

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

ANTANAS STRAKŠYS

POLI(URETANKARBAMIDINĖS) MIKRODALELĖS: SINTEZĖ,
TYRIMAS IR PANAUDOJIMAS MALTOGENINEI α -AMILAZEI
IMOBILIZUOTI

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2015 metai

Disertacija rengta Vilniaus Universitete 2007-2011 metais studijuojant doktorantūroje ir ginama eksternu

Mokslinė konsultantė:

Prof. dr. Saulutė Budrienė (Vilniaus Universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

TURINYS

SANTRUMPOS.....	6
ĮVADAS	8
1.0 LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1 PU ir PUK sintezėje naudojami izocianatai	12
1.2 Poli(vinilo alkoholis) ir jo naudojimas PU ir PUK sintezei	17
1.3 PU ir PUK dalelių sintezė.....	20
1.4 Akytų PU ir PUK sintezė ir tyrimas	25
1.4.1 Akytų organinių medžiagų sintezei naudojami metodai	25
1.4.2 Medžiagų akytumo įvertinimo būdai.....	27
1.4.3 Akytų PU ir PUK sintezė.....	29
1.5 Fermentų imobilizavimas ant nešiklių.....	32
1.5.1 Imobilizavimo būdai, privalumai ir trūkumai	32
1.5.2 Fermentų imobilizavimas ant PU ir PUK nešiklių	35
1.6 Amilazių šeimos fermentų imobilizavimas ant įvairių nešiklių	41
1.6.1 Krakmolą skaldantys fermentai	41
1.6.2 α -Amilazė ir jos imobilizavimas	42
1.6.3 β -Amilazė ir jos imobilizavimas.....	45
1.6.4 Maltogeninė α -amilazė	47
1.6.4.1 Ma iš <i>Bacillus stearotherophilus</i> ir jos imobilizavimas.....	50
1.7 Literatūros apžvalgos apibendrinimas	55
2. DARBO METODIKA	58
2.1 Naudotos medžiagos ir reagentai.....	58
2.1.1 Polimerai.....	58
2.1.2 Organinės medžiagos.....	58
2.1.3 Neorganinės medžiagos	60
2.1.4 Tirpikliai	60
2.1.5 Fermentai	61
2.2 Tirpalai.....	61
2.2.1 Ftalinantis mišinys hidroksigrupių kiekiui nustatyti	61
2.2.2 0,2 M dietilamino tirpalas izocianatogrupių kiekiui nustatyti.....	61
2.2.3 0,1 M Citratinis buferis (pH = 5,0).....	61
2.2.4 Pradinis Ma tirpalas	62
2.2.5 Krakmolo tirpalas Ma aktyvumui nustatyti	62

2.2.6	Neokuproino reagentas redukuojančių cukrų kiekiui nustatyti	62
2.2.7	BCA tirpalas baltymo kiekiui nustatyti	63
2.3	Darbo metodikos.....	63
2.3.1	Poli(uretankarbamidinių) mikrodalelių sintezė	63
2.3.2	Ma imobilizavimas ant poli(uretankarbamidinių) mikrodalelių.....	64
2.4	Analizės metodikos.....	64
2.4.1	Hidroksigrupių kiekio nustatymas	64
2.4.2	Izocianatogrupių kiekio nustatymas	65
2.4.3	Redukuojančių cukrų kiekio nustatymas Neokuproino metodu.....	65
2.4.4	Baltymo kiekio nustatymas modifikuotu Lowry metodu naudojant bicinchinono rūgštį	65
2.4.5	Spektroskopinis PUK mikrodalelių tyrimas	66
2.4.6	Elementinė PUK mikrodalelių analizė	66
2.4.7	Terminė PUK mikrodalelių analizė	66
2.4.8	PUK mikrodalelių dydžio ir paviršiaus morfologijos tyrimas	67
2.4.9	PUK mikrodalelių paviršiaus ploto, bendro akučių tūrio ir jų dydžio pasiskirstymo nustatymas	67
2.4.10	Liofilizavimas	67
2.4.11	PUK išeigos apskaičiavimas.....	68
2.5	Ma aktyvumo ir stabilumo nustatymas.....	68
2.5.1	Pradinio Ma tirpalo aktyvumo nustatymas	68
2.5.2	Ma aktyvumo nustatymas ant IP	68
2.5.3	Ma aktyvumo nustatymas filtrate	69
2.5.4	Imobilizuotos Ma stabilumo nustatymas	69
2.5.5	Tirpios ir imobilizuotos Ma optimalios temperatūros įvertinimas	70
2.5.6	Natrio chlorido įtaka tirpios ir imobilizuotos Ma fermentiniam aktyvumui nustatymas	70
2.5.7	Tirpios ir imobilizuotos Ma K_M nustatymas.....	70
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	72
3.1	PUK mikrodalelių sintezė.....	72
3.1.1	PUK mikrodalelių sintezė iš PVA ir diizocianatų mišinio	73
3.1.2	PUK mikrodalelių sintezė iš PVA ir IPDI.....	76
3.1.3	PUK mikrodalelių sintezė iš PVA ir HMDI.....	79
3.2	PUK mikrodalelių tyrimas.....	83
3.2.1	PUK mikrodalelių sandaros tyrimas.....	83

3.2.2	Iš PVA ir įvairių diizocianatų susintetintų PUK mikrodalelių terminė analizė.....	88
3.2.3	PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir įvairių diizocianatų, aktyvumo tyrimas	97
3.2.4	PUK mikrodalelių dydžio ir paviršiaus morfologijos tyrimas	105
3.3	Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių ir imobilizuotų preparatų tyrimas	108
3.3.1	Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių tyrimas	109
3.3.1.1	Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI bei TDI mišinio, tyrimas.....	109
3.3.1.2	Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, tyrimas.....	111
3.3.1.3	Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, tyrimas.....	114
3.3.2	Imobilizuotų preparatų savybių tyrimas.....	116
3.3.2.1	Imobilizuotos Ma ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir diizocianatų, stabilumo tyrimas.....	116
3.3.2.2	Ma IP krakmolo hidrolizės ciklinio režimo tyrimas.....	121
3.3.2.3	Joninės jėgos įtaka tirpiai ir ant PUK mikrodalelių imobilizuotai Ma	123
3.3.2.4	Tirpios ir ant PUK mikrodalelių imobilizuotos Ma optimalios temperatūros nustatymas	126
3.3.2.5	Tirpios ir imobilizuotos maltogeninės α -amilazės K_M ir V_{MAX} nustatymas	128
3.3.3	PUK mikrodalelių taikymas ureazei imobilizuoti	130
	IŠVADOS	134
	PUBLIKUOTŲ DARBŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	136
	CURRICULUM VITAE.....	140
	LITERATŪRA	141

SANTRUMPOS

BD	– 1,4-butandiolis
BET	– <i>Brunauer-Emmett-Teller</i> (paviršiaus ploto nustatymo metodas)
BJH	– <i>Barret-Joyner-Halenda</i> (akučių dydžio ir tūrio nustatymo metodas)
BsMa	– maltogeninė α -amilazė iš <i>Bacillus stearothermophilus</i>
CGTazė	– ciklodekstrino gliukanotransferazė
DE	– dekstrozės ekvivalentas
DI	– diizocianatas
DMPA	– dimetilolpropano rūgštis
DMSO	– dimetilsulfoksidas
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
GA	– glutaraldehydas
HDI	– 1,6-heksametilendiizociantas
HEMA	– 2-hidroksietilmetakrilatas
HIPE	– didelio tūrio vidinės (disperguotos) fazės emulsinės polimerizacijos metodas (high internal phase emulsijon)
HMDI	– 4,4'-dicikloheksilmetandiizocianatas
IB	- fermento imobilizavimas pagal baltymą
IE	– imobilizavimo efektyvumas
IP	– imobilizuotas preparatas
IUPAC	– Tarptautinė grynosios ir taikomosios chemijos sąjunga
IPDI	– izoforondiizocianatas
K_M	– <i>Michaelis-Menten</i> konstanta
Ma	– maltogeninė α -amilazė
MDI	– 4,4'-difenilmetandiizocianatas
PEG	– polietilenglikolis
PEI	– polietileniminas
PET	– polietilentereftalatas
PCL	– polikaprolaktonas

PP	– polipropilenas
PUK	– poli(uretankarbamidas)
PU	– poliuretanas
PVA	– poli(vinilo alkoholis)
PVAc	– polivinilacetatas
SA	– santykinis aktyvumas
TDI	– 2,4-toluendiizociantas
V_{MAX}	– maksimalus reakcijos greitis

ĮVADAS

Šiuolaikiniame pasaulyje poli(uretanai) (PU) ir poli(uretankarbamidai) (PUK) naudojami optinių jutiklių gamyboje, kosmoso, automobilių, statybos, tekstilės pramonės srityse, taip pat biotechnologijoje ir medicinoje, nes pasižymi biosuderinamu [1-3]. PU/PUK daugiausia sintetunami masėje arba dispersijose, iš kurių gaminamos dangos, plėvelės, membranos, matricos.

Į pradinį reagentų mišinį įdėjus akytumą sudarančių medžiagų (įvairių neorganinių druskų, žemos virimo temperatūros inertinių tirpiklių ar vandens), gaunami aktyti PU/PUK. Jie dažniausiai naudojami kaip karkasas atstatyti pažeistiems audiniams ar lūžusiems kaulams [4, 5], taip pat tinka fermentams imobilizuoti.

Fermentų imobilizavimas yra svarbi ir aktuali sritis, nes fermentai yra brangūs, juos sunku išgryninti, o jų panaudojimas yra vienkartinis. Jie jautrūs temperatūros, pH ir joninės jėgos pokyčiams. Norint panaikinti arba dalinai pašalinti išvardintus trūkumus, fermentus būtina imobilizuoti. Fermentams imobilizuoti naudojami įvairūs polimeriniai nešikliai, taip pat ir PU/PUK.

Publikacijų skaičius apie fermentų įterpimą į PU matricas, putplasčius ar imobilizavimą ant plėvelių ir membranų yra didelis, deja, dauguma išvardintų imobilizavimo būdų ant PU/PUK yra neefektyvūs, o gauti imobilizuoti preparatai – mažai stabilūs.

Darbo aktualumas

Šiuo metu gaminama nemažai fermentų nešiklių, tačiau daugeliu atvejų fermentai imobilizuojami fizikinės adsorbcijos būdu, kai fermentas prie nešiklio gali jungtis dėl hidrofobinės sąveikos ir *Van der Waals'o* sąveikų, susidarant vandeniliniams ir joniniams ryšiams. Taip pat naudojamas kovalentinis imobilizavimas, tačiau šiuo atveju nešikliai prieš imobilizavimą paprastai modifikuojami difunkciniais junginiais. Nešiklių sintezės sritis nėra iki galo išplėtota, todėl naujų nešiklių sintezė ir jų pritaikymas biokatalizatoriams imobilizuoti gali būti platus, pradedant nuo panaudojimo biotechnologijoje ir baigiant greitu utilizavimu.

Publikacijų apie fermentų imobilizavimą ant PUK dalelių kovalentiniu būdu yra mažai, o fermentų imobilizavimas ant akytų PUK mikrodalelių yra palyginus nauja ir mažai tyrinėta sritis.

Labai svarbu, kad nešikliai būtų kuo universalesni ir tikėtų imobilizuoti daugumą fermentų. Pageidautina, kad jie būtų mechaniškai patvarūs, pasižymėtų biosuderinamumu ir bioskalumu, o tokių nešiklių labai trūksta. Šias savybes galima suteikti, PUK mikrodalelių sintezei naudojant poli(vinilo alkoholį) (PVA). Be to, PVA padidina nešiklių hidrofiliškumą, todėl jie giminingesni daugumai fermentų, o imobilizavimo metu yra geresnė tarpusavio sąveika, lyginant su hidrofobiniais nešikliais. Susintetintose akytose PUK mikrodalelėse yra laisvų izocianato grupių, todėl nešiklių nereikia papildomai modifikuoti difunkciniais junginiais, kurie gali deaktyvuoti fermentą. Fermentas ant naujų akytų PUK mikrodalelių gali imobilizuotis ne tik kovalentiniu, bet ir fizikinės adsorbcijos būdu.

Darbo naujumas ir reikšmė

Pirmą kartą susintetintos akytos, termostabilios ir temperatūrai atsparios PUK mikrodalelės iš biosuderinamo, bioskalaus ir hidrofilinio poli(vinilo alkoholio) (PVA) ir diizocianatų: 1,6-heksametilendiizocianato (HDI) ir 2,4-

toluendiizocianato (TDI) mišinio, izoforondiizocianato (IPDI) arba 4,4-dicikloheksilmetandiizocianato (HMDI). Iki šiol nebuvo publikuota darbų, kuriuose PVA būtų naudojamas akytoms PUK dalelėms sintetinti. Susintetintos PUK mikrodalelės yra įvairiapusiškai ištirtos: nustatytos mikrodalelių išeigos, funkcinių grupių, akytumo, terminio stabilumo priklausomybės nuo pradinių reakcijos sąlygų (pradinių medžiagų molinių santykių, trukmės, temperatūros). PUK mikrodalelės yra tinkamos maltogeninei α -amilazei (Ma) ir potencialiai kitiems fermentams imobilizuoti dėl jose esančių laisvų izocianatograpių ir akytumo. Detaliai ištirtas Ma imobilizuotų preparatų (IP) aktyvumas ir stabilumas, Ma IP optimalios temperatūros. Ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, imobilizuota Ma išlieka aktyvi po 7 krakmolo hidrolizės ciklų arba laikant 28 paras, todėl gali būti panaudota krakmolo hidrolizei. Šios PUK mikrodalelės panaudotos ureazei imobilizuoti ir biojutikliams, skirtiems karbamido kiekiui nustatyti, kurti.

Darbo tikslas

Susintetinti akytas PUK mikrodaleles iš PVA ir diizocianatų: HDI ir TDI mišinio, IPDI arba HMDI, ištirti jų savybes ir įvertinti tinkamumą Ma imobilizuoti.

Šiam tikslui pasiekti buvo išskelti uždaviniai:

1. Susintetinti PUK mikrodaleles iš PVA ir diizocianatų: HDI ir TDI mišinio, IPDI arba HMDI bei surasti optimalias sintezės sąlygas;
2. Ištirti PUK mikrodalelių sandarą (cheminę sudėtį ir struktūrą), termines savybes, paviršiaus plotą ir akytumą;
3. Panaudoti gautas PUK mikrodaleles Ma imobilizuoti ir ištirti imobilizuotų preparatų efektyvumą bei stabilumą.
4. Nustatyti imobilizuotos ir tirpios Ma optimalias temperatūras, NaCl įtaką Ma aktyvumui ir fermento desorbcijai nuo PUK mikrodalelių, nustatyti

Michaelis-Menten konstantas (K_M) ir maksimalius reakcijos greičius (V_{MAX}).

Ginamieji teiginiai

- Iš PVA ir įvairių diizocianatų – HDI ir TDI mišinio, IPDI arba HMDI – susintetintos akytos PUK mikrodalelės yra tinklinės struktūros, jose yra hidroksigrupių, uretaninių ryšių ir įvairaus ilgio polikarbamido grandinių, kurios gali baigtis laisva izocianatogrupe. Esant diizocianato pertekliui, susidaro ilgesnės, tvarkingesnės struktūros, vandenilniais ryšiais stabilizuotos polikarbamido grandinės.
- PUK mikrodalelės yra plokštelių pavidalo, akutės – plyšinės formos, o jų dydis tinkamas fermentams imobilizuoti. Didžiausias PUK mikrodalelių paviršiaus plotas ir bendras akučių tūris gautas, sintezei naudojant PVA ir IPDI.
- Akytos PUK mikrodalelės tinka Ma imobilizuoti kovalentiniu būdu. Ma imobilizavimo efektyvumas yra didesnis, esant didesniai PUK mikrodalelių paviršiaus plotui, bendram akučių tūriui ir izocianatograpių kiekiui.
- Maltogeninės α -amilazės imobilizuoto preparato optimali temperatūra yra aukštesnė už tirpaus fermento. Ma IP yra stabilūs laike ir gali būti naudojami krakmolo hidrolizei daugkartinio veikimo vonios tipo reaktoriuje. PUK mikrodalelės gali būti naudojamos ir ureazei imobilizuoti.

1.0 LITERATŪROS APŽVALGA

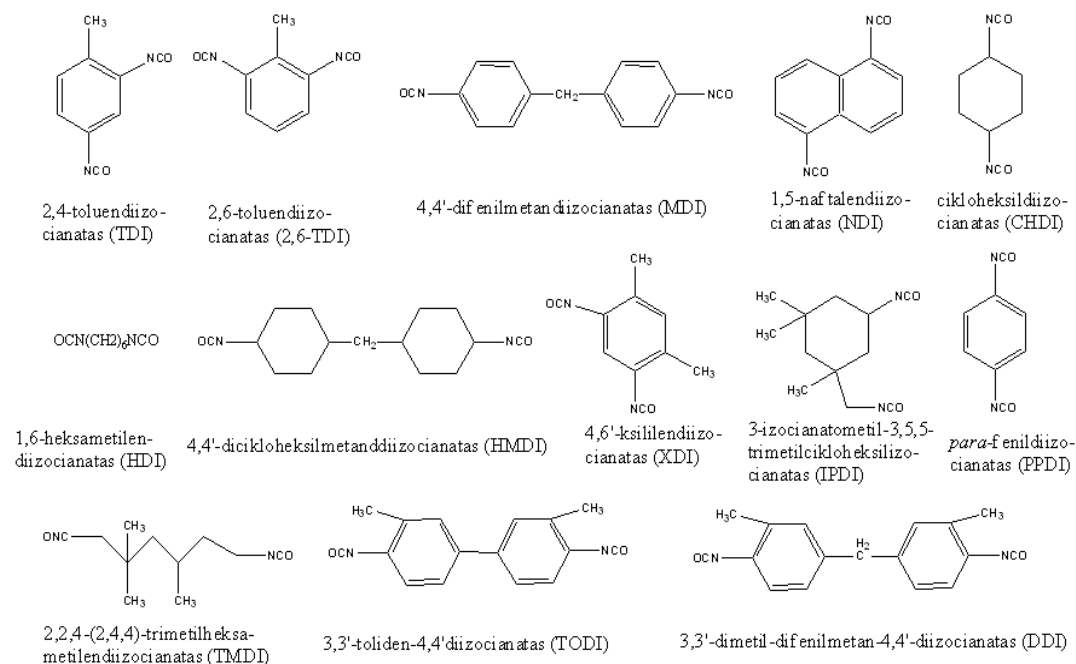
1.1 PU ir PUK sintezėje naudojami izocianatai

1849 metais A. Wurtz pirmą kartą įvykdė sintezę tarp izocianato ir junginių, turinčių hidroksi- arba aminogrupę [8]. Buvo įrodyta, kad tarp izocianatogrupės ir pirminės hidroksigrupės susidaro uretaninis ryšys, o reaguojant izocianatui su aminogrupe susidaro karbamidinis ryšys. 1937 metais Vokietijos įmonėje *I. G. Farben* profesorius Otto Bayer su kolegomis [9] pirmą kartą poliadicijos būdu susintetino poliuretaną (PU) iš poliesterpoliolio, kuris turėjo dvi galines hidroksigrupes, ir diizocianato. 1938 metais H. Rinke su bendradarbiais taip pat sėkmingai susintetino PU, vykdant reakciją tarp alifatinio 1,8-oktandiizocianato ir 1,6-butandiolio (BD), ir tais pačiais metais JAV užpatentavo [10]. 1942 metais *Dupont* kompanija užpatentavo poliizocianatų reakciją su glikoliu, diaminais, poliesteriais ir kitais aktyvųjų vandenilį turinčiais junginiais [11]. Nuo 1950 metų prasidėjo staigus PU pramonės vystymasis. 1954 metais *Dupont* kompanija sėkmingai įvykdė sintezę tarp polietilenglikolio ir 2,4-toluendiizocianato. Didžiausias perversmas įvyko, kai 1,5-naftalendiizocianatas (NDI) buvo pakeistas į liaunesnį difenilmetandiizocianatą (MDI) ir 1957 metais Schollenberger susintetino linijinį elastomerą iš MDI, adipo rūgšties ir BD [12]. Gautas polimeras pasižymėjo elastingumu, tūsumu, tirpumu ir atsparumu trinčiams, o MDI tapo pagrindiniu diizocianatu pluoštų gamyboje. PU tapo universaliausiu polimeru, kuris yra naudojamas visur ir mus lydi kiekviename žingsnyje.

Pirmuosius izocianatus 1848 m. susintetino A. Wurtz [13], atlikdamas reakciją tarp organinio sieros rūgšties esterio ir kalio cianato. 1884 metais A. W. Hofmann, T. Curtius ir W. Hentschel pasiūlė alternatyvią izocianatų sintezę iš aminių, juos veikiant fosgenu [14]. 1921 m. H. Staudinger nustatė, kad izocianato ir ketenų struktūros yra labai panašios ir pastūmėjo mokslininkų susidomėjimą šia sritimi [15]. Tada atsirado publikacijų, kurios aprašo izocianatų reakcijas su skirtingais cheminiais junginiais. Izocianatų reakcijos buvo suskirstytos į du tipus: 1) reakcijos su aktyviu vandenilio donoru; 2)

reakcijos su neaktyviu vandeniliu. Pirmojo tipo reakcijos rado platesnį panaudojimą ir iš jų išsivystė PU chemija, o antrojo tipo reakcijos nėra reikšmingos PU chemijoje, todėl šiame darbe jos nebus nagrinėjamos.

Izocianatai – aktyvūs junginiai, kurių izocianatogrupė gali reaguoti su kitų junginių, turinčių aktyvų vandenilį grupėmis [16]. Aktyvusis vandenilis įeina į daugelio grupių sudėtį, tačiau pagrindinę ir didžiausią reikšmę turi alkoholio



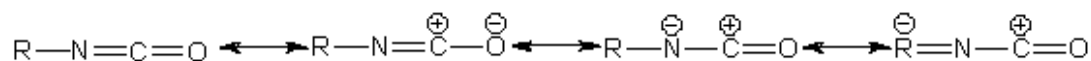
1 pav. Svarbiausių diizocianatų struktūros [11].

reakcija su izocianatu, susidarant uretaniniam ryšiui.

1 pav. pateikiami pagrindiniai ir dažniausiai PU/PUK sintezėje naudojami diizocianatai. PU, kurie sudaryti iš aromatinių diizocianatų, yra neatsparumas saulės šviesai ir oro deguoniui. Jų poveikyje PU pradeda keisti spalvą ir prarasti skaidrumą. Šiam nepageidaujamam efektui panaikinti naudojami alifatiniai diizocianatai – IPDI, HDI ir HMDI.

Izocianatogrupės reakingumas su nukleofiliniais reagentais yra didelis, nes elektroteigiamas anglies atomas delokalizuoja deguonies ir azoto elektronus. Izocianatogrupės elektroninę struktūrą galima išreikšti kaip

rezonansinę (1 schema). Aromatiniai izocianatai yra reaktingesni už alifatinius

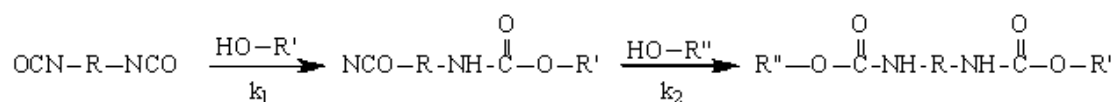


1 schema. Rezonansinė izocianatogrupsės struktūra [11].

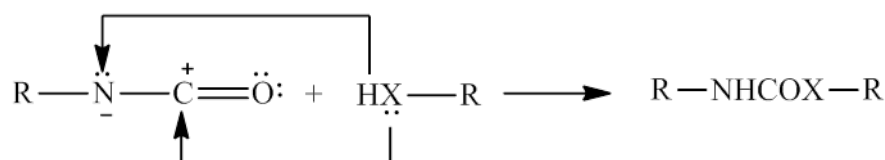
dėl neigiamo krūvio delokalizacijos. Aromatinių izocianatų neigiamo krūvio delokalizacija gali būti pakeista, įvedant pakaitus į aromatinį žiedą. Įvestos akceptorinės grupės *orto* ir *para* padėtyse padidina izocianatogrupsės

1 lentelė. Diizocianatų reaktingumas [11]

Diizocianatas	k_1	k_2
TDI	400	33
MDI	320	110
HDI	1	0,5
HMDI	0,57	0,40
IPDI	0,62	0,23



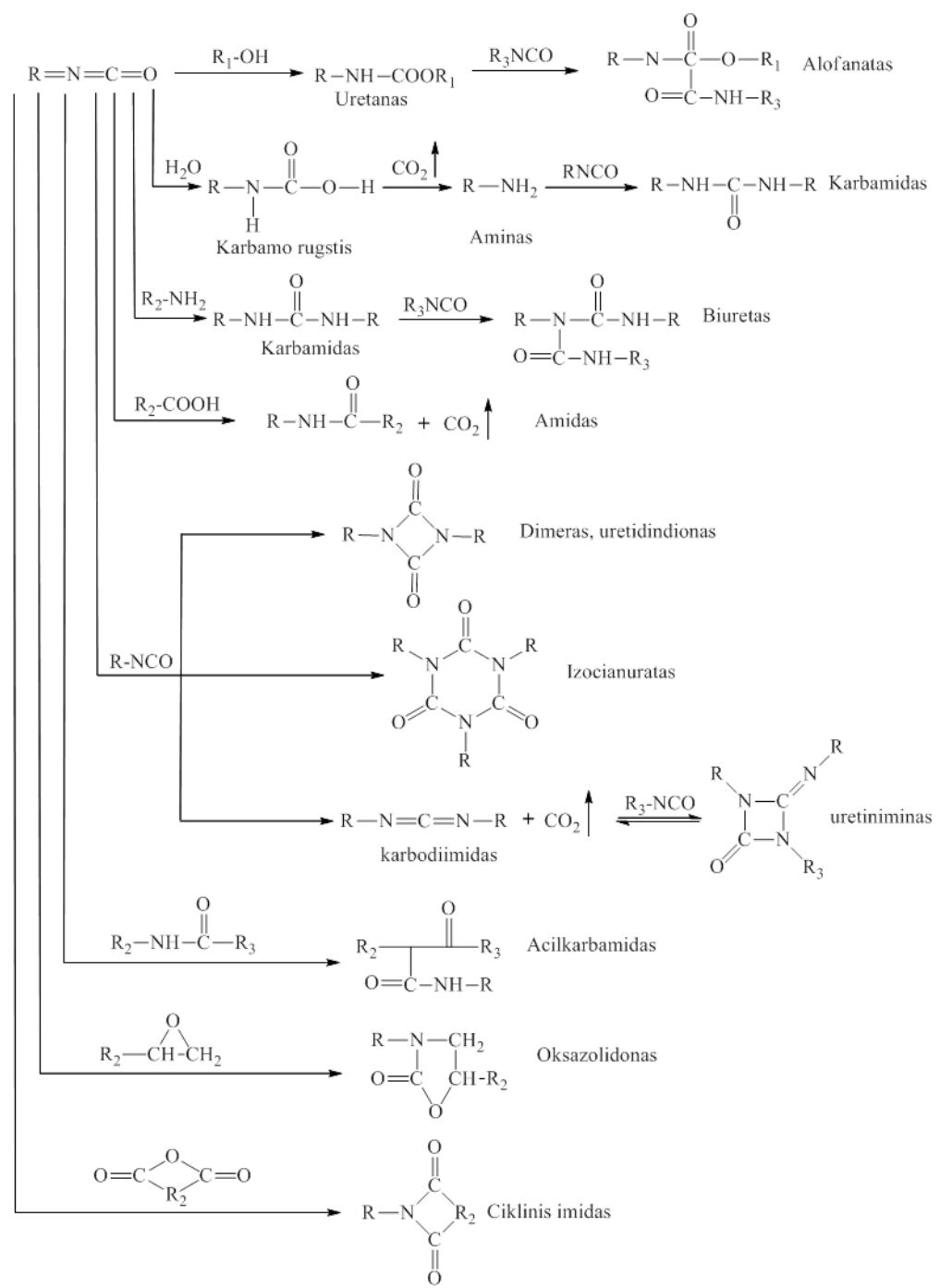
reaktingumą, o donorinės grupės efektą sumažina (1 lentelė). Reakcija tarp izocianato ir junginio, kuris turi aktyvų vandenilį, vyksta pagal tokią schemą:



2 schema. Reakcija tarp izocianato ir aktyvų vandenilį turinčio junginio [17].

junginys, kuris turi aktyvų vandenilį nukleofiliniame centre (hidroksigrupsės – deguonies atomas arba aminogrupsės – azoto atomas), atakuoja elektrofilinį anglies atomą ir vandenilis prisijungia prie izocianatogrupsės azoto atomo

(2 schema). 3 schemejoje pateiktos pagrindinės izocianatų reakcijos su alkoholiais, aminais, vandeniu, rūgštimis, uretanais ir karbamidais, o taip pat jų dimerizacija bei trimerizacija. Plačiausiai naudojama reakcija yra diizocianatų reakcija su polioliais. Alifatinių poliolių pirminė hidroksigrupė yra



3 schema. Izocianatų reakcijos [5].

reaktingiausia, po to seka antrinė ir tretinė hidroksigrupės, o mažiausiai aktyvūs yra aromatiniai alkoholiai (pvz., fenolis) (2 lentelė). Aromatiniai alkoholiai yra naudojami izocianatograpių blokavimui. Reakcijos greitį galima kontroliuoti, į reakcijos mišinį įdėjus tam tikro katalizatoriaus. Rūgštiniai katalizatoriai (pvz., mineralinės rūgštys, rūgščių halogenidai) mažina reakcijos greitį, o baziniai katalizatoriai (pvz., tretiniai aminai, metalų (alavo, cinko, ir kt.) druskos) jį didina [18, 19]. Viena iš svarbesnių reakcijų yra izocianatų reakcija su vandeniu. Vanduo, reaguodamas su izocianatogrupe, sudaro nestabilią karbamato rūgštį, kuri skyla į aminą ir anglies dioksidą. Susidaręs aminas labai greitai reaguoja su laisva izocianatogrupe, sudarydamas karbamidinį ryšį, o išsiskyręs anglies dioksidas išpučia medžiagą.

Izocianatų reakcija su amino junginiais, susidarant karbamido ryšiui (3 schema, 2 lentelė), dažnai taikoma, kai, sintetinant PU, lieka mažai laisvų

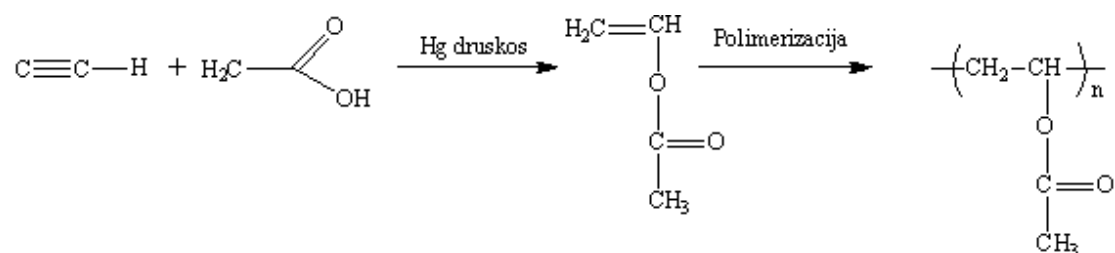
2 lentelė. Santykinis izocianatograpių aktyvumas su junginiais, kurie turi aktyvųjį vandenilį [17]

Aktyvų vandenilį turintis junginys	Formulė	Santykinis reakcijos greitis (be katalizatoriaus, 25 °C)
Pirminis alifatinis aminas	R-NH ₂	2500
Antrinis alifatinis aminas	R ₂ NH	500-1250
Pirminis aromatinis aminas	Ar-NH ₂	5-7,5
Pirminis alifatinis alkoholis	R-CH ₂ -OH	2,5
Vanduo	HOH	2,5
Karboksirūgštis	R-COOH	1
Antrinis alifatinis alkoholis	R ₂ CH-OH	0,75
Urėja	R-NH-CO-NH-R	0,375
Tretinis alifatinis alkoholis	R ₃ C-OH	0,0125
Aromatinis alkoholis	Ar-OH	0,0025-0,0125
Uretanas	R-NH-COOR	0,0025

izocianatograpių arba norima, kad produktas turėtų tam tikrų savybių. Reakcijos greitis tarp izocianato- ir aminograpių yra 100-1000 kartų didesnis nei su hidroksigrupe. Reaktingiausi yra alifatiniai pirminiai aminai, po to seka alifatiniai antriniai aminai, aromatiniai pirminiai aminai ir galiausiai aromatiniai antriniai aminai. Tretiniai aminai nereaguoja su izocianatograpiėmis, nes neturi aktyvaus laisvo vandenilio, bet yra puikūs katalizatoriai PU sintezėje [18]. Likusios izocianatų reakcijos yra ne tokios svarbios ir yra labiau savitos (saviti katalizatoriai, aukštos temperatūros). Alafonatų ar biuretų sintezei reikia aukštesnės temperatūros ($T > 110\text{ }^{\circ}\text{C}$) [20] ir katalizatorių, kai įprastinės reakcijos, esant katalizatoriui vyksta esant $40\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Pakėlus temperatūrą iki $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, prasideda grįžtamasis alafonatų ir biuretų susidarymo procesas [5, 20, 21]. Esant savitiems baziniams katalizatoriams, diizocianatai gali dimerizuotis ir trimerizuotis [22]. TDI dėl alkilgrupės trukdžių negali dimerizuotis, o MDI jau kambario temperatūroje lėtai dimerizuoja. Pagrindiniai trimerizacijos reakcijos produktai yra izocianuratai ir šios reakcijos yra negrįžtamos. Esant savitiems katalizatoriams, gali vykti kondensacijos reakcijos, susidarant karbodiimidams, kurie gali grįžtamai pavirsti į uretinimus.

1.2 Poli(vinilo alkoholis) ir jo naudojimas PU ir PUK sintezei

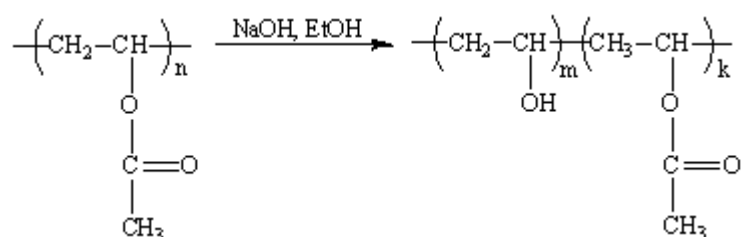
1912 metais vokiečių chemikas F. Klatte pirmą kartą susintetino vinilacetatą iš acetileno ir acto rūgšties [23], kaip katalizatorių naudojant gyvsidabrio druskas. Po metų mokslininkas pirmą kartą susintetino



4 schema. PVAc sintezė.

poli(vinilacetatą) (PVAc) (4 schema) [24]. Po 13 metų vokiečių mokslininkai W. O. Herrmann ir W. Haehnel pirmą kartą gavo poli(vinilo alkoholį) (PVA) iš PVAc [25]. Tais pačiais metais, nepriklausomai nuo jų, H. Staudinger su bendradarbiais taip pat susintetino PVA, hidrolizuojant PVAc alkoholinėje terpėje (5 schema) [26].

Šiuo metu PVA vandeninis tirpalas naudojamas medžiui klijuoti. Jis taip pat yra modifikuojamas įvairiais aldehidais bei kitais funkciniais junginiais, ir



5 schema. PVA sintezė ($m \gg k$).

naudojamas tekstilėje, žvejyboje, dangų, popieriaus, medicinos, biotechnologijos pramonėse, emulsijose kaip sterinis stabilizatorius.

Literatūros šaltiniuose rasta, kad PVA, kaip poliolis, naudojamas reakcijoms vykdyti su izocianatais ar diizocianatais [27-38]. PVA gali būti naudojamas kaip poliolis, nes jo ilgos molekulės turi laisvas antrines hidroksigrupes, kurios reaguoja su izocianatogrupėmis ir, priklausomai nuo PVA susiuvimo laipsnio, yra gaunamos kietos medžiagos ar hidrogeliai. F. Arranz su bendradarbiais įvykdė reakciją tarp PVA ir *n*-butanizocianato ir nustatė, kad susidaro modifikuotas PVA, kuriame yra vinilbutiluretano grandžių. Šios reakcijos greitis mažėja, ilginant reakcijos trukmę, nes susidariusios vinilbutiluretano grandys trukdo izocianatui patekti prie laisvų PVA hidroksigrupių [27]. PVA plėvelių paviršius taip pat buvo modifikuotas HDI, o po to likusios laisvos izocianatogrupės hidrolizuojant buvo paverstos į aminogrupes. Taigi, rūgštinėje terpėje plėvelės paviršius įgavo teigiamą krūvį [28]. PVA modifikuojant fenilizocianatu, buvo sumažintas PVA hidrofiliškumas [29]. C. Galiatsatos su bendradarbiais [30] susintetino

membraną iš PVA ir triizocianato dimetilsulfoksido (DMSO) tirpale. Reakcija buvo atlikta kambario temperatūroje, o membranos storis buvo reguliuojamas keičiant reakcijos laiką. Norint pagerinti mišinių savybes, PVA buvo sumaišytas su PU. Tai atliko G.-Q. Zhu su bendradarbiais [31], suformuodami membraną iš PVA ir PU DMSO tirpale. PU buvo susintetintas iš TDI, polipropilenglikolio ir polietilenglikolio, o grandinei prailginti naudotas BD. Autoriai teigia, kad gautoje membranoje susidaro vandeniliniai ryšiai tarp PVA hidroksigrupių ir PU uretaninių ryšių, o membranos hidrofobiškumas, lyginant su PVA membrana, didėja, didinant PU masės dalį membranoje [31]. C.-D. Nechifor su bendradarbiais gavo plėvelę iš PVA ir PU, juos tarpusavyje mechaniškai sumaišant [32]. Nustatyta, kad plėvelės hidrofobiškumas didėja, o mechaninės savybės blogėja, didinant PU masės dalį plėvelėje. M. Krumova su kolegomis tyrė, kaip keičiasi PVA plėvelės mechaninės ir terminės savybės nuo susiuvimo laipsnio, kai PVA buvo susiuvamas su HDI [33]. Nustatyta, kad plėvelės mechaninės ir terminės savybės blogėjo, kol susiuvimo laipsnis pasiekė 20 %, nes, susiuvant mažėjo PVA kristališkumo laipsnis. Susiuvimo laipsnį toliau didinant, savybės nebetiko. Autoriai išskyrė 3 tokio reiškimo priežastis: silpnėja tinklinė struktūra dėl nutrūkusių vandenilinių ryšių; formuojasi tinklinė struktūra, paremta cheminiais ryšiais; atsiranda lanksčių grandinės atkarpų. J.-K. Yun su kolegomis iš PVA, PUK ir nailono sukūrė audinį, kuris yra laidus vandens garams [34]. Straipsnyje [35] aprašytas membranos iš PVA/poli(vinilbutiralo) kopolimero ir hidrofiliinio PU gavimas. Membrana buvo padengtas platinos elektrodas, kuris skirtas fermentui imobilizuoti. Tokiu būdu sukurtas gliukozės biojutiklis, kuris gali būti naudojamas medicininiams ir biologiniams tikslams [35]. Darbe [36] iš politetrametileterglikolio, TDI ir BD, kuris naudotas grandinėms prailginti, gauta PU membrana. Ji buvo modifikuota silicio dioksido dalelėmis, padengtomis PVA. Tokia membrana geriau praleidžia anglies dioksidą ir labiau sulaiko azoto, deguonies ir metano dujas, lyginant su nemonifikuota. S. Bonakdar su kolegomis [37] pagamino bioskalų hidrogelį iš PVA, kurio liaunos grandinės buvo susiūtos aktyviu PU prepolimeru, susintetintu iš

polikaprolaktono (PCL) ir perteklinio kiekio HDI. Toks modifikuotas hidrogelis gali būti panaudotas kaip atrama sąnario audinio atsinaujinimui po sunkių kremzlės operacijų ar pažeidimų [37, 38].

VU Chemijos fakultete, Polimerų chemijos katedroje susintetintos PU mikrodalelės iš PVA ir HDI [39] organiniuose tirpaluose (kai į reakcijos mišinį nebuvo dedama sterinio stabilizatoriaus). Šios susintetintos dalelės buvo panaudotos maltogeninei α -amilazei imobilizuoti.

Apibendrinus literatūrą, galima teigti, kad, modifikuojant PVA įvairiais izocianatais, buvo gautos įvairiomis savybėmis pasižyminčios plėvelės, membranos ir hidrogeliai. Be to, PVA įvairiais santykiais buvo maišomas su PU, norint gauti tam tikrų savybių plėveles ir membranas. Tik VU Chemijos fakultete, Polimerų chemijos katedroje PVA buvo naudotas kaip poliolis PU mikrodalelių sintezei.

1.3 PU ir PUK dalelių sintezė

Anksčiau PU sintezė buvo atliekama masėje, kai sistema sudaryta tik iš reaguojančių medžiagų arba išskirtinai organiniuose tirpaluose, kadangi diizocianatai yra jautrūs drėgmei. Laikui bėgant, atsirado poreikis PU ir PUK medžiagas sintetinti dalelių pavidalu [40-49]. Tokios medžiagos panaudotos dangoms, plėvelėms, audiniams, užpildams gaminti. Pagrindinis PU dalelių sintezės būdas yra emulsinė arba suspensinė polimerizacija [40-49]. Pirmąsias PU daleles susintetino J. J. McGarr iš *USM* įmonės [40], naudodamas emulsinės polimerizacijos metodą. Patente nurodyta, kad reakcija vykdyta organiniame tirpiklyje, kuriame diizocianatai TDI arba MDI yra netirpūs, o polioliai – politetrametileneterglikolis ar poli(butanoladipatas) su galinėmis hidroksigrupėmis – tirpūs. Grandinėms prailginti pasirinktas BD. Sistema stabilizuota, įvedant stabilizatorių – vinilpirolidono ir 1-heksadeceno kopolimerą [40]. X. Wang ir E. Ruckenstein [41] susintetino PU daleles organinėje hidrofobinėje terpėje, nenaudojant sterinių stabilizatorių. Reakcija

buvo vykdoma tarp polidifenilmetandiizocianato ir polipropilenglikolio mineralinėje alyvoje, į reakcijos terpę įdėjus kalcio karbonato ir vandens, dėl kurių poveikio dalelės tapo akytos struktūros. Mokslininkai iš Indijos [42-46] susintetino PU sferas iš etilenglikolio ar 2-etil-1,3-heksandiolio ir TDI, esant katalizatoriui. Sferų dydžiui reguliuoti buvo naudojami steriniai stabilizatoriai: kopolimerai poli(butadienas)-*b*-poli(etilenoksidas) [42, 43] arba poli(izoprenas)-*b*-poli(etilenoksidas) [44], o taip pat makromonomeras, kuris gautas iš trimetilopropano ir poli(laurilmetakrilato), su galinėmis karboksigrupėmis [45, 46]. Nustatyta, kad susintetintų sferų dydžiai priklauso nuo stabilizatoriaus struktūros ir koncentracijos. Naudojant poli(izopreną)-*b*-poli(etilenoksida), gauta, kad PU sferų dydžiai svyruoja nuo 0,2 iki 2 μm ir pasižymi mažu polidispersiškumu [46].

Hidrofilinės PU dalelės susintetintos atvirkštinės emulsinės polimerizacijos būdu [47], naudojant dvi tarpusavyje nesimaišančias fazes – cikloheksaną arba Isopar M (izoalkanų mišinį) ir DMSO. DMSO buvo ištirpintas diolis (etilenglikolis) ir poliolis (polietilenglikolis), o cikloheksane arba Isopar M – sterinis stabilizatorius. Sumaišius abu tirpiklius, susiformavo emulsija, į kurią buvo įdėtas katalizatorius, ir lėtai sulašintas diizocianatas (TDI arba MDI), ištirpintas cikloheksane arba Isopar M [47].

VU Chemijos fakultete, Polimerų chemijos katedroje susintetintos PU dalelės iš MDI ir BD ar polieterglikolio [48], taip pat iš PVA ir HDI [39] organiniuose tirpaluose, kai į reakcijos mišinį nebuvo dedama sterinio stabilizatoriaus [48, 39].

