

调控配位不饱和位点增强锆基金属有机框架 纳米酶的蛋白水解酶活性及应用

Nanozymatic activity of Zr-based MOFs: Tuning the coordinatively unsaturated metal sites for enhancing hydrolytic activity toward peptide bonds

许珂宇¹ 夏利伟¹ 邢克宇¹ 程云辉^{1,2} 许宙¹
XU Keyu¹ XIA Liwei¹ XING Keyu¹ CHENG Yunhui^{1,2} XU Zhou¹

(1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114;

2. 齐鲁工业大学食品科学与工程学院, 山东 济南 250353)

(1. School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. School of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology, Jinan, Shandong 250353, China)

摘要:目的: 开发高效稳定的蛋白水解酶纳米酶, 研究配位不饱和位点与肽键水解活性的关系。方法: 制备 3 种不同配位(12/6/4 配位)不饱和位点的锆基金属有机框架纳米酶(Zr-MOFs 纳米酶)调控蛋白水解酶活性。以双甘肽(Gly-Gly)水解率为指标, 评估 3 种 Zr-MOFs 纳米酶的蛋白水解酶活性。随后, 使用性能最优的蛋白水解酶纳米酶水解大豆蛋白、鱼糜蛋白和酪蛋白, 利用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离水解产物, 通过考马斯亮蓝对分离的条带染色, 考察人工蛋白酶对 3 种蛋白的水解效率。结果: 在 3 种不同配位不饱和位点 Zr-MOFs 纳米酶中, 6-配位 Zr-MOF 纳米酶的蛋白水解酶活性最高, 水解率为 52%。与非催化水解相比, 水解反应速率提高了 2.63×10^3 倍。蛋白水解酶纳米酶可水解食品工业中 3 种常见的蛋白质, 对鱼糜蛋白的水解效率最高。结论: 通过调控 Zr-MOFs 纳米酶的配位不饱和位点可以增强蛋白水解酶活性。

关键词: 金属有机框架; 配位不饱和位点; 蛋白水解酶; 水解; 肽键

Abstract: Objective: To develop efficient and stable artificial proteases and investigate the relationship between coordinatively unsaturated metal sites and hydrolysis activity of peptide bond.

基金项目: 湖南省教育厅研究项目(编号: 21B0337); 湖南省自然科学基金(编号: 2021JJ30701, 2022JJ10046); 泰山产业领军人才项目(编号: 457 LJNY202004)

作者简介: 许珂宇, 女, 长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者: 许宙(1983—), 男, 长沙理工大学副教授, 博士。

E-mail: xz_jnu@126.com

收稿日期: 2023-03-29 **改回日期:** 2023-08-11

Methods: Three zirconium-based metal-organic frameworks (Zr-MOFs) with different coordinatively unsaturated sites (12-connected Zr-MOF, 6-connected Zr-MOF, and 4-connected Zr-MOF) were prepared to modulate protein hydrolase activity. The protein hydrolase activity of three Zr-MOFs was evaluated by the hydrolysis rate of bis-glycopeptide (Gly-Gly) as an indicator. Subsequently, soy protein, surimi protein and casein were hydrolyzed using the best performing protein hydrolase nanoenzymes, and the hydrolysis products were separated using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the hydrolysis efficiency of the three proteins by artificial proteases was investigated by staining the separated bands with Komasa Brilliant Blue. **Results:** Among the three Zr-MOFs proteases, the 6-connected Zr-MOF showed the highest hydrolysis (52%) efficiency toward the Gly-Gly. The hydrolysis reaction rate was increased 2.63×10^3 times compared the uncatalyzed hydrolysis. In addition, the 6-connected Zr-MOF could respectively hydrolyze three commonly proteins in the food industry and had the highest catalytic effect on surimi protein. **Conclusion:** These results revealed that the ability of Zr-MOF to hydrolyze peptide bonds could be enhanced by tuning the coordinatively unsaturated sites. The study provided a new idea for the application of artificial proteases in food industry.

Keywords: metal-organic framework; coordinatively unsaturated sites; nanozymes; hydrolysis; peptide bond

微生物蛋白酶是食品工业中的主要酶类之一, 占整个酶类市场的 65%^[1-3]。然而, 微生物生产蛋白酶仍存

在许多问题,如菌种培育操作复杂、环境要求严格、纯化过程繁琐、生产成本高昂等。此外,在贮藏和应用过程中,pH值和温度条件更是严重限制了微生物蛋白酶在工业中的发展^[4]。由于纳米酶不具有蛋白质结构,所以各种环境因素(如pH值和温度)对纳米酶的催化活性中心造成的破坏性较小。因此,纳米酶具有高选择性^[5]、稳定性和潜在可回收性^[6-7],可以降低食品工业中酶催化的经济成本^[8]。

蛋白水解酶纳米酶是一种具有蛋白水解酶活性的纳米酶,已在寡肽和蛋白质水解过程中显示出高选择性^[9-10]。然而,这些蛋白水解酶纳米酶的活性相对较低,严重阻碍了蛋白水解酶纳米酶的实际应用。

