

基于刺激响应性高分子的智能酶催化剂研究进展

张一飞, 戈 钧*, 刘 铮

(清华大学化学工程系, 工业生物催化教育部重点实验室, 北京 100084)

摘要:将刺激响应性高分子和生物酶分子相结合可设计、构建智能酶催化剂, 该类智能酶催化剂同时具备了材料对环境的响应性能和酶的催化性能, 可很好应用于可控生物催化、药物递送、分析检测、智能设备开发等新兴领域, 极大地扩展了酶催化的应用范围, 是智能生物材料研究的热点方向。本文按刺激响应类型总结了过去二十年间智能酶催化剂的研究进展, 分析了智能酶催化剂的构建方式和性能特点, 并举例介绍了其可能的应用领域。

关键词:刺激响应性高分子; 酶催化; 智能材料

引言

刺激响应性高分子在外部环境刺激下, 其自身结构或者物理化学性质能够做出相应变化, 在医疗、建筑、军事、微电子、传感器等领域有着很好的应用价值。迄今, 高分子化学家已经制备了各种性能独特的具有刺激响应性能的高分子材料。依据其外部刺激源的不同, 主要可以分为物理响应和化学响应两大类。物理响应源包括热、力、光、声、电等常见的物理作用, 化学响应源主要有 pH 值、氧化还原反应、分子识别以及酶促反应等。将这些刺激响应高分子材料与生物酶分子通过化学或物理的方式结合, 可以构建出各种具备刺激响应性能的酶催化剂, 也就是智能酶催化剂, 这一研究引起了化学、材料和生物交叉领域研究人员的广泛兴趣。现今, 研究者已经合成了对温度、外力、光照、盐浓度、pH 值、环境氧化还原性质、特异性分子等外界刺激具有响应特性的酶催化剂。这些酶催化剂同时具备了材料的刺激响应性和酶的催化活性, 为智能酶催化剂的发展和应用提供了基础。本文总结了目前已开发的基于高分子材料的刺激响应性酶催化剂, 通过这些典型的例子, 探讨了刺激响应性酶催化剂的构建方式、性能特点以及潜在的应用价值。

1 基于刺激响应性高分子材料的智能酶催化剂

1.1 温度响应性酶催化剂

温度响应性高分子能够对环境温度的变化做出反应。一般来说, 这类材料具有一个临界溶解温度: 如果升高温度, 材料由溶解状态变为不溶, 则该材料具有低临界溶解温度(LCST); 反之, 则其具有高临界溶解温度(UCST)^[1]。温敏性高分子通常具有亲水链和疏水链两个部分, 温度的变化导致高分子内部链段与溶剂相互作用的变化, 引起聚集状态的变化。典型的温敏性高分子如聚异丙基丙烯酰胺 PNIPAAm, 温度较低时, PNIPAAm 可在水溶液中溶解; 温度高于 LCST 时(如 32℃), PNIPAAm 可从溶液中沉淀出来^[2]。其它高分子材料如聚羟丙基甲基丙烯酸甲酯、环氧乙烷和环氧丙烷的无规共聚物和嵌段共聚物、聚乙烯醇衍生物、聚环氧乙烷、两性离子型聚电解质如聚-(甲基丙烯酰氧乙基二甲氨基)丙

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.09.014

收稿: 2015-06-10; 修回: 2015-06-25;

基金项目: 国家自然科学基金(21036003)及 863 计划青年科学家专题(2014AA020507);

作者简介: 张一飞(1988—), 男, 清华大学化工系博士生; 戈钧(1982—), 男, 清华大学化工系副教授; 刘铮(1964—), 男, 清华大学化工系教授;

* 通讯联系人, E-mail: junge@mail.tsinghua.edu.cn.

磺酸等也具有类似的温敏特性。

早在1990年, Hoffman及其同事^[3]就通过将异丙基丙烯酰胺与 *N*-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺共聚, 合成了具有活性酯基团的温敏性共聚物, 并将溶菌酶、蛋白 A、白蛋白、 γ -球蛋白等生物分子通过表面氨基接枝到聚合物链上。他们发现, 该温敏性共聚物的浊点在 32℃, 所接枝蛋白质的等电点、分子量以及溶液 pH 值、离子强度等对其临界温度没有明显的影响。随后, 更多的温敏性高分子-酶结合物被制备出来^[4~6]。这类接枝了温敏性高分子的酶能够很方便地通过温度刺激从溶液中沉淀出来, 实现酶催化剂的回收和重复使用。Palai 等^[7]制备了修饰有 PNIPAAm 链的 β -半乳糖苷酶, 其 LCST 为 26.5℃。通过调节体系温度, 该酶-高分子结合物在进行了 24 次沉淀(40℃)-溶解(4℃)循环操作后, 酶活仍然保持了 90% 左右, 显示了良好的可回用性与操作稳定性。PNIPAAm-胰蛋白酶结合物^[8]、PNIPAAm-葡萄糖苷酶结合物^[9]等也具有类似的性质。同样地, 具有正相温敏性的结合物也被研究用于制备酶-高分子结合物。例如, Yan 等^[10]将温敏性高分子聚(3-*N,N*-二甲基-(甲基丙烯酰氧基)丙磺酸铵)(PDMAAPS)共价连接到胰蛋白酶表面。该结合物在 60℃ 下对酪蛋白的水解活性为游离酶的 2.6 倍, 并且酶的热稳定性得到显著提升(酶活半衰期由游离酶的 4.8min 提高到 315.9min)。更重要的是, 该结合物的上临界溶解温度(UCST)是 14℃, 因此在酶催化反应完成后, 通过降低温度结合物能够有效地从催化体系中沉淀出来, 在经过 11 次的循环使用后, 酶的催化活性仍能保持了初始活性的 85% 以上。

应用于有机相酶催化的温度响应性酶催化剂近来也受到了研究者的关注。Zhu 等^[11]报道了一种具有有机相温敏性的高分子(Pluronic-F127, 聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯)-酶纳米结合物。该结合物通过醛基化的 Pluronic-F127 和酶分子间的席夫碱反应制备得到。所得到的结合物在常规反应温度下(例如 30~40℃)可溶解于常见的有机溶剂(如甲苯、四氢呋喃、甲醇等), 显著降低了有机相酶催化过程中底物的传质阻力, 使得表观酶活相比于天然酶提高了 1~2 个数量级。有机相中的正相温敏性使其能够很容易地通过降温沉淀回收。在脂肪酶-Pluronic 结合物催化合成抗癌药物戊柔比星的实例中, 其初始催化反应速率比天然酶提高了 11 倍, 且在 7 次循环催化(40℃ 反应, 4℃ 沉淀)后, 酶催化反应转化率仍能达到 80% 以上^[12]。

