

脂肪酶仿生固定化及性质

王静云, 马翠丽, 包永明

(大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 将仿生钛化过程用于脂肪酶固定化, 研究了该过程中工艺条件对脂肪酶固定化的影响及固定化脂肪酶的性质. 结果表明: 0.5 mL 浓度 8 mg/mL 精蛋白诱导剂、0.5 mL 浓度 6 mg/mL 脂肪酶与 1 mL, 0.25 mol/L 钛前驱体 (Ti-BALDH) 在 pH 7.5, 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液为反应介质的条件下, 脂肪酶的包埋率达 70.1%, 酶活回收率为 20.3%. 固定化脂肪酶的最适 pH 为 8.0, 最适温度为 45 °C; 与游离酶相比, 固定化脂肪酶的 pH、温度和储存稳定性都有了较大提高; 重复 6 次使用, 固定化脂肪酶仍保持最初酶活的 41%.

关键词: 仿生钛化; 氧化钛; 精蛋白; 固定化脂肪酶

中图分类号: Q556; O643.3

文献标识码: A

脂肪酶 (EC3.1.1.3), 三酯酰甘油酯基水解酶, 由于其不仅能够在水溶液中催化甘油三酯水解, 也能够的微水相中具有手性选择性地催化酯化或转酯等合成反应, 因此在手性药物合成、食品工业、日化等方面有着广阔的应用前景, 近几十年来一直是研究的热点^[1]. 然而, 游离脂肪酶面临价格高、操作稳定性差、有机溶剂耐受性差、难以回收、不利于下游工业的分离纯化、不能重复利用、经济成本高等一系列问题. 酶固定化技术有效解决了游离酶存在的不足和缺陷^[2], 常用的固定化方法包括吸附法、交联法、包埋法和共价结合法, 包埋法因其操作简单、不易脱落、保持较高酶活, 具有相对广泛的适用性^[3-6].

自然界中, 生物体能够在常温下精确控制体内矿物的形成及形貌和尺寸, 以适应自身支撑和保护的需要^[7,8]. 自然条件下生物矿化过程为温和条件下制备无机材料提供了重要启示, 推动了仿生矿化在固定化酶研究中的应用^[9]. 与传统的溶胶凝胶包埋方法相比较, 仿生固定化过程以诱导蛋白为催化剂和模板, 能够避免传统固定化过程中酸碱催化剂、高速搅拌以及高温等对酶分子天然构象的破坏, 有利于酶活保持, 且仿生矿化法反应条件温和、快速, 已经成功用于多种酶的包埋^[9-12]. Zhang 等以精蛋白为模板形成的液核 (海藻酸钠)-硅壳材料应用于

β -葡萄糖醛酸酶的包埋, 有效地降低了酶的泄露并提高了酶活力及稳定性^[13]. 除仿生硅化外, 仿生钛化也用于酶的固定化, 如 Luckarift 等以溶菌酶为诱导剂, 成功地将丁酰胆碱酯酶固定在氧化钛粒子中^[14], 绿色荧光蛋白在 PAA 的催化诱导下, 也成功地固定在磷酸钛中^[15]; Jiang 等以精蛋白为诱导剂, 成功地将 YADH (醇脱氢酶) 包埋在氧化钛中^[12], Jiang 等还以溶菌酶为诱导剂将 YADH 成功包埋在氧化锆颗粒中^[11]; Sun 等以精蛋白诱导剂, 以仿生钛化的方式将三种脱氢酶固定在氧化钛中, 建立了二氧化碳向甲醇转化的绿色有效的新途径^[16]. 然而有关仿生矿化过程用于脂肪酶固定化的报道非常少见, 目前只检索到仿生硅化用于脂肪酶包埋的两篇报道^[17,18], 有关仿生钛化固定化脂肪酶的报道还鲜为人知.

我们以精蛋白为诱导剂, 通过模拟生物矿化过程, 将仿生钛化用于脂肪酶的固定化, 并对固定化酶的性质进行了研究.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 脂肪酶 (Lipase PS “Amano” SD, Wako), 4-硝基苯酚棕榈酸酯 (*p*-NPP, 95%, Alfa aesar), 细胞色素 C (From horse heart, 99%, Sigma),

收稿日期: 2011-06-07; 修回日期: 2011-07-07.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目 (2009CB724706).

