

陶瓷膜表面固定化脂肪酶的研究

刘 静, 高能文*

重庆理工大学化学化工学院, 重庆

收稿日期: 2023年2月28日; 录用日期: 2023年3月22日; 发布日期: 2023年3月29日

摘 要

本文利用(3-氨丙基)-三乙氧基硅烷(APTES)和甲基三甲氧基硅烷(MTMS)对片状陶瓷膜进行改性,再使用戊二醛(GA)交联得到陶瓷复合膜。最后,将脂肪酶固定在该陶瓷复合膜上,制备得到酶膜反应器。通过傅里叶变换红外光谱仪和X射线光电子能谱仪对样品进行表征。确定固定化的最佳条件为: APTES和MTMS浓度均为0.1 M、GA浓度为2%、固定化时间为3 h。固定化酶的最适操作pH值和温度分别为7、55°C。此外,固定化的酶具有较好的热稳定性和可重复使用性。

关键词

硅烷改性, 脂肪酶, 化学交联法, 固定化, 酶膜反应器

Research on Immobilization of Lipase on Ceramic Membrane Surface

Jing Liu, Nengwen Gao*

College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing

Received: Feb. 28th, 2023; accepted: Mar. 22nd, 2023; published: Mar. 29th, 2023

Abstract

In this paper, ceramic planar membranes were modified with (3-aminopropyl)-triethoxysilane (APTES) and methyltrimethoxysilane (MTMS), and then cross-linked with the glutaraldehyde (GA) to obtain ceramic composite membranes. Finally, lipases were immobilized on these ceramic composite membranes to prepare the enzyme membrane reactor. The samples were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. The optimal conditions for immobilization were determined as follows: APTES and MTMS concentrations of 0.1 M,

*通讯作者。

GA concentration of 2%, and immobilization time of 3 h. The optimum operating pH and temperature of the immobilized enzyme were 7 and 55°C, respectively. In addition, the immobilized enzyme had better thermal stability and reusability.

Keywords

Silane Modification, Lipase, Chemical Cross-Linking Method, Immobilization, Enzyme Membrane Reactor

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

脂肪酶,既能水解酯,又能合成酯,具有选择性专一、反应条件温和、绿色无污染的特点[1]。此外,脂肪酶因其特殊的蛋白质结构,在面对疏水界面时,能够诱导蛋白质构象重排,使脂肪酶处于“开放状态”,从而使底物更容易与酶结合,提高了酶的活力,这种功能被称为“界面活化”[2]。但游离脂肪酶性能不稳定、价格昂贵、回收较困难,增加了工业生产的成本,其在工业中的应用受到限制。

为解决上述问题,提出将脂肪酶固定化的概念,常用的酶固定化方法主要有:物理吸附、化学交联、共价结合、包埋法等[3]。固定化后的酶在食品行业、对映体拆分[4]、生物柴油的生产[5]、二氧化碳的捕获[6]以及环境问题的处理方面展现了巨大的优势[7]。酶固定化技术不仅解决了酶的回收问题、降低操作成本,还拓宽了酶的应用领域。

此外,在选择合适的固定化方法的基础上选择合适的载体材料,能够进一步地提高固定化酶的活力。当前普遍使用的载体材料有:介孔无机材料[8]、陶瓷材料[9][10]、有机膜[11]、有机金属框架[12]、纳米材料[6]、氧化石墨烯[13]等。其中,1966年,酶膜反应器被提出,这一设计的提出实现了膜分离和酶催化的结合。酶膜反应器能及时移除酶促反应的产物,降低产物抑制,并且也避免了副产物的产生,大大提高了酶促反应的效率[14]。因此,本研究通过 APTES/MTMS 改性陶瓷超滤膜后,交联戊二醛(GA),制备得到一种陶瓷复合膜,最后将脂肪酶固定在该陶瓷复合膜上,制备了一种酶膜反应器(EMR),优化了制备条件,并研究了酶膜反应器的性能。该酶膜反应器的制备原理如图 1 所示。