不同的温敏性高分子材料有着不同的临界溶解温度, 如 PNIPAAm 的 LCST 大约为 32℃, 聚(*N,N*-二乙基丙烯酰胺)的 LCST 为 25~32℃, 聚(*N*-乙基己内酰胺)的 LCST 在 25~35℃^[13]。通过共聚的方法改变温敏性高分子的组成, 可以对其原有的临界溶解温度在一定范围内进行调节, 以适应应用需求。Neradovic 等^[14]合成了一系列具有不同单体组成的 NIPAAm 和乳酸单-2-(甲基丙烯酰氧基)乙酯(HEMA-monolactate)的共聚物。研究表明, 高分子的 LCST 随着结构中 HEMA-monolactate 的摩尔比的提高而线性降低。再如, 对于聚(异丙基丙烯酰胺-甲基丙烯酸叔丁酯-甲基丙烯酸)、聚(异丙基丙烯酰胺-甲基丙烯酸叔丁酯-二乙基胺基甲基丙烯酸乙酯), 其中甲基丙烯酸、二乙基胺基甲基丙烯酸乙酯比例的增加则会导致 LCST 升高^[15]。Moji 等^[16]将异丙基丙烯酰胺与 *N*-叔丁基丙烯酰胺和 *N*-丙烯酰琥珀酰亚胺酯共聚(摩尔比为 60:40:2.5)合成了 LCST 在 7~13℃ 的三元共聚物, 并将其与抗体化学结合。该结合物室温下即可发生聚沉, 其免疫试验效果要优于抗体-PNIPAAm 结合物(LCST 为 32℃)。Lee 等^[17]合成了一系列不同单体比例的 NIPAAm 和葡萄糖基氧乙基甲基丙烯酸酯(GEMA)共聚物, 随着 GEMA 比例的升高(0~15%), 聚合物的 LCST 也持续提高且范围变宽。将具有不同 LCST 的共聚物与胰蛋白酶共价结合后, 他们发现结合物的活性-温度关系也呈现出明显的差异, 这可能是由于高分子链构象随温度的变化影响了大分子底物与酶活性位点之间的接触, 因此可以在一定范围通过温度变化对胰蛋白酶的活性进行人工调控。

在某些特殊的例子中, 温度对于酶活性的调控作用会非常明显, 甚至起到酶活“开关”的作用。牛血清白蛋白 BSA 被认为具有类酯酶的活性, 可用于催化 4-硝基苯酚乙酸酯的水解^[18]。De 等^[19]采用可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)的方法, 首先在 BSA 表面的 34 位半胱氨酸上引入链转移剂, 随后引发 NIPAAm 聚合, 得到了窄分布的 BSA-PNIPAAm 结合物。在 LCST 以下(25℃), BSA 表现出 $92 \pm 4\%$

的类酯酶活性;而在高于 LCST 温度时(40℃),活性降低到 $75 \pm 2\%$,并且这种温度调节酶活的现象是可逆的。Cummings 等^[20]通过原子转移自由基聚合(ATRP)原位接枝(Grafting from)的方法分别制备了胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin, CT)和具有 LCST 的 PNIPAAm 以及具有 UCST 的 PDMAPS 的结合物。两种结合物均保持了原聚合物的温敏特性,CT-PNIPAAm 的水力学半径在环境温度高于 LCST 时减小,聚合物塌缩,催化效率 k_{cat}/K_m 显著降低;相反地,CT-PDMAPS 在环境温度低于 UCST 时发生塌缩聚集,水力学半径减小,5℃的 k_{cat}/K_m 降低到 25℃时的 1/3 左右。

更有趣的例子是内切葡聚糖酶(endoglucanase, EG)温敏性结合物。Shimoboji 等^[5]将温敏性高分子聚(*N,N*-二甲基丙烯酰胺-*N*-4-苯偶氮-苯基丙烯酰胺)特异性地接枝在定点突变得到的 EG-12A 上,实现了对 EG-12A 活性的“开-关”调节。具体研究中,他们首先构建了酶的两个突变体,突变体 N55C 的半胱氨酸残基(见图 1a)位于该酶与底物特异结合的位点附近,而突变体 S25C 的半胱氨酸残基则远离结合位点(见图 1a)。通过突变的半胱氨酸残基与高分子端基间的化学结合物,制备了两种结合物。在温度高于 LCST(52℃)以及低于 LCST(32℃)的条件下,利用小分子底物(邻硝基苯基- β -D-纤维二糖苷)和大分子底物(羟乙基纤维素)分别测定两种结合物的酶活。研究发现,对小分子底物,连接了温敏性高分子的两种突变体在高于 LCST 时都表现出很低的活性,且接枝高分子链越长,活性越低;而在 LCST 以下则均表现出游离酶 80% 以上的活性。这表明当温度低于 LCST,聚合物链完全伸展时,对小分子底物扩散不存在明显的阻碍作用。对于大分子底物,两种突变体结合物的活性在 32℃ 下仅为游离酶的 20%~40%。当温度高于 LCST 时(52℃)两种突变体结合物的活性进一步下降,并且对于高分子结合于酶活性位点附近的 N55C 结合物,其活性下降比 S25C 结合物更为显著,这表明温度高于 LCST 时位于活性位点附近的高分子链的塌缩可能阻碍了底物与酶活性位点的接触。这种“开-关”效应对酶活的调控是可逆的。在一些特殊的情况下,即使修饰位点远离活性中心,酶的活性仍可受到调控。例如, Pennadam 等^[21]通过将 PNIPAAm 接枝到多亚基的 DNA 马达的 R 酶上(DNA 马达指 Type I 限制修饰系统,由 DNA 限制性内切酶 R 和修饰酶 M 一起组成),通过温度调控了 M 酶的活性,影响了 DNA 的甲基化过程。

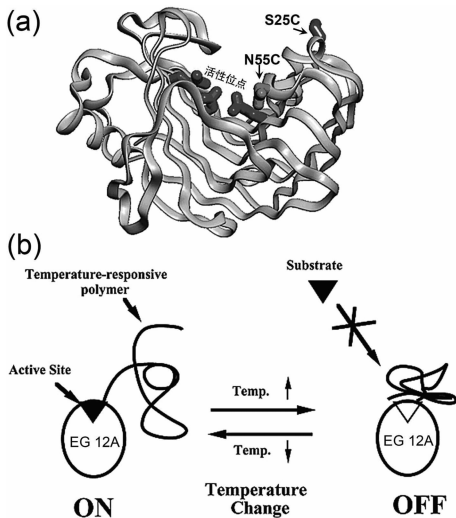


图 1 温敏性高分子对酶的活性“开-关”调控^[5]

(a)内切葡聚糖酶 EG-12A 的结构模型;(b) 温度调控酶活“开-关”的示意图。

Figure 1 On-off switch of enzymatic activity by temperature responsive polymer^[5]

(a) Molecular model of endoclucanase 12A; (b) Schematic mechanism for the on-off switch of enzymatic activity by temperature stimulus

1.2 力学响应性酶催化剂

力学响应性高分子材料通常表现为在外力作用下发生明显的形变以及其它性质的变化。许多有趣

的例子展示了力学响应材料广阔的应用前景。例如, Sun 等^[22] 制备了一种聚丙烯酰胺和海藻酸钙的双组分水凝胶, 这种水凝胶含水量在 90% 以上, 能够拉伸至原长的 20 倍左右, 断裂能高达 9000J/m²。Davis 等^[23] 设计合成了一种机械力响应的合成高分子, 通过将色素分子螺吡喃结构共聚到聚甲基丙烯酸酯中, 发现外力的拉伸导致材料发生形变, 同时使得色素分子内化学键发生断裂, 导致该材料在临近断裂时能够由黄色转变为红色, 发出“危险警报”信号。除拉伸外, 弯折、压力也是常见的力学刺激源。Tee 等^[24] 制备了一种对压力与弯折敏感的导电复合材料, 这种材料由氢键网络超分子聚合物与微米镍导电颗粒复合而成。该材料电导率高达 40S·cm⁻¹, 在受压和弯折时能引起材料电导率的变化。同时这种复合材料中的动态化学键又赋予材料自愈功能, 可用于制备智能皮肤。