作者简介: 王静云, 女, 生于 1967 年, 博士, 副教授, 硕士生导师. E-mail: wangjingyun67@126.com.

硫酸鱼精蛋白 (Grade II, Sigma), 溶菌酶(上海晶纯有限公司), Ti-BALDH (50% w/w, Alfa aesar).

1.1.2 主要仪器 Thermo scientific 酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司; Mettler Toledo 数字 pH 计, 梅特勒—托利仪器; Maxi dry lyo 冷冻干燥仪, 美国 GE 公司; Sorvall fresco 高速离心机, 赛默飞世尔科技有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 仿生钛化固定化脂肪酶 用 pH 7.0, 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液配制浓度为 5 mg/mL 精蛋白、5 mg/mL 溶菌酶、20 mg/mL 细胞色素 C 溶液及 5 mg/mL 脂肪酶溶液, 将钛前驱体 Ti-BALDH 原溶液用双蒸水稀释至 0.25 mol/L. 室温条件下, 0.5 mL 脂肪酶溶液与 0.5 mL 精蛋白溶液均匀混合, 然后加入到 1.0 mL 的前驱体溶液, 震荡反应 5 min 后, 4 000 r/min 下离心 5 min 得到沉淀, 收集上清液. 双蒸水洗涤沉淀 3 次以去除未反应的前驱体和未包埋的酶, 收集洗液合并于上清液备用. 沉淀冷冻干燥备用. 分别以配制的溶菌酶溶液、细胞色素 C 溶液取代精蛋白溶液, 进行脂肪酶固定化, 过程同上.

1.2.2 脂肪酶水解酶活测定方法 以 *p*-NPP 为底物, 参照 Huang^[19] 等方法测定脂肪酶酶活. 酶活力定义: 在 37 ℃, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液为反应介

质的条件下, 1 min 水解 *p*-NPP 产生 1 μmol 对-硝基苯酚的脂肪酶量.

1.2.3 脂肪酶的包埋率及酶活回收率 脂肪酶包埋率: $E(\%) = \frac{[\text{lipase}]_{\text{initial}} - [\text{lipase}]_{\text{supernatant}}}{[\text{lipase}]_{\text{initial}}}$ (1)

其中, *E* 为包埋效率, $[\text{lipase}]_{\text{supernatant}}$ 和 $[\text{lipase}]_{\text{initial}}$ 分别表示脂肪酶包埋后上清液中残余的酶活和包埋前最初酶活.

酶活力回收率: $\text{Recovery}(\%) = \frac{A_e}{A_i} \times 100$ (2)

其中, *A_e* 和 *A_i* 分别为固定化后包埋酶的酶活和固定化前脂肪酶的总酶活.

1.2.4 仿生钛法固定化脂肪酶的酶学性质 为了比较游离与固定化脂肪酶的最适温度及 pH, 将游离及固定化酶分别置于不同温度、不同 pH 条件下反应. 50 ℃ 及 65 ℃ 条件下分别保温 0~6 h, 测定其热稳定性, 在不同 pH 缓冲液中保持 0~6 h, 测定酶的 pH 稳定性.

1.2.5 脂肪酶存储稳定性 游离和固定化脂肪酶分别保存在 pH 7.0, 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液中, 于 4 ℃ 条件下保存 60 d, 每隔一段时间取样测定脂肪酶的活力, 以未经存储的脂肪酶酶活为 100%, 计算其存储稳定性.

$\text{Storage efficiency}(\%) = \frac{\text{enzyme activity after storage}}{\text{initial enzyme activity}} \times 100$ (3)

1.2.6 脂肪酶重复使用稳定性 1 次反应结束后, 固定化脂肪酶经离心回收, 双蒸水洗涤 3 次以去除残余底物, 然后加入新鲜反应液进行下一轮反应, 酶

活测量同 1.2.2, 计算固定化脂肪酶的重复使用稳定性.

