连接漆酶 (Laccase) 获得 Lac@H-COF-OMe, 固载量有 $67 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 对四环素的降解率高达 99%, 重复使用 10 次后降解率仍有 91%。2022 年, Wang 等^[39] 制备一种核壳结构的磁性 Fe_3O_4 @COF 材料, 通过戊二醛共价连接辣根过氧化物酶 (HRP), 制备一种 Fe_3O_4 @COF@HRP 生物传感器, 用于检测对苯二酚。该生物传感器具有良好的检测分析能力, 检测范围为 $0.5\sim 300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, LOD 为 $0.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并成功应用于自来水和天然水中对苯二酚的检测, 具有良好的回收率。

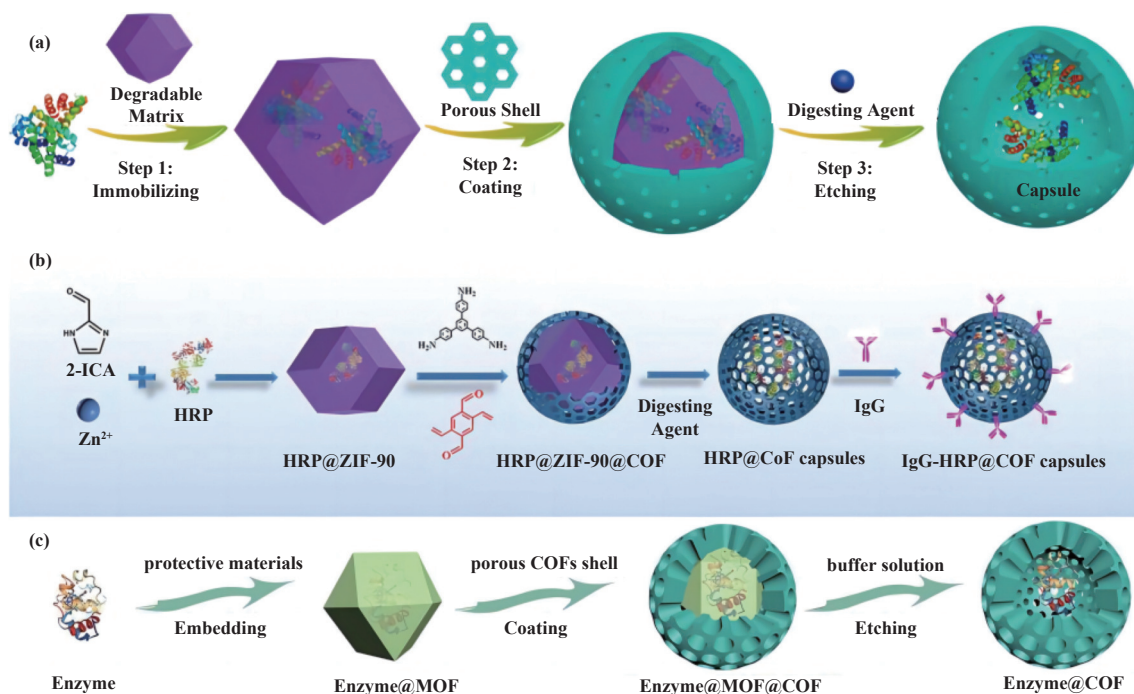
2.3 包埋

固定化酶包埋是将酶通过混合、浸渍或共沉积等方法嵌入固体材料中, 形成固定化酶^[80]。包埋法具有不改变酶的结构, 不受酶分子大小的限制, 利用多孔载体的屏蔽效应, 实现酶活性最大程度的保存^[81]。但是, COFs 的合成条件苛刻, 目前采用直接包埋

的方法制备固定化酶仍比较困难。

2.3.1 牺牲模板法

2020 年, 陈瑶等^[43] 提出了一种用 MOFs 作为牺牲模板, 二次构筑 COFs 胶囊包埋酶的新策略(图 5(a))。首先选择温和条件下可降解的 MOFs 作为牺牲模板, 通过仿生物矿化法固定酶; 然后以 MOFs 为核, 在表面生长 COFs 外壳, 得到三明治结构; 最后在温和的条件下降解 MOFs, 对酶“松绑”, 将其释放到 COFs 的胶囊内腔中, 首次制备了可定制化的酶@COF“核壳胶囊反应器”, 催化性能提高超过 300%。这种新型策略同样适用于多种酶和多酶级联体系。2021 年, Wang 等^[44] 使用可降解的 ZIF-90 作为牺牲模板, 制备 HRP 封装的中空 COF 胶囊 (HRP@COF), 建立了一种肉眼检测 SARS-CoV-2 RNA 的比色方法(图 5(b))。该方法还可用于临床样本的分析, 并可成功区分 COVID-19 患者与健康人群。2023 年, Lin 等^[45] 使用相同策略, 将葡萄糖氧化酶 (GOx) 和细胞色素 c(Cyt c) 共同封装在 COF 胶囊

图 5 酶@COF 胶囊的合成路线^[43-45]Fig.5 Synthetic route to enzyme@COF capsules^[43-45]

中, 构建 GOx-Cyt c@COF(图 5(c)), 级联催化活性较游离酶提高约 1.6 倍, 并用于测定血清中的葡萄糖。

2.3.2 无模板法

牺牲模板法具有较强的通用性和适用性, 但合成步骤相对繁琐, 某些模板可能会与 COFs 结构紧密结合, 导致模板残留, 模板分子的形状和大小也会限制 COFs 的孔隙结构。2022 年, Yang 等^[46] 创建了一种无模板方法, 在室温下将酶原位包埋在中空 COFs 材料中(图 6(a))。以 Trypsin 为模型制备, COFs 微晶从内核迁移并在外壁自组装, 从而将酶保留在空腔中形成 Trypsin@COF-LZU1, 其生物活性比游离酶高约 30%。此外, 在高温、有机溶剂、螯合物、变性剂等各种极端条件下均表现出优异的活性和稳定性。基于这种方法, 还制备了 GOx@COF 胶囊用于电化学传感, 检查人血清中的葡萄糖, 具有高选择性和优异的使用性能。该研究不仅为 COFs 包埋酶提供了新途径, 而且在生物催化和生物传感方面具有潜在应用, 使人造细胞器成为可能。

