



## Synteza polimerów z użyciem enzymów

Gabriel Rokicki

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, Warszawa

### Enzyme – mediated polymer synthesis

#### Summary

Enzyme – mediated polymer synthesis in non-natural environments has significantly expanded in scope and impact over the past 10 years. This review focuses on a rapidly expanding research activity where *in vitro* enzyme catalysis is used for the synthesis of polyesters, polycarbonates, polyphenols, vinyl polymers, as well as natural and artificial oligosaccharides like cellulose, amylose, xylan, and chitin. The inclination to use enzymes for polymer synthesis has been fuelled by a desire to carry out these reactions in the absence of heavy metal-based catalysts, under mild conditions and with high selectivity. The aspects of this work that include enzyme-catalyzed step-growth polycondensation, chain-growth ring-opening polymerizations, oxidation polymerization and corresponding transesterification of macromolecular substrates are discussed. The polymerization utilizes mainly hydrolases and oxidoreductases as catalysts. Characteristic features of enzymatic polymerizations are also discussed.

#### Key words:

enzymatic polymerization, enzymatic polycondensation, polyesters, polycarbonates, polyphenols, oligosaccharides.

### 1. Wstęp

Enzymy od wieków stosowane są w różnych dziedzinach działalności człowieka, np. w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, skórzanym. Pierwsze, świadome zastosowania izolowanych enzymów miało miejsce w XIX w., jednak dopiero w drugiej połowie XX w. w pełni rozwinęła się technologia wyodrębniania enzymów. Do dziś poznano już ponad 3500 enzymów.

Zastosowanie enzymów jako biokatalizatorów w syntezie organicznej wiąże się z przeniesieniem ich z naturalnego środowiska

#### Adres do korespondencji

Gabriel Rokicki,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Warszawska,  
ul. Noakowskiego 3,  
00-664 Warszawa.

---

#### biotechnologia

2 (69) 48–68 2005

do bardzo odmiennych warunków, w których używa się ich w reakcjach różnych związków chemicznych, nie będących naturalnymi substratami. Jednakże rozwijająca się ostatnio bioinżynieria pozwala na otrzymanie zmodyfikowanych enzymów o zwiększonej stabilności i stereoselektywności.

Z chemicznego punktu widzenia enzymy mają wiele zalet. Szybkość reakcji w obecności enzymu może być  $10^9$ - $10^{15}$  razy większa niż szybkość reakcji w tych samych warunkach bez użycia enzymu. Enzymy są chemo-, regio-, stereo- i enancjoselektywne, można nimi zastąpić drogie i trudne w użyciu katalizatory, jak np. toksyczne kompleksy metali. Zużyte enzymy są nietoksyczne dla środowiska i łatwo ulegają biodegradacji.

Wiele jest informacji dotyczących typowych procesów chemicznych z udziałem enzymów, natomiast zastosowanie enzymów w polimeryzacji i polikondensacji notuje się od stosunkowo niedawna, chociaż wiadomo, że polimery naturalne wytwarzane są *in vivo* z udziałem enzymów.

Najczęściej wykorzystywanymi enzymami w reakcjach prowadzących do związków wielkocząsteczkowych są lipazy. Ponad 100 lat minęło od czasu gdy mikrobiolog Eijkmann doniósł, że bakterie mogą produkować i wydzielać lipazy. Dzisiaj wiadomo, że lipazy są aktywne nie tylko w układach wodnych, ale także w rozpuszczalnikach organicznych. Enzymy te wykazują wyjątkową chemo-, regio- i stereoselektywność, dlatego też stały się atrakcyjnymi katalizatorami w chemii organicznej. Możliwość wykorzystania do ich wytwarzania mikroorganizmów, takich jak grzyby i bakterie sprawia, że obecnie są one dostępne w dużych ilościach. Struktura krystaliczna niektórych lipaz jest już określona, co pozwala z kolei na rozwój różnych strategii katalitycznych z ich udziałem. Na koniec, lipazy nie wymagają stosowania kofaktorów, jak również są na tyle selektywne, że ograniczają udział reakcji ubocznych. Wszystko to czyni lipazy najwszechstronniejszą grupą biokatalizatorów stosowanych w chemii organicznej.

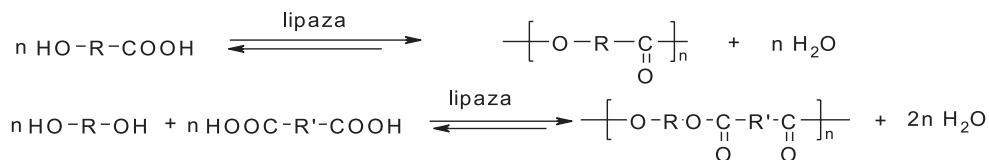
Polimery, takie jak polisacharydy, poliestry i polifenole budzą duże zainteresowanie ze względu na ich biodegradowalność i możliwość wytwarzania z odtwarzalnych surowców. Dostępne handlowo lipazy pochodzące z różnych źródeł nadają się do katalizy polireakcji monomerów o złożonej budowie strukturalnej zawierających grupy funkcyjne. Polireakcja z udziałem enzymów zwykle biegnie z dużą wydajnością [1].

„Polireakcję enzymatyczną” można zdefiniować jako polikondensację lub polimeryzację prowadzoną *in vitro* z udziałem katalizatora w postaci izolowanego enzymu [2].

## 2. Polikondensacja katalizowana enzymami

### 2.1. Synteza poliestrów

Lipazy są najczęściej wykorzystywanymi enzymami w katalizie poliestryfikacji. Synteza poliestrów z udziałem lipazy może być prowadzona z wykorzystaniem hydroksykwasów karboksylowych lub dioli i kwasów dikarboksylowych w układach



Schemat 1. Synteza poliestrów z udziałem lipazy.

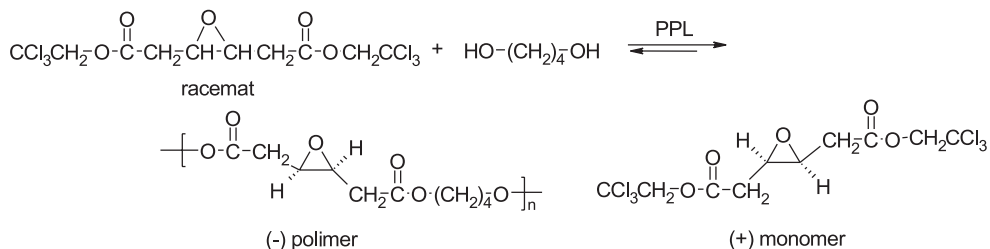
niewodnych (schemat 1) [3-7]. Ciężar cząsteczkowy tak otrzymanych poliestrów dochodzi do 50 000.

Ostatnio wykazano, że polikondensacja dioli i kwasów dikarboksylowych z udziałem lipazy *Pseudomonas cepacia* (lipaza PC) może być prowadzona także w układzie wodnym [8]. Reakcja w temperaturze 45°C po 24 h prowadziła do poliestru o ciężarze cząsteczkowym 1600 z wydajnością 43%.

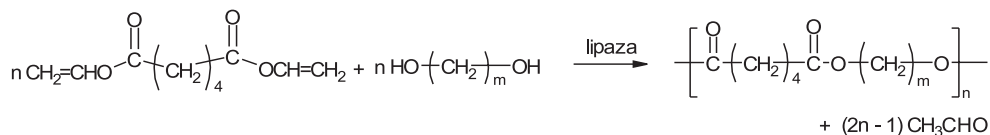
Użycie aktywowanych estrów w polikondensacji prowadzi do poliestru z większą łatwością i wydajnością. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu grupy trihalogenoetylowe [9,10].

Prekursorem badań nad syntezą optycznie czynnych oligoestrów wykorzystujących enancjoselektywność lipazy był Klibanov i wsp. [11]. Wykorzystał on enancjoselektywność lipazy ze świńskiej trzustki – PPL do katalizowania reakcji między racemicznym diestrem i achiralnym diolem lub racemicznym diolem i achiralnym diestrem. W obu przypadkach, powstawały trimery i tetramery typu AA-BB-AA i AA-BB-AA-BB-AA oraz małe ilości oligomerów o większym ciężarze cząsteczkowym [12]. Powstałe oligomery o końcowych grupach hydroksylowych były wynikiem stosowania nadmiaru diolu. Berkane i in. rozważali wpływ warunków enzymatycznej reakcji transestryfikacji na tworzenie się produktów cyklicznych [13].

Morrow i Wallace (14) badali wpływ stechiometrii reakcji *trans*-3,4-epoksyadypianianu bis(2,2,2-trichloroetylowego) z 1,4-butanodiolem katalizowanej lipazą PPL na wydajność i budowę polimeru [15]. Po 120 h otrzymali oni produkt o ciężarze cząsteczkowym  $M_w = 7900$ . Poliestry otrzymane przez Wallace'a i Morrowa miały wysoką czystość optyczną, powyżej 95% (schemat 2).



Schemat 2. Synteza poliestrów optycznie czynnych.



Schemat 3. Polikondensacja adypinianu diwinyłu z diolami katalizowana lipazą.