$\text{Recycling}(\%) = \frac{\text{enzyme activity in the } n \text{ cycle}}{\text{enzyme activity in the first cycle}} \times 100$ (4)

2 结果与讨论

2.1 不同诱导蛋白对脂肪酶固定化的影响

据文献报道, 碱性蛋白 (pI > 7.0) 具有诱导带负电荷的无机前驱体(如正硅酸甲酯、正硅酸乙酯, Ti-

BALDH 等) 水解缩聚生成相应的氧化物的功能^[20-22]. 分别以溶菌酶 (pI = 10.5)、细胞色素 C (pI = 10.7)、精蛋白 (pI = 12.0) 为模板诱导剂, 以 pH 7.0, 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液为反应介质, 仿生钛化固定化脂肪酶, 结果如表 1 所示. 当精蛋白为

表 1 不同诱导蛋白下脂肪酶在氧化钛中的包埋率和酶活回收率

Table 1 Encapsulation and recovery efficiency of lipase within titania particles induced by different proteins

Induced proteins in phosphate buffer (pH 7.0, 0.05 mol/L)	Protamine 5 mg/mL	Cytochrome c ^a 20 mg/mL	lysozyme 5 mg/mL
^b Encapsulation efficiency (%)	50.2 ± 0.05	45.3 ± 0.12	49.1 ± 0.21
^c Recovery (%)	19.1 ± 0.23	12.7 ± 0.56	15.9 ± 0.32

^a: Calculated values were little bigger due to the effect of the red colour of Cytochrome c solution on the activity measurement of enzyme; ^b: Calculated with equation 1; ^c: Calculated with equation 2.

诱导剂时,包埋效率和酶活力回收率都优于其它两种蛋白. 精蛋白共有 32 个氨基酸,其中 20 - 22 是精氨酸,这赋予精蛋白更多的正电荷,从而使得精蛋白具有更强的水解缩聚钛前驱体的能力^[22]. 考虑到精蛋白价格相对便宜,易于制取,后续实验以精蛋白为诱导剂仿生合成氧化钛固定化脂肪酶.

2.2 不同缓冲液种类对脂肪酶固定化影响

仿生矿化过程中,反应介质对诱导合成的无机物的形貌尺寸有很大影响^[22,23],而载体的形貌尺寸与酶的活性及底物扩散阻力密切相关. 考察不同缓冲液种类对脂肪酶固定化的影响,结果如图 1 所示. 当以精蛋白为诱导剂,Tris-HCl (pH 7.0,0.05 mol/L)、磷酸盐 (pH 7.0,0.05 mol/L) 和纯水为反应介质时,包埋效率分别为 56.8%、49.8% 和 50.1%,磷酸盐缓冲液有稍低的包埋效率,这可能归因于磷酸根的负电荷消耗了精蛋白所带的正电荷而减少了生成的氧化钛的量^[22],脂肪酶的包埋量也因此减少. 然而,磷酸盐缓冲液为溶剂时酶活回收率 (19.6%) 最高. 考虑到酶在水溶液中不稳定,后续实验选取磷酸盐缓冲液为溶剂进行下一步实验.

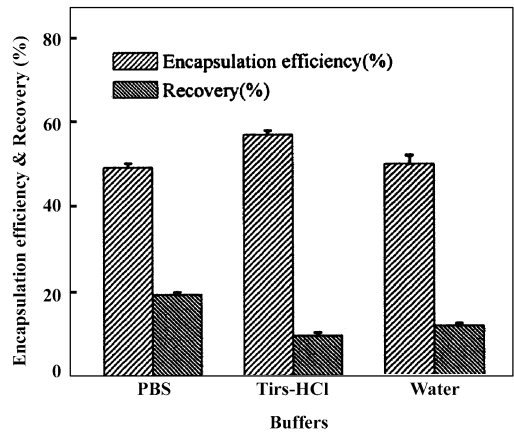


图 1 不同缓冲液对脂肪酶包埋率和酶活回收率的影响
Fig.1 Effect of different buffers on encapsulation and recovery efficiency

2.3 固定化介质 pH 和离子强度对脂肪酶的影响

在 pH 6.5 ~ 8.5 的范围内考察 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 对脂肪酶固定化的影响,结果如图 2 (a) 所示. 随着 pH 增大,酶活回收呈先上升后下降的状态,在 pH 7.5 时达到最优的酶活回收率 20.3%. 而在 pH 7.5,不同离子强度磷酸盐缓冲液

