

聚苯胺纳米纤维固定化辣根过氧化物酶的 合成及性能研究*

丁杭军^{1**} 文湘华² 杨洲¹ 杨槐³

(¹ 北京科技大学材料科学与工程学院 北京 100083)

(² 清华大学环境科学与工程系 北京 100084) (³ 北京大学工学院 北京 100871)

摘要 FeCl₃ 为氧化剂合成了聚苯胺纳米纤维,纤维直径 20 ~ 30 nm,并以此为载体对辣根过氧化物酶进行了固定化. SEM, FTIR, UV-Vis 等结构表征证明辣根过氧化物酶 HRP 中的质子可作为掺杂剂与聚苯胺主链中的氮结合,酸根离子作为对阴离子依附于聚苯胺主链周围,实现了聚苯胺载体对生物酶的固定化. 聚苯胺纳米纤维具有较大的比表面积,有利于增加酶的负载量,提高固定化酶活性. 该方法简单,快速,载体材料无需活化. 与游离酶相比,固定化酶对 pH, 高温的耐受性,不同温度下的热稳定性均有了明显的提高,在 4 ℃ 条件下保存 7 周后固定化酶活性几乎没有损失,重复使用 6 次后仍可保持 80% 的酶活,说明纳米结构的聚苯胺是一种良好的载体,可实现生物酶的高效固定化.

关键词 聚苯胺, 纳米纤维, 辣根过氧化物酶, 固定化, 酶活性, 酶稳定性

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,简称 HRP)是一类商品化较早、应用较为广泛的酶制剂,在有机合成、生物传感器、废水处理、环境化学和食品工业等领域有着广泛的用途^[1]. 然而,游离状态的酶稳定性差,对温度、离子浓度、pH 值及重金属离子等外界因素敏感,容易失活,且反应后分离困难,不能重复利用,使用成本高,这些不足大大限制了游离酶的应用. 酶的固定化技术是解决这一问题的最有效方法之一. 酶的固定化技术,即通过物理或化学的方法将游离酶束缚于一定载体中,保持了酶催化活性的同时可以重复,连续地使用. 在酶固定化技术中,载体材料的结构和性质显著地影响了固定化酶的性能^[2]. 以纳米材料为载体,可以克服体材料负载量低、酶易流失、失活等不足,提高固定化酶的性能^[3]. 磁性纳米颗粒,纳米孔材料^[4~7],碳纳米管^[8]等已经开始应用于酶的固定化研究中,显示出优于体材料的催化效果. 设计合成性能更加优异的纳米材料为新型酶固定化载体已成为目前固定化酶研究的重点之一.

聚苯胺(polyaniline, PANI) 纳米材料是一类

具有广泛应用前景的新型功能高分子材料,具有高度共轭结构的分子结构,通过“掺杂”后可以使其电导率由绝缘体变为导体,其优异的物理、化学性能引起了科学家们的极大兴趣,成为材料领域中的研究热点^[9,10]. 聚苯胺分子骨架中带有氨基,而酶的主要成分是氨基酸,聚苯胺不需要任何表面修饰即可通过氨基与酶分子中羧基的质子直接键合,实现酶的固定化. 除此之外,聚苯胺还具有以下特点:(1) 单体价格便宜,易于合成;(2) 分子骨架具有多样化的结构,易于实现载体的多样化;(3) 独特的质子酸“掺杂”机制,通过使用不同的掺杂剂,实现载体性质可控可调;(4) 高度共轭的分子结构,有利于载体与酶分子之间的电子传输,增强酶活性中心与底物间长距离的电子传输效率. 结合高分子材料本身良好的机械性能、可加工性及环境稳定性高、可重复使用等优点,导电聚苯胺纳米材料可以作为一种理想的新型载体,实现生物酶的高效固定化. Lee 等^[11,12] 尝试将甲丝酵母多皱脂肪酶固载在聚苯胺载体上,固定化酶成功地催化了外消旋布洛芬的手性酯化反应. Fernandes 等^[13,14] 等以聚苯胺为载体,实现了对辣

* 2013-10-22 收稿,2013-11-28 修稿;国家自然科学基金(基金号 51273022)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: dinghj2007@mater. ustb. edu. cn

根过氧化物酶的固定化.然而在整个固定化过程中,需要使用戊二醛对 PANI 载体进行活化.