金属有机框架(MOFs)是一种新兴的多孔纳米材料^[11-12],是由金属离子或金属团簇和多种有机配体通过配位构建的^[13-14]。因此,通过改变金属团簇和有机配体类型,MOFs的结构和性能(如纳米级孔隙率、高表面积、良好的热稳定性和均匀的空腔结构)可以被调整。目前,Zr-MOFs作为催化剂已被用于肽键的水解^[15-17]。然而,大多数Zr-MOFs中金属离子与有机配体完全配位,这种微观结构阻碍了Zr-MOFs对肽的吸附,严重影响了Zr-MOFs的催化性能。有研究^[18-19]表明,MOFs的催化性能可以通过改变缺陷而被提高,而不同的缺陷可以通过调整配位不饱和和金属位点(CUSs)来实现。最常见的CUSs调控方法是在MOFs合成过程中使用不同的有机配体^[20]。

研究拟通过简便的水热法制备3种具有不同配位不饱和和位点的Zr-MOFs纳米酶(12-配位Zr-MOF、6-配位Zr-MOF和4-配位Zr-MOF),利用扫描电子显微镜(SEM)、动态光散射(DLS)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)和X射线衍射(XRD)来表征Zr-MOF纳米酶的特征。以双甘肽(Gly-Gly)水解率为指标,评估3种Zr-MOFs纳米酶的蛋白水解酶活性,并于食品工业中3种常见的蛋白质(大豆蛋白、鱼糜蛋白和酪蛋白)中验证Zr-MOFs纳米酶的实际应用能力,以期为食品工业中蛋白水解提供技术支持。

1 材料与实验方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

四氯化锆($ZrCl_4$)、八水合二氯化锆($ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$)、对苯二甲酸(BDC)、均苯三甲酸(H_3BTC)、[1,1':4',1'']三联苯-3,3'',5,5''-四甲酸(TPTC);北京百灵威科技有限公司;

大豆分离蛋白、酪蛋白、鱼糜蛋白、*N,N*-二乙基甲酰胺(DEF)、苯异硫氰酸酯(PITC);上海麦克林科技有限公司;

N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、无水乙醇、氯化钾、甲

醇、甲酸、乙腈、三乙胺、正己烷、醋酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

管式炉:GSL-1600X型,郑州博科仪器公司;

电子分析天平:FA2004N型,上海精密科学仪器有限公司;

数显恒温磁力搅拌器:85-2型,天津市泰斯特仪器有限公司;

台式高速离心机:TG16-WS型,湖南湘仪离心机仪器有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9246A型,上海精宏实验设备有限公司;

高效液相色谱:E2695型,美国沃特世公司;

激光粒度仪:Zetasizer nano型,英国Malvern公司;

扫描电子显微镜:JEOLJEM-2100型,日本电子株式会社;

傅立叶红外光谱仪:Nicolet6700型,美国Thermo Nicolet公司;

X射线衍射仪:smartlab9型,日本理学公司。

1.2 方法

1.2.1 Zr-MOFs纳米酶的合成

(1) 12-配位Zr-MOF的制备:将60.6 mg $ZrCl_4$ 和0.423 g BDC溶于15 mL DMF和0.447 mL冰醋酸混合溶液中,置于聚四氟乙烯内胆(20 mL)中,120 °C加热24 h。冷却,8 017 × *g*离心15 min。将得到的产物分别用DMF和甲醇洗涤3次,后续试验前,于室温下真空活化12-配位Zr-MOF^[14]。

(2) 6-配位Zr-MOF的制备:将40.3 mg $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ 和26.2 mg H_3BTC 溶于5 mL DMF和5 mL甲酸混合溶液中,置于聚四氟乙烯内胆(20 mL)中,130 °C加热48 h。冷却,12 333 × *g*离心10 min。将得到的产物用DMF和乙醇分别洗涤3次,并于150 °C活化20 h后进行后续试验^[21]。

(3) 4-配位Zr-MOF的制备:将42.8 mg $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ 溶于4 mL DEF和2.5 mL甲酸混合溶液中,置于聚四氟乙烯内胆(20 mL)中,80 °C加热1 h,冷却,加入13.6 mg TPTC和200 μL去离子水,超声处理20 min,于130 °C加热48 h,14 800 × *g*离心10 min,用DMF和丙酮洗涤3次,并于80 °C真空干燥^[22]。

1.2.2 Zr-MOFs纳米酶的特征 使用Malvern Zetasizer Nano-ZS测量Zr-MOFs的DLS,通过SEM观察Zr-MOFs的形貌,使用FTIR分析Zr-MOFs的化学结构,通过XRD获取Zr-MOFs的晶体结构信息,并通过高效液相色谱法(HPLC)测定Gly-Gly和Gly含量。