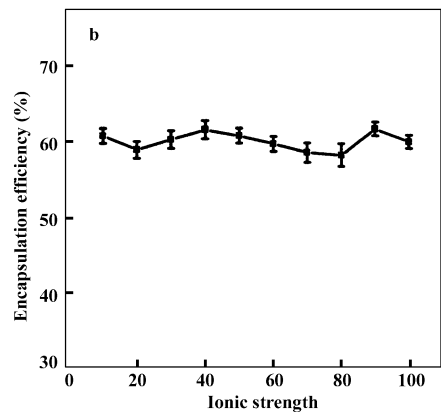
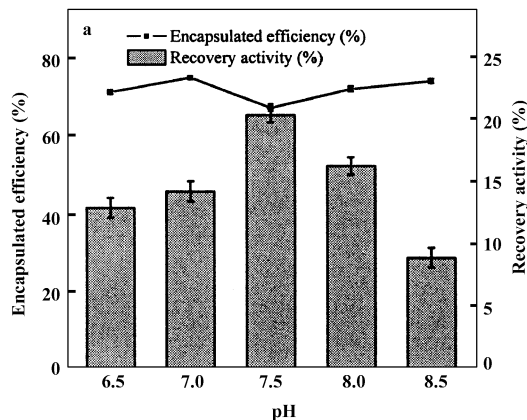


图 2 (a) 不同 pH 值的磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L) 和 (b) 不同离子强度的磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 对脂肪酶包埋率的影响
Fig.2 Effect of (a) (0.05 mol/L) phosphate buffer with different pH and (b) (pH 7.5) phosphate buffer with different concentration on encapsulation and recovery efficiency

对固定化脂肪酶的包埋率影响不大,见图 2(b). 而 Jiang 等以精蛋白诱导合成氧化钛固定化 YADH 过程中发现,磷酸根浓度在 0.01 ~ 0.1 mol/L 范围内,随着磷酸根浓度升高,YADH 的包埋率从最初的 100% 降低到 20% 左右^[12].

2.4 诱导蛋白浓度和酶量对脂肪酶固定化的影响

从图 3(a) 中可以看出,随着精蛋白浓度的增大,酶包埋率先升高而后缓慢降低的趋势,在浓度

8.0 mg/mL 时达到最高包埋效率 74.6%. McAuliffe 等以聚乙烯亚胺为诱导剂,正硅酸甲酯为前驱体仿生硅化固定化脂肪酶过程中,酶的包埋率小于 < 10%^[18]. Jiang 等在研究精蛋白诱导合成氧化钛时发现,随着精蛋白浓度的增大,生成氧化钛的量随之增大而后趋于稳定^[22],与此同时,Jiang 等将仿生钛化过程用于 YADH 的固定化并进行了系统研究,提出了包埋机理,在反应介质中,精蛋白与 YADH 通