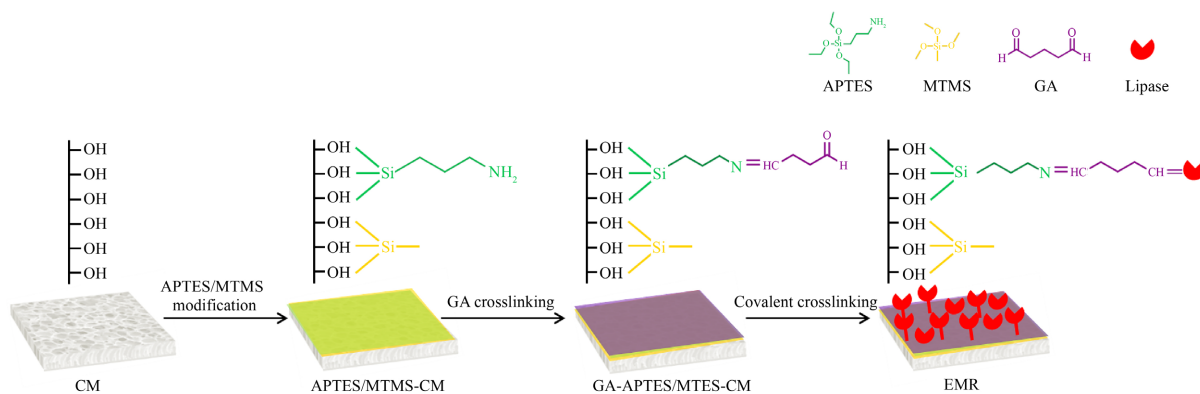


Figure 1. Schematic diagram of the preparation of enzyme membrane reactor

图 1. 酶膜反应器的制备原理图

2. 材料与方法

2.1. 材料

GA 购自成都科隆化学品有限公司, (3-氨丙基)三乙氧基硅烷(APTES)、甲基三甲氧基硅烷(MTMS)与考马斯亮蓝 G250 均购自国药集团化学试剂有限公司, 假丝酵母脂肪酶(CRL)购自北京索莱宝科技有限公司, 牛血清蛋白(BSA)购自上海阿拉丁试剂有限公司, 三乙酸甘油酯(TA)购自上海阿达玛斯试剂有限公司。所有化学品均为分析级化学品, 无需进一步纯化。

2.2. 方法

2.2.1. 陶瓷膜的硅烷改性

将氧化铝陶瓷膜用去离子水活化 2 h, 然后在 50℃真空干燥箱中干燥 2.5 h, 得到羟基活化的陶瓷膜(CM); 称取一定量的(3-氨丙基)三乙氧基硅烷(APTES)和甲基三甲氧基硅烷(MTMS)溶解在无水乙醇中, 配制得到一定浓度的硅烷混合溶液。将活化后的陶瓷膜浸泡在配制的混合硅烷溶液中, 在恒温振荡箱中振荡 2 h, 用无水乙醇去除未反应完全的硅烷试剂。随后, 将清洗后的膜在 50℃真空干燥箱中烘干 2.5 h, 取出冷却至室温, 得到改性后的陶瓷膜(APTES/MTMS-CM), 通过接触角测量仪测定膜的亲疏水性。

2.2.2. 脂肪酶的固定化

配制一定体积浓度的 GA 溶液, 将复合陶瓷膜浸泡在 GA 溶液中 1 h, 取出后, 用缓冲液去除未反应的 GA, 在 50℃真空干燥箱中烘干 2.5 h, 冷却至室温, 得到交联后的复合陶瓷膜(GA-APTES/MTMS-CM)。称取一定量的脂肪酶粉末, 溶解于磷酸缓冲溶液(PBS, pH 7, 0.05 M), 搅拌 1 h, 后在 4000 r/min 离心机中离心 5 min, 将得到的复合陶瓷膜浸泡在脂肪酶溶液中进行固定化, 测定脂肪酶的负载量和固定化脂肪酶的活力。

2.2.3. 脂肪酶负载量和脂肪酶活力的测定

脂肪酶是一种蛋白质酶, 可采用 Bradford 法[15]测定脂肪酶的负载量, 以牛血清蛋白为标准蛋白, 制作标准曲线, 得到标准曲线为: $y = 4.59 + 0.6816x$, $R^2 = 0.9996$ 。使用紫外分光光度计在 595 nm 时测定脂肪酶溶液的吸光度, 计算脂肪酶的负载量。计算公式: 脂肪酶负载量(WOL, mg):

$$WOL = 1 - \frac{C_t \times V_t}{C_0 \times V_0} \quad (1)$$

式中, C_0 、 V_0 分别为过滤前酶溶液的初始浓度(mg/mL)和初始体积(mL); C_t 、 V_t 分别为过滤后酶溶液的最终浓度(mg/mL)和最终体积(mL)。

脂肪酶活性测定是以三乙酸甘油酯为底物, 用酶将其水解为脂肪酸和甘油, 通过测定其生成的脂肪酸的量, 评价酶的活力。一个酶活力单位定义为: 在一定条件下, 水解三乙酸甘油酯, 每分钟生成 1 μ mL 脂肪酸所需的酶量。计算公式: 酶活力(EA, U/mg):

$$EA = \frac{C_i \times V_i}{t \times m} \times 1000 \quad (2)$$

式中, C_i 、 V_i 分别为滴定时需要的氢氧化钠溶液的浓度(M)和体积(mL); 1000 为换算系数; t 为催化降解的反应时间(min); m 为固定化酶的量(mg)。以最高酶活力为参照, 定义为 100%, 以某一次的酶活力与参照酶活力的百分比来计算其他条件下的残留酶活力。

2.2.4. 材料的表征

采用傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)和 X 射线光电子能谱仪(XPS)表征膜表面化学组成; 采用热重分析