2.3.3 其他方法

2023 年, Wang 等^[47] 设计一种在自修复和结晶过程中将酶包裹在 COFs 中的预保护策略。初始生长阶段酶被装载在低结晶 aCOFs 中, 为酶提供有效的保护; 随后酶在 aCOFs 自修复和结晶过程继续包埋, 转化为高结晶多孔 COFs。通过该方法, 将葡萄

糖氧化酶 (GOx) 包埋在 COFs 中, 制备 GOx@COF(图 6(b))。该预保护策略不仅使酶免受恶劣反应条件的影响, 同时不限制酶的大小。采用不同大小和表面电荷的酶以及双酶级联系统证明了预保护策略的多功能性, 提供将酶包裹在多孔载体中的设计思路, 有望开发高性能固定化生物催化剂。

为了将更多的酶嵌入到孔径较小的 COFs 中, Kim 等^[48] 使用共沉积法制备了 GOx@COF 复合材料。首先, 在深共晶溶剂 (DES) 溶液中, 用 Tp 将 GOx 功能化, 得到醛基化的 GOx(GOx-CHO)。然后, 通过席夫碱反应, 将 Pa 或 TAPB 和 Tp 共价连接, 成功构建了 GOx@COF 复合材料 (分别为 GOx@Tp-Pa 和 GOx@Tp-TAPB), 这种方法显著提高了酶的耐受性、稳定性和催化活性。

2020 年, Dong 等^[49] 用热溶剂法合成了一种纳米级核壳结构微球 Fe₃O₄@DhaTph-lipase, 所制备的微球作为乳化剂来稳定 Pickering 乳液, 形成一个乳液液滴微反应器。通过可见光诱导的光热转化来促进双相油水界面的酶促酯化反应, 具有良好的催化活性、重复使用性, 经过 10 次循环后, 酯化率仍高达 97%。这种形成乳液液滴微反应器为 COFs 固定化酶的合成开辟了新的途径。

综上, COFs 作为载体, 可以通过物理吸附、共价连接和包埋等方法将酶固载, 制备固定化酶。物理

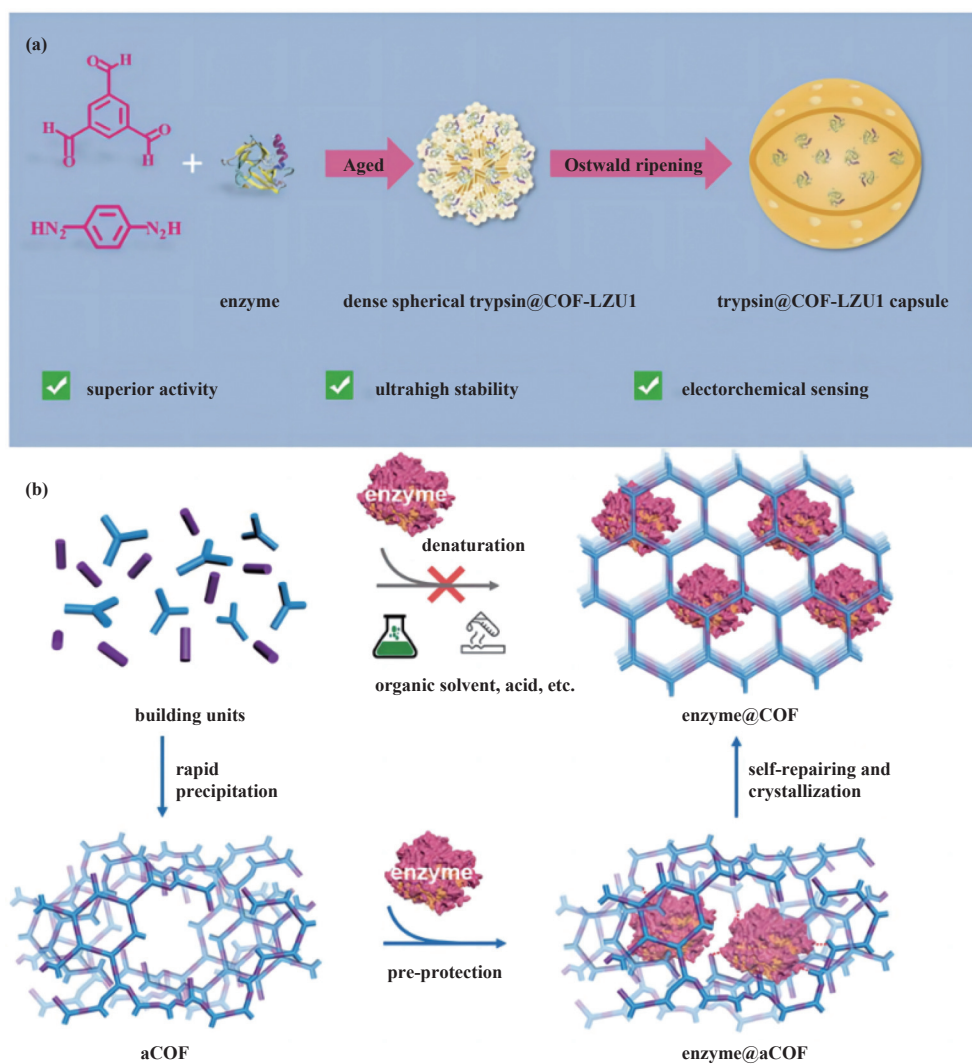


图 6 (a) Trypsin@COF-LZU1 胶囊的制备图^[46]; (b) Enzyme@aCOF 的自修复和结晶过程示意图^[47]

Fig.6 (a) The Preparation Diagram of the Trypsin@COF-LZU1 Capsule^[46], (b) Schematic illustration of enzyme@aCOF via self-repairing and crystallization process^[47]

吸附操作简单, 但适用酶种类受限于 COFs 孔径, 酶与 COFs 之间的结合力较弱, 易脱落, 固定化酶的稳定性较低. 共价连接具有更好的稳定性和重复使用性, 但 COFs 表面需要有官能团, 同时, 共价链接容易造成酶结构变化, 导致酶活性下降. 包埋法可以最大程度保存酶的活性, 防止酶泄露, 但合成条件相对苛刻, 目前路线较长, 操作复杂. 因此, 在选择固定化酶的方法时, 需权衡各种因素, 并根据具体应用需求做出相应选择.