PU ir PUK daleles galima gauti ne tik naudojant organinius tirpiklius, bet ir reakcijas vykdamas vandeninėje terpėje vienstadijinės [49] arba dvistadijinės [50, 51] emulsinės polimerizacijos būdu. Vienstadijinėje emulsinėje polimerizacijoje nenaudojami brangūs organiniai tirpikliai, ji greitai atliekama, dalelės dažniausiai gaunamos sferos pavidalo, o, išgarinus organinį tirpiklį, lieka tik vandeninė PU ar PUK emulsija. Norint taikyti šią metodiką PU dalelėms gauti, reikalinga, kad naudojamos medžiagos atitiktų šiuos reikalavimus [49]:

- Reaguojantys reagentai (diizocianatai, polioliai) turi būti mažai tirpūs vandenyje;
- Reakcija tarp diizocianato ir poliolio turi būti lėtesnė, negu laikas, reikalingas susidaryti emulsijai;
- Pašalinė reakcija tarp diizocianato ir vandens dispergavimo metu turi būti lėtesnė, negu reakcija tarp diizocianato ir poliolio.

Vienstadijinėje emulsinėje polimerizacijoje dažniausiai naudojamas IPDI – ciklinis diizocianatas, kuris, palyginus su HDI ar TDI, lėtai reaguoja su vandeniu, susidarant emulsijai [49]. Šio metodo trūkumas – ribotas pradinių medžiagų pasirinkimas ir iki galo neišvengiama tarpfazinė reakcija tarp izocianatogrupsės ir vandens.

Vandeninė dvistadijinė polimerizacija neturi tokių griežtų reikalavimų, kaip vienstaginė, ir gali būti naudojami visi norimi pradiniai reagentai, be to, nereikia sterinių stabilizatorių [50, 51]. Šiuo atveju pirmiausia masėje arba organiniame tirpale susintetinamas norimo polimerizacijos laipsnio PU prepolimeras. Antra stadija gali būti vykdoma dviem būdais:

1. Masėje susintetintas PU prepolimeras disperguojamas vandenyje, o, kai PU prepolimero sintezė vykdoma tirpale, po dispergavimo organinis tirpiklis išgarinamas [50].
2. Susintetintas PU prepolimeras yra disperguojamas vandenyje, kuriame yra įdėtas diolis arba diaminas grandinėms prailginti. Įvykus galutinei reakcijai, gaunama vandeninė emulsija. Jei pirmoje stadijoje PU prepolimeras paruoštas organiniame tirpale – organinis tirpiklis nudistiliuojamas [51].

PU ar PUK dalelės, gautos vienstaginės ir dvistadijinės vandeninės emulsinės polimerizacijos būdu, yra naudojamos plėvelių, dangų, dažų gamyboje, taip išvengiant organinių tirpiklių ir taupant gamtą bei žmogaus sveikatą.

Anijoninės vandeninės PUK dispersijos yra gaunamos naudojantis aprašytu dvistadijinės polimerizacijos būdu [52-59]. Dažniausiai PUK dalelės yra sintetamos iš IPDI ir diolių mišinio. Diolio mišinį sudaro įprastinis

poliolis ir anijoninis poliolis, iš kurių plačiausiai yra naudojamas dimetilolpropano rūgštis (DMPA). Pirmiausia iš diizocianato ir diolių mišinio susintetinamas prepolimeras. Šioje stadijoje PU prepolimero anijoninės grupės dažnai neutralizuojamos trietilaminu (TEA), bet kartais jis yra dedamas ir antroje stadijoje. Po to PU prepolimeras yra disperguojamas vandenyje, į kurį grandinėms prailginti pridėta diamino, hidrazino, etilendiamino ar propilendiamino ir susidaro PUK. Jeigu pirmoje stadijoje buvo naudojami organiniai tirpikliai, jie yra išgarinami. Pastebėta, kad, keičiant grandinėms prailginti naudojamus aminus, keičiasi susintetintų PUK stiklėjimo temperatūros [56]. Be to, galutinei PUK dispersijai įtaką daro neutralizuojančių medžiagų cheminė prigimtis [57]. PUK dalelių dydis, vandenilinių ryšių kiekis, dispersijos klampa, gautų produktų adhezija ir atsparumas tempimui mažėja, kai neutralizacijai naudojamas trietilaminas, natrio hidroksidas ar vario acetatas. Neutralizuojant vario junginiais, gauti PUK pasižymėjo antibakterinėmis savybėmis [56, 57].

PUK taip pat yra gaunami fotopolimerizacijos būdu, kai, be įprastinių reagentų, tokių kaip IPDI, polietilenglikolis (PEG), DMPA, yra naudojami bisfenolis A ir 2-hidroksietilmetakrilatas (HEMA) [60, 61]. Anijoninėms PU sferoms gauti pirmiausia etilacetato tirpale buvo susintetintas PU prepolimeras, kurio grandinių užbaigimui panaudotas HEMA. Gautas PU-HEMA prepolimeras buvo disperguojamas vandenyje ir, veikiant UV šviesa, inicijuojamas tolesnis grandinių augimas ar susiuvimas.

PUK sferas ar daleles taip pat galima formuoti, panaudojant membraną. H. Yuyama su kolegomis [62] gavo vienodas PUK sferas, pasinaudodami Shirasu stikline membrana. Pirmiausiai autoriai iš TDI ir difunkcinio-trifunkcinio poliolio mišinio, kurio pagrindinę dalį sudarė propilenglikolis, norbornanmetildiizocianato ir poliheksilkarbonato arba poliesterio (sudarytas iš 1,6-heksandiolio ir adipo rūgšties)) susintetinto PU prepolimerą organiniame tirpiklyje. Taip gautas PU prepolimeras buvo praleidžiamas per Shirasu stiklinę membraną į vandeninę terpę, kurioje pridėta sterinio stabilizatoriaus ir

diamino. Gautų PUK sferų skersmuo priklausė nuo Shirasu stiklinės membranos rūšies ir buvo nuo 5 iki 20 μm.

PU ir PUK dalelių sintezei naudojami ir šakotieji polioliai. Q. Hu su kolegomis PUK prepolimerą susintetino iš TDI, DMPA ir polikarbonatdiolio [63]. PU prepolimero anijoninės grupės buvo neutralizuotos TEA. Po to paruoštas 20 % tirpalas organiniame tirpiklyje įpiltas į trimetilolpropantris[poli(propilenglikol)-amino] organinį tirpalą. Įvykus galutinei reakcijai, šakotas PUK tirpalas buvo disperguotas vandenyje. Darbe [64] pirmiausia polikondensacijos būdu iš poli(tetrametileter)glikolio ir DMPA susintetintas šakotasis poliesteris su galinėmis hidroksigrupėmis, kuris buvo sumaišytas su IPDI. Taip pat atskirai paruošiamas PU prepolimeras iš IPDI ir DMPA. Po to šios dvi medžiagos sumaišomos ir, įvykus reakcijai, įdedama medžiagų grandinėms prailginti ir TEA karboksigrupėms neutralizuoti. Galutiniame etape PUK disperguojamas vandenyje ir gaunama vandeninė dispersija.

Emulsinės polimerizacijos būdu B. G. Zanetti-Ramos su kolegomis susintetino PUK daleles iš IPDI, gamtinio triolio – ricinos aliejaus ir PEG, o organine faze pasirinko alyvuogių aliejų [65]. Emulsinė polimerizacija buvo panaudota modifikuoto ir ciklodekstrino susiuvimui su IPDI, o gautos dalelės tiko organinių junginių adsorbicijai [66].

Taip pat sintetinamos PU dalelės, į kurių sudėtį įeina ne vien tik anglis, deguonis, azotas ir vandenilis, bet ir heteroatomai [67-69]. K. Lewandowski su kolegomis [67] susintetino PUK dispersiją iš diizocianato (IPDI, HMDI, MDI, HDI arba TDI) ir diolio (gauto vykdant reakciją tarp dimetilsulfoizoftalato druskos ir polikaprolaktono arba dietiletilenglikolio), o grandinėms prailginti panaudojo 3-aminopropiltrioksilaną arba 3-aminopropilmetildietoksilaną, per kuriuos džiūvimo metu medžiaga susisluva tarpmolekuliniiais ryšiais.

PUK anijoninės dalelės, savo sandaroje turinčios halogenų, pavyzdžiui, fluoro, buvo susintetintos emulsinės polimerizacijos būdu. Tokie fluora turintys PUK pasižymi maža trintimi, švara, hidrofobiškumu. Jie gali būti naudojami implantų gamyboje, apsauginėms dangoms, kompozitams gauti [68, 69]. S. Turri su kolegomis PUK sintezei panaudojo IPDI ir

perfluorpolieterdiolį, DMPA ir etilendiaminą [68]. Z. Wang šią kompoziciją praturtino PCL ir dietilentriaminu [69].

Apibendrinant, būtų galima teigti, kad PU ir PUK dalelių sintezei naudojami trys skirtingi metodai: vandeninė vienstadijinė ir dvistadijinė polimerizacijos, emulsinė polimerizacija organiniuose tirpikliuose. Deja, nerasta duomenų apie PU ar PUK dalelių sintezę, kurioje kaip poliolis būtų naudojamas PVA ir diizocianatai – TDI, HDI, IPDI bei HMDI.

1.4 Akytų PU ir PUK sintezė ir tyrimas

Aplinkoje yra įvairių akytų medžiagų, pradedant nuo natūralių (kaulai, oda, mediena) iki sintetinių (įvairios plėvelės, membranos, dalelės). Akytų organinių medžiagų konstrukcijos yra sudarytos iš elementų: anglies, azoto, deguonies, vandenilio, boro, fluoro. Lyginant su neorganinėmis akytomis medžiagomis, organinės yra lengvesnės. Akytos organinės medžiagos naudojamos medžiagų atskyrimui, kapsuliavimui, imobilizavimui, kaip dujų talpyklos ir saugyklos, katalizatoriai, katalizatorių nešikliai, jutikliai, pirminės medžiagos anglies nanostruktūrų dariniams, ląstelių laikini pagrindai, filtracijos ir atskyrimo membranos, kolonėlių užpildai chromatografijoje, protonų mainų membranos, elektrodų medžiagos, energijos saugyklos, medžiagos, pasižyminčios maža dielektrine konstanta ir kt. [70-72].

1.4.1 Akytų organinių medžiagų sintezei naudojami metodai

Akytų organinių medžiagų sintezei dažniausiai naudojama:

- Tiesioginio modelio metodas;
- Blokinių kopolimerų savitvarkos metodas;
- Tiesioginės sintezės metodas;

- Didelio tūrio vidinės (disperguotos) fazės emulsinės polimerizacijos metodas (HIPE) (*high internal phase emulsion*);
- Tarpfazinės polimerizacijos metodas;

Tiesioginio modelio metodas paremtas tuo, kad į monomerą arba jo tirpalą yra įdedamos kietos medžiagos (modeliai, šablonai) arba kietų modelių akutės yra pripildomos monomerais ir vykdoma polimerizacija. Po to modeliai yra pašalinami ir lieka tuščios ertmės – akutės [73, 74].

Blokinių kopolimerų savitvarka vyksta lėtai išgarinant jų tirpalus. Išgarinimo metu ilgos kopolimero grandinės susigrupuoja, sudarydamos akutes. Prie šio metodo taip pat priskiriama kopolimerų destrukcija, kai yra destruktuojama viena sudėtinė kopolimero dalis ir vietoje jos lieka tuščios ertmės – akutės [75-77]. Šiuo atveju naudojami kopolimerai, kurių viena dalis gali būti destruktuojama paveikiant UV šviesa, šarminiu ar rūgštiniu tirpalu, pakėlus temperatūrą.

Tiesioginės sintezės metodu akytos medžiagos gaunamos, kai reaguojantys mažamolekuliai komponentai sintezės metu erdviškai išsidėsto, sudarydami mikroakutes. Šis metodas paremtas įvairiomis organinės chemijos reakcijomis: Suzuki jungimusi [78]; Yamamoto jungimusi; [79], „click“ chemija [80]; *Friedel-Craft*’o alkilinimu [81]; Sonogashira-Hagihara jungimusi [82]; Gilch jungimosi [83]; mažamolekulių junginių ciklotrimerizacijos [84, 85]; *Schiff*’o bazių susidarymu [86] ir kt. Taip pat šiai kategorijai priskiriama radikalinė polimerizacija [87, 88] ir polikondensacija [89, 90].

HIPE metodas remiasi atvirkštinės emulsinės polimerizacijos principu [91-94]. Jis nuo klasikinės emulsinės polimerizacijos skiriasi tuo, kad vanduo (disperguota fazė) sudaro apie 74 % visos emulsijos. Vanduo yra lašelių pavidalo, o tarp lašelių yra pasiskirsčiusi organinė fazė, kurioje yra ištirpę reagentai. Pasibaigus reakcijai ir pašalinus vandenį, lieka tuščios akutės.

Tarpfazinės polimerizacijos metodu sintetamos akytos dalelės ar sferos. Reagentai yra pasiskirstę tarp dviejų nesimaišančių fazių ir šių fazių sąlyčio

riboje vyksta reakcijos. Akutėms formuoti yra naudojami tirpikliai [95, 96], linijiniai polimerai [97, 98], vanduo [99, 100], kietos medžiagos [101, 102].

Be šių išvardintų metodų, yra naudojama daugiastadijinė heterogeninė polimerizacija (*multistage heterogenous polymerization*) [103], emulsifikavimo metodas panaudojant membraną (jos pagalba kontroliuojami lašelių dydžiai) [104, 105], mikroskysčių metodas [106]. Kiti metodai dažniausiai yra jau patobulinti pagrindiniai metodai, kurie pritaikomi konkrečiam atvejui [107-111].

1.4.2 Medžiagų akytumo įvertinimo būdai

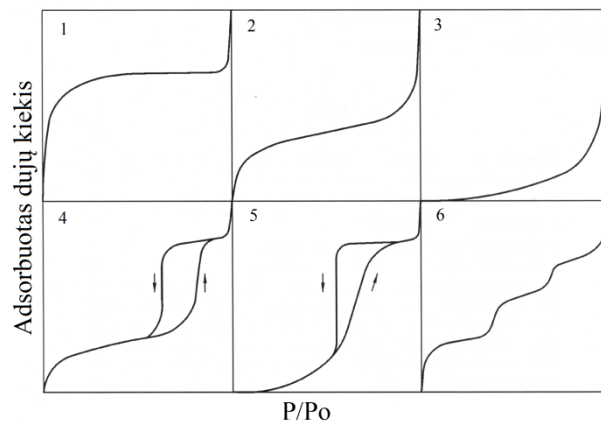
Medžiagų dalelių dydis ir jų pasiskirstymas gali būti nustatomas tiesioginiais metodais: lazerio šviesos difrakcijos metodu, optiniu ar skenuojančiu elektroniniu mikroskopu [112-116] arba netiesioginiais metodais – dujų sorbcija, gyvsidabrio (Hg) įsiskverbimu [117, 98, 118]. Optiniu mikroskopu yra įvertinamos palyginus didelės akutės. Jeigu akučių dydis yra santykinai mažesnis nei tas, kurį galima nustatyti optiniu mikroskopu, tada jis yra nustatomas skenuojančiu elektroniniu mikroskopu. Pagal IUPAC nomenklatūrą akutės pagal dydį yra skirstomos [117]:

- Mikroakutės – skersmuo yra mažesnis kaip 2 nm;
- Mezoakutės – skersmuo yra 2 – 50 nm;
- Makroakutės – skersmuo yra didesnis kaip 50 nm.

Atliekant mokslinius tyrimus, dažnai akučių dydis, jų pasiskirstymas ir tūris yra įvertinami dujų (azoto, argono, anglies dioksido) sorbcijos arba Hg įsiskverbimo metodais. Azoto sorbcijos metodu nustatomos mikroakutės, mezoakutės ir makroakutės, tuo tarpu Hg įsiskverbimo metodu galima nustatyti tik mezoakutes ir makroakutes [98]. Akutės yra skirstomos į uždaras ir atviras. Naudojant azoto sorbcijos metodą, nustatomos atviros akutės, o Hg įsiskverbimo atveju – atviros ir uždaros akutės, nes, naudojant Hg dėl tyrimo metu naudojamo slėgio uždaros akutės atsiveria. Naudojant azoto sorbciją,

mėginys nėra užteršiamas kenksmingu Hg ir mėginį galima naudoti tolesniuose darbuose ar tyrimuose.

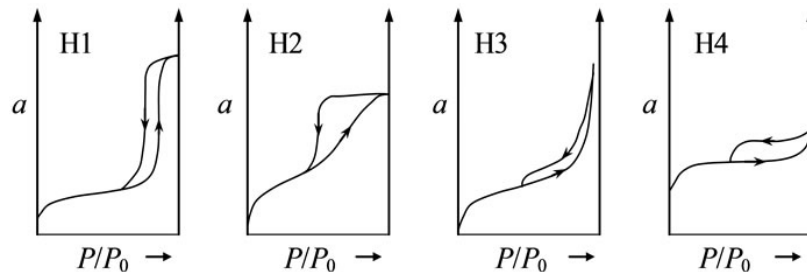
Atliekant azoto sorbciją ant medžiagos paviršiaus, yra gaunamos sorbcijos izotermos, kurios pagal IUPAC suskirstytos į šešis modelius (2 pav.) [118]. 1, 2, 4 ir 6 modeliuose yra stipri sąveika tarp medžiagos paviršiaus ir adsorbuotų dujų, o 3 ir 5 modeliuose sąveika yra silpna. I modelio kreivė nusako, kad medžiaga yra mikroaktyta ir turi santykinai mažą paviršiaus plotą (pvz., aktyvuota anglis, kurios paviršiaus plotą pagrindė sudaro mikroakučių plotas), be to, egzistuoja stipri sąveika. 2 modelio kreivė nusako, kad medžiaga yra neaktyta arba joje yra makroakutės, egzistuoja stipri sąveika. 3 modelio



2 pav. Azoto sorbcijos izotermos.

Kreivė aprašo neaktytą arba makroaktytą medžiagą, esant silpnai sąveikai su dujomis. 4 modelio kreivė būdinga daugumai medžiagų, kurios turi mezoakučių ir vyksta dujų kondensacija kapiliaruose, pasižymi stipria sąveika. 5 modelio kreivė nusako, kad medžiaga yra aktyta, pasižymi silpna sąveika. 6 tipo kreivė aprašo daugiasluoksne dujų adsorbiciją ant neaktytos medžiagos, esant stipriai sąveikai. Izotermų histerezės kilpos pagal IUPAC nomenklatūrą yra suskirstytos į keturis modelius (3 pav.), kurie aprašo akučių dydžio pasiskirstymą medžiagoje [117]. H1 histerezės kilpa būdinga aktytoms medžiagoms, kurios turi vienodos formos akutes (dažniausiai yra cilindrinės formos), o jų dydžių pasiskirstymas yra siauras. H2 histerezės kilpa būdinga

akytoms medžiagoms, kurių akučių forma ir dydžių pasiskirstymas yra sunkiai nuspėjami. Taip pat tokias histerezės kilpas turi medžiagos, kurių akutės yra butelio formos. H3 histerezės kilpa nusako, kad tiriamos dalelės yra lėkštelės



3 pav. Histerezės kilpų modeliai [117].

pavidalo, akutės yra plyšinės, o jų dydžių pasiskirstymas yra platus. H4 histerezės kilpa būdinga medžiagoms, kaip ir H3 atveju, tik čia plyšinės akutės turi siaurą akučių dydžių pasiskirstymo intervalą. Taigi, analizuojant medžiagas dujų sorbcija, iš gautų kreivių galima nustatyti paviršiaus plotą, akučių dydžius ir pasiskirstymą, kokia sąveika yra tarp tiriamosios medžiagos ir adsorbuotų dujų.

1.4.3 Akytų PU ir PUK sintezė

Apie akytų PU ir PUK gavimą bei jų struktūrą yra mažai duomenų. Pirmieji akytas PU daleles susintetino X. Wang ir E. Ruckenstein [41]. Mokslininkai akutėms formuoti panaudojo mineralinę alyvą, kurioje buvo mažas kiekis vandens ir kalcio karbonato, ir ją sumaišė su PU prepolimeru prieš vykdydami tolimesnę reakciją. Reakcijai pasibaigus, gautos PU dalelės buvo plaunamos druskos rūgšties tirpalu. PU dalelėse buvęs kalcio karbonatas, sąveikaudamas su druskos rūgšties tirpalu, išskiria anglies dioksidą, o susidaręs kalcio chloridas išsiplauna ir susiformuoja pirmosios akutės. Vėliau benzenu iš PU dalelių buvo išekstrahuota mineralinė alyva, taip padidinant akytumą [41]. Akytos PU dalelės taip pat sintetintamos suspensinės polimerizacijos būdu, panaudojant MDI ir polietilenglikolį ($M_w = 400$ Da), o grandinėms prailginti –

BD [50]. Pastebėta, kad akučių dydžiai priklauso nuo grandinėms prailginti naudojamo BD kiekio pradiniam mišinyje. Padidinus jo kiekį iki 50 %, akučių skaičius ir jų dydis sumažėjo, o pasiekus 60 % – PU dalelės tapo neakytos. Įvairioms akytoms dalelėms gauti buvo panaudota HIPE polimerizacijos metodas [50, 119]. Tokiu būdu buvo susintetintos PUK dalelės iš bioskalaus PCL, triolio ir HDI. Organinėje fazėje tirpus poliglicerolis-*b*-poliricinoleatas panaudotas kaip emulsiklis. Autoriai teigia, kad pagrindinė reakcija vyko tarp poliolio ir diizocianato, tačiau nebuvo išvengta reakcijos tarp diizocianato ir vandens, todėl susiformavo ne vien tik uretano, bet ir karbamido ryšiai [63].

Daugiau informacijos apie akytas PU ar PUK daleles nerasta, bet yra susintetintos akytos plėvelės, membranos, putplasčiai [120-136]. Įprastiniai PU ir PUK pasižymi biosuderinamumu, tačiau jie nėra bioskalūs. Aišku, kad biosuderinamumas yra privalumas, tačiau yra sričių, kai reikalingas ne tik biosuderinamumas, bet ir bioskalumas. Biosuderinami ir bioskalūs PU ar PUK gaunami į jų sudėtį įvedus bioskalių esterinių darinių – kaprolaktoną ir jo polimerinius darinius, laktidą ir poliesterpoliolius. Akyti biosuderinami ir bioskalūs PU ar PUK rado nišą medicinoje kaip natūralaus audinio pakaitas ar laikina atrama, reikalinga iki tam tikro momento, kol atsistato prarasti ar pažeisti natūralūs audiniai, arba įvykus lūžiams [120-130]. Norint gauti akytus bioskalius ir biosuderinamus PU ar PUK, taikomas išputinimo metodas. Išputinti medžiagas galima panaudojant anglies dioksidą, kuris susidaro reakcijos metu, reaguojant perteklinėms izocianatogrupėms su vandeniu arba su rūgštimi, gaunant PUK arba poliuretanamidą [120, 121]. Akyti PU ar PUK taip pat gaunami naudojant neorganines druskas: natrio chloridą, natrio fosfato heksahidratą, natrio hidrokarbonatą, amonio chloridą [122-128]. Šiuo atveju pirmiausiai susintetinami PU ar PUK prepolimerai organinėje fazėje arba masėje. Tada į juos įmaišoma druska ir yra išliejama plėvelė, membrana ar norimos konfigūracijos gaminys, ir leidžiama susidaryti gaminiui. Po to jis yra plaunamas kelis kartus organiniais tirpikliais, kad būtų pašalinti nesureagavę pradiniai reagentai, paskui plaunama vandeniu, šarmu ar rūgštimi, kad iš gaminio būtų išplautos druskos, taip susidarant akutėms. Suformuotų akučių

dydžiai ir jų pasiskirstymas priklauso nuo naudotų druskų dalelių dydžių ir jų pasiskirstymo. Akytas PU taip pat buvo gautas naudojant hidroksiapatitą, kuris buvo sumaišytas su TDI, BD ir ricinos aliejumi, o reakcija vykdyta 120 °C temperatūroje [129]. J. Guan su kolegomis susintetino akytą PUK iš PCL, 1,4-butandiizocianato ir 1,4-diaminobutano, o akutės buvo gautos taikant šaldymo metodą [130]. Tuo tikslu PUK ištirpinamas organiniame tirpiklyje ir tirpalas užšaldomas nuo -20 iki -80 °C temperatūroje arba iškart dedamas į skystą azotą ir laikomas 3 valandas. Tada užšaldytas mėginys patalpinamas į -20 °C temperatūros etanolį ir iš PUK matricos išekstrahuojamas organinis tirpiklis, taip sudarant akutes [130]. Akučių sudarymas šaldymo metodu yra brangesnis, nei akučių sudarymas druskų pagalba, nes reikia brangios aparatūros, organinių tirpiklių ir ilgiau atliekamas formavimas. Mokslininkas S. Das su bendradarbiais susintetino akytą hidrofobinę PUK membraną iš TDI ir polibutadieno su galinėmis hidroksigrupėmis, grandinėms prailginti naudojo oksidianiliną, o akutėms formuoti – ličio chloridą [132]. Gauta membrana buvo panaudota fenoliui atskirti nuo chlorfenolio iš vandeninės terpės. Norint išsaugoti kūno šilumą, tekstilės pramonei buvo susintetinta PEG/PU akyta membrana, akutėms sudaryti panaudojant amonio karbonatą [133]. Akyti PU kompozitai taip pat sintetunami naudojant atsinaujinančius šaltinius: rapsų aliejaus poliolių, linų bei kanapių plaušus, kurių akutėms formuoti naudoti ciklopentanas ir vanduo [134, 135]. A. M. Atta su bendraautorais [136] akytą PU putplastį, skirtą naftai sorbuoti, susintetino iš polietilentereftalato (PET) atliekų. Šiuo atveju poliolis gaminamas iš PET, jo grįžtamajam perdirbimui alkoholinės būdu naudojant trimetilolpropaną arba pentaeritritolį. PU sintezei buvo panaudotas gautas poliolis ir TDI perteklius. Tam, kad sureaguotų likusios laisvos izocianatogrūpės buvo pridėta vandens, o išsiskyres anglies dioksidas išputino gaminį. Akyta PU plėvelė, skirta dažų absorbcijai, susintetinta iš TDI, polieterpoliolio ir rūgštimi aktyvuoto magnio aliuminio silikatinio mineralo (*attapulgate*), akutėms gauti naudojant natrio hidrokarbonatą [137]. Akytos PU medžiagos yra pirminis šaltinis gaminti akytas anglies plėvelės, kurios gali būti naudojamos kaip adsorbentas arba

katalizatorių nešiklis [138]. Šiuo tikslu per 2 stadijas buvo susintetintas PU–poliamidas. PU prepolimeras buvo gautas iš HDI, polietilenadipato ir fenolio, o poliamidas gautas iš 4,4'-oksidianilino ir piromelito rūgšties dianhidrido. Tada gauti mišiniai sumaišyti tarpusavyje ir suformuota plėvelė. Šią plėvelę kaitinant 300 °C temperatūroje inertinėje atmosferoje skyla uretano ryšiai ir lieka vien tik akyta poliamido plėvelė. Tolesnė pirolizė atliekama, esant 900 °C temperatūrai, gaunant akytą anglies plėvelę [138].

Apibendrinant, būtų galima teigti, kad akytoms PU ir PUK dalelėms bei įvairioms medžiagoms sintetinti dažniausiai naudojamas tiesioginės sintezės metodas. Deja, rasti tik keli straipsniai apie akytų PU mikrodalelių sintezę iš diolių ar poliolių ir diizocianato, tačiau PVA jų sintezei nenaudojamas.

1.5 Fermentų imobilizavimas ant nešiklių

1.5.1 Imobilizavimo būdai, privalumai ir trūkumai

Fermentai – tai stambiamolekuliai baltymai, sudaryti iš amino rūgščių liekanų ir vadinami biologiniais katalizatoriais. Fermentai pasižymi aktyvumu, selektyvumu, specifiskumu, veikia esant mažoms koncentracijoms, katalizuoja tiesiogines ir grįžtamasias reakcijas, yra nenuodingi, tirpūs vandeninėje terpėje. Tačiau jie yra jautrūs pH ir temperatūros svyravimams, joninei jėgai, druskoms, mažoms inhibitorių, pesticidų ir sunkiųjų metalų koncentracijoms [139-143]. Be šių išvardintų neigiamų savybių, fermentai yra brangūs, nes jų išskyrimas ir išgryninimas yra brangiai kainuojantis procesas, o panaudojimas yra vienkartinis. Fermentus imobilizuojant galima pašalinti nepageidaujamas savybes ir sumažinti savikainą. Fermentų imobilizavimas turėtų atitikti kelis tikslus:

- Padidinti fermentų aktyvumą aukštesnėse temperatūrose arba terpėse, kurių pH intervalas platesnis;
- Padidinti aktyvumą organiniuose tirpikliuose;

- Padidinti stabilumą aukštesnėse temperatūrose, pH terpėse, kurių intervalas yra platesnis nei tirpaus fermento;
- Pailginti saugojimo stabilumą;
- Imobilizuotų fermentų enantioselektyvumas būtų kuo labiau panašus į tirpaus fermento;
- Galima regeneruoti fermentus, juos filtruojant ar centrifuguojant;
- Fermentų pakartotinis naudojimas.

Fermentų imobilizavimo metodai ir optimalių sąlygų parinkimas turi labai didelės įtakos imobilizuoto preparato (IP) savybėms [144]. Fermentų imobilizavimą ant nešiklio galima vykdyti keliais būdais:

- Cheminis prijungimas:
 - ✓ Prijungimas tiesiogiai arba per „jungtuką“ prie nešiklio;
 - ✓ Susiuvimas.
- Fizikinis prijungimas:
 - ✓ Adsorbcija ant nešiklio (hidrofobinės ir *Van Der Waals*‘o sąveikos, vandeniliniai ryšiai);
 - ✓ Joniniai ryšiai;
- Įterpimo būdai:
 - ✓ Įterpimas į polimerinę tinklinę struktūrą (*incorporation into polymeric networks*);
 - ✓ Sudėtinė membraninio įrenginio dalis (*incorporation into membrane device*);
 - ✓ Įterpimas į membraną (*inclusion into membrane device*).

Visi fermentų imobilizavimo būdai gali būti taikomi tiek naudojant organinius, tiek ir neorganinius nešiklius.

Cheminis fermento prijungimas prie nešiklio yra plačiausiai taikomas metodas. Fermentai imobilizuojami susidarant kovalentiniams ryšiams tarp nešiklio ir fermento funkcinių grupių. Imobilizavimas vyksta per laisvas aminogrupes, kurias turi kai kurios amino rūgščių liekanos (pvz., lizinas,

argininas). Jos labai lengvai sudaro patvarius ryšius, reaguojant su epoksi- ar aldehidogrupėmis, esant švelnioms sąlygoms [141, 145, 146].

Kitas kovalentinio imobilizavimo būdas yra fermento kristalų ar fermento agregatų susiuvimas tarpusavyje, naudojant di(tri)funkcinius junginius [147-150]. Naudojant fermento kristalų susiuvimą, reikia, kad fermentas būtų labai grynas, tuo tarpu, naudojant fermento agregatų susiuvimą, užtenka fermentą išsodinti organinių tirpiklių ar druskų pagalba. Deja, fermento tarpusavyje susiuvimas nėra pats geriausias imobilizavimo būdas, nes gaunamas mažas fermento aktyvumas, mažas mechaninis patvarumas, o susiūti fermentai dažnai būna gelio pavidalo [147-149].

Fermentų imobilizavimas ant nešiklių fizikinės adsorbcijos metodu privalumai: greitas imobilizavimas, nešiklius galima panaudoti pakartotinai – vieną fermentą atkabinti, o kitą prikabinti [142]. Kaip nešikliai dažniausiai naudojami biopolimerai (celiuliozė, chitozanas ir kt.) [139] ir baltymai – želatina ir albuminas [142]. Fermentų fizikinis imobilizavimas ant nešiklių vyksta dėl hidrofobinės ir *Van Der Waals*'o sąveikų, vandenilinių ir joninių ryšių. Pati silpniausia adsorbcija ant nešiklio yra, kai fermentas sorbuojasi veikiamas hidrofobinės ir *Van der Waals*'o sąveikų. Taip prikabintas fermentas lengvai atsikabina fermentinės reakcijos metu, nekeičiant jokių parametų. Stabilesnė adsorbcija vyksta tuomet, kai tarp fermento ir nešiklio susidaro vandeniliniai ryšiai. Tačiau, pakeitus pH, substrato koncentraciją, temperatūrą ar įdėjus nežymų kiekį druskų, taip imobilizuotas fermentas atsikabina nuo nešiklio paviršiaus. Joniniais ryšiais imobilizuoto fermento stabilumas yra geriausias ir šiek tiek nusileidžia kovalentiniu būdu imobilizuoto fermento stabilumui, tačiau, į tirpalą įvedus druskų ir pakeitus joninę jėgą, joniniais ryšiais imobilizuotas fermentas taip pat gali atsikabinti [142, 143].

Fermentai gali būti imobilizuojami, juos įterpiant į matricą [151]. Dažniausiai yra įterpiama į organinį polimerą arba zolio-gelio matricą, nepakenkiant fermento konformacijai. Taip imobilizuotas fermentas yra atskirtas nuo aplinkos, jį mažiau veikia pH ir temperatūros svyravimai, terpėje esantys inhibitoriai, organiniai tirpikliai, druskos. Šio metodo trūkumas yra tas,

kad substratui sunku prieiti prie fermento aktyviojo centro, o produktams iš jo pasišalinti. Dėl to sulėtėja fermentinės reakcijos greitis, be to, „mažas įterpto fermento kiekis ir didelė jo išsiplovimo tikimybė, jei fermentas papildomai nėra imobilizuotas kovalentiškai [142, 143].

Imobilizuojant fermentus ant nešiklių, didelį vaidmenį vaidina pačio nešiklio charakteristikos. Fermento imobilizavimui nešiklis turi atitikti šiuos reikalavimus:

- Turi būti netirpus;
- Pasižymėti cheminiu ir biologiniu stabilumu;
- Turi pasižymėti hidrofiliškumu, dirbant vandeninėse terpėse;
- Būti pralaidus substratui ir produktui;
- Lengvai modifikuojamas ir/ar aktyvuojamas;
- Neturi inhibuoti fermento ir sukelti nespecifinės imobilizuojamo fermento, substrato ar produkto adsorbcijos.

Apibendrinant, būtų galima teigti, kad fermentus ant nešiklių galima imobilizuoti įvairiausiais būdais, bet geriausiai per kovalentinius ar joninius ryšius. Kovalentiškai prikabintas fermentas yra stabilesnis ir tokia sistema naudojama tol, kol fermentas inaktyvuojasi. Tuo tarpu, joniniu ryšiu prikabintą fermentą galima desorbuoti ir ant nešiklio imobilizuoti naują fermentą, tačiau yra fermento išplovimo tikimybė pasikeitus terpės parametrams.

1.5.2 Fermentų imobilizavimas ant PU ir PUK nešiklių

Tarp visos gausos fermentinių nešiklių savo nišą rado PU ir PUK nešikliai. PU ir PUK nešikliai, priklausomai nuo sintezei naudotų pradinių medžiagų, gali turėti geras mechanines savybes, būti biosuderinami, bioskalūs, netirpūs vandeninėse terpėse ir pasižymėti hidrofiliškumu. PU ir PUK nešiklių didžiausia neigiama savybė – kad yra sintetinami organiniuose tirpikliuose, o tokia terpė yra nepalanki fermentams imobilizuoti. Iš kitos pusės, PU ar PUK

negali būti sintetinami tiesiog vandenyje, nes izocianatogrups jautrios vandeniui.

Dažniausiai fermentai yra įterpiami į PU matricą (putplastį arba membraną), kurioje yra nesureagavusių izocianatogrūpių. PU putplastyje (matricoje) buvo imobilizuoti fermentai: aminoacilazė ir fitazė [152], chloroperoksidazė [153], fosfotriesterazė [154], diizopropilfluorfosfatazė [155], β-galaktozidazė [156], karbonato anhidrazė [157, 158], invertazė [159], lipazė [160] ir alkoholio oksidazė [161]. Visi fermentai PU matricoje buvo imobilizuoti pagal šią arba panašią schemą:

1. Fermentas dedamas į buferinį tirpalą;
2. Sterinis stabilizatorius sumaišomas su komerciniu PU prepolimeru, pašildoma, kad tirpalas taptų mažiau klampus;
3. Paruošti tirpalai tarpusavyje sumaišomi, disperguojami, kol gaunama vientisa emulsija;
4. Gauta emulsija pilama į norimos formos ar tūrio indą, o indas pašildomas iki reakcijai reikiamos temperatūros ir laukiama, kol išsiputina.

PU išputinimas vyksta dėl vandens ir izocianatogrūpių tarpusavio reakcijos, kurios metu išsiskiria anglies dioksidas. Gautas putplastis liofilizuojamas arba plaunamas buferiu, vandeniui, kartais organiniais tirpikliais. Straipsniuose [157, 158] teigiama, kad fermentas yra tolygiai pasiskirstęs visame putplasčio tūryje, o imobilizuojamas ne tik įterpimo į matricą, bet ir kovalentiniu būdu. Putplastyje susidariusios akutės yra pakankamai didelės, kad įterptas fermentas galėtų difunduoti, o substratas su produktu laisvai prieiti ir pasišalinti nuo aktyvaus fermento centro. Šis imobilizavimo būdas pasižymi greitumu, nesudėtingumu ir tokiu būdu galima imobilizuoti norimą fermento kiekį. Tačiau, vykstant PU susidarymo reakcijai, išsiskiria šiluma, kuri yra sunkiai kontroliuojama ir dalinai deaktyvuoja fermentus. Norėdami sumažinti šį neigiamą efektą, mokslininkai po mišinių sumaišymo ir prasidėjus reakcijai, indą iškart įdėdavo į ledo vonelę [152, 153]. Pastebėta, kad, jei į reakcijos mišinį nėra dedamas sterinis stabilizatorius, yra prarandamas imobilizavimo efektyvumas [152, 153]. Anksčiau visi fermentai buvo imobilizuoti PU

putplasčiuose, kurių gamybai buvo naudojami tik komerciniai PU prepolimerai, nes juos lengva gauti, žinoma, koks ir kokių savybių putplastis susidarys. E. Keith su kolegomis [154] susintetino PU putplastį ir kartu imobilizavo fosfotriesterazę, naudodami PU prepolimerus Hypol 3000 (prepolimeras pagamintas TDI pagrindu) ar Hypol 5000 (prepolimeras pagamintas MDI pagrindu), imdami du skirtingus stabilizatorius – Pluronic-65 (polietilenoksidai-*b*-polipropilenoksidai) ir Brij-52 (polietilenglikolio heksadecileteris). Tokio imobilizavimo efektyvumas viršijo 50 %, o, laikant kambario temperatūroje tris mėnesius, liko 51 % santykinio aktyvumo (SA). Nustatyta, kad šio tirpalo ir imobilizuoto fermento K_M lygi atitinkamai 0,047 mM ir 0,124 mM. Pagrindiniai faktoriai, kurie apsprendžia fermento parametrus, yra K_M ir maksimalus reakcijos greitis (v_{max}).

K_M – tai substrato koncentracija, kuriai esant fermentinės reakcijos greitis yra lygus pusei maksimalaus greičio. K_M yra išreiškiama %, mM ar mg/ml.

Mokslininkai nustatė, kad fermentas geriau imobilizavosi, kai buvo įterptas į Hypol 3000, nei į Hypol 5000 putplastį, kai buvo naudotas sterinis stabilizatorius Pluronic-65. Taip yra todėl, kad Hypol 3000 yra hidrofiliškesnis, nei Hypol 5000, o tai yra labiau priimtina fermentui. Tokiu pat būdu, naudojant Hypol 3000, buvo imobilizuota diizopropilfluorofosfatazė, kurios imobilizavimo efektyvumas siekė 67 % [155]. Remdamiesi šiais duomenimis, autoriai teigia, kad imobilizuoto fermento SA priklauso nuo pradinio fermento koncentracijos ir yra didžiausias, kai fermento pradinė koncentracija 2,0 mg/g PU. Mažinant ar didinant fermento kiekį, SA mažėja. M. Bekker su kolegomis [152], imobilizuodami skirtingus kiekius aminoacilazės ir fitazės ant PU, kuris buvo sintetintas iš Hypol 3000, didžiausią imobilizavimo efektyvumą pasiekė, kai fermento kiekis pradiname reakcijos mišinyje yra mažiausias. Dedant daugiau, fermento imobilizavimo efektyvumas mažėjo nuo 100 iki 60 %. Atlikus pertraukiamą ciklinį režimą 12 kartų, pastebėta, kad aminoacilazės SA liko nepakitęs. Imobilizuojant β -galaktozidazę PU putplastyje, kuris buvo gautas iš poliizocianato Hyperplast-5003 ir poliolio Hyperplast-7982016, gauta, kad, priklausomai nuo pradinių medžiagų santykių, imobilizavimo išeiga siekė nuo

27,9 iki 43,9 % [156]. Kituose šaltiniuose rašoma, kad fermentas karbonato anhidrazė buvo imobilizuojama PU putplasčiuose, kurie sintetinami iš PU prepolimero Hypol 2060 [157, 158]. Gauta, kad imobilizuotos karbonato anhidrazės K_M (9,6 mM) yra mažesnė nei pradinio fermento K_M (12,2 mM), o tokie duomenys gaunami labai retai [157, 158]. Autoriai, gavę rezultatus, priėmė kritinį sprendimą, kad gauti imobilizavimo rezultatai gali būti netikslūs, nes, vykdant fermento imobilizavimą, neištyrė, kiek fermento imobilizavosi ir kaip jis pasiskirstė visame PU tūryje. Imobilizuotas fermentas buvo stabilus po 45 dienų saugojimo, kai, tuo tarpu, tirpus fermentas denatūravosi.

Fermentai yra imobilizuojami putplasčiuose ne tik sintezės metu, bet ir po jos [160]. PU putplastis buvo gautas iš poliolio, kurio sandaroje esama fosforo, ir MDI. Gautas PU putplastis buvo panardintas į fermento lipazės tirpalą ir imobilizavimas vykdytas fizikinės adsorbcijos metodu. Tiriant fermento imobilizavimo efektyvumą (substratas – palmito rūgštis ir acetilo alkoholio tirpalas, produktas – acetilpalmitatas), buvo naudojami skirtingi organiniai tirpikliai ir pastebėta, kad, naudojant *n*-heksadekaną, imobilizuoto fermento SA siekė net 120 %. Panašūs aktyvumai gauti, naudojant kitus ilgų grandinių alifatinius angliavandenilius (nuo C_8), o blogiausias rezultatas buvo gautas, imobilizavimą vykdant DMSO tirpale. Mokslininkai D. Kayrak [162] ir N. Inoglu [163] gliukozės oksidazę imobilizavo ant PU/polipirolų mišinio ir ant PU plėvelės anglies dioksido atmosferoje. Nustatyta, kad anglies dioksido aplinka yra palanki fermentui imobilizuoti, o imobilizuotas fermentas saugojimo metu pasižymėjo stabilumu. Taip pat autoriai nustatė, kad, didinant sistemos slėgį iki 150 atmosferų, imobilizuoto fermento aktyvumas didėja, o K_M , lyginant su tirpiu fermentu, kito nežymiai.

Fermentai taip pat buvo imobilizuoti ant PU membranų/plėvelių [164-167]. Ant PU membranų buvo imobilizuotos lipazės iš *Candida rugosa* [164] ir *Yarrowia lipolytica* [165]. Lipazė iš *Candida rugosa* [164] buvo imobilizuota ant membranos, kuri sudaryta iš polipropileno (PP) membranos, modifikuotos hidrofiliniu PU. Hidrofilinis PU susintetintas iš TDI, *p*-metoksifenolio ir politetrahidrofurano, o per likusias laisvas izocianatogrupes prijungtas HEMA.