在本文中,我们以聚苯胺的纳米纤维为载体,在无戊二醛活化剂的条件下,直接通过辣根过氧化物酶的掺杂作用实现了酶的固定化.对固定化酶进行了结构表征,并研究了固定化酶 PANI-HRP 的活性及稳定性.结果表明,聚苯胺纳米纤维具有较大的比表面积,有利于提高辣根过氧化物酶的负载量,固定化酶对 pH,高温的耐受性,不同温度下的热稳定性均有了明显的提高,在 4 °C 条件下保存 7 周后固定化酶活性几乎没有损失,重复使用 6 次后仍可保持 80% 的酶活.

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

苯胺(aniline, An, 北京化工厂)在使用前减压蒸馏.辣根过氧化物酶(HRP, 酶活性 $\geq 200 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 中国医药上海化学试剂公司),愈创木酚(分析纯,百灵威公司),六水合三氯化铁(Ferric Chloride, 分析纯,北京化工厂),乙醇(ethanol, 分析纯,北京化工厂),乙醚(ether, 分析纯,北京化工厂)等试剂未经处理直接使用.

SR-4 数显恒温磁力搅拌水浴锅(天津市欧诺仪器仪表有限公司),扫描电镜(SEM, Hitachi-530),傅立叶红外(FTIR, EOUNINOX55, Bruker),紫外可见吸收(UV, V-570 型紫外吸收分光光度计).

1.2 聚苯胺纳米纤维的合成

聚苯胺分子骨架中带有氨基,而酶的主要成分是氨基酸,聚苯胺不需要任何表面修饰即可通过氨基与酶分子中羧基的质子直接键合,实现酶的固定化.为了得到最大的酶负载量,需要更多的 N 原子裸露出来与氨基酸键合,因此在本实验中选用脱掺杂的聚苯胺纳米纤维为载体材料.按照文献报道的方法制备聚苯胺纳米纤维^[15],将 2 mmol(0.2 mL)苯胺(An)单体分散于 10 mL 去离子水溶液中,超声分散至形成透明的均相溶液,然后一次性加入 10 mL 的 FeCl_3 水溶液(FeCl_3 与 An 单体的比例为 5:1),静置反应 12 h,将混合溶液离心,离心后的固体依次用蒸馏水、无水乙醇和乙醚洗涤,最后在室温下真空干燥 18 h,得到墨绿色的聚苯胺粉末.将得到的聚苯胺粉末浸泡于 0.1 mol/L 的氨水溶液中,24 h 后将混合溶液离心,所得的固体依次用蒸馏水、无水乙醇和乙醚洗

涤,在室温下真空干燥 18 h,得到深蓝色的脱掺杂的聚苯胺粉末.

1.3 辣根过氧化物酶的固定

将 1.2 节中合成的聚苯胺粉末 4 mg 和一定量的市售的辣根过氧化物酶分别分散于 1 mL 的磷酸缓冲溶液(pH = 7.0)中,室温下磁力搅拌至均匀.4 °C 下将聚苯胺纳米纤维的缓冲溶液与酶溶液于 120 r/min 的摇床中固定化反应 48 h,离心过滤,去除上清液,固定化酶用同样 pH 值的缓冲溶液清洗 3 ~ 5 次,至上清液中 HRP 活性为 0,自然干燥,即得粉末状墨绿色的聚苯胺固定化辣根过氧化物酶,于 4 °C 冰箱中保存.

1.4 固定化酶(PANI-HRP)/游离辣根过氧化物酶(HRP)活性的测定

使用愈创木酚法测定辣根过氧化物酶 HRP 的活性:将 0.01 mL 一定浓度的游离/固定化的辣根过氧化物酶(PANI-HRP/HRP)溶液加入 2.9 mL 的磷酸缓冲溶液中,以 0.05 mL 愈创木酚为底物,在 37 °C 条件下,加入 0.01 mL H_2O_2 引发酶促降解反应,用紫外分光光度计检测 470 nm 处在 150 s 内吸光度的变化,从而得知酶反应速率,进而推算酶活性.定义 1 min 氧化 1 μmol 愈创木酚所需的酶量为 1 个酶活单位.