过静电引力或氢键相互作用自发结合形成团聚体，随后在精蛋白的作用下,诱导钛前驱体水解缩聚形

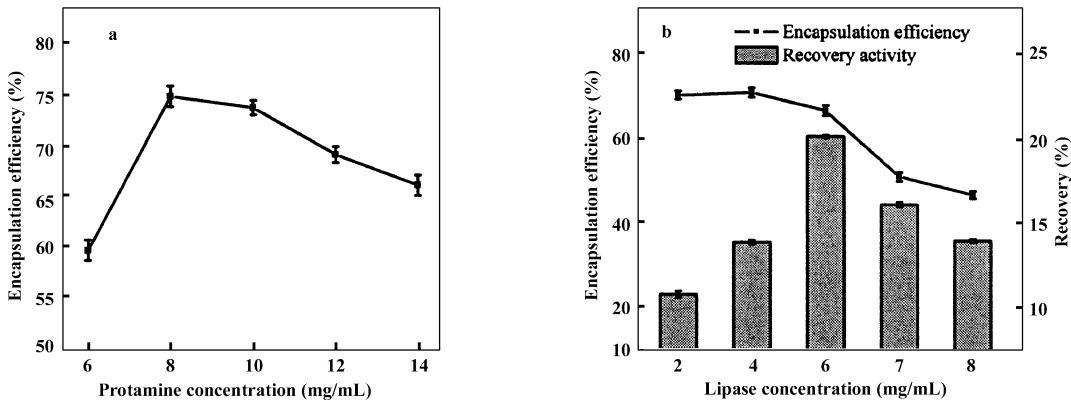


图 3 (a) 不同浓度的精蛋白溶液和(b)脂肪酶浓度对脂肪酶固定化包埋率和酶活回收率的影响
Fig. 3 Effect of protamine concentration (a) and lipase concentration (b) on encapsulation and recovery efficiency

成二氧化钛,在此过程中 YADH 随之被包埋^[12]. 图 3(a)中显示,在低浓度精蛋白反应介质中,脂肪酶分子与精蛋白通过静电或氢键作用相互结合,随着精蛋白浓度升高,结合的脂肪酶也越多,因此包埋率呈上升趋势. 然而,当精蛋白浓度高于 8 mg/mL,由于钛前驱体的浓度一定,精蛋白只能够沉淀一定量的氧化钛,多余的精蛋白(与脂肪酶结合)则残余在反应体系中未被沉淀,因此出现包埋率下降的情况. 在精蛋白浓度为 8 mg/mL 时,包埋效果最优.

脂肪酶量对酶固定化的影响如图 3 (b) 所示. 当脂肪酶浓度在 2 ~ 8 mg/mL 范围内,包埋率从 70% 逐渐下降到 50%,而酶活回收从 11.2% 先上升至 20.4% 而后下降到 14.3%. 这表明增大脂肪酶

的浓度并不能提高酶的包埋效率和酶活回收. 这是因为,在酶浓度范围为 2 ~ 6 mg/mL 时,脂肪酶可以充分结合到精蛋白表面,因此获得较高的包埋率;当脂肪酶浓度高于 6 mg/mL 时,由于反应体系中精蛋白浓度是一定的,只能够结合一定量的脂肪酶,未被结合的脂肪酶则残余在上清中,因此包埋率下降;另外酶浓度过高,氧化钛载体孔径内由于包埋了过多的脂肪酶而使酶分子无法伸展成有利于保持催化活性的构象,也会导致酶包埋效率和酶活回收降低. 最佳的脂肪酶包埋浓度为 6 mg/mL.

2.5 氧化钛固定化脂肪酶的最适 pH 及 pH 稳定性

图 4(a)结果表明,游离和固定化脂肪酶的最适 pH 分别是 7.0 和 8.0. Chen 等以仿生矿化的方式

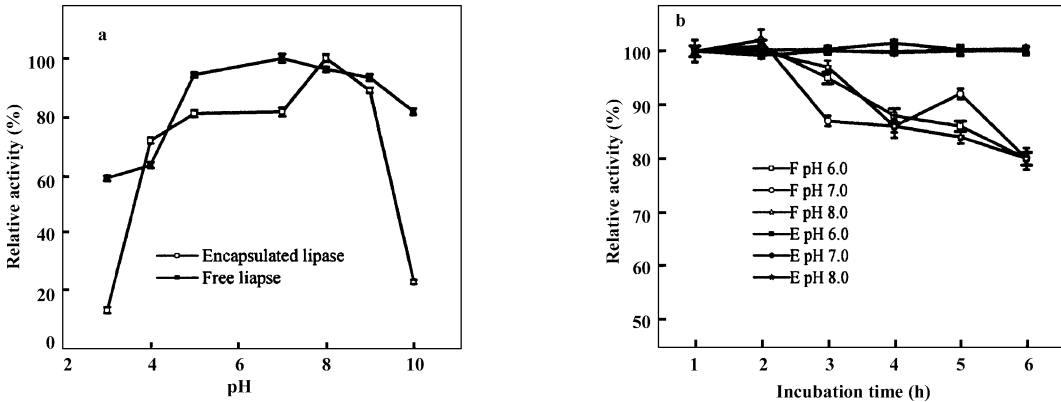


图 4 pH 对游离和固定化脂肪酶(a)酶活力和(b)稳定性的影响
Fig. 4 Effects of different pH on the activity (a) and the stability (b) of free and encapsulated lipase
E: encapsulated lipase, F: free lipase