将酶与具有力学响应性的高分子材料结合能够实现外力对酶活性的调控。Mertz 等^[25] 报道了第一个通过拉力调控生物分子催化活性的例子。他们采用聚赖氨酸(PLL)/透明质酸(HA)和聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDADMA)/聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)为基材, 通过层层自组装的方式将碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)包埋在自组装膜中。其中, (PLL/HA)_n 用于包埋蛋白作为“酶池”, (PDADMA/PSS)_m 作为外覆盖层(*m*, *n* 为聚阴阳离子的沉积次数)。当 PDADMA/PSS 层覆盖了“酶池”以后, 得到的[(PLL/HA)₁₅/PLL/ALP/(PLL/HA)₁₅/(PDADMA/PSS)₆]膜只有在拉伸以后才能表现出碱性磷酸酶(ALP)的活性, 且这种拉伸过程对酶活性的调控是可逆的。作者认为, 聚阳离子层的存在阻碍了底物分子荧光素二磷酸酯(FDP)与包埋于自组装膜内部的酶的接触, 而拉伸过程则将酶暴露到了膜表面, 从而“开启”了酶催化过程, 产生荧光信号。

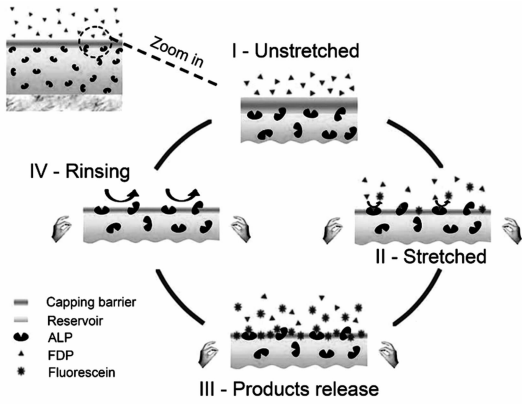


图 2 拉力对酶表现活性的可逆调控^[25]

Figure 2 The apparent enzymatic activity reversibly controlled by the external force^[25]

类似地, 可拉伸水凝胶也能够实现对酶活性的调控过程。Zhang 等^[26] 采用具有可拉伸性能的聚丙烯酰胺-海藻酸钙双组分凝胶包埋了辣根过氧化物酶(HRP)和南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB)。所制得的水凝胶能够拉伸至原来表面积的 16 倍, 包埋在凝胶中的酶所表现的催化活性随着拉伸面积的扩大而呈现线性增强。这一现象的机理主要是致密的凝胶网络阻碍了底物向凝胶内部的扩散, 从而阻碍了底物与酶的接触, 而拉伸操作可以使得更多的酶暴露到凝胶表面进行催化反应。

1.3 光响应性酶催化剂

光辐照能够引发聚合物中一些光敏性基团的分子结构变化, 导致材料某些宏观性质的改变。常见的光敏性基团主要有三苯基甲烷类、偶氮苯类、螺吡喃色素等^[27]。例如偶氮苯类化合物在紫外光照的条件下, 能够发生分子构型翻转, 由顺式异构体变为反式异构体。该结构常见于液晶材料中, 同时研究者也将这种光响应特性应用到了药物递送系统^[28]、光致分子开关与马达^[29]、可逆信号存储^[30]等领域。

具有光学响应的高分子材料与酶结合, 能够使酶催化剂在光照刺激下发生聚集状态、催化活性的变化。Ito 等^[31] 将带有螺吡喃侧链的光敏性高分子共价连接到枯草杆菌蛋白酶上。该结合物能够溶解在

甲苯中,高效地催化 *N*-乙酰-*L*-苯丙氨酸乙酯和正丙醇的转酯化反应(这种溶解态的蛋白酶的催化活性是天然酶的 100 倍)。在紫外光照射下,螺吡喃基团发生异构化形成亲水性较强的部青花结构,使得酶-高分子结合物从甲苯中沉淀,从而实现了催化剂的回收。这种光致异构反应非常迅速,仅需约 5min 就能使酶完全沉淀。Shimoboji 等^[32]展示了一种通过光照“开-关”酶活的方法。他们通过单体 *N,N*-二甲基丙烯酰胺(DMA)分别与 *N*-4-苯基偶氮苯丙烯酸酰胺(AZAAm)和 4-苯基偶氮苯丙烯酸酯(AZAA)聚合合成了 DMAAm 和 DMAA 两种光敏共聚物,并通过末端乙烯基连接到定点突变的内切葡聚糖酶 EG 12A 的巯基上。由于连接点离酶的活性中心很近,紫外/可见光照可以导致高分子聚集状态的变化,调控活性中心对底物的可及性,从而达到了对酶活的开光控制。研究发现,在 40~45℃ 范围内,紫外光照使得 EG 12A-DMAA 的高分子链疏水塌缩,酶活“关闭”,而可见光照则使得高分子链伸展溶解,活性“开启”。EG 12A-DMAAm 结合物表现出相反的光致相转变行为和酶活响应性能。结合物的酶活对光照非常敏感,响应时间在 1min 以内。类似地,这类光敏性高分子也能用于调节生物分子与其配体(如链霉素和生物素)之间的特异性识别行为^[33]。

1.4 盐浓度响应性酶催化剂

盐浓度响应特性常见于带有相反电荷的两种聚电解质的静电组装行为。盐浓度增加,易导致静电组装复合物间的相互作用被反离子竞争而屏蔽,导致静电作用减弱,复合物解离。

酶作为常见的带电生物大分子,同样能够和聚电解质发生静电相互吸引而组装。对盐浓度的响应行为主要来自于溶液中离子强度的变化引起的酶分子与材料之间静电相互作用的改变。早在 1955 年,Skarnes 等^[34]就发现溶菌酶的活性能够被酸性聚合物抑制,且能被 NaCl 重新激活。Harada 与 Kataoka^[35]将带负电荷的聚乙二醇-聚天冬氨酸嵌段聚合物[PEG-P(Asp)]与带正电荷的溶菌酶静电组装,形成了聚电解质胶束。由于溶菌酶被包埋在胶束内部,不能接触大底物微球菌,含酶胶束完全不能表现出水解活性。高浓度的 NaCl(如 150mM)能够屏蔽静电作用,导致胶束解离,使得酶活恢复。更精细的研究表明,PEG-P(Asp)与溶菌酶按计量比 1:1 形成的胶束内核约含有 36 个溶菌酶分子与 42 条 PEG-P(Asp)聚合物链^[36]。这种胶束对酶活的调控机制主要是基于聚合物胶束对大分子底物的屏蔽作用,因为其对小分子底物的水解活性不但没有被抑制,反而有所提高^[37]。进一步地,如果对该酶-胶束复合物进行戊二醛交联,胶束被固定以后,其对盐离子强度的响应性则丧失^[38]。基于同样的原理,聚电解质类材料也被用于包埋和固定胰蛋白酶^[39]、脂肪酶^[40]、细胞色素 C^[41]等多种酶,并实现酶的可控释放及活性调控。