Reakcja dioli z aktywowanymi diestrami winylowymi biegnie w sposób nieodwracalny ze względu na przegrupowanie produktu ubocznego – alkoholu winylowego w stabilny termodynamicznie aldehyd octowy. Dlatego też i diestry winylowe znalazły zastosowanie w enzymatycznej polikondensacji. Polikondensacja adypinianu diwinyłu z diolami prowadzi do poliestru o ciężarze cząsteczkowym 6700 (schemat 3) [16].

Uyama i in. [17] prowadzili polikondensację estrów diwinyłowych aromatycznych kwasów dikarboksyłowych (kwas izoftalowy, tereftalowy, *p*-fenylenodioctowy) z glikolami wykorzystując różne lipazy jako katalizatory. Reakcję prowadzono w heptanie w temp. 60°C. Wykazali, że spośród badanych lipaz: *Candida antarctica* (lipaza CA), *Candida cylinderacea* (lipaza CC), *Mucor meihei* (lipaza MM), *Pseudomonas cepacia* (lipaza PC), *Pseudomonas fluorescens* (lipaza PF) i lipaza ze świńskiej trzustki (PPL), największą wydajność daje się uzyskać stosując lipazę *Candida antarctica*. W obecności lipazy CA otrzymano oligomer o ciężarze cząsteczkowym  $M_w = 5500$  z wydajnością 74%.

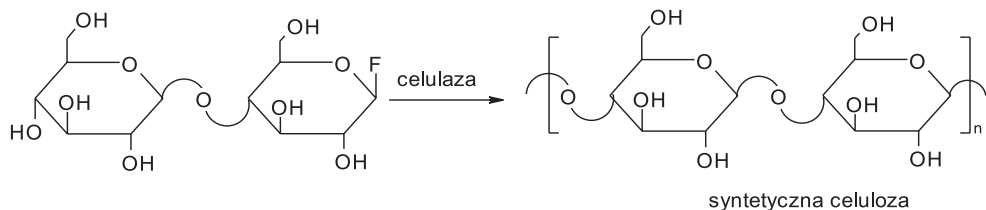
Knani i in. [18] badali wpływ rodzaju enzymu, rozpuszczalnika, stężenia, czasu reakcji i innych parametrów na kondensację  $\epsilon$ -hydroksyheksanianu metylu. Chaudhary i in. [19] w wyniku transestryfikacji adypinianu diwinyłowego 1,4-butanodiolem katalizowanej lipazą (Novozym-435) otrzymali poliester o ciężarze cząsteczkowym  $M_w = 23\ 000$ . Wykazali, że ciężar cząsteczkowy i rodzaj grup końcowych są funkcją: zawartości wody w enzymie, stosunku wagowego enzymu do substratu, stosunku molowego monomeru i diolu i temperatury reakcji. Rodney i Kobayashi [16,20] otrzymywali alifatyczne poliestry poddając homopolikondensacji monomery typu AA-BB używając lipazy (Novozym-435) jako katalizatora.

Inne enzymatyczne reakcje transestryfikacji prowadzące do optycznie czynnych polimerów opisał Wallace i Morrow [9,21]. Gutman i in. badali konkurencyjność oligomeryzacji i cyklizacji  $\omega$ -hydroksyestrów w obecności lipazy [22].

## 2.2. Synteza polisacharydów

### 2.2.1. Synteza celulozy

Pomimo wielu prób syntezy celulozy *in vitro* [23,24] dopiero pod koniec ubiegłego wieku grupie Kobayashiego udało się otrzymać syntetyczną celulozę metodą polireakcji enzymatycznej [25]. Aby enzymatyczna reakcja miała miejsce mono-



Schemat 4. Synteza celulozy z udziałem celulazy.

mer musi być rozpoznawany przez enzym jako substrat. Jako enzym wybrano celulazę, zewnątrzkomórkowy enzym hydrolizy celulozy. Natomiast substratem była pochodna disacharydu – fluorek  $\beta$ -cellobiosylu, który wcześniej był łatwo rozpoznawalny przez celulazę w reakcji jego hydrolizy. Położenie atomu fluoru w pierścieniu było tak dobrane, aby reakcja monomeru według „mechanizmu podwójnego podstawienia” aktywnych miejsc enzymu [26] prowadziła do celulozy  $\beta(1\rightarrow4)$ . W reakcji tej syntetyczna celuloza o stopniu polimeryzacji  $DP \approx 22$  tworzyła się z wydajnością 54% (schemat 4) [25]. Kobayashi postuluje, że reakcja z udziałem 5% wag. celulazy przebiega wg mechanizmu aktywowanego monomeru.

Należy podkreślić, że polikondensacja, w której uwalnia się HF nie wymaga stosowania strategii zabezpieczania i odbezpieczania grup OH. Ta syntetyczna celuloza ma strukturę podobną do celulozy naturalnej. W badaniach  $^{13}\text{C}$  NMR i dyfrakcji rentgenowskiej wykazano krystaliczną strukturę celulozy II. Celuloza I jest formą metastabilną ze względu na strukturę równoległe ułożonych łańcuchów polisacharydu, natomiast celuloza II ma strukturę przeciwrównoległe ułożonych łańcuchów i jest formą termodynamicznie stabilną. Dobierając układ rozpuszczalników i odpowiednio oczyszczony enzym udało się otrzymać *in vitro* odmianę polimorficzną celulozy I. Ten rodzaj kontroli struktury polimeru wyższego rzędu podczas polireakcji był po raz pierwszy zaobserwowany przez grupę Kobayashiego i nazwany „choroselektywnością” [27] od greckiego słowa „choros” ( $\chi\omega\rho\omicron\varsigma$ ) oznaczającego przestrzeń. Koncepcja ta może być stosowana dla polimeryzacji, w której tworzą się łańcuchy polimeru mające kierunek.

Przedstawiona metoda z wykorzystaniem fluoropochodnej w polireakcji katalizowanej enzymatycznie była również zastosowana do syntezy innych oligosacharydów [28-30].

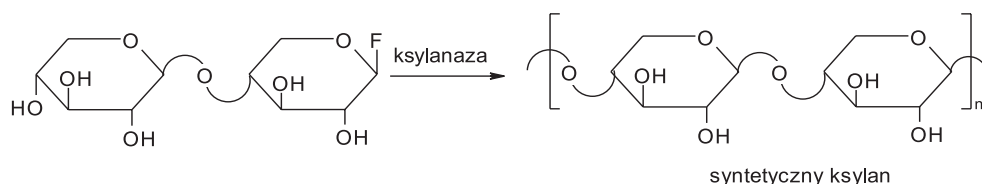
### 2.2.2. Synteza amylozy

Stosując podobną strategię z użyciem fluorku  $\alpha$ -maltosylu jako monomeru i  $\alpha$ -amylazy jako enzymu otrzymano oligomeryczną amylozę z wiązaniami glikozydowymi  $\alpha(1\rightarrow4)$  [31]. Należy zauważyć, że amylozę otrzymano z dobrą wydajnością

również w reakcji transglikozydacji stosując 1-fosforan  $\alpha$ -glukozy jako monomer i fosforylazę  $\alpha$ -glukanu (transferaza) jako enzym [32].

### 2.2.3. Synteza ksylanu

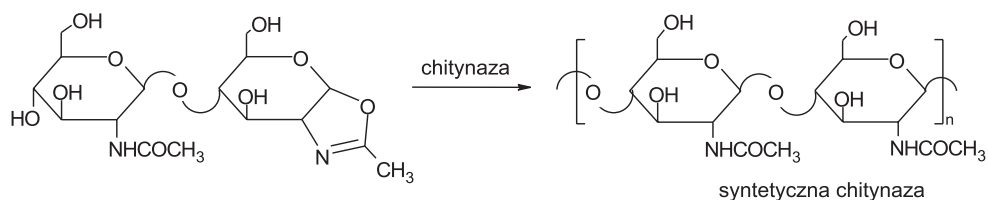
Ksylan jest ważnym składnikiem hemicelulozy występującej w ściankach komórek roślinnych. Okazało się, że również do jego syntezy *in vitro* można zastosować opisaną strategię. Fluorek  $\beta$ -ksylobiosyłu kondensował w obecności enzymu ksylanazy dając z dużą wydajnością syntetyczny ksylan o strukturze  $\beta(1\rightarrow4)$  (schemat 5) [33].



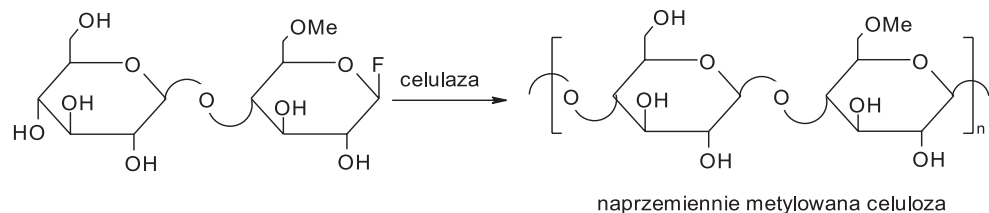
Schemat 5. Synteza ksylanu katalizowana enzymatycznie.