1.5 固定化蛋白量的计算

以牛血清蛋白为标准物,利用考马斯亮兰法测定蛋白质的含量.固定化蛋白量为负载前游离酶的蛋白量与负载后离心的上清液中蛋白量的差值.

1.6 固定化酶(PANI)/游离辣根过氧化物酶(HRP)稳定性测定

1.6.1 pH 稳定性

将适量的游离酶和固定化酶分别置于不同 pH 的缓冲溶液中,每隔一段时间测定其酶活,通过考察酶残留活性随时间的变化,研究酶的 pH 稳定性.

1.6.2 热稳定性

将适量的游离酶和固定化酶分别置于 30、45、60 °C 水浴中恒温,每隔一段时间测定其酶活,通过考察残留活性随时间的变化,研究酶的热稳定性.

1.6.3 存储稳定性

将固定化酶和游离酶置于 4 °C 条件下保存,每隔一段时间测定其活性,考察其存储稳定性.

1.6.4 固定化酶重复使用的稳定性

每次催化反应结束后,通过离心将固定化酶从反应液中回收,用磷酸缓冲溶液清洗后重新加入到新的反应体系中,检测其活性.

2 结果与讨论

2.1 聚苯胺纳米纤维固定化辣根过氧化物酶材料的表征

采用扫描电镜对聚苯胺载体及固定化酶的微观形貌进行了观察.结果如图 1 所示,负载前后聚苯胺载体的形貌有较大的变化.以 FeCl_3 为氧化剂,按照文献报道的方法^[15],得到了直径为 20 ~ 30 nm 均匀的纳米纤维(图 1(a)).负载后聚苯胺纳米纤维的直径有所增加,并有大量的颗粒状物质(酶)附着于纤维外表面,可见 HRP 酶在固定化的过程中,大部分负载于纳米纤维的外表面,并可能导致纤维的团聚,从而对载体的形貌有一定的影响.

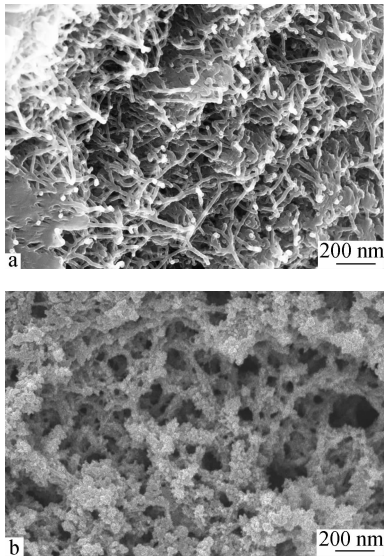


Fig. 1 Typical SEM images of (a) PANI- FeCl_3 nanofibers and (b) PANI nanofibers-HRP

图 2 给出了 PANI 载体,HRP 游离酶及固定化酶 PANI-HRP 的红外吸收光谱图.由图 2 可见负载前后 PANI 的红外吸收谱图是相似的.产物均在 1580,1495,1305,1141,821 和 505 cm^{-1} 处出现较强吸收峰.它们分别归属于醌环的 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动,苯环的 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动, $\text{C}-\text{N}$ 键伸缩振动, $\text{C}=\text{N}$ 键伸缩振动和 1,4-取代苯环的振动,这与文献中报道的 PANI 的红外光谱是一致的^[16],说明固定化酶保持了聚苯胺的主链骨架结构.此

外,PANI-HRP 在 1640 cm^{-1} 附近出现明显的吸收峰,这是游离酶 HRP 酰胺中羰基的吸收峰(游离酶 HRP 在 1659 cm^{-1} 处存在明显的酰胺羰基吸收峰)与聚苯胺载体相互作用的结果,证明 HRP 作为对阴离子依附于聚苯胺主链结构的周围.