3 以 COFs 为载体固定化酶的应用

COFs 作为一种很有发展前景的酶固定化平台. 随着进一步的结构设计和功能扩展, 将开发出更多结合 COFs 和酶优势的生物复合材料^[82-83]. 接下来,

将介绍 COFs 固定化酶在酶促酯化、手性拆分、分子检测、肿瘤治疗和蛋白水解等应用方面的最新进展.

3.1 酶促酯化

2023 年, Wang 等^[50] 利用 Pickering 乳液微液滴作为软模板, 在乳液界面进行 COFs 纳米微球 (COF-MCs) 的有序组装, 将酶分子封装在液滴内部, 然后通过乳液滴表面的 COFs 颗粒交联, 制备出交联多孔 COFs 微胶囊 (COF-MCs-SH, 图 7). 该催化剂在己酸与己醇的酯化反应中, 2 h 内产率达到 95%, 游离酶仅有 27%, 表观活性较游离酶提高了 10.9 倍. COFs 微胶囊暴露于蛋白酶, 24 h 后仍有 98% 的初始活性, 证明 COFs 的保护作用. 应用于连续流体系, 催化效率 (CE) 高达 $5.17 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 较间歇反应提

高 1.56 倍; 连续高效生产己酸己酯 72 h 后仍保持 97% 的产率. 该方法实现了酶分子的高效可控封装,

在有机介质的间歇反应和连续流动体系中均表现出优异的性能, 展现出工业生产应用的潜力.

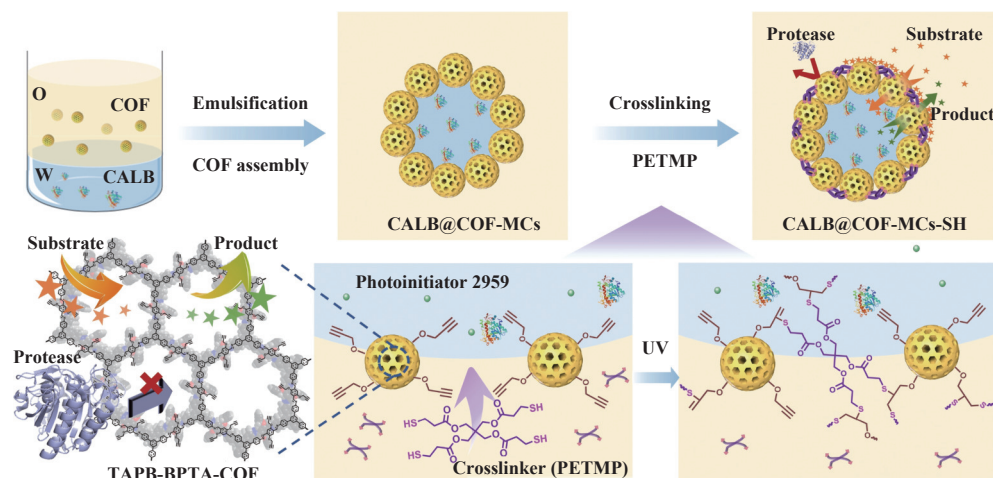


图 7 交联微胶囊 CALB@COF-MCs-SH 的制备^[50]

Fig.7 Fabrication of COF based porous microreactors with crosslinked shells(CALB@COF-MCs-SH)^[50]

3.2 手性拆分

2019 年, 季一兵等^[40]用三聚氰胺和对苯二甲醛合成了一种席夫碱基 COFs(SNW-1), 将其与二甲基丙烯酸乙二醇酯 (EDMA)、甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA) 通过聚合获得 poly(GMA-EDMA-SNW-1) 整体柱, 用戊二醛作为偶联剂连接纤维素酶 (cellulase) 得到 cellulase@poly(GMA-EDMA-SNW-1)(图 8), 为毛细管电色谱 (CEC) 提供一种新的手性固定相. 其分辨率和保留时间的相对标准差 (RSD) 均低于 6.8% 和 4.5%, 在 30 d 内运行 60 次后, 分辨率没有明显变化 (仅从 2.13 到 1.99), 具有较好稳定性和重

复使用性, 并对 8 种不同的手性药物均表现出良好的对映体分离效果.

3.3 分子检测

2019 年, Song 等^[41]提出一种由氨醛缩合反应制备的 COFETTA-TPAL, 将微过氧化物酶-11(MP-11) 和葡萄糖氧化酶 (GOD) 用于比率电化学葡萄糖生物传感 (图 9). COFETTA-TPAL 为二维 (2D) 纳米片, 具有高度有序的晶体共轭结构, 比表面积为 $423.14 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, 双孔隙分别为 3.06 和 0.87 nm. MP-11 和 GOD 通过孔隙装载到 COFETTA-TPA 上, 同时 MP-11 和 GOD 的羧基与载体上的 N 原子结合产生氢键, 生成 GOD-MP-11/COFETTA-TPAL/GCE 系统, 用于葡萄糖检测的电化学生物传感器. 该生物传感器具有高选择性和优异的葡萄糖传感性能, 其检测限为 $4.97 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 线性范围为 $0.017 \sim 3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 显示出良好的重现性和稳定性.