将脂肪酶和纳米磁性 Fe_3O_4 共包埋于氧化硅中,发 现包埋后酶的最适 pH 没有发生改变^[17],Jiang 等将

YADH 包埋于氧化钛粒子后,酶的最适 pH 也没有发生改变^[12]. 刘勇等报道脂肪酶经耦合固定化后,固定化酶的最适 pH 向碱性偏移 1 个单位^[24].

pH 对脂肪酶稳定性的影响如图 4(b) 所示. 游离酶在 pH 6.0、7.0、8.0 缓冲液中孵化 6 h 后约损失 20% 左右的酶活力,而固定化脂肪酶在 pH 6.0、7.0、8.0 的缓冲溶液中孵化 6 h,酶活几乎没有损失. 经仿生钛化固定化后,处于氧化钛孔径中的脂肪酶分子受到载体的空间限制,防止了酶分子的伸展,因此使得酶的 pH 稳定性比游离态脂肪酶高. 仿生硅化固定化脂肪酶在 pH 4 ~ 11 范围内分别孵化

1 h,酶活平均损失约 24%^[17].

2.6 氧化钛固定化脂肪酶的最适温度及热稳定性

温度对酶的催化活力有非常大的影响,这是由于温度既影响到酶蛋白的构象、改变酶促反应功能基团的解离状态,也影响到酶与底物的亲和力、酶-底物络合物的分解,甚至还影响到酶与激活剂、抑制剂的亲和力等^[25]. 图 5(a) 所示,游离和固定化脂肪酶的最适反应温度分别在 37 ℃ 和 45 ℃. 游离及固定化脂肪酶热稳定性结果如图 5(b) 所示,在水浴 55 ℃ 条件下保持 6 h 后,游离和固定化脂肪酶酶活分别下降为最初活力 23.1% 和 39.8%; 在水浴

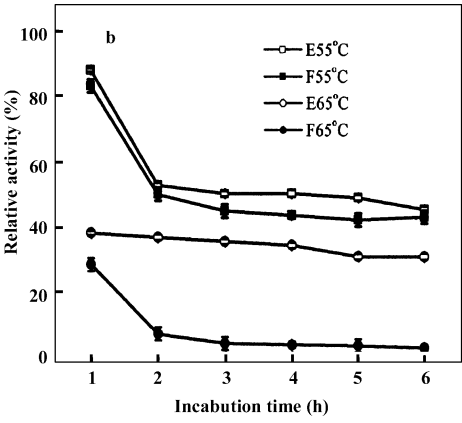
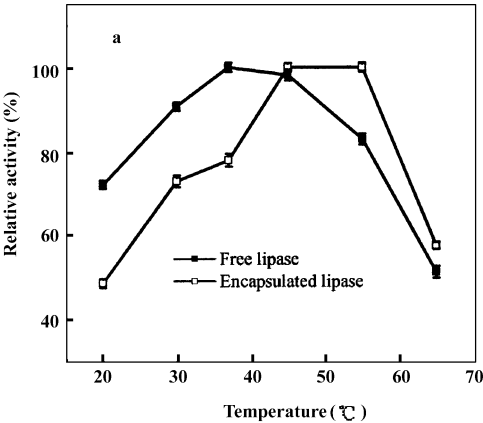


图 5 温度对脂肪酶(a)活性和(b)热稳定性的影响

Fig. 5 Effects of temperature on (a) the activity and (b) the thermo-stability of lipase

E: encapsulated lipase, F: free lipase

65 ℃ 条件下保持 2 h,游离酶几乎完全丧失了活性,而该条件下保持 6 h 的固定化酶仍保持最初酶活的 30.1%. 而 Chen 等报道的仿生硅化固定化脂肪酶在 37 ℃ 保持 6 h,酶活损失 16%,在 57 ℃ 保持 1 h

酶活完全丧失^[17].