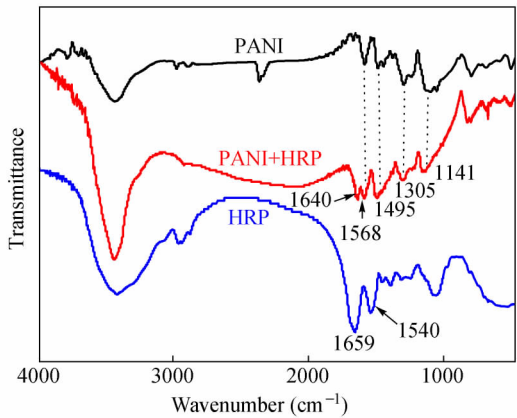


Fig. 2 FTIR spectra of PANI nanofibers, HRP and PANI-HRP

以去离子水为溶剂,PANI 纳米纤维载体,游离酶 HRP,固定化酶 PANI-HRP 及机械混合的聚苯胺和 HRP 的紫外-可见吸收光谱如图 3 所示.游离的辣根过氧化物酶在 403 nm 处有一强的吸收峰,为血红素辅基的吸收(图 3 谱图 a).脱掺杂的 PANI 载体在约 320 nm 和约 680 nm 有两处明显的吸收峰,归属于中间氧化态的聚苯胺特征吸收峰^[17,18].聚苯胺负载辣根过氧化物酶的紫外吸收曲线(图 3 谱图 c)与典型的掺杂态 PANI 一致,在约 400 nm 和 > 800 nm 左右有较强吸收峰,440 nm 是与掺杂有关的电子吸收峰, > 800 nm 处长拖尾峰为离域的极化子的吸收峰(图 3 谱图

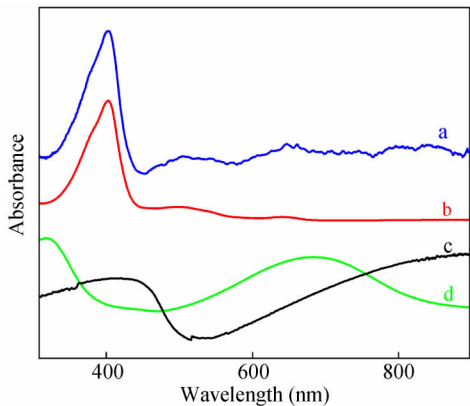


Fig. 3 UV-Visible spectra of (a) mechanically mixture of PANI and HRP, (b) pure HRP, (c) PANI doped with HRP and (d) undoped PANI supports

b)^[19,20],而室温下简单的机械混合得到的 PANI 和 HRP 的混合物中则分别保留了 HRP 血红素辅基的特征吸收峰(403 nm)和中间氧化态 PANI 约 680 nm 的吸收峰(图 3 谱图 d).说明辣根过氧化物酶在固定化的过程中,酶中氨基酸的氢质子与聚苯胺的 N 原子直接键合,同时酸根离子以对阴离子的形式依附于聚苯胺主链结构周围,实现了酶在聚苯胺载体上的负载,此结论与红外吸收光谱的分析结果一致.

2.2 固定化条件的优化

2.2.1 PANI 载体对 HRP 的吸附

按 1.3 节的固定化方法,分别以合成的掺杂态和脱掺杂的聚苯胺纳米材料为载体,在不同的给酶量的条件下固定化操作 48 h 得到固定化酶.图 4(a) 给出了吸附时初始 HRP 给酶量与 PANI 载体的配比与吸附载量之间的关系.从图中可以看出,随着 HRP 投加量的增加,负载到 PANI 载体上的蛋白量(吸附量)不断增加,且在低投加配比时增加速度较快,随后增加趋势减缓直至饱和,达到最大吸附量.对于脱掺杂的聚苯胺最大吸附量可达 150 $\mu\text{g}/\text{mgPANI}$,而掺杂态的聚苯胺载体在较低投加比时即达到饱和,最大吸附量约为 90

$\mu\text{g}/\text{mgPANI}$,均高于文献报道的数值^[14].我们测量了 PANI 纳米纤维的比表面积为 60 m^2/g ,大于商业化的 PANI(比表面积为 35 m^2/g).由此可见,纳米结构具有较大的比表面积,有利于提高载体的负载量,增加载体活性.根据红外和紫外的结构分析可知,HRP 中氨基酸的质子可以作为掺杂剂进入聚苯胺主链,而酶对阴离子可负载于聚苯胺载体上,因此,脱掺杂的聚苯胺可以提供更多的掺杂点位,有利于提高酶的负载量.