仪(TGA)和 X 射线衍射仪(XRD)分析膜固定化前后材料的热性能和理化性能。

3. 结果与讨论

3.1. 表征分析

图 2 为膜表面的 FTIR 结果图。图 2(b)中, 在 3440 cm^{-1} 处出现的峰是 APTES 烷烃 N-H 键发生拉伸振动引起的, 而在 2920 cm^{-1} , 2849 cm^{-1} , 1396 cm^{-1} 处出现的三个峰均为 APTES 和 MTMS 烷烃侧链中 C-H 的伸缩振动, 在 $1046\sim 1140\text{ cm}^{-1}$ 处的宽峰和 414 cm^{-1} 处的峰均为 Si-O 键的拉伸振动[16] [17], 结果表明, 硅烷试剂对膜的成功改性。图 2(c)中, 在 1637 cm^{-1} 处出现的峰为戊二醛中与 APTES 发生酰胺反应生成 C=N 键的特征峰, 表明 GA 的成功交联。图 2(d)中, 在 3443 cm^{-1} 处的峰是酶分子中 O-H 键拉伸振动的特征峰, 而在 1642 cm^{-1} 出现的峰为戊二醛和酶分子发生酰胺反应生成 C=N 键的特征峰[18], 表明脂肪酶被成功固定在膜上。

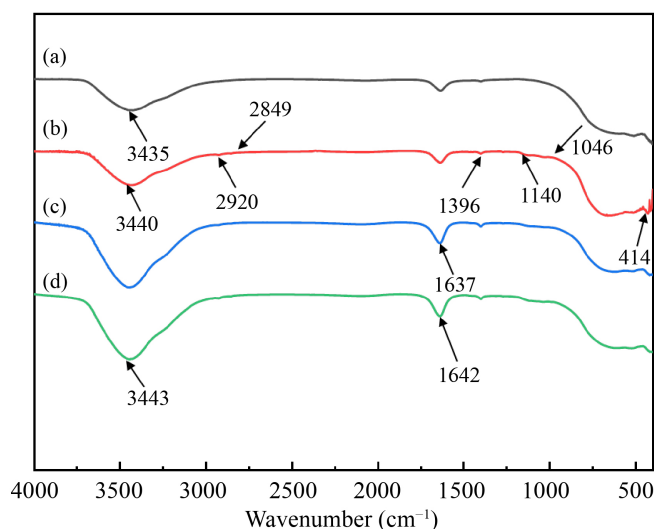


Figure 2. FTIR analysis diagram of membrane surface: (a) CM; (b) APTES/MTMS-CM; (c) GA-APTES/MTMS-CM; (d) EMR

图 2. 膜表面的 FTIR 分析图: (a) CM; (b) APTES/MTMS-CM; (c) GA-APTES/MTMS-CM; (d) EMR

图 3 为 XPS 全谱图。在硅烷改性陶瓷膜后, 即在图 3 A/M-CM 上, 100 eV 处出现的峰属于 Si2p, 此时硅烷与陶瓷膜上的羟基发生反应形成 Si-O 键, 使硅烷改性膜上成功带有 Si 元素, 因此 Si 元素的出现表明硅烷的成功改性。此外, APTES 改性时, 膜上还应有 N 元素, 但此时可能 N 元素含量少, 形成的键的峰也弱, 所以未明显看见。在图 3 EMR 材料上, 400 eV 处出现的峰, 属于 N1s。在脂肪酶固定化时, 脂肪酶带有的氨基基团与醛基反应, 形成酰胺键, 使膜上带有 N 元素, 这表明脂肪酶在复合膜上的成功固定化。

图 4(a)、图 4(b)分别为对陶瓷空白膜(CM)和酶膜反应器(EMR)进行 TGA 和 XRD 表征的结果图。在图 4(a)中, CM 随温度变化, 质量损失较少, 但是 EMR 随温度升高, 出现了三个质量损失: $0\sim 60^\circ\text{C}$, 失重 12%, 可能是 EMR 上吸附的水被蒸发[19]; $60\sim 270^\circ\text{C}$, 失重率为 5%, 此时膜表面的 APTES/MTMS 和 GA 可能被降解[20]; $270\sim 510^\circ\text{C}$, 失重率为 4%, 此时可能固定化的脂肪酶被降解[21]。图 4(b)中的 XRD 结果图表明, 脂肪酶进行固定化的过程对膜的理化结构无明显变化, 没有产生额外晶体物质[22]。