1.2.3 Zr-MOFs纳米酶的蛋白水解酶活性分析

(1) 双甘肽的水解:将2.0 μmol Zr-MOFs和50 μL

Gly-Gly 溶液 (40 mmol/L) 加入到 950 μL 超纯水中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌。Gly-Gly 被 Zr-MOFs 水解后, 混合物于 14 800 $\times g$ 离心 20 min 以去除 Zr-MOFs^[23], 通过 HPLC 检测水解产物, 并通过 Gly 产率计算 Zr-MOF 水解 Gly-Gly 的催化速率。

(2) 蛋白水解酶活性测定: 以双甘肽 (Gly-Gly) 水解率为指标, 评估 Zr-MOFs 纳米酶的蛋白水解酶活性。将 200 μL 样品溶液、100 μL 三乙胺乙腈溶液和 100 μL PITC 乙腈溶液混合, 室温放置 1 h, 向混合物中加入 400 μL 正己烷, 室温静置 10 min, 过滤, 滤液用 800 μL 超纯水稀释。流动相 A 为 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液 (pH 6.5); 流动相 B 为乙腈; 洗脱流速 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 上样量 10 μL 。梯度洗脱条件: 0~7 min, 100% A, 7~15 min, 85% A, 15~18 min, 100% A。

(3) Zr-MOFs 纳米酶 (6-配位 Zr-MOF) 的异质性: 将 2.0 μmol 6-配位 Zr-MOFs 和 50 μL Gly-Gly 溶液 (40 mmol/L) 加入到 950 μL 水中, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育催化 3 h, 离心去除 6-配位 Zr-MOF, 并使剩余溶液进一步反应。

(4) Zr-MOFs 纳米酶 (6-配位 Zr-MOF) 的可重复使用性: 采用溶剂洗涤法进行再生^[23]。150 $^{\circ}\text{C}$ 真空条件下, 将 6-配位 Zr-MOF 活化 24 h, 继续用于催化反应。

(5) Zr-MOFs 纳米酶 (6-配位 Zr-MOF) 对 3 种蛋白质的水解: 将大豆蛋白、鱼糜蛋白和酪蛋白分别与 6-配位 Zr-MOF 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。于不同的时间间隔内, 采用 SDS-PAGE 分析 3 种蛋白质的分子量和水解产物。分离的条带用 Kemas Brilliant Blue R-250 染色。

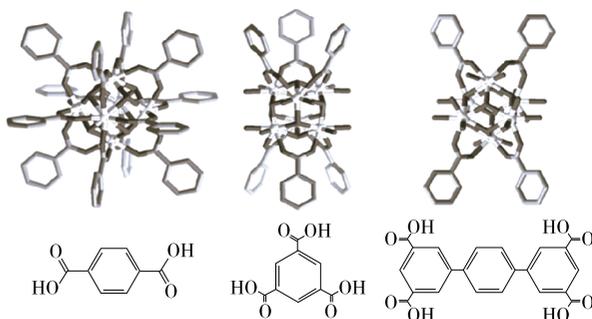
1.2.4 数据分析 每组数据 3 次重复, 利用 Origin 2017 软件处理数据与作图。

2 结果与分析

2.1 Zr-MOFs 纳米酶的特征

在聚四氟乙烯内胆中, 使用不同的有机羧酸作为连接剂, 与 Zr 团簇配位连接, 分别合成了 3 种 Zr-MOFs 纳米酶, 即 12/6/4-配位的 Zr-MOFs 纳米酶 (图 1)。

由图 2 和图 3 可知, 12-配位 Zr-MOF 纳米酶是一种具有光滑表面的规则球体, 直径为 100 nm; 6-配位



(a) 12-配位Zr-MOF (b) 6-配位Zr-MOF (c) 4-配位Zr-MOF
图 1 不同配位数的 Zr-MOFs 结构示意图

Figure 1 Structure diagram of Zr-MOFs with different coordinatively unsaturated sites

Zr-MOF 纳米酶是一种规则的八面体纳米材料, 直径为 2 μm ; 4-配位 Zr-MOF 纳米酶呈圆形, 直径为 150 nm, 与文献^[24-25]的结果一致。因此, 3 种 Zr-MOFs 被成功合成。

由图 4 可知, 3 种 Zr-MOFs 显示出典型的连接分子 (1,4-苯二甲酸、1,3,5-苯三羧酸和 [1,1';4',1''] 三联苯-3,3'',5,5''-四甲酸) 的振动光谱^[26]。661 cm^{-1} 处吸收峰为 Zr-O 拉伸振动特征峰, 反映了羧酸配体与锆金属中心的配位^[27]。<1 000 cm^{-1} 处吸收峰为芳香族苯环的=C—H 变形带的特征峰^[26]。1 400, 1 584 cm^{-1} 处分别为对苯二甲酸酯连接分子的对称和不对称的—CO₂ 伸展振动峰。3 398 cm^{-1} 处的宽波段是由于 O—H 拉伸振动的重叠^[28]。3 个 Zr-MOFs 在 1 070, 1 043, 1 015 cm^{-1} 处出现了不同的峰值, 可能是 CUSs 个数不同造成的。综上, Zr-MOFs 纳米酶具有不同的 CUSs 含量, 合成的 3 种 Zr-MOFs 纳米酶的 XRD 与文献^[22,29-30]的相符。在有缺陷的 Zr-MOFs 纳米酶的 XRD 图中出现了一个尖锐而薄的衍射峰 ($2^{\circ}\sim 15^{\circ}$), 表明在 Zr-MOFs 纳米酶的合成过程中使用不同的有机配体可以制备具有不同缺陷的 Zr-MOFs 纳米酶。因此, 3 种具有不同 CUSs 的 Zr-MOFs 纳米酶被成功制备。