2.2.2 固定化时间对负载量的影响

按 1.3 节方法,分别以掺杂态和脱掺杂的 PANI 为载体,在最优的固定 HRP 初始浓度与载体的配比下(HRP/脱掺杂 PANI = 0.6/1; HRP/掺杂态 PANI = 0.4/1)时,考察了固定化时间对蛋白质负载量的影响.如图 4(b)所示,对于不同的载体,蛋白质的负载量均随固定化时间的增加而增加,当负载时间为 24 h 时,蛋白质的吸附量开始趋于饱和,检测到的脱掺杂 PANI 载体对蛋白质最大负载量为 150 $\mu\text{g}/\text{mgPANI}$,掺杂态 PANI 载体对蛋白质的最大负载量为 90 $\mu\text{g}/\text{mgPANI}$.24 h 之后,负载量基本不再随负载时间的增加发生变化,可见对于不同的 PANI 载体,HRP 在 PANI 载体上的负载都是一个缓慢的过程,20 ~ 24 h 可达到饱和.

2.3 固定化酶的酶学性质

2.3.1 最适宜 pH 值

分别在不同的 pH 值(2.0 ~ 12.0),37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下测定固定化 PANI-HRP 和游离酶 HRP 的生物活性,以确定其最适 pH 值.从图 5 中可以看出,固定化酶 PANI-HRP 和游离 HRP 具有相似的 pH-活性曲线.对于游离 HRP 而言,最适宜 pH 值为 8,在 pH 小于 4 的酸性环境和 pH 值大于 10 的碱性环境中,游离酶 HRP 的活性小于最适宜 pH 条件下酶活的 10%,几乎完全失活.而固定化酶 PANI-HRP 的生物活性有了很大程度的提高,尤其是在 pH 大于 10 的碱性环境中,固定化酶仍可保持最适 pH 条件下活性的 60%,同时,PANI-HRP 的最适宜 pH 范围向酸性范围扩大了 2 个单位,pH 从 6 到 8 固定化酶都具有最大的活性,可见,PANI-HRP 对 pH 的耐受性得到了明显的提高.

2.3.2 最适宜温度

分别在不同温度(20 ~ 75 $^{\circ}\text{C}$),最适宜 pH 条件下测定固定化 PANI-HRP 和游离酶 HRP 的生

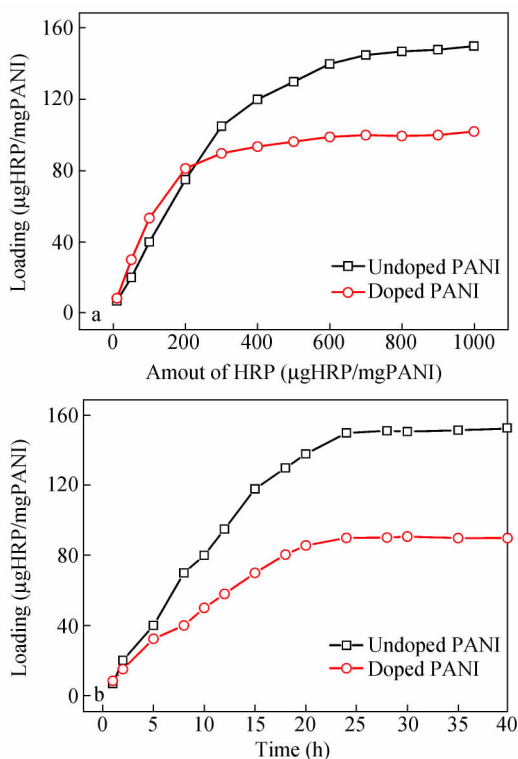


Fig. 4 (a) Effect of the amount of HRP exposed to PANI nanofibers on loading of HRP on PANI and (b) effect of time on loading of HRP on PANI nanofibers