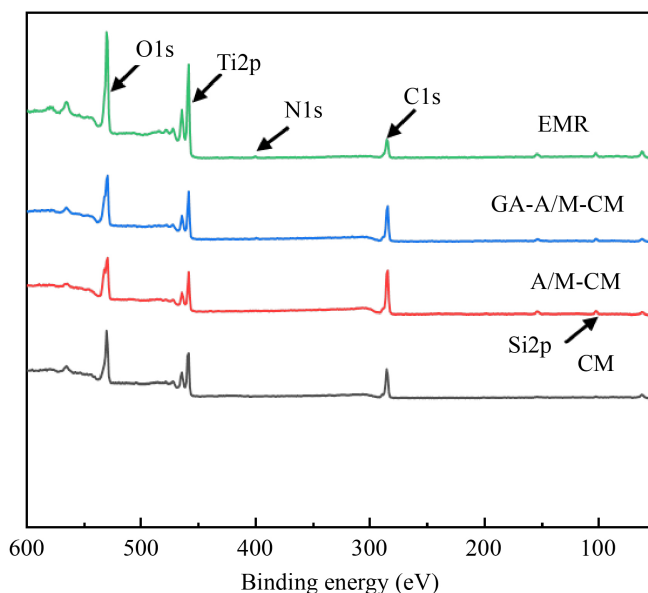


Figure 3. XPS full spectrum of membrane surface
图 3. 膜表面的 XPS 全谱图

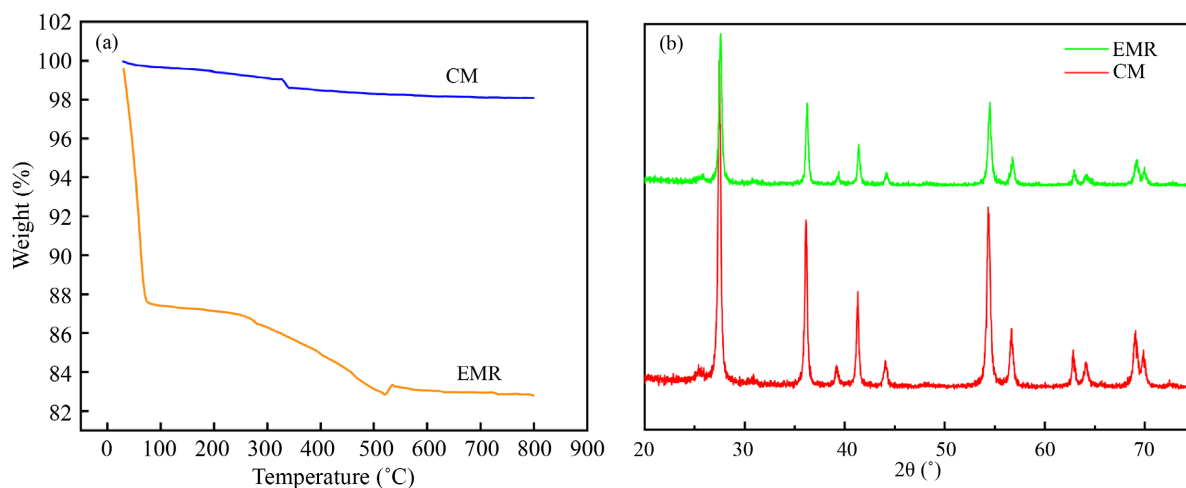


Figure 4. (a) TGA analysis diagram before and after membrane immobilization of the enzyme; (b) XRD analysis diagram before and after membrane immobilization of the enzyme

图 4. (a) 膜固定化酶前后的 TGA 分析图; (b) 膜固定化酶前后的 XRD 分析图

3.2. 酶固定化条件的优化

硅烷是一种常用的改性陶瓷膜的试剂, 它能与陶瓷膜上存在的羟基反应, 使硅烷结合在膜上。使用 APTES 和 MTMS 对膜进行改性, 不仅将膜进行胺化, 同时也使膜的接触角增大、疏水性增强, 将脂肪酶固定在膜上后, 能使固定化脂肪酶产生界面激活, 打开酶的活性中心, 从而增大脂肪酶的活力。图 5(a) 中, 结果表明选择浓度均为 0.1 M 的 APTES 和 MTMS 改性陶瓷膜, 能使陶瓷膜的疏水性明显增大, 因此选择 APTES 和 MTMS 浓度为 0.1 M 时为最佳改性浓度。

交联剂 GA 与膜上的氨基反应, 另外又为酶的固定化提供作用位点, 但是 GA 对酶的结构也有一定的损伤, 所以需要选择合适的浓度进行交联。图 5(b)中, 在交联剂浓度为 2% 时, 此时固定化酶的活力最