2.2 Zr-MOFs 纳米酶的蛋白水解酶活性

由图 6(a) 可知, 6-配位 Zr-MOF 和 4-配位 Zr-MOF 纳米酶的蛋白水解酶活性明显高于 12-配位 Zr-MOF 的,

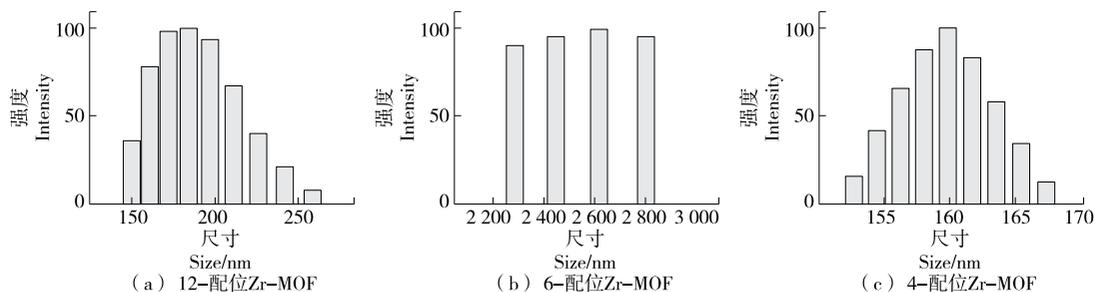


图 2 不同配位数的 Zr-MOFs 的水合粒径

Figure 2 Hydrodynamic size of Zr-MOFs with different coordinatively unsaturated sites

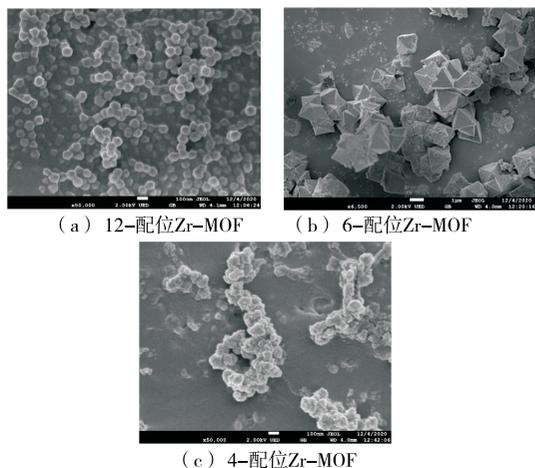


图3 不同配位数的 Zr-MOFs 的 SEM 图像
Figure 3 The SEM images of Zr-MOFs with different coordinatively unsaturated sites

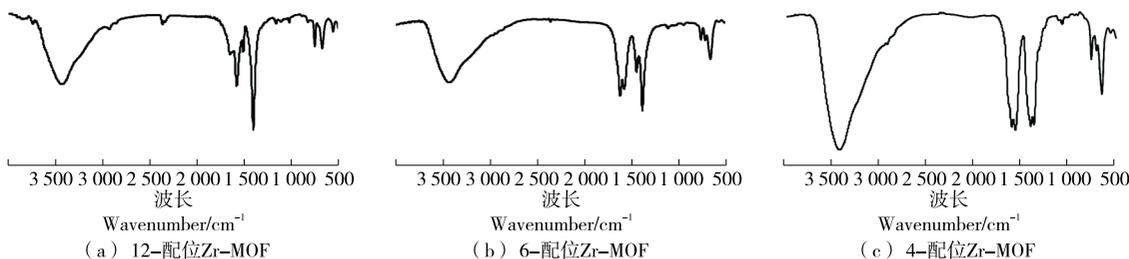


图4 不同配位数的 Zr-MOFs 的 FTIR 图像
Figure 4 The FTIR images of Zr-MOFs with different coordinatively unsaturated sites

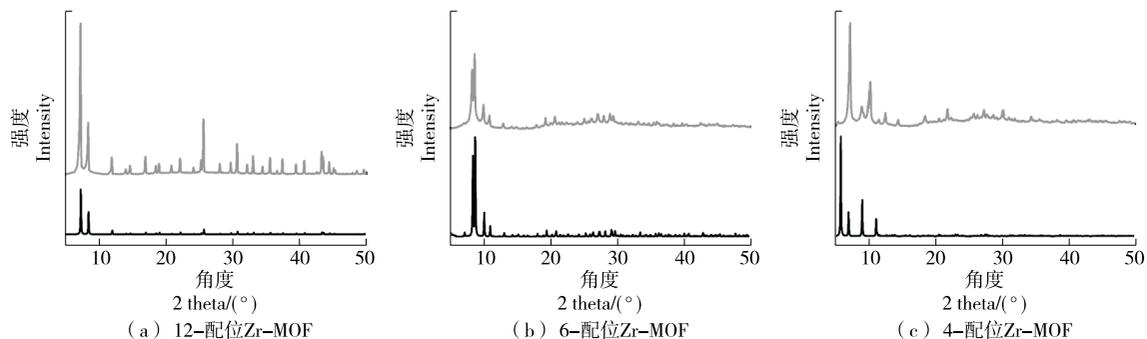


图5 不同配位数的 Zr-MOFs 的 XRD 图像
Figure 5 The XRD images of Zr-MOFs with different coordinatively unsaturated sites