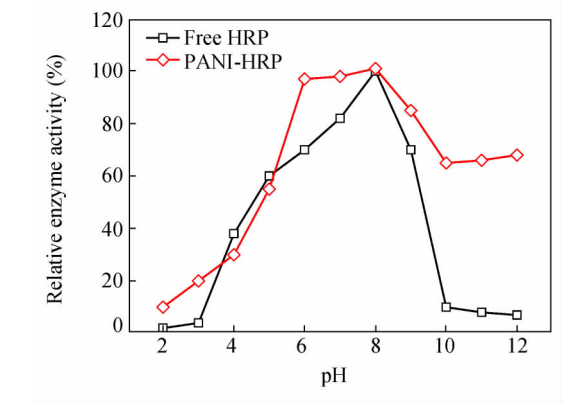


Fig. 5 Effect of pH on the activity of free HRP and PANI-HRP

物活性,以确定最适温度.从图 6 中可以看出,在 25 ~ 45 ℃ 的温度范围内,固定化 PANI-HRP 和游离 HRP 均显示出较高的活性,当温度高于 45 ℃ 后,游离 HRP 的活性随温度升高急剧下降,到 60 ℃ 时,酶完全失活.而 PANI-HRP 表现出对高温有较强的耐受力,在温度为 60 ℃ 时,仍保持了 60% 的酶活,可见,PANI 纳米纤维载体对 HRP 的活性中心起到了较好的保护作用,提高了其对高温的耐受能力.

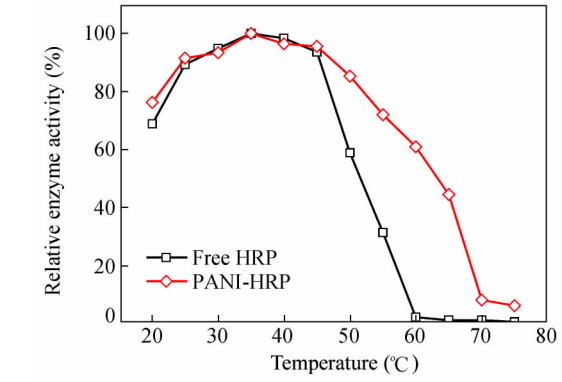


Fig. 6 Effect of temperature on the activity of free HRP and PANI-HRP

2. 3. 3 热稳定性

在最适宜 pH 条件下,测定了固定化 PANI-HRP 和游离 HRP 在不同温度下活性随时间的变化,以研究酶的热稳定性能.从图 7 中可以看出,游离酶和固定化酶的热稳定性均随温度的升高而有所下降.当温度为 30 ℃ 时,固定化酶 PANI-HRP 和游离 HRP 活性的变化趋势基本相同,120 min 后活性变化较小,均能保持 90% 以上的酶活.而当温度为 45,60 ℃ 时,固定化 PANI-HRP 比游离酶 HRP 具有更好的热稳定性.固定化酶 PANI-

HRP 经在 45 ℃ 处理 120 min 后仍可保持 85% 的活性而游离酶仅能保持 40% 的活性.60 ℃ 时,游离酶经过处理 30 min 后,其活性已完全丧失,此时固定化 PANI-HRP 保留了 43% 的活性,120 min 后仍保留了 10% 的酶活.这是由于经过固定化后,酶分子与载体间之间的作用力使酶分子的构象变化受到了限制,减少了酶失活的可能,从而提高了固定化酶的耐热稳定性.

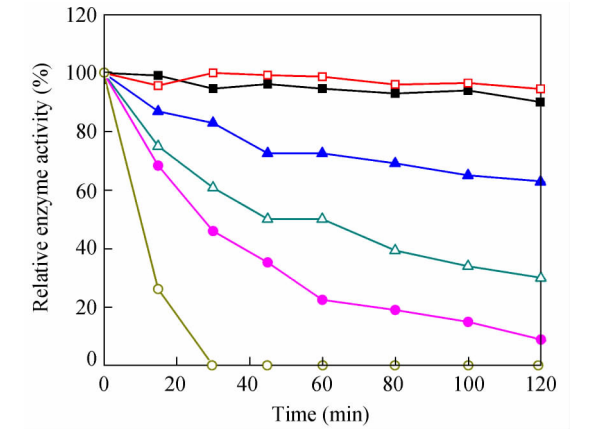


Fig. 7 The effect of temperature on the thermal stability of free HRP and PANI-HRP