### 2.2.4. Synteza chityny

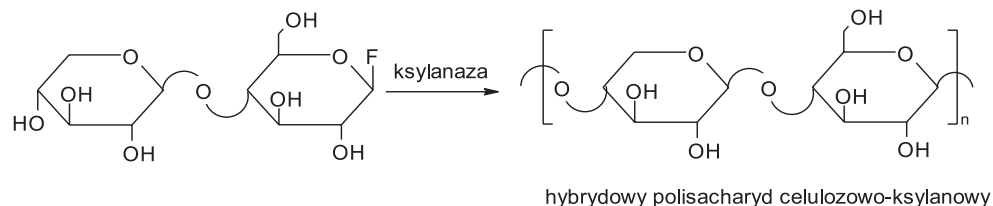
W syntezie chityny, mukopolisacharydu występującego w pancerzach bezkręgowców, zastosowano poliaddycję z otwarciem pierścienia pochodnej oksazolinowej chitobiozy katalizowaną enzymem chitynazą. Badania CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR wykazały regio- i stereoselektywną reakcję z inwersją konfiguracji na atomie węgla C1 prowadzącą do tworzenia wiązań  $\beta(1\rightarrow4)$  (schemat 6) [34].



Schemat 6. Synteza chityny katalizowana enzymatycznie.



Schemat 7. Synteza naprzemiennie metylowanej celulozy.



Schemat 8. Synteza hybrydowego polisacharydu.

### 2.3. Synteza nienaturalnych polisacharydów

Metodę z fluoropochodnymi disacharydów zastosowano również w syntezie nienaturalnych sacharydów, takich jak naprzemiennie 6-O-metylowana celuloza z udziałem celulazy jako katalizatora (schemat 7) [35,36]. Zadziałała tu reguła Fischera „zamka i klucza”. Należy podkreślić, że takiej pochodnej celulozy nie można otrzymać w wyniku metylowania celulozy.

Grupie Kobayashiego udało się również otrzymać hybrydę celulozy i ksylanu wychodząc z fluorku  $\beta$ -ksylanopiranozylo-glukopiranozylowego i stosując enzym ksylanazę jako katalizator polireakcji (schemat 8) [37].

W reakcji polikondensacji ksylanaza rozpoznaje jednostkę glukozy jako miejsce donorowe, a jednostkę ksylozy jako miejsce akceptorowe.

## 3. Polimeryzacja enzymatyczna monomerów heterocyklicznych

### 3.1. Polimeryzacja laktonów

Enzymatyczną polimeryzację z otwarciem pierścienia po raz pierwszy zastosowano w syntezie polikaprolaktanu. Najwięcej prac poświęconych polimeryzacji laktonów dotyczy polimeryzacji z otwarciem pierścienia siedmioczłonowego  $\epsilon$ -kaprolaktanu ( $\epsilon$ -CL) [18,38-43]).

Otwarcie pierścienia w polimeryzacji laktonów omija etap generowania grup odchodzących, który może ograniczać szybkość propagacji i ciężar cząsteczkowy produktu.

Lipazy katalizują także otwarcie pierścienia laktonów o innym rozmiarze pierścienia, jak również monomerów zawierających podstawniki w pierścieniu:  $\delta$ -walerolaktonu ( $\delta$ -VL) [38],  $\alpha$ -metylo- $\delta$ -walerolaktonu [44],  $\alpha$ -metylo- $\epsilon$ -kaprolaktonu [44],  $\beta$ -propiolaktonu ( $\beta$ -PL) [45,46],  $\beta$ -metylo- $\beta$ -propiolaktonu, ( $\pm$ ) $\alpha$ -metylo- $\beta$ -propiolaktonu [45,47,48],  $\gamma$ -butyrolaktonu [45,49], 8-oktanolidu (8-OL) [50] i innych. Polimeryzacja przebiega z powolną propagacją dając produkt o stosunkowo małym ciężarze cząsteczkowym. Lipazy: *Candida cylindracea*, *Pseudomonas fluorescens* i PPL wykazują wysoką aktywność w polimeryzacji  $\delta$ -walerolaktonu [41].

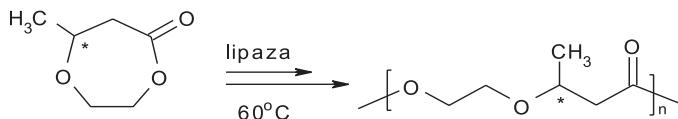
W przypadku prowadzenia enzymatycznej polimeryzacji w rozpuszczalnikach organicznych, obok produktów liniowych, tworzą się makrocykliczne oligolaktony [43,51,52].

W przeciwieństwie do polimeryzacji 4-, 6- i 7-członowych laktonów, prowadzona w sposób tradycyjny polimeryzacja makrocyklicznych laktonów przebiega powoli, dając polimer o małym ciężarze cząsteczkowym [53]. Polimeryzacja katalizowana lipazami daje podobne, a nawet w niektórych przypadkach korzystniejsze wyniki. Jako pierwszy, polimeryzację z otwarciem pierścienia  $\omega$ -undekanolidu (UDL) [54],  $\omega$ -dodekanolidu (DDL) [55],  $\omega$ -pentadekanolidu (PDL) [54] i  $\omega$ -heksadekanolidu (HDL) [56] katalizowaną lipazami opisał Kobayashi. Zainteresowało go to, w jaki sposób polimeryzują makrocykliczne 12-, 13-, 16- i 17-członowe laktony pod wpływem lipaz. Do polimeryzacji UDL, DDL, PDL i HDL używał następujących enzymów: *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea* (lipaza B), *Candida rugosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus delemar javanicus*, *Pseudomonas fluorescens* (lipaza P, Cosmo Bio.) *Pseudomonas* sp. (lipaza PS, Amano) oraz lecytynazy i PPL [57]. Używając lipaz P i PS w polimeryzacji  $\omega$ -dodekanolidu uzyskał po 120 h w temp. 75°C polimer o dużym ciężarze cząsteczkowym, dochodzącym do 25 000. Kobayashi wykazał, że immobilizacja lipazy PF na Celicie powoduje znaczne zwiększenie jej aktywności katalitycznej w polimeryzacji makrolidu. Zaledwie 1% enzymu wykazuje podobną aktywność jak enzym w postaci nieimmobilizowanego proszku [58].

Immobilizacja lipazy *Candida antarctica* na makroporowatej żywicy akrylowej prowadzi do wzrostu aktywności w procesie polimeryzacji  $\epsilon$ -CL [59]. Polimeryzacja w obecności lipazy CA biegnie z szybkością ponad 1000 razy większą w porównaniu z szybkością polimeryzacji katalizowanej lipazami PC i PF [50]. Wykazano, że jedynie lipaza *Candida antarctica* katalizuje polimeryzację podstawionych laktonów  $\alpha$ -metylo- $\delta$ -walerolaktonu,  $\alpha$ -metylo- $\epsilon$ -kaprolaktonu i  $\beta$ -metylo- $\delta$ -walerolaktonu [44].

Wybór lipazy jako katalizatora do polimeryzacji daje możliwość kontroli budowy produktu na drodze regioselektywnej transformacji. Ta cecha lipazy była wykorzystywana do inicjowania polimeryzacji wychodząc ze specyficznych miejsc multifunkcyjnych inicjatorów. Przykładowo do otwarcia pierścienia  $\epsilon$ -kaprolaktonu stosowano  $\alpha$ - i  $\beta$ -etyloglukozyd. PPL umożliwia zapoczątkowanie i następnie wzrost łańcu-





Schemat 9. Polimeryzacja enancjoselektywna 3-metylo-4-oksa-6-heptanolidu.

cha wybierając jedną z sześciu pierwszorzędowych grup hydroksylowych etyloglukozydu [42,60].

W enancjoselektywnej polimeryzacji 3-metylo-4-okso-6-heptanolidu wykorzystano optycznie czynny monomer. Katalizatorem polimeryzacji z otwarciem pierścienia (R)- i (S)-3-metylo-4-oksa-6-heptanolidu była lipaza PC (*Pseudomonas cepacia*) (schemat 9) [61].

#### 4. Kopolimeryzacja katalizowana enzymami

Kopolimeryzacja dwóch lub więcej monomerów jest ważną strategią otrzymywania polimerów o zadanej budowie i zaprogramowanych właściwościach. Katalizowana enzymami kopolimeryzacja *in vitro* jest relatywnie nowym obszarem badań. Kopolimeryzacji katalizowanej lipazą poddane zostały, jako jedne z pierwszych:  $\beta$ -propiolakton i  $\epsilon$ -kaprolakton [46].

W przypadku kopolimeryzacji  $\epsilon$ -CL z DDL z udziałem lipazy tworzy się kopolimer o budowie statystycznej w odróżnieniu od kopolimeru blokowego tworzącego się w wyniku kopolimeryzacji jonowej dwóch laktonów o różnym rozmiarze pierścienia i różniących się reaktywnością [50].

Uyama i in. [54] do kopolimeryzacji  $\omega$ -pentadekanolidu z  $\omega$ -dodekanolidem,  $\omega$ -undekanolidem,  $\delta$ -walerolaktonem i  $\epsilon$ -kaprolaktonem zastosowali lipazę PF. Wykazali, że reakcja biegnie z małą szybkością i powstaje polimer o małym ciężarze cząsteczkowym ( $M_n = 6000$ ). Kopolimeryzację laktydu z węglanem trimetylenu prowadzono w masie w obecności lipazy PPL w 100°C przez 7 dni otrzymując poli(estro-węglan) o stosunkowo niewielkim ciężarze cząsteczkowym [62].