2022 年, Wang 等^[34]采用溶剂热法在多壁碳纳米管 (MWCNTs) 表面原位合成 COF-DhaTab, 将 AChE 吸附在材料的表面, 制备 AchE/COF@MWCNTs/GCE 生物传感器 (图 10), 用于马拉硫磷的定量分析. 在最佳条件下, 该生物传感器的线性范围为 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 马拉硫磷的检测限为 $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 具有良好的抗干扰能力、重现性和存储稳定性. 该生物传感器检测水和菠菜等样品中的马拉硫磷, 准确率高于 96%, 证明该生物传感器可应用于有机磷农药的测定和环境监测.

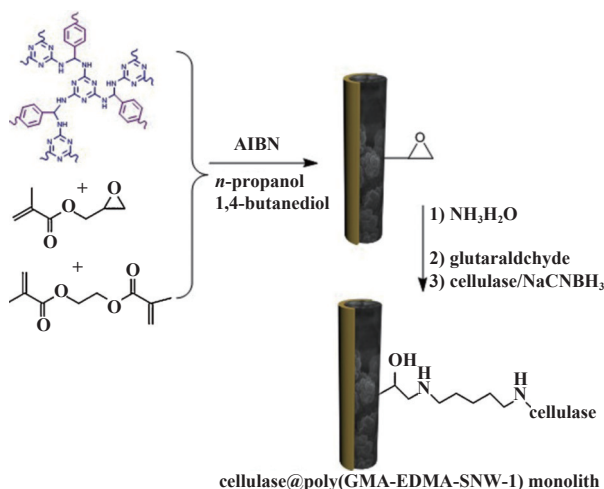


图 8 Cellulase@poly(GMA-EDMA-SNW-1) 整体柱的制备^[40]

Fig.8 Fabrication of cellulase@poly(GMA-EDMA-SNW-1) capillary monolithic column^[40]

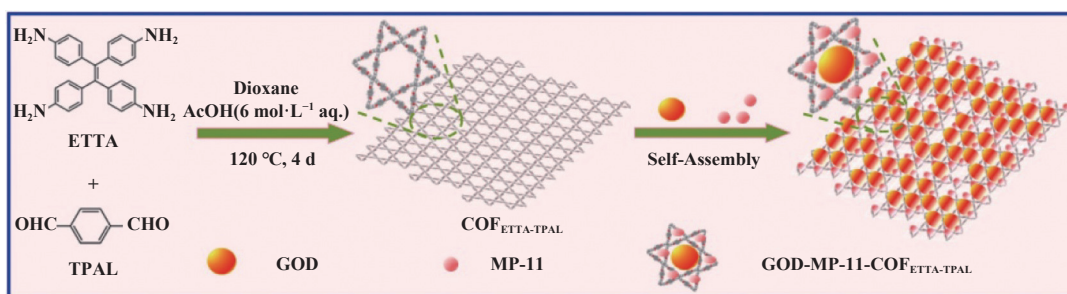


图 9 ETDA-TPAL 合成和 GOD 和 MP-11 自组装示意图^[41]

Fig.9 Schematic illustration of COFETTA-TPAL synthesis and the assembly both GOD and MP-11 into the pores of COFETTA-TPAL^[41]

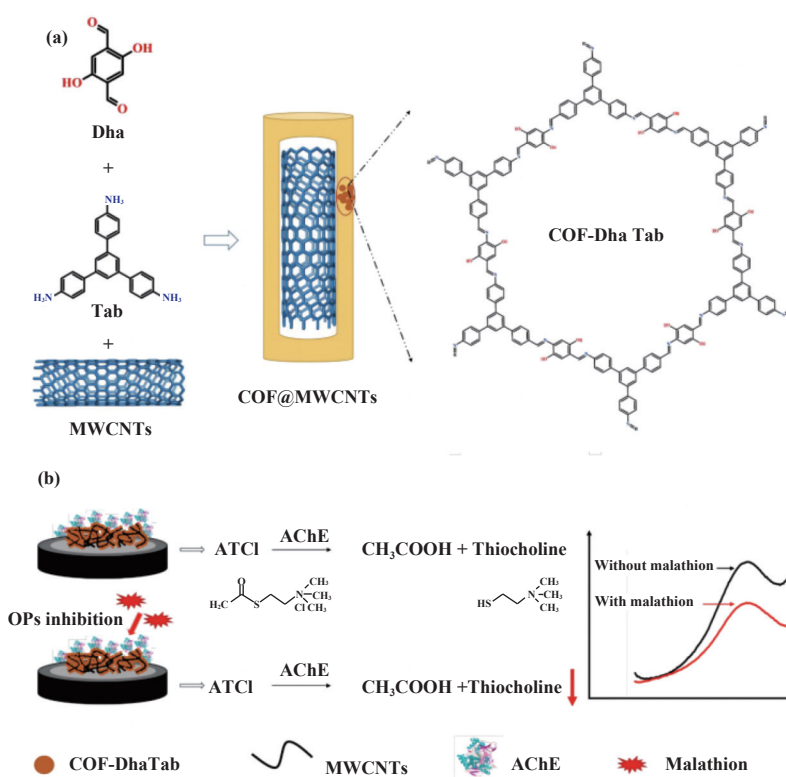


图 10 (a) COF@MWCNTs 的合成途径, (b) AchE/COF@MWCNTs/GCE 生物传感器检测原理^[34]

Fig.10 (a) Synthesis route of COF@MWCNTs, (b) Detection principle of AchE/COF@MWCNTs/GCE biosensor^[34]

3.4 肿瘤治疗

2021 年, Tang 等^[33] 通过静电相互作用把 GOx 和过氧化氢酶 (CAT) 吸附在 COFs 上, 制备 COF@GOx&CAT, 用于肿瘤细胞的长期饥饿治疗和光动力治疗. GOx 和 CAT 的固载量分别为 46.1 和 392.58 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, 将其置于磷酸缓冲溶液、MEM 细胞培养基等不同介质中浸泡 24 h 后仍具有良好的稳定性. 细胞实验中, 经 COF@GOx&CAT 处理后的肿瘤细胞仅保留 17% 的活性, 高于 COF@CAT (48%) 和 COF@GOx(27%), 表现出对肿瘤细胞强大的抑制作用. 小鼠实验中, 经 COF 运输的 GOx 和

CAT, 延长了酶在肿瘤组织中的保留时间, 有效抑制了肿瘤生长.