Taip gautas PU buvo maišomas su glicidilmetakrilatu ir susiuvimo agentu – pentaeritritoltetraakrilatu. Gautu hidrofiliniu PU yra padengiama PP membrana. Po to PU-PP membrana veikiama UV spinduliuote, kad susidarytų paviršinės epoksigrupės. Ant gautos PU-PP membranos, dalyvaujant GA, buvo imobilizuota lipazė. Fermento imobilizavimo efektyvumas siekė 90 %, o po 10 pakartotinių naudojimo ciklų liko 58 % SA [164]. Kita lipazė iš *Yarrowia lipolytica* buvo imobilizuota ant PU (pirktas iš vietinės parduotuvės) ir PU-PEI (polietilenimino) putplasčių [165]. PU-PEI putplastis buvo gautas PU putplastį padengiant PEI. Fermento imobilizavimas ant PU putplasčio buvo vykdomas fizikinės adsorbcijos būdu. Autoriai teigia, kad fermento imobilizavimas ant PU-PEI membranos vyko susidarant joniniams ir kovalentiniams ryšiams bei susisuvant joniniais ryšiais. Gauti rezultatai parodė, kad imobilizuotos ant PU putplasčio lipazės SA nepakito po 25 ciklų, tuo tarpu, lipazės, imobilizuotos ant PU-PEI putplasčio, SA po 16 ciklų drastiškai krito. Nustatyta, kad imobilizuotos ant PU lipazės K_M yra 9,73 mM, o ant PU-PEI – 58,9 mM. Vadinasi, fermentui PU nešiklis yra giminingesnis, nei PU-PEI [165]. Darbe [166] mokslininkai diizopropilfluorofosfatažę prijungė prie aukso nanodalelių per aminogrupes ir tada jas nusodino ant PU dangos, kuri susintetinta iš komercinių hidrofilinių poliizocianatų BAYHYDUR XP-7063, XP-7007, XP-7148, kurių pagrindą sudaro HDI, ir poliolio BAYHYDROL XP-7903. Nustatyta, kad fermentas geriausiai imobilizuojasi ant hidrofobiškesnių PU dangų. Stabilumo tyrimai parodė, kad imobilizuotos diizopropilfluorofosfatažės SA po 100 saugojimo dienų sumažėjo iki 40 %, o tomis pačiomis sąlygomis laikytas tirpus fermentas inaktyvavosi [166]. A. Kreider su kolegomis [167] imobilizavo krienų peroksidazę ant modifikuotos PU dangos, kuri gauta iš komercinio poliizocianato, poliolio ir poli(dimetilsiloksano). Taip pagamintą dangą paveikus plazma, susidaro hidroksigrupės. Po to PU dangos paviršius buvo paveiktas glutaraldehydu (GA) ir per aktyvias aldehido grupes imobilizuota krienų peroksidazė. Fermento imobilizavimo efektyvumas buvo didesnis, nei tuo atveju, kai jis buvo imobilizuotas fizikinės adsorbcijos metodu.

Fermentai taip pat buvo imobilizuoti ant PU ar PUK dalelių (sferų) [7, 39, 41, 48, 168]. Mokslininkai X. Wang ir E. Ruckenstein [41] ant aktyvų PU dalelių (sintezė aprašyta 1.3 skyriuje) fizikinės adsorbcijos metodu imobilizavo lipazę iš *Candida rugosa*, o po imobilizacijos papildomai susiuvo GA, taip padidinant fermento stabilumą. S. Phadtare su kolegomis [7, 168] adsorbcijos būdu imobilizavo pepsiną ir endogliukanazę ant PU dalelių (sintezė aprašyta 1.3 skyriuje), kurios buvo padengtos aukso dalelėmis. Imobilizuoti fermentai rodė geresnį stabilumą tam tikruose terpių pH ir temperatūrų intervaluose, nei tirpūs. Tačiau, atliekant pakartotinius ciklus, fermentai nuo paviršiaus desorbavosi.

VU Chemijos fakultete, Polimerų Chemijos katedroje PU putplastyje (sintezė aprašyta 1.5.2 skyriuje) buvo imobilizuota β -galaktozidazė [156]. β -galaktozidazės imobilizavimo efektyvumas, priklausomai nuo PU sintezės sąlygų, kito nuo 6,2 iki 19,6 % [156]. Imobilizuojant maltogeninę α -amilazę (Ma) ant PU nešiklių, gauti geri imobilizavimo efektyvumai [39, 48]. Pirmu atveju gauta, kad didžiausias imobilizavimo efektyvumas siekė 97,5 %, kai PU susintetintas iš MDI ir BD, esant pradiniam moliniam santykiui 1:2 [48]. Antru atveju gauta, kad didžiausias imobilizavimo efektyvumas siekė 153 %, kai PU susintetintas iš PVA ir HDI, esant pradiniam moliniam santykiui 1:5 [39]. Darant pakartotinius ciklus nepastebėta, kad fermentas išsiplautų nuo dalelių ar mažėtų SA. Autoriai teigia, kad fermentas imobilizavosi kovalentiniu būdu, sąveikaujant fermento funkcinėms grupėms su laisvomis izocianatogrupėmis, kurios yra ant PU dalelių.

Apibendrinant, būtų galima teigti, kad dažniausiai fermentai ant PU/PUK medžiagų imobilizuojami įterpimo į putplastį metodu. Tuo tarpu, ant PU dalelių imobilizavimas pagrinde vykdyta fizikinės adsorbcijos būdu ir tik keliose VU Chemijos fakulteto, Polimerų Chemijos katedros publikacijose aprašytos fermentų imobilizavimas kovalentiniu būdu. Neaptikta literatūros šaltinių, kuriuose fermentai būtų imobilizuoti ant PUK mikrodalelių,

susintetintų iš PVA ir TDI ar IPDI ar HMDI, kovalentiškai ar fizikine adsorbcija.

1.6 Amilazių šeimos fermentų imobilizavimas ant įvairių nešiklių

1.6.1 Krakmolą skaldantys fermentai

Kraskmolos – viena iš pagrindinių augalų: kviečių, ryžių, kukurūzų, manijokų, bulvių ir kt. sudedamųjų dalių. Tai yra svarbi ne tik žmonių maisto raciono sudėtinė dalis, bet naudojama ir kosmetikoje bei kitose pramonės šakose. Krakmolos yra homopolisacharidas, sudarytas iš α -D-gliukopiranozinių likučių, sujungtų glikozidiniais ryšiais. Krakmolos α -1,4 ir α -1,6 glikozidiniai ryšiai yra stabilūs silpnai rūgštinėje, neutralioje ir šarminėje terpėje, bet skyla stipriai rūgštinėje terpėje. Krakmolos sudarytas iš amilozės ir amilopektino. Amilozė yra linijinis polimeras, sudarytas iš α -D-gliukopiranozinių molekulių liekanų, sujungtų α -1,4-glikozidiniais ryšiais. Jos molekulinė masė svyruoja nuo 36000 iki 180000 Da. Amilopektinas turi daugybę atsišakojimų kas 20 – 30 α -D-gliukopiranozinių liekanų, sujungtų α -1,4-glikozidiniais ryšiais. Linijinės atkarpos jungiasi tarpusavyje α -1,6-glikozidiniais ryšiais. Visą amilopektino molekulę sudaro iki 2 milijonų gliukopiranozinių liekanų. Panašus į amilopektiną darinys, tik labiau šakotas, yra randamas gyvuosiuose organizmuose, grybuose ir vadinamas glikogenu. Amilopektino ir glikogeno biologinė svarba yra tokia pati – perteklinės energijos saugojimas. Krakmolą iki gliukozės, fruktozės, aukštesniųjų ir šakotųjų cukrų hidrolizuoja α -amilazių šeimos fermentai, kurių sudaro 13 glikozilhidrolazių [169]. Kadangi kraskmolą skaidančių fermentų yra daug, jie suskirstyti į grupes:

- Endoamilazės;
- Egzoamilazės;
- Atšakas atskeliantys (*debranching*) fermentai;
- Transferazės.

Endoamilazių grupės pagrindinis fermentas yra α -amilazė (EC 3.2.1.1), kuri atsitiktiniu būdu skaldo α -1,4 glikozidinius ryšius amilozėje ir amilopektine. Egzoamilazių grupę sudaro fermentai, kurie skaldo α -1,4 ir α -1,6 glikozidinius ryšius. Iš šios grupės būtų galima išskirti β -amilazę (EC 3.2.1.2) ir maltogeninę α -amilazę (EC 3.2.1.133) (Ma). Šie du fermentai makromolekulių skaldymą pradeda nuo neredukuotų galų, o galutinis skaldymo produktas yra maltozė. Skirtumas tarp šių dviejų fermentų yra tas, kad β -amilazė gautos maltozės konfigūraciją iš α verčia į β , o Ma atskelia α konfigūracijos maltozę. Fermentai α -amilazė ir β -amilazė dažnai aptinkami įvairiausiuose mikroorganizmuose [170], o Ma daugiausiai yra gaunama iš bakterijų *Bacillus stearotherophilus* [171]. Trečia grupė – šakotumą skaldantys fermentai: izoamilazė (EC 3.2.1.68) ir pululanazė (EC 3.2.1.41). Šie fermentai skaldo tik α -1,6-glikozidinius ryšius amilopektine, jį paversdami linijiniu polimeru. Ketvirta yra transferazių grupė, kuri susideda iš amilomaltazės (EC 2.4.1.25), ciklodekstrino gliukantransferazės (EC 2.4.1.19) ir atšakas sudarančio (*branching*) fermento (EC 2.4.1.18). Šių fermentų paskirtis – linijinius darinius versti į šakotuosius [169].

Amilazių šeimos atstovai – α -amilazė, β -amilazė ir maltogeninė α -amilazė yra dažniausiai krakmolo hidrolizei naudojami fermentai, gaminant koncentruotus mažamolekulių cukrų sirupus, kurių pagrindinę dalį sudaro maltozė. Tokie sirupai yra naudojami kosmetikos, maisto, gėrimų ir farmacijos pramonėje. Literatūros apžvalgoje bus aptartas šių trijų fermentų gavimas ir imobilizavimas ant įvairių nešiklių.

1.6.2 α -Amilazė ir jos imobilizavimas

α -Amilazė (EC 3.2.1.1) yra endoamilazių grupės fermentas, kuris skaldo atsitiktinius α -1,4 glikozidinius ryšius. Pramonėje α -amilazė yra naudojama suskystinti krakmolą, verčiant jį į gliukozę, maltozę ir maltotriozę, plačiai naudojama alaus gamyboje, maisto, tekstilės, popieriaus, detergentų ir cukraus

pramonėje. Iki 2000 metų α -amilazė buvo išgaunama iš daugybės kultūrinių augalų, pavyzdžiui, iš miežių [172], bakterijų *Alicyclobacillus acidocaldarius atcc 27009* [173], *Streptococcus bovis* štamo 148 [174] ir kt. Nuo 2000 metų α -amilazė yra išskiriama iš: avinžirnių [175], batatų gumbų [176], įvairių mikroorganizmų [173, 174, 177-180], lervų [181, 182] ir moliuskų [183].

α -Amilazėms, išskirtoms iš skirtingų šaltinių, būdingi bendri bruožai:

- Optimalus pH yra nuo 5 iki 7,5, o temperatūra – nuo 20 °C iki 60 °C;
- Molekulinė masė – nuo 31 iki 60 kDa;
- Mažiausias neskaldomas cukrus – maltotriozė;
- Fermento aktyvumui turi įtakos metalų jonai: Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ – aktyvuoja, o Hg^+ , Cd^{2+} , EDTA jonai veikia inhibuojančiai.

α -Amilazei hidrolizuojant maltotetrozę ar maltopentozę, susidaro maltotriozė ir gliukozė ar maltozė. Iš substratų α -amilazė geriausiai toleruoja krakmolą, po to amilozę, amilopektiną, dekstrinus ir oligosacharidus. Pavyzdžiui, α -amilazės $K_M = 0,52$ mM, kai substratas yra krakmolas, ciklodekstrinų atveju K_M svyruoja nuo 2,61 iki 5,12 mM, priklausomai nuo dekstrino konfigūracijos (α , β , γ), o, kai substratas yra maltotriozė, K_M išauga iki 62,9 mM [178]. Kelios iš bakterijų išgautos α -amilazės yra termostabilios [173, 178, 180]. Jų aktyvumo optimalios temperatūros svyruoja nuo 75 °C iki 90 °C, bet, pakėlus temperatūrą 10 °C virš optimalios, fermentas denatūruojasi. Kaip minėta anksčiau, α -amilazių molekulinės masės yra palyginus mažos, bet α -amilazė, gauta iš bakterijų *Alicyclobacillus acidocaldarius atcc 27009* [173], pasižymi itin didele molekuline mase, kuri siekia 160 kDa ir yra stabili rūgštinėje terpėje (optimalus pH = 3,0). Tai – vienintelė literatūroje aprašyta α -amilazė, turinti didelę molekulinę masę, ir aktyvi, esant mažoms pH reikšmėms, nes kitos α -amilazės tokiose sąlygose inhibuojasi.

Iš amilazių šeimos α -amilazės yra labiausiai paplitusios ir naudojamos. Saugojimo metu jos, esant optimalioms pH vertėms ir temperatūroms, yra nestabilios, be to, denatūruojasi. Šią problemą labai puikiai išsprendžia imobilizavimas ant polimerinių nešiklių (3 lentelė) [184-207]. Be to,

imobilizuotus preparatus galima panaudoti daug kartų. α -Amilazėms imobilizuoti buvo panaudoti įvairūs būdai ir nešikliai: įterpimas į

3 lentelė. Imobilizuotos α -amilazės

α -Amilazės gavimo šaltiniai	Literatūros šaltiniai
<i>Aspergillus oryzae</i>	[184-186], [201], [205]
<i>Bacillus subtilis</i>	[187], [188], [198], [199], [206]
<i>Kiaulių kasa</i>	[189-192]
<i>Bacillus licheniformis</i>	[193], [204], [207]
<i>Sojų pupelės</i>	[194], [195]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	[196]
Novozimo firma	[197], [200]
Aladdin firma	[202]
Merck firma	[203]

poliakrilamidinį gelį [184, 185], kovalentinis prijungimas prie magnetito dalelių, kurios buvo padengtos akacijų derva ir aktyvuotos GA [186], chitozano darinių [187], akrilinių nešiklių [188], PVA/poli(akrilo rūgšties) plaušų [189], foto iniciavimo būdu (UV šviesa) susiūtos dangos (fermentas kovalentiniu būdu prijungtas prie N-(4-sulfofenil)-maleinimido ir sumaišytas su PEG-diakrilatu, PEG-monoakrilatu, vinil-2-pirolidonu ir fotoiniciatoriumi Irgacure-184) [190], silanolinių medžiagų [191], kalcio karbonato nanodalelių, aktyvuotos GA [192], reaktingų polimerinių plėvelių, kurios sudarytos iš maleino rūgšties anhidrido kopolimerų [193], chitozano ir amberlito MB 150 dalelių [194], želatinos [195], polivinilamino ir polivinilformamido nešiklių [196], alginato matricos [197]. α -Amilazės taip pat fizikinės adsorbcijos būdu imobilizuotos ant alginato rutuliukų [198], bentonito/chitozano kompozito [199], silicio dalelių [200], magnetinių rutuliukų, kai Fe_3O_4 dalelės apvilktos poliHEMA [201], PVA-silicio dioksido nešiklio [202] ir metalo-keraminių dalelių [142]. Imobilizavimui buvo panaudotas ir retesnis metodas: α -amilazė buvo išsodinta ir susiūta GA [150]. Ji taip pat buvo imobilizuota ant aktyvų

nešiklių: kovalentiškai imobilizuota ant membranos, kuri sudaryta iš HEMA ir glicidilmetakrilato kopolimero [204], silikagelio [205], aliuminio oksido [206], adsorbcijos būdu imobilizuota ant susiūtos celiuliozės matricos [207]. Ant akyto nešiklio imobilizuotos α -amilazės aktyvumas priklauso nuo nešiklio akučių dydžio ir bendro akučių tūrio. Autoriai teigia, kad, esant mažoms akutėms, fermento K_M didėja, kadangi atsiranda trukdžiai substratui patekti prie fermento ir produktui pasišalinti iš jų [204, 206, 207].

Apibendrinant apžvelgtus straipsnius, pastebėta, kad α -amilazė yra imobilizuojama ant įvairiausių nešiklių tiek kovalentiškai, tiek fizikine adsorbcija, tiek įterpimu į matricas. Straipsniuose teigiama, kad, imobilizavus α -amilazę, padidėja jos stabilumas kintant terpės pH ir temperatūrai, lyginant su tirpiaisiais fermentais. Nėra informacijos, kad α -amilazė buvo imobilizuota ant PU ar PUK.

1.6.3 β -Amilazė ir jos imobilizavimas

β -Amilazė yra egzoamilazių grupės fermentas [169]. Mokslininkas Caldwell 1931 metais pirmą kartą β -amilazę išskyrė iš kasos [208]. Buvo nustatyta, kad krakmolo hidrolizę augalų lapuose, stiebuose ar kamienuose pagrinde atlieka β -amilazė, o ne α -amilazė [209]. Iki 2000 metų β -amilazės buvo išskirtos iš: miežių [210], žirnių (*Pisum sativum L.*) [211], bulvių lapų (*Solanum tuberosum*) [212], baltažiedžio vairo (*Arabidopsis thaliana*) lapų [213], iš parazito *Entamoeba invadens* [214]. Dauguma β -amilazės išgavimo šaltinių yra publikuojami dabar sunkiai prieinamuose žurnaluose, kurie išleisti 1940-1980 metais. Nuo 2000 metų β -amilazė išgauta iš: kardelio (*Gladiolus klattianus*) svogūnėlių [215], gyvatvorių vijoklio (*Calystegia sepium*) šakniastiebių [216], daigintų sorų (*Panicum miliaceum L.*) sėklų [217], afrikinių sorų (*Eleusine coracana*) sėklų [218], nendrių (*Saccharum officinarum*) [219], mikroorganizmų *Clostridium thermosulfurogenes* štamo SV2 [220] ir *Salimicrobium halophilum* štamo LY20 [221], taip pat iš bakterijų

Bacillus subtilis, kurios yra parazito *Balanogastriis kolae* straubliuke, o parazitas gyvena ant kolamedžio riešutų [222]. β -Amilazė, gauta iš skirtingų šaltinių, pasižymi šiomis savybėmis:

- Optimalus pH yra apie 5,5;
- Optimali temperatūra yra apie 55 °C;
- Galutinis skaldymo produktas yra β konfigūracijos maltozė.

Išimtis yra β -amilazė, gauta iš mikroorganizmo *Salimicrobium halophilum* štamo LY20 [221]. Šis fermentas yra atsparus šarminei terpei (optimalus pH = 10), druskingumui (optimalus druskingumas – 10 % NaCl), o optimali temperatūra, kurioje aktyvumas didžiausias, yra 70 °C. β -Amilazė yra naudojama maisto, medicinos, alaus pramonėje. Jos pagalba, iš krakmolo ir amilozės gaunami maltozės sirupai, o iš amilopektino – dekstrinai.

β -Amilazė, kaip ir dauguma fermentų, yra neatspari temperatūros ir pH pokyčiams bei laikant ilgesnį laiką. Esant optimaliai terpės temperatūrai, β -amilazės aktyvumas yra didžiausias. Tačiau šioje temperatūroje ji yra jautriausia ir po kurio laiko prasideda inaktyvavimas. Fermentas yra modifikuojamas, norint padidinti jo terminį stabilumą [223, 224], pagerinti stabilumą, esant mažoms [225] ar didelėms terpės pH vertėms [221].

β -Amilazė kovalentiškai buvo imobilizuota ant sefarozės, susiūtos epichlohidrinu [226], poliakrilamido-*b*-poli(akrilo rūgštis) kopolimero, susiūtos karbodiimidu [227], jaučio serumo albumino matricos, susiūtos GA [228], želatinos, susiūtos formaldehidu arba GA [229], įvairių poliakrilamido kopolimerų, aktyvuotų tionilchloridu [230], agarozės rutuliukų turinčių tiolines grupes ir per jas prijungtas fermentas turintys PEG grandines [231], akrilinių nešiklių aktyvuotų GA, divinilsulfonu ar karbodiimidu [232], agarozės, modifikuotos GA, nešiklių [233], akyto silikagelio, aktyvuoto GA [234]. Naudojant fizikinę adsorbciją, β -amilazė imobilizuota ant katijoninio polistireninio jonito [235], anijoninės dervos [236], chitozano rutuliukų [237]. Visais atvejais padidėjo imobilizuotos β -amilazės stabilumas, esant platesniems terpės pH ir temperatūros intervalams, atsirado galimybė

panaudoti imobilizuotus preparatus pakartotiniuose cikluose. Tačiau PU ar PUK β -amilazei imobilizavimui nebuvo naudoti.

Apibendrinant apžvelgtus straipsnius, pastebėta, kad mokslinis susidomėjimas β -amilaze nėra didelis. Galima teigti, kad taip yra todėl, kad fermentas nėra toks aktyvus kaip α -amilazė, o ilgą krakmolo grandinę skaldo tik nuo galo. Tai nesuteikia greito efekto, pvz., klampos sumažėjimo ir t.t.

Tirpios formos β -amilazė yra jautri, todėl ji buvo imobilizuota ant įvairių nešiklių, kurie suteikė stabilumo, tačiau nėra informacijos, kad ji buvo imobilizuota ant PU ar PUK.

1.6.4 Maltogeninė α -amilazė

Maltogeninė α -amilazė (Ma) – 1,4- α -D-gliukano α -maltohidrolazė (EC 3.2.1.133). Fermento hidrolizės pagrindinis produktas yra α konfigūracijos maltozė [238]. Kaip minėta anksčiau, Ma yra fermentas, kuris priskiriamas prie egzoamilazių. Šio fermento grupės EC įvesta 1992 metais ir papildyta 1999 [239]. Iki 1992 metų Ma buvo traktuojama kaip α -amilazė (EC 3.2.1.1). Tačiau, tirdami Ma veikimą, mokslininkai pastebėjo, kad gauti produktai skiriasi nuo standartinių α -amilazės produktų, kitoks veikimo principas, inhibavimas ir aktyvavimas. Prieita prie išvados, kad Ma veikimas pagrįstas egzoamilazių principu, bet tuo pačiu išlieka ir endoamilazių veikimas. Nustatyta, kad Ma skaldo krakmolą nuo neredukuoto galo, bet tuo pačiu gali skaldyti ir atsitiktinai. Be šių faktų, mokslininkai išsiaiškino, kad Ma skaldo oligomaltozes, tokias kaip maltotriozę ir maltotetraozę, kurių neskaldo α -amilazė (EC 3.2.1.1). Be to, Ma pasižymi geresnėmis terminėmis savybėmis, yra stabilesnė terpės pH ir temperatūros pokyčiams, nei α - ir β -amilazės, nes tam turi įtakos Ma struktūroje esantys kalcio jonai.

Apžvelgus literatūrą, rasti tokie Ma gavimo šaltiniai (4 lentelė). Ma yra išskirta iš: *Bacillus licheniformis* ATCC 27811 [240, 241], *Byssoschlamys fulva* CMI 40021 [242], *Thermus* IM 6501 [243], *Streptomyces* sporų [244],

Lactobacillus gasseri ATCC 33323 [245], *Geobacillus thermoleovorans* NP54 [246], *kiaulės kasos* [247], *Alicyclobacillus acidocaldarius* MTCC 8766 [248], vaistinės ožragės sėklų (*Trigonella foenum graecum*) [249], *Clostridium acetobutylicum* [250], *Saccharomonospora viridis* [251], *Micromonospora*

4 lentelė. Ma gavimo šaltiniai ir savybės

Ma šaltinis	M (kDa)	T _{opt} (°C)	pH _{opt}	Krak-	Dekst-	Pulu-	Lite- ratūra
				mol- as	ri- nas	lanas	
				Pagrindinis produktas po angliavandenių hidrolizės			
<i>Bacillus licheniformis</i>	64	50	6,0-8,0	maltozė	maltozė	panozė	[240]
<i>Byssochlamys fulva</i>	63	40	4,0-4,5	maltozė	maltozė	panozė	[241]
<i>Thermus</i>	64	60	6,0	maltozė	maltozė	panozė	[243]
<i>Streptomyces sporos</i>	45	60	6,0-7,0	maltozė	netirta	netirta	[244]
<i>Lactobacillus gasseri</i>	65	55	5,0	maltozė	maltozė	panozė	[245]
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	26	100	8,0	maltozė	maltozė	panozė	[246]
<i>Kiaulių kasa</i>	-	40	6,9	maltozė	netirta	netirta	[247]
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	94,5	60	6,0	maltozė	netirta	netirta	[248]
<i>Trigonella foenum graecum</i>	68	60	5,0	maltozė	netirta	netirta	[249]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	84	45	5,6	maltozė	Neskal- do	panozė	[250]
<i>Saccharomonospora viridis</i>	-	40	6,5	maltozė	netirta	netirta	[251]
<i>Micromonospora melanosporea</i>	45	55	7,0	maltozė	netirta	netirta	[252]

melanosporea [252]. Be išvardintų šaltinių, Ma taip pat yra gaunama iš *Bacillus stearothermophilus* skirtingų štamų, kurie bus aprašyti vėliau skyriuje 1.6.4.1.

Iš 4 lentelės duomenų matyti, kad Ma gali hidrolizuoti krakmolą, dekstrinus ir pululaną, tačiau dauguma autorių tyrė tik krakmolo hidrolizę [247-252]. Nustatyta, kad Ma hidrolizuoja krakmolą ir dekstrinus iki α maltozės, o pululaną iki panozės [240, 242-246]. Pastebėta, kad Ma krakmolą hidrolizuoja nenuosekliai, tai yra, grandinės skaldymas vyksta atsitiktiniu būdu, o pati hidrolizė pasižymi selektyvumu. Tai yra, fermentas pradžioje ilgą krakmolo grandinę hidrolizuoja iki oligomaltozių ir tik po to iki α maltozės [242, 247, 251, 253]. Šis reiškinys sukėlė daug diskusijų ir J. F. Robyt su kolegomis 1970 metais išnagrinėjo bei pasiūlė Ma veikimo mechanizmą [247]. Tyrimo objektu buvo pasirinkta kiaulės kasos Ma ir oligomaltozių (grandinė sudaryta nuo 3 iki 8 gliukopiranozės vienetų) substratai. Kai substratas yra oligomaltozė (gliukopiranozės vienetų ≥ 4), nepriklausomai nuo substrato koncentracijos, galutinis produktas yra maltozė. Kai substratas – maltotriozė, Ma atskelia maltozę ir gliukozę, tačiau, esant didesnėms substrato koncentracijoms, susidaro beveik tik maltozė, o gliukozės lieka tik pėdsakai. Šiam fenomenui paaiškinti mokslininkai iškėlė hipotezę, kad Ma su substratu sudaro bendrą kompleksą, kuriame fermentas turi sudėtinį (daugiataškį) penkianarį aktyvųjį centrą. Šiame komplekse yra du gliukozės vienetai, kuriuos Ma atskelia nuo oligomaltozės. Mokslininkai padarė prielaidą, kad hidrolizė vyksta pagal šiuos mechanizmus: trimolekulinio komplekso susidarymas; tranferazės mechanizmai; kondensacija [247]. Skaldant substratą, lygiagrečiai vyksta ir "šalutinė" reakcija – transglikozilinimas, kuris ypač išryškėja, esant substrato koncentracijai didesnei kaip 100 mM. Nustatyta, kad kai substratas yra maltotriozė, – reakcijos produkte rasta maltotetraozė ir maltopentozė, o kai substratas maltopentozė – maltoheksozė ir ilgesnių grandinių oligomaltozės. Iš viso to seka, kad Ma turi trijų fermentų savybes:

- Gali hidrolizuoti krakmolą kaip α -amilazė;

- Atskelti maltozę nuo neredukuoto galo kaip β -amilazę;
- Sudaryti glikozidinius ryšius kaip ciklodekstrino gliukantransferazę (CGTazę).

Šioms Ma savybėms įrodyti mokslininkai hidrolizavo akarbozę (akarbozė yra daugumos amilazių inhibitorius) iki gliukozės ir pseudotrisacharido, kuris buvo transglikozilintas per α -1,6 glikozidinį ryšį, kai terpėje yra akceptorinių junginių (gliukozės, fruktozės, maltozės ir kt.) [244]. Ne visos Ma skaldo akarbožę. Pavyzdžiui, akarbozė inhibuoja Ma iš *Geobacillus thermoleovorans* [246].

Ma stabilumą ir optimalias fermento aktyvumo sąlygas galima pagerinti, pakeitus aplinkos sąlygas, pavyzdžiui, slėgį [254] arba cheminiu būdu modifikuojant Ma baltyminę struktūrą [253]. Naudodami slėgį mokslininkai pagerino Ma iš *Aspergillus niger* termines savybes, sumažino K_M ir padidino reakcijos greitį [254].

Apibendrinant apžvelgtus straipsnius, galima teigti, kad iki šiol rasta 12 skirtingų Ma šaltinių, neatsižvelgiant į tai, kad Ma gaunama ir iš *Bacillus stearothermophilus*. Nustatyta, kad daugumos Ma katalitinės savybės yra panašios ir jų veikimo principas yra vienodas. Taip pat Ma turi bendrumų net su trimis skirtingais fermentais: α -amilaze, β -amilaze ir CGTaze.

1.6.4.1 Ma iš *Bacillus stearothermophilus* ir jos imobilizavimas

Apžvelgus literatūrą, galima konstatuoti, kad maltogeninė α amilazė iš *Bacillus stearothermophilus* (BsMa) yra daugiausiai ištyrinėta ir aprašyta, buvo surinktos ir kultivuojamos šių bakterijų kolonijos, o iš jų štamų gautos kelios skirtingos ir tuo pačiu panašios Ma (5 lentelė) [255-261]. Kristalinės formos BsMa iš štamo 1503-4 pirmą kartą gauta mokslininkų G. B. Manning ir L. L. Cambell [255], o L. P. Sharon su kolegomis [256] išskyrė nekristalinės formos fermentą. Pastebėta, kad skiriasi to paties fermento molekulinė masė, optimali

temperatūra ir terpės pH. L. P. Sharon su kolegomis konstatavo, kad molekulinį masių skirtumas atsiranda todėl, kad gaunant kristalinės formos fermentą, galėjo pasišalinti kai kurie amino rūgščių segmentai [256].

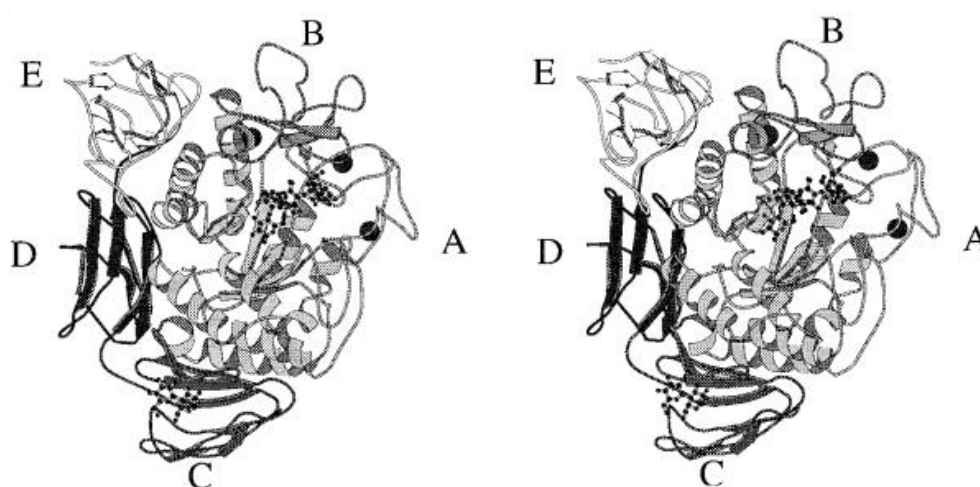
Iš 5 lentelėje pateiktų BsMa plačiausiai ištirtos dvi: iš štamo C599 ir ET1 [257, 259]. BsMa iš štamo ET1 buvo panaudota akarbozei hidrolizuoti ir

5 lentelė. BsMa įvairovė.

<i>Bacillus stearothermophilus</i> štamai	M (kDa)	T _{opt} (°C)	pH _{opt}	Literatūra
1503-4	53	65	6,5	[255, 256]
C599	70	60	5,3	[257]
B1	52±5	70	6,0	[258]
ET1	70	50	6,0	[259]
US149	135 (2·67,5)	40	6,5	[260]
TS-25	70	60	4,0-5,0	[261]

transglikozilinti [259]. Ši BsMa kartu su CGTaze buvo naudojama izomaltooligosacharidams iš krakmolo gauti [262]. Autoriai teigia, kad, naudojant šiuos fermentus kartu, yra sutaupomas laikas, atliekama mažiau operacijų, o galutinė substrato konversija yra didesnė. Izomaltooligosacharidai yra šakoti ir trumpų grandinių, todėl jų sirupai pasižymi maža klampa, ilgai laikant nesikristalizuoja ir yra nelabai saldūs, o tai ypač aktualu gėrimų ir maisto pramonėje [262]. Panaudojant BsMa iš štamo ET1, buvo glikozilintas narigeninas [263]. Narigeninas – natūralus, kartus ir mažai tirpus geltonos spalvos flavanoidas, kuris randamas citrusinių vaisių sultyse. Norint panaikinti jo kartumą ir padidinti tirpumą vandenyje, užtenka jį su BsMa glikozilinti per α -1,6 glikozidinį ryšį, prijungiant maltozę ar gliukozę. Taip modifikuoto narigenino tirpumas padidėja net 270 kartų, o sultys nepraranda spalvos sodrumo ir tampa nekarčios. Ši BsMa buvo imobilizuota ant silicio dioksido dalelių ir panaudota šakotiems oligocukrams iš krakmolo gauti [264].

Vienas iš šio disertacinio darbo tikslų yra BsMa, kuri gauta iš štamo C599 (depozito numeris NCIB 11837) ir žinoma komerciniu vardu MALTOGENASE 4000 L (*Novozyme* kompanijos) [257, 265-267], imobilizavimas ant PUK dalelių ir tyrimas. H. Outtup ir B. E. Norman [257] iš *Novozyme* įmonės aprašė Ma išgavimą iš bakterijų *Bacillus stearothermophilus*, kurios buvo išskirtos iš Islandijoje paimtos žemės, po to kultivuojamos ir užaugintos. Taikant DNR rekombinavimo metodą, BsMa buvo gauta iš mikroorganizmų *Bacillus subtilis* ir *E. Coli* [267-273]. Tuo tikslu



4 pav. BsMa struktūra [211].

iš *Bacillus stearothermophilus* štamo NCIB 11837 buvo paimta DNR seka, kuri koduoja Ma sintezę, ir įkelta į mikroorganizmo *Bacillus subtilis* arba *E. Coli* plazmidės DNR seką, kuri atsakinga už junginių sintezę. Toks fermento gavimo būdas yra greitesnis ir lengvesnis, o išgaunami kiekiai yra didesni, nei gaunant iš aplinkos. Įgyvendinus šį tikslą, Europoje [265, 266] ir JAV [267] buvo paskelbti patentai, ir išleistas straipsnis [268] apie sėkmingą BsMa klonavimą iš štamo NCIB 11837.

Praėjus dešimčiai metų, 1998 metais mokslininkas C. Christophersen su kolegomis aprašė BsMa veikimą ir paskelbė dvi išvadas [269]:

- BsMa turi panašią homologinę seką, kaip CGTazė, todėl gali hidrolizuoti ciklodekstrinus bei sudaryti transglikolizilinius ryšius;
- Galutinis hidrolizės produktas yra maltozė. Aktyvųjį centrą sudaro penkianaris kompleksas. (Šio aktyviojo centro veikimas aprašytas 1.6.4 skyriuje);
- BsMa veikimo principas skiriasi nuo egzoamilazių grupės fermentų, tokių kaip β -amilazė ir gliukoamilazė, nes pentasacharidą gali skaldyti iškart iš abiejų pusių. Be to, BsMa negali hidrolizuoti α -1,6 ryšių, bet gali dalyvauti transglikozidinio α -1,6 ryšio sudaryme.

Autoriai konstatavo, kad, naudojant BsMa, substrato hidrolizei nebūtina neredukuota galinė grupė [269]. Kad būtų dar aiškesnis BsMa veikimo principas, Z. Dauter [270] su kolegomis išanalizavo BsMa struktūrą panaudojant rentgeno struktūrinę analizę (4 pav.). Nustatyta, kad BsMa susideda iš 5 struktūrinių domenų, kurie yra labiau būdingi CGTazei, nei α -amilazės šeimai. BsMa katalizinis korio pavidalo (β/α_8) domenas suformuotas iš 1-131 ir 201-408 amino rūgščių liekanų sekos. Didelė kilpa, į kurią įeina 131-201 amino rūgščių liekanos (randasi tarp vijų, kurios panašios į β -3 klostę ir α -3 spirale), suformuoja B domeną. Kalcio jonas, kuris yra sandūroje tarp domenų A ir B, stabilizuoja erdvinę struktūrą ir substrato priėmimo plyšį. Šioje vietoje BsMA turi 5 amino rūgščių liekanas, kurios yra įsiterpusios į B domeną (190-194) ir dalinai apsupa aktyvųjį centrą. Domenas C susideda iš 408-496 amino rūgščių liekanų ir sudaro aštuonijį β -cilindrą. Šiame domene yra aktyvus centras, kurio erdvinis išsidėstymas panašus į maltozės molekulę. Šio BsMa katalitinio domeno (A-C) seka yra apie 50 % panaši į CGTazės ir tik apie 20-28 % į α -amilazės A-C domenų sekas. Domenai D (sudarytas iš 496-577 amino rūgščių liekanų) ir E (sudarytas iš 577-686 rūgščių liekanų) labiau asocijuojasi su CGTazės, nei su α -amilazės domenais. Domenas E yra skirtas substrato, pavyzdžiui, krakmolo, prijungimui, o prisijungimas vyksta per maltozės molekulės likučio vienetą [270]. Gauti duomenys patvirtino J. F. Robyt ir D. French [247] iškeltą hipotezę, kad Ma iš kiaulių kasos aktyvusis

centras yra penkianaris. Taip pat nustatyta, kad BsMa struktūroje yra 3 kalcio jonai, iš kurių vienas yra sandūroje tarp A ir B domenu, 2 – A domene. Šie kalcio jonai suteikia fermento struktūrai stabilumą ir termoatsparumą [270]. Naudojant BsMa, buvo pagamintas koncentruotas maltozės sirupas [271], pagerintas puerarino tirpumas vandeniniuose tirpaluose, jį glikozilinant per α -1,6 glikozidini ryšį [272]. Ypač plačiai BsMa naudojama kulinarijos pramonėje, nes suteikia gaminiui minkštumo ir prailgina vartojimo laiką [273-276]. Kadangi BsMa yra pramoninis užpatentuotas fermentas, tai buvo nuolat tobulinamas, didinamas jo atsparumas terpėms, kurių maža pH vertė ar temperatūra [277, 278]. Mokslininkai iš Novozyme kompanijos modifikavo BsMa. Šis fermentas gali hidrolizuoti krakmolą, esant mažoms terpės pH vertėms [261].

Norint pagerinti fermento stabilumą, geriausias būdas yra jį imobilizuoti. Novozyme kompanija užpatentavo BsMa imobilizavimą ant dalelių, kurias gautos iš fenolinių, akrilinių ar polistireninių dervų ir gali būti aktytos [279]. Kadangi šie BsMa imobilizavimo būdai yra patentuoti, galima daryti prielaidą, kad patentas dalinai sustabdė tolimesnes fermento imobilizavimo ant įvairiausių sintetinių nešiklių paieškas. Vėliau Vilniaus Universiteto Chemijos fakulteto Polimerų chemijos katedros mokslininkai BsMa imobilizavo ant nešiklių iš chitozano-poli(etilenglikol)metiletermetakrilato kopolimero, o imobilizavimo efektyvumas siekė 77 % [280]. BsMa taip pat buvo imobilizuota ant PU dalelių, kurios susintetintos iš MDI ir BD [48], arba iš PVA ir HDI [39]. Pirmu atveju gauta, kad didžiausias imobilizavimo efektyvumas siekė 97,5 %, kai MDI ir BD pradinis molinis santykis yra 1:2 [48]. Imobilizuojant BsMa ant PU dalelių, kurios buvo susintetintos iš PVA ir HDI, esant pradiniam moliniam santykiui 1:3, gauta, kad imobilizavimo efektyvumas yra 153 %. Autoriai tokį imobilizavimo efektyvumą aiškina tuo, kad imobilizavimo metu pakito fermento konfigūracija ir padidėjo jo aktyvumas [39]. Daugiau duomenų apie BsMa imobilizavimą ant įvairių nešiklių nerasta.

Apibendrinant galima teigti, kad BsMa galima gauti iš skirtingų štamų bakterijų *Bacillus stearothermophilus*, tačiau plačiau naudojama tik BsMa, gauta iš ET1 ir C599 štamų, o pastarojo BsMa buvo ir komercializuota. BsMa plačiai naudojama: krakmolui ir kitiems substratams hidrolizuoti iki maltozės, modifikuoti mažai tirpius junginius į tirpesnius, karčius – į saldžius arba tiesiog sumažinti saldumą. Dėl tokių savybių BsMa yra plačiai naudojama duonos pramonėje, vaistų gamyboje, biotechnologijoje. Fermentų imobilizavimas teikia didelę naudą ir reikšmę tose pramonės srityse, kuriose be fermentų neapsieinama. Straipsniuose rasta labai mažai informacijos apie BsMa imobilizavimą ant įvairių nešiklių, o daugiausia tyrimų atlikta Vilniaus Universitete Chemijos fakultete, Polimerų chemijos katedroje, kur BsMa iš štamo C559 buvo imobilizuota ant skirtingų nešiklių.

1.7 Literatūros apžvalgos apibendrinimas

PU ar PUK daleles galima susintetinti trimis skirtingais būdais. Pirmasis yra emulsinė polimerizacija nesimaišančiuose organiniuose tirpikliuose, kuriuose diizocianatas ir poliolis pasiskirstęs skirtingose fazėse. Tokios sintezės trūkumas yra tas, kad reikalingi sudėtingi steriniai stabilizatoriai. Tuo tarpu, sintetinant PU ar PUK daleles vandeninės vienstadijinės ar dvistadijinės polimerizacijos būdu, atsisakoma dalies brangių organinių tirpiklių. Vienstadijinės polimerizacijos trūkumai: reikia specialių sąlygų ir tinka ne visi reagentai, ypač diizocianatai. Dvistadijinėje polimerizacijoje galima naudoti beveik visus norimus reagentus, o pagrindinis trūkumas (sintezė atliekama per du etapus) yra nežymus. Todėl ji plačiausiai taikoma, norint susintetinti įvairias PU ar PUK mikrodaleles. Tokiu būdu susintetintos dalelės yra neakytos, o, kad būtų akytos, reikia pridėti specialių priedų. Tai dar labiau apsunkina PU ar PUK dalelių sintezę, o publikacijų apie akytų PU ar PUK dalelių sintezę rasta tik kelios, todėl yra didelis tyrimo potencialas šioje mokslo srityje.

PVA yra sintetinis polimeras, kuris pasižymi bioskalumu ir biosuderinamumu. PVA PU ar PUK sintezėje naudojamas epizodiškai, kai

norima diizocianatų pagalba modifikuoti PVA plėvelių ar membranų paviršius arba susiūti jas. Publikacijų, kuriose PVA būtų naudojamas kaip poliolis PU ar PUK dalelių sintezėje, galima teigti, kad nėra, išskyrus Vilniaus Universiteto Chemijos Fakulteto Polimerų chemijos katedros atliktus PVA ir HDI tyrimus.

Maltogeninė α -amilazė yra fermentas, kuris skaldo krakmolą ir pasižymi trijų fermentų veikimo požymiais: 1) skaldo krakmolo grandinę kaip α -amilazė; 2) galutinis produktas yra maltozė, kaip β -amilazės atveju; 3) esant didesnėms substrato koncentracijoms, pradeda glikozilinti junginius per α -1,6 glikozidinį ryšį. Ma yra naudojama, norint gauti didelės koncentracijos maltozinius sirupus, kurie taikomi maisto, farmacijos, biotechnologijos pramonėse. Tačiau visi tirpūs fermentai panaudojami vieną kartą ir yra brangūs. Norint pašalinti šiuos trūkumus, fermentus reikia imobilizuoti ant netirpių nešiklių.

Apžvelgus α -amilazių imobilizavimą ant polimerinių nešiklių, taip pat ir ant PU ar PUK medžiagų, matyti, kad imobilizavimas dažniausiai vykdomas įterpimo PU putplastyje arba PU putplastis, plėvelės ar membranos aktyvuojami funkcinėmis grupėmis, o po to fermentas yra imobilizuojamas kovalentiniu būdu. Deja, yra mažai informacijos apie fermentų imobilizavimą ant PU ar PUK dalelių. Norint panaudoti PU ar PUK daleles kovalentiniam fermentų prijungimui, dalelės turi turėti laisvų izocianatograpių, prie kurių galėtų jungtis fermentas. Apžvelgus literatūrą, rasti tik keli straipsniai, kuriuose fermentai fizikiniu adsorbcijos būdu imobilizuojami ant PU mikrodalelių, o tie fermentai nėra iš amilazių šeimos. Galima prieiti prie išvados, kad PU dalelės nebuvo plačiai pritaikytos imobilizavimo tikslams, o tai leidžia teigti, kad yra tyrimo galimybių PU ar PUK dalelių sintezės ir fermentų imobilizavimo srityje. Taip pat mažai rasta informacijos apie PUK dalelių sintezę, o jų sintezė iš poliolio PVA ir HDI tirta tik Vilniaus Universiteto Chemijos Fakulteto Polimerų chemijos katedroje.