2.7 氧化钛固定化酶存储稳定性和重复利用稳定性

储存稳定性和重复使用稳定性是评价固定化酶的重要指标. 图 6(a) 所示,在 pH 7.0 的磷酸盐缓

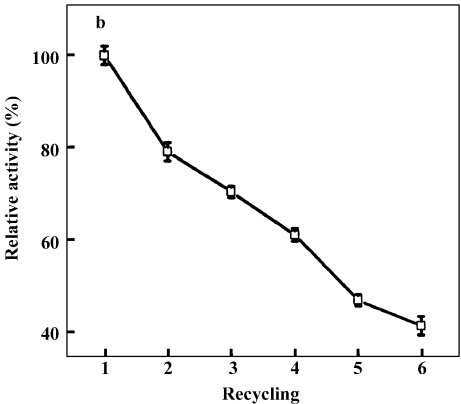
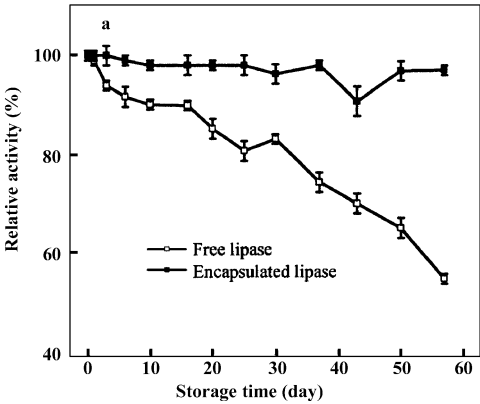


图 6 (a) 游离和固定化脂肪酶存储稳定性和(b)固定化脂肪酶的重复使用稳定性

Fig. 6 (a) The storage stability of free and encapsulated lipase and (b) recycling stability of encapsulated lipase

E: encapsulated lipase, F: free lipase

冲液中储存 7 d, 游离脂肪酶的活力下降为最初的 90%, 60 d 后, 游离酶的酶活约为最初酶活的 50%; 同样条件下储存 60 d, 固定化脂肪酶活力几乎没有下降。可知经仿生钛化固定化后, 脂肪酶存储稳定性有了显著提高, 此结果与文献报道的仿生钛法固定化 YADH 一致^[12], 仿生硅化法固定化脂肪酶在 25 ℃ 储存 14 d, 酶活略有下降^[17]。图 6(b) 显示重复 6 次使用, 固定化酶保持最初酶活的 41.4%, 这说明仿生钛化固定化脂肪酶表现出较好的重复使用稳定性。

3 结 论

首次将温和的仿生钛化过程用于脂肪酶固定化。脂肪酶固定化的最优条件为 8 mg/mL 精蛋白为诱导剂、pH 7.5, 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液为反应介质、6 mg/mL 脂肪酶, 此时脂肪酶的包埋率达 70.1%, 酶活回收率为 20.3%。经仿生钛化固定化后, 脂肪酶的最适反应温度向高温偏移, 最适反应 pH 向碱性偏移。与游离酶相比, 仿生钛化固定化脂肪酶的 pH、温度和储存稳定性都有了较显著提高。重复 6 次反应, 固定化脂肪酶保持最初酶活的 41%; 与仿生硅化固定化脂肪酶相比, 仿生钛化固定化脂肪酶有更好的 pH、温度及储存稳定性。

参考文献:

- [1] Fan Y. X., Qian J. Q. *J Mol Catal B-Enzym* [J], 2010, **66**(1-2): 1-7
- [2] Li Ye (李 晔). *J. Mol Catal. (China)* (分子催化) [J], 2008, **22**(1): 86-96
- [3] Wang Y D., Shen X Y., Li Z L., *et al. J. Mol Catal.* [J], 2010, **67**(1-2): 45-51
- [4] Da Ros P C M., Silva G A M., Mendes A A., *et al. Biore-sour. Technol.* [J], 2010, **101**(14): 5 508-5 516
- [5] Yang Jiang-ke (杨江科), Cao Xiong-wen (曹雄文), Shu Zhong-yao (舒钟瑶). *J. Mol Catal. (China)* (分子催化) [J], 2010, **24**(1): 77-81
- [6] Jiang Zhong-yi (姜忠义), Wu Hong (吴 洪), Xu Song-wei (许松伟), *et al. J. Mol Catal. (China)* (分子催化) [J], 2002, **23**(2): 162-164
- [7] Wang X H., Wiens M., Schroder H C., *et al. Adv. Funct. Mater.* [J], 2010, **12**(9): B422-B437
- [8] Natalio F., Mugnaioli E., Wiens M., *et al. Cell Tissue Res.* [J], 2010, **339**(2): 429-436
- [9] Betancor L., Luckarift H R. *Trends Biotechnol.* [J],