高, 低浓度的 GA 为酶的固定化提供的反应位点较少, 最终酶膜反应器表现的活力降低, 高浓度的 GA 会导致酶的空间结构改变, 进而使酶活力降低。

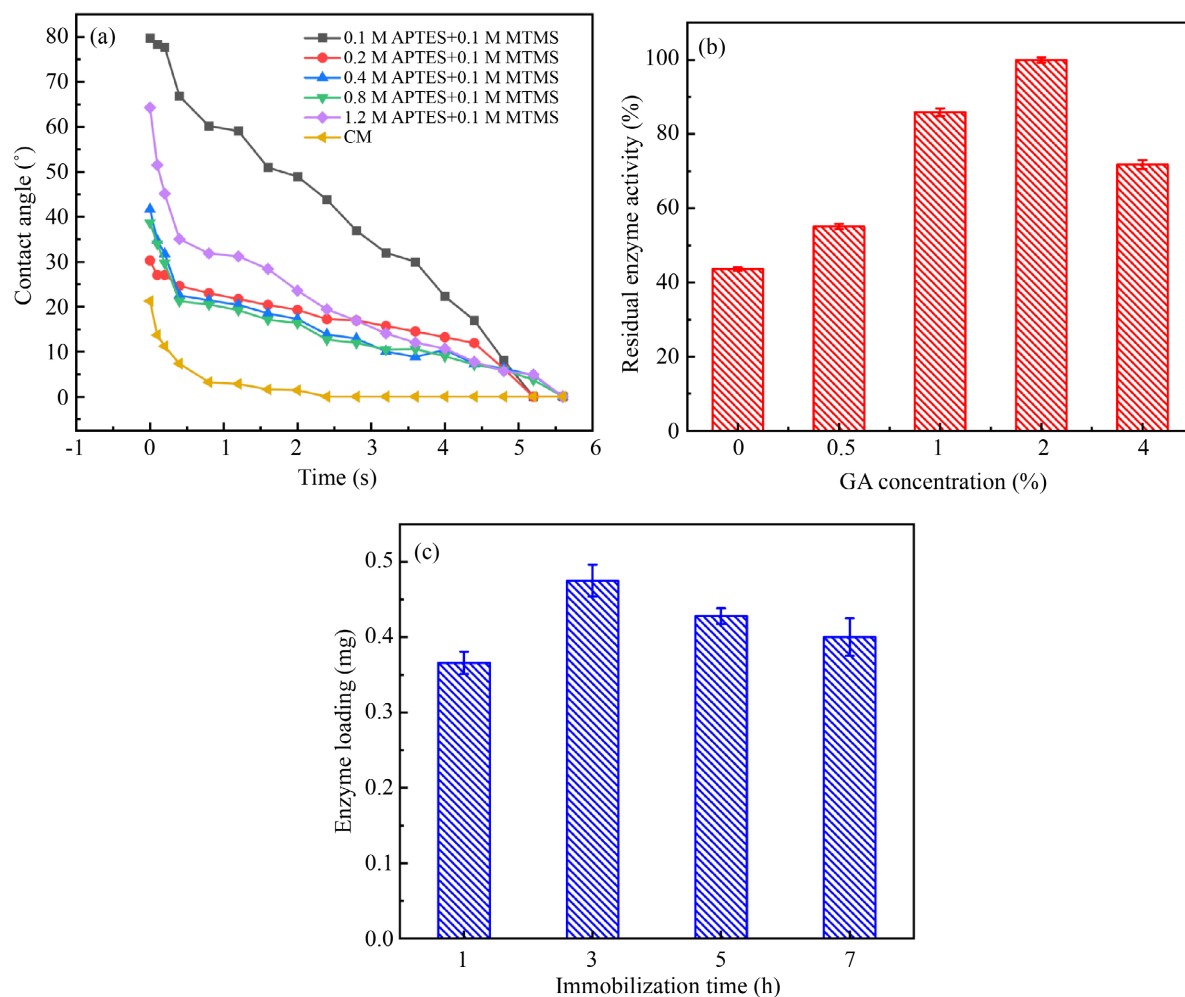


Figure 5. (a) Effect of silane modification on membrane hydrophobicity; (b) Effect of GA concentration on the activity of immobilized enzymes; (c) Effect of immobilization time on enzyme loading

图 5. (a) 硅烷改性对膜亲疏水性的影响; (b) GA 浓度对固定化酶活力的影响; (c) 固定化时间对酶负载量的影响

酶在固定化过程中存在酶的解吸和吸附, 当吸附和解吸达到平衡时, 酶的固定化效果最好。图 5(c) 中, 酶的固定化量随时间增加而增加, 在固定化时间为 3 h 后, 酶的固定化量达到最大。此后, 随着固定化时间增加, 酶固定化量降低, 此时先固定化的酶可能发生流失。

3.3. 酶的催化条件的优化

脂肪酶是一种蛋白质, pH 会对蛋白质表面的电荷以及解离基团造成影响。当酶进行固定化时, 固定的载体与酶之间会存在相互作用力或生成化学键, 这样就对酶的结构形成了一定的保护作用。图 6(a) 结果表明, 固定化酶和游离酶在 pH 为 7 时, 酶活力最大, 但是固定化酶在其他 pH 值下残留的酶活力更高, 这可归因于固定化操作对酶的结构的保护。

酶催化反应的本质是利用酶的活性中心与底物结合, 催化底物的降解, 而酶的结构易受温度的影响,

温度可能会造成酶的活性中心的遮蔽或者活性中心的过度暴露。图 6(b)中, 游离酶在 35℃时, 酶活力最高, 而固定化酶在 55℃时, 酶活力最好, 结果表明, 固定化的脂肪酶对温度的耐受性明显提高, 这可能是由于固定化操作对酶的结构具有一定的保护作用。