由图 6(b) 可知,当从水解体系中去掉 6-配位 Zr-MOF 纳米酶后,双甘肽的水解率几乎不变,表明双甘肽不再被水解。该测试异质性的热过滤试验表明,在双甘肽水解体系中具有催化活性的是 6-配位 Zr-MOF 纳米酶。

由图 6(c) 可知,以 6-配位 Zr-MOF 纳米酶含量为横坐标,一阶反应速率常数为纵坐标绘制曲线,并由伪 Michaelis-Menten 模型 [式 (1)] 进行拟合。6-配位 Zr-MOF 纳米酶对双甘肽的水解反应符合 Michaelis 方程。当 6-配位 Zr-MOF 纳米酶含量为 4.0 μmol 时,水解

6-配位 Zr-MOF 对双甘肽的水解率达 52%,而 4-配位 Zr-MOF 和 12-配位 Zr-MOF 的水解率分别为 6.15%, 45.8%。天然蛋白酶通过 Zn²⁺ 裂解肽链而水解双甘肽^[31-32]。因此,Zr-MOF 的活性中心被认为是 CUSs。CUSs 模拟了 Zn²⁺ 在天然锌金属蛋白酶中的作用,更多的 CUSs 将有助于提高 Zr-MOF 纳米酶的水解性能。然而,4-配位 Zr-MOF 纳米酶的催化活性低于 6-配位 Zr-MOF 纳米酶的,是因为 4-配位 Zr-MOF 纳米酶的小孔尺寸阻碍了双甘肽与 CUSs 的结合^[22,33]。综上,6-配位 Zr-MOF 纳米酶对双甘肽的催化活性最高。

6-配位 Zr-MOF 纳米酶水解双甘肽的一阶反应速率常数为 2.64 × 10⁻⁵ s⁻¹,在没有 Zr-MOF 纳米酶存在的情况下,双甘肽的水解恒定速率为 7.4 × 10⁻⁹ s⁻¹^[34],表明使用 6-配位 Zr-MOF 纳米酶时,双甘肽的水解反应速率增加了 2.63 × 10³ 倍,说明 6-配位 Zr-MOF 对双甘肽具有较好的水解性能。

双甘肽的速率常数达到最大为 7.4 × 10⁻⁹ s⁻¹,说明使用 4.0 μmol 6-配位 Zr-MOF 可以实现良好的水解效果。

$$k_{obs} = \frac{k_{max} \times [MOF]}{K_M + [MOF]}, \tag{1}$$

式中:

k_{obs} —— 一阶反应速率常数;

k_{max} —— 最大反应速率常数;

[MOF] —— MOF 催化剂的浓度, mol/L;