2. 3. 4 存储稳定性

由于游离酶的稳定性的差,在放置一段时间后均会有一定的酶损失,因此,存储稳定性是衡量酶稳定性能的重要指标之一.按照实验 1. 6. 3 节方法,将固定化酶 PANI-HRP 和游离酶 HRP 分别放置在 4 ℃ 条件下考察其存储稳定性,图 8 中显示,固定化 PANI-HRP 具有更高的存储稳定性,在放置 7 周后,仍保持了 97% 左右的活性,而游离 HRP 仅剩 80% 的酶活.因此,聚苯胺纳米纤维对

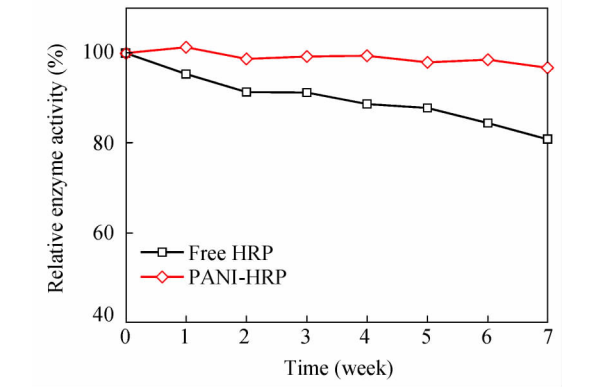


Fig. 8 Storage stability of free HRP and PANI-HRP

HRP 的固定化提高了 HRP 的储存稳定性.

2.3.5 固定化酶循环使用的稳定性

固定化酶的显著优点就是易于回收,可以多次循环使用,从而使酶使用成本下降.按 1.6.4 节方法考察固定化 PANI-HRP 的重复使用稳定性.结果如图 9 中所示,从图中可以看出,在第一次循环中,酶活有较大的降低,降低了 13%,而在接

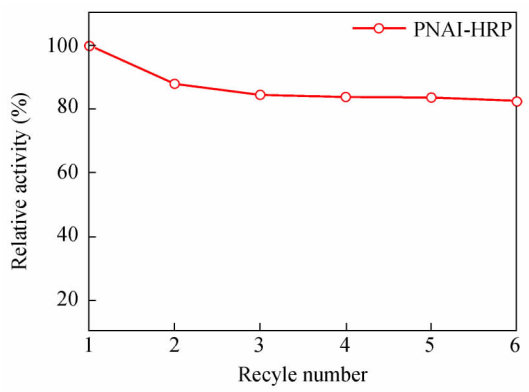


Fig. 9 Operational stability of PANI-HRP

下来的几次循环中,酶活均没有明显损失,6 次循环后固定化酶 PANI-HRP 保持了 80% 的活性.说明以聚苯胺纳米纤维为载体制备的固定化酶有较好的重复使用性,初次循环中酶活的损失可能是由于部分以物理吸附于载体表面的 HRP 的脱吸附而导致.

3 结论

本文以聚苯胺纳米纤维为载体,制备了聚苯胺固定化辣根过氧化物酶.在固定化过程中,辣根过氧化物酶起到掺杂剂的作用,负载于聚苯胺主链之上,制备方法简单方便,载体材料无需活化.与游离酶 HRP 相比,固定化 PANI-HRP 对 pH 值 and 高温的耐受能力有了大幅度的提高,4 ℃ 条件下保存 7 周后固定化 PANI-HRP 活性几乎没有损失,重复使用 6 次后仍可保持 80% 的酶活,说明纳米结构的聚苯胺是一种良好的载体,可以实现酶的高效固定化.