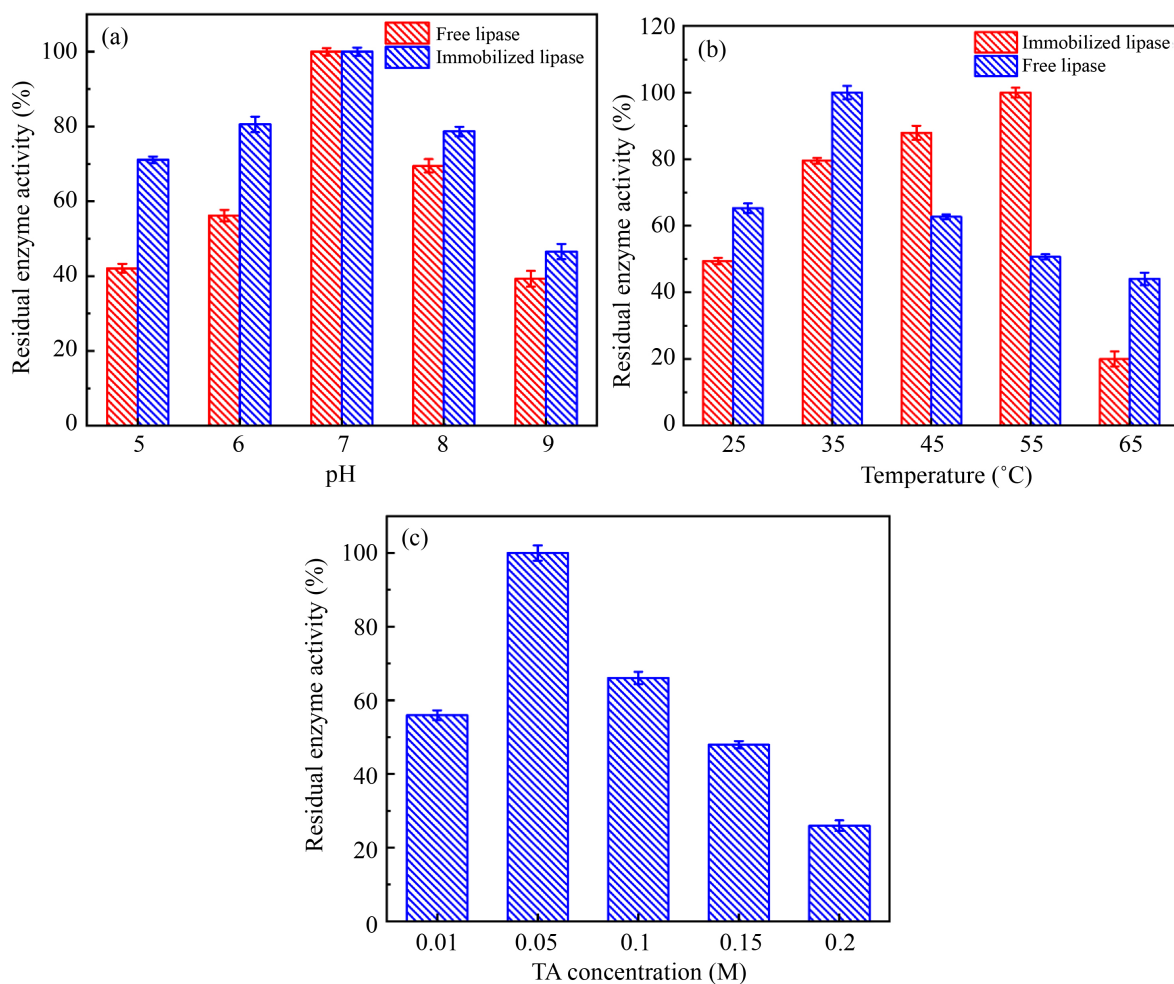


Figure 6. (a) Effect of pH on the activity of free and immobilized enzymes; (b) Effect of temperature on the activity of free and immobilized enzymes; (c) Effect of TA concentration on the activity of free and immobilized enzymes

图 6. (a) pH 对游离酶和固定化酶活力的影响; (b) 温度对游离酶和固定化酶活力的影响; (c) TA 浓度对固定化酶活力的影响

酶催化底物受底物浓度的影响, 首先底物浓度太高, 渗透过膜时存在浓差极化的影响, 其次底物浓度太高会影响酶活性中心的打开。图 6(c)结果显示, 当 TA 浓度低于 0.05 M 时, 酶活力随 TA 浓度的增加而增大, 当 TA 浓度超过 0.05 M 时, 酶活力逐渐减小, 所以低浓度和高浓度的 TA 都不利于酶的催化。