1.5 pH 响应性酶催化剂

带有酸性官能团(如—COOH, —SO₃H)或碱性官能团(如胺类)的高分子材料常具有 pH 响应特性,典型的如聚甲基丙烯酸、聚天冬氨酸、壳聚糖、聚赖氨酸,或改性的其它材料等,它们通常具有结合或释放质子的能力,能够根据环境 pH 的不同,改变其聚集状态。此类 pH 响应性高分子材料可制备成水凝胶^[42]、薄膜^[43]、微球^[44]、纳米颗粒^[45]等不同形式,用于包埋小分子药物、蛋白、siRNA、DNA 等生物大分子,在药物递送领域有很好的应用价值^[44]。另外,pH 响应材料也可应用于酶的固定化和开发一些新奇的化学阀门^[46]和化学机械^[47]等方面。

pH 响应性高分子通常表现出随环境 pH 变化发生沉淀-溶解、收缩-溶胀等现象,这些性质很容易被应用到酶催化过程中,将 pH 响应性高分子与酶复合形成一系列功能性的酶催化剂。Zhou^[48]将纤维素酶接枝到琥珀酰壳聚糖上,得到的固定化纤维素酶的最适 pH 值和最适温度与游离酶相似。这种固定化酶能够在溶解状态下(pH 为 4.0)催化纤维素水解。调整 pH 至 3.0,固定化酶从催化体系中沉淀出来,通过简单的过滤即可实现固定化酶与产物葡萄糖的有效分离。类似地,Liang 等^[49]合成了甲基丙烯酸(MAA)、甲基丙烯酸-*N,N*-二甲氨基乙酯(DMAEMA)和甲基丙烯酸丁酯(BMA)的无规共聚物,并将其用于固定化纤维素酶。该固定化酶能够在 pH 2.5 以下沉淀回收重复使用,在重复回收了 5 次以后,该固定化酶仍然保持了 83.1% 的初始活性。一些商业化的聚丙烯酸类树脂如 Eudragit L-100 和 Eudragit S-

100 等也常用于酶的固定化,两者分别能够在 pH 为 6 和 pH 为 7 以上的介质中溶解。例如 Roy 等^[50]将木糖聚酶吸附在 Eudragit L-100 上,通过调节 pH 实现固定化酶的沉淀回收,10 次循环以后仍没有明显的失活。Silva 等^[51]将蛋白酶固定在 Eudragit S-100 上用于处理羊毛纤维,固定化蛋白酶同样显示了良好的储存稳定性和回收性能。

pH 响应除了能够实现催化剂的回收以外,在一些精巧的设计中,也能实现对酶活性的调节。Ito 等^[52]在胰蛋白酶表面生长聚甲基丙烯酸-聚甲基丙烯酸甲酯共聚物,发现该结合物中胰蛋白酶的水解活性明显受到环境 pH 的调控。Mei 等^[53]制备了海藻酸钙/鱼精蛋白/硅胶构成的三层复合微米小球(外层为刚性硅壳),小球中间物理包埋了蔗糖转化酶。当环境 pH 发生改变时,软性层中海藻酸钙网络与鱼精蛋白间的静电作用也随之变化,由此可调节微球壳层对于小分子底物和产物的可渗透性。当环境 pH 低于临界值时(如 pH 为 4),微球内的软性层不通透,阻碍了底物和产物的扩散,几乎不体现酶活;而当 pH 升高时,鱼精蛋白和海藻酸钙带相反电荷,静电吸引作用导致网络结构收缩,使得微球壁通透性提高,酶能接触到底物而催化反应。这种智能的复合壳层能够实现 pH 对酶活的可逆开关控制。Zhang 等^[54]采用原子转移自由基聚合的方法合成了聚乙二醇-聚甲基丙烯酸嵌段聚合物。该聚合物能够与带正电的溶菌酶在 pH 5 的条件下静电组装形成复合胶束。由于酶被紧密地包裹在胶束内部不能与底物接触,表观活性消失。提高溶液 pH,聚合物链上所带负电荷增加,链段间静电斥力增大,导致组装体解离,酶活恢复。Aizenberg 和其同事^[55]将环氧树脂微型翅片包埋在 pH 响应性水凝胶(丙烯酰胺/丙烯酸/丙烯酸十二酯共聚物)膜中,置于双水层的微流控装置中,翅片顶部修饰有荧光素酶(如图 3 所示)。当溶液 pH<7 时,翅片呈弯曲倒伏状态,荧光素酶不能接触到上水层中的底物。当 pH 增大时,凝胶发生溶胀导致翅片直立起来,顶部的荧光素酶接触底物产生肉眼可见的荧光。这一过程不仅实现了环境 pH 对酶活的可逆开关控制,还展示了化学信号→力学信号→化学信号的响应过程。

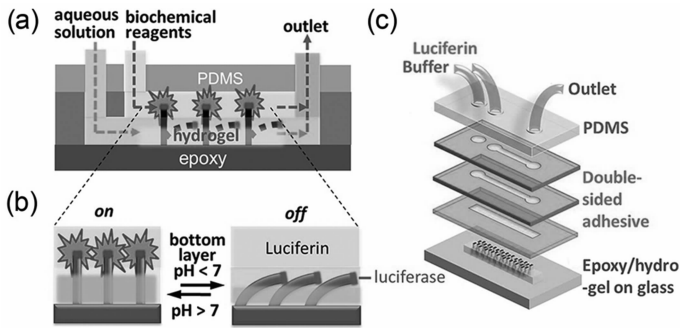


图 3 利用 pH 响应性水凝胶的形变“开关”酶促反应的微流控装置

(a) 装置主视图;(b) pH 可逆调控酶活开关示意图;(c) 微流控装置的组装方式^[55]

Figure 3 Microfluidic apparatus for the pH triggered oscillation of the enzymatic reaction using a pH-responsive hydrogel
(a) Side-view of schematic of oscillating bioluminescence reactor; (b) Close-up of schematic showing the reversible “on-off” switching of enzymatic activity; (c) Fabrication of the microfluidic device with aqueous bilayer^[55]

1.6 电场响应性酶催化剂

聚电解质、导电聚合物等材料对电流或电场的变化非常敏感,能够在电刺激下产生收缩、溶胀、弯曲等形态变化。Hamlen 等^[56]报道了第一例聚电解质凝胶在电场中的形变。这种凝胶由聚乙烯醇与聚甲基丙烯酸共聚合成,可以依据内部离子强度的不同发生溶胀或收缩。他们将该材料负载在阳极上,置于 NaCl 溶液中,在直流电场的作用下,材料会发生规律地收缩。Ge 等^[57]合成了装载有药物的聚吡咯导电高分子,然后辅以温敏性的水凝胶(PLGA-PEG-PLGA)对小鼠进行皮下注射。在电场的刺激下,药物释放速率与电压正相关,可用于体内药物释放的程序控制。

电场响应的高分子材料与酶复合,能够实现外加电场对酶的表现活性的调控。Harada 等^[58]研究了

溶菌酶与 PEG-P(Asp)形成的复合胶束在电场下的催化行为。研究发现,当外加电场小于 50V/cm 时,胶束中的溶菌酶表现了高催化活性;当外加电压大于 63V/cm 时,活性几乎完全消失。这种酶-聚电解质复合胶束的活性变化对电场变化的响应非常迅速,几乎不存在延迟。这种活性的调控机制可能是电场导致胶束核心的微环境发生变化而引起的。