Dong i in. [49] poddawali kopolimeryzacji  $\epsilon$ -kaprolakton z cyklicznymi i liniowymi monomerami z użyciem lipazy *Pseudomonas* sp. Kopolimeryzacja w masie prowadzona była w 45°C przez 20 dni dając największy ciężar cząsteczkowy ( $M_n = 8400$ ) produktu reakcji  $\epsilon$ -kaprolaktonu z  $\omega$ -pentadekanolidem.

Zainteresowanie praktycznym wykorzystaniem lipaz, jako katalizatorów w reakcji otrzymywania oligoestrów spowodowało rozpoczęcie prac nad skróceniem czasu reakcji i zwiększeniem ciężaru cząsteczkowego polimerów. Badano wpływ rozpuszczalnika, temperatury reakcji, stosunku monomeru do enzymu, stężenia enzymu, rodzaju i źródła enzymu oraz zawartości wody na szybkość procesu i ciężar cząsteczkowy polimeru [40,63]. Okazało się, że najczęściej stosowaną i efektywną lipazą w reakcji poli-

meryzacji z otwarciem pierścienia laktonu jest lipaza CALB *Candida antarctica* – lipaza B immobilizowana na żywicy akrylowej (Novozym 435 firmy Novo Nordisk).

Aby zwiększyć ciężar cząsteczkowy polimeru przeprowadzono reakcję polimeryzacji  $\epsilon$ -kapolaktonu i  $\omega$ -pentadekanolidu w środowisku niepolarnego rozpuszczalnika. Stwierdzono, że dodatek toluenu w stosunku 2:1 (toluen/monomer) zwiększa ciężar cząsteczkowy produktu i zwiększa szybkość reakcji. W wyniku kopolimeryzacji  $\epsilon$ -kapolaktonu i  $\omega$ -pentadekanolidu (w stosunku molowym 1:1, w 70°C, przez 45 min) otrzymano kopolimer o  $M_n = 20\ 000$  z wydajnością 88%. Ze stałych reaktywności monomerów wynika, że szybkość polimeryzacji  $\omega$ -pentadekanolidu jest 13 razy większa niż  $\epsilon$ -kapolaktonu. Niezależnie od różnic w reaktywności komonomerów, rozkład merów w kopolimerach odpowiada statystycznemu rozkładowi Bernoulliego. W reakcjach tych toluen okazał się rozpuszczalnikiem zwiększającym stabilność termiczną enzymu Novozym-435. Okazało się, że lipaza ta może być skutecznie wykorzystywana jako katalizator polimeryzacji w nawet w wyższych temperaturach dochodzących do 100°C.

Badano reakcję wymiany pomiędzy poliestrami: polipentadekanolidem i poli( $\epsilon$ -kapolaktonem) katalizowaną lipazą [64].

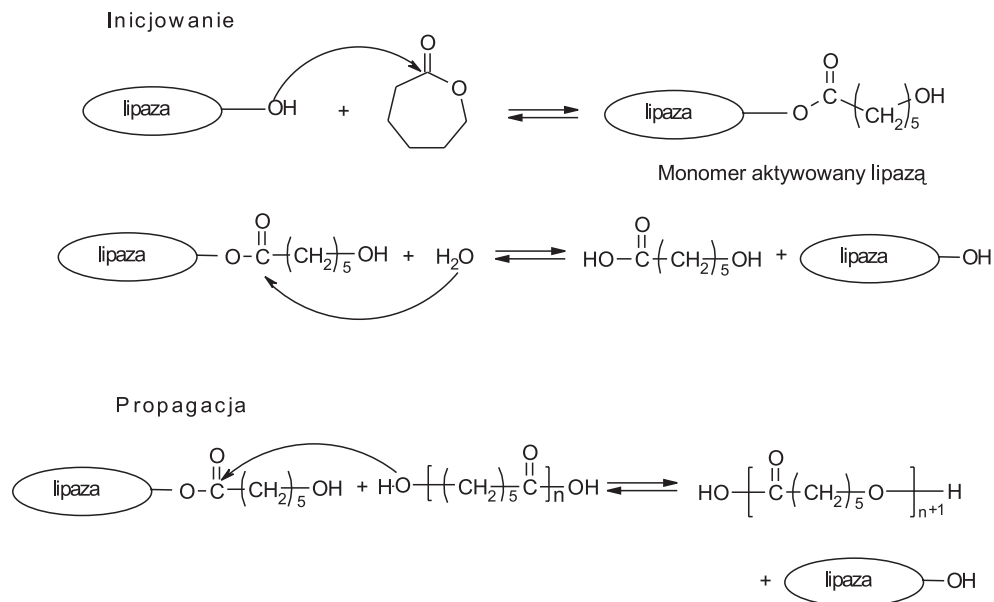
Stosunkowo duży ciężar cząsteczkowy, dochodzący do 21 000 uzyskano w kopolimeryzacji laktydu z węglanem trimetylenu prowadzonej w obecności lipazy Novozym-435. Należy jednak zauważyć, że w 100°C węglan trimetylenu homopolimeryzuje bez stosowania katalizatorów [65], co może oznaczać, że proces biegnie w tych warunkach bez udziału lipazy jako katalizatora.

## 5. Mechanizm polimeryzacji enzymatycznej

Przyjmuje się, że polimeryzacja enzymatyczna składa się z dwóch etapów: inicjowania i propagacji [66]. Przykładowo, lipaza katalizuje otwarcie pierścienia laktonu na etapie inicjowania polimeryzacji. Polega on na ataku nukleofilowym reszt serynowych lipazy na karbonylowy atom węgla laktonu [42,67]. Tworzy się kompleks monomeru aktywowanego enzymem (MAE). Dla zapoczątkowania wzrostu łańcucha nukleofil, taki jak woda występująca zwykle w małej ilości, może reagować z kompleksem MAE tworząc monoaddukt. Jeśli inne nukleofile takie, jak alkohol lub amina są obecne w układzie reakcyjnym to mogą zastąpić wodę w reakcji inicjowania.

Wzrost łańcucha polega na tym, że końcowa grupa hydroksylowa z łańcucha poli(hydroksykwasu) atakuje karbonylowy atom węgla kompleksu MAE, co prowadzi do cząsteczki wydłużonej o jedną jednostkę powtarzalną (schemat 10).

W badaniach nad inicjowaniem i wzrostem łańcucha polimeryzacji [68] z udziałem aktywowanego kompleksu monomer/enzym –  $\epsilon$ -kapolakton/PPL lub  $\epsilon$ -kapolakton/Novozym-435 stosowano trzy rodzaje inicjatorów: butanol, woda i butylamina. Dong wykazał, że stała szybkości inicjowania ( $k_i$ ) jest mniejsza od stałej szybkości wzrostu łańcucha ( $k_p$ ) [49].

Schemat 10. Mechanizm polimeryzacji enzymatycznej  $\epsilon$ -kapolaktonu.

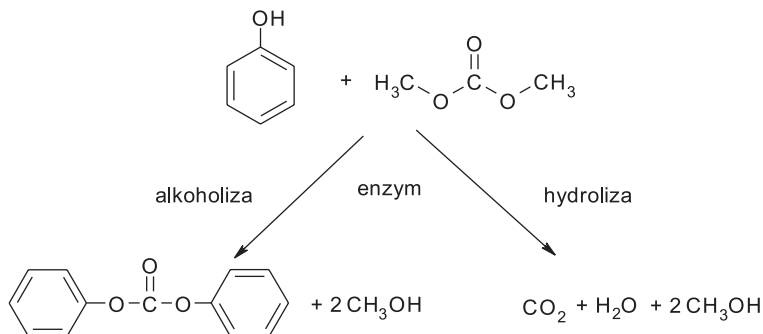
Bisht [69] badał wpływ zawartości wody w monomerze na szybkość polimeryzacji  $\omega$ -pentadekanolidu w obecności immobilizowanej oraz wolnej lipazy PS-30 i wykazał, że wraz ze wzrostem zawartości wody w monomerze, szybkość polimeryzacji rośnie proporcjonalnie. Jednakże, jak wynika z badań nad kinetyką reakcji katalizowanych przez enzymy, nie można uogólnić uzyskanych zależności na inne lipazy i monomery.

### 5.1. Synteza poliwęglanów

Wiele alifatycznych poliwęglanów i ich kopolimerów ze względu na bioresorbowalność znalazło zastosowanie jako materiały biomedyczne.

Hydrolazy, w tym esterazy, katalizują wiele reakcji chemicznych, włączając te z udziałem różnych nienaturalnych akceptorów grupy acylowej [70,71]. Lipazy akceptują jako substraty zarówno węglany diarylowe jak i dialkylowe [72,73]. Lipaza katalizuje alkoholizę węglanów dialkylowych, np. węglanu dietylu lub metylu [73]. Reakcje alkoholizy estrów kwasu węglowego z udziałem enzymów prowadzone były z użyciem aktywowanych węglanów, takich jak węglany diwinyłowe [74-77].

Rodney i in. zastosowali różne enzymy jako katalizatory reakcji otrzymywania węglanu difenyłu z fenolu i węglanu dimetylu. Jednakże wydajność reakcji była niewielka, ze względu na konkurencyjną reakcję hydrolizy węglanu dimetylu (schemat 11) [78].