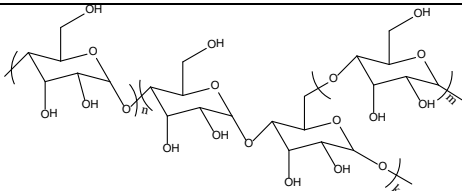
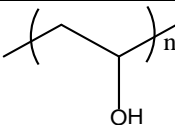
Nėra publikacijų apie PUK sintezę iš PVA ir kitų diizocianatų, kai reakcijos terpėje yra vandens. Imobilizavimas ant aktyvų PUK nešiklių yra labai

mažai nagrinėta tema ir ši tyrimo sritis gali būti plečiama bei teikti dideles perspektyvas.

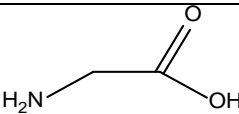
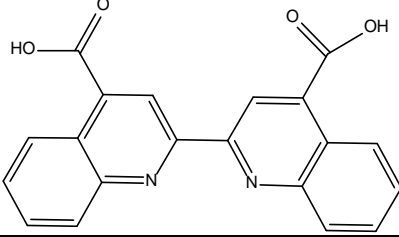
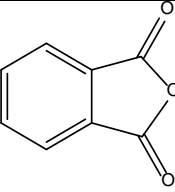
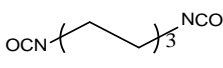
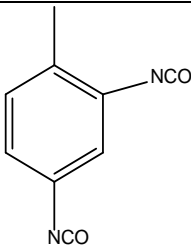
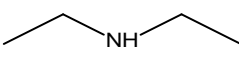
2. DARBO METODIKA

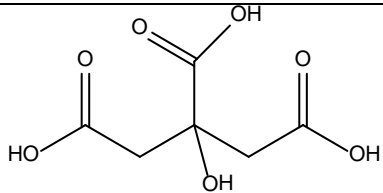
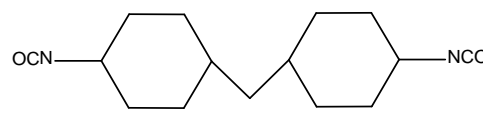
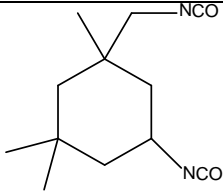
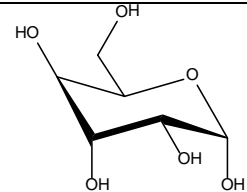
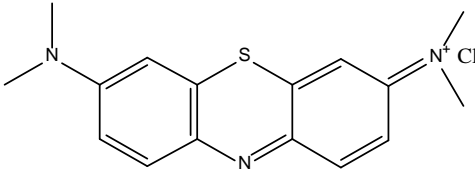
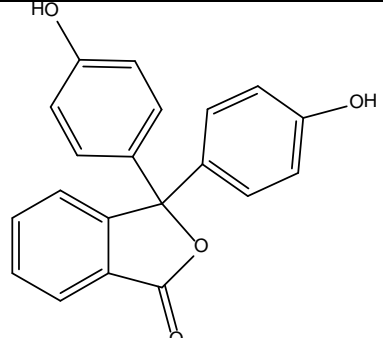
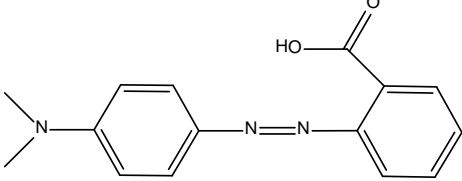
2.1 Naudotos medžiagos ir reagentai

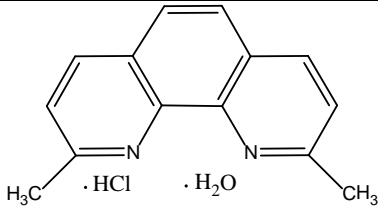
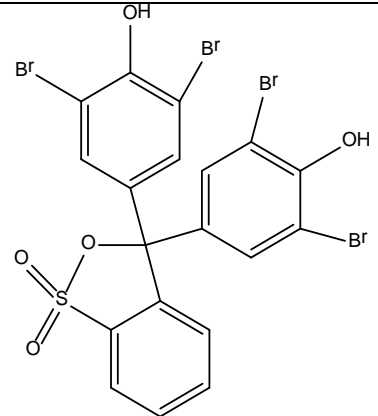
2.1.1 Polimerai

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Bulvių krakmolas, <i>Reachim</i>	-	
Poli(vinilo alkoholis), PVA, <i>Fluka</i>	M _w 100000, hidrolizės laipsnis 86-89 mol %	

2.1.2 Organinės medžiagos

Pavadinimas	Savybės	Formulė
2-aminoacto rūgštis, glicinas, <i>Sigma</i>	M _r 75,07	
BCA kit, komercinis reagentų rinkinys baltymo kiekiui matuoti, kurio pagrindą sudaro bicinchinono rūgštis (BCA), <i>Thermo Scientific</i>	-	
2-benzofuran-1,3-dionas, ftalio rūgšties anhidridas, <i>Sigma-Aldrich</i>	M _r 148,12	
1,6-diizocianatoheksanas, 1,6-heksametilendiizocianatas, HDI, <i>Fluka</i>	M _r 168,20; T _{vir.} 255 °C; d ²⁰ 1,04 g/ml; n _D ²⁰ 1,452	
2,4-diizocianato-1-metilbenzenas, 2,4-toluendiizocianatas, TDI, <i>Aldrich</i>	M _r 174,16; T _{lyd.} 19,5-21,5 °C; T _{vir.} 251 °C; d ²⁰ 1,22 g/ml; n _D ²⁰ 1,385	
N-etiletanaminas, dietilaminas, <i>Reachim</i>	M _r 73,14; T _{lyd.} 50 °C; T _{vir.} 55 °C;	

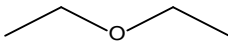
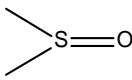
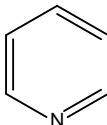
	d^{25} 0,707 g/ml; n_D^{20} 1,385	
2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksirūgštis, citrinų rūgštis, <i>Reachim</i>	M_r 192,12; $T_{lyd.}$ 153-159 °C	
Jaučio serumo albuminas, Thermo Scientific	M_r 60000	-
1-izocianato-4-[(4-izocianatocikloheksil)metil]cikloheksanas, 4,4'-metilėnbis(cikloheksilizocianatas), HMDI, <i>Aldrich</i>	M_r 262,35; $T_{lyd.}$ 25 °C; $T_{vir.}$ 168 °C; d^{25} 1,066 g/ml; n_D^{20} 1,497	
5-Izocianato-1-(izocianatometil)-1,3,3-trimetilcikloheksanas, izoforon-diizocianatas, IPDI, <i>Aldrich</i>	M_r 222,28; $T_{vir.}$ 158-159 °C; d^{25} 1,049 g/ml; n_D^{20} 1,484	
1,2,4,5,6-pentahidroksihexsan-3-onas, D-gliukozė, <i>Reachim</i>	M_r 180,16	
Indikatoriai		
(3,7-bis(dimetilamino)fenotiazin-5-iumchloridas), metileno mėlynasis, <i>Reachim</i>	M_r 319,85	
3,3-bis(4-hidroksifenil)-2-benzofuran-1-onas, Fenoftaleinas, <i>Reachim</i>	M_r 318,32	
(2-(dimetil-4-amino)fenil)azobenzeno rūgštis, metileno raudonasis, <i>Reachim</i>	M_r 269,30	

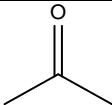
2,9-dimetil-1,10-fenantrolino hidrochlorido hidratas, neokuproinas $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, <i>Sigma</i>	M_r 244,72	
3,3',5,5'-tetrabromofenol-sulfoftaleinas, bromfenolio mėlynasis, <i>Reachim</i>	M_r 669,96	

2.1.3 Neorganinės medžiagos

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Dinatrio karbonatas, natrio karbonatas, <i>Reachim</i>	M_r 105,99	Na_2CO_3
Natrio hidroksidas, <i>Reachim</i>	M_r 40,00	NaOH
Vandenilio chlorido rūgštis 37%, druskos rūgštis, <i>POCH</i>	M_r 36,46; d^{20} 1,18 g/ml	HCl
Vario sulfato pentahidratas, <i>Reachim</i>	M_r 249,7	$\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

2.1.4 Tirpikliai

Pavadinimas	Savybės	Formulė
Etoksietanas, dietileteris, <i>Lach-ner</i>	M_r 74,12; $T_{\text{vir.}}$ 34,6 °C; d^{25} 0,706 g/ml; n_D^{20} 1,353	
Metilsulfinilmetanas, dimetilsulfoksidas, <i>Sigma-Aldrich</i>	M_r 78,13; $T_{\text{lyd.}}$ 16-19 °C; $T_{\text{vir.}}$ 189 °C; d^{20} 1,10 g/ml; n_D^{20} 1,479	
Piridinas, <i>Reachem Slovakia</i>	M_r 79,10; $T_{\text{lyd.}}$ -42 °C; $T_{\text{vir.}}$ 115 °C; d^{25} 0,978 g/ml; n_D^{20} 1,509	

Propan-2-onas. acetonas, <i>Reachim Slovakia</i>	M_r 58,08; T_{vir} 56 °C; d^{20} 0,791 g/ml; n_D^{20} 1,359	
---	---	---

2.1.5 Fermentai

Pavadinimas/šaltinis	Savybės
α -amilazė (EC 3.2.1.1) iš Bacillus Subtilis, Novozyme	d^{20} 1,150 g/ml; pH_{opt} 6,5; aktyvumas 25000 V/ml
Maltogeninė α -amilazė (EC 3.2.1.133) iš Bacillus stearothermophilus, Novozymes	d^{20} 1,250 g/ml; T_{opt} 60 °C; pH_{opt} 5,0-5,5; aktyvumas 4000 MANU/ml

2.2 Tirpalai

2.2.1 Ftalinantis mišinys hidroksigrupių kiekiui nustatyti

6 g ftalio rūgšties anhidrido ištirpinama 30 ml sauso piridino.

2.2.2 0,2 M dietilamino tirpalas izocianatogrupių kiekiui nustatyti

14,628 g arba 20,69 ml (0,2 mol) dietilamino maišoma su 200 ml acetonu ir skiedžiama acetonu iki 1000 ml. Paruošto tirpalo galiojimo laikas – 6 valandos.

2.2.3 0,1 M Citratinis buferis (pH = 5,0)

19,2 g (0,1 mol) citrinų rūgšties ištirpinama 500 ml distiliuoto vandens. Į gautą tirpalą lašinamas koncentruotas natrio hidroksido tirpalas, kol pH pasiekia 5,0. Gautas tirpalas skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml.

2.2.4 Pradinis Ma tirpalas

1 ml Ma skiedžiamas su 3 ml citratinu buferiu (pH = 5,0). Gautas tirpalas naudojamas iš karto. Paruošto tirpalo galiojimo laikas – 2 paros.

2.2.5 Krakmolo tirpalas Ma aktyvumui nustatyti

5 g krakmolo ištirpinama 100 ml citratinio buferio (pH 5,0). Po to pripilama 1 ml α -amilazės tirpalo, kurio aktyvumas yra 500 V/ml. Fermentinė reakcija vykdoma 3 min. 40 °C temperatūroje ir inaktyvuojama 30 min. verdančio vandens vonioje. Tokiu būdu paruošto krakmolo tirpalo (substrato) dekstrozės ekvivalentas (DE) yra lygus nuo 2 iki 5%. DE rodo redukuojančių cukrų kiekį gliukozės atžvilgiu, t.y., gliukozės DE yra 100%, maltozės – 50%, o kai visai nėra redukuojančių cukrų – 0%. Paruošto krakmolo DE (%) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$DE = \frac{[Red.cukrus]}{[Substratas]} \cdot 100$$

[Red.cukrus] – po fermentinės reakcijos susidariusių redukuojančių cukrų koncentracija, mg/ml;

[Substratas] – pradinio krakmolo tirpalo koncentracija, mg/ml.

2.2.6 Neokuproino reagentas redukuojančių cukrų kiekiui nustatyti

Neokuproino reagentas ruošiamas iš dviejų tirpalų A ir B.

Tirpalas A. Atskiruose indeliuose paruošiami tirpalai:

- 40 g natrio karbonato ištirpinama 600 ml vandens;
- 16 g glicino ištirpinama 100 ml vandens;
- 0,450 vario sulfato pentahidrato ištirpinama 100 ml vandens.

Visi gauti tirpalai sumaišomi eilės tvarka: į natrio karbonato tirpalą įpilamas glicino tirpalas, po to į gautą tirpalą lėtai supilamas vario sulfato tirpalas (tirpalas nusidažo mėlynai). Gautas tirpalas skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml.

Tirpalas B. 1,2 g neokuproino ištirpinama 300 ml vandens. Gautas tirpalas skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml.

Prieš naudojimą tirpalai turi būti laikomi mažiausiai 12 val. Paruoštų tirpalų galiojimo trukmė – dvi savaitės.

2.2.7 BCA tirpalas baltymo kiekiui nustatyti

Bicinchinono rūgšties tirpalas ruošiamas prieš pat tyrimą, sumaišant komercinius reagentus BC-A ir BC-B santykiu 50:1. Paruošto reagento galiojimo trukmė – 1 diena.

2.3 Darbo metodikos

2.3.1 Poli(uretankarbamidinių) mikrodalelių sintezė

Į trikaklę kolbą su grįžtamuju aušintuvu ir azoto prapūtimo vamzdeliu įdedama 0,06 arba 0,1 M PVA ir įpilama 50 ml DMSO, kuriame yra 1 arba 2 tūrio % distiliuoto vandens (PUK sintezei naudojant HMDI – 2 % vandens tūrio). Ištirpus PVA, temperatūra keliama iki 70-150 °C ir sulašinamas diizocianatas arba diizocianatų mišinys. PUK dalelių sintezei iš PVA (0,1 M) ir HDI:TDI mišinio naudota 0,202-0,606 ml HDI ir 0,178-0,357 ml TDI mišinio, esant pradiniam moliniams santykiams PVA:(HDI:TDI) = 1:(0,25-0,75:0,25-0,60). PUK dalelių sintezei iš PVA (0,06 M) ir IPDI naudota 1,271-2,543 ml IPDI, esant pradiniam moliniui santykiui PVA:IPDI = 1:(2-4). PUK dalelių sintezei iš PVA (0,06 M) ir HMDI naudota 1,477-4,430 ml HMDI, esant pradiniam moliniam santykiui PVA:HMDI = 1:(2-6). Reakcija vykdoma 60-180 min ir gautas produktas išsodinamas dietileterio ir acetono (3:1) mišinyje, nufiltruojamas ir plaunamas kelis kartus tos pačios sudėties mišiniu. PUK mikrodalelės iškart po sintezės naudojamos izocianatogrupėms nustatyti ir Ma imobilizuoti. Prieš liofilizavimą PUK mikrodalelės papildomai plaunamos acetonu ir kelis kartus distiliuotu vandeniu.

2.3.2 *Ma imobilizavimas ant poli(uretankarbamidinių) mikrodalelių*

Sumaišoma 5 ml citratinio buferio ir 0,38 ml Ma pradinio tirpalo. Tirpalas termostatuojamas 40 °C vandens vonioje 5 min. Po to įdedama apie 1,75 g iškart po sintezės nusodintų PUK dalelių ir imobilizavimas vykdomas 30 min 40 °C temperatūroje, maišant maišykle (300 aps/min). Po to imobilizuotas preparatas (IP) perkeliamas į šaldytuvą (4 °C) ir laikomas 12 val. Vėliau imobilizuotos PUK dalelės filtruojamos ir du kartus po 5 ml plaunamos citratinu buferiu.

2.4 **Analizės metodikos**

2.4.1 *Hidroksigrupių kiekio nustatymas*

Į 200 ml Erlenmejerio kolbutę įdedama 0,2-0,5 g sausų PUK mikrodalelių, įpilama 10 ml ftalinančio mišinio (2.2.1) ir sujungiama su grįžtamuoju aušintuvu, kuris yra užkimštas su kalcio chloridu užpildytu vamzdeliu. Kolbutė šildoma smėlio vonioje 60 °C temperatūroje 2 valandas. Lygiagrečiai atliekamas bandinys be tiriamosios medžiagos. Kolbutė atšaldoma, įpilama 50 ml distiliuoto vandens ir susidariusi ftalio rūgšties liekana titruojama 0,5 M NaOH tirpalu, indikatoriumi naudojant fenoftaleiną, iki kol galutinai tirpalas nusidažo rausva spalva. Titruojama kolbutė turi būti energingai plakama arba maišoma magnetiniu maišikliu, siekiant pašalinti rūgštį iš organinio tirpiklio sluoksnio. Hidroksigrupių kiekis X_{OH} (%) apskaičiuojamas pagal formulę [281]:

$$X_{OH} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c \cdot 17}{m \cdot 1000} \cdot 100$$

Čia:

- V_1 ir V_2 – NaOH tirpalo, sunaudoto atitinkamai kontroliniam ir tiriamajam bandiniui titruoti, tūris, ml;
- c – NaOH tirpalo koncentracija, mol/l;
- 17 – OH molinė masė, g/mol;
- m – bandinio masė, g.

2.4.2 Izocianatograpių kiekio nustatymas

Į 100 ml Erlenmejerio kolbutę suberiama 0,3-0,4 g PUK mikrodalelių ir įpilama 10 ml 0,2 M dietilamino tirpalo (2.2.2). Mišinys termostatuojamas 40 °C temperatūroje 30 min., ataušinamas iki kambario temperatūros ir titruojamas 0,1 M HCl tirpalu, indikatoriumi naudojant bromfenolio mėlynąjį. Izocianatograpių kiekis X_{NCO} (%) apskaičiuojamas pagal formulę [281]:

$$X_{NCO} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c \cdot 42}{m \cdot 1000} \cdot 100$$

Čia:

- V_1 ir V_2 – HCl tūris, atitinkamai sunaudotas kontroliniam ir tiriamajam bandiniui nutrituoti, ml;
- c – HCl tirpalo koncentracija, mol/l;
- 42 – izocianatograpių molinė masė, g/mol;
- m – titruojamosios medžiagos masė, g.

2.4.3 Redukuojančių cukrų kiekio nustatymas Neokuproino metodu

Į 0,5 ml redukuojančių cukrų tirpalo ($2,775 \cdot 10^{-5}$ - $3,885 \cdot 10^{-4}$ mol/l) įpilama po 2 ml Neokuproino reagento A ir B (2.2.6). Mėgintuvėlis užkemšamas kamščiu ir virinamas verdančio vandens vonelėje 12 min. Atvėsinama ledo vonioje ir įpilama 8 ml distiliuoto vandens (bendras tūris 12,5 ml). Mėgintuvėlis supurtomas ir *Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS* spektrofotometru matuojamas tirpalo optinis tankis ties $\lambda = 450$ nm. Kontrolinis bandinys atliekamas aprašytuoju būdu, tik vietoje redukuojančio cukraus tirpalo įpilama 0,5 ml distiliuoto vandens. Kalibracinei tiesei gauti naudojami $2,775 \cdot 10^{-5}$ - $3,885 \cdot 10^{-4}$ mol/l gliukozės vandeniniai tirpalai. Iš kalibracinės tiesės nustatomas redukuojančių cukrų kiekis mišinyje [282].

2.4.4 Baltymo kiekio nustatymas modifikuotu Lowry metodu naudojant bicinchinono rūgštį

0,1 ml baltymo tirpalo citratiniame buferyje sumaišoma su 2 ml BCA tirpalo, paruošto pagal metodiką 2.2.7, ir termostatuojama 30 min. 37 °C

temperatūroje. Ataušinama ir *Perkin Elmer* Lambda 35 UV/VIS spektrofotometru matuojamas tirpalo optinis tankis ties $\lambda = 562$ nm. Kontrolinis bandinys ruošiamas aprašytuoju būdu, tik vietoje baltymo tirpalo pripilama 0,1 ml citratinio buferio. Kalibracinės tiesės gavimui naudojami 0,2-2 mg/ml jaučio serumo albumino tirpalai citratiname buferyje. Tiesinis intervalas yra 0,1-0,9 optinio tankio srityje. Iš kalibracinės tiesės nustatomas baltymo kiekis mišinyje (mg/ml) [283].

2.4.5 Spektroskopinis PUK mikrodalelių tyrimas

ATR (visiško atspindžio nuo paviršiaus) metodu FT-IR spektrai užrašyti *Perkin Elmer* FT-IR FRONTIER spektrometru. Mėginių spektrai užrašyti 650-4000 cm^{-1} srityje, kiekvieną bandinį skenuojant 20 kartų.

2.4.6 Elementinė PUK mikrodalelių analizė

Liofilizuotų PUK mikrodalelių elementinė analizė atlikta naudojant *Thermo Scientific* Flash 2000 serijos CHNS-O analizatorių.

2.4.7 Terminė PUK mikrodalelių analizė

PUK mikrodalelių terminė analizė atlikta dviem skirtingais prietaisais. TGA analizė atlikta naudojant *Perkin Elmer* STA 6000 prietaisą, kai temperatūra kelta nuo 30 °C iki 600 °C, šildymo greitis – 10 °C/min ir nešančių dujų (azoto) greitis – 20 ml/min. DSK analizė atlikta naudojant *Perkin Elmer* DSC 8500 prietaisą. Šiuo atveju temperatūra kelta nuo 0 °C iki 250 °C, šildymo greitis - 10 °C/min ir nešančių dujų (azoto) greitis – 40 ml/min.

2.4.8 PUK mikrodalelių dydžio ir paviršiaus morfologijos tyrimas

Liofilizuotų PUK mikrodalelių dydis nustatytas optiniu mikroskopu *Olympus BX 51*, o dalelių paviršiaus morfologija tirta naudojant skenuojantį elektroninį mikroskopą (SEM) *Hitachi SU 70*.

2.4.9 PUK mikrodalelių paviršiaus ploto, bendro akučių tūrio ir jų dydžio pasiskirstymo nustatymas

Liofilizuotų PUK mikrodalelių paviršiaus plotas, bendras akučių tūris ir jų dydžio pasiskirstymas nustatytas naudojant *Micromeritics Tristar II* prietaisą. Apie 0,1 -0,3 g PUK liofilizuotų mikrodalelių suberiama į specialų indą. Indas pasveriamas ir prapučiamas azoto dujomis 2-4 valandas, esant 120-140 °C, kad pasišalintų lakūs junginiai. Po to indas su mėginiu ataušinamas, pasveriamas, apskaičiuojama tiksli PUK mikrodalelių masė ir dedamas į *Micromeritics Tristar II* prietaisą. Taikant *Brunauer-Emmett-Teller* (BET) modelį, iš adsorbcijos izotermos santykinio slėgio ribose 0,05-0,3 yra apskaičiuojamas PUK mikrodalelių paviršiaus plotas. Bendras akučių tūris ir jų dydžio pasiskirstymas nustatomas naudojant *Barret-Joyner-Halenda* (BJH) modelį. Visi skaičiavimai atliekami naudojantis *TriStar II 3020* programine įranga.

2.4.10 Liofilizavimas

PUK mikrodalelės liofilizuotos -40 °C temperatūroje, naudojant *Christ ALPHA 2-4 LSC* liofilizatorių. Liofilizavimas - tai džiovavimo būdas, kuomet užšaldytas tirpalas vakuumuojamas, ir tirpiklis sublimuojasi, iš kietos fazės pereidamas į dujinę. Tirpiklis pilnai pašalinamas per 72 val. Medžiagos džiovinimas vyksta keliais etapais: pirma tirpalas užšaldomas, tuomet žemoje temperatūroje vykdomas pagrindinis džiovinimas. Tirpikliui sublimuojantis PUK mikrodalelių tūris lieka nepakitęs. Likę 5-10 % tirpiklio pašalinama

liekamojo džiovavimo metu, temperatūrą palaipsniui keliant iki 20 °C temperatūros.

2.4.11 PUK išeigos apskaičiavimas

Susintetintos PUK mikrodalelės džiovinamos vakuuminėje krosnelėje, esant 80-100 °C temperatūrai arba liofilizuojamos pagal 2.4.10 metodiką. Gautų PUK mikrodalelių išeiga (q, %) apskaičiuojama pagal žemiau pateiktą formulę:

$$q = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

Čia:

m_1 – gautų PUK mikrodalelių masė, g;

m_2 – įdėtų pradinių reagentų masių suma, g.

2.5 Ma aktyvumo ir stabilumo nustatymas

2.5.1 Pradinio Ma tirpalo aktyvumo nustatymas

Pradinis Ma tirpalas skiedžiamas 160 kartų citratiniu buferiu. 1 ml praskiesto Ma tirpalo įpilama į 10 ml krakmolo (2.2.5) tirpalo. Inkubuojama 20 min. 40 °C temperatūroje ir reakcija nutraukiama virinant 15 min. vandens vonioje. Redukuojančių cukrų kiekis nustatomas Neokuproino metodu (2.4.4). Ma aktyvumas vienetais mililitre (V/ml) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$A = \frac{c \cdot Sk \cdot 1000 \cdot 11}{t}$$

Čia:

c – redukuojančių cukrų kiekis, mol/l;

Sk – skiedimų skaičius;

11 – bendras reagentų tūris, ml;

t – inkubavimo trukmė, min.

2.5.2 Ma aktyvumo nustatymas ant IP

Į 10 ml krakmolo tirpalo (2.2.5) įdedama apie 0,1 g drėgno IP ir maišoma 20 min. 40 °C temperatūroje. Fermentinė reakcija sustabdoma kaitinant

reakcijos mišinį 15 min. verdančio vandens vonioje. Reakcijos mišinys nufiltruojamas ir redukuojančių cukrų kiekis filtrate nustatomas Neokuproino metodu (2.4.4). Fermento aktyvumas vienetais grame (V/g) drėgno IP apskaičiuojamas pagal 2.5.1 metodikoje nurodytą formulę, tik gautas aktyvumas papildomai dalinamas iš IP masės.

Imobilizavimo efektyvumas (IE) – gauto Ma aktyvumo ant IP ir imobilizavimui paimto pradinio fermento aktyvumo procentinis santykis.

Imobilizavimo išeiga pagal baltymą (IB) – Ma baltymo kiekis ant IP po imobilizavimo ir imobilizavimui paimto baltymo kiekio procentinis santykis.

Atliekant 7 ciklų krakmolo hidrolizę, imobilizuota Ma po kiekvieno ciklo kelis kartus plaunama citratinu buferiu ir panaudojama kitam krakmolo hidrolizės ciklui. Pirminis IP aktyvumas yra išreiškiamas 100 %, o kiti išreiškiami kaip santykinis aktyvumas (SA) nuo pirminio IP aktyvumo.

2.5.3 *Ma aktyvumo nustatymas filtrate*

Į 10 ml krakmolo (2.2.5) tirpalo įpilama 1 ml praskiesto filtrato (IP po imobilizavimo praplaunamas 10 ml citratinio buferio) ir inkubuojama 20 min. 40 °C temperatūroje. Po to fermentinė reakcija sustabdoma kaitinant reakcijos mišinį 15 min. verdančio vandens vonioje ir redukuojančių cukrų kiekis nustatomas Neokuproino metodu (2.4.4). Fermento aktyvumas vienetais mililitre (V/ml) apskaičiuojamas pagal formulę, pateiktą 2.5.1 metodikoje.

2.5.4 *Imobilizuotos Ma stabilumo nustatymas*

Imobilizuoti Ma preparatai laikomi šaldytuve 4 °C temperatūroje. Ma stabilumas ant IP nustatomas pagal 2.5.2 metodiką matuojant fermentinį aktyvumą tam tikrais laiko tarpais.

2.5.5 Tirpios ir imobilizuotos Ma optimalios temperatūros įvertinimas

Į 10 ml krakmolo tirpalo (2.2.5) įpilama 1 ml pradinio fermento tirpalo (praskiestas 160 k.) (2.2.4) arba įdedama apie 0,1 g drėgno IP (2.6.2) ir 20 min. maišoma 40-80 °C temperatūroje. Po to fermentinė reakcija sustabdoma, kaitinant reakcijos mišinį 15 min. verdančio vandens vonioje. Ma fermentinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal 2.5.1 ir 2.5.2 metodikas.

2.5.6 Natrio chlorido įtaka tirpios ir imobilizuotos Ma fermentiniam aktyvumui nustatymas

Pradinis Ma tirpalas skiedžiamas 160 kartų citratinio buferiu. 1 ml praskiesto Ma tirpalo įpilama į 10 ml krakmolo (2.2.5) tirpalo, kuriame yra 0-0,1 M natrio chlorido, ir vykdoma hidrolizė pagal 2.5.1 skyrių. Tirpios Ma aktyvumas, kai neįdėta natrio chlorido, yra prilyginamas 100 %, o kiti išreiškiami kaip SA nuo tirpios Ma aktyvumo.

Į 10 ml citratinio buferio, kuriame yra 0-0,1 M natrio chlorido, įdedama 0,1 g IP ir termostatuojama 20 min. 40 °C temperatūroje. Po to IP filtruojamas ir plaunamas su 10 ml citratinio buferio. IP fermentinis aktyvumas nustatomas pagal 2.5.2 metodiką.

2.5.7 Tirpios ir imobilizuotos Ma K_M nustatymas

Paruošiamas 10 % krakmolo tirpalas pagal 2.2.5 metodiką. Iš paruošto 10 % krakmolo tirpalo skiedimo būdu paruošiami 0,5 %, 1 %, 2%, 4%, 5 %, 6 % krakmolo tirpalai. Tolesnė tyrimo eiga kiekvienos krakmolo koncentracijos atveju atliekama pagal 2.5.1. metodiką, kai naudojama tirpi Ma, arba pagal 2.6.2 metodiką, kai naudojama imobilizuota Ma. Inkubavimo metu kas 2, 4, 6, 8, 12, 16 ir 20 minučių paimama po 0,5 ml mėginio, skiedžiama 5 ml citratinio buferio ir inaktyvuojama 15 min. verdančio vandens vonioje. Iš gautų duomenų kiekvienos krakmolo koncentracijos atveju brėžiama redukuotų

cukrų koncentracijos (mol/l) priklausomybė nuo trukmės (min). Iš kreivės polinkio tiesinės dalies kampo tangento apskaičiuojamas pradinis reakcijos greitis ($\text{mol}\cdot(\text{l}\cdot\text{min})^{-1}$). Po to brėžiama pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo krakmolo koncentracijos ir nustatomos K_M ir $V_{MAX}/2$ reikšmės [283].

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 PUK mikrodalelių sintezė

Šiame darbe PUK mikrodalelių sintezei buvo pasirinktas poliolis PVA bei įvairūs diizocianatai: TDI (aromatinis asimetrinis) ir HDI (alifatinis simetrinis) mišinys, IPDI (cikloalifatinis asimetrinis) arba HMDI (cikloalifatinis simetrinis). Visi išvardinti diizocianatai, išskyrus TDI, yra alifatiniai, o iš jų gauti produktai yra atsparesni hidrolizei, UV šviesai. Jie vienas nuo kito skiriasi savo struktūra ir izocianatograpių reakingumu [17, 284]. Reakingiausi diizocianatai yra aromatiniai, po jų seka alifatiniai ir cikloalifatiniai. Kai diizocianato molekulė yra simetrinė (HDI ir HMDI), abiejų izocianatograpių reakingumas yra vienodas, bet, sureagavus vienai izocianatogrupei, likusios reakingumas sumažėja beveik du kartus, lyginant su pirmosios grupės reakingumu [17]. Taip yra todėl, kad, susidarant uretano ryšiui, yra išlaisvinami lokalizuoti elektronai, kurie sumažina kitos laisvos izocianatograpių reakingumą [17]. Asimetrinių diizocianato junginių (TDI ir IPDI) izocianatograpių reakingumas priklauso nuo jų padėties. TDI yra standi, aromatinė asimetrinė molekulė, kurioje metilgrupės atžvilgiu *orto* ir *para* padėtyse yra antrinės izocianatograpių, kurių reakcijų greičiai yra skirtingi [17, 284-286]. Tuo tarpu, IPDI turi pirminę (alifatinę) ir antrinę (cikloalifatinę) izocianatogrupes. IPDI izocianatograpių aktyvumas ir kuri grupė pirma dalyvaus reakcijoje su polioliu (nukleofilu) priklauso nuo reakcijos temperatūros, poliolio sandaros, katalizatoriaus ir -cheminės sudėties [19, 28]. Kai reakcijos mišinyje katalizatoriaus nėra, IPDI antrinė izocianatogrupė yra reakingesnė už pirminę, tačiau, esant erdviniams trukdžiams šalia poliolio antrinės hidroksigrapių, reakcija lengviau vyksta su pirmine nei su antrine izocianatogrupe [19, 28].

Žinoma, kad PVA yra hidrofilinis, bioskalus ir biosuderinamas polimeras. PUK dalelių sintezei paprastai naudojami dioliai ar polioliai su galuose esančiomis hidroksigrapiėmis. PVA grandinėse yra daug hidroksigrapių, todėl tikimybė gauti tinklinės akytos struktūros PUK yra labai didelė. Galimybė

susidaryti akytesnei struktūrai dar labiau padidėja, į reakcijos mišinį pridėjus vandens, nes susidaro ilgesnės polikarbamido grandinės. Kaip poliolių naudojant PVA, PUK mikrodalelės tampa hidrofiliškesnės, nes lieka nesuragavusių hidroksigrupių, tai yra jos tampa artimesnės fermento prigimčiai. Naudojant diizocianato perteklių, tikėtasi susintetinti PUK daleles su laisvoms izocianatogrūpėmis, per kurias būtų galima prijungti fermentus. Todėl pirmiausia buvo siekiama iš PVA ir skirtingų diizocianatų susintetinti naujas fermentams imobilizuoti tinkamas PUK mikrodaleles, kurias pasižymėtų skirtingomis fizikinėmis savybėmis ir turėtų laisvų izocianatogrūpių.

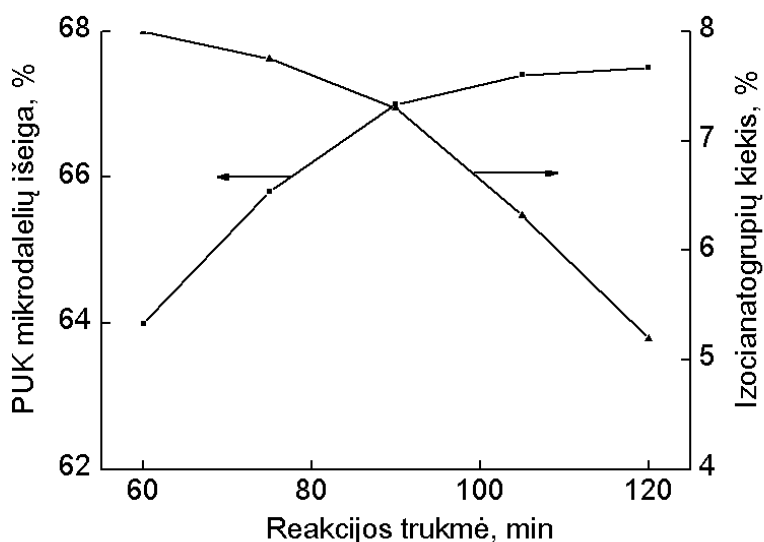
3.1.1 PUK mikrodalelių sintezė iš PVA ir diizocianatų mišinio

PUK mikrodalelės susintetintos iš PVA ir diizocianatų mišinio DMSO/H₂O tirpale (DMSO/H₂O = 99/1 tūrio %), kai PVA molinė koncentracija yra 0,1 M, o diizocianatų mišinys sudarytas iš HDI ir TDI. [PVA]:([HDI]:[TDI]) molinis santykis buvo keistas nuo 1:(0,25:0,25) iki 1:(0,75:0,25). Vykdamas reakciją tarp PVA ir vieno diizocianato TDI santykiu 1:1 gauta, kad PUK mikrodalelės, esant mažai PVA molinei koncentracijai (<0,08 M), nesusidaro, o, padidinus virš 0,1 M, susidaro gelis. Todėl nuspręsta

3.1 lentelė. PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI bei TDI mišinio, išeiga ir funkcinių grupių kiekis (t = 90 min., T = 90 °C)

Nr.	[PVA]:([HDI]:[TDI])	PUK išeiga (%)	NCO grupių kiekis (%)	OH grupių kiekis (%)
1	1:(0,25:0,25)	47	2,8	6,6
2	1:(0,35:0,35)	50	3,2	5,2
3	1:(0,50:0,50)	67	7,3	2,7
4	1:(0,40:0,60)	55	5,4	4,0
5	1:(0,75:0,25)	72	9,1	2,6

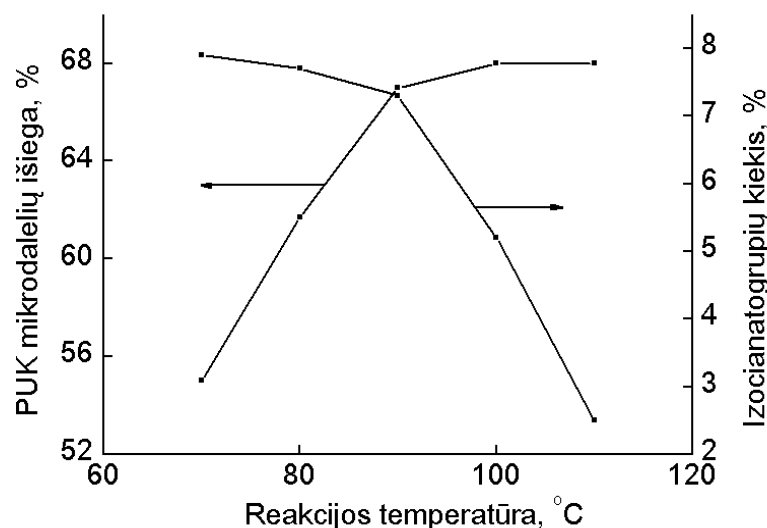
į reakcijos mišinį papildomai įvesti HDI. Panaudojus HDI-TDI mišinį, PUK mikrodalelės susidarė. Buvo ištirta PUK mikrodalelių sintezės priklausomybė nuo komponentų molinių santykių, reakcijos trukmės ir temperatūros. Pradinis PVA ir diizocianatų mišinio molinis santykis buvo varijuojamas nuo 1:0,5 iki 1:1 (3.1 lentelė). Nustatyta, kad, keičiant pradinį PVA ir (HDI:TDI) molinį santykį nuo 1:(0,25:0,25) iki 1:(0,50:0,50), PUK mikrodalelių išeiga ir izocianatograpių kiekis didėja, o hidroksigrapių – mažėja. Padidinus TDI molinį kiekį diizocianatų mišinyje (3.1 lentelė, Nr. 3-4), PUK mikrodalelių išeiga ir izocianatograpių kiekis sumažėjo, o nesureagavusių hidroksigrapių liko daugiau. Priešingai, padidinus HDI molinį kiekį diizocianatų mišinyje, gauta, kad PUK išeiga ir izocianatograpių kiekis padidėjo, o hidroksigrapių kiekis sumažėjo. Iš literatūros duomenų [17, 284-286] žinoma, kad TDI izocianatograpių grupė, kuri yra aromatinio žiedo metilgrupės atžvilgiu *para* padėtyje, yra keturis kartus reaktingesnė už izocianatograpių grupę, kuri yra *orto* padėtyje ir mažiausiai šimtą kartų reaktingesnė už simetrines HDI izocianatograpių grupes [284]. Taigi, aromatinio žiedo metilgrupės atžvilgiu *orto* padėtyje esanti izocianatograpių grupė gali nereaguoti tol, kol iki galo nebus



3.1 pav. PUK mikrodalelių išeigos ir izocianatograpių kiekio priklausomybė nuo reakcijos trukmės ([PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1: (0,50: 0,50), T = 90 °C).

sureagavusi *para* padėtyje esant izocianatogrupė, tuo tarpu, HDI molekulėje abiejų grupių reakingumas pradinėje stadijoje yra vienodas ir bet kuri grupė gali reaguoti su PVA hidroksigrupe. Didžiausia PUK mikrodalelių išėiga (72 %) ir didžiausias izocianatogrupių kiekis (9,1 %) gautas, kai PUK dalelės susintetintos, naudojant pradinį molinį santykį PVA:(HDI:TDI) = 1:(0,75:0,25) (3.1 lentelė, Nr. 5).

Taip pat buvo tirta reakcijos trukmės (3.1 pav.) ir temperatūros (3.2 pav.) įtaka PUK išėigai ir izocianatogrupių kiekiui, kai pradinių medžiagų molinis santykis PVA:(HDI-TDI) buvo 1:(0,5:0,5). Ilginant reakcijos trukmę nuo 60 iki 120 min., PUK mikrodalelių išėiga nežymiai padidėjo nuo 64 iki 68 %, o



3.2 pav. PUK mikrodalelių išėigos ir izocianatogrupių kiekio priklausomybė nuo reakcijos temperatūros (t = 90 min., [PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1: (0,50:0,50)).

izocianatogrupių skaičius sumažėjo nuo 8,0 iki 5,2 %. Tuo tarpu, didinant reakcijos temperatūrą, pastebėta, kad PUK mikrodalelių išėiga ir izocianatogrupių kiekis kinta labiau, nei nuo reakcijos trukmės. Padidinus reakcijos temperatūrą nuo 70 iki 90 °C, PUK mikrodalelių išėiga išaugo nuo 55 iki 68 %, o izocianatogrupių kiekis praktiškai nepakito: sumažėjo nuo 7,9 iki 7,3 % (3.2 pav.). Toliau padidinus reakcijos temperatūrą iki 110 °C, polimero

išeiga praktiškai nekito, o izocianatograpių kiekis sumažėjo iki 2,5 %. Literatūros šaltinyje [286] autoriai teigia, kad, esant aukštomis temperatūroms ($T \approx 125 \text{ }^\circ\text{C}$), TDI molekulėje metilgrupės atžvilgiu *orto* ir *para* padėtyse esančių izocianatograpių reakcijų greičiai suvienodėja, todėl lengviau vyksta susiuvimo reakcijos, dėl ko sumažėjo izocianatograpių kiekis.

Apibendrinant, būtų galima priėti išvados, kad, sintetinant PUK mikrodaleles, svarbu atsižvelgti į pradinius medžiagų molinius santykius ir reakcijos temperatūrą. Esant aukštai reakcijos temperatūrai, gali vykti greitesnis susiuvimas. Optimalios sintezės sąlygos gautos, kai pradinis PVA ir izocianatų mišinio molinis santykis yra 1:(0,75:0,25), reakcijos trukmė – 90 min. ir temperatūra – 90 °C.