K_M —— 米氏常数。

由图 6(d) 可知,在重复使用 5 次后, Gly-Gly 的转化

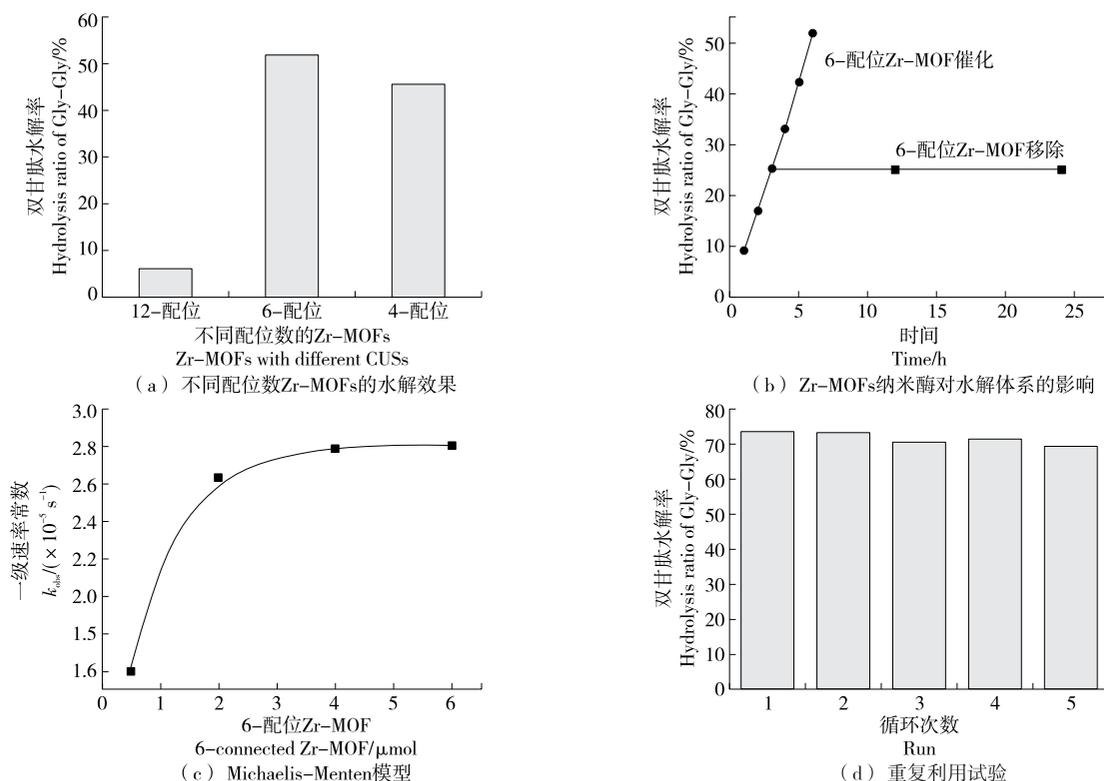


图 6 Zr-MOFs 纳米酶的蛋白水解酶活性

Figure 6 The studies of Zr-MOFs for hydrolyzing Gly

率未明显下降,说明 6-配位 Zr-MOF 的水解活性未受到较大影响,表明 6-配位 Zr-MOF 具有较高的稳定性,在实际应用中具有较大的重复利用潜力。

2.3 Zr-MOF 纳米酶水解蛋白质

由图 7 可知,随着水解时间的延长,3 种蛋白的条带逐渐变浅,表明 Zr-MOF 纳米酶可以同时水解 3 种蛋白质,展现出广泛的蛋白酶活性。Zr-MOF 纳米酶对大豆蛋白和鱼糜蛋白显示出较高的催化活性,对酪蛋白的催化活性较低。如图 7(a)所示,水解过程中没有低分子量 (<14.4 kDa)的条带,可能是由于 Zr-MOF 纳米酶将大豆蛋白的长肽水解为短肽。由于短链多肽容易从 SDS-PAGE 凝胶中漏出,所以无法被观察到。由图 7(b)可知,随着水解时间的延长,大豆蛋白的长肽条带逐渐变浅,短

肽条带逐渐变深,说明 Zr-MOF 纳米酶对鱼糜蛋白具有较好的水解效果。由图 7(c)可知,酪蛋白的长肽条带逐渐变浅,短肽条带逐渐变深,但变化不明显,表明 Zr-MOF 纳米酶可以催化大豆蛋白、鱼糜蛋白和酪蛋白水解,展现出广泛的蛋白酶活性,且对大豆蛋白和鱼糜蛋白显示出较高的催化活性。

3 结论

通过调节锆基金属有机框架的配位不饱和和金属位点制备了 3 种具有不同蛋白水解酶活性的纳米酶,证明了一种可以调节锆基金属有机框架纳米酶的蛋白水解酶活性的方法。以双甘肽水解率为指标,评估了具有不同配位不饱和金属位点的锆基金属有机框架纳米酶的蛋白水

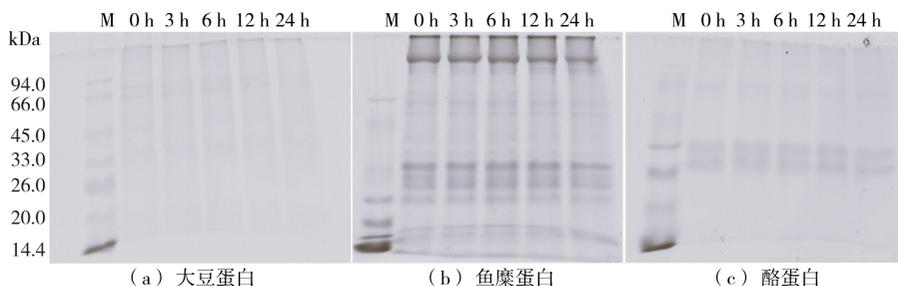


图 7 6-配位 Zr-MOF 水解 3 种蛋白质的 SDS-PAGE 图

Figure 7 SDS-PAGE diagram of hydrolyzed protein by the 6-connected Zr-MOF

解酶活性,其中 6-配位的锆基金属有机框架纳米酶对双甘肽的蛋白水解酶活性最高,对双甘肽的水解率达 52%,证实了锆基金属有机框架的蛋白酶活性可以通过调整配位不饱和金属位点而被提高,同时具有良好的异质性和可重复利用性。此外,锆基金属有机框架纳米酶可以分别水解 3 种常见的蛋白质(大豆蛋白、鱼糜蛋白和酪蛋白),展现出广泛的蛋白酶活性,表明锆基金属有机框架作为蛋白水解酶纳米酶具有较好的实际应用潜力。研究中蛋白催化水解温度较高,后续需进一步研究锆基金属有机框架纳米酶结构对催化温度的影响机理,以期降低锆基金属有机框架纳米酶高效水解蛋白时的温度。