Schemat 11. Synteza węglanu difenyłu.

W przypadku bezpośredniej polikondensacji prowadzącej do poliwęglanu zastosowano diwinyłową pochodną generującą niestabilny produkt uboczny – alkohol winylowy [78,79]. Spośród 26 testowanych hydrolaz tylko Novozym 435 umożliwił otrzymanie poliwęglanu o ciężarze cząsteczkowym powyżej 1000.

Lipazy zostały też użyte do polimeryzacji z otwarciem pierścienia sześciocłonowych węglanów cyklicznych: węglanu trimetyleny (TMC) [65,80-83] i innych podstawionych węglanów cyklicznych (5-metylo-5-benzylloksykarbonylo-1,3-dioksan-2-on) [84].

Szybkość inicjowania polimeryzacji węglanu trimetyleny z udziałem enzymu Novozym-435, podobnie jak w przypadku laktonów, jest mniejsza niż szybkość propagacji. Z analizy widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR wynika, że na pierwszym etapie wzrostu łańcucha następuje dekarboksylacja.

W wyniku polimeryzacji węglanu trimetyleny prowadzonej w masie w obecności lipazy PPL w temperaturze  $100^\circ\text{C}$  powstawał liniowy polimer o ciężarze cząsteczkowym przekraczającym 84 000; konwersja monomeru przewyższała 95%. Nie zaobserwowano ugrupowań eterowych w strukturze polimeru [83].

Bisht i in. wykazali, że najszybciej zachodzi polimeryzacja TMC wobec lipazy Novozym-435. Największy ciężar cząsteczkowy otrzymali w temperaturze  $55^\circ\text{C}$ . W wyższych temperaturach zwiększał się udział katalizowanej enzymem degradacji łańcucha poliestru.

Immobilizacja lipazy PPL na mikrokrzemionce umożliwiła wielokrotne użycie biokatalizatora do polimeryzacji TMC. Siedmiokrotne użycie lipazy nie wpłynęło na obniżenie ciężaru cząsteczkowego i wydajności poliwęglanu [85].

Obecność jednej grupy metylowej w pozycji 5 cyklicznego węglanu (5-metylo-1,3-dioksan-2-on) nie ogranicza katalitycznej aktywności lipazy Novozym-435 w polimeryzacji monomeru. Dopiero dwa podstawniki metylowe w pierścieniu cyklicznego węglanu (5,5-dimetylo-1,3-dioksan-2-on, DTC) uniemożliwiają polimeryzację z udziałem tego enzymu [86].

Po raz pierwszy cykliczny węglan z dwoma podstawnikami metylowymi w pozycji 5 – DTC został spolimeryzowany enzymatycznie przez Zhuo i in. w roku 2003.

Do polimeryzacji DTC zastosowali oni lipazę PPL immobilizowaną na krzemionce o mikronowym rozmiarze ziaren [87]; podobny efekt uzyskali stosując do immobilizacji nanokrzemionkę [88].

Kopolimeryzacja węglanu trimetyleny z 5-metylo-5-benzyloksykarbonylo-1,3-dioksan-2-onem prowadzona w 80°C i katalizowana lipazą *Pseudomonas fluorescens* (AK) prowadziła do statystycznego kopolimeru o budowie amorficznej [89].

## 6. Polimeryzacja monomerów winylowych z udziałem enzymów

Ostatnio wykazano, że oksydoreduktazy inicjują polimeryzację monomerów winylowych. W układzie peroksydaza/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zachodzi polimeryzacja akrylamidu [90,91] i monomerów metakrylanowych [92]. Układ peroksydaza/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generuje rodniki na wprowadzanych do układu reakcyjnego dodatkach, takich jak pentan-2,4-dion, które są właściwymi inicjatorami polimeryzacji akrylamidu. Należy podkreślić, że enzym lakkaza inicjuje polimeryzację akryloamidu w wodzie w temperaturze 50°C bez potrzeby wprowadzania tego typu dodatków [93].

### 6.1. Synteza dendrymerów z użyciem enzymów

Synteza regularnie rozgałęzionych polimerów zwanych, z racji budowy przypominającej budowę drzewa, dendrymerami metodą z użyciem enzymu została opisana po raz pierwszy w roku 1998. Dendrymer pierwszej generacji na podstawie poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL) otrzymano metodą selektywnego acylowania pierwszorzędowych grup końcowych łańcuchów PCL z udziałem lipazy B *Candida antarctica* (CALB) [60]. Alifatyczne poliestrowe dendrymery na podstawie kwasu 2,2-bis(hydroksymetylo)propionowego zastosowano jako rusztowania w syntezie ferroelektrycznych dendrymerów [94]. CALB jest efektywnym katalizatorem polimeryzacji laktonów i w regioselektywnym procesie acylowania węglowodanów [95]. Sześćofunkcyjny dendrymer z grupami hydroksylowymi w cząsteczce poddawany był reakcji z  $\epsilon$ -kaprolaktonem. Polimeryzacja z otwarciem pierścienia biegnie dwuetapowo. Na etapie nieregioselektywnego inicjowania Ser105 lipazy atakuje  $\epsilon$ -CL tworząc pochodną acylową enzymu. Pochodna ta może być deacylowana każdą z sześciu grup OH (deacylacja może być stereoselektywna) [96]. Drugi etap, etap propagacji jest regioselektywny, ponieważ selektywność enzymu decyduje czy grupa 6-hydroksylowa będzie deacylować produkt pośredni – pochodną acylową enzymu. CALB jest regioselektywna dla mniej zatłoczonych sterycznie grup 6-hydroksylowych, stąd ma tu miejsce selektywna propagacja łańcucha.

Ilhre [97] użył dendrymeru heksahydroksylowego otrzymanego z kwasu 2,2-bis(hydroksymetylo)propionowego i 1,1,1-tris(hydroksyfenylo)etanu, jako wielofunkcyjnego inicjatora otwarcia pierścienia  $\epsilon$ -kaprolaktonu. Udowodnił, że polimeryzacja biegnie startując tylko z jednej z sześciu grup hydroksylowych [54,97,98].

Skaria i Gross opisali syntezę hiperrozgałęzionego kopoliestru w reakcji polimeryzacji  $\epsilon$ -kaprolaktonu połączoną z polikondensacją kwasu 2,2'-bis(hydroksymetylo)masłowego [99,100].

## 7. Polimeryzacja fenoli katalizowana enzymami

Polimeryzacja pochodnych fenolowych z użyciem peroksydazy chrzanowej (HRP) i  $H_2O_2$  jako czynnika utleniającego znana jest już od lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia [101]. Reakcja prowadzona w układzie: woda/1,4-dioksan lub aceton z dodatkiem buforu octanowego umożliwiała otrzymanie polifenoli o ciężarze cząsteczkowym 1400 i poli(*p*-fenylofenolu) o  $M_w = 26\ 000$  [102].

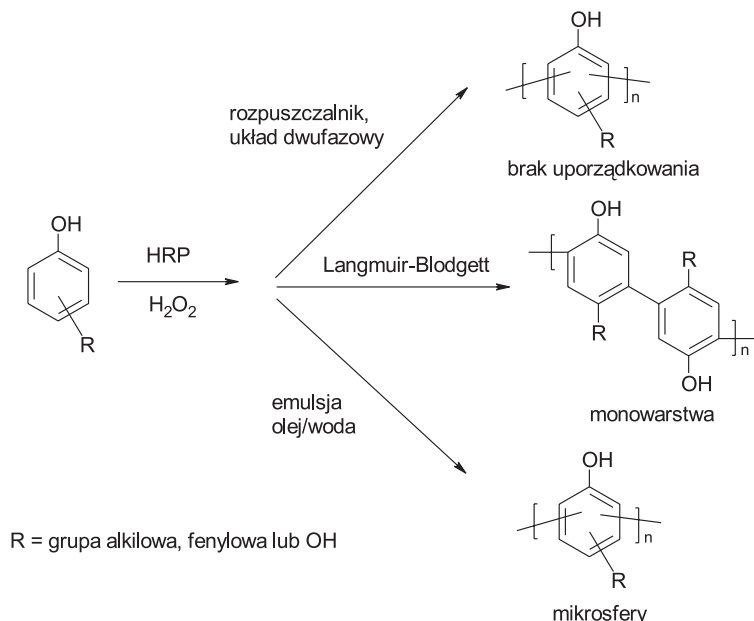
Polimeryzacja dyspersyjna fenoli i ich pochodnych z wykorzystaniem enzymów pozwoliła na otrzymanie monodispersyjnych cząstek polifenolowych. Jako stabilizatory dyspersji o średnim wymiarze ziarna 254 nm stosowano glikol poli(oksyetylenowy), poli(alkohol winylowy) i poli(metylowy eter alkoholu winylowego), a czynnikiem utleniającym był 30%  $H_2O_2$  i HRP.

Chociaż kataliza enzymami znana jest od ponad wieku w zasadzie ograniczała się do układów wodnych [103]. Z punktu widzenia zastosowań przemysłowych enzymologia w układach niewodnych ma szczególne znaczenie biorąc pod uwagę trudności lub wręcz niemożliwość zastosowania konwencjonalnych katalizatorów „chemicznych” w syntezie niektórych związków chemicznych.