1.7 氧化还原响应性酶催化剂

氧化还原反应响应材料中通常含有对环境氧化还原性敏感的化学键或化学基团,常见的包括二硫键^[59, 60]、二硒键^[61]、二茂铁^[62],或其它易被氧化/还原的基团^[63]等。通常将这类材料制备成凝胶或胶束,在加入氧化剂或还原剂以后,发生解离,使包埋在其中的物质释放出来,常用在药物递送过程中。

对环境氧化还原性敏感的酶催化剂亦有零星的报道。早在 1993 年, Ito 等^[52]就报道了一种能根据环境氧化还原性质可逆溶解-沉淀的酶催化剂。他们从胰蛋白酶表面接枝生长出还原性敏感的聚-3-氨甲酰-1-(对乙烯苄基)吡啶盐酸盐(PCVPC),得到了胰蛋白酶-PCVPC 结合物。如图 4 所示^[64],该高分子能够可逆地响应溶液的氧化还原条件,在水中溶解或沉淀。当溶液中存在还原性物质 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 时,结合物不溶于水,酶活几乎为零。在溶液中加入 H_2O_2 后,结合物溶解,但由于 H_2O_2 的强氧化性对酶的伤害,重新溶解后的酶的活性仅为原来的 60%左右,更多的循环还会导致酶活进一步下降。氧化环境对酶的毒性限制了该方法进一步的发展和应用。

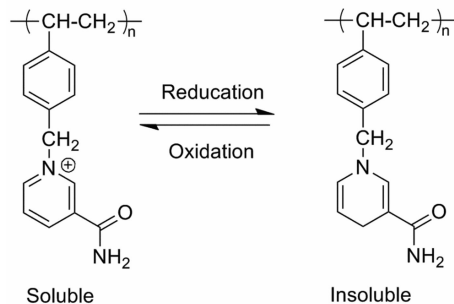


图 4 PCVPC 对环境氧化还原性质响应的分子机制^[64]

Figure 4 Molecular mechanism of PCVPC responsive to the environmental oxidoreduction property^[64]

二硫键是另一类常见的氧化还原响应官能团。游离巯基在氧化环境中可缩合成二硫键,而还原性试剂的存在又能使得二硫键解离。通常认为细胞内环境中含有的谷胱甘肽能够还原二硫键,可用于细胞内药物递送。一个有趣的例子是二硫键交联的肝素-Pluronic F127 纳米凝胶用于递送核糖核酸酶 A(RNA 酶 A)^[65]。具体研究中,首先将羧基化的 Pluronic F127 与肝素共价连接,并进一步在肝素分子上接枝巯基。然后,利用 RNA 酶 A 与肝素间的特异性亲和作用,将其负载到肝素-Pluronic 结合物上,并通过氧气氧化巯基形成二硫键从而制备纳米级凝胶。这种凝胶生物安全性好,酶负载量高达 81.8%,并且能够在胞内环境中实现二硫键的还原解离,从而可控释放包埋的酶分子,为蛋白类药物的递送提供了一种有效方式。

1.8 分子响应性酶催化剂

利用分子间的特异性识别,可以设计制备具有精确结构和特殊功能的材料。例如, DNA 互补链是一种天然的分子识别模式;环糊精的空腔能够识别大小和极性适合的分子或基团(如萘环,硝基苯,二茂铁等)^[66, 67];葫芦脲类化合物能够与金刚烷、脂肪族胺、紫晶等分子结合形成主客体配合物^[68];抗原与抗体,酶与底物和其抑制剂都有很强的特异性相互作用;苯硼酸类化合物与葡萄糖可特异性地结合^[69]。这些分子间相互作用可用于构建组成不同、性能各异的刺激响应性材料的组装体,如纳米颗粒、水凝胶、聚合物微球等。当体系中存在竞争性结合的分子,或环境条件发生变化时,组装体可发生溶胀、解离、聚沉等变化。这些性质可用于化学传感、药物递送、分子开关等领域^[70]。

另一类有趣的小分子响应见于 pH 敏感性高分子与葡萄糖氧化酶(GOx)的复合体系。GOx 能够氧化葡萄糖为葡萄糖酸,导致体系 pH 值的降低,从而引起 pH 敏感性高分子的收缩或溶胀。这种响应特性提供了一种新型的胰岛素按需给药机制,受到广泛关注^[71~73]。Horbett 等^[74]将 GOx 共价固定在甲基丙烯酸羟乙与聚甲基丙烯酸 *N,N*-二甲氨基乙酯的共聚物[Poly(HEMA-DMAEMA)]水凝胶膜中。当环境中的葡萄糖浓度升高时,酶促反应发生,葡萄糖转化为葡萄糖酸,pH 值的降低引起了二甲氨基的质子化,从而使得凝胶网络内的静电斥力增加,膜孔增大,胰岛素的渗透性增加,实现了控制胰岛素给药的目的。聚羧酸类高分子同样具有类似的功能。Peppas 及其同事^[72,75]在聚乙二醇-聚甲基丙烯酸共聚水凝胶中包埋了 GOx。酶促反应引起的 pH 降低导致凝胶收缩,使得胰岛素能够被泵出。过氧化氢酶的引入能够提高 GOx 的反应速率,从而进一步增强载体材料对葡萄糖的响应速率^[76]。这类小分子响应的刺激响应过程巧妙利用了酶对目标分子的特异性识别,能够实现智能和定量给药。

酶响应是一类特殊的分子响应机制,其机制是利用酶对底物的特异性反应。酶响应的材料中通常具有与酶促反应相关的基团,对体系中存在特异的酶非常敏感。这种响应最常见于精巧设计的药物递送系统中,利用酶与底物之间的反应,可以快速、灵敏、特异地切断材料中的某种化学键,从而使得递送载体崩解,释放载体中包含的药物。例如 Wang 等^[77]用双亲水性聚合物(单甲氧基聚乙二醇-嵌段-聚赖氨酸盐酸盐)和三磷酸腺苷(ATP),通过静电自组装构成了大小为 70~80nm 左右的纳米颗粒。这种纳米颗粒装载了小分子药物,在牛小肠碱性磷酸酶的作用下,由于 ATP 被水解,这一纳米颗粒解离,释放出药物。更有趣的是,这类材料还可用于酶分子的可控释放。例如 Ge 等^[78]制备了一种以葡聚糖癸酸酯为基材的自组装纳米颗粒,并包埋了辣根过氧化物酶分子。这种材料能够被脂肪酶快速水解,释放包埋的酶分子,且释放速率与外加脂肪酶活单位相关。

2 智能酶催化剂应用

2.1 生物催化

上文介绍的许多外源刺激,如温度、光、pH、氧化还原等,均能用于实现酶催化剂从反应体系中的有效分离,为酶催化剂的回收重复使用提供了新途径。一般来说,光作为外源刺激对酶的活性影响较小,极端的 pH、氧化还原条件等容易导致酶的失活。目前为止,工业上利用刺激响应过程回收酶催化剂的例子还不多见,更多是见于文献报道。另一方面,通过这些外源刺激,能够很方便地调控底物与酶的接触,从而调控酶的表现活性。本综述第一部分已经介绍了大量的利用刺激响应过程回收酶催化剂和调控活性的例子,在此不再赘述。

2.2 药物递送

刺激响应性高分子材料具有对环境的响应特性,而酶则能够精确识别特异性底物,发挥催化性能。刺激响应性高分子与酶的复结合,使得这类材料同时具备了对外源刺激和特异性靶点的双重识别能力,提供了一种能够精确控制药物在体内的递送与释放的新方式,因此受到广泛的关注。