参考文献

- [1] ADJIDJ R, BADIS A, MECHRI S, et al. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 114: 1 033-1 048.
- [2] 赵玉滨, 穆秋霞, 曲柳青, 等. 糖基化改性对酪蛋白酶解产物抗氧化活性的影响[J]. *食品与机械*, 2019, 35(10): 223-226.
ZHAO Y B, MU Q X, QU L Q, et al. Effects of glycosylation modification on the antioxidant activity of casein-enzymatic hydrolysate[J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(10): 223-226.
- [3] 唐雄, 陈茂龙, 许宙, 等. 钆金属有机框架的制备及用于吸附辛硫磷的研究[J]. *食品与机械*, 2019, 35(2): 37-41.
TANG X, CHEN M L, XU Z, et al. Preparation of gadolinium metal organic framework and its application for adsorption of phoxim[J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(2): 37-41.
- [4] ALAZAR-CEREZO S, KUN R S, DE VRIES R P, et al. CRISPR/Cas9 technology enables the development of the filamentous ascomycete fungus *Penicillium subrubescens* as a new industrial enzyme producer[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 133: 109463.
- [5] MU X Y, WANG J Y, LI Y H, et al. Redox trimetallic nanozyme with neutral environment preference for brain injury[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(2): 1 884.
- [6] WANG Y, LI H, GUO L, et al. A cobalt-doped iron oxide nanozyme as a highly active peroxidase for renal tumor catalytic therapy[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(33): 18 815-18 822.
- [7] YANG Y, ZHU D, LIU Y, et al. Platinum-carbon-integrated nanozymes for enhanced tumor photodynamic and photothermal therapy[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(25): 13 548-13 557.
- [8] LOOSEN A, DE AZAMBUJA F, SMOLDERS S, et al. Interplay between structural parameters and reactivity of Zr₆-based MOFs as artificial proteases[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(26): 6 662-6 669.
- [9] WEZYNFELD N E, FRACZYK T, BAL W. Metal assisted peptide bond hydrolysis: Chemistry, biotechnology and toxicological implications [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2016, 327/328: 166-187.
- [10] MOONS J, DE AZAMBUJA F, MIHAILOVIC J, et al. Discrete Hf₁₈ metal-oxo cluster as a heterogeneous nanozyme for site-specific proteolysis[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2020, 59(23): 9 094-9 101.
- [11] HUANG Y B, LIANG J, WANG X S, et al. Multifunctional metal-organic framework catalysts: Synergistic catalysis and tandem reactions[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(1): 126-157.
- [12] KATZ M J, MONDLOCH J E, TOTTEEN R K, et al. Simple and compelling biomimetic metal-organic framework catalyst for the degradation of nerve agent simulants [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2014, 53(2): 497-501.
- [13] DE KONING M C, VAN GROL M, BREIJAERT T. Degradation of paraoxon and the chemical warfare agents VX, tabun, and soman by the metal-organic frameworks UiO-66-NH₂, MOF-808, NU-1000, and PCN-777[J]. *Inorganic Chemistry*, 2017, 56(19): 11 804-11 809.
- [14] KALAJ M, PALOMBA J M, BENTZ K C, et al. Multiple functional groups in UiO-66 improve chemical warfare agent simulant degradation[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(37): 5 367-5 370.
- [15] LOOSEN A, SIMMS C, SMOLDERS S, et al. Bimetallic Ce/Zr UiO-66 metal-organic framework nanostructures as peptidase and oxidase nanozymes[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2021, 4(6): 5 748-5 757.
- [16] DE AZAMBUJA F, LOOSEN A, CONIC D, et al. En route to a heterogeneous catalytic direct peptide bond formation by Zr-based metal-organic framework catalysts [J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(13): 7 647-7 658.
- [17] LY H G T, FU G X, DE AZAMBUJA F, et al. Nanozymatic activity of UiO-66 metal-organic frameworks: Tuning the nanopore environment enhances hydrolytic activity toward peptide bonds[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2020, 3(9): 8 931-8 938.
- [18] DISSEGNA S, EPP K, HEINZ W R, et al. Defective metal-organic frameworks[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(37): e1704501.
- [19] GUO H, SU S, LIU Y, et al. Enhanced catalytic activity of MIL-101 (Fe) with coordinatively unsaturated sites for activating persulfate to degrade organic pollutants[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(14): 17 194-17 204.
- [20] KIRLIKOVALI K O, CHEN Z J, ISLAMOGLU T, et al. Zirconium-based metal-organic frameworks for the catalytic hydrolysis of organophosphorus nerve agents [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(13): 14 702-14 720.
- [21] MOON S Y, LIU Y, HUPP J T, et al. Instantaneous hydrolysis of nerve-agent simulants with a six-connected zirconium-based metal-organic framework [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2015, 54(23): 6 795.
- [22] ZHANG Y, ZHANG X, LYU J, et al. A flexible metal-organic framework with 4-connected Zr₆ nodes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(36): 11 179-11 183.
- [23] LY H G T, FU G, KONDINSKI A, et al. Superactivity of MOF-808 toward peptide bond hydrolysis [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(20): 6 325-6 335.
- [24] LI J, JIANG X, ZHU M, et al. Cu(II) anchoring in MOF-808 as a stable catalyst in ultra-deep oxidation desulfurization [J]. *Fuel*, 2023, 341: 127674.