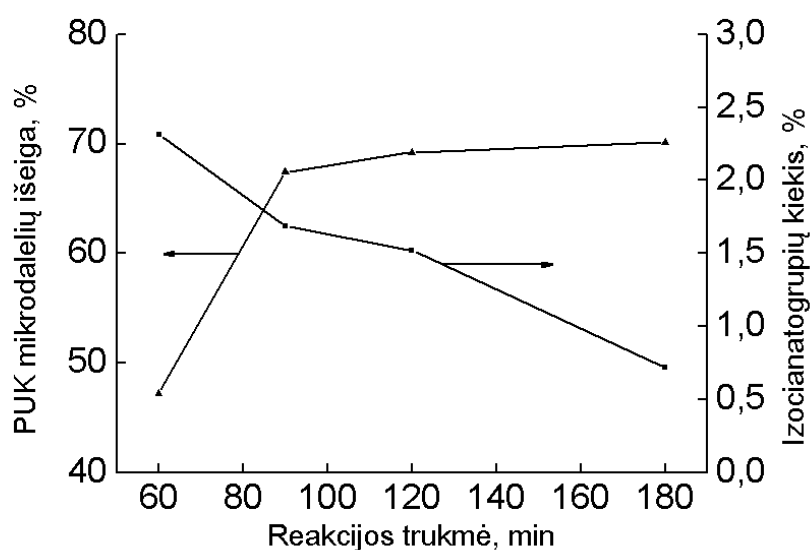
3.1.2 PUK mikrodalelių sintezė iš PVA ir IPDI

PUK mikrodalelės susintetintos iš PVA ir IPDI dimetilsulfoksido ir vandens tirpale (DMSO/H₂O = 99/1 tūrio %), kai PVA molinė koncentracija yra 0,06 M. Mažinant PVA pradinę molinę koncentraciją, PUK mikrodalelės nesusidarė, o ją didinant, gaunasi gelis. PUK mikrodalelės susintetintos keičiant pradinį PVA ir IPDI molinį santykį nuo 1:2 iki 1:4. Toliau didinant

3.2 lentelė. PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, išeiga ir funkcinių grupių kiekis (t = 90 min., T = 90 °C)

Nr.	[PVA]:[IPDI]	PUK išeiga (%)	NCO grupių kiekis (%)	OH grupių kiekis (%)
1	1:2,0	49	0,6	11,6
2	1:2,5	53	1,3	10,5
3	1:3,0	62	1,5	8,1
4	1:3,5	67	1,6	7,3
5	1:4,0	67	1,7	6,8

IPDI kiekį PVA atžvilgiu, susidaro gelis. Iš 3.2 lentelėje pateiktų PUK mikrodalelių išeigos ir funkcinių grupių kiekio rezultatų matyti, kad jie priklauso nuo pradinio PVA ir IPDI molinio santykio. Keičiant jį nuo 1:2 iki 1:4, gauta, kad PUK mikrodalelių išeiga didėja nuo 49 iki 67 %, izocianatograpių kiekis – nuo 0,6 iki 1,7 %, o hidroksigrapių kiekis sumažėja nuo 11,6 iki 6,8 %. Manoma, kad PUK išeiga didėja, nes, esant diizocianato pertekliui, daugiau susiformuoja karbamidinių grandžių, tačiau lieka ir laisvų izocianatograpių. Vykiant PUK mikrodalelių sintezę, kai PVA ir IPDI molinis santykis 1:4 ir keičiant reakcijos trukmę (3.3 pav.) arba temperatūrą (3.4 pav.), gauta, kad PUK mikrodalelių išeiga ir izocianatograpių kiekis taip pat kito. Ilginant pradinę reakcijos trukmę nuo 60 iki 90 min. (3.3 pav.), PUK

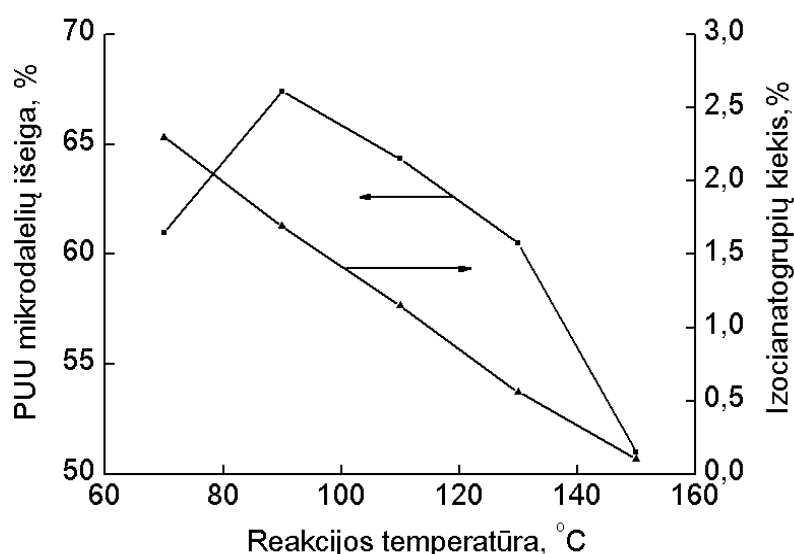


3.3 pav. PUK mikrodalelių išeigos ir izocianatograpių kiekio priklausomybė nuo reakcijos trukmės ($T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$), $[\text{PVA}]:[\text{IPDI}] = 1:4$).

mikrodalelių išeiga padidėjo nuo 47 iki 67 %, o izocianatograpių kiekis sumažėjo nuo 2,3 iki 1,7 %. Pailginus trukmę iki 180 min., išeiga nežymiai padidėjo iki 70 %, o izocianatograpių kiekis dar labiau sumažėjo iki 0,72 %. Todėl manoma, kad ilginant reakcijos trukmę virš 90 min., PUK mikrodalelėse labiau vyksta tinklinimosi reakcijos. Apibendrinus sintezės rezultatus, prieita

išvados, kad tikslingiausia reakcija vykdyti 90 min., nes toliau nedidėja PUK mikrodalelių išeiga, o izocianatograpių kiekis labai sumažėja.

Didinant pradinę reakcijos temperatūrą nuo 70 iki 90 °C, PUK mikrodalelių išeiga didėja nuo 61 iki 67 %, o izocianatograpių kiekis sumažėja nuo 2,2 iki 1,7 % (3.4 pav.). Toliau didinant reakcijos temperatūrą iki 150 °C, PUK mikrodalelių išeiga sumažėjo iki 51 %, o izocianatograpių kiekis – iki 0,1 %. Esant aukštai reakcijos temperatūrai ($T \geq 100$ °C), izocianatograpių reakingumai tampa panašūs [19, 28], ir abi grupės turi vienodas galimybes dalyvauti reakcijoje su PVA hidroksigrupe ar vandens molekule, susidarant uretano ar karbamido ryšiams. Žinoma, [19, 28], kad esant erdviniams trukdžiams šalia PVA hidroksigrupės, reakcija lengviau vyksta tarp jos ir IPDI



3.4 pav. PUK mikrodalelių išeigos ir izocianatograpių kiekio priklausomybė nuo reakcijos temperatūros ($t = 90$ min., $[PVA]:[IPDI] = 1:4$).

pirminės izocianatograpių, o ne antrinės. Esant aukštai temperatūrai, prasideda dalinis arba visas vandens išgaravimas, o vanduo reakcijos sistemoje naudojamas, kad susidarytų karbamidiniai ryšiai ir tuo pačiu metu atlieka porodario vaidmenį. Todėl, išgaravus vandeniui, negali susidaryti polikarbamidinės grandinės ir sumažėja PUK išeiga.

Apibendrinant, galima teigti, kad PUK mikrodalelių išeiga ir izocianatograpių kiekis, kaip ir ankstesniame skyriuje aprašytų tyrimų atveju, priklauso nuo pradinių reakcijos sąlygų. Didžiausia išeiga gauta, esant 90 °C temperatūrai ir optimaliai 90 min. trukmei. Tuo tarpu, didžiausias izocianatograpių kiekis PUK mikrodalelėse gaunamas esant trumpiausiai reakcijos trukmei.

3.1.3 PUK mikrodalelių sintezė iš PVA ir HMDI

PUK mikrodalelės taip pat susintetintos iš PVA ir HMDI dimetilsulfoksido ir vandens tirpale (DMSO/H₂O = 99/2 tūrio %), kai PVA molinė koncentracija yra 0,06 M. Tik esant šiai koncentracijai galima gauti PUK mikrodaleles, keičiant PVA ir HMDI pradinį molinį santykį nuo 1:2 iki 1:6. Toliau didinant HMDI kiekį pradiniam mišinyje, susidaro gelis. 3.3 lentelėje pateikti PUK mikrodalelių išeigos ir funkcinių grupių kiekių

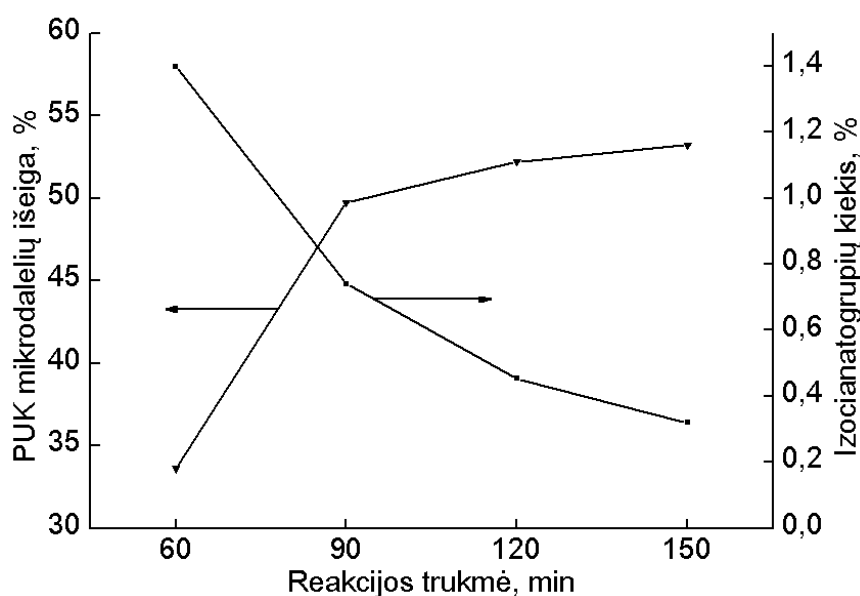
3.3 lentelė. PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, išeiga ir funkcinių grupių kiekis (t = 90 min., T = 90 °C)

Nr.	[PVA]:[HMDI]	PUK išeiga (%)	NCO grupių kiekis (%)	OH grupių kiekis (%)
1	1:2	38	0,2	2,6
2	1:3	50	0,7	1,2
3	1:4	54	0,5	0,9
4	1:5	55	0,3	0,3
5	1:6	55	0,2	2,9

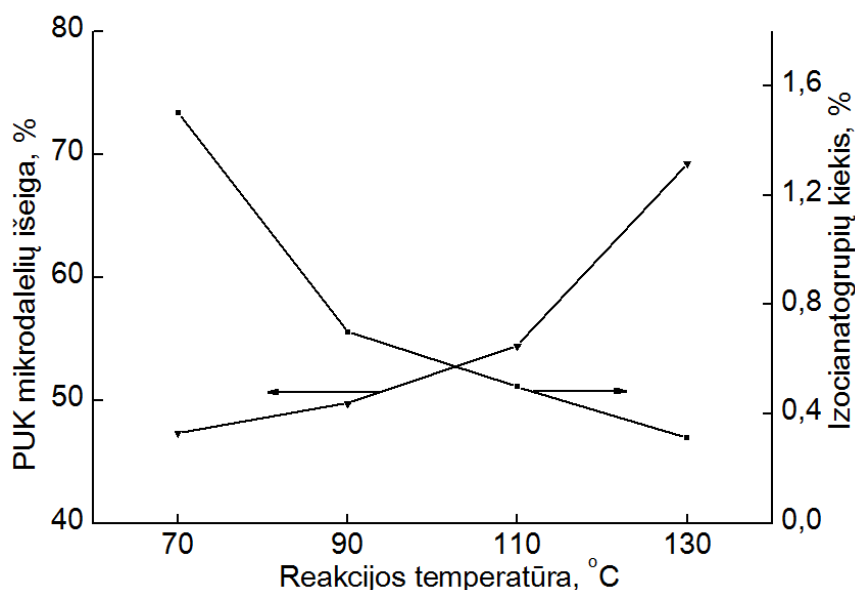
rezultatai, gauti keičiant PVA ir HMDI pradinius molinius santykius. Mikrodalelių išeiga, didinant HMDI kiekį, didėjo nuo 38 iki 55 %. Tuo tarpu, izocianato- ir hidroksigrapių kiekių kitimas yra sudėtingesnis. Kai PVA:HMDI = 1:2, izocianatograpių kiekis yra 0,2 %, o kai 1:3, gautas didžiausias

izocianatograpių kiekis – 0,7 %. Toliau didinant HMDI kiekį pradiname mišinyje izocianatograpių kiekis mažėja, kai santykis yra 1:6, jų yra tik 0,2 %. Didinant HMDI kiekį pradiname mišinyje PVA: HMDI nuo 1:2 iki 1:5, hidroksigrapių kiekis mažėja nuo 2,6 iki 0,3 %, tačiau, esant PVA ir HMDI santykiui 1:6 – vėl padidėja ir yra 2,9 %. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, nuspręsta reakcijos trukmės (3.5 pav.) ir temperatūros (3.6 pav.) įtaką PUK mikrodalelių išeigai ir izocianatograpių kiekiui tirti, esant PVA ir HMDI pradiniam moliniam santykiui 1:3. Pailginus reakcijos trukmę nuo 60 iki 90 min., PUK mikrodalelių išeiga padidėjo nuo 34 iki 50 %, o, toliau ilginant trukmę iki 150 min., išeiga padidėjo nežymiai iki 53 %. Didžiausias izocianatograpių kiekis PUK mikrodalelėse gautas, kai reakcijos trukmė yra 60 min. ir siekia 1,4 %. Ilginant reakcijos trukmę, šių grupių kiekis sumažėja iki 0,3 %. Kadangi, ilginant reakcijos trukmę nuo 90 iki 180 min., išeiga praktiškai nekinta, o izocianatograpių kiekis šiek tiek sumažėja, galima daryti prielaidą, kad PUK mikrodalelėse vyksta susiuvimas.

PUK mikrodalelių išeigai ir izocianatograpių kiekiui reakcijos temperatūra daro didesnę įtaką nei reakcijos trukmė, kaip ir sintezei naudojant



3.5 pav. PUK mikrodalelių išeigos ir izocianatograpių kiekio priklausomybė nuo reakcijos trukmės ($T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{PVA}]:[\text{HMDI}] = 1:3$).



3.6 pav. PUK mikrodalelių išeigos ir izocianatogrūpių kiekio priklausomybė nuo reakcijos temperatūros ($t = 90$ min, $[PVA]:([HMDI]) = 1:3$).

kitus diizocianatus (3.1.1 ir 3.1.2). Keliant reakcijos temperatūrą nuo 70 iki 130 °C, PUK mikrodalelių išeiga didėja nuo 47 iki 69 %, o izocianatogrūpių kiekis sumažėja nuo 1,5 iki 0,3 % (3.6 pav.). Be to, 130 °C temperatūra yra ribinė, nes pradeda formuotis gelis, o, padidinus reakcijos temperatūrą bent 10 °C, susidaro kieta masė. Esant žemai temperatūrai, HMDI izocianatogrūpės reakcijos greičiai su hidroksigrūpėmis ar vandeniu yra maži [287], tačiau, keliant temperatūrą, jų reaktingumas didėja.

Apibendrinant gautus rezultatus, būtų galima priėti išvados, kad, sintetinant PUK mikrodaleles iš PVA ir HMDI, svarbu atsižvelgti į pradinis medžiagų molinius santykius, reakcijos trukmę ir temperatūrą. Didžiausia PUK mikrodalelių išeiga ir mažiausias izocianatogrūpių kiekis gaunamas esant maksimaliai reakcijos temperatūrai. Įvertinus visas aplinkybes, galima teigti, kad optimaliausios sintezės sąlygos yra pasiekiamos, kai PUK mikrodalelės sintetamos iš PVA ir HMDI, esant moliniam santykiui 1:3, reakcijos trukmė yra 90 min., o temperatūra – 90 °C.

Apibendrinant PUK mikrodalelių sintezę iš PVA ir įvairių diizocianatų, pastebėti bendri dėsningumai. Didžiausios PUK išeigos ir didžiausi izocianatograpių kiekiai gauti, esant didesniai diizocianatų pertekliui PVA atžvilgiu: PUK mikrodaleles sintetinant iš PVA ir diizocianatų mišinio, [PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1:(0,75:0,25), o, sintetinant iš PVA ir IPDI, – 1:4. Tačiau, sintezei naudojant PVA ir HMDI, didžiausia išeiga gaunama esant moliniam santykiui 1:6, o izocianatograpių kiekis – kai santykis 1:3.

Keičiant PUK sintezės trukmę, gauta, kad didžiausios išeigos ir mažiausias izocianatograpių kiekis gaunamas esant ilgiausiai reakcijos trukmei, o, esant 60 min trukmei, gaunama mažiausia išeiga ir didžiausias izocianatograpių kiekis. PUK mikrodalelių mažiausios išeigos ir didžiausi izocianatograpių kiekiai gauti, esant 70 °C temperatūrai, o didžiausios išeigos ir mažiausi izocianatograpių kiekiai – esant maksimalioms temperatūroms. Tačiau, sintetinant PUK mikrodaleles iš PVA ir IPDI, didžiausia išeiga gauta, kai reakcijos temperatūra yra 90 °C.

Šio darbo tikslas yra susintetinti PUK mikrodaleles, kurios labiausiai tiktų fermentui imobilizuoti. Dėl šios priežasties iš 3.1 skyriuje gautų rezultatų negalima galutinai teigti, kad tam tikros sintezės sąlygos yra geresnės už kitas, nes nuo jų taip pat priklauso PUK mikrodalelių paviršiaus plotas, dalelių dydis ir izocianatograpių kiekis, o nuo to priklauso ir fermento imobilizavimo efektyvumas bei imobilizuotų preparatų stabilumas. Tačiau, apžvelgus rezultatus, galima pastebėti, kad, esant 90 min. reakcijos trukmei ir 90 °C temperatūrai, gaunamos optimalios PUK mikrodalelių išeigos ir pakankamas izocianatograpių kiekis, kai:

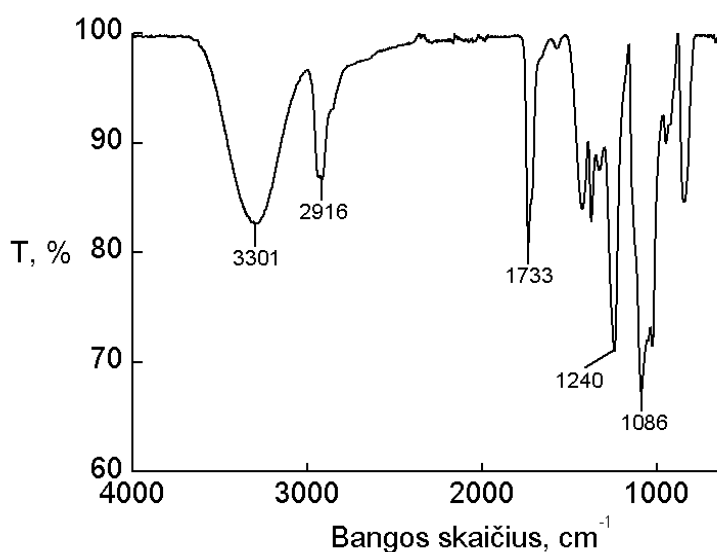
- [PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1:(0,75:0,25), q = 72 %, NCO = 9,1 %;
- [PVA]:[IPDI] = 1:4, q = 67 %, NCO = 1,7 %;
- [PVA]:[HMDI] = 1:3, q = 50 %, o NCO = 0,7 %.

3.2 PUK mikrodalelių tyrimas

3.2.1 PUK mikrodalelių sandaros tyrimas

PUK mikrodalelių struktūra buvo įrodyta remiantis FT-IR spektrais ir elementine analize. BMR analizė negalima, nes gautos PUK mikrodalelės dėl susiūtos struktūros yra netirpios. Nustatyta, kad susintetintų PUK mikrodalelių FT-IR spektruose yra smailės, kurios būdingos tam tikroms PUK sandaroje esančioms grupėms [288].

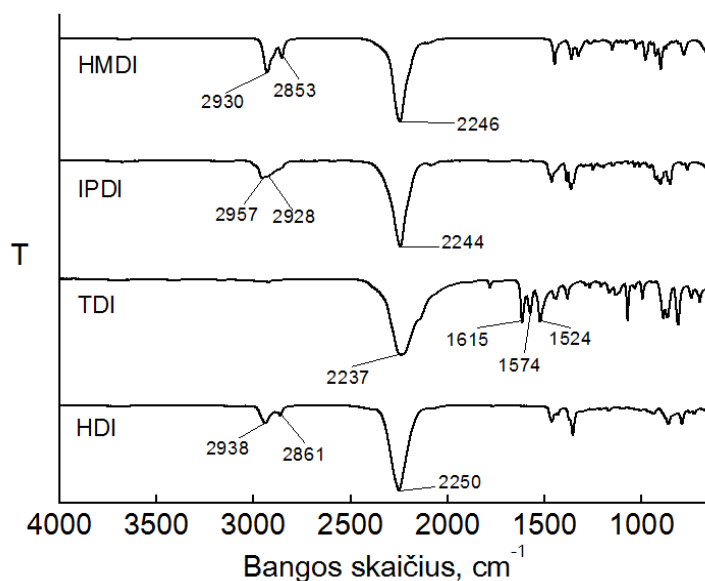
PVA FT-IR spektre (3.7 pav.) yra $\nu(\text{OH})$ grupės virpesiams būdinga sugerties juostos smailė ties 3301 cm^{-1} , alkilgrupių C-H virpesiams būdinga juosta su smaile ties 2916 cm^{-1} , karbonilgrupės (iš PVA vinilacetatinių grandžių) – ties 1733 cm^{-1} ir C-O-C grupės – ties 1086 cm^{-1} [289]. Visų diizocianatų FT-IR spektruose (3.8 pav.) stebima izocianatogrupei būdinga



3.7 pav. PVA FT-IR spektras.

sugerties juostos smailė ties $2237\text{--}2250\text{ cm}^{-1}$, alifatinių diizocianatų alkilgrupėms būdingos sugerties smailės ties $2853\text{--}2931\text{ cm}^{-1}$. Aromatinio diizocianato (TDI) spektre nėra būdingų juostų alifatinių angliavandenilių alkilgrupėms, tačiau matyti dvigubųjų ryšių (C=C) sugerties juostos smailė ties

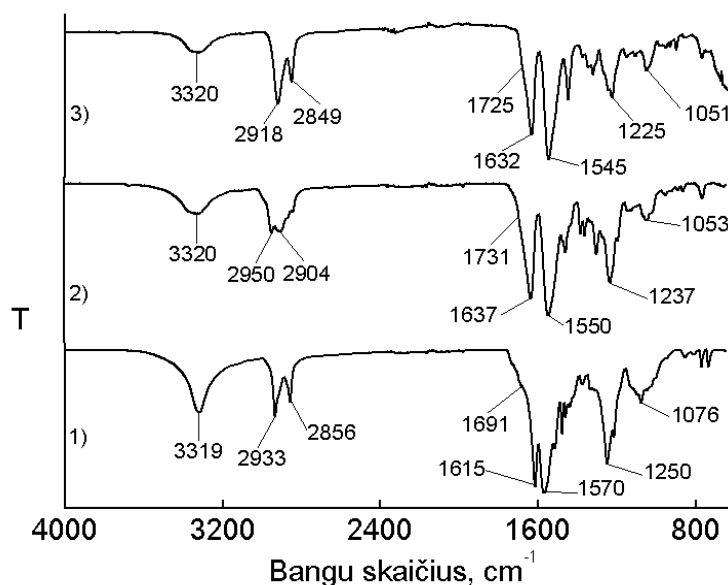
1615, 1574 ir 1524 cm^{-1} . Susintetintų dalelių (3.9 pav.) FT-IR spektrai patvirtina PUKsusidarymą, nes PVA spektre esanti labai plati sugerties juosta nuo 3650 iki 3000 cm^{-1} , kuri priskiriama OH grupei (3.7 pav.), susiaurėja ir yra nuo 3650 iki 3150 cm^{-1} su smaile ties 3319 arba 3320 cm^{-1} , kuri būdinga –NH ir –OH grupių virpesiams (3.9 pav.). PUK FT-IR spektre nematyti izocianatogrupėms būdingų smailių ties 2237, 2246 ar 2250 cm^{-1} , nes likusios laisvos izocianatogrupės sureaguoja su atmosferos drėgme saugojimo metu arba su vandeniu, atliekant liofilizavimo procesą. Analizuojant PUK mikrodalelių FT-IR spektrus, rasta hidroksi-, amino-, uretano ir karbamido grupėms būdingos juostos [288]. Mikrodalelių, kurios gautos, sintezei naudojant PVA ir įvairius diizocianatus, FT-IR spektruose matomos smailės (3.9 pav): alkilgrupių (C-H) virpesių – ties 2933 ir 2856 cm^{-1} (3.9 pav. 1) arba 2950 ir 2904 cm^{-1} (3.9 pav. 2), arba 2918 ir 2849 cm^{-1} (3.9 pav. 3); karbamido – ties 1615 (3.9 pav. 1) arba 1637 (3.9 pav. 2), arba 1632 cm^{-1}



3.8 pav. Diizocianatų FT-IR spektrai.

(3.9 pav. 1); amido II (δ N-H, ν C=N) – ties 1570 (3.9 pav. 1) arba 1550 (3.9 pav. 2), arba 1545 cm^{-1} (3.9 pav. 3); amido III (kitos rūšies δ N-H, ν C=N)

– ties 1250 (3.9 pav. 1) arba 1237 (3.9 pav. 2), arba 1225 cm^{-1} (3.9 pav. 3);



3.9 pav. PUK mikrodalelių FT-IR spektrai: 1 – [PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1:(0,75:0,25); 2 – [PVA]:[IPDI] = 1:4; 3 – [PVA]:[HMDI] = 1:3 (t = 90 min., T = 90 °C).

C-O-C grupės virpesiai – ties 1076 (3.9 pav. 1) arba 1053 (3.9 pav. 2), arba 1050 cm^{-1} (3.9 pav. 3). Ties 1691 (3.9 pav. 1) arba 1731 (3.9 pav. 2) ir 1725 cm^{-1} (3.9 3 pav.) yra vos pastebimos smailės, kurios priskiriamos uretano karbonilgrupei [288].

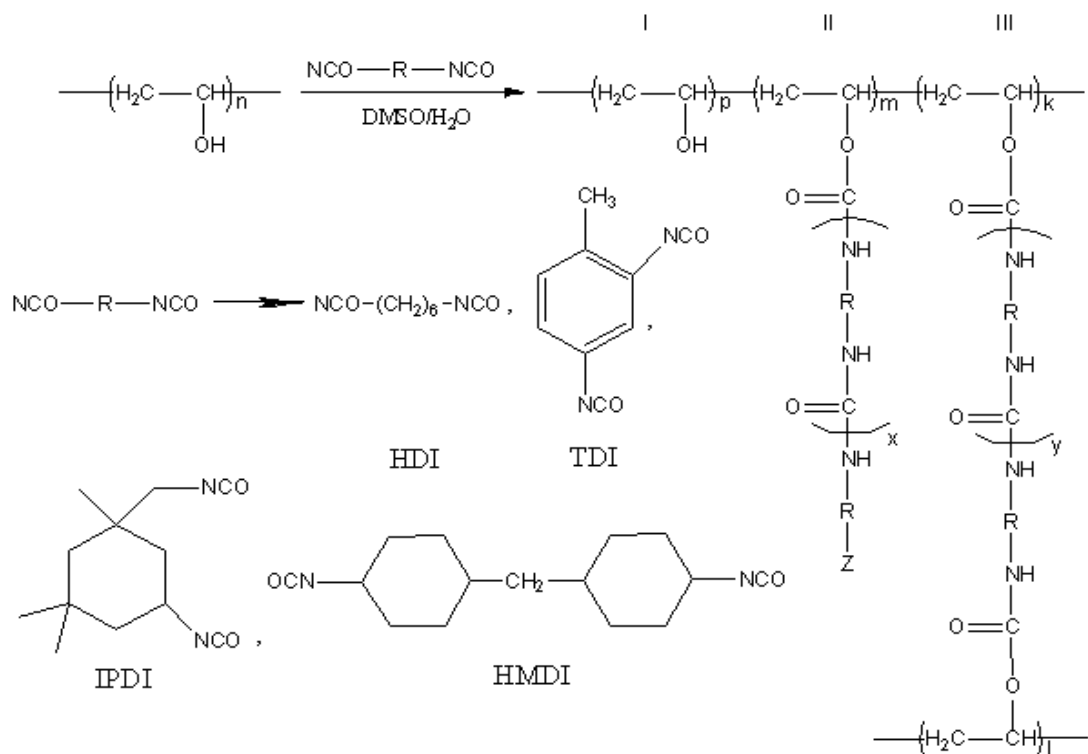
PUK sandaroje esančios uretano ir karbamido grupės yra linkusios sudaryti vandenilinius ryšius, dėl kurių poveikio šių grupių smailės pasislenka į mažesnių bangų skaičių pusę [290]. Vandeniliniai ryšiai PUK gali susidaryti tarp dviejų tipų donorų (uretano N-H ir karbamido N-H grupių) ir trijų tipų protonų akceptorių (uretano C=O, karbamido C=O ir C-O-C) grupių. Karbamido ir uretano grandys gali sudaryti skirtingą vandenilinių ryšių skaičių, nes karbamido grandyje yra viena karbonil- ir dvi aminogrupės, o uretano grandyje yra tik viena amino- ir karbonilgrupė [290]. Buvo nustatyta, kad, karbamidui nesudarant vandenilinių ryšių, FT-IR spektre karbonilgrupės smailė randasi ties 1691 cm^{-1} , o, didėjant vandenilinių ryšių skaičiui,

pasislenka į mažesnius bangų skaičius [290]. PUK sintezės metu didinant diizocianato kiekį PVA atžvilgiu, FT-IR spektruose pastebimas nežymus ($\approx 1 \text{ cm}^{-1}$) karbamido karbonilgrupės poslinkis link žemesnių bangų skaičių, o tai reiškia, kad susidaro daugiau vandenilinių ryšių. Naudojantis FT-IR metodu, lengva nustatyti ir atskirti uretano karbonilgrupės smailes nuo karbamido karbonilgrupės.

Galutiniam PUK mikrodalelių sandaros patvirtinimui buvo atlikta elementinė analizė (3.4 lentelė). Nustatyta, kad, nepriklausomai nuo naudoto pradinio diizocianato (DI), azoto ir anglies kiekis PUK visais atvejais didėja,

3.4 lentelė. PUK mikrodalelių elementinė sudėtis

Nr.	[PVA]:[DI]	Anglies kiekis (%)	Azoto kiekis (%)	Vandenilio kiekis (%)
[PVA]:([HDI]:[TDI])				
1	1:(0,25:0,25)	56,8	10,9	8,6
2	1:(0,35:0,35)	57,3	12,5	8,6
3	1:(0,50:0,50)	57,3	12,6	8,4
4	1:(0,40:0,60)	57,7	13,0	8,5
5	1:(0,75:0,25)	57,4	13,9	8,7
[PVA]:[IPDI]				
6	1:2,0	62,7	11,4	9,7
7	1:2,5	63,1	11,7	9,8
8	1:3,0	63,7	12,2	9,9
9	1:3,5	63,8	12,4	9,9
10	1:4,0	63,9	12,7	10,0
[PVA]:[HMDI]				
11	1:2	67,2	10,2	9,9
12	1:3	68,0	10,7	9,9
13	1:4	67,9	10,8	10,0
14	1:5	67,9	10,8	10,0
15	1:6	67,8	10,9	10,0



3.1 schema. PUK mikrodalelių sintezė ir struktūra (Z = NCO arba NH₂).

didinant diizocianatų kiekį pradinuose mišiniuose. Galima teigti, kad azoto ir anglies dalis PUK mikrodalelėse gali didėti, daugėjant uretano ir karbamido grandžių kiekiui. Tačiau sintetinant PUK daleles iš PVA ir HMDI, matyti, kad anglies ir azoto kiekis nežymiai padidėja, pakeitus pradinį santykį nuo 1:2 iki 1:3, o, toliau didinant HMDI kiekį, nedidėja. Tačiau, esant santykiui 1:6, nežymiai vėl padidėja azoto, bet sumažėja anglies kiekis. Šiuo atveju, kaip buvo minėta 3.1.3 skyriuje, prasideda želatinizacija.

Remiantis sintezės rezultatais, FT-IR spektrais ir elementine analize, 3.1 schemoje yra pateikta galima PUK mikrodalelių struktūra. Manoma, kad ją sudaro skirtingos sandaros grandys: I – hidroksietileno grandis su nesureagavusia hidroksigrupe; II – su viena laisva izocianatogrupe, kai sureaguoja viena hidroksietileno grandies hidroksigrupė su viena diizocianato izocianatogrupe, o kita laisva izocianatogrupė gali reaguoti su vandeniu, sudarydama aminogrupę, kuri momentaliai jungiasi su diizocianato izocianatogrupe, susidarant įvairaus ilgio polikarbamido grandinėms, besibaigiančioms laisva izocianato- arba aminogrupe; III – susiūtos struktūros

grandis, kuri gali susidaryti sureagavus dviem izocianatogrupėms su dviem hidroksietileno grandžių hidroksigrupėmis. Šiuo atveju tarp uretaninių grandžių gali susidaryti įvairaus ilgio polikarbamidiniai tilteliai.

Apibendrinant galima teigti, kad, PUK mikrodalelėse, nepriklausomai nuo naudoto diizocianato, esančios karbamido grandys yra sudariusios vandenilinius ryšius, nes karbamido karbonilgrupių smailės yra pasislinkusios link žemesnių verčių. Remiantis elementine analize galima teigti, kad, didinant diizocianato kiekį pradiniam mišinyje, nepriklausomai nuo naudoto diizocianato, didėja azoto ir anglies kiekiai, o tai gali reikšti, kad PUK mikrodalelėse susidaro įvairaus ilgio polikarbamidinių grandžių. Remiantis FT-IR ir elementine analize galima teigti, kad PUK struktūra yra sudaryta iš trijų skirtingų grandžių tipų.

3.2.2 Iš PVA ir įvairių diizocianatų susintetintų PUK mikrodalelių terminė analizė

Terminė analizė dažniausiai atliekama, norint išsiaiškinti medžiagų termostabilumą, kokioje temperatūroje medžiaga pradeda skilti, koks skilimo greitis, ar ji skyla vienu metu, ar pakopomis ir kokia procentinė dalis skyla, norint sužinoti jų darbinės temperatūrų ribas arba ruošiant iš tiriamos medžiagos bandinius kitiems tyrimams, kad ruošimo metu nevyktų jokie destruktiniai pokyčiai.

Šiame darbe, be terminio stabilumo, papildomai buvo įvertinta ir PUK mikrodalelių sandara.

PVA ir PUK mikrodalelių terminė analizė atlikta naudojant vienalaikės terminės analizės (STA) prietaisą.

Literatūroje [291] nurodyta, kad PVA lydymosi temperatūra yra 191,2 °C, o PVA, kuris naudotas šiame darbe, lydymosi temperatūra yra 189,3 °C. Atlikus TGA tyrimus, nustatyta, kad PVA skilimas vyksta per dvi stadijas (3.5 lentelė). Pirmoji PVA skilimo stadija prasideda 249 °C

temperatūroje (T_1), bandinio masės didžiausio kitimo greičio temperatūra (T_2) yra 309 °C. Šioje stadijoje netenkama 78 % PVA masės. Jos metu vyksta dehidratacija ir susidaro lakūs junginiai. Antroje stadijoje, kuri prasideda 427 °C temperatūroje (T_3), skyla polieno likučiai, susidarant angliai ir angliavandeniliams, o bandinio masės didžiausio kitimo greičio temperatūra yra 481 °C (T_4). Šios stadijos metu netenkama apie 11 % masės [291].

Literatūroje [292] rašoma, kad PUK, kurie sudaryti iš poliolių ir diizocianatų, skilimas vyksta per 2 ar 3 stadijas, kurios priklauso nuo sintezės sąlygų. Pirmosios stadijos metu skyla kieti segmentai, sujungti uretano ir karbamido ryšiais, o vėliau pradeda skilti lankstūs segmentai, kurie sudaryti iš poliolių. Autoriai konstatuoja, kad PUK pasižymi geresniu terminiu stabilumu nei poliuretanai, nes tam įtakos turi vandeniliniai ryšiai, kurių karbamido grandys gali sudaryti daugiau, nei uretano [292].

PUK mikrodalelių skilimas yra sudėtingesnis, negu PVA, ir priklauso nuo naudoto diizocianato (DI) ir jo pradinio molinio santykio su PVA (3.5 lentelė).

Iš 3.5 lentelėje (Nr. 2-6) pateiktų rezultatų matyti, kad PUK skilimas vyksta per 2 stadijas. Kai PUK mikrodalelės susintetintos iš PVA ir HDI-TDI mišinio, esant PVA:(HDI:TDI) moliniam santykiui 1:(0,25:0,25), 1:(0,35:0,35) arba 1:(0,50:0,50) (3.10 pav., 3.5 lentelė, Nr. 2, 3 ir 5), tai yra padidinus diizocianatų kiekį PVA atžvilgiu, sumažėja pirmosios skilimo stadijos pradžios temperatūra (T_1) nuo 221 iki 202 °C, tačiau pirmosios skilimo stadijos didžiausio kitimo greičio temperatūra (T_2) padidėja nuo 282 iki 301 °C. Didinant HDI kiekį diizocianatų mišinyje, T_1 didėja, o T_2 kinta netolygiai (3.5 lentelė, Nr.4-6). Be to, esant santykiui 1:(0,50:0,50) ir 1:(0,75:0,25), PUK skilimas yra sudėtingesnis, nes pirmoji skilimo stadija pasidalija į du etapus (3.5 lentelė, Nr. 5 ir 6, 3.10 pav. B). Naudojant daugiau HDI, T_2^b yra aukštesnė. Pirmajame etape masės netektis yra atitinkamai 66 ir 56 %, o antrajame – 15 ir 26 %. Masės netektis 2-4 atvejais (3.5 lentelė) yra 72-78 %. Todėl daroma prielaida, kad, reakcijos mišinyje esant mažesniai diizocianatų

3.5 lentelė. PVA ir PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA bei įvairių diizocianatų, termogravimetrinių tyrimų rezultatai

Nr	[PVA]:[DI]	Pirma skilimo stadija					Antra skilimo stadija		
		T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	Δm (%)	T ₂ ^b (°C)	Δm, %	T ₃ (°C)	T ₄ (°C)	Δm (°C)
1	PVA	249	309	78	-	-	427	481	11
[PVA]:([HDI]:[TDI])									
2	1:(0,25:0,25)	221	282	72	-	-	443	482	18
3	1:(0,35:0,35)	214	299	78	-	-	452	486	14
4	1:(0,40:0,60)	200	293	77	-	-	450	486	12
5	1:(0,50:0,50)	202	301	66	328	15	464	504	11
6	1:(0,75:0,25)	212	291	56	334	26	466	506	10
[PVA]:[IPDI]									
7	1:2,0	247	300	-	352	90	428	453	7
8	1:2,5	247	301	-	352	90	428	453	7
9	1:3,0	247	302	-	355	89	427	453	6
10	1:3,5	247	304	-	354	90	430	454	7
11	1:4,0	247	305	-	354	90	430	453	6
[PVA]:[HMDI]									
12	1:2	252	291	-	351/363	79	475	495	17
13	1:3	282	311	-	349/365	74	469	487	20
14	1:4	269	313	-	357	74	476	495	18
15	1:5	273	312	-	360	77	472	492	18
16	1:6	275	313	-	360	74	477	498	19

T₁ – Pirmosios skilimo stadijos pradžios temperatūra;

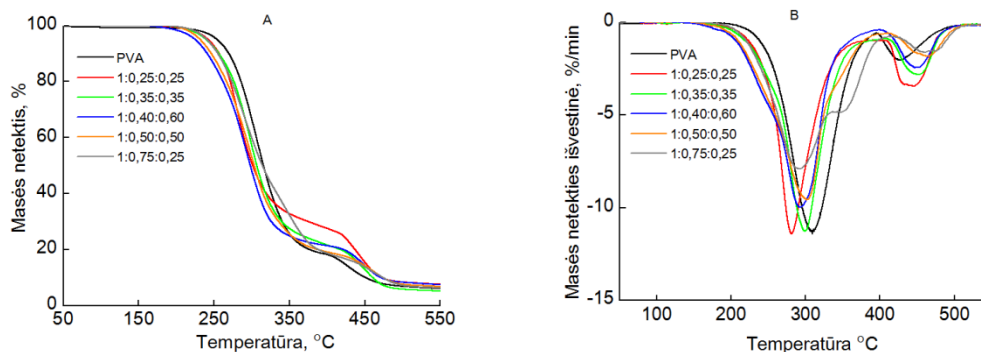
T₂ – bandinio masės didžiausio kitimo greičio temperatūra pirmosios skilimo stadijos I etape;

T₂^b – bandinio masės didžiausio kitimo greičio temperatūra pirmosios skilimo stadijos II etape;

T₃ – antrosios skilimo stadijos bandinio masės didžiausio kitimo greičio temperatūra;

T₄ – antrosios skilimo stadijos galinė temperatūra;

Δm – masės netektis.

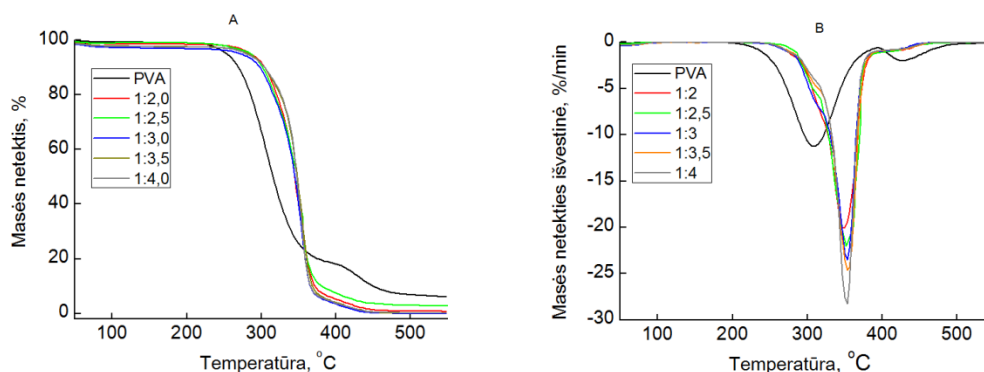


3.10 pav. PVA ir PUK mikrodalelių susintetintų iš PVA ir HDI bei TDI mišinio ($t = 90$ min, $T = 90$ °C) TGA (A) ir DTGA (B) kreivės.

kiekiui (3.5 lentelė, Nr. 2 ir 3) arba esant mažesniai HDI kiekiui (3.5 lentelė, Nr. 4), pirmosios stadijos I etape skyla susidarę uretaniniai ir trumpesnių polikarbamidinių grandinių ryšiai. Esant didesniai HDI kiekiui (3.5 lentelė, Nr. 5 ir 6), susidaro tvarkingesnės vandenilniais ryšiais stabilizuotos karbamidinės grandinės, kurios skyla pirmos stadijos II etape.

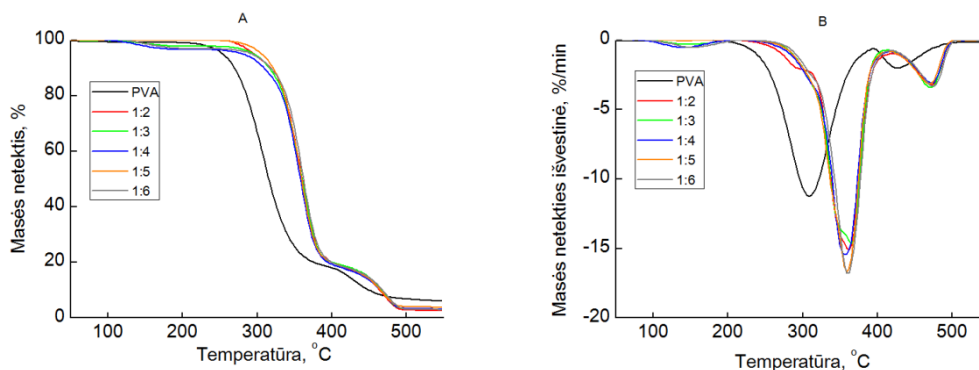
Tiriant PUK mikrodaleles, kurios susintetintos iš PVA ir IPDI (3.5 lentelė, Nr. 7-11, 3.11 pav.), matyti, kad pirmoji skilimo stadija prasideda 247 °C temperatūroje (T_1), o pirmo etapo didžiausio masės kitimo greičio temperatūra T_2 yra 300-305 °C, tuo tarpu antro etapo T_2^b yra 352-355 °C ir yra 40-46 °C didesnė už PVA pirmosios stadijos didžiausio masės kitimo greičio temperatūrą. Pirmosios skilimo stadijos metu netenkama 89-90 % masės, nepriklausomai nuo pradinių medžiagų santykio. Iš DTGA kreivių (3.11 pav. B) galima konstatuoti, kad pirmoji skilimo stadija yra sudaryta iš dviejų etapų, nors TGA kreivėse (3.11 pav. A) jų neįmanoma išskirti. Pirmosios skilimo stadijos pirmasis etapas yra 247-325 °C temperatūrų ribose, o maksimalaus skilimo greičio temperatūra (T_2) yra apie 300-305 °C. Manoma, kad pirmame etape pirmiausia skyla uretaniniai ir trumpesnių grandinių karbamidiniai ryšiai, o antrame etape – ilgesnių polikarbamidinių grandinių ryšiai.

Ištirus PUK mikrodaleles, susintetintas iš PVA ir HMDI (3.5 lentelė, Nr. 12-16, 3.12 pav.), matyti, kad pirmosios skilimo stadijos pradžios temperatūra



3.11 pav. PVA ir PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI ($t = 90$ min, $T = 90$ °C), TGA (A) ir DTGA (B) kreivės.