一方面,刺激响应性高分子和酶的组合可以用于药物的精确可控释放。例如,上文已经介绍过的 pH 响应性聚合物与 GOx 复合的例子中^[71~76],通过酶对葡萄糖的特异性催化反应,改变聚合物的物理状态,实现了对胰岛素的按需释放。另一方面,一些酶分子本身作为蛋白类药物,可以用于治疗某些特定的疾病,如蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶可用于治疗消化不良,青霉素酶可用于青霉素引起的过敏反应。刺激响应型材料也可用于对酶分子本身的递送。例如,Yan 等^[79]将多种蛋白和酶(如绿色荧光蛋白、牛血清白蛋白、辣根过氧化物酶、超氧化物歧化酶等)制成纳米凝胶,进行了体内蛋白药物递送过程的研究。得益于在交联剂的分子结构中引入了在酸性环境中可降解的基团,经过内吞作用进入到胞内的含酶纳米凝胶能够在偏酸性环境(pH~5.5)中水解释放出目标酶分子。

刺激响应性材料控制的酶的递送和酶活调控还可用于小分子前体药物的靶向递送。Tamura 等^[80]

利用多聚准轮烷(由环糊及穿过环糊精空腔的聚乙二醇链构成,环糊精侧链修饰带正电的 N,N -二甲氨基丙烯酸乙酯)通过静电作用与带负电的 β -半乳糖苷酶形成复合物,这种复合物中的酶活仅为游离酶的 30%~40%。由于多聚准轮烷末端含有二硫键,当复合物被递送到胞内时,环境中含有的还原性物质(如谷胱甘肽)等会裂解二硫键,导致多聚准轮烷分解,从而释放出具有完全活性的 β -半乳糖苷酶。在体内给药实验中,他们采用无毒的前体药物——5-氟尿嘧啶核苷-5'- O - β -D-半乳糖苷给药。胞内释放的 β -半乳糖苷酶能够水解半乳糖苷键,产生毒性较强的治疗药物 5-氟尿嘧啶核苷,从而实现了药物的可控释放。

2.3 分析检测与传感器件

酶促反应常常会引起电荷、pH、离子强度等状态发生变化,这些变化作为外源刺激可以使得刺激响应性材料产生相应的物理化学性质改变。这种特性能够利用酶促反应的专一性和高效性,将酶对目标分子的特异性识别转换为对刺激响应性材料的外源刺激,最终经过材料将外源刺激转化为放大的二次物理或化学信号。基于此原理研究者开发了一系列分析传感器件,这种酶和刺激响应性材料的结合使得检测过程可能同时具有很好的专一性和灵敏度。

Endo 等^[81]将葡萄糖氧化酶 GOx 与银纳米粒子固定化在 pH 响应性水凝胶(部分水解羧化的聚丙烯酰胺)中。GOx 催化葡萄糖生成葡萄糖酸导致 pH 变化,引发凝胶溶胀,银纳米粒子间距增大,引起局域表面等离子体共振(LSPR)峰强度降低。该方法灵敏度很高,能够检测到最低 10pM 的葡萄糖。Arunbabu 等^[82]将脲酶共价固定在聚合晶体胶体阵列中(polymerized crystalline colloidal array, PCCA)中,制成了能够探测重金属汞的传感器。他们所采用的 PCCA 是由聚丙烯酰胺凝胶包埋单分散的光散射晶体胶体阵列(带电聚苯乙烯颗粒)而形成。他们将聚丙烯酰胺凝胶在碱性条件下水解,产生的羧基用于固定化脲酶,同时还有部分羧基剩余。当环境中存在尿素时,脲酶催化尿素水解成 HCO_3^- 和 NH_4^+ ,屏蔽了 PCCA 凝胶网络中的静电斥力,导致 PCCA 体积收缩,从而引起其特征衍射波长的蓝移。由于脲酶活性受到汞离子的强烈抑制,汞离子的存在会导致衍射蓝移现象明显减弱,因此可以用于汞离子的检测。利用该方法最低能够测到 1ppb 浓度的汞离子,并且具有良好的离子选择性。利用类似的原理,Walker 等^[83]将乙酰胆碱酯酶与聚合胶体晶体阵列材料相结合,建立了有机磷化合物的高专一性和高灵敏度检测方法,对农药分子对硫磷的检测限低至 4.26fM。

另一方面,许多智能酶催化剂的活性能够对外源刺激做出响应,这种酶活的变化即可以反映环境信号的变化,作为检测的依据。基于此原理,亦有大量的分析传感方法的报道。例如,Miranda 等^[84]介绍了一种检验待测溶液中极低浓度蛋白的方法。他们用季铵封端的聚乙二醇寡聚物修饰金纳米粒子,并与带负电的 β -半乳糖苷酶通过静电吸附组装,组装的复合体的催化活性完全被抑制。当溶液中含有竞争性吸附的其它带检测蛋白时,金纳米粒子从 β -半乳糖苷酶表面脱除,酶活恢复并水解底物 4-甲基伞形酮酰- β -D-吡喃葡萄糖酸苷,产生荧光信号。该方法灵敏性很高,能检测浓度低至 1nM 的目标蛋白。

刺激响应性材料还能用于含酶传感元件的再生。Xiong 等^[85]设计了一种可再生的,基于 PNIPAAm 和 GOx 的葡萄糖微流控生物传感器。他们在微反应器中原位聚合形成了多孔 PNIPAAm 整体柱,通过疏水作用吸附 GOx,实现对葡萄糖浓度的检测。当传感器中的 GOx 经过长期使用而失活后,通过改变温度调节多孔 PNIPAAm 整体柱至相对亲水的状态,即可较容易洗去失活的 GOx,从而再用于吸附新的 GOx 分子,实现了含酶传感元件的再生。

2.4 其它应用

除了以上介绍的在生物催化、药物递送和分析检测方面的应用之外,刺激相应性高分子与酶分子的结合还被用于构建许多新奇的智能系统。例如,通过刺激响应的材料来包埋酶分子,能够达到类似逻辑门的效果。Motornov 等^[86]以 pH 响应性的嵌段聚合物刷 PS- b -P4VP- b -PEO 修饰的纳米颗粒为基材,结合 GOx 和酯酶(Est)的反应特性,实现了“或”门。PS- b -P4VP- b -PEO 修饰的纳米颗粒能够作为皮克林乳液的乳化剂,在这种乳化系统中,根据颗粒表面亲疏水性的不同,能够稳定形成 W/O 或 O/W 的乳液。GOx 和 Est 均能独立地使体系 pH 降低,引起 PS- b -P4VP- b -PEO 的亲水性增强,进而使乳液由 W/O 变

为 O/W。利用类似的原理,联合使用 GOx 和蔗糖转化酶,则能实现“与”门(蔗糖转化酶转化蔗糖产生葡萄糖,GOx 再与葡萄糖反应而降低体系 pH)。Sengupta 等^[87]利用带正电的水凝胶吸附多种酶,利用反应产生的热作为驱动力,构建了酶促反应驱动的微泵。在其它方面,刺激相应性高分子与酶分子的结合也初步展现出了诱人的前景。例如,在微通道中,将酶对底物的选择性和刺激响应性材料的溶胀-收缩相结合,将有可能设计出具有分子特异性识别的通道开关元件。将酶对底物类似物的识别与刺激响应性高分子的相变分离性能相结合,将有可能开发出新型的生物分离材料。总之,结合刺激响应性高分子和酶具有的独特而优异的性能,能够构建多种智能材料,更多具有前景的应用正等待人们进一步发掘^[88]。