3.3. 固定化酶热稳定性和重复使用性的测试

将脂肪酶固定在空白陶瓷膜上得到酶膜反应器(L-CM), 探究 L-CM 和采用化学交联法制备的酶膜反应器(EMR)的热稳定性, 实验结果如图 7(a)所示。在 55℃孵育 120 min, 直接吸附在空白陶瓷膜上的酶其活力在 30 min 后就很大程度地降低了, 而使用化学交联法制备的 EMR 在 120 min 后还有将近 50%的残留酶活力, 这表明化学交联法制备的酶膜反应器具有较好的热稳定性。出现此结果的原因可能是, 在脂

肪酶的固定化过程中, 酶与载体膜之间形成的化学键或作用力对酶的空间结构有一定的保护作用, 所以能增加酶对温度的耐受性, 最终使制备的酶膜反应器具有较好的热稳定性。

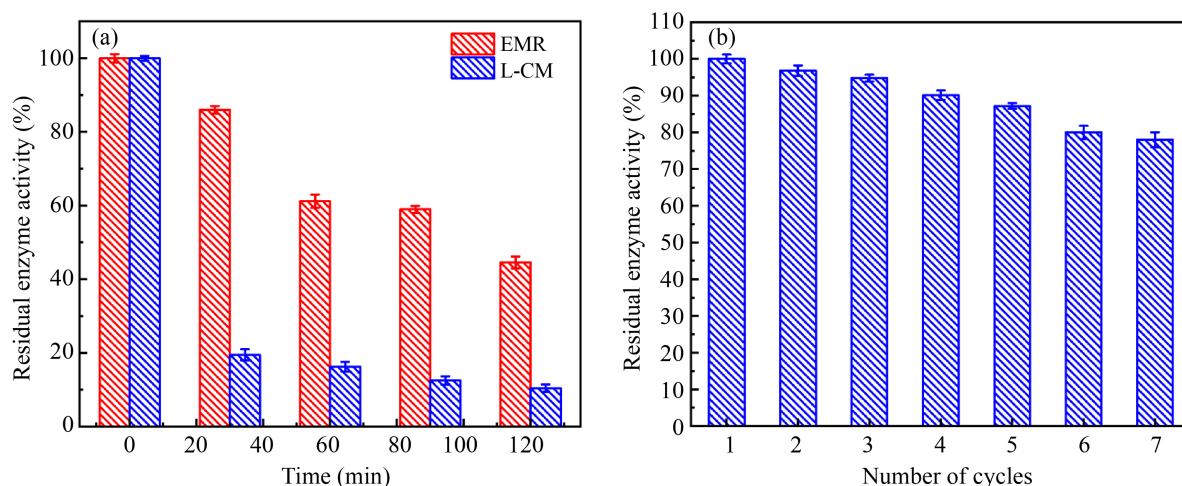


Figure 7. (a) Thermal stability of immobilized enzymes; (b) Reusability of immobilized enzymes

图 7. (a) 固定化酶的热稳定性; (b) 固定化酶的重复使用性

对制备的 EMR 进行重复使用性的探究, 其结果如图 7(b)所示。在重复催化 TA 降解的过程中, 固定化的酶具有较好的稳定性, 在循环催化降解 7 次后, EMR 仍然残留将近 80% 的初始酶活力。这可归因于脂肪酶固定化过程中形成的酰胺键有关。另外, 脂肪酶是一种疏水性蛋白质, 膜被硅烷改性后, 疏水性增加, 酶与改性膜之间存在疏水相互作用力和其他的分子间作用力。因此, 化学交联法固定的酶, 在长期的使用中, 具有较大的发展前途。

4. 总结

以片状陶瓷膜为载体, 利用 APTES 和 MTMS 对陶瓷膜进行胺化和疏水改性, 随后使用交联剂 GA 将脂肪酶固定在复合陶瓷膜上。确定最佳的固定化条件: 硅烷浓度为 0.1 M 的 APTES 和 MTMS、GA 浓度为 2%、固定化时间为 3 h。固定化酶的最适操作 pH 值为 7, 最适操作温度为 55℃, 最佳底物 TA 浓度为 0.05 M。固定化后的酶具有较好的热稳定性, 在 55℃ 条件下保温 120 min 后, 仍然残留约 50% 的酶活力, 且固定化后的酶具有较好的重复使用性, 在循环 7 次后, 仍然残留约 80% 的酶活力。由此可见, 酶的化学交联固定化方法能显著提高酶对温度的耐受性和重复使用性。

基金项目

国家自然科学基金项目: 贻贝仿生法制备陶瓷复合纳滤膜及其性能研究(No. 21606029)。

参考文献

- [1] Yu, X.W., Xu, Y. and Xiao, R. (2016) Lipases from the Genus *Rhizopus*: Characteristics, Expression, Protein Engineering and Application. *Progress in Lipid Research*, **64**, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.08.001>
- [2] Jin, Q., et al. (2018) Silica Nanowires with Tunable Hydrophobicity for Lipase Immobilization and Biocatalytic Membrane Assembly. *Journal of Colloid and Interface Science*, **531**, 555-563. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.07.035>
- [3] Luo, J., et al. (2020) Biocatalytic Membrane: Go Far beyond Enzyme Immobilization. *Engineering in Life Sciences*, **20**, 441-450. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000018>
- [4] Bhushan, I., et al. (2018) Enantioselective Resolution of 2-Arylpropionic Acid Derivatives Employing Immobilization