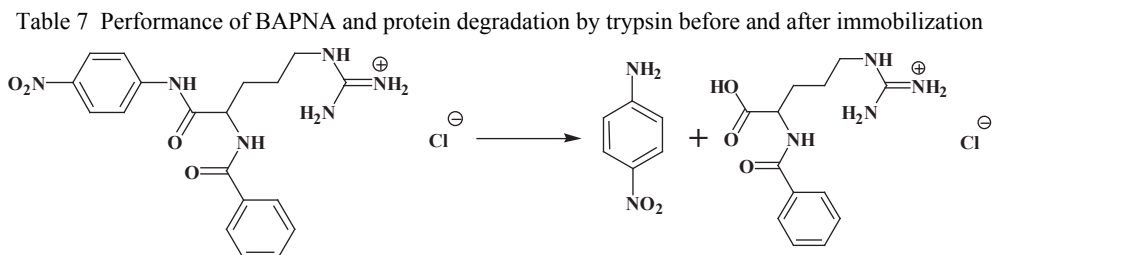
3.5 蛋白水解

2021 年, Lin 等^[42] 通过调控催化剂的添加量, 用 4,4',4''-(1,3,5-三嗪-2,4,6-三基) 三苯胺 (Tat) 和 2,3-二羟基对苯二甲醛 (Dha) 合成中空微管 TatDha-COF, 将 Ni^{2+} 与 COF 的羟基和三嗪基团螯合, 为 trypsin 固定提供结合位点, 成功制备 COF(Ni)@trypsin. 由于 Ni^{2+} 和 trypsin 固定在孔隙通道, 中空微管的比表面积由 2 607 减少到 1 242 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, 孔隙体积从 1.14 减少到 0.49 $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$. 固定后的 trypsin

活性为 $30 \mu\text{mol}\cdot(\text{L}\cdot\text{g}\cdot\text{min})^{-1}$, 较游离酶提高 10%; 相同条件下水解蛋白, COF(Ni)@trypsin 耗时 (5 min) 仅为游离酶的 (约 12 h) 的 1/144, 显著提高蛋白水解效率 (表 7). 经消化乳蛋白评价, COF(Ni)@

trypsin 鉴定出 44 个肽, 高于游离酶 (鉴定出 18 个肽), 在消化方面表现出对复杂样品的良好适用性, 稳定性和重复使用性.

表 7 Trypsin 固定前后 BAPNA 和蛋白质的水解性能



Materials	Enzyme loading $/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	Enzymatic activity $/(\mu\text{mol}\cdot(\text{L}\cdot\text{g}\cdot\text{min})^{-1})$	K_m $/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$K_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	Protein degradation/% (sequence coverage of amino acid)	
					Cytc	Ova
Free trypsin	—	27.3	4.83	0.74	55.2	26.4
COF(Ni)@trypsin	453	30.0	2.58	0.79	95.2	54.1

4 结论与展望

我们综述了近十年来 COFs 做为载体材料, 制备固定化酶的研究进展. 目前, COFs 材料被成功应用于固定化酶, 具有增强酶的抗逆性能、提高酶的稳定性和重复使用性, 取得了非常好的效果. 但相比于其他多孔材料, 这方面研究才刚刚起步, 依然面临非常大的挑战: COFs 的合成条件较为苛刻, 缺乏大批量的制备方法, 导致 COFs 作为固定化酶载体难以实现产业化应用; COFs 在酸性条件下易解离, 失去对酶的保护作用, 需要继续提高材料的稳定性; COFs 固定化酶在医学、食品等领域的生物安全性仍需要更加深入的研究.

参考文献:

- [1] a. Nestl B M, Hammer S C, Nebel B A, *et al.* New generation of biocatalysts for organic synthesis[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2014, **53**(12): 3070–3095.
b. Chen Yi-ying(陈一莹), Tian Ya-ping(田亚萍), Liu Qing-cui(刘青翠), *et al.* Preparation of Co-MOF-derived cobalt-based catalyst and its properties for hydrogen production from NaBH_4 hydrolysis(Co-MOF 衍生钴基催化剂制备及其 NaBH_4 水解制氢性能)[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2024, **38**(1): 63–70.
c. Li Bo-yuan(李博远), He Feng-gui(何凤贵), Zhang Ming-hui(张明慧), *et al.* Modification of metal organic

framework materials and their application in photocatalytic hydrogen evolution(金属-有机骨架材料的改性方法及其光催化制氢应用)[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2023, **37**(1): 94–107.

- [2] a. Feng J, Huang Q Y, Zhang C, *et al.* Review of covalent organic frameworks for enzyme immobilization: strategies, applications, and prospects[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, **248**: 125729.
b. Lan Yong-cheng(兰永成), Lu Yan-mei(鲁艳梅), Yun Dong(郇栋), *et al.* Application of ionic liquid functionalized MOFs/COFs in catalytic reactions(离子液体功能化金属/共价-有机框架材料在催化反应中应用)[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2022, **36**(5): 480–498.
c. Zhang Zhi-yan(张志艳), Zhang Xiao(张潇), Shi Chen-chen(石琛琛), *et al.* Covalent organic frameworks supported noble-metal Pt for electrocatalytic hydrogen evolution(共价有机框架负载贵金属铂用于电催化析氢)[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2024, **38**(1): 42–50.
- [3] a. Zhang Y, He S, Simpson B K. Enzymes in food bio-processing—Novel food enzymes, applications, and related techniques[J]. *Curr Opin Food Sci*, 2018, **19**: 30–35.
b. Zhang Zhi-yan(张志艳), Shi Chen-chen(石琛琛), Zhang Xiao(张潇), *et al.* Carbazole-based covalent organic frameworks for photocatalytic hydrogen evolution (咔唑基共价有机框架用于光催化析氢)[J]. *J Mol*