Zastosowanie katalizy enzymatycznej w rozpuszczalnikach organicznych umożliwiło syntezę takich polimerów jak polifenole, poliaminy aromatyczne [104,105]. Zastosowanie enzymatycznej katalizy w syntezie związków poliaromatycznych umożliwiło otrzymanie nowej klasy materiałów o budowie różniącej się od otrzymanych z użyciem klasycznych katalizatorów. Wykazano, że architektura związków poliaromatycznych otrzymywanych z udziałem enzymów zależy od układu reakcyjnego (schemat 12) [106]. Synteza prowadzona w jedno- lub dwufazowym układzie rozpuszczalników katalizowana HRP z nadtlaniem wodoru jako utleniaczem prowadzi do polimerów o niezdefiniowanej geometrii, uporządkowaniu i orientacji.

Natomiast reakcja prowadzona w mikroemulsji typu „woda w oleju” z monomerami aromatycznymi zawierającymi grupy amfifilowe, w obecności środka powierzchniowo czynnego powoduje, że cząsteczki monomerów ustawiają się na granicy faz olej-woda w sposób uporządkowany. Jeśli uporządkowane w przestrzeni monomery poddane są polimeryzacji z udziałem HRP i  $H_2O_2$  tworzą się mikrosfery [107,108]. Mikrocząstki mają jednorodny kształt i rozmiar.

Gdy amfifilowe monomery są zorientowane na granicy faz powietrze-woda, jak to ma miejsce np. na wadze Langmuira-Blodgett to tworzy się polimer w postaci dwuwymiarowych monowarstw [109]. Takie monowarstwy mogą być wykorzystywane bezpośrednio, bez konieczności przetwarzania polimeru z roztworu.



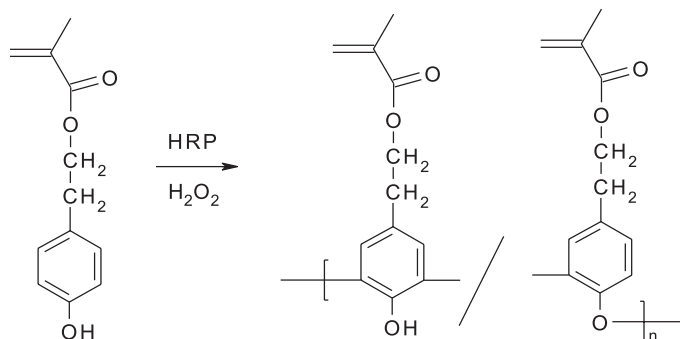
Schemat 12. Polimeryzacja utleniająca fenoli z udziałem enzymu HRP.

W przypadku monomerów fenolowych posiadających elektronoakceptorowe podstawniki w pozycji *para*, mery fenolowe połączone są ze sobą w pozycji *orto*, a grupy OH pozostają praktycznie niepodstawione [105]. Po ogrzaniu takie polifenole ulegają usieciowaniu [108]. Chociaż polifenole są połączone w *orto*-pozycjach, to w przypadku enzymatycznej polimeryzacji naftoli obserwuje się połączenia *orto-para* [110].

Polifenole, ze względu na swoją wysoką odporność termiczną i brak możliwości generowania toksycznego formaldehydu są konkurencyjne w stosunku do żywic fenolowo-formaldehadowych w zastosowaniach, gdzie wymagana jest odporność na działanie wysokich temperatur.

Enzymy tracą swoją aktywność katalityczną przy dużym stężeniu rozpuszczalników organicznych. Przykładowo HRP ulega dezaktywacji w buforze zawierającym powyżej 90% dioksanu, 80% etanolu lub 60% DMF [111]. Wykazano, że możliwe jest przywrócenie aktywności enzymu poprzez dodanie buforu, co zmienia efektywny kontakt pomiędzy enzymem i substratem.

Rozpuszczalne polifenole otrzymywano także polimeryzując 4,4'-dihydroksybi-fenyl [112] i bisfenol A [113]. Polymer otrzymany z 4,4'-dihydroksybi-fenylu wykazywał wyjątkowo dużą odporność termiczną. Po ogrzaniu do 1000°C w atmosferze azotu pozostawało jeszcze 60% polimeru. Rozpuszczalny polymer otrzymany z bisfenolu A z użyciem HRP składał się z jednostek fenylenowych i oksyfenylenowych, a po ogrzaniu ulegał usieciowaniu. Możliwe było też jego utwardzanie za pomocą żywicy epoksydowej [113].



Schemat 13. Polimeryzacja utleniająca fenoli z grupami metakrylanowymi.

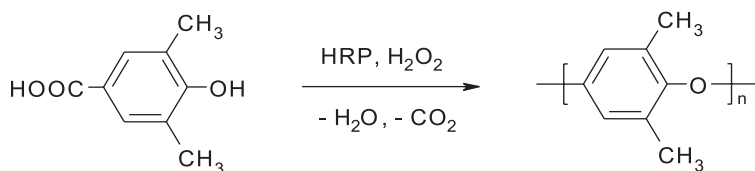
Pochodne fenolu z grupami metakrylanowymi wykazywały chemoselektywność w polimeryzacji z użyciem enzymu HRP (schemat 13). Tylko jednostka fenolowa ulegała enzymatycznej polimeryzacji utleniającej, ugrupowanie metakrylanowe pozostało nienaruszone. Produkt był rozpuszczalny w typowych rozpuszczalnikach (aceton, chloroform, DMF) i ulegał sieciowaniu po naświetleniu promieniowaniem UV [92].

### 7.1. Synteza poli(oksyfenylenów)

Najbardziej znany poli(1,4-oksyfenylen) – PPO otrzymuje się poprzez polimeryzację utleniającą 2,6-dimetylofenolu katalizowaną układem Cu/amina [114,115].

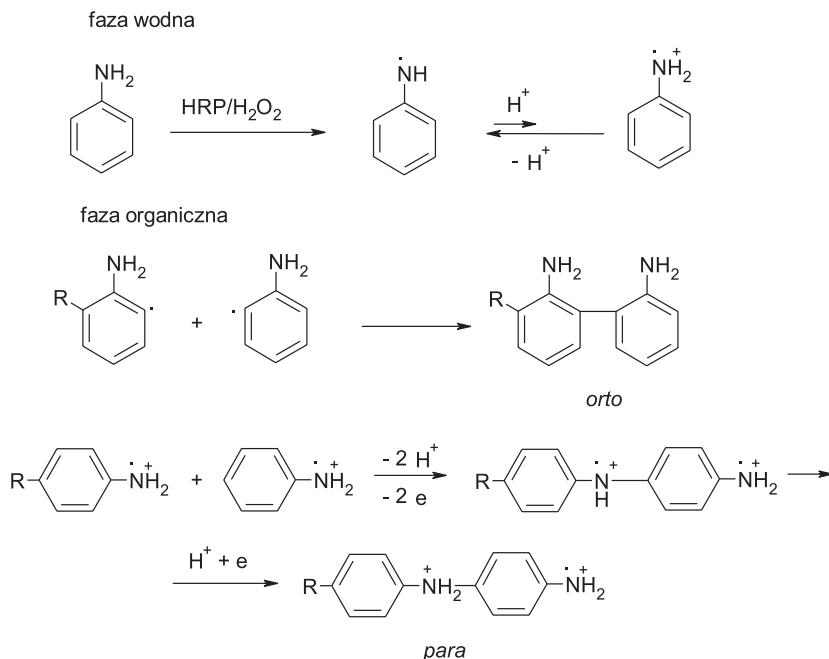
Okazało się, że oksydoreduktazy (HRP, lakkaza) inicjują polimeryzację utleniającą pochodnych kwasu 4-hydroksybenzoesowego w temperaturze pokojowej w atmosferze powietrza do PPO (schemat 14) [116,117].

Można kontrolować ciężar cząsteczkowy PPO, a produkt jest rozpuszczalny w typowych rozpuszczalnikach organicznych, stąd można wykorzystać go do wytwarzania makromonomerów i kopolimerów blokowych poli(oksyfenyleny) [118].



Schemat 14. Polimeryzacja utleniająca 2,6-dimetylofenolu w obecności HPR.





Schemat 15. Polimeryzacja enzymatyczna aniliny.

## 7.2. Synteza pochodnych polianiliny

Drugą ważną grupą polimerów aromatycznych otrzymywanych z udziałem peroksydazy w rozpuszczalnikach organicznych jest polianilina (PANI) [102,119-122]. Jednakże w odróżnieniu od polianiliny otrzymywanej metodami chemicznymi lub elektrochemicznymi w poliaminie aromatycznej otrzymanej enzymatycznie obecne są bezpośrednie połączenia pierścieni aromatycznych (jednostki *orto*-podstawionej aniliny) (schemat 15) [123].

Lim i Yoo wykazali, że polimer z większym udziałem jednostek *orto*-podstawionej aniliny tworzy się przy wzroście pH buforu fosforanowego lub gdy zastosuje się rozpuszczalnik organiczny o dużej stałej dielektrycznej [124]. Włókna z przewodzącej polianiliny wytwarzano z wodorocieńczej PANI otrzymywanej z użyciem HRP i w obecności sulfonowanego polistyrenu [125,126].