(T_1) yra 252-282 °C intervale, o maksimalus skilimo greitis yra 349-365 °C ribose (T_2^b). Šio skilimo metu netenkama 74-79 % masės. Iš DTGA kreivių (3.12 pav. B) matyti, kad, nepriklausomai nuo PVA ir HMDI santykio, pirmoji skilimo stadija yra sudaryta iš dviejų etapų. Pirmajame etape skilimas vyksta 252-320 °C temperatūrų intervale, o šio etapo skilimo greičio maksimumas (T_2) yra ties 291-313 °C. Pirmasis etapas ypač išryškėja analizuojant PUK mikrodaleles, susintetintas, kai $[PVA]:[HMDI] = 1:2$. Didinant HMDI



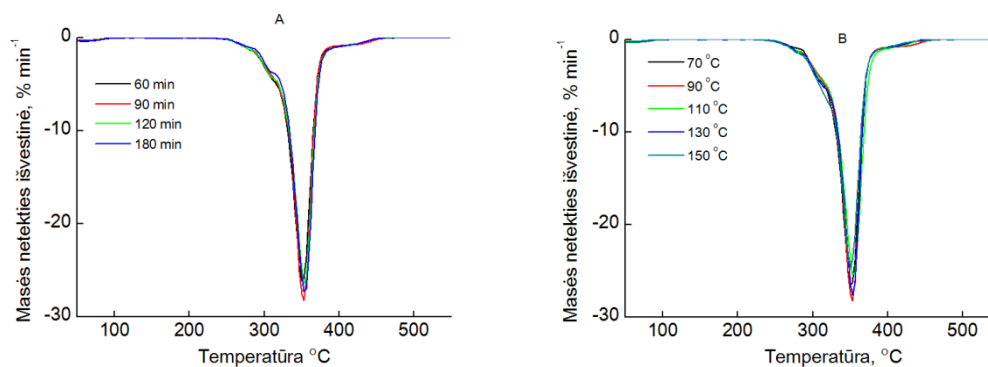
3.12 pav. PVA ir PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI ($t = 90$ min, $T = 90$ °C), TGA (A) ir DTGA (B) kreivės.

perteklių ir esant santykiui 1:6, pirmosios skilimo stadijos pirmasis etapas ne toks ryškus. Iš TGA (3.12 pav. A) rezultatų neįmanoma apskaičiuoti, kokia yra masės netektis pirmosios skilimo stadijos pirmajame etape. Manoma, kad šiame etape, kaip ir ankstesniais atvejais, skyla uretaniniai ryšiai ir trumpesnių grandinių karbamidiniai. Iš DTGA kreivių (3.12 pav. B) matyti, kad, esant PVA ir HMDI moliniam santykiui 1:2 ir 1:3, pirmosios skilimo stadijos antrame etape skilimo smailė išsiskaido į du maksimumus, kurie atitinkamai yra 351/363 ir 349/365 °C temperatūrose (T_2^b). Tačiau, padidinus HMDI kiekį PVA atžvilgiu ir esant santykiams [PVA]:[HMDI] = 1:4, 1:5 ir 1:6, pirmosios skilimo stadijos antrojo etapo smailėje yra tik vienas maksimumas ties 357 °C ir 360 °C (3.5 lentelė, Nr. 14-16). Galima teigti, kad, sintetinant PUK mikrodaleles iš PVA ir HMDI, esant mažam HMDI pertekliui, susidaro skirtingo ilgio polikarbamidinės grandinės. Trumposios skyla žemesnėse temperatūrose, o ilgesnės – aukštesnėse. Didinant HMDI kiekį PVA atžvilgiu, PUK mikrodalelėse susidaro daugiau ilgų polikarbamido grandinių, todėl pirmosios skilimo stadijos smailėje stebimas tik vienas maksimumas (T_2^b).

Geriausiu terminiu stabilumu pasižymėjo PUK mikrodalelės, susintetintos iš PVA ir HMDI, nes T_1 (252-282 °C), T_2 (291-313 °C) ir T_2^b (349-365 °C) temperatūros yra aukščiausios. Mažiau termostabilios yra PUK mikrodalelės, susintetintos iš PVA ir IPDI ($T_1 = 247$ °C, $T_2 = 300-305$ °C) ir T_2^b (352-355 °C), tačiau jų termostabilumas yra didesnis už PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI-TDI mišinio ($T_1 = 200-221$ °C, $T_2 = 282-301$ °C ir $T_2^b = 328-334$ °C). Žinoma, kad aromatiniai diizocianatai (TDI) aktyviau dalyvauja PUK sintezėje, negu alifatiniai, tačiau lengviau susidarys ryšiai lengviau ir skyla. Todėl iš PVA ir HDI-TDI mišinio gautų PUK termostabilumas yra mažesnis. Tačiau, padidinus HDI ir sumažinus TDI kiekį pradiniam HDI-TDI mišinyje, PUK stabilumas padidėja ir šalia T_2 atsiranda T_2^b temperatūra (3.5 lentelė, Nr. 5 ir 6), nes dėl mažesnių erdviųjų trukdžių susidaro tvarkingesnės vandeniliniai ryšiais stabilizuotos polikarbamidinės grandinės.

Antrosios PUK mikrodalelių skilimo stadijos, nepriklausomai nuo sintezėje naudoto diizocianato, bandinio masės didžiausio kitimo greičio temperatūra (T_3) yra didesnė už PVA. Iš PVA ir HDI-TDI mišinio bei iš PVA ir HMDI susintetintų PUK mikrodalelių, antrosios skilimo stadijos galinė temperatūra (T_4) yra didesnė už PVA galinę skilimo temperatūrą, o PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, – mažesnė. PUK mikrodalelių, antrosios skilimo stadijos masės netektis yra mažiausia. Galima teigti, kad šiose PUK mikrodalelėse lieka mažiausiai polieno grandžių likučių, dėl ko sumažėja T_3 ir T_4 , lyginant su kitomis PUK.

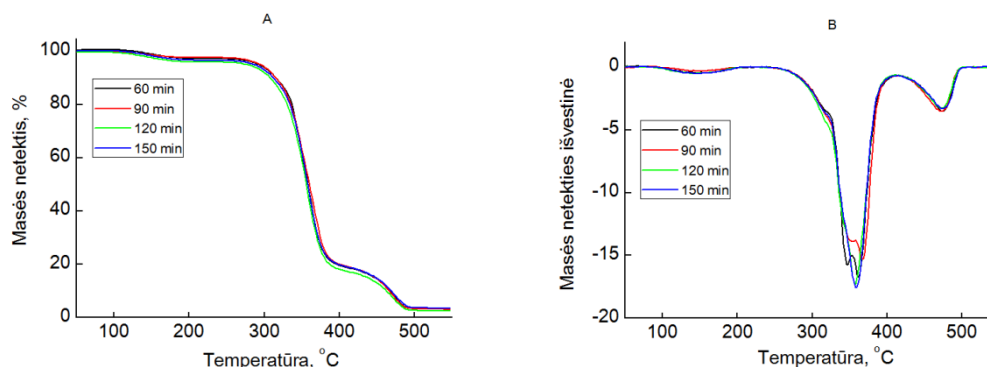
Taip pat buvo ištirta PUK sintezės trukmės ir temperatūros įtaka jų termostabilumui ir mikrodalelių sandarai. PUK, gautų iš PVA ir IPDI, TGA kreivės yra panašios. Išnagrinėjus DTGA kreives (3.13 pav.) gauta, kad, ilginant PUK sintezės trukmę nuo 60 iki 150 min., pirmosios skilimo stadijos pirmasis etapas yra nuo 247 iki 320 °C, o antrosios nuo 320 iki 368 °C, kurio T_2^b didėja nuo 353 iki 357 °C. Tai dar kartą patvirtina, kad,



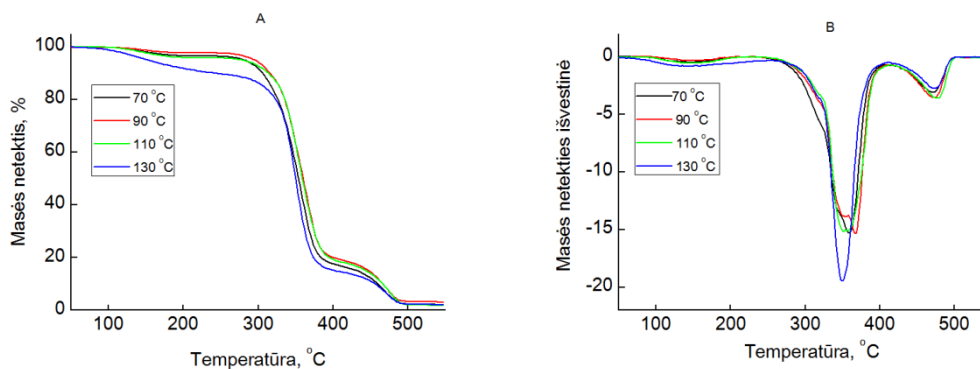
3.13 pav. PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, esant skirtingai sintezės trukmei (A) ($T = 90$ °C) arba temperatūrai (B) ($[PVA]:[IPDI] = 1:4$), DTGA kreivės.

ilginant sintezės trukmę, susiformuoja ilgesnės polikarbamidinės grandinės, kurių terminis stabilumas yra didesnis. Keliant PUK sintezės temperatūrą nuo 70 iki 130 °C, T_2^b didėja nuo 352 iki 356 °C, o, esant sintezės temperatūrai 150 °C, T_2^b sumažėja iki 352 °C (3.13 pav. B).

Išanalizavus PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, TGA ir DTGA kreives, esant skirtingai sintezės trukmei (3.14 pav.) ir temperatūrai (3.15 pav.), nustatyta, kad, nepriklausomai nuo PUK sintezės trukmės ir temperatūros, pirmosios skilimo stadijos pirmojo etapo temperatūros ribos yra



3.14 pav. PVA ir PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, esant skirtingai sintezės trukmei, ([PVA]:[HMDI] = 1:3, T = 90 °C), TGA (A) ir DTGA (B) kreivės.



3.15 pav. PVA ir PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, esant skirtingai sintezės temperatūrai, ([PVA]:[HMDI] = 1:3, t = 90 min.), TGA (A) ir DTGA (B) kreivės.

nuo 282 iki 315 °C. Tačiau pirmosios skilimo stadijos antrasis etapas priklauso nuo sintezės sąlygų. Iš DTGA kreivių (3.14 pav. B) nustatyta, kad, esant PUK sintezės trukmei 60 ir 90 min., antrojo etapo smailė yra sudaryta iš dviejų maksimumų, kurie yra atitinkamai 346 °C ir 353 °C bei 363 °C ir 368 °C

temperatūrose. Kai sintezės trukmė yra padidinama iki 150 min., skilimo smailės du maksimumai susilieja į vieną ties 359 °C. Be to, iš DTGA kreivių (3.15 pav. B) nustatyta, kad PUK, gautų, esant žemai sintezės temperatūrai (70-90 °C), skilimo tendencija yra panaši, kaip ir esant trumpai reakcijos trukmei (60-90 min.). Tačiau, pakėlus sintezės temperatūrą iki 110 °C ir 130 °C, pirmosios skilimo stadijos antrojo etapo smailė turi tik vieną maksimumą, kuris yra atitinkamai ties 356 °C ir 351 °C. Didinant reakcijos temperatūrą, susidaro trumpesnės, o, ilginant reakcijos trukmę – ilgesnės polikarbamidinės grandinės, kurios yra stabilesnės.

Apibendrinant PUK mikrodalelių terminį stabilumą, galima teigti, kad PUK mikrodalelės, nepriklausomai nuo diizocianato, skyla per 2 stadijas. Pirmoje stadijoje skyla uretaniniai ir karbamidiniai ryšiai, o antroje stadijoje – polieno likučiai. Remiantis DTGA rezultatais, nustatyta, kad skilimas yra sudėtingesnis ir priklauso nuo diizocianato ir PVA santykio, sintezės trukmės bei temperatūros. Nustatyta, kad, PUK sintezei naudojant HDI ir TDI mišinį ir didinant HDI kiekį TDI atžvilgiu, dėl mažesnių erdvinių trukdžių susidaro labiau vandenilniais ryšiais stabilizuotos polikarbamidinės grandinės, todėl pirmoji skilimo stadija dalinasi į du etapus: pirmame skyla uretaniniai ryšiai ir mažiau vandenilniais ryšiais stabilizuotos polikarbamidinės grandinės, o antrame – dėl vandenilinių ryšių tarpusavyje labiau susiglaudusios polikarbamidinės grandinės.

Taip pat nustatyta, kad, didinant IPDI kiekį PVA atžvilgiu ir ilginant sintezės trukmę didėja pirmosios skilimo stadijos maksimalaus skilimo greičio temperatūra. Keliant PUK sintezės temperatūrą nuo 70 iki 110 °C, ši temperatūra taip pat didėja, tačiau, esant maksimaliai sintezės temperatūrai (150 °C) – sumažėja dėl susidariusių trumpesnių polikarbamidinių grandinių.

Nustatyta, kad, esant mažam HMDI pertekliui PVA atžvilgiu arba trumpai reakcijos trukmei ir žemai temperatūrai, pirmosios skilimo stadijos antrojo etapo smailė turi du maksimumus. Tačiau, padidinus HMDI kiekį PVA

atžvilgiu, pailginus sintezės trukmę ar pakėlus temperatūrą, dėl susidariusių ilgesnių polikarbamidinių grandinių smailėje yra vienas maksimumas.

3.2.3 PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir įvairių diizocianatų, aktyvumo tyrimas

PUK mikrodalelių paviršiaus plotas, bendras akučių tūris, akučių plotis ir jų pasiskirstymas buvo nustatyti $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, atliekant azoto dujų izoterminę sorbcijos analizę. PUK mikrodalelių paviršiaus plotas apskaičiuojamas BET (*Brunauer-Emmett-Teller*) metodu iš dujų adsorbcijos kreivės tiesiniame intervale, kuris yra nuo 0 iki 0,3 p/p₀ [293]. Tuo tarpu, vidutinis skaitinis akučių plotis, jų tūris ir pločio pasiskirstymas yra apskaičiuojamas BJH (*Barret-Joyner-Halenda*) metodu. Šis būdas yra greitas, lengvas, o tirta medžiaga lieka neužteršta, nepakeitusi savo cheminės sudėties ir tinkama tolimesniems tyrimams. PUK mikrodalelėse akutės gali susidaryti:

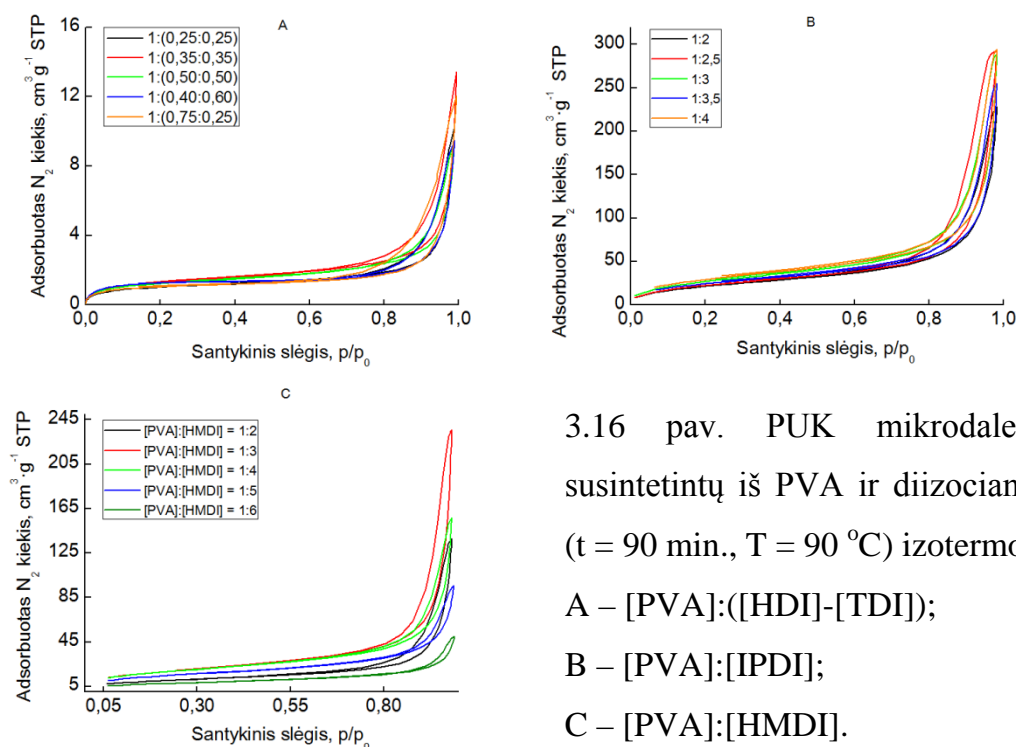
- Vykstant susiuvimo reakcijoms tarp PVA grandžių ir diizocianatų (šiuo atveju akučių dydis priklauso nuo PVA susiuvimo laipsnio ir polikarbamidinių grandinių tarp susiuvimo vietų ilgio);
- Reaguojant izocianato grupėms su reakcijos mišinyje esančiu vandeniu ir išsiskiriant anglies dioksidui.

Reakcijos metu išsiskiriant dujoms, reguliuoti akučių dydį ir jų pasiskirstymą yra sunku ar praktiškai neįmanoma, nes lakių medžiagų garavimas yra momentinis ir intensyvus, o jų išsiskyrimą reakcijos eigoje riboja masės klampa. Tačiau akučių dispersiškumas gali būti teigiama savybė, nes ne visada reikia, kad akutės medžiagose būtų monodispersiškos ir būtinai tam tikro dydžio.

PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI-TDI mišinio, IPDI arba HMDI, paviršiaus ploto, bendro akučių tūrio ir vidutinio skaitinio akučių pločio rezultatai yra pateikti 3.6 lentelėje, azoto dujų sorbcijos PUK mikrodalelėse izotermų histerezės pateiktos 3.16 pav., o akučių pločio

pasiskirstymas – 3.17 pav. Atlikus dujų adsorbcijos ir desorbcijos PUK mikrodalelėse tyrimus, buvo gautos histerezės kilpos, kurios rodo, kad dalelėse yra mezoakučių ($p/p_0 = 0,4-0,8$) ir makroakučių ($p/p_0 = 0,8-1$). Pagal IUPAC klasifikaciją, azoto dujų sorbcijos mikrodalelėse izotermas galima priskirti IV tipui, o susiformavusias histerezės kilpas – H3 tipui (3.16 pav.). Todėl galima priėti išvados, kad PUK mikrodalelės yra plokštelių pavidalo, o akutės – plyšinės.

Išanalizavus 3.6 lentelėje pateiktus duomenis, matyti, kad PUK



mikrodalelių paviršiaus plotas ir bendras akučių tūris priklauso nuo sintezei naudoto diizocianato. Šie dydžiai didėja, sintezei naudojant PVA ir HDI-TDI mišinį, po to – PVA ir HMDI, o didžiausi – PVA ir IPDI (3.6 lentelė).

Iš PVA ir HDI-TDI mišinio susintetintų PUK mikrodalelių paviršiaus plotas nepriklauso nuo pradinių PVA ir DI molinių santykių ir yra $4-5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ribose, o bendras akučių tūris – $0,012-0,021 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ribose (3.6 lentelė, Nr. 1-5). Akučių pločio pasiskirstymas yra platus, o daugiausiai yra 20-80 nm pločio

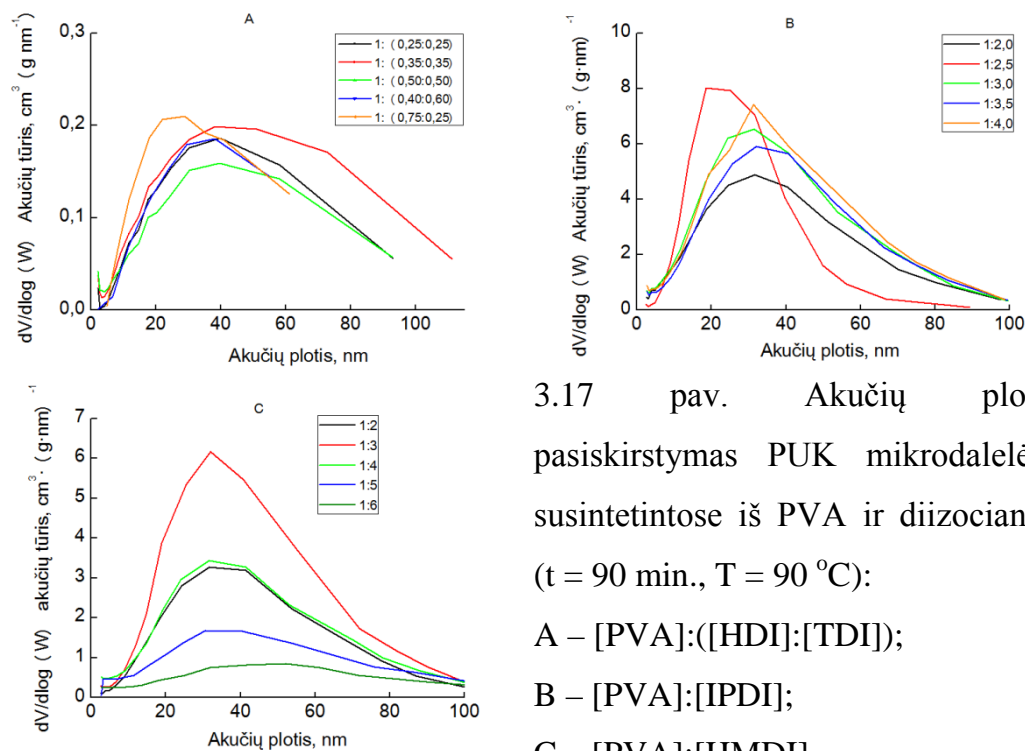
akučių (3.17 A pav.). Dominuojančios akutės yra apie 40 nm pločio. Tuo tarpu, jų vidutinis skaitinis plotis yra 15-23 nm ribose (3.6 lentelė, Nr. 1-5).

Sintetinant PUK mikrodaleles iš PVA ir IPDI bei keičiant jų pradinius molinius santykius, nustatyta, kad PUK mikrodalelėse vidutinis akučių plotis

3.6 lentelė. PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI-TDI mišinio, IPDI arba HMDI, paviršiaus plotas, bendras akučių tūris ir vidutinis plotis

Nr.	[PVA]:[DI]	Paviršiaus plotas ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Bendras akučių tūris ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Vid. skaitinis akučių plotis (nm)
[PVA]:([HDI]:[TDI])				
1	1:(0,25:0,25)	4	0,016	21
2	1:(0,35:0,35)	5	0,021	20
3	1:(0,50:0,50)	5	0,015	15
4	1:(0,40:0,60)	5	0,012	23
5	1:(0,75:0,25)	4	0,017	21
[PVA]:[IPDI]				
6	1:2,0	83	0,36	16
7	1:2,5	88	0,45	18
8	1:3,0	94	0,45	16
9	1:3,5	104	0,45	18
10	1:4,0	113	0,46	17
[PVA]:[HMDI]				
11	1:2	38	0,22	21
12	1:3	68	0,37	22
13	1:4	67	0,24	16
14	1:5	54	0,08	14
15	1:6	28	0,08	14

kinta nuo 16 iki 18 nm ir nepriklauso nuo pradinio PVA ir IPDI molinio santykio. Keičiant PVA ir IPDI pradinį molinį santykį nuo 1:2 iki 1:4, PUK



3.17 pav. Akučių pločio pasiskirstymas PUK mikrodalelėse, susintetintose iš PVA ir diizocianatų ($t = 90 \text{ min.}$, $T = 90 \text{ }^\circ\text{C}$):
 A – [PVA]:([HDI]:[TDI]);
 B – [PVA]:[IPDI];
 C – [PVA]:[HMDI].

mikrodalelėse ne tik daugėja karbamidinių grandžių, bet ir didėja susiuvimo tankis (3.1 schema, II ir III grandys), todėl didėja paviršiaus plotas nuo 83 iki $113 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ bei bendras akučių tūris nuo $0,36$ iki $0,46 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (3.6 lentelė, Nr. 6-10). Išanalizavus akučių pločio pasiskirstymą PUK mikrodalelėse, nustatyta, kad akučių pasiskirstymo smailių maksimumai yra ties 31-32 nm (3.17 pav. B). Vadinasi, tokio pločio akutės užima didžiausią bendro akučių tūrio dalį. PUK mikrodalelės, kurios susintetintos, esant [PVA]:[IPDI] = 1:2,5, akučių pločio pasiskirstymo smailės maksimumas yra ties 19 nm žyma. PUK mikrodalelėse, gautose, kai [PVA]:[IPDI] = 1:4,0, akučių pločio pasiskirstymas yra bimodalinis: pirmasis maksimumas yra ties 20 nm, o antrasis – 32 nm.

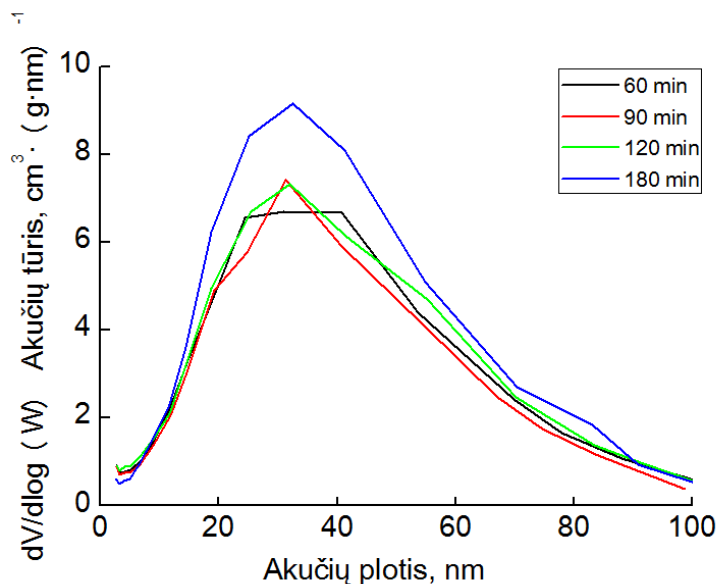
Tiriant PUK, gautas iš PVA ir HMDI, matyti, kad, keičiant pradinį molinį santykį nuo 1:2 iki 1:6, mikrodalelių paviršiaus plotas, bendras akučių tūris ir vidutinis skaitinis akučių plotis kinta netolygiai (3.6 lentelė, Nr. 11-15).

Padidinus HMDI kiekį PVA atžvilgiu reakcijos mišinyje nuo 1:2 iki 1:3, gauta, kad PUK mikrodalelių paviršiaus plotas padidėjo nuo 38 iki 68 m²·g⁻¹, bendras akučių tūris – nuo 0,22 iki 0,37 cm³·g⁻¹, o vidutinis skaitinis akučių plotis kito 21-22 nm ribose. Dar padidinus HMDI kiekį ir esant moliniam santykiui 1:4, susintetintų PUK mikrodalelių paviršiaus plotas praktiškai nepakito, bendras akučių tūris sumažėjo iki 0,24 cm³·g⁻¹, o vidutinis skaitinis akučių plotis – iki 16 nm. Toliau didinant HMDI kiekį ir esant santykiui 1:6, PUK mikrodalelių paviršiaus plotas sumažėjo iki 28 m²·g⁻¹, o bendras akučių tūris susitraukė iki 0,08 cm³·g⁻¹. Skyriuje 3.1.3 minėta, kad santykis 1:6 yra ribinis, kai dar gaunamos mikrodalelės, nes, esant santykiui 1:7, susidaro gelis. Manoma, kad, esant santykiui 1:6, atviros akutės gali tapti uždaromis, dėl to sumažėja paviršiaus plotas, bendras akučių tūris ir vidutinis skaitinis akučių plotis. Esant santykiui 1:3, šie parametrai yra didžiausi. Išanalizavus akučių pločio pasiskirstymo grafiką (3.17 C pav.), galima teigti, kad dauguma akučių yra 32 nm pločio. Tačiau, esant PVA ir HMDI pradiniam moliniam santykiui 1:2 ir 1:4, pastebima, kad dominuojančių akučių pločio intervalas prasiplečia nuo 25 nm iki 42 nm. Padidinus HMDI kiekį PVA atžvilgiu iki 1:6, gaunamas platus pasiskirstymas su nežymiai išreikštu dominuojančių akučių pločio intervalu nuo 32 iki 72 nm.

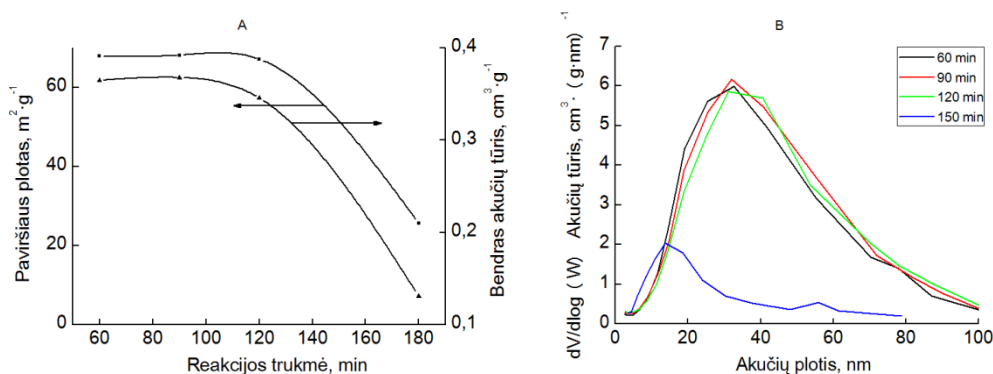
Išanalizavus visų trijų tipų PUK mikrodalelių rezultatus, nuspręsta, kad pradinės sintezės trukmės ir temperatūros įtaką PUK mikrodalelių akytumui tikslinga tirti tik PVA ir IPDI arba HMDI atvejais, nes naudojant PVA ir HDI-TDI mišinį, paviršiaus plotas bei bendras akučių tūris yra per maži, kad būtų tolimesni tyrimai atliekami.

Tyrimams iš PVA ir IPDI buvo susintetintos PUK, kai [PVA]:[IPDI] = 1:4, T = 90 °C. Ilginant PUK sintezės trukmę nuo 60 iki 150 min., paviršiaus plotas kinta nežymiai nuo 113 iki 119 m²·g⁻¹, bendras akučių tūris didėja nuo 0,46 iki 0,58 cm³·g⁻¹, o vidutinis skaitinis akučių plotis kinta 17-19 nm ribose. Išanalizavus akučių pločio pasiskirstymo grafiką, galima teigti, kad didžiausią tūrio dalį sudarančių akučių plotis yra ≈ 31 nm (3.18 pav.).

Tačiau PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, esant santykiui 1:3, reakcijos trukmei – nuo 60 iki 90 min., paviršiaus plotas ($\approx 68 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ir bendras akučių tūris ($\approx 0,37 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) praktiškai nekinta, bet, pailginus reakcijos



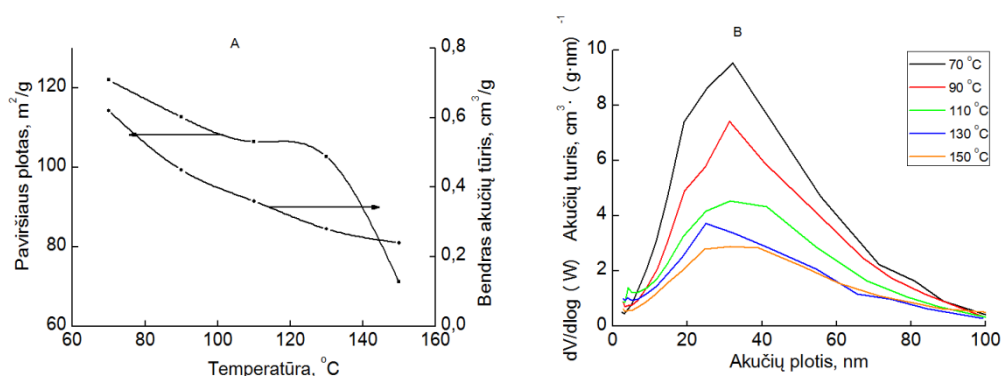
3.18 pav. Iš PVA ir IPDI susintetintų PUK mikrodalelių akučių pločio pasiskirstymo priklausomybė nuo sintezės trukmės ([PVA]:[IPDI] = 1:4, T = 90 °C).



3.19 pav. Iš PVA ir HMDI susintetintų PUK mikrodalelių paviršiaus ploto ir bendro akučių tūrio (A) bei akučių pločio pasiskirstymo (B) priklausomybė nuo sintezės trukmės ([PVA]:[HMDI] = 1:3, T = 90 °C).

trukmę iki 150 min., paviršiaus plotas sumažėjo nuo 68 iki $26 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, o bendras akučių tūris – nuo 0,37 iki $0,13 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (3.19 pav. A). Esant reakcijos trukmei nuo 60 iki 120 min., PUK mikrodalelėse didžiausią tūrio dalį sudaro akutės, kurių plotis 32 nm (3.19 pav. B). Tačiau, esant reakcijos trukmei 150 min., PUK mikrodalelėse didžiausią dalį jau sudaro 14 nm pločio akutės. 3.1.3 skyriuje teigiama, kad, pailginus reakcijos trukmę virš 90 min., PUK mikrodalelių išėiga lieka pastovi, o izocianatograpių kiekis mažėja, nes manoma, kad dalelėse vyksta tinklinimo reakcijos. Galima teigti, kad iš atvirų akučių susidaro uždaros ir todėl labai sumažėja paviršiaus plotas ir bendras akučių tūris.

Padidinus sintezės temperatūrą nuo 70 iki $150 \text{ }^\circ\text{C}$, esant PVA ir IPDI moliniam santykiui 1:4 bei $t = 90 \text{ min.}$, gauta, kad PUK mikrodalelių paviršiaus plotas ir bendras porų tūris atitinkamai sumažėjo nuo 122 iki $71 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ir nuo 0,62 iki $0,24 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (3.20 pav. A). Tai galima paaiškinti tuo,

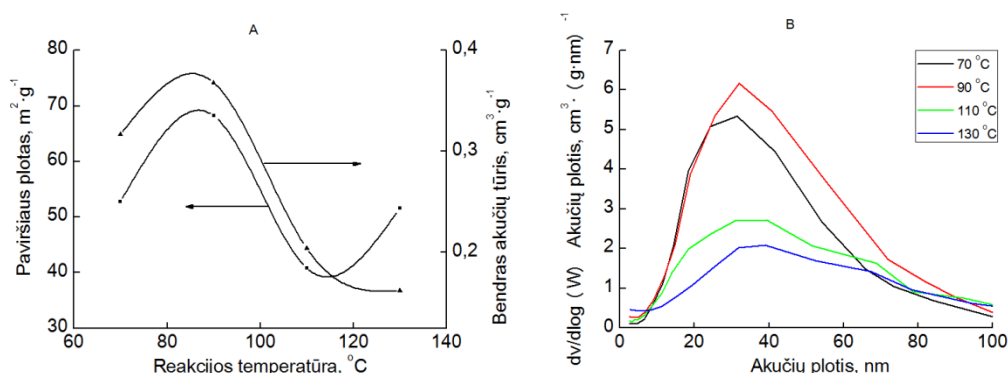


3.20 pav. Iš PVA ir IPDI susintetintų PUK mikrodalelių paviršiaus ploto ir bendro akučių tūrio (A) bei akučių pločio pasiskirstymo (B) priklausomybė nuo sintezės temperatūros ([PVA]:[IPDI] = 1:4, $t = 90 \text{ min.}$).

kad, esant aukštai reakcijos temperatūrai, yra didesnis reakcijos greitis tarp PVA ar vandens ir IPDI, gaunamas didesnis PUK susiuvimo laipsnis, todėl susidaro daugiau uždarytų akučių. Be to, esant aukštai temperatūrai, vanduo greičiau išgaruoja iš DMSO/ H_2O mišinio, todėl susidaro mažiau karbamidinių grandžių, išsiskiria mažiau anglies dioksido, gaunama mažesnė dalelių išėiga.

Dėl to mažėja PUK mikrodalelių paviršiaus plotas ir bendras akučių tūris, tačiau išlieka panašus akučių plotis. Kai reakcija vykdoma nuo 70 iki 130 °C, dominuojančių akučių plotis mažėja nuo 32 iki 26 nm, o, padidinus iki 150 °C, – gaunamas platus akučių pločio pasiskirstymo intervalas nuo 20 iki 60 nm be aiškiai išreikšto maksimumo (3.20 pav. B).

Tiriant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI ([PVA]:[HMDI] = 1:3, t = 90 min.), paviršiaus ploto ir bendro akučių tūrio kitimus nuo sintezės temperatūros, nustatyta, kad jie yra sudėtingesni (3.21 pav. A), lyginant su



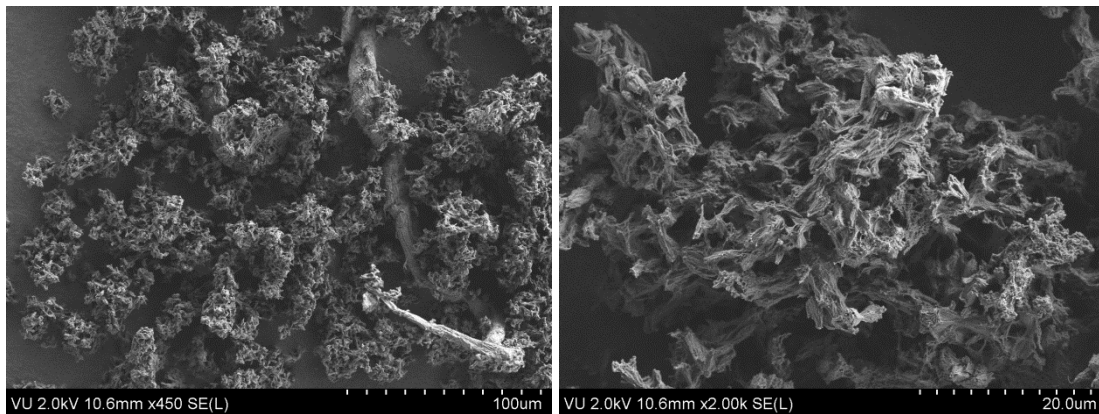
3.21 pav. Iš PVA ir HMDI susintetintų PUK mikrodalelių paviršiaus ploto ir bendro akučių tūrio (A) bei akučių pločio pasiskirstymo (B) priklausomybė nuo sintezės temperatūros ([PVA]:[HMDI] = 1:3, t = 90 min).

PUK, gautais iš PVA ir IPDI. Didinant PUK mikrodalelių sintezės temperatūrą nuo 70 iki 90 °C, paviršiaus plotas padidėjo nuo 53 iki 68 m²·g⁻¹, o bendras akučių tūris – nuo 0,33 iki 0,37 cm³·g⁻¹. Dar padidinus reakcijos temperatūrą iki 110 °C, PUK mikrodalelių paviršiaus plotas sumažėjo iki 41 m²·g⁻¹, o, esant 130 °C temperatūrai, vėl padidėjo iki 52 m²·g⁻¹. Tačiau, didinant reakcijos temperatūrą nuo 90 iki 130 °C, bendras akučių tūris nuosekliai mažėjo nuo 0,37 iki 0,16 cm³·g⁻¹. 3.1.3 skyriuje teigiama, kad, esant 130 °C reakcijos temperatūrai, dėl intensyviau vykstančių susiuvimo reakcijų pradeda formotis gelis ir dėl to padidėja paviršiaus plotas ir sumažėja bendras akučių tūris, nes atviros akutės virsta uždaromis. Kintant PUK mikrodalelių sintezės

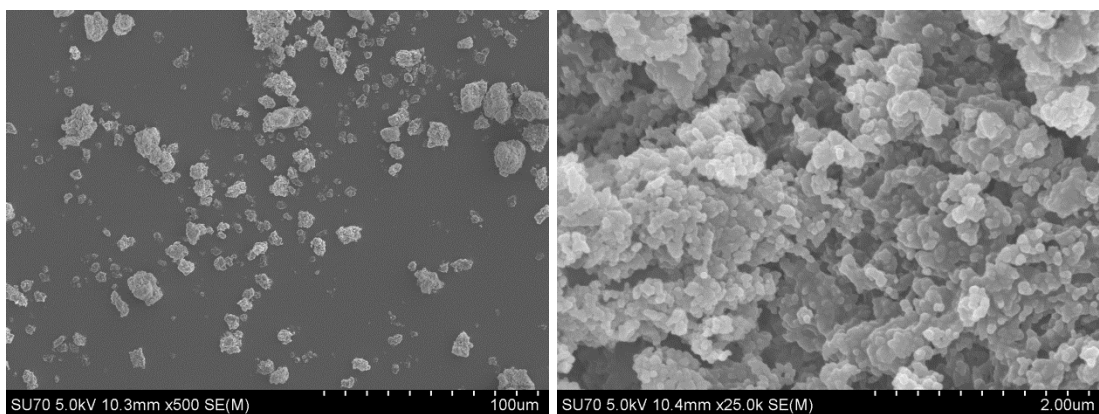
temperatūrai nuo 70 iki 130 °C, nustatyta, kad dominuojančių akučių plotis didėja nuo 32 iki 39 nm (3.21 pav. B).

3.2.4 PUK mikrodalelių dydžio ir paviršiaus morfologijos tyrimas

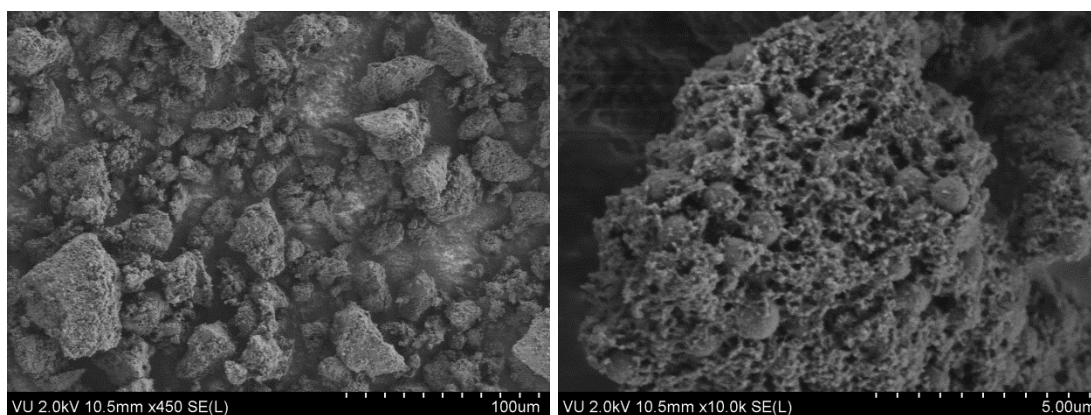
Ištyrus PUK mikrodaleles optiniu mikroskopu, nustatyta, kad PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI-TDI mišinio, dydis yra 10-30 µm ribose, o susidariusių aglomeratų dydis svyruoja nuo 50 iki 300 µm. Tuo tarpu, PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, dydis svyruoja nuo 2 iki 10 µm, o susidariusių aglomeratų – siekia 10-30 µm. PUK mikrodalelių, gautų iš



3.22 pav. PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI bei TDI, SEM nuotraukos ([PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1:(0,75:0,25) (t = 90 min., T = 90 °C).



3.23 pav. PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, SEM nuotraukos ([PVA]:[IPDI] = 1:4) (t = 90 min., T = 90 °C).



3.24 pav. PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, SEM nuotraukos ([PVA]:[HMDI] = 1:3) ($t = 90 \text{ min.}$, $T = 90 \text{ }^\circ\text{C}$).

PVA ir HMDI, kurių pradinis molinis santykis kinta nuo 1:2 iki 1:5, dydis svyruoja nuo 1 iki 12 μm , o aglomeratų – nuo 10 iki 90 μm . Tačiau, esant pradiniam PVA ir HMDI moliniam santykiui 1:6, gautų PUK mikrodalelių dydis yra nuo 10 iki 30 μm , o aglomeratų dydis išauga iki 110-180 μm .

Išanalizavus SEM nuotraukas (3.22-3.24 pav.), galima teigti, kad, nepriklausomai nuo PVA ir naudoto diizocianato, PUK mikrodalelių paviršius yra grublėtas, o paviršiuje yra tuščios ertmės – atviros akutės. Įdėmiau pasižiūrėjus į PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir HMDI, SEM nuotraukas, paviršiuje matosi burbuliukai, kuriuos galima įvardinti kaip uždaras akutes.

Apibendrinant 3.2.3 ir 3.2.4 skyriuose pateiktus rezultatus, matyti, kad atlikus dujų sorbcijos tyrimus PUK mikrodalelėse, kurios susintetintos iš PVA ir įvairių diizocianatų, susidarė histerezės kilpos, kurios rodo, kad dalelėse yra mezoakučių ($p/p_0 = 0,4-0,8$) ir makroakučių ($p/p_0 = 0,8-1$). Pagal IUPAC klasifikaciją PUK mikrodalelių dujų sorbcijos izotermas galima priskirti IV tipui, o susiformavusias histerezės kilpas – H3 tipui. Vadinas, susintetintos PUK mikrodalelės yra plokštelių pavidalo, kuriose akutės yra plyšinės formos.