- Catal (China)* (分子催化), 2023, **37**(4): 367–374.
- [4] Zhang Y, Geary T, Simpson B K. Genetically modified food enzymes: A review[J]. *Curr Opin Food Sci*, 2019, **25**: 14–18.
- [5] Gröger H. Enzyme catalysis in the synthesis of pharmaceuticals[J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, **26**(7): 1239–1240.
- [6] Zeng Z, Zheng W, Hou P. The role of drug-metabolizing enzymes in synthetic lethality of cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, **240**: 108219.
- [7] Girelli A M, Astolfi M L, Scuto F R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review[J]. *Chemosphere*, 2019, **244**: 125368.
- [8] Choi J M, Han S S, Kim H S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects[J]. *Biotechnol Adv*, 2015, **33**(7): 1443–1454.
- [9] Wu S, Snajdrova R, Moore J C, *et al.* Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, **60**(1): 88–119.
- [10] Iyer P V, Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment [J]. *Process Biochem*, 2008, **43**(10): 1019–1032.
- [11] Cantone S, Ferrario V, Corici L, *et al.* Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(15): 6262–6276.
- [12] Zhou Z W, Cai C X, Xing X, *et al.* Magnetic COFs as satisfied support for lipase immobilization and recovery to effectively achieve the production of biodiesel by great maintenance of enzyme activity[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2021, **14**(1): 156.
- [13] Liang H, Jiang S, Yuan Q, *et al.* Co-immobilization of multiple enzymes by metal coordinated nucleotide hydrogel nanofibers: Improved stability and an enzyme cascade for glucose detection[J]. *Nanoscale*, 2016, **8**(11): 6071–6078.
- [14] Brito M J P, Veloso C M, Bonomo R C F, *et al.* Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization[J]. *Fuel Process Technol*, 2017, **156**: 421–428.
- [15] Llopis-Lorente A, Lozano-Torres B, Bernardos A, *et al.* Mesoporous silica materials for controlled delivery based on enzymes[J]. *J Mater Chem B*, 2017, **5**: 3069.
- [16] Ji Y, Wu Z, Zhang P, *et al.* Enzyme-functionalized magnetic framework composite fabricated by one-pot encapsulation of lipase and Fe₃O₄ nanoparticle into metal-organic framework[J]. *Biochem Eng J*, 2021, **169**: 107962.
- [17] Kumar S, Kulkarni V V, Jangir R. Covalent-organic framework composites: A review report on synthesis methods[J]. *ChemistrySelect*, 2021, **6**(41): 11201–11223.
- [18] Ashkan Z, Hemmati R, Homaei A, *et al.* Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, **168**: 708–721.
- [19] Wang S, Xia X, Chen F E. Engineering of covalent organic framework - based advanced platforms for enzyme immobilization: Strategies, research progress, and prospects[J]. *Adv Mater Interfaces*, 2022, **9**(29): 2200874.
- [20] Soozanipour A, Taheri-Kafrani A. Enzyme immobilization on functionalized graphene oxide nanosheets: Efficient and robust biocatalysts[J]. *Methods Enzymol*, 2018, **609**: 371–403.
- [21] Martinez-Perinan E, Martinez-Fernandez M, Segura J L, *et al.* Electrochemical (bio)sensors based on covalent organic frameworks (COFs)[J]. *Sensors*, 2022, **22**(13): 4758.
- [22] Shuang L, Meng-hao L, Manlin Q, *et al.* Nanoplat-forms based on covalent organic frameworks (COFs) for biomedical applications[J]. *Chem Mater*, 2023, **35**(20): 8353–8370.
- [23] Aiyappa H B, Thote J, Shinde D B, *et al.* Cobalt-modified covalent organic framework as a robust water oxidation electrocatalyst[J]. *Chem Mater*, 2016, **28**(12): 4375–4379.
- [24] Côté A P, Benin A I, Ockwig N W, *et al.* Porous, crystalline, covalent organic frameworks[J]. *Science*, 2005, **310**(5751): 1166–1170.
- [25] Yuan G, Tan L, Wang P, *et al.* MOF-COF composite photocatalysts: Design, synthesis, and mechanism[J]. *Cryst Growth Des*, 2021, **22**(1): 893–908.
- [26] Patial S, Soni V, Kumar A, *et al.* Rational design, structure properties, and synthesis strategies of dual-pore covalent organic frameworks (COFs) for potent applications: A review[J]. *Environ Res*, 2022, **218**: 114982.
- [27] Kandambeth S, Venkatesh V, Shinde D B, *et al.* Self-templated chemically stable hollow spherical covalent organic framework[J]. *Nat Commun*, 2015, **6**: 6786.
- [28] Sun Q, Fu C W, Aguila B, *et al.* Pore environment control and enhanced performance of enzymes infiltrated in covalent organic frameworks[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(3): 984–992.
- [29] Sun Q, Aguila B, Lan P C, *et al.* Tuning pore heterogeneity in covalent organic frameworks for enhanced enzyme accessibility and resistance against denaturants[J]. *Adv Mater*, 2019, **31**(19): 1900008.