3 结束语

过去二十多年间,随着高分子科学和生物化学的发展和交叉融合,涌现了一系列结构巧妙、功能独特的新型智能复合材料。刺激响应性高分子和生物酶分子的复合正是其中的一类典型代表。刺激响应性高分子的多样性、功能性特别是刺激响应性赋予了酶催化剂许多其本身并不具备的特性,丰富了酶催化过程的调控手段,特别是为实现酶催化的人工控制提供了可能,从而极大拓展了酶催化的应用范围。其中,刺激相应性高分子-酶复合智能催化剂已经在生物催化、药物递送、分析检测等应用领域中崭露头角,很有可能开发出具有突破性的方法和技术,在科学研究和实际应用中均具有重要的意义。

致谢 本工作承蒙国家自然科学基金(21036003)及 863 计划青年科学家专题(2014AA020507)支持,特此致谢!

参考文献:

- [1] Seuring J, Agarwal S. *Macromol Rapid Commun*, 2012, 33 (22): 1898~1920.
- [2] Schild H G. *Prog Polym Sci*, 1992, 17 (2): 163~249.
- [3] Chen J P, Yang H J, Hoffman A S. *Biomaterials*, 1990, 11 (9): 625~630.
- [4] Hoffman A S, Stayton P S, Shimoboji T, Chen G, Ding Z, Chilkoti A, Long C, Miura M, Chen J, Park T, Monji N, Cole C A, Harris J M, Nakamae K. *Macromol Symp*, 1997, 118: 553~563.
- [5] Shimoboji T, Larenas E, Fowler T, Hoffman A S, Stayton P S. *Bioconjug Chem*, 2003, 14 (3): 517~525.
- [6] Park T G, Hoffman A S. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1993, 4 (5): 493~504.
- [7] Palai T, Kumar A, Bhattacharya P K. *Enzyme Microb Technol*, 2014, 55: 40~49.
- [8] Ding Z, Chen G, Hoffman A S. *J Biomed Mater Res*, 1998, 39 (3): 498~505.
- [9] Chen G, Hoffman A S. *Bioconjug Chem*, 1993, 4 (6): 509~514.
- [10] Yan M, Ge J, Dong W, Liu Z, Ouyang P. *Biochem Eng J*, 2006, 30 (1): 48~54.
- [11] Zhu J, Zhang Y, Lu D, Zare R N, Ge J, Liu Z. *Chem Commun*, 2013, 49 (54): 6090~6092.
- [12] Zhang Y, Dai Y, Hou M, Li T, Ge J, Liu Z. *RSC Adv*, 2013, 3 (45): 22963~22966.
- [13] Ward M A, Georgiou T K. *Polymers(Basel)*, 2011, 3 (3): 1215~1242.
- [14] Neradovic D, Hinrichs W L J, Kettenes-van den Bosch J J, Hennink W E. *Macromol Rapid Comm*, 1999, 20 (11): 577~581.
- [15] Feil H, Bae Y H, Feijen J, Kim S W. *Macromolecules*, 1993, 26 (10): 2496~2500.
- [16] Monji N, Cole C A, Hoffman A S. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1994, 5 (5): 407~420.
- [17] Lee H, Park T G. *Biotechnol Prog*, 1998, 14 (3): 508~516.
- [18] Tildon J T, Ogilvie J W. *J Biol Chem*, 1972, 247 (4): 1265~1271.
- [19] De P, Li M, Gondi S R, Sumerlin B S. *J Am Chem Soc*, 2008, 130 (34): 11288~11289.
- [20] Cummings C, Murata H, Koepsel R, Russell A J. *Biomaterials*, 2013, 34 (30): 7437~7443.
- [21] Pennadam S S, Lavigne M D, Dutta C F, Firman K, Mernagh D, Gorecki D C, Alexander C. *J Am Chem Soc*, 2004, 126 (41): 13208~13209.
- [22] Sun J Y, Zhao X, Illeperuma W R, Chaudhuri O, Oh K H, Mooney D J, Vlassak J J, Suo Z. *Nature*, 2012, 489 (7414): 133~136.
- [23] Davis D A, Hamilton A, Yang J, Cremer L D, Van Gough D, Potisek S L, Ong M T, Braun P V, Martinez T J, White S R, Moore J S, Sottos N R. *Nature*, 2009, 459 (7243): 68~72.
- [24] Tee B C, Wang C, Allen R, Bao Z. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7 (12): 825~832.