- of Lipase from *Bacillus Subtilis* Strain Kakrayal_1 (BSK-L). *Bioresource Technology*, **269**, 581-585. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.123>
- [5] Marín-Suárez, M., *et al.* (2019) Reuse of Immobilized Lipases in the Transesterification of Waste Fish Oil for the Production of Biodiesel. *Renewable Energy*, **140**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.035>
- [6] Luo, J., *et al.* (2015) Cascade Catalysis in Membranes with Enzyme Immobilization for Multi-Enzymatic Conversion of CO₂ to Methanol. *New Biotechnology*, **32**, 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.006>
- [7] DiCosimo, R., *et al.* (2013) Industrial Use of Immobilized Enzymes. *Chemical Society Reviews*, **42**, 6437-6474. <https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>
- [8] Gao, J., *et al.* (2017) Dopamine-Functionalized Mesoporous Onion-Like Silica as a New Matrix for Immobilization of Lipase *Candida* sp. 99-125. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 40395. <https://doi.org/10.1038/srep40395>
- [9] Cen, Y.K., *et al.* (2019) Immobilization of Enzymes in/on Membranes and Their Applications. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **361**, 5500-5515. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900439>
- [10] Gao, J., *et al.* (2015) Immobilized Lipase on Porous Ceramic Monoliths for the Production of Sugar-Derived Oil Gelling Agent. *RSC Advances*, **5**, 68601-68609. <https://doi.org/10.1039/C5RA10570F>
- [11] Aghababaie, M., *et al.* (2018) Novel Approaches to Immobilize *Candida Rugosa* Lipase on Nanocomposite Membranes Prepared by Covalent Attachment of Magnetic Nanoparticles on Poly Acrylonitrile Membrane. *RSC Advances*, **8**, 4561-4570. <https://doi.org/10.1039/C7RA11866J>
- [12] Feng, D., *et al.* (2015) Stable Metal-Organic Frameworks Containing Single-Molecule Traps for Enzyme Encapsulation. *Nature Communications*, **6**, Article No. 5979. <https://doi.org/10.1038/ncomms6979>
- [13] Hengyu, L., *et al.* (2021) The Interaction of Graphene Oxide-Silver Nanoparticles with Trypsin: Insights from Adsorption Behaviors, Conformational Structure and Enzymatic Activity Investigations. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **202**, Article ID: 111688. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111688>
- [14] Su, Z., *et al.* (2020) Enzyme Membrane Reactors for Production of Oligosaccharides: A Review on the Interdependence between Enzyme Reaction and Membrane Separation. *Separation and Purification Technology*, **243**, Article ID: 116840. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116840>
- [15] Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- [16] Zhang, D., *et al.* (2016) Immobilization of Cellulase on a Silica Gel Substrate Modified Using a 3-APTES Self-Assembled Monolayer. *Springerplus*, **5**, Article No. 48. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1682-y>
- [17] Mosayebi, M., *et al.* (2020) Amine, Thiol, and Octyl Functionalization of GO-Fe₃O₄ Nanocomposites to Enhance Immobilization of Lipase for Transesterification. *Renewable Energy*, **154**, 569-580. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.03.040>
- [18] Zhang, W., *et al.* (2018) Synthesis of Functionalized 4H-Chromenes Catalyzed by Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews*, **11**, 246-253. <https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1474271>
- [19] Asmat, S., *et al.* (2020) Tailoring a Robust Nanozyme Formulation Based on Surfactant Stabilized Lipase Immobilized onto Newly Fabricated Magnetic Silica Anchored Graphene Nanocomposite: Aggrandized Stability and Application. *Materials Science and Engineering: C*, **112**, Article ID: 110883. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110883>
- [20] Pinheiro, B.B., *et al.* (2019) Chitosan Activated with Divinyl Sulfone: A New Heterofunctional Support for Enzyme Immobilization. Application in the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **130**, 798-809. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.145>
- [21] Ashjari, M., *et al.* (2020) Application of Multi-Component Reaction for Covalent Immobilization of Two Lipases on Aldehyde-Functionalized Magnetic Nanoparticles; Production of Biodiesel from Waste Cooking Oil. *Process Biochemistry*, **90**, 156-167. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.002>
- [22] Ding, C., *et al.* (2019) Photothermal Enhanced Enzymatic Activity of Lipase Covalently Immobilized on Functionalized Ti₃C₂T_x Nanosheets. *Chemical Engineering Journal*, **378**, Article ID: 122205. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122205>