- [30] Cheng H, Wei Y Q, Han J Y, *et al.* Catalytic hydrolysis of ginsenosides by pectinase immobilized on a covalent organic framework material[J]. *Process Biochem*, 2022, **118**: 317–322.
- [31] Niu K, Zhang Y, Chen J, *et al.* 2D conductive covalent organic frameworks with abundant carbonyl groups for electrochemical sensing[J]. *ACS Sensors*, 2022, **7**(11): 3551–3559.
- [32] Samui A, Happy, Sahu S K. Integration of α -amylase into covalent organic framework for highly efficient biocatalyst[J]. *Microporous Mesoporous Mater*, 2020, **291**: 109700.
- [33] Wan X, Zhang H, Pan W, *et al.* An enzyme nanopocket based on covalent organic frameworks for long-term starvation therapy and enhanced photodynamic therapy of cancer[J]. *Chem Commun*, 2021, **57**(44): 5402–5405.
- [34] Wang X, Yang S, Shan J, *et al.* Novel electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on core-shell covalent organic framework@multi-walled carbon nanotubes (COF@MWCNTs) composite for detection of malathion[J]. *Int J Electrochem Sci*, 2022, **17**(5): 220543.
- [35] Wang H, Jiao F, Gao F, *et al.* Covalent organic framework-coated magnetic graphene as a novel support for trypsin immobilization[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, **409**(8): 2179–2187.
- [36] Zhang S, Zheng Y, An H, *et al.* Covalent organic frameworks with chirality enriched by biomolecules for efficient chiral separation[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2018, **57**(51): 16754–16759.
- [37] Oliveira F L, de Souza S P, Bassut J, *et al.* Enzyme-decorated covalent organic frameworks as nanoporous platforms for heterogeneous biocatalysis[J]. *Chemistry*, 2019, **25**(69): 15863–15870.
- [38] Tang Y, Li W, Muhammad Y, *et al.* Fabrication of hollow covalent-organic framework microspheres via emulsion- interfacial strategy to enhance laccase immobilization for tetracycline degradation[J]. *Chem Eng J*, 2021, **421**(1): 129743.
- [39] Sun X, Xie Y, Chu H, *et al.* A highly sensitive electrochemical biosensor for the detection of hydroquinone based on a magnetic covalent organic framework and enzyme for signal amplification[J]. *New J Chem*, 2022, **46**(24): 11902–11909.
- [40] Xu S, Wang Y, Li W, *et al.* Covalent organic framework incorporated chiral polymer monoliths for capillary electrochromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2019, **1602**(27): 481–488.
- [41] Wang L, Liang H, Xu M, *et al.* Ratiometric electrochemical biosensing based on double-enzymes loaded on two-dimensional dual-pore COFETTA-TPAL[J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2019, **298**: 126859.
- [42] Zhong C, Ma W, He Y, *et al.* Controllable synthesis of hollow microtubular covalent organic frameworks as an enzyme-immobilized platform for enhancing catalytic activity[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(44): 52417–52424.
- [43] Li M, Qiao S, Zheng Y, *et al.* Fabricating covalent organic framework capsules with commodious microenvironment for enzymes[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, **142**(14): 6675–6681.
- [44] Wang M, Lin Y, Lu J, *et al.* Visual naked-eye detection of SARS-CoV-2 RNA based on covalent organic framework capsules[J]. *Chem Eng J*, 2022, **429**: 132332.
- [45] Zhong C, Li G, Tian W, *et al.* Construction of covalent organic framework capsule-based nanoreactor for sensitive glucose detection[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, **15**(7): 10158–10165.
- [46] Chao H, Zhou Z, He W, *et al.* Template-free *in situ* encapsulation of enzymes in hollow covalent organic framework capsules for the electrochemical analysis of biomarkers[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, **14**(18): 20641–20651.
- [47] Zhang Y, Xing C, Mu Z, *et al.* Harnessing self-repairing and crystallization processes for effective enzyme encapsulation in covalent organic frameworks[J]. *J Am Chem Soc*, 2023, **145**(24): 13469–13475.
- [48] Talekar S, Kim Y, Wee Y, *et al.* De novo synthesis of enzyme-embedded covalent organic frameworks (COFs) using deep eutectic solvent: Pushing the COF limits[J]. *Chem Eng J*, 2023, **456**: 141058.
- [49] Yao B J, Zhang X M, Li F, *et al.* Fe₃O₄/Porphyrin covalent organic framework core-shell nanospheres as interfacial catalysts for enzymatic esterification[J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2020, **3**(10): 10360–10368.
- [50] Feng M, Niu Z, Xing C, *et al.* Covalent organic framework based crosslinked porous microcapsules for enzymatic catalysis[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2023, **62**(33): e202306621.
- [51] Ma M, Lu X, Guo Y, *et al.* Combination of metal-organic frameworks (MOFs) and covalent organic frameworks (COFs): Recent advances in synthesis and analytical applications of MOF/COF composites[J]. *Trends Anal Chem*, 2022, **157**: 116741.
- [52] Solomos M A, Claire F J, Kempa T J. 2D molecular crystal lattices: Advances in their synthesis, characteri-