- 2008, **26**(10): 566-572
- [10] Kuan I C., Wu J C., Lee S L., *et al. Biochem. Eng. J.* [J], 2010, **49**(3): 408-413
- [11] Jiang Y J., Yang D., Zhang L., *et al. Ind. Eng. Chem. Res.* [J], 2008, **47**(6): 1 876-1 882
- [12] Jiang Y J., Sun Q Y., Jiang Z Y., *et al. Mater. Sci. Eng., C.* [J], 2009, **29**(1): 328-334
- [13] Zhang Y., Hong W., Jian L., *et al. Chem. Mater.* [J], 2006, **20**: 1 041-1 048
- [14] Luckarift H R., Matthew B D., Kenneth H S., *et al. Small.* [J], 2006, **2**(5): 640-643
- [15] Cole K E., Ortiz A N., Schoonen M A., *et al. Chem. Ma-ter.* [J], 2006, **18**(19): 4 592-4 599
- [16] Sun Q., Jiang Y., Jiang Z., *et al. Ind. Eng. Chem. Res.* [J], 2009, **48**: 4 210-4 215
- [17] Chen G C., Kuan I C., Hong J R., *et al. Biotechnol Lett.* [J], 2011, **33**(3): 525-529
- [18] McAuliffe J C., Smith W C., Bond R., *et al. Abstr. Am. Chem. Soc.* [J], 2005, **229**: U1159-U1159
- [19] Huang X J., Yu A G., Jiang J., *et al. J Mol Catal B-enz-ym.* [J], 2009, **57**(1-4): 250-256
- [20] Shiomi T., Tsunoda T., Kawai A., *et al. Chem. Mater.* [J], 2007, **19**(18): 4 486-4 493
- [21] Pan F S., Cheng Q L., Jia H P., *et al. J Membrane Sci.* [J], 2010, **357**(1-2): 171-177
- [22] Jiang Y J., Yang D., Zhang L., *et al. Dalton Trans.* [J], 2008, **31**: 4 165-4 171
- [23] Kroger N., Lorenz S., Brunner E., *et al. Science.* [J], 2002, **298**(5593): 584-586
- [24] Liu Yong (刘 勇), Wu Manjiang-Aili (吾满江. 艾力), Xia Muxikamaer (夏木西卡玛尔), *et al. J. Mol Catal. (China)* (分子催化) [J], 2006, **20**(3): 260-265
- [25] Diaz E G., Catana R., Ferreira B S., *et al. J Membrane Sci.* [J], 2006, **273**(1-2): 152-158

The Immobilization of Lipase by Biomimetic Mineralization and Its Properties

WANG Jing-yun, MA Cui-li, BAO Yong-ming

(*School of life science & biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, 116024, China*)

Abstract: Biomimetic mineralization, which employs biological molecules to induce and drive the formation of inorganic oxides with excellent properties at room temperature, ambient pressure and neutral pH, provides a facile new method for enzyme immobilization. In the present study, for the first time, the biomimetic synthesis of titania was employed for the immobilization of lipase. The optimal encapsulation efficiency (70.1%) and activity recovery (20.3%) of lipase were achieved when 0.5 mL protamine solution of 8mg/mL and 0.5 mL lipase solution of 6mg/mL were reacted with 1 mL Ti-BALDH of 0.25 mol/L in phosphate buffer (pH7.5, 0.05 mmol/L). It was found that the optimum pH of free and encapsulated lipase in titania particles were pH 7.0 and 8.0, respectively, while the optimum temperature were 37 °C and 45 °C. Additionally, the lipase encapsulated into titania particles exhibited significantly enhanced pH, thermal, and storage stability, still retained 41% of its initial activity after consecutive 6 cycles.

Key words: biomimetic mineralization; titania; protamine; encapsulated lipase