Do wytwarzania przewodzącej polianiliny Kramyshev i in. zastosowali po raz pierwszy lakkazę *Coriolus hirsutus*, prowadząc polimeryzację aniliny w obecności sulfonowanego polistyrenu jako matrycy. Enzym lakkaza wykazuje przewagę nad powszechnie stosowanym HRP ze względu na aktywność i stabilność w środowisku kwaśnym [127].

## 8. Nowe rozpuszczalniki dla reakcji katalizowanych lipazą

Ciecze jonowe są, jak się wydaje, dobrymi rozpuszczalnikami dla katalizowanych enzymatycznie transformacji prowadzonych z udziałem wysoce polarnych monomerów. Jednakże powtarzalność w syntezie tego typu rozpuszczalników jest czynnikiem decydującym o zachowaniu kinetycznych właściwości enzymu. Okazało się, że na etapie przygotowywania, przemywanie cieczy jonowych wodnym roztworem węgla sodowego zapewnia ich przydatność do reakcji enzymatycznych [128].

Nadkrytyczny dwutlenek węgla ( $scCO_2$ ) z jego właściwościami łączącymi cechy gazu (duża szybkość dyfuzji) i cieczy o małej lepkości jest bardzo perspektywicznym rozpuszczalnikiem dla reakcji enzymatycznych. Łatwość całkowitego usuwania z produktu reakcji daje mu dużą przewagę nad tradycyjnymi rozpuszczalnikami. Wykazano, że lipazy z *Rhizomucor miehei* (Lipozyme®) [129] i *Candida antarctica* (Novozym 435) [130,131] charakteryzują się doskonałą aktywnością w takim układzie reakcyjnym zarówno w procesie polimeryzacji jak i polikondensacji prowadzącej do poliesterów.

## 9. Wnioski

Liczba zastosowań enzymów w wielu procesach biochemicznych, w tym prowadzących do produktów polimerycznych, gwałtownie rośnie. Równocześnie wiele nowych typów enzymów jest odkrywanych i identyfikowanych. Dobór odpowiednich enzymów i optymalizacja warunków reakcji prowadzi do nowych dróg syntezy pozwalających na produkcję cennych polimerów z dużą regio- i syndioselektywnością.

Z zamieszczonego przeglądu literatury wynika, że polimeryzacja enzymatyczna ma dużą przyszłość w technologii chemicznej. Stosowane enzymy jako katalizatory polireakcji nie stanowią zagrożenia dla środowiska naturalnego. Dzięki enzymom można uzyskiwać produkty ulegające biodegradacji. Pod względem ekonomicznym enzymy (zwłaszcza immobilizowane na polimerach) mogą stać się również konkurencyjne w stosunku do typowych katalizatorów „chemicznych”.

Do podstawowych zalet polimeryzacji i polikondensacji enzymatycznej należy zaliczyć możliwość otrzymywania polimerów w łagodnych warunkach. Polimery otrzymane z udziałem enzymów mogą być użyte do zastosowań biomedycznych, gdyż nie zawierają toksycznych katalizatorów zwykle stosowanych w procesach polimeryzacji z otwarciem pierścienia.

## Literatura

1. Steinbuechel A., (Ed.) (2002), *Biopolymers*, Wiley-VCH, Weinheim.
2. Kobayashi S., (1999), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 37, 3041-3056.
3. Okamura S., Iwai M., Tominaga Y., (1984), *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2805-2811.

4. Matsumura S., Takahashi J., (1986), *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 7, 369-371.
5. O'Hagen D., Zaidi N. A., (1994), *Polymer*, 35, 3576-3582.
6. Mahapatro A., Kumar A., Kalra B., Gross R. A., (2004), *Macromolecules*, 37, 35-40.
7. Mahapatro A., Kalra B., Gross R. A., (2004), *Biomacromolecules*, 5, 62-68.
8. Kobayashi S., Uyama H., Suda S., Namekawa S., (1997), *Chem. Lett.*, 105-107.
9. Wallace J. S., Morrow C. J., (1989), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 27, 2553-2567.
10. Linko Y.-Y., Wang Z.-L., Seppaelae J., (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 506-511.
11. Margolin A. L., Creene J. Y., Klibanov A. M., (1987), *Tetrahedron Lett.*, 28, 1607-1610.
12. Gross R. A., Kalra B., Kumar A., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 655-660.
13. Berkane C., Mezoul G., Lalot T., Brigodit M., Marechal E., (1997), *Macromolecules*, 30, 7729-7734.
14. Morrow C. J., Wallace J. S., (1993), *US Patent*, 5 147 791, C.A. 118, 102985x (1993).
15. Wallace J. S., Morrow C. J., (1989), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 27, 3271-3284.
16. Uyama H., Kobayashi S., (1994), *Chem. Lett.*, 1687-1689.
17. Uyama H., Shigeru Y., Kobayashi S., (1999), *Polymer J.*, 31, 380-383.
18. Knami D., Gutman A. L., Kohn D. H., (1993), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 31, 1221-1232.
19. Chaudhary A. K., Lopez J., Becjman E. J., Russell A. J., (1997), *Biotechnol. Prog.*, 13, 318-325.
20. Rodney R. L., Allison B. T., Becman E. J., Russell A. J., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 65, 485-489.
21. Pavel K., Ritter H., (1991), *Macromol. Chem.*, 192, 1941-1949.
22. Gutman A. L., Oren D., Boltanski A., Bravdo T., (1987), *Tetrahedron. Lett.*, 28, 5367-5368.
23. Husemann E., Mueller G. J. M., (1966), *Makromol. Chem.*, 91, 212-217.
24. Micheel F., Brodde O. E., (1974), *Liebigs Ann. Chem.*, 124, 702.
25. Kobayashi S., Kashiwa K., Kawasaki T., Shoda S., (1991), *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 3079-3084.
26. Lai H. L., Buttler L. G., Axelrod B., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 635.
27. Kobayashi S., Shoda S., Wen X., Okamoto E., Kiyosada T., (1997), *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A34, 2135-2140.
28. Kobayashi S., Kawasaki T., Obata K., Shoda S., (1993), *Chem. Lett.*, 685-686.
29. Shoda S., Kawasaki T., Obata K., Kobayashi S., (1993), *Carbohydr. Res.*, 249, 127.
30. Kobayashi S., Shoda S., (1995), *Int. J. Biol. Macromol.*, 17, 373-379.
31. Kobayashi S., Shimada J., Kashiwa K., Shoda S., (1992), *Macromolecules*, 25, 3237-3241.
32. Andresz H., Richter G. C., Pffannmueller B., (1978), *Makromol. Chem.*, 179, 301-306.
33. Kobayashi S., Wen X., Shoda S., (1996), *Macromolecules*, 29, 2698-2700.
34. Kobayashi S., Kiyosada T., Shoda S., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 13113-13114.
35. Shoda S., Okamoto E., Kiyosada T., Kobayashi S., (1994), *Macromol. Rapid Commun.*, 15, 751-754.
36. Okamoto E., Kiyosada T., Shoda S., Kobayashi S., (1997), *Cellulose*, 4, 6411.
37. Fujita M., Shoda S., Kobayashi S., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 6411-6412.
38. Uyama H., Kobayashi S., (1993), *Chem. Lett.*, 1149-1150.
39. McDonald R. T., Pulpapura S. K., Svirkin Y. Y., Gross R. A., Kaplan D. L., Akkara J., Swift G., Wolk S., (1995), *Macromolecules*, 28, 73-78.
40. Kumar A., Gross R. A., (2000), *Biomacromolecules*, 1, 133-138.
41. Kobayashi S., Takeya K., Suda S., Uyama H., (1998), *Macromol. Chem. Phys.*, 199, 1729-1736.
42. Bisht K. S., Deng F., Gross R. A., Kaplan D. L., Swift G., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 1363-1367.
43. Cordova A., Iversena T., Hult K., (1999), *Polymer*, 40, 6709-6721.
44. Kullmer K., Kikuchi H., Uyama H., Kobayashi S., (1998), *Macromol. Rapid Commun.*, 19, 127-130.
45. Nobes G. A. R., Kazalaukas R. J., Marchessault R. H., (1996), *Macromolecules*, 29, 4829-4833.
46. Namekawa S., Uyama H., Kobayashi S., (1996), *Polymer J.*, 28, 730-735.
47. Svirkin Y. Y., Gross R. A., Kaplan D. L., Swift G., (1996), *Macromolecules*, 29, 4591-4597.
48. Matsumura S., Beppu H., Nakamura K., Osanai S., Toshima K., (1996), *Chem. Lett.*, 795-796.
49. Dong H., Wang H.-D., Cao S.-G., Shen J.-C., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 905-908.
50. Kobayashi S., Uyama H., Namekawa S., Hayakawa H., (1998), *Macromolecules*, 31, 5655-5659.
51. Cordova A., Iversen T., Hult K., Martinelle M., (1998), *Polymer*, 39, 6519-6524.
52. Cordova A., Hult K., Iversen T., (1998), *Macromolecules*, 31, 1040-1045.
53. Dubois P., Degee P., Jerome R., Teyssie P., (1992), *Macromolecules*, 25, 2614-2618.