Didžiausias paviršiaus plotas ($83-113 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ir bendras akučių tūris ($0,36-0,46 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) pasiektas, kai PUK mikrodalelės susintetintos, esant

skirtingiems PVA ir IPDI moliniams santykiams. Vidutinis skaitinis akučių plotis, priklausomai nuo PVA ir IPDI molinio santykio, svyruoja nuo 16 iki 18 nm. Dominuojantis akučių plotis PUK yra 31-32 nm.

Iš PVA ir HMDI susintetintų PUK mikrodalelių paviršiaus plotas kinta nuo 38 iki 68 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, bendras akučių tūris – nuo 0,08 iki 0,37 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, dominuoja 32 nm pločio akutės, o vidutinis jų plotis – nuo 14 iki 32 nm.

PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI bei TDI, vidutinis akučių dydis kinta nuo 15 iki 23 nm, o akučių pločio pasiskirstymas yra platus. Daugiausiai yra 20-80 nm pločio akučių. Paviršiaus plotas ($4\text{-}5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ir bendras akučių tūris ($0,012\text{-}0,021 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) yra mažiausi, lyginant su mikrodalelėmis, gautomis naudojant IPDI arba HMDI.

Ilginant PUK mikrodalelių sintezės trukmę nuo 60 iki 150 min., nustatyta, kad paviršiaus plotas ir bendras akučių tūris kinta nežymiai, sintetinant PUK iš PVA ir IPDI. Tačiau, kai PUK sintetamos iš PVA ir HMDI, – paviršiaus plotas sumažėjo nuo $68 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ iki $26 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, o bendras akučių tūris – nuo $0,37 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ iki $0,13 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. Manoma, kad, ilginant sintezės trukmę, dalelėse vyksta tinklinimo reakcijos ir iš atvirų akučių susidaro uždaros, todėl labai sumažėja paviršiaus plotas bei bendras akučių tūris, o dominuojantis akučių plotis sumažėja nuo 32 iki 14 nm.

Didinant reakcijos temperatūrą nuo 90 iki 110 °C, abiejose sistemose (PVA-IPDI ir PVA-HMDI) mažėja PUK mikrodalelių paviršiaus plotas ir bendras akučių tūris. Tačiau, esant maksimaliai sintezės temperatūrai 130 °C, PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA-HMDI, paviršiaus plotas padidėja. Manoma, kad, esant šiai temperatūrai intensyviau vyksta susiuvimo reakcijos ir pradeda formuotis gelis, dėl to padidėja paviršiaus plotas ir sumažėja bendras akučių tūris, nes atviros akutės virsta uždaromis.

Išanalizavus PUK mikrodalelių dydžius, nustatyta, kad iš PVA ir HDI bei TDI susintetintų PUK dalelių dydžiai svyruoja nuo 10 iki 30 μm , iš PVA ir IPDI – nuo 2 iki 10 μm , o iš PVA ir HMDI – nuo 1 iki 12 μm . Analizuojant SEM nuotraukas, nustatyta, kad visų PUK mikrodalelių, nepriklausomai nuo

diizocianato, paviršius yra grublėtas ir akytas. Iš PVA ir HMDI susintetintų PUK mikrodalelių paviršiuje matyti burbuliukai – uždaros akutės.

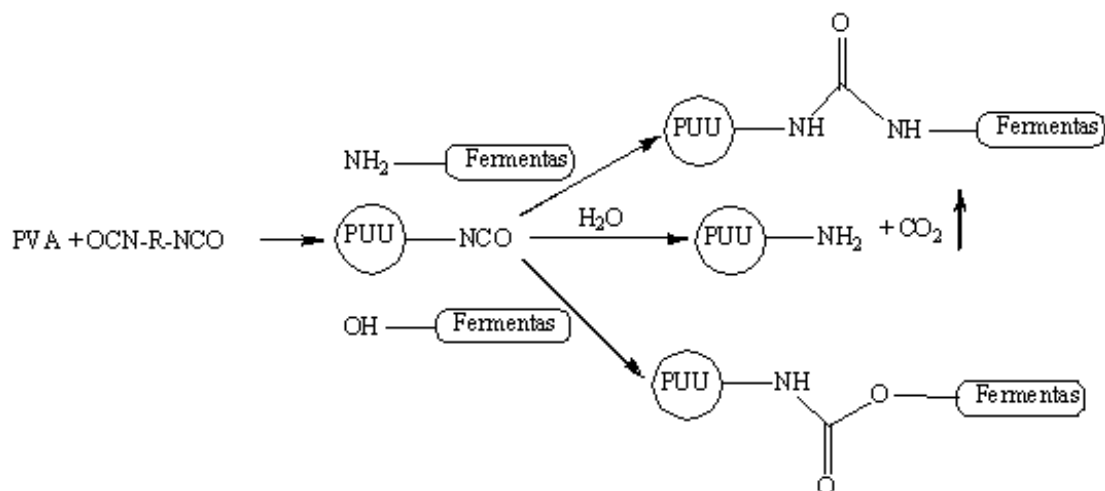
3.3 Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių ir imobilizuotų preparatų tyrimas

Biotechnologijos ir maisto pramonėje maltogeninė α -amilazė (Ma) yra plačiai naudojama, nes gali skaldyti įvairius angliavandenius – krakmolą, amilozę, amilopektiną, dekstrinus, įvairaus ilgio polisacharidus – iki maltozės. Taip pat Ma gali transglikozilinti angliavandenius ir tokiu būdu panaikinti jų nuodingumą, netirpumą, kartumą ar saldumą ir paversti nenuodingais, tirpiaisiais, saldžiais ar mažiau saldžiais dariniais.

PUK mikrodalelės, susintetintos, esant skirtingai reakcijos trukmei, temperatūrai bei pradiniam PVA ir diizocianatų moliniams santykiams, panaudotos kaip nešikliai Ma imobilizuoti, nes turi laisvą izocianatograpių ir yra akytos. Ma pasirinkta ne tik kaip modelinis fermentas, bet ir dėl potencialios galimybės panaudoti imobilizuotus preparatus maltoziniam sirupams gauti. Pasirinkimą lėmė ir šie veiksniai:

- Substratas krakmolą yra draugiškas aplinkai;
- Ma yra plačiai paplitusi gamtoje;
- Fermentas naudojamas pramonėje;

Fermentas ant PUK mikrodalelių gali imobilizuotis kovalentiniu būdu, tai yra fermento amino- ar hidroksigrupėms reaguojant su PUK esančiomis laisvomis izocianatogrūpėmis, susidarant uretaniniams arba karbamidiniams ryšiams (3.2 Schema), arba fizikiniu – adsorbcijos būdu. Tarp Ma ir PUK pagrinde turėtų vyrauti karbamidiniai ryšiai, nes aminogrūpės reakcija su izocianatogrūpe yra kelis kartus greitesnė, nei reakcija tarp izocianato- ir hidroksigrūpės ar vandens molekulės. Imobilizavimas fizikiniu būdu vyksta, kai susidaro joniniai ar vandeniliniai ryšiai tarp fermento ir PUK funkcinų



3.2 schema. Ma imobilizavimas ant PUK mikrodalelių.

grupių, o taip pat dėl hidrofobinės ir *Van der Waals'o* sąveikos. Literatūroje rasta duomenų, kad joninio ryšio stiprumas kartais yra prilyginamas kovalentinio ryšio stiprumui [294].

3.3.1 *Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių tyrimas*

3.3.1.1 *Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI bei TDI mišinio, tyrimas*

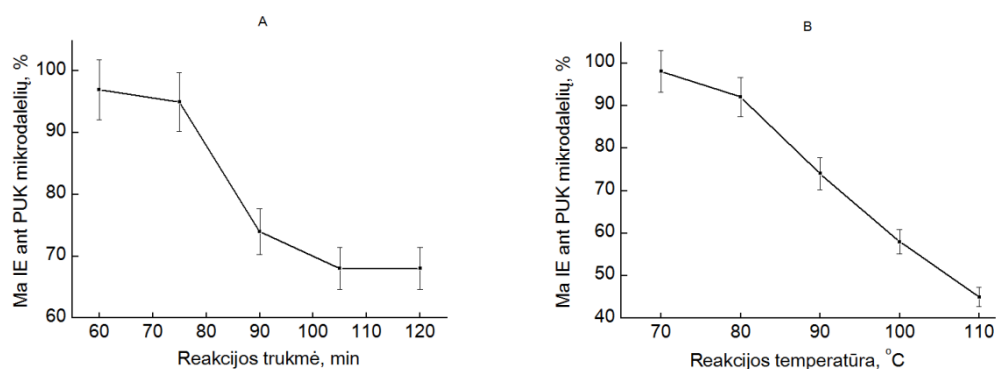
Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir HDI bei TDI mišinio. Pirmiausiai buvo tirta Ma imobilizavimo efektyvumo (IE) ir imobilizavimo išeigos pagal baltymą (IB) priklausomybė nuo pradinių PUK sintezės sąlygų (3.7 lentelė, 3.25 pav.). IE yra gauto Ma aktyvumo imobilizuoto preparato (IP) ir imobilizavimui paimto pradinio fermento aktyvumo procentinis santykis, o IB – Ma baltymo kiekio ant IP po imobilizavimo ir paimto imobilizavimui fermento baltymo kiekio procentinis santykis. Paprastai IB būna didesnis už IE, nes imobilizuojant fermentas gali virsti neaktyviu, nebent imobilizavimo metu fermentas gali aktyvuotis, tada $IE > IB$. Keičiant pradinius PVA ir (HDI:TDI) molinius santykius nuo 1:(0,25:0,25) iki 1:(0,75:0,25), Ma IE didėja nuo 45 iki 96 %, o IB – nuo 47 iki 100 %. Taip yra todėl, kad, didinant diizocianatų kiekį ir keičiant PVA ir

diizocianatų mišinio pradinį molinį santykį nuo 1:0,5 iki 1:1, ant PUK mikrodalelių lieka daugiau laisvų izocianatograpių (3.1 lentelė). Didinant HDI kiekį reakcijos mišinyje TDI atžvilgiu, IE bei IB taip pat didėja (3.7 lentelė, Nr. 4-5). Ma imobilizuojasi ant PUK mikrodalelių, reaguojant laisvoms

3.7 lentelė. Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI-TDI mišinio, rezultatai

Nr.	[PVA]:([HDI]:[TDI])	IE (%)	IB (%)
1	1:(0,25:0,25)	45 ± 2	47 ± 2
2	1:(0,35:0,35)	51 ± 3	52 ± 3
3	1(0,40:0,60)	60 ± 3	62 ± 3
4	1:(0,50:0,50)	74 ± 4	76 ± 4
5	1:(0,75:0,25)	96 ± 5	100 ± 5

izocianatograpiams su Ma funkcinėmis grupėmis, susidarant kovalentiniais ryšiams, taip pat vyksta Ma fizikinė adsorbcija. Kai PUK mikrodalelės susintetintos, esant PVA:(HDI:TDI) pradiniam moliniam santykiui 1:(0,75:0,25), gauta, kad izocianatograpių kiekis yra 9,1 %, o Ma IE siekia net 96 %. Ma IE kitimas taip pat priklauso nuo PUK mikrodalelių sintezės



3.25 pav. Ma imobilizavimo efektyvumo priklausomybė nuo PUK mikrodalelių sintezės trukmės (A) (90 °C) ir temperatūros (B) (90 min.) ([PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1:(0,5:0,5)).

trukmės (3.25 pav. A) ir temperatūros (3.25 pav. B), nes nuo šių faktorių taip pat kinta PUK mikrodalelių sandara ir laisvų izocianatograpių kiekis. Pailginus reakcijos trukmę nuo 60 min. iki 120 min., izocianatograpių kiekis PUK mikrodalelėse mažėja (3.1 pav.) ir tuo pačiu mažėja fermento IE nuo 96 iki 70 %. Padidinus pradinę reakcijos temperatūrą nuo 70 iki 110 °C, izocianatograpių kiekis PUK mikrodalelėse mažėja (3.2 pav.), taip pat mažėja Ma IE nuo 98 iki 45 %. Šie rezultatai rodo, kad fermento IE labai priklauso nuo izocianatograpių kiekio PUK dalelėse. Vykstant Ma imobilizacijai adsorbcijos būdu, IE priklauso nuo paviršiaus ploto ir akučių pločio [295]. Tai yra, kuo didesnis paviršiaus plotas, tuo daugiau reikia fermento, kad paviršių padengtų monosluoksniu. Tačiau paviršiaus plotas priklauso nuo akučių skersmens ir tūrio. Vieni autoriai teigia, kad sėkmingam imobilizavimui akutės turi būti didesnės už 30 nm, tačiau kiti teigia, kad sėkmingam imobilizavimui akutės turi būti mažesnės nei 100 nm [295, 296]. Nustatyta, kad fermentui geriausia imobilizuotis, kai akučių skersmuo yra 10 kartų didesnis už fermento skersmenį [295]. Galima daryti išvadą, kad geriausiai imobilizavimas turėtų vykti, jei akutės yra 30-100 nm ribose. Tokios akutės reikalingos, kad fermentas galėtų laisvai difunduoti į jų vidų iki dugno, o substratas ir produktas galėtų laisvai prieiti prie fermento ir išeiti. Esant mažoms akutėms, fermentas nedifunduoja iki dugno, o gali prisikabinti ant sienelės, prie akutės viršaus ir neišnaudoti viso akutės paviršiaus ploto [295]. Nustatyta, kad PUK mikrodalelių paviršiaus plotas yra 4-5 m²g⁻¹ ribose, bendras akučių tūris yra nuo 0,012 iki 0,021 cm³g⁻¹, o dominuojančios akutės yra 40 nm pločio akučių.

3.3.1.2 Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, tyrimas

Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir cikloalifatinio diizocianato IPDI, keičiant jų pradinius molinius santykius, sintezės trukmę ir temperatūrą (3.8 lentelė, 3.26 pav.). Kai nešikliai buvo gauti iš PVA ir IPDI, keičiant pradinį molinį santykį nuo 1:2 iki 1:4, imobilizuotos

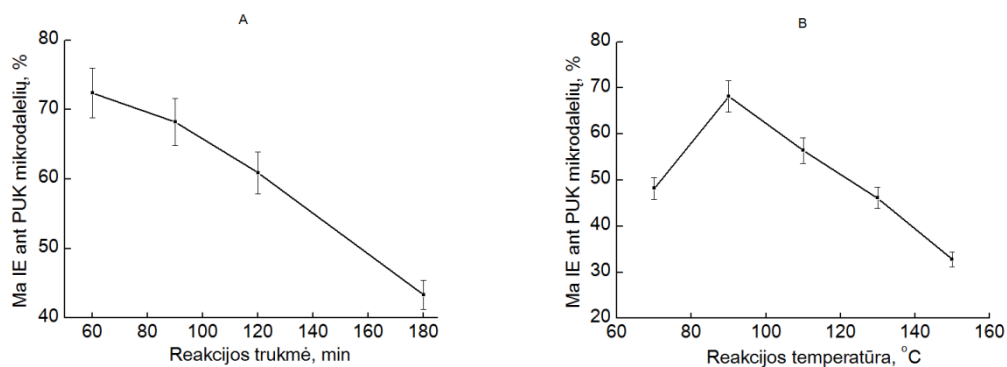
Ma IE didėja atitinkamai nuo 46 iki 68 %, o IB – nuo 51 iki 74 %. Imobilizavus Ma ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir IPDI, esant pradiniam santykiui 1:4, T = 90 °C ir ilginant sintezės trukmę nuo 60 iki 180 min., gauta, kad IE sumažėja nuo 72 iki 43 % (3.26 pav. A). Iš pateiktų duomenų 3.1.2 skyriuje matyti, kad, ilginant PUK mikrodalelių sintezės trukmę, mažėja laisvų izocianatograpių kiekis nuo 2,3 iki 0,72 %, todėl tuo pačiu mažėja fermento kovalentinio prisijungimo prie PUK mikrodalelių galimybė. Tokia pati tendencija pastebėta ir 3.3.1.1 skyriuje. Tai dar kartą patvirtina, kad fermento IE priklauso nuo PUK esančių izocianatograpių

3.8 lentelė. Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, rezultatai

[PVA]:[IPDI]	IE (%)	IB (%)
1:2.0	46 ± 2	51 ± 3
1:2.5	59 ± 3	63 ± 3
1:3.0	62 ± 3	67 ± 3
1:3.5	67 ± 3	71 ± 3
1:4.0	68 ± 3	74 ± 4

kiekio. Iš rezultatų matyti, kad geriausias Ma IE ant PUK mikrodalelių pasiekiamas, kai PUK sintezės trukmė yra trumpiausia. Kadangi Ma IE priklauso nuo izocianatograpių kiekio, tai jis turi priklausyti ir nuo PUK sintezės temperatūros. Didinant ją nuo 70 iki 110 °C, izocianatograpių kiekis PUK mažėja nuo 2,2 iki 0,1 %. Kai PUK sintezės temperatūra padidinama nuo 70 iki 90 °C, Ma IE padidėja nuo 48 iki 68 % (3.26 pav. B). Tačiau, toliau keliant temperatūrą iki 150 °C, Ma IE ant PUK mikrodalelių sumažėja iki 33 %. Jeigu imobilizavimas vykėtų tik kovalentiniu būdu, didžiausias Ma IE ant PUK mikrodalelių turėtų būti, kai PUK sintezės temperatūra yra 70 °C, o ne 90 °C, nes šiuo atveju gaunamas didžiausias izocianatograpių kiekis (2,2 %). Kai PUK sintezės temperatūra 90 °C, izocianatograpių kiekis yra 1,7 %, o tai

yra palyginus mažas pokytis, žinant, kad PUK išeiga padidėja apie 6 % (3.4 pav.). Mikrodalelių paviršiaus plotas ir bendras akučių tūris yra didesnis, kai PUK sintezė atlikta 70 °C, o ne 90 °C temperatūroje (3.20 pav. A). Tačiau



3.26 pav. Ma imobilizavimo efektyvumo priklausomybė nuo PUK mikrodalelių sintezės trukmės (A) (90 °C) ir temperatūros (B) (90 min.) ([PVA]:[IPDI] = 1:4).

iš gautų rezultatų matyti, kad, esant PUK sintezės temperatūrai 90 °C, susidaro palankesnės sąlygos imobilizuotis fermentui. Tai lemia ne tik dominuojantis akučių plotis, kuris abiem atvejais yra 32 nm, tačiau ir tai, kad mikrodalelėse, sintetintose 90 °C temperatūroje, yra žymiai mažiau akučių, mažesnių už 30 nm. Iš literatūros duomenų žinoma, kad fermentams imobilizuoti tinkamiausias yra 30-100 nm skersmens akutės [295, 296]. Keliant PUK sintezės temperatūrą nuo 90 iki 150 °C, izocianatograpių ant PUK mikrodalelių praktiškai nelieka, paviršiaus plotas sumažėja nuo 113 iki 71 m²·g⁻¹, bendras akučių tūris – nuo 0,46 iki 0,24 cm³·g⁻¹, o Ma IE sumažėja nuo 68 % iki 33 %. Todėl galima prieiti prie išvados, kad, didėjant PUK sintezės temperatūrai, Ma daugiausia imobilizuojasi fizikinės sorbcijos būdu.

3.3.1.3 Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, tyrimas

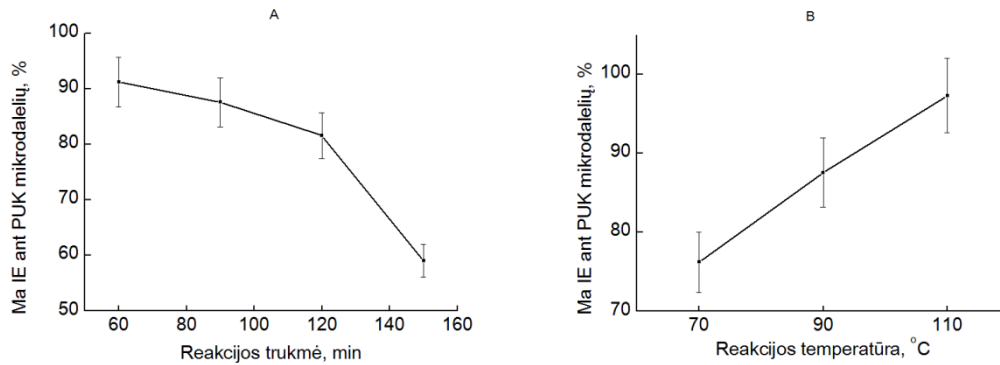
Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių, kurios gautos iš PVA ir cikloalifatinio diizocianato HMDI. Fermento imobilizavimas ir tyrimas buvo vykdomas ant PUK mikrodalelių, gautų keičiant PVA ir HMDI pradinis molinius santykius nuo 1:2 iki 1:6 (3.9 lentelė). Kai nešikliai buvo gauti, esant santykiui [PVA]:[HMDI] = 1:2 ir 1:3, imobilizuotos Ma IE padidėjo nuo 60 iki 88 %, o IB – nuo 63 iki 90 %, tai yra, didžiausių verčių. PUK mikrodalelių sintezei naudojant didesnį HMDI perteklių ([PVA]:[HMDI] = 1:4-1:6), imobilizuotos Ma IE sumažėjo iki 49 %, o IB iki 51 %. Tokius rezultatus būtų galima paaiškinti tuo, kad mikrodalelėse sumažėja izocianatograpių kiekis nuo 0,7 iki 0,2 % (3.3 lentelė), PUK mikrodalelių paviršiaus plotas – nuo 68 iki 28 m²·g⁻¹, bendras akučių tūris – nuo 0,37 iki 0,08 cm³·g⁻¹, nors 30-70 nm

3.9 lentelė. Ma imobilizavimo ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, rezultatai

[PVA]:[HMDI]	IE (%)	IB (%)
1:2	60 ± 3	63 ± 3
1:3	88 ± 4	90 ± 5
1:4	68 ± 3	71 ± 4
1:5	51 ± 3	53 ± 3
1:6	49 ± 2	51 ± 3

pločio akučių buvo palyginus daug. (3.26 pav.).

Tiriant PUK sintezės trukmės įtaką Ma IE, nustatyta, kad, pailginus sintezės trukmę nuo 60 iki 90 min., IE nežymiai sumažėja nuo 91 iki 88 %, o, pailginus sintezės trukmę iki 150 min., IE sumažėja iki 59 % (3.27 pav. A). Gauti imobilizavimo duomenys koreliuoja su PUK sintezės rezultatais:



3.27 pav. Ma IE priklausomybė nuo PUK mikrodalelių sintezės trukmės (A) (90 °C) ir temperatūros (B) (90 min) ([PVA]:[HMDI] = 1:3).

mikrodalelių izocianatogrupių kiekis (3.5 pav.) ir paviršiaus plotas (3.19. pav A) sumažėjo, ilginant PUK sintezės trukmę. Pailginus PUK sintezės trukmę nuo 60 iki 120 min., mikrodalelėse dominuoja 32 nm pločio akutės, o, kai sintezės trukmė 150 min., – tik 14 nm. Galima daryti prielaidą, kad Ma ant PUK mikrodalelių imobilizavosi kovalentiniu ir fizikiniu būdu. Imobilizavus fermentą ant PUK mikrodalelių, kurios gautos, keičiant sintezės temperatūrą nuo 70 iki 110 °C, nustatyta, kad Ma IE didėja nuo 76 iki 97 % (3.27 pav. B). Šiais atvejais izocianatogrupių kiekis sumažėjo nuo 1,5 iki 0,3 % (3.6 pav.), o paviršiaus plotas – nuo 53 iki 41 m²·g⁻¹. Esant reakcijos temperatūrai 90 °C, gautas didžiausias paviršiaus plotas, kuris lygus 68 m²·g⁻¹ (3.21 pav. A). Galima daryti prielaidą, kad, didėjant sintezės temperatūrai, susidaro palankesnės sąlygos fermento imobilizavimui ant PUK mikrodalelių fizikiniu būdu. Ma imobilizavimas ant PUK, esant sintezės temperatūrai 130 °C, nepavyko, nes šiuo atveju susidaro ne dalelės, o vientisas gelis, kurį reikia smulkinti, o tai prieštarauja darbo koncepcijai.

Apibendrinant galima teigti, kad, maltogeninė α -amilazė iš *Bacillus stearothermophilus* sėkmingai imobilizuota ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir įvairių diizocianatų. Didžiausi Ma IE pasiekti, kai Ma buvo imobilizuota ant nešiklių, kurie susintetinti, esant trumpiausiai reakcijos trukmei (60 min.), nes šiuo atveju PUK mikrodalelėse, nepriklausomai nuo

diizocianato, lieka daugiausiai laisvų izocianatograpių, prie kurių kovalentiniu ryšiu gali jungtis fermentas. PUK mikrodalelių sintezės temperatūros įtaka Ma IE priklauso nuo naudoto diizocianato ir jo santykio su PVA. Didžiausi Ma IE ant PUK yra gaunami, kai: [PVA]:([HDI:TDI]) = (1:(0,5:0,5)), T = 70 °C (IE = 98 %); [PVA]:[IPDI] = 1:4, T = 90 °C (IE = 68 %); [PVA]:[HMDI] = 1:3, T = 110 °C (IE = 97 %.) Galima daryti prielaidą, kad Ma imobilizuojasi ne tik per laisvas izocianatogrupes, bet ir fizikinės adsorbcijos būdu. Ma IE ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir HDI bei TDI mišinio, yra didžiausias, nes yra didžiausia teorinė galimybė imobilizuotis kovalentiniu būdu dėl didelio kiekio PUK mikrodalelėse esančių laisvų izocianatograpių. Ma imobilizavimas ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, gali vykti kovalentiškai per laisvas izocianatogrupes ir fizikinės adsorbcijos būdu akutėse, nes yra didelis PUK paviršiaus plotas ($> 100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ir bendras akučių tūris ($> 0,36 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$), o dominuoja 32 nm pločio akutės. Ant PUK, susintetintų iš PVA ir HMDI, Ma imobilizavimas pagrinde gali vykti fizikinės adsorbcijos būdu, nes yra pakankamas didelis mikrodalelių paviršiaus plotas ($68 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), o prisijungimas kovalentiniu būdu yra mažai tikėtinas dėl labai mažo izocianatograpių kiekio.

3.3.2 Imobilizuotų preparatų savybių tyrimas

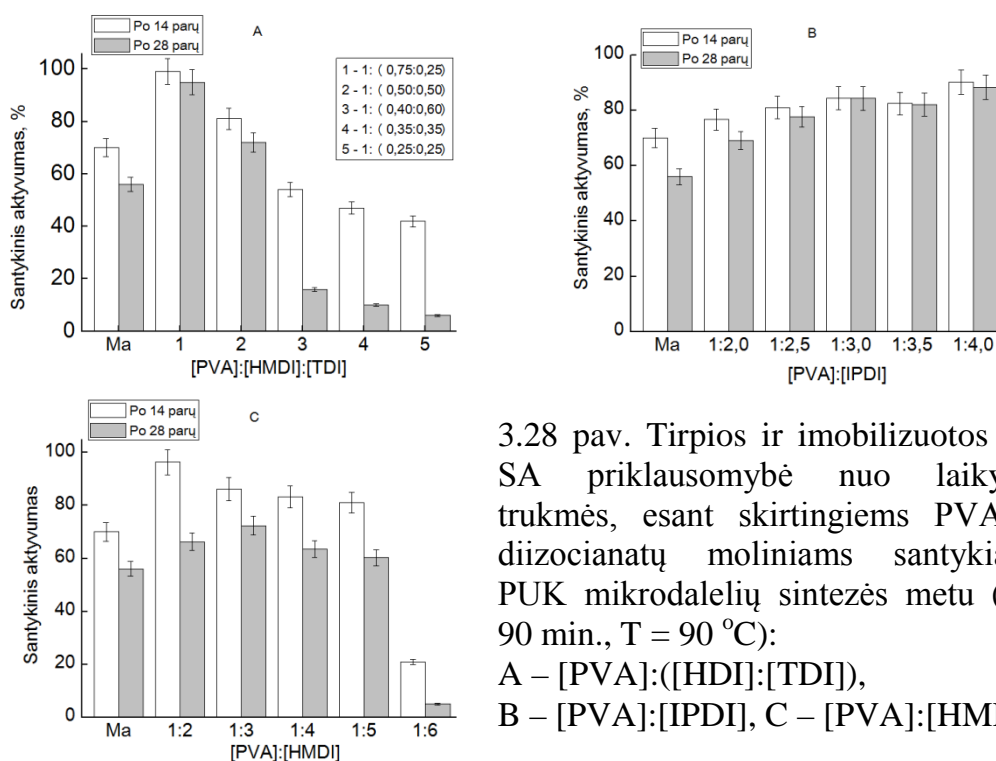
3.3.2.1 Imobilizuotos Ma ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir diizocianatų, stabilumo tyrimas

Imobilizuotų preparatų (IP) stabilumo tyrimai dalinai atskleidžia, kaip fermentas imobilizavosi ant nešiklio: kovalentiškai ar fizikinės sorbcijos būdu. Be to, saugojimo metu, fermentas gali deaktyvuoti. IP stabilumas laike yra vienas svarbiausių faktorių, kuriant naujus technologinius procesus, kuriuose naudojami imobilizuoti fermentai. Dėl šių priežasčių atlikti Ma IP stabilumo tyrimai, laikant juos 4 °C temperatūroje citratiniame buferyje (pH = 5,0) 14 ir 28 paras (3.28 pav.).

Ištirus tirpios Ma stabilumą, gauta, kad po 14 parų liko 70 % jos aktyvumo, o po 28 parų – 56 %. Todėl galima teigti, kad Ma laikant deaktyvuojasi.

Pirmiausia buvo ištirti Ma IP, kurie gauti imobilizavimui naudojant PUK mikrodaleles, kurios buvo susintetintos iš PVA ir HDI-TDI mišinio, esant pradiniam moliniams santykiams: 1:(0,4:0,6), 1:(0,35:0,35) ir 1:(0,25:0,25). Ma SA po 14 parų sumažėjo iki 54-42 %, o po 28 parų liko 16-6 %, pradinio aktyvumo, todėl galima teigti, kad šiais atvejais imobilizavimas labiau vyko fizikiniu būdu. Tuo tarpu, imobilizavimui naudojant PUK mikrodaleles, kurios buvo susintetintos, esant PVA ir HDI bei TDI mišinio pradiniam moliniams santykiams 1:(0,5:0,5) ir 1:(0,75:0,25), imobilizuota Ma saugojimo metu parodė gerą stabilumą: po 14 parų imobilizuotos Ma SA sumažėjo atitinkamai iki 81 % ir 99 %, o po 28 parų – iki 72 % ir 95 %, (3.28 pav. A). Manoma, kad šiais atvejais Ma imobilizavimas ant PUK mikrodalelių, o ypač esant santykiui 1:(0,75:0,25), daugiausia vyko kovalentiniu būdu.

Kai Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių, gautų iš PVA ir IPDI,



3.28 pav. Tirpios ir imobilizuotos Ma SA priklausomybė nuo laikymo trukmės, esant skirtingiems PVA ir diizocianatų moliniams santykiams PUK mikrodalelių sintezės metu ($t = 90 \text{ min.}$, $T = 90 \text{ }^\circ\text{C}$):

A – [PVA]:([HDI]:[TDI]),

B – [PVA]:[IPDI], C – [PVA]:[HMDI].

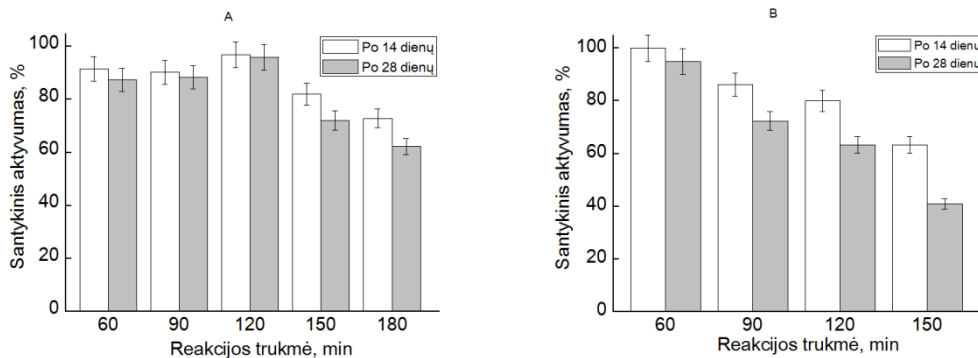
esant pradiniam moliniams santykiams nuo 1:2 iki 1:4, IP SA po 14 saugojimo parų išliko gana didelis ir didėjo nuo 77 iki 90 %, didėjant IPDI kiekiui PUK sintezės metu. Po 28 parų SA šiek tiek sumažėjo ir kito nuo 69 iki 88 % (3.28 pav. B). Iš gautų rezultatų galima teigti, kad imobilizuota Ma yra stabilesnė už tirpią Ma, o geriausias IP stabilumas gautas, esant PVA ir IPDI pradiniam moliniams santykiui 1:4.

Ma imobilizavus ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, esant pradiniam moliniams santykiui 1:2, nustatytas geriausias imobilizuotos Ma SA (96 %) po 14 parų saugojimo. Po to seka IP, kai santykiai buvo nuo 1:3 iki 1:5, o blogiausias stabilumas – esant santykiui 1:6. Po 28 parų saugojimo geriausias IP stabilumas gautas, kai Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių, susintetintų esant santykiui 1:3 (72 %), o blogiausias – Ma imobilizuojant ant PUK mikrodalelių, susintetintų esant santykiui 1:6 (3.28 pav. C). Šiuo atveju Ma SA yra tik 5 %. Manoma, kad Ma pagrinde imobilizavosi fizikinės sorbcijos būdu, o saugojimo metu difundavo nuo PUK mikrodalelių paviršiaus, kurių paviršiaus plotas ($28 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ir bendras akučių tūris ($0,08 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) buvo mažiausi.

Taip pat buvo atlikti Ma stabilumo tyrimai, kai Ma imobilizuota ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir IPDI, kai jų pradinis molinis santykis yra 1:4, o taip pat iš PVA ir HMDI, kai jų santykis yra 1:3, esant skirtingai sintezės trukmei ($T = 90 \text{ }^\circ\text{C}$) (3.29 pav.) ir temperatūrai ($t = 90 \text{ min.}$) (3.30 pav.)

Gauti didžiausi IP SA po 14 ir 28 parų saugojimo, kai PUK sintezė buvo vykdyta iš PVA ir IPDI nuo 60 iki 120 min., toliau ilginant PUK sintezės trukmę iki 180 min., IP SA po 14 parų sumažėjo iki 73 %, o po 28 parų – iki 62 % (3.29 pav. A). Iš 3.1.2 ir 3.2.3 skyriuose pateiktų duomenų matyti, kad PUK mikrodalelių išėiga ir paviršiaus plotas praktiškai nesikeičia, ilginant sintezės trukmę nuo 90 iki 180 min., tačiau mažėja izocianatograpių kiekis ir bendras akučių tūris.

Tiriant sintezės trukmės įtaką Ma IP stabilumui, nustatyta, kad PUK,

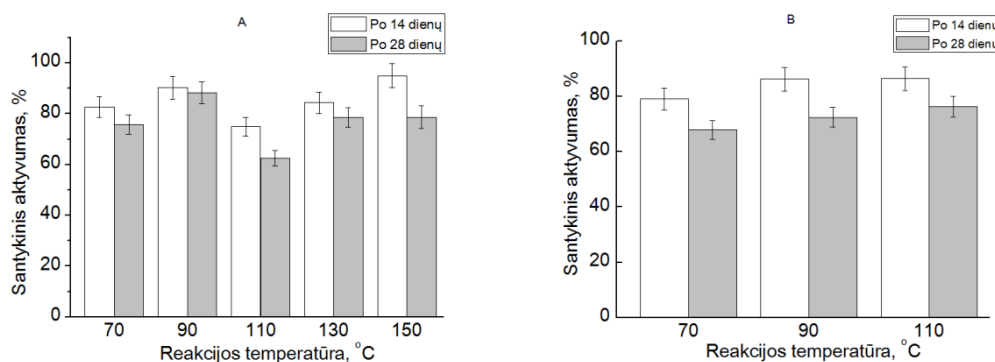


3.29 pav. Imobilizuotos Ma SA priklausomybė nuo laikymo trukmės, esant skirtingoms PUK sintezės trukmėms (A – [PVA]:[IPDI] = 1:4; B – [PVA]:[HMDI] = 1:3; T = 90 °C).

gautų iš PVA ir HMDI, geriausias IP stabilumas pasiektas, kai Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių, esant mažiausiai sintezės trukmei (60 min). Šio IP SA po 14 parų buvo 100 %, o po 28 parų – 95 % (3.29 pav. B). Šiuo atveju gauta mažiausia PUK mikrodalelių išėiga (34 %) bei didžiausias izocianatograpių kiekis, o, imobilizavus Ma, gaunamas didžiausias IE (91 %). Kai PUK sintezės trukmė yra 90 min., imobilizuoto preparato SA po 14 ir 28 parų saugojimo sumažėjo atitinkamai iki 86 % ir 72 %. PUK išėiga šiuo atveju didesnė 16 % ir siekė 50 %, bet sumažėjo izocianatograpių kiekis, todėl Ma IE ant PUK mikrodalelių nežymiai sumažėjo nuo 91 iki 88 %. Pailginus PUK sintezės trukmę iki 150 min., po 28 parų saugojimo IP SA sumažėjo iki 41 %. Šiuo atveju Ma IP stabilumas taip pat susijęs su PUK dalelėse esančių izocianatograpių kiekiu, kuris, ilginant sintezės trukmę, mažėja (3.5 pav.). Įvertinus Ma IE ir IP stabilumą nuo PUK sintezės trukmės, galima daryti prielaidą, kad, esant trumpai sintezės trukmei, fermentas prie PUK mikrodalelių jungiasi daugiau kovalentiniu būdu, nes yra daugiau izocianatograpių, o, ilginant sintezės trukmę, labiau dominuoja fizikinė adsorbicija. Dėl šių veiksnių IP stabilumas saugojant mažėja, ilginant PUK sintezės trukmę.

Tiriant PUK mikrodalelių, gautų iš PVA ir IPDI sintezės temperatūros įtaką Ma IP stabilumui, nustatyta, kad stabiliausi IP gauti, kai PUK sintezės

temperatūra yra 90 °C (3.30 pav. A). Šiuo atveju imobilizuoto Ma preparato SA po 14 ir 28 saugojimo parų yra 90 % ir 88 %. Šiuo atveju yra optimalus santykis tarp PUK išeišos (67 %), izocianatograpių kiekio (1,7 %), paviršiaus ploto (113 %), ir Ma IE (68 %) bei IP stabilumo (88 %). Pakėlus PUK sintezės temperatūrą iki 150 °C, imobilizuotos Ma SA po 14 ir 28 saugojimo parų yra atitinkamai 84 % ir 79 %. Galima teigti, kad didelis IP stabilumas pastaruoju atveju gautas todėl, kad Ma IE yra mažas (33 %), o po saugojimo liko tik 26 % pradinio fermento aktyvumo, nors desorbavosi ir nedidelė dalis. Atsižvelgus į Ma IP stabilumo rezultatus, galima teigti, kad Ma imobilizavimas ant PUK nešiklių, gautų esant žemoms sintezės temperatūroms, pagrinde turėtų vykti



3.30 pav. Imobilizuotos Ma SA priklausomybė nuo laikymo trukmės, esant skirtingoms PUK sintezės temperatūroms (A – [PVA]:[IPDI] = 1:4; B – [PVA]:[HMDI] = 1:3; t = 90 min).

kovalentiniu būdu, o, esant aukštomis sintezės temperatūroms – fizikiniu būdu.

Taip pat nustatyta PUK, gautų iš PVA ir HMDI, sintezės temperatūros įtaka Ma IP stabilumui (3.30 pav. B). Pakėlus PUK sintezės temperatūrą nuo 70 iki 90 °C, gautas IP stabilumas padidėja, o po to išlieka panašus, kai PUK sintezė vykdyta 110 °C temperatūroje. Šiais atvejais Ma IE didėjo nuo 76 iki 97 %. Izocianatograpių 110 °C temperatūroje sintetintose PUK mikrodalelėse praktiškai nėra. 3.2.3 skyriuje teigiama, kad, didinant sintezės temperatūrą, mažėja PUK paviršiaus plotas ir bendras akučių tūris. Tačiau susidaro geros sąlygos fermentui imobilizuotis fizikinės adsorbcijos būdu 30-80 nm pločio

akutėse, kurių mikrodalelėse pakankamai daug (3.21 B pav.). Todėl saugojimo metu tik maža dalis desorbuojasi ar deaktyvuojasi.

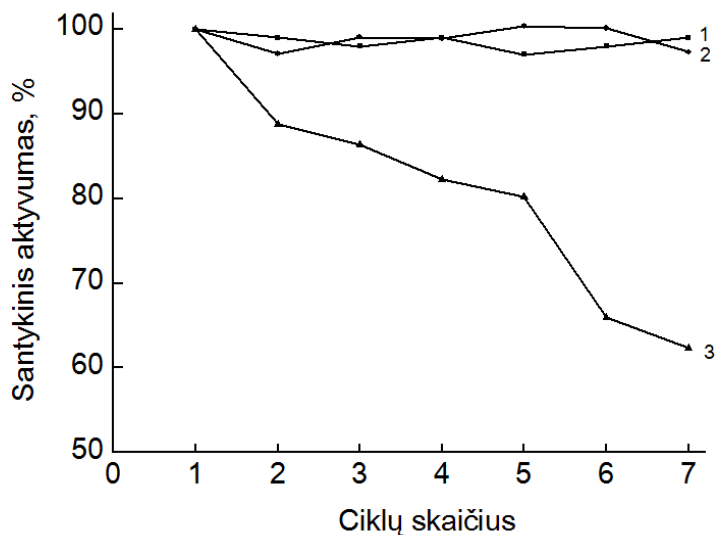
Ma IP stabilumas priklauso nuo PUK mikrodalelių sintezės sąlygų. Po 28 parų, geriausiu stabilumu pasižymi IP, kai PUK mikrodalelių sintezei naudota: [PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1:(0,75:0,25), $t = 90$ min. ir $T = 90$ °C; [PVA]:[IPDI] = 1:4, $t = 60$ -90 min. ir $T = 90$ °C; bei [PVA]:[HMDI] = 1:3, $t = 60$ min ir $T = 90$ °C. Iš gautų rezultatų, galima teigti, kad šiais atvejais Ma imobilizavimas pagrinde vyko kovalentiniu būdu. Kitais atvejais vyravo mišrus imobilizavimo būdas.

3.3.2.2 *Ma IP krakmolo hidrolizės ciklinio režimo tyrimas*

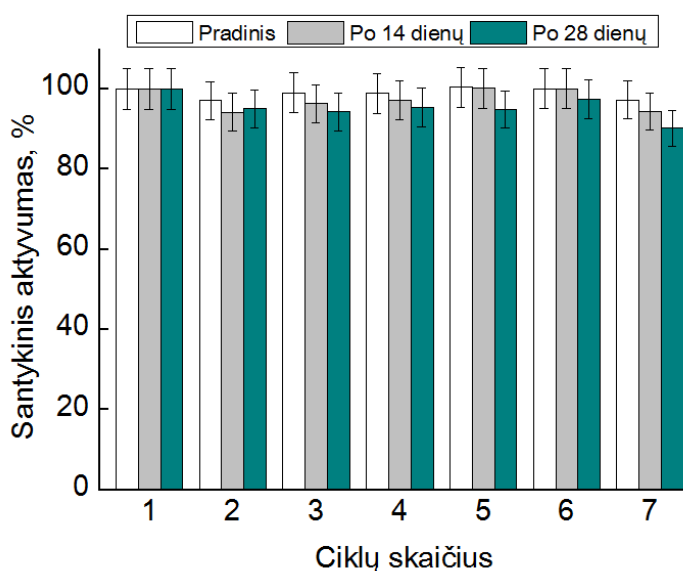
Fermentai imobilizuojami ant nešiklio ne vien tam, kad būtų padidintas jų stabilumas saugojimo metu ar juos transportuojant, bet ir norit IP panaudoti kelis kartus. Be to, daugkartinis IP panaudojimas sumažina fermentacijos, IP gali būti atskiriami nuo produkto ar substrato, tiesiog jį nufiltruojant ir t.t. Ciklinis režimas parodo, kaip fermentas elgiasi dinaminėmis sąlygomis, nes, jei fermentas prie nešiklio prisikabinęs silpnai ar tiesiog difundavęs į akutes, atsikabina greičiau, negu tiriant stabilumą statinėmis sąlygomis. Todėl greičiau sumažėja IP SA vertė.