(下转第 25 页)

- [15] HYDE J, GORHAM C, BRACKNEY D E, et al. Antibiotic resistant bacteria and commensal fungi are common and conserved in the mosquito microbiome[J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0218907.
- [16] LEHMAN M. Assessment of antibiotic resistant commensal bacteria in food[D]. Columbus: Ohio State University, 2006: 27.
- [17] BLLMANN J, MARTIENSSEN M. Comparison of different media for the detection of denitrifying and nitrate reducing bacteria in mesotrophic aquatic environments by the most probable number method[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2020, 168: 105808.
- [18] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求: GB 4789.28—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 14.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National standard for food safety: Quality requirements for culture media and reagents for microbiological examination of food: GB 4789. 28—2013 [S]. Beijing: China Standards Press, 2013: 14.
- [19] 国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-2.
- State Food and Drug Administration, National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National standard for food safety: Microbiological examination of food: Determination of total bacterial count: GB 4789. 2—2016 [S]. Beijing: China Standards Press, 2016: 1-2.
- [20] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. *Embnet Journal*, 2011, 17(1): 10-12.
- [21] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [22] 邵毅, 姚春霞, 黄柳娟, 等. 冷鲜鸡肉表面四环素和磺胺耐药菌的菌群多样性分析[J]. *农业工程学报*, 2019, 35(17): 301-308.
- SHAO Y, YAO C X, HUANG L J, et al. Diversity of tetracycline-and-sulfamethoxazole-resistant bacteria on surface of cold fresh chicken[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2019, 35(17): 301-308.
- [23] 黄柳娟, 冯博, 刘海燕, 等. 冷鲜鸡肉表面及内部细菌菌群的多样性分析[J]. *上海农业学报*, 2021, 37(1): 104-109.
- HUANG L J, FENG B, LIU H Y, et al. Diversity of bacterial flora in surface and internal tissue of cold fresh chicken [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2021, 37(1): 104-109.
- [24] ROSSI F, RIZZOTTI L, FELIS G E, et al. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge and future perspective[J]. *Food Microbiology*, 2014, 42(1): 232-243.
- [25] YAMAMOTO K, TOYA S, SABIDI S, et al. Diluted Luria-Bertani medium vs. sewage sludge as growth media: Comparison of community structure and diversity in the culturable bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105: 3 787-3 798.
- [26] LOCEY K J, LENNON J T. Scaling laws predict global microbial diversity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113: 5 970-5 975.
- [27] SUN J, GUO J, YANG Q, et al. Diluted conventional media improve the microbial cultivability from aquarium seawater [J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 57(9): 759-768.
- [28] CHAUDHARY D K, KHULAN A, KIM J. Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6 666.
-
- (上接第 17 页)
- [25] YUAN H, LI J, PAN L, et al. Particulate toxicity of metal-organic framework UiO-66 to white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 247: 114275.
- [26] SUN Y, HARLOFF J, KOSSLICK H, et al. Influence of the framework on the catalytic performance of Rh-supported Zr-MOFs in the hydroformylation of n-alkenes[J]. *Molecular Catalysis*, 2022, 517: 112005.
- [27] CHEN J, OUYANG J, CHEN W, et al. Fabrication and adsorption mechanism of chitosan/Zr-MOF (UiO-66) composite foams for efficient removal of ketoprofen from aqueous solution[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 431: 134045.
- [28] WANG F, CHEN Z, CHEN H, et al. Interplay of lewis and bronsted acid sites in Zr-based metal-organic frameworks for efficient esterification of biomass-derived levulinic acid[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(35): 32 090-32 096.
- [29] CAVKA J H, JAKOBSEN S, OLSBYE U, et al. A new zirconium inorganic building brick forming metal organic frameworks with exceptional stability[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(42): 13 850-13 851.
- [30] FURUKAWA H, GANDARA F, ZHANG Y B, et al. Water adsorption in porous metal-organic frameworks and related materials[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(11): 4 369.
- [31] MONDAL T, MANDAL B. Engineered peptidic constructs metabolize amyloid beta by self-assembly-driven reactions [J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(34): 4 933-4 936.
- [32] FISCHER T, RIEDL R. Inhibitory antibodies designed for matrix metalloproteinase modulation[J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2 265.
- [33] CHEN S, HUA Y, DAI L, et al. High proton conductivity of MOF-808 promotes methane production in anaerobic digestion[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(4): 1 419-1 429.
- [34] RADZICKA A, WOLFENDEN R. Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(26): 6 105-6 109.