- [25] Mertz D, Vogt C, Hemmerle J, Mutterer J, Ball V, Voegel J C, Schaaf P, Lavallo P. *Nat Mater*, 2009, 8 (9): 731~735.
- [26] Zhang Y, Chen Q, Ge J, Liu Z. *Chem Commun*, 2013, 49 (84): 9815~9817.
- [27] Jochum F D, Theato P. *Chem Soc Rev*, 2013, 42 (17): 7468~7483.
- [28] Mei X, Yang S, Chen D, Li N, Li H, Xu Q, Ge J, Lu J. *Chem Commun*, 2012, 48 (80): 10010~10012.
- [29] Katsonis N, Lubomska M, Pollard M M, Feringa B L, Rudolf P. *Prog Surf Sci*, 2007, 82 (7/8): 407~434.
- [30] Shishido A. *Polym J*, 2010, 42 (7): 525~533.
- [31] Ito Y, Sugimura N, Kwon O H, Imanishi Y. *Nat Biotechnol*, 1999, 17 (1): 73~75.
- [32] Shimoboji T, Larenas E, Fowler T, Kulkarni S, Hoffman A S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (26): 16592~16596.
- [33] Shimoboji T, Ding Z, Stayton P S, Hoffman A S. *Bioconjug Chem*, 2002, 13 (5): 915~919.
- [34] Skarnes R C, Watson D W. *J Bacteriol*, 1955, 70 (1): 110~112.
- [35] Harada A, Kataoka K. *J Am Chem Soc*, 1999, 121 (39): 9241~9242.
- [36] Harada A, Kataoka K. *Macromolecules*, 1998, 31 (2): 288~294.
- [37] Harada A, Kataoka K. *J Control Release*, 2001, 72 (1/3): 85~91.
- [38] Yuan X F, Yamasaki Y, Harada A, Kataoka K. *Polymer*, 2005, 46 (18): 7749~7758.
- [39] Kawamura A, Harada A, Kono K, Kataoka K. *Bioconjug Chem*, 2007, 18 (5): 1555~1559.
- [40] Lindhoud S, de Vries R, Schweins R, Stuart M A C, Norde W. *Soft Matter*, 2009, 5 (1): 242~250.
- [41] Liang L, Yao P, Jiang M. *Biomacromolecules*, 2006, 7 (6): 1829~1835.
- [42] Krogsgaard M, Behrens M A, Pedersen J S, Birkedal H. *Biomacromolecules*, 2013, 14 (2): 297~301.
- [43] Yusan P, Tuncel I, Butun V, Demirel A L, Erel-Goktepe I. *Polym Chem-UK*, 2014, 5 (12): 3777~3787.
- [44] Liu W, Selomulya C, Chen X D. *Biochem Eng J*, 2013, 81: 177~186.
- [45] Zhou K, Wang Y, Huang X, Luby-Phelps K, Sumer B D, Gao J. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50 (27): 6109~6114.
- [46] Zhai L, Nolte A J, Cohen R E, Rubner M F. *Macromolecules*, 2004, 37 (16): 6113~6123.
- [47] Park J Y, Oh H J, Kim D J, Baek J Y, Lee S H. *J Micromech Microeng*, 2006, 16 (3): 656~663.
- [48] Zhou J. *J Agric Food Chem*, 2010, 58 (11): 6741~6746.
- [49] Liang W, Cao X. *Bioresour Technol*, 2012, 116: 140~146.
- [50] Roy I, Gupta A, Khare S K, Bisaria V S, Gupta M N. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61 (4): 309~313.
- [51] Silva C J S M, Zhang Q, Shen J, Cavaco-Paulo A. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39 (4): 634~640.
- [52] Ito Y, Kotoura M, Chung D J, Imanishi Y. *Bioconjug Chem*, 1993, 4 (5): 358~361.
- [53] Mei L, Xie R, Yang C, Ju X J, Wang J Y, Zhang Z, Chu L Y. *J Membrane Sci*, 2013, 429: 313~322.
- [54] Zhang Y, Han K, Lu D, Liu Z. *Soft Matter*, 2013, 9 (36): 8723~8729.
- [55] He X, Friedlander R S, Zarzar L D, Aizenberg J. *Chem Mater*, 2013, 25 (4): 521~523.
- [56] Hamlen R P, Kent C E, Shafer S N. *Nature*, 1965, 206 (4989): 1149~1150.
- [57] Ge J, Neofytou E, Cahill T J, Beygui R E, Zare R N. *ACS Nano*, 2012, 6 (1): 227~233.
- [58] Harada A, Kataoka K. *J Am Chem Soc*, 2003, 125 (50): 15306~15307.
- [59] Wen Y, Zhang Z, Li J. *Adv Funct Mater*, 2014, 24 (25): 3874~3884.
- [60] Jeanmaire D, Laliturai J, Almalik A, Carampin P, dArcy R, Lallana E, Evans R, Winpenny R E P, Tirelli N. *Polym Chem-UK*, 2014, 5 (4): 1393~1404.
- [61] Ma N, Li Y, Xu H, Wang Z, Zhang X. *J Am Chem Soc*, 2010, 132 (2): 442~443.
- [62] Nakahata M, Takashima Y, Yamaguchi H, Harada A. *Nat Commun*, 2011, 2:511.
- [63] Wang C, Guo Y, Wang Y, Xu H, Zhang X. *Chem Commun*, 2009, (36): 5380~5382.
- [64] Ito Y, Nishi S, Park Y S, Imanishi Y. *Macromolecules*, 1997, 30 (19): 5856~5859.
- [65] Nguyen D H, Choi J H, Joung Y K, Park K D. *J Bioact Compat Pol*, 2011, 26 (3): 287~300.
- [66] Schmidt B V K J, Hetzer M, Ritter H, Barner-Kowollik C. *Prog Polym Sci*, 2014, 39 (1): 235~249.
- [67] Chen G, Jiang M. *Chem Soc Rev*, 2011, 40 (5): 2254~2266.
- [68] Assaf K I, Nau W M. *Chem Soc Rev*, 2015, 44 (2): 394~418.
- [69] Zhang C, Losego M D, Braun P V. *Chem Mater*, 2013, 25 (15): 3239~3250.
- [70] Liao X, Chen G, Jiang M. *Polym Chem-UK*, 2013, 4 (6): 1733~1745.
- [71] Zhang K, Wu X Y. *J Control Release*, 2002, 80 (1/3): 169~178.
- [72] Hassan C M, Doyle F J, Peppas N A. *Macromolecules*, 1997, 30 (20): 6166~6173.
- [73] Miyata T, Urugami T, Nakamae K. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54 (1): 79~98.

- [74] Cartier S, Horbett T A, Ratner B D. J Membrane Sci, 1995, 106 (1/2): 17~24.
- [75] Parker R S, Doyle F J, Peppas N A. IEEE Trans Biomed Eng, 1999, 46 (2): 148~157.
- [76] Gu Z, Dang T T, Ma M, Tang B C, Cheng H, Jiang S, Dong Y, Zhang Y, Anderson D G. ACS Nano, 2013, 7 (8): 6758~6766.
- [77] Wang C, Chen Q, Wang Z, Zhang X. Angew Chem Int Ed Engl, 2010, 49 (46): 8612~8615.
- [78] Ge J, Lu D, Yang C, Liu Z. Macromol Rapid Comm, 2011, 32 (6): 546~550.
- [79] Yan M, Du J, Gu Z, Liang M, Hu Y, Zhang W, Priceman S, Wu L, Zhou Z, Liu Z, Sequira T, Tang Y, Lu Y. Nat Nanotechnol, 2010, 5 (1): 48~53.
- [80] Tamura A, Ikeda G, Seo J H, Tsuchiya K, Yajima H, Sasaki Y, Akiyoshi K, Yui N. Sci Rep-UK, 2013, 3: 2252.
- [81] Endo T, Ikeda R, Yanagida Y, Hatsuzawa T. Anal Chim Acta, 2008, 611 (2): 205~211.
- [82] Arunbabu D, Sannigrahi A, Jana T. Soft Matter, 2011, 7 (6): 2592~2599.
- [83] Walker J P, Asher S A. Anal Chem, 2005, 77 (6): 1596~1600.
- [84] Miranda O R, Chen H T, You C C, Mortenson D E, Yang X C, Bunz U H, Rotello V M. J Am Chem Soc, 2010, 132 (14): 5285~5289.
- [85] Xiong M, Gu B, Zhang J, Xu J J, Chen H Y, Zhong H. Biosens Bioelectron, 2013, 50: 229~234.
- [86] Motornov M, Zhou J, Pita M, Tokarev I, Gopishetty V, Katz E, Minko S. Small, 2009, 5 (7): 817~820.
- [87] Sengupta S, Patra D, Ortiz-Rivera I, Agrawal A, Shklyaev S, Dey K K, Cordova-Figueroa U, Mallouk T E, Sen A. Nat Chem, 2014, 6 (5): 415~422.
- [88] Cobo I, Li M, Sumerlin B S, Perrier S. Nat Mater, 2015, 14 (2): 143~159.

Recent Advancement of Smart Enzyme Catalysts Based on Stimulus-Responsive Polymers

ZHANG Yi-fei, GE Jun* , LIU Zheng

(*Department of Chemical Engineering , Key Laboratory of Industrial Biocatalysis of Ministry of Education , Beijing 100084, China*)

Abstract: The combination of stimulus-responsive polymers and enzymes results in the construction of smart enzyme catalysts which have both the environment responsiveness and catalytic properties. The smart enzyme catalysts hold great promise for broad applications in the fields of controllable biocatalysis, drug delivery, biosensing, intelligent devices and other emerging research fields. In this review we will introduce the recent advances of the smart enzyme catalysts, including the design and preparation, the unique features, and the promising applications of such smart enzyme catalysts.

Key words: Stimulus-responsive polymer; Enzymatic catalysis; Smart materials