- zation, and application[J]. *J Mater Chem A*, 2019, **7**(41): 23537–23562.
- [53] Zhang Y, Xu X, Liao Q, *et al.* New potential of boron-based COFs: The biocompatible COF-1 for reactive oxygen generation and antimicrobial applications[J]. *J Mater Chem B*, 2022, **10**(17): 3285–3292.
- [54] Yang C H, Chang J S, Lee D J. Chemically stable covalent organic framework as adsorbent from aqueous solution: A mini-review[J]. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2020, **110**: 79–91.
- [55] Yang H C, Chen Y Y, Suen S Y, *et al.* Triazine-based covalent organic framework/carbon nanotube fiber nanocomposites for high-performance supercapacitor electrodes[J]. *Polymer*, 2023, **273**: 125853.
- [56] Chen Y J, Zhuo H Y, Pan Y, *et al.* Triazine COF-supported single-atom catalyst (Pd₁/trzn-COF) for CO oxidation[J]. *Sci China Mater*, 2021, **64**: 1939–1951.
- [57] Dautzenberg E, Claassen F W, de Smet L C P M. Functionalized modulators in imine-linked covalent organic frameworks (COFs)[J]. *Microporous Mesoporous Mater*, 2023, **350**: 112318.
- [58] Sprachmann J, Grabicki N, Moeckel A, *et al.* Substituted benzophenone imines for COF synthesis via formal transimination[J]. *Chem Commun*, 2023, **59**(91): 13639–13642.
- [59] Qianqian Z, Yunlong Z, Zhenjie Z, *et al.* Enzyme immobilization on covalent organic framework supports[J]. *Nat Protoc*, 2023, **18**: 3080–3125.
- [60] Qin Y, Zhu X, Huang R. Covalent organic frameworks: Linkage types, synthetic methods and bio-related applications[J]. *Biomater Sci*, 2023, **11**(21): 6942–6976.
- [61] Wang S, Zhang M, Chen J. Research progress of synthesis methods for crystalline porous materials[J]. *Acta Chim Sin*, 2023, **81**(2): 146.
- [62] Zhang F, Zhang J, Zhang B, *et al.* Room - temperature synthesis of covalent organic framework (COF - LZU1) nanobars in CO₂/water solvent[J]. *ChemSusChem*, 2018, **11**(20): 3576–3580.
- [63] Rodríguez-Carrillo C, Benítez M, El Haskouri J, *et al.* Novel microwave-assisted synthesis of COFs: 2020–2022[J]. *Molecules*, 2023, **28**(7): 3112.
- [64] Yang S T, Kim J, Cho H Y, *et al.* Facile synthesis of covalent organic frameworks COF-1 and COF-5 by sonochemical method[J]. *RSC Adv*, 2012, **2**(27): 10179–10181.
- [65] Wenhui Y, Yongkui C, Timing F, *et al.* Liquid-liquid phase separation of aqueous ionic liquids in covalent organic frameworks for thermal switchable proton conductivity[J]. *J Phys Chem Lett*, 2023, **14**(36): 8165–8174.
- [66] Bisbey R P, Dichtel W R. Covalent organic frameworks as a platform for multidimensional polymerization[J]. *ACS Cent Sci*, 2017, **3**(6): 533–543.
- [67] Dey K, Pal M, Rout K C, *et al.* Selective molecular separation by interfacially crystallized covalent organic framework thin films[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(37): 13083–13091.
- [68] Yuan R, He Y, Tang B, *et al.* Enzyme-immobilized spherical covalent organic frameworks as nanoreactors for heterogeneous biocatalysis[J]. *CrystEngComm*, 2023, **25**(25): 3604–3608.
- [69] Zhu Y, Wan S, Jin Y, *et al.* Desymmetrized vertex design for the synthesis of covalent organic frameworks with periodically heterogeneous pore structures[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(43): 13772–13775.
- [70] Maschita J, Banerjee T, Savasci G, *et al.* Ionothermal synthesis of imide-linked covalent organic frameworks[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, **59**(36): 15750–15758.
- [71] Matsumoto M, Valentino L, Stiehl G M, *et al.* Lewis-acid-catalyzed interfacial polymerization of covalent organic framework films[J]. *Chem*, 2018, **4**(2): 308–317.
- [72] Gan J, Bagheri A R, Aramesh N, *et al.* Covalent organic frameworks as emerging host platforms for enzyme immobilization and robust biocatalysis—A review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, **167**(15): 502–515.
- [73] Wang C, Liao K. Recent advances in emerging metal- and covalent-organic frameworks for enzyme encapsulation[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(48): 56752–56776.
- [74] Xu Y, Huang A, Yi W, *et al.* Nanozyme engineering in structurally explicit framework: Design mechanisms and biosensing applications[J]. *Coord Chem Rev*, 2024, **500**: 215517.
- [75] Machado N B, Sabi G J, Hirata D B, *et al.* Enzymatic production of wax esters by esterification using lipase immobilized via physical adsorption on functionalized rice husk silica as biocatalyst[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2023, **70**(3): 1291–1301.
- [76] Qiao S, Li M, Yu J, *et al.* Biomolecule@COF: Natural-artificial hybrid microcapsules for controllable biocatalysis[J]. *Particuology*, 2021, **64**: 140–144.
- [77] Zhou Y, Wei Y, Ren J, *et al.* A chiral covalent organic framework (COF) nanozyme with ultrahigh enzymatic activity[J]. *Mater Horiz*, 2020, **7**(12): 3291–3297.

- [78] Zhao H, Liu G, Liu Y, *et al.* Metal nanoparticles@covalent organic framework@enzymes: A universal platform for fabricating a metal-enzyme integrated nanocatalyst[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, **14**(2): 2881–2892.
- [79] Yue J Y, Ding X L, Wang L, *et al.* Novel enzyme-functionalized covalent organic frameworks for the colorimetric sensing of glucose in body fluids and drinks[J]. *Mater Chem Front*, 2021, **5**(10): 3859–3866.
- [80] Maghraby Y R, El-Shabasy R M, Ibrahim A H, *et al.* Enzyme immobilization technologies and industrial applications[J]. *ACS Omega*, 2023, **8**(5): 5184–5196.
- [81] Goralski S T, Cid-Seara K M, Jarju J J, *et al.* Threefold reactivity of a COF-embedded rhenium catalyst: Reductive etherification, oxidative esterification or transfer hydrogenation[J]. *Chem Commun*, 2022, **58**(86): 12074–12077.
- [82] Li T, Pan Y, Shao B, *et al.* Covalent-organic framework (COF)-core-shell composites: Classification, synthesis, properties, and applications[J]. *Adv Funct Mater*, 2023, **33**(45): 2304990.
- [83] Ding S Y, Wang W. Covalent organic frameworks (COFs): From design to applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(2): 548–568.

Recent Progress on Covalent Organic Frameworks Materials in Immobilized Enzymes

JIN Jing^{1,2}, ZHANG Yu-fei², ZHENG Dong-yun^{1*}, ZHENG Ming-ming^{2*}

(1. College of Biomedical Engineering, South-Central Minzu University, Wuhan, 430000, China; 2. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, 430000, China)

Abstract: Covalent Organic Frameworks (COFs) are a class of crystalline porous polymers that are constructed based on the interactions of different atoms *via* covalent bonds. Due to their adjustable physicochemical properties, structural regularity, robust framework, adjustable porosity and excellent absorptivity, COFs have been widely used to prepare immobilized enzymes for food processing, chemical production and wastewater treatment, etc. This paper reviews the advances in using COFs as the carriers for enzyme immobilization through different immobilization methods including physical adsorption, covalent linkage, and entrapment in recent 10 years. And discussed the remaining challenges as well as the forthcoming chances of COFs materials for enzyme immobilization.

Key words: covalent organic frameworks; immobilized enzyme; physical adsorption; covalent linkage; entrapment