54. Uyama H., Kikuchi H., Takeya K., Kobayashi S., (1996), *Acta Polym.*, 47, 357-360.
55. Uyama H., Takeya K., Hoshi N., Kobayashi S., (1995), *Macromolecules*, 28, 7046-7050.
56. Namekawa S., Uyama H., Kobayashi S., (1998), *Proc. Jpn. Acad.*, 748, 65.
57. Uyama H., Takeya K., Kobayashi S., (1995), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68, 56-61.
58. Uyama H., Kikuchi H., Takeya K., Hori N., Kobayashi S., (1996), *Chem. Lett.*, 107-109.
59. Uyama H., Suda S., Kikuchi H., Kobayashi S., (1997), *Chem. Lett.*, 1109-1110.
60. Cordova A., Hult A., Hult K., Ihre H., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 13521-13522.
61. Kobayashi S., Uyama H., Namekawa S., (1998), *Polym. Degrad. Stab.*, 59, 195-201.
62. Matsumura S., Tsukada K., Toshima K., (1999), *Int. J. Biol. Macromol.*, 25, 161.
63. Deng F., Gross R. A., (1999), *Int. J. Biol. Macromol.*, 25, 153-159.
64. Kumar A., Gross R. A., (2000), *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 11767-11770.
65. Bisht K. S., Svirkin Y. Y., Henderson L. A., Gross R. A., Kaplan D. L., Swift G., (1997), *Macromolecules*, 30, 7735-7742.
66. Matsumoto M., Odachi D., Kondo K., (1999), *Biochem. Eng. J.*, 4, 73-76.
67. Henderson L. A., Gross R. A., (1996), *Renewable resources, biopolymers and biocatalysis*, Eds. Scholz C., Gross R. A., 110-112, American Chemical Society, Washington DC.
68. Henderson L. A., Svirkin Y. Y., Gross R. A., Kaplan D. L., Swift G., (1996), *Macromolecules*, 29, 7759-7766.
69. Bisht K. S., Henderson L. A., Gross R. A., Kaplan D. L., Swift G., (1997), *Macromolecules*, 30, 2705-2710.
70. Zaks A., Klibanov A. M., (1984), *Science*, 224, 1249-1251.
71. deZoete M. C., van Rantwijk F., Sheldon R. A., (1994), *Catalysis Today*, 22, 563-590.
72. Abramowicz D. A., Keese C. R., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 149-156.
73. Pioch D., Lozano P., Graille J., (1991), *Biotechnol. Lett.*, 13, 633-636.
74. Pozo M., Pulido R., Gotor V., (1992), *Tetrahedron*, 48, 6477-6484.
75. Pozo M., Gotor V., (1993), *Tetrahedron*, 49, 4321-4326.
76. Pozo M., Gotor V., (1993), *Tetrahedron*, 49, 10725-10732.
77. Pozo M., Gotor V., (1995), *Tetrahedron: Asymm.*, 6, 2797-2802.
78. Rodney R. L., Stagno J. L., Beckman E. J., Russell A. J., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 62, 259-266.
79. Chaudhary A. K., Beckman E. J., Russell A. J., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 227-239.
80. Bisht K. S., Svirkin Y. Y., Henderson L. A., Gross R. A., Kaplan D. L., Graham S., (1997), *PMSE Prepr.*, 76, 421.
81. Bisht K. S., Svirkin Y. Y., Gross R. A., Kaplan D. L., Swift G., (1997), *Polym. Mat. Sci. Eng.*, 76, 421-422.
82. Kobayashi S., Kikuchi H., Uyama H., (1997), *Macromol. Rapid Commun.*, 18, 575-579.
83. Matsumura S., Tsukada K., Toshima K., (1997), *Macromolecules*, 30, 3122-3124.
84. Al-Azemi T. F., Bisht K. S., (1999), *Macromolecules*, 32, 6536-6540.
85. Feng J., He F., Zhuo R. X., (2002), *Macromolecules*, 35, 7175-7177.
86. Rokicki G., dane nie opublikowane.
87. He F., Wang Y. X., Zhuo R. X., (2003), *Chinese J. Polym. Sci.*, 21, 5.
88. Yu X.-H., Zhuo R.-X., Feng J., Liao J., (2004), *Europ. Polym. J.*, 40, 2445-2450.
89. Al-Azemi T. F., Harmon J. P., Bisht K. S., (2000), *Biomacromolecules*, 1, 493-500.
90. Derango R. A., Chiang L. C., Dowbenko R., Lash J. G., (1992), *Biotechnol. Tech.*, 6, 523-526.
91. Emery O., Lalot T., Brigodit M., Marechal E., (1997), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 35, 3331-3333.
92. Uyama H., Lohavisavapanich C., Ikeda R., Kobayashi S., (1998), *Macromolecules*, 31, 554-556.
93. Ikeda R., Tanaka H., Uyama H., Kobayashi S., (1998), *Macromol. Rapid Commun.*, 19, 423-425.
94. Busson P., Ihre H., Hult A., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 9070-9071.
95. Lay L., Panza L., Riva S., Khitri M., Tirendi S., (1996), *Carbohydr. Res.*, 291, 197.
96. Wang Y.-F., Wong C.-H., (1988), *J. Org. Chem.*, 53, 3127-3132.
97. Ihre H., Hult A., Soderlind E., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 6388-6395.
98. Cordova A., Iversen T., Hult K., (1998), *Macromolecules*, 31, 1040-1045.
99. Skaria S., Smet M., Frey H., (2002), *Macromol. Rapid Commun.*, 23, 292-296.

100. Kulshrestha A. S., Gross R. A., (2004), Preprints MACRO 2004 IUPAC Paris,
101. Schnotzer M., Barr M., Hartenstein R., (1984), *Soil Biol. Biochem.*, 16, 371.
102. Dordick J. S., Morletta M. A., Klibanov A. M., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 31-36.
103. Dixon M., Webb E. C., (1979), *Enzymes*, Academic Press, London.
104. Akkara J. A., Senecal K., Kaplan D. L., (1991), *J. Polym. Sci.*, 29, 1561-1574.
105. Ayyagari M. S., Marx K. A., Tripathy S. K., Akkara J. A., Kaplan D. L., (1995), *Macromolecules*, 28, 5192-5197.
106. Akkara J. A., Ayyagari M. S. R., Bruno F. F., (1999), *TIBTECH*, 17, 67-73.
107. Ayyagari M., Akkara J. A., Kaplan D. L., (1996), *Acta Polym.*, 47, 193-203.
108. Ayyagari M., Akkara J. A., Kaplan D. L., (1996), *Mater. Sci. Eng. C*, 4, 169-173.
109. Bruno F. F., Akkara J. A., Samuelson L. A., Kaplan D. L., Mandal B. K., Marx K. A., Kumar J., Tripathy S. K., (1995), *Langmuir*, 11, 889-892.
110. Jones J. B., (1986), *Tetrahedron*, 42, 3351-3353.
111. Ryu K., Stafford D. R., Dordick J. S., (1989), *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 389, 408-436.
112. Kobayashi S., Kurioka H., Uyama H., (1996), *Macromol. Rapid Commun.*, 17, 503-504.
113. Kobayashi S., Uyama H., Ushiwata T., Uchiyama T., Sugihara J., Kurioka H., (1998), *Macromol. Chem. Phys.*, 199, 777-782.
114. Hay A. S., (1967), *Adv. Polym. Sci.*, 4, 496.
115. Johnson R. O., Burlhis H. S., (1983), *J. Polym. Sci., Polym. Symp.*, 70, 129-133.
116. Ikeda R., Uyama H., Kobayashi S., (1996), *Macromolecules*, 29, 3053-3054.
117. Ikeda R., Sugihara J., Uyama H., Kobayashi S., (1998), *Polym. Int.*, 47, 295-297.
118. Ikeda R., Sugihara J., Uyama H., Kobayashi S., (1996), *Macromolecules*, 29, 8702-8705.
119. Ichinohe D., Muranaka T., Sasaki T., Kobayashi M., Kise H., (1998), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 36, 2593-2600.
120. Aizawa M., Wang L., Shinohara H., Ikariyama Y., (1990), *J. Biotechnol.*, 14, 301-310.
121. Alva K. S., Marx K. A., Kumar J., Tripathy S. K., (1996), *Macromol. Rapid Commun.*, 17, 859-861.
122. Kobayashi S., Kaneko I., Uyama H., (1992), *Chem. Lett.*, 393-395.
123. Akkara J. A., Salapu P., Kaplan D. L., (2004), *Indian J. Chem.*, 31B, 855-858.
124. Lim C. H., Yoo Y. J., (2000), *Process Biochem.*, 36, 233-241.
125. Liu W., Kumar W., Tripathy S. K., Senecal K., Samuelson L., (1999), *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 71-78.
126. Wang X., Schreuder-Gibson H., Downey M., Tripathy S., Samuelson L., (1999), *Synth. Met.*, 107, 117-121.
127. Karamyshev A. V., Shleev S. V., Koroleva O. V., Yaropolov A. I., Sakharov I. Y., (2003), *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 556-564.
128. Park S., Kazlauskas R. J., (2001), *J. Org. Chem.*, 66, 8395-8401.
129. Al-Duri B., Goddard R., Bosley J., (2001), *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 11, 825-834.
130. Matsumura S., Ebata H., Kondo R., Toshima K., (2001), *Macromol. Rapid Commun.*, 22, 1325-1329.
131. Takemoto T., Uyama H., Kobayashi S., (2001), *e-Polymers*, 4, 1-5.