REFERENCES

- 1 Zuo Peng(左鹏), Yu Shaoming(于少明), Yang Jiejia(杨杰茄), Zhang Lugao(章碌高), Zhang Chi(张迟). Materials Review(材料导报), 2007, 21: 46 ~ 49
- 2 Bai Yongxiao(拜永孝), Li Yanfeng(李彦锋), Ma Yingxia(马应霞), Zhou Lincheng(周林成), Ma Pengcheng(马鹏程). Chemistry Online(化学通报), 2005, 68: 1 ~ 6
- 3 Kim J, Grate J W, Wang P. Chem Eng Sci, 2006, 61: 1017 ~ 1026
- 4 Kim U, Grate J W, Nano Lett, 2003, 3: 1219 ~ 1222
- 5 Dyal A, Loos K, Noto M, Chang S W, Spagnoli C, Shafi K, Ulman A, Cowman M, Gross R A. J Am Chem Soc, 2003, 125: 1684 ~ 1685
- 6 Kim B C, Nair S, Kim J, Kwak J H, Grate J W, Kim S H, Gu M B. Nanotechnology, 2005, 16: S382
- 7 Gill I, Pastor E, Ballesteros A. J Am Chem Soc, 1999, 121: 9487 ~ 9488
- 8 Jeykumari D R S, Narayanan S S. Biosen Bioelectron, 2008, 23: 1404 ~ 1411
- 9 Wan M X. Conducting Polymer Nanofibers. In: Nalwa H S, ed. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. Los Angeles: American Scientific Publisher, 2004
- 10 Jing Xiabin(景遐斌), Wang Lixiang(王利祥), Wang Xianhong(王献红), Geng Yanhou(耿延候), Wang Fosong(王佛松). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2005, (5): 655 ~ 663
- 11 Lee G, Kim J, Lee J H. Enzyme Microb Technol, 2008, 42: 466 ~ 472
- 12 Lee G, Joo H, Lee J H, Hongil J, Jung-heon L. J Mol Catal B: Enzymatic, 2008, 54: 116 ~ 121
- 13 Fernandes K F, Lima C S, Lopes F M, Collins C H. Process Biochem, 2004, 39: 957 ~ 962
- 14 Fernandes K F, Lima CS, Lopes F M, Collins C H. Process Biochem, 2003, 38: 1379 ~ 1384
- 15 Ding HJ, Wan MX, Wei Y. Adv Mater, 2007, 19: 465 ~ 469
- 16 Salaneck W R, Liedberg B, Inganas O, Erlandsson R, Lundstrom I, MacDiarmid A G, Halpern M, Somasiri N L D. Mol Cryst Liq Cryst, 1985, 121: 191 ~ 194
- 17 Chen S A, Lee H T. Macromolecules, 1995, 28: 2858 ~ 2866
- 18 Asturias G E, MacDiarmid A G, McCall R P, Epstein A J. Synth Met, 1989, 29: 157 ~ 162
- 19 MacDiarmid A G, Epstein A J. Synth Met, 1994, 65: 103 ~ 116
- 20 Cao Y, Li S, Xue Z, Guo D. Synth Met, 1986, 16: 305 ~ 315

Immobilization of Horseradish Peroxidase on Polyaniline Nanofibers

Hang-jun Ding^{1*}, Xiang-hua Wen², Zhou Yang¹, Huai Yang³

(¹ School of Materials Science and Engineering, University of Science & Technology Beijing, Beijing 100083)

(² Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

(³ School of Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract PANI nanofibers oxidized by FeCl_3 were employed as the supports for the immobilization of horseradish peroxidase (HRP) *via* covalent immobilization. These PANI-HRP enzymes have been characterized using scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and UV-Visible spectroscopy. SEM images show that the diameters of PANI-nanofibers are in the range of 20 ~ 30 nm. The nanofibers become larger and rough after immobilization of HRP. FTIR and UV-Vis demonstrate that horseradish peroxidase can dope into PANI supports as the dopants. This method is simple, fast, and the activation of PANI support is not necessary. The maximum amount of HRP loading on PANI is 150 $\mu\text{g}/\text{mgPANI}$ for undoped-PANI, 90 $\mu\text{g}/\text{mgPANI}$ for doped-PANI, respectively. Comparing with the free HRP, the optimum working pH, the optimum working temperature and thermal stability of PANI-HRP were significantly improved. No obvious activity loss was observed after 7 weeks storage at 4 $^{\circ}\text{C}$, and 80% of the initial activity could still remain even after 6 times usage. These results demonstrate that PANI nanofibers as a carriers for HRP enzymes have great potential applications.

Keywords Polyaniline, Nanofibers, Horseradish peroxidase, Immobilization, Enzyme activity, Stability

* Corresponding author; Hang-jun Ding, E-mail: dinghj2007@mater.ustb.edu.cn