Septynių ciklų krakmolo hidrolizės tyrimai buvo atlikti, kai Ma imobilizuota ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HDI-TDI mišinio, kai jų pradinis molinis santykis 1:(0,75:0,25), iš PVA ir IPDI, kai jų santykis 1:4, bei iš PVA ir HMDI, kai jų santykis 1:3, esant sintezės trukmei 90 min. ir $T = 90$ °C (3.31 pav.). Išanalizavus duomenis, nustatyta, kad, naudojant IP, gautus iškart po Ma imobilizavimo, kai Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių susintetintų iš PVA ir HDI-TDI mišinio arba IPDI, Ma SA po 7 ciklų krakmolo hidrolizės praktiškai nepakito. Todėl galima teigti, kad fermentas yra stabiliai prisikabinęs prie PUK mikrodalelių.

Tuo tarpu, naudojant imobilizuotą Ma ant PUK mikrodalelių, susintetintų



3.31 pav. Imobilizuotos Ma ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir diizocianatų, SA priklausomybė nuo krakmolo hidrolizės ciklų skaičiaus: 1 – [PVA]:([HDI:TDI]) = 1:(0.75:0.25), 2 – [PVA]:IPDI = 1:4.0, 3 – [PVA]:HMDI = 1:3.0 (t = 90 min, T = 90 °C).



3.32 pav. Imobilizuotos Ma ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, SA priklausomybė nuo krakmolo hidrolizės ciklų skaičiaus.

iš PVA ir HMDI, gauta, kad jau po antro ciklo IP SA sumažėja iki 89 %. Po septynių ciklų IP SA sumažėja iki 62 %. Galima teigti, kad dalis fermento, kuris buvo imobilizavęsis fizikiniu būdu prie PUK mikrodalelių, naudojimo metu išsiplovė.

7 ciklų krakmolo hidrolizė taip pat buvo atlikta, naudojant IP, kai Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir IPDI, ne iškart, o po 14 ir 28 parų saugojimo (3.32 pav.). Nustatyta, kad, naudojant šiuos IP, SA sumažėjo iki 95 ir 90 %.

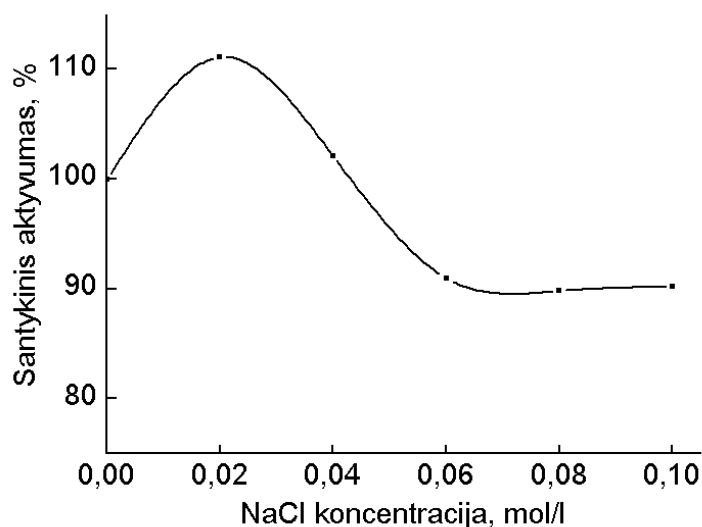
Remiantis rezultatais, galima teigti, kad gauti IP yra stabilūs tiek tiriant statinėmis, tiek dinaminėmis sąlygomis.

Panaudojus Ma IP, atlikti 7 krakmolo hidrolizės ciklai ir nustatyta, kad IP yra stabilūs, kai Ma imobilizuota ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir (HDI:TDI) bei IPDI. Tačiau, naudojant Ma, imobilizuotą ant PUK, susintetintų iš PVA ir HMDI, po 7 ciklų Ma SA sumažėjo iki 62 %. Vadinasi, Ma ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, imobilizavosi nestipriu fizikinės adsorbcijos būdu.

3.3.2.3 Joninės jėgos įtaka tirpiai ir ant PUK mikrodalelių imobilizuotai Ma

Žinoma, kad fermentai gali imobilizuotis ant nešiklių, susidarant kovalentiniams ryšiams arba fizikinės sorbcijos būdu (dėl hidrofobinės ir *Van der Waals'o* sąveikų, susidarant vandeniliniams ir joniniams ryšiams) [294, 295]. Kartais atskirti, kaip fermentas yra prisijungęs prie nešiklio, yra sunku ir, tik įdėjus druskos, tai yra įvedant joninę jėgą, galima nustatyti, ar fermentas yra prisijungęs fizikinės sorbcijos būdu, ar kovalentiniu ryšiu [294, 297, 298]. Druskų pridėjimas gali fermentą aktyvuoti arba deaktyvuoti [299, 300].

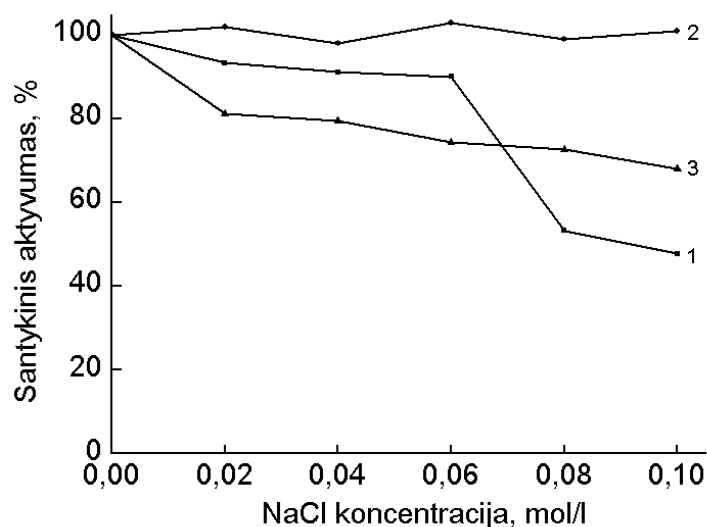
Norint įvesti joninę jėgą ir įvertinti jos poveikį Ma IP, visų pirma reikia įsitikinti, ar druskos pridėjimas nepakeičia tirpios Ma aktyvumo (3.33 pav.).



3.33 pav. Tirpios Ma SA priklausomybė nuo NaCl koncentracijos.

Nustatyta, kad, į krakmolo tirpalą įdėjus 0,02 M NaCl ir įvykdžius fermentinę reakciją, Ma SA padidėjo 11 %, o, padidinus NaCl koncentraciją iki 0,06 M, Ma SA sumažėjo iki 91 %, o toliau didinant iki 0,10 M – nekinta. Galima daryti prielaidą, kad mažas NaCl kiekis suaktyvina tirpią Ma, bet didesnis – dalinai inhibuoja fermentą.

Norint įsitikinti, ar fermentas prie PUK mikrodalelių imobilizuotas stipriai, Ma IP preparatai buvo laikomi 20 min citratiniame buferyje (pH = 5,0), kuriame yra 0-0,1 M NaCl. Po to IP buvo praplauti su buferiniu tirpalu ir vykdoma fermentinė krakmolo hidrolizė (3.34 pav.). Nustatyta, kad IP preparato, kai PUK mikrodalelės susintetintos iš PVA ir IPDI, SA nepriklauso nuo NaCl koncentracijos. Todėl galima teigti, kad fermentas didesne dalimi imobilizavosi kovalentiniu ryšiu. Manoma, kad tokiam geram IP stabilumui įtakos galėjo turėti didelis PUK mikrodalelių paviršiaus plotas ($113 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), didelis bendras akučių tūris ($0,46 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$), kurio didelę dalį sudaro 30-70 nm dydžio akutės, o dominuoja 32 nm. Tuo tarpu, paveikus joninę jėgą IP, kai Ma imobilizuota ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir HDI bei TDI mišinio, nustatyta, kad IP SA priklauso nuo NaCl



3.34 pav. Ant PUK mikrodalelių imobilizuotos Ma SA priklausomybė nuo NaCl koncentracijos: 1 – [PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1:(0,75:0,25); 2 – [PVA]:[IPDI] = 1:4; 3 – [PVA]:[HMDI] = 1:3 (t = 90 min., T = 90 °C).

koncentracijos buferiniame tirpale. Padidinus NaCl koncentraciją iki 0,06 M, IP SA sumažėja iki 90 %, o, padidinus NaCl koncentraciją iki 0,10 M, sumažėjo iki 48 %. Manoma, kad apie 10 % fermento prie PUK paviršiaus galimai buvo prisijungęs hidrofobine sąveika, 40 % – vandenilniais ir joniniais ryšiais, o likę 48 % – pagrinde kovalentiniu ryšiu. Iš PUK sintezės duomenų (3.1.1 skyrius) žinoma, kad PUK mikrodalelės, susintetintos iš PVA ir HDI bei TDI mišinio, turi didžiausią izocianatograpių kiekį (9 %), tačiau mažiausią paviršiaus plotą ($4 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Vadinasi, galima teigti, kad imobilizavimo metu dalis PUK izocianatograpių sureagavo su vandeniu, susidarant amino grupei, o kita dalis sureagavo su Ma amino- ir hidroksigrupėmis.

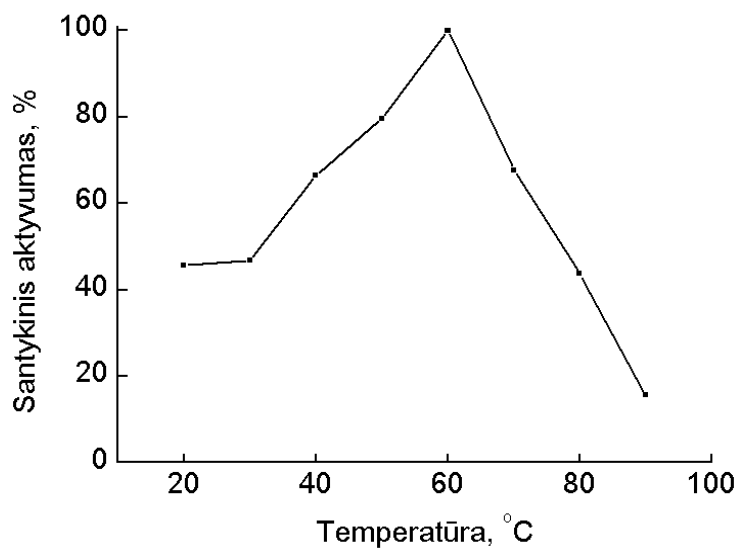
Kai Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir HMDI, nustatyta, kad, didinant NaCl koncentraciją iki 0,1 M, Ma palaipsniui desorbuojasi nuo PUK mikrodalelių paviršiaus, o IP SA sumažėja iki 68 %. Iš PUK sintezės duomenų (3.1.3 skyrius) žinoma, kad PUK mikrodalelėse izocianatograpių kiekis buvo 0,7 %, o paviršiaus plotas –

$68 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (3.2.3 skyrius). Todėl manoma, kad šiuo atveju 32 % fermento buvo prijungta fizikinės adsorbcijos būdu, o 68 % – pagrindė kovalentiniu ryšiu.

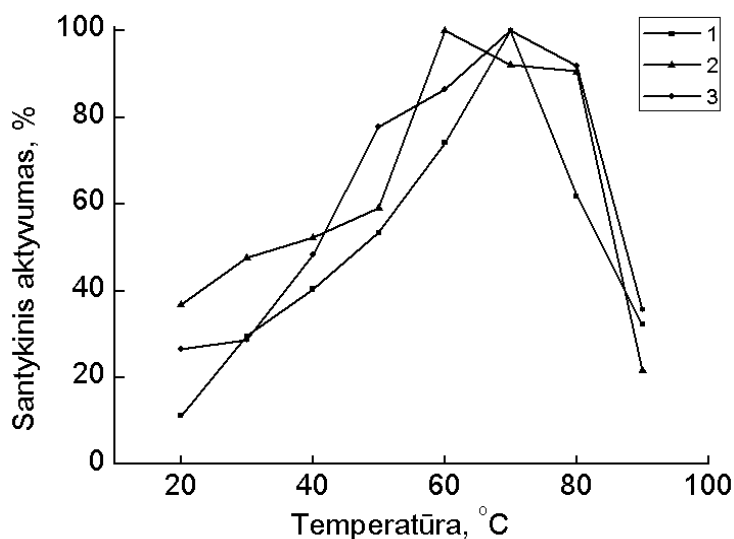
Apibendrinant galima prieiti prie išvadų, kad 0,02 M NaCl koncentracija aktyvina tirpią Ma, o didesnis kiekis – deaktyvuoja. Desorbuojant fermentą nuo nešiklio, į buferinį tirpalą įvedant 0,1 M NaCl, nustatyta, kad Ma, imobilizuotos ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, SA nekinta, o Ma imobilizavus ant PUK, susintetintų iš PVA ir HDI-TDI mišinio bei PVA ir HMDI, SA atitinkamai sumažėjo iki 48 % ir 68 %.

3.3.2.4 Tirpios ir ant PUK mikrodalelių imobilizuotos Ma optimalios temperatūros nustatymas

Imobilizuojant fermentus ant organinių ar neorganinių nešiklių, dažnai pasikeičia imobilizuotų fermentų savybės: stabilumas, optimali temperatūra (fermento aktyvumas yra didžiausias), enantioselektyvumas, Michaelio konstanta (K_M), greičio konstanta (V_{MAX}) ir t. t. [295]. Fermento optimalios veikimo temperatūros nustatymas yra svarbus faktorius, nes, žinant fermento veikimo temperatūros ribas, yra galimybė nuspėti reakcijos eigą. Išanalizavus tirpios Ma SA priklausomybę nuo substrato temperatūros, nustatyta, kad tirpios Ma optimali temperatūra yra $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (3.35 pav.). Nustatyta fermento optimali temperatūra yra tokia pati, kokia yra deklaruojama [301]. Išanalizavus rezultatus, galima teigti, kad, esant žemoms temperatūroms ($20\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$), fermento SA yra apie 45 %, o, pakėlus temperatūrą nuo 60 iki $90 \text{ }^\circ\text{C}$, fermento aktyvumas staigiai krenta ir siekia vos 16 %. Ištyrus ant PUK mikrodalelių imobilizuotos Ma optimalias temperatūras, nustatyta, kad jos priklauso nuo PUK sintezei naudoto diizocianato (3.36 pav.). Ma, imobilizuotos ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, optimali temperatūra yra $70 \text{ }^\circ\text{C}$, o tai yra $10 \text{ }^\circ\text{C}$ aukščiau, lyginant su tirpios Ma optimalia temperatūra. Padidinus temperatūrą iki $80 \text{ }^\circ\text{C}$, IP SA staigiai mažėja. Tuo tarpu, Ma, imobilizuotos ant



3.35 pav. Tirpios Ma SA priklausomybė nuo terpės temperatūros.



3.36 pav. Ant PUK mikrodalelių imobilizuotos Ma SA priklausomybė nuo terpės temperatūros: 1 – [PVA]:[IPDI] = 1:4; 2 – [PVA]:([HDI]:TDI) = 1:(0,75:0,25); 3 – [PVA]:[HMDI] = 1:3 (t = 90 min, T = 90 °C)).

PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir diizocianatų mišinio (HDI ir TDI) bei HMDI, optimali temperatūra atitinkamai yra 60 °C ir 70 °C. Tačiau šiais atvejais yra temperatūrų zonos, kuriose IP SA yra didesnis kaip 90 %. Imobilizuotos Ma ant PUK mikrodalelių, gautų iš PVA ir HDI bei TDI mišinio, atveju ši zona yra 60-80 °C temperatūros ribose. Padidinus

temperatūrą iki 90 °C, IP SA staigiai krenta. Ma, imobilizuotai ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, ši zona yra 70-80 °C. Pakėlus temperatūrą iki 90 °C ir šiuo atveju fiksuojamas staigus IP SA kritimas.

Įvertinus gautus duomenis, galima teigti, kad, imobilizavus Ma ant PUK, padidėja fermento optimali temperatūra, o fermentas tampa stabilesniu. Iš gautų rezultatų galima prieiti prie išvadų, kad, imobilizavus Ma ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir diizocianatų mišinio arba HMDI, galima pasirinkti šių IP panaudojimo temperatūrą ribose, kuriose IP SA yra didesnis kaip 90 %. Vadinas, atliekant krakmolo hidrolizę, nebūtina tiksliai laikytis temperatūros režimo, o jis gali kisti nustatytame optimalios temperatūros intervale.

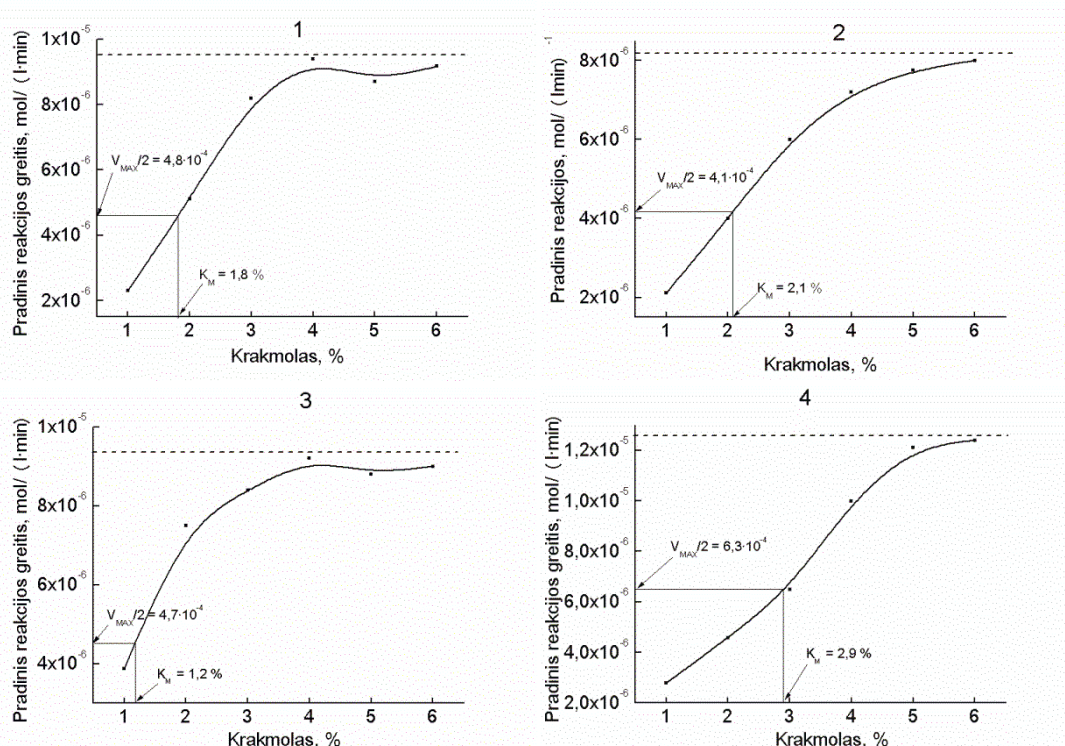
3.3.2.5 Tirpios ir imobilizuotos maltogeninės α -amilazės K_M ir V_{MAX} nustatymas

Dirbant su fermentais svarbu žinoti, kokie yra fermento K_M ir V_{MAX} . Žinant šias konstantas, galima lengviau nuspėti rezultatus, žinoti, koks fermento kiekis yra reikalingas atlikti konkrečiai užduočiai ir per kiek laiko.

Žemiau pateikti rezultatai yra orientaciniai, nes Ma K_M ir $V_{MAX}/2$ vertės turėtų būti nustatomos, kai substratas yra maltotriozė [301] arba krakmolas [271], o produktas – maltozė. O. Gaouar [271] nustatė, kad, kai substratas yra krakmolas, Ma $K_M = 1 \%$ (9,64 g·l⁻¹ krakmolo), o $V_{MAX} = 0,00247$ mol·(min·l)⁻¹ maltozės.

Tačiau šio tyrimo atveju buvo bandoma nustatyti krakmolo hidrolizės K_M ir V_{MAX} konstantas, kai substratas yra krakmolas, o galutinis produktas – įvairaus ilgio oligosacharidų mišinys, nes žinoma, kad Ma ne tik atskelia galutinį produktą – α konfigūracijos maltozę, bet taip pat skaido ilgą krakmolo grandinę atsitiktinėse vietose. Be to, esant tam tikrai mažamolekulių cukrų koncentracijai, gali pradėti vykdyti transglikozilinimo reakcijos [169]. Iš eksperimento duomenų galima teigti, kad būtent dėl Ma specifiškumo

nepavyko atvirkštinėse koordinatėse nustatyti tikrųjų K_M ir V_{MAX} verčių, o nustatytos tik orientacinės vertės (3.37 pav.), kurios leidžia palyginti tarpusavyje tirpios Ma ir Ma IP, gautus naudojant skirtingas PUK mikrodaleles. Šiems tyrimams Ma imobilizuota ant PUK mikrodalelių, susintetintų esant $[PVA]:([HDI]:[TDI]) = 1:(0,75:0,25)$, $[PVA]:[IPDI] = 1:4$ ir $[PVA]:[HMDI] = 1:3$. Visos PUK mikrodalelės susintetintos, esant 90 min. trukmei ir 90 °C temperatūrai. Gauta, kad tirpios Ma K_M vertė yra 1,8 %, o $V_{MAX}/2 = 4,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{l})^{-1}$. Tuo tarpu, imobilizuoto fermento ant PUK



3.37 pav. Tirpios (1) ir imobilizuotos ant PUK mikrodalelių Ma K_M ir $V_{MAX}/2$ vertės: 2 – [PVA] ir $([HDI]:[TDI]) = 1:(0,75:0,25)$; 3 – [PVA] ir IPDI = 1:4,0; 4 – [PVA] ir [HMDI] = 1:3; ($t = 90 \text{ min}$, $T = 90 \text{ }^\circ\text{C}$).

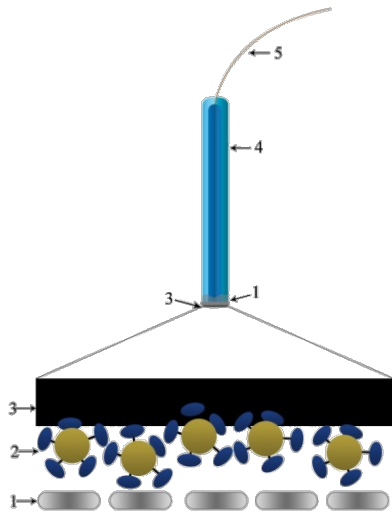
mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, K_M yra 1,2 %, Ma ant PUK mikrodalelių iš PVA ir HDI bei TDI mišinio, K_M yra 2,1 %, o PVA ir HMDI atveju K_M lygi 2,9 %. Vadinasi, imobilizavus fermentą ant mikrodalelių iš PVA ir IPDI, Ma tapo giminingesnė krakmolo substratui, nei tirpus fermentas. Taip pat galima teigti, kad fermento imobilizavimas ant kitų dviejų nešiklių

pablogino fermento giminingumą substratui. Išanalizavus reakcijos greičius, nustatyta, kad, imobilizavus Ma ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir HMDI, $V_{MAX}/2$ yra lygus $6,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{l})^{-1}$, o tai yra 1,3 karto didesnis, lyginant su tirpaus fermento $V_{MAX}/2$ reikšme. Imobilizavus fermentą ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, $V_{MAX}/2$ yra lygus $4,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{l})^{-1}$, tai yra beveik toks pat, kaip tirpaus fermento. Blogiausias $V_{MAX}/2$ gautas, kai Ma buvo imobilizuota ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir diizocianatų mišinio ($4,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot (\text{l} \cdot \text{min})^{-1}$).

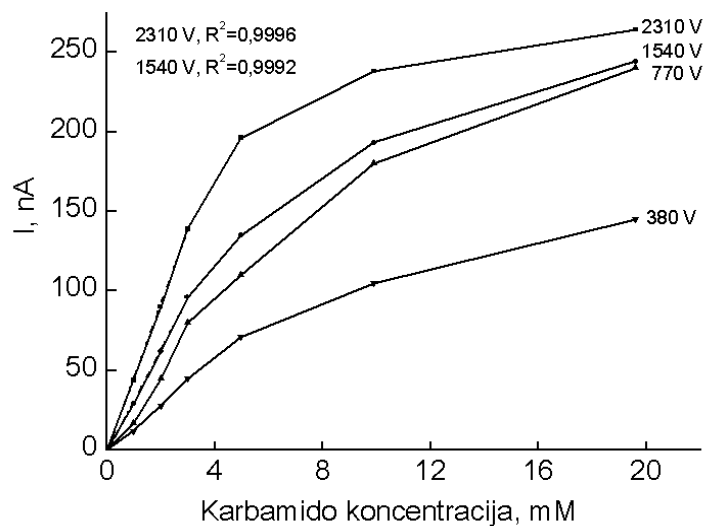
Apžvelgus rezultatus, galima konstatuoti, kad geriausia fermentą imobilizuoti ant PUK mikrodalelių, susintetintų iš PVA ir IPDI, nes sumažėja K_M vertė, o reakcijos greitis praktiškai identiškas tirpiam fermentui.

3.3.3 PUK mikrodalelių taikymas ureazei imobilizuoti

Bendradarbiaujant su Vilniaus Universiteto Biochemijos instituto mokslininkais, ant PUK mikrodalelių imobilizuotas fermentas ureazė (EC.3.5.1.5, išgauta iš *Jack beans*, aktyvumas = $77 \text{ V} \cdot \text{mg}^{-1}$, *Sigma*). Ureazei imobilizuoti pasirinktos PUK mikrodalelės, susintetintos iš PVA ir IPDI, esant jų moliniam santykiui 1:4, kai $t = 90 \text{ min.}$, $T = 90 \text{ }^\circ\text{C}$, nes ant šio nešiklio imobilizuota Ma pasižymėjo geriausiomis savybėmis. Ureazės imobilizavimas buvo atliktas pagal 2.3.2 metodiką, tik ureazė imobilizuota fosfatinio buferio terpėje (0,01 M, pH = 7,3) $20 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Tyrimams naudota 0,5 g šlapių PUK mikrodalelių, ant kurių imobilizuotas skirtingas ureazės kiekis: 380, 770, 1540 ir 2310 V. IP buvo panaudotas elektrocheminiam biojutikliui kurti (3.38 pav.). Biojutiklis skirtas nustatyti karbamido kiekiui piene [302]. Šio biojutiklio detektavimas paremtas chronoamperometrijos metodu. Tai – elektrocheminis tyrimo metodas, kurio metu fiksuojamas elektros srovės kitimas laike, esant pastoviam elektrodo potencialui. Nustatyta, kad jutiklio signalo atsako stipris priklauso nuo karbamido koncentracijos terpėje, esant

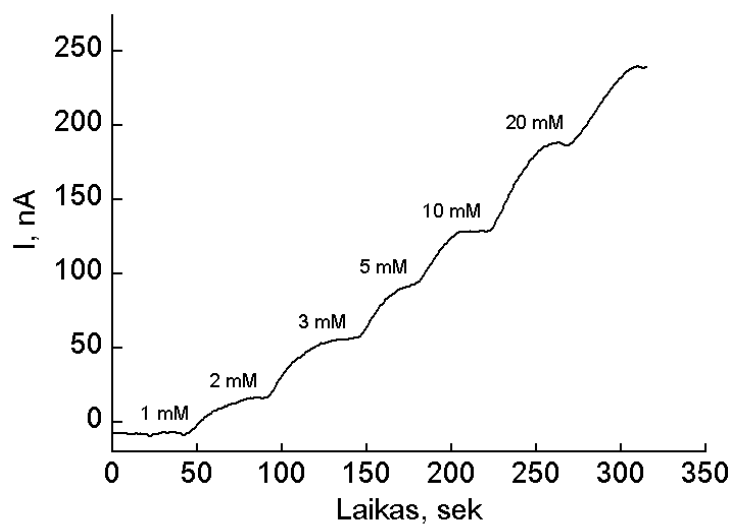


3.38 pav. Principinė biojutiklio schema. 1 – pusiau pralaidi lavsano plėvelė, 2 – ant polimerinio nešiklio imobilizuotos ureazės sluoksnis, 3 – modifikuoto grafito sluoksnis, 4 – biojutiklio korpusas, 5 – kontaktinis laidas, kuriuo prisijungiama prie potenciostato.

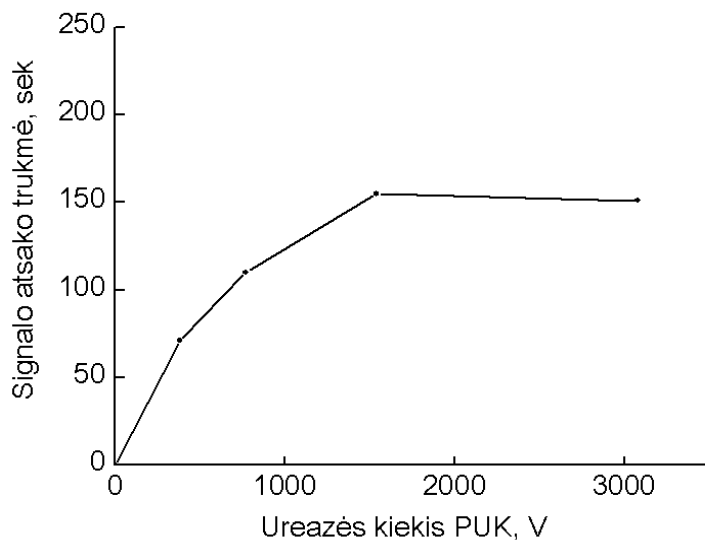


3.39 pav. Jutiklio atsako srovės stiprio priklausomybė nuo imobilizuotos ureazės kiekio ant PUK mikrodalelių.

skirtingam imobilizuotam ureazės kiekiui ant PUK mikrodalelių (3.39 pav.). Didžiausias signalo atsako srovės stipris išmatuotas, kai buvo imobilizuota 2310 V ir 1540 V ureazės ant PUK nešiklio. Iš 3.39 pav. nustatyta, kad tiesinė priklausomybė gaunama, esant karbamido koncentracijai nuo 0 iki 5 mM. Tyrimams buvo pasirinktas biojutiklio, kuris sukonstruotas naudojant PUK



3.40 pav. Biojutiklio atsako trukmės priklausomybė nuo karbamido koncentracijos.

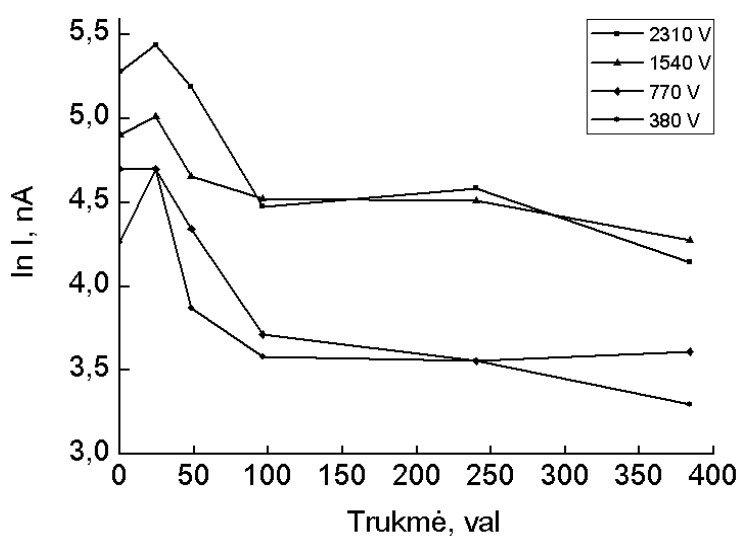


3.41 pav. Biojutiklio signalo atsako trukmės priklausomybė nuo imobilizuotos ureazės kiekio ant PUK nešiklių, esant 5 mM karbamido.

mikrodaleles, ant kurių imobilizuotas ureazės kiekis yra 1540 V. Gauta, kad jutiklio atsako dydis proporcingas karbamido koncentracijai (3.40 pav.).

Išanalizavus duomenis, tolimesniems tyrimams pasirinkta karbamido koncentracija, kuri yra lygi 5 mM. Esant šiai koncentracijai, gauta, kad

biojutiklio atsako signalo trukmė priklauso nuo skirtingo ureazės kiekio, imobilizuoto ant PUK mikrodalelių (3.41 pav.). Gauta, kad geriausia imobilizavimui naudoti 1540 V ureazės, nes, imobilizuojant didesnius fermento kiekius, signalo atsakas nekinta. Iš stabilumo tyrimo duomenų gauta, kad fermento aktyvumas krenta per pirmąsias 100 valandų. Taip yra todėl, kad vyksta nesurišto fermento desorbcija nuo PUK nešiklio paviršiaus. Ilgėjant



3.42 pav. Biojutiklių stabilumas laike.

saugojimo trukmei iki 400 val., biojutiklio atsakas kinta nežymiai, ypač imobilizuojant ureazės kiekį, kuris lygus 1540 V ir 770 V (3.42 pav.). Tai vyksta dėl savaiminio fermento deaktyvavimosi. Galima daryti išvadą, kad, esant šioms parametrams, ant PUK mikrodalelių imobilizuota ureazė yra tinkama naudoti, nes yra pakankamai didelis srovės stiprio atsakas.

IŠVADOS

1. Pirmą kartą susintetintos akytos poli(uretankarbamidinės) (PUK) mikrodalelės iš poli(vinilo alkoholio) (PVA) ir 1,6-heksametilendiizocianato (HDI) bei 2,4-toluendiizocianato (TDI) mišinio, izoforondiizocianato (IPDI) arba 4,4'-dicikloheksilmetandiizocianato (HMDI). PUK mikrodalelių išeiga ir izocianatograpių kiekis yra mažiausi, sintezei naudojant PVA ir HMDI, didesni – PVA ir IPDI, o didžiausi – PVA ir HDI-TDI mišinį. Ilginant sintezės trukmę bei keliant temperatūrą, PUK išeiga didėja, o izocianatograpių kiekis mažėja, išskyrus PVA-IPDI sistemą, kai didžiausia išeiga gauta, sintezę vykdant 90 °C temperatūroje.
2. PUK mikrodalelių struktūra yra tinklinė. Joje yra hidroksigrapių, uretaninių grandžių ir įvairaus ilgio polikarbamido grandinių, kurios gali baigtis laisva izocianatogrupe. PUK mikrodalelės, nepriklausomai nuo naudoto diizocianato, skyla per dvi stadijas. Esant diizocianato pertekliui, pirmoji skilimo stadija sudaryta iš dviejų etapų. Pirmiausia skyla uretano grandys, tada – trumposios, o po to – ilgesnės, tvarkingesnės struktūros, vandenilniais ryšiais stabilizuotos polikarbamido grandinės.
3. PUK mikrodalelės yra plokštelių pavidalo, akutės – plyšinės formos. PUK mikrodalelių paviršiaus plotas yra mažiausias, sintezei naudojant PVA ir HDI-TDI mišinį ($4\text{-}5\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), didesnis – PVA-HMDI ($28\text{-}68\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), o didžiausias – PVA ir IPDI ($71\text{-}122\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$). Bendro akučių tūrio kitimo tendencija yra ta pati. PUK mikrodalelėse dominuoja 32-40 nm pločio akutės.
4. Didžioji dalis Ma ant PUK mikrodalelių imobilizuota kovalentiniu būdu. IE yra didžiausias, kai Ma imobilizuota ant PUK mikrodalelių, sintezę vykdant iš PVA ir HMDI arba iš PVA ir HDI-TDI mišinio (IE \approx 98 %), o IE yra mažesnis – kai iš PVA ir IPDI (IE = 72 %).

5. Didžiausias IP stabilumas gautas, kai Ma imobilizuota ant PUK mikrodalelių, kurios susintetintos iš PVA ir IPDI, esant optimalioms sąlygoms ($[PVA]:[IPDI] = 1:4$, $t = 90$ min., $T = 90$ °C), nes IP išlieka stabilūs po 28 parų saugojimo, Ma santykinis aktyvumas nekinta, naudojant IP 7 ciklą krakmolo hidrolizei, o Ma desorbicija nuo PUK mikrodalelių nevyksta, pridėjus 0,1 M NaCl.
6. Ma IP optimali temperatūra yra 10-20 °C didesnė už tirpaus fermento optimalią temperatūrą. Ma imobilizuoti tinkamiausios yra optimaliomis sąlygomis iš PVA ir IPDI susintetintos PUK mikrodalelės, nes sumažėja *Michaelis-Menten* konstantos vertė, palyginus su tirpia Ma, o maksimalūs reakcijos greičiai yra praktiškai vienodi.
7. Ant PUK mikrodalelių, kurios suintetintos optimaliomis sąlygomis iš PVA ir IPDI, imobilizuota Ma gali būti panaudota krakmolo hidrolizei. Šios PUK mikrodalelės panaudotos ureazei imobilizuoti ir biojutikliams, skirtiems karbamido kiekiui nustatyti, kurti.

PUBLIKUOTŲ DARBŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Moksliniai straipsniai žurnaluose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą:

1. Strakšys, A., Kochanė, T., Budrienė, S. Synthesis and characterization of poly(urethane-urea) microparticles from poly(vinyl alcohol) and binary blends of diisocyanates and their application for immobilization of maltogenic α -amylase. *Chemija*, 2013, 24(2), p. 160-169.
2. Strakšys, A., Kochanė, T., Budrienė, S. Preparation and characterization of porous poly(urethane-urea) microparticles from poly(vinyl alcohol) and isophorone diisocyanate. *Chemija*, 2015, 26(2), p. 132-140.
3. Strakšys, A., Kochanė, T., Budrienė S., Catalytic properties of maltogenic α -amylase immobilized onto PUU microparticles (pateiktas žurnalui „*Biotechnology Journal*“).

Moksliniai straipsniai kituose recenzuojamuose tarptautiniuose ir užsienio leidiniuose (ISI Proceedings)

1. Straksys, A., Budriene, S., Romaskevici, T., Zeltuchina, I. Preparation of polyurethane microparticles using poly(vinyl alcohol) and binary blends of diisocyanates. *Polymer Chemistry and Technology: proceedings of Scientific Conference Chemistry and Chemical Technology*. Kaunas, Lithuania, 2009, p. 100-104.
2. Razumiene, J., Sakinyte, I., Kochane, T., Maciulyte, S., Straksys, A., Budriene, S, Barkauskas, J. Carbon electrode based urea sensor modification of graphite and new polymeric carriers for enzyme immobilization. *BIODEVICES 2013 – International Conference on Biomedical Electronics and Devices 2013*. Barselona, Spain, 2013, p. 197-201.

Tarptautinių konferencijų medžiaga

1. Straksys, A., Budriene, S., Romaskevici, T., Zeltuchina, I. Preparation and use of Maltogenase bound to polyurethane microparticles. *Programme and Proceedings of Baltic Polymer Symposium 2009*. Ventspils, Latvia, 2009, p. 96.
2. Budriene, S., Straksys, A., Romaskevici, T. Development of PVA-based polyurethane microparticles for enzyme immobilization. Proceedings of European Polymer Congress EPF 2011. Granada, Spain, 2011, 1342.
3. Straksys, A., Kozlovskaja, A., Kochane, T., Budriene, S. Synthesis and characterization of poly(urethane-urea) microparticles using poly(vinyl alcohol) and 4,4'-methylenebis(cyclohexyl isocyanate). *Programme and Proceedings of Baltic Polymer Symposium 2012*. Liepaja, Latvia, 2012, p. 83.

Tarptautinių konferencijų tezės

1. Straksys, A., Jelinskaite, V., Romaskevici, T., Budriene, S. Influence of additives on structure of poly(vinyl alcohol) – based polyurethanes. *Baltic Polymer Symposium 2008: Programme and Book of Abstracts*. 2008, Otepaa, Estonia, p. 53.
2. Straksys, A., Budriene, S., Romaskevici, T. Modification of polyurethane microparticles for the attachment of bioactive compounds. *Baltic Polymer Symposium 2010: Programme and Book of Abstracts*. Palanga, Lithuania, 2010, p. 74.
3. Budriene, S., Straksys, A., Kozlovskaja, A., Romaskevici T. Synthesis of poly(vinyl alcohol) based polyurethanes: comparison of different diisocyanates. *Baltic Polymer Symposium 2010: Programme and Book of Abstracts*. Palanga, Lithuania, 2010, p. 75.

4. Straksys, A., Budriene, S., Romaskevicius, T. Maltogenase immobilization on polyurethane microparticles by covalent attachment. *Baltic Polymer symposium 2011: Programme and Book of Abstracts*. Parnu, Estonia, 2011, 59.
5. Razumiene, J., Sakinyte, I., Kochane, T., Maciulyte, S., Straksys, A., Budriene, S., Barkauskas, J. Carbon electrode based urea sensor modification of graphite and new polymeric carriers for enzyme Immobilization. *BIODEVICES 2013 - International Conference on Biomedical Electronics and Device*. Final Program and Book of Abstracts. Barselona, Spain, 2013, p. 30.
6. Razumiene, J., Sakinyte, Gurevičienė V., Kurtinaitienė B., Strakšys A., Kochane, T., Budriene, S. Polymeric carriers for immobilization of biocatalysts. *Fifth International Symposium: Advanced micro- and mesoporous materials*. Golden Sands, Bulgaria, 2013, p. 80.
7. Straksys, A., Dulko, A., Razumiene, J., Sakinyte, J., Kochane, T., Budriene, S. Immobilization and catalytic properties of maltogenic α -amylase on PUU microparticles. *Baltic Polymer Symposium 2013: Programme and abstracts*. Trakai, Lithuania, 2013, p. 166.
8. Strakšys, A., Kochane, T., Mačiulytė, S., Dulko, A., Budrienė, S. Polyurethane microparticles bound Maltogenase: preparation and study. *Chemistry 2013: 11th international conference of Lithuanian chemists: Abstracts*. Vilnius, Lithuania, 2013, p. 94.
9. Straksys, A., Kochane, T., Budriene, S. Studies on catalytic activity and properties of immobilized maltogenic α -amylase onto PUU microparticles. *Baltic Polymer symposium 2014: Programme and Book of Abstracts*. Laulasmaa, Estonia, 2014, p. 113.

Nacionalinės konferencijos tezės

1. Straksys, A., Matuseviciute, J., Romaskevicius, T., Budriene, S. Preparation of polyurethane microparticles using poly(vinyl alcohol) and isophorone

diisocyanate. *Chemistry 2009: Book of Abstracts*. Vilnius Lithuania, 2009, p. 112.

CURRICULUM VITAE

<i>Vardas, Pavardė:</i>	Antanas Strakšys
<i>Gimimo data ir vieta:</i>	1981 balandžio 24 d. Vilniaus raj.
<i>Išsilavinimas:</i>	
1999	Salininkų vidurinė mokykla Vidurinis išsilavinimas
1999-2003	Vilniaus universitetas Chemijos fakultetas Chemijos bakalauras
2003-2005	Vilniaus universitetas Chemijos fakultetas Chemijos magistras
2007-2011	Vilniaus universitetas, Chemijos fakultetas, Polimerų chemijos katedra Doktorantūros studijos
<i>Užsienio kalbos:</i>	Anglų, rusų
<i>El.paštas:</i>	antanas.straksys@gmail.com
<i>Dalyvauta projektuose:</i>	
2009	Pramoninės biotechnologijos plėtros programos projektas „Biokatalizatorių imobilizavimo ir jų panaudojimo biotechnologiniuose procesuose tyrimai“ (VMSF, N-10/2009).
2012-2015	„Biotechnologija ir biofarmacija“: fundamentiniai ir taikomieji tyrimai“ (VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-005).

LITERATŪRA

1. Liu J., Qiu F., Cao G., Guan Y., Shen Q., Yang D., Guo Q., Chiral azo polyurethane(urea): preparation, optical properties and low power consumption polymeric thermo-optic switch, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 2011, V. 49, 939-948.
2. Qiu F., Cao Z., Cao G., Guan Y., Shen Q., Wang Q., Yang D., Preparation, optical properties and 1 X 2 polymeric thermo – optic switch of polyurethane-urea, *Mater. Chem. Phys.*, 2012, V. 135, 518-523.
3. Zhuang L., Cao Z., Cao G., Wang Z., Qiu F., Shen Q., Preparation of novel azo polyurethane urea and the research of its optical properties, *Optik*, 2013, V. 124, 2551-2554.
4. Sharifpoor S., Labow R. S., Santerre J. P., Synthesis and characterization of degradable polar hydrophobic ionic polyurethane scaffolds for vascular tissue engineering applications, *Biomacromolecules*, 2009, V. 10, 2729-2739.
5. Dong Z., Li Y., Zou Q., Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering, *Appl. Surf. Sci.*, 2009, V. 255, 6087-6091.
6. Kreider A., Richter K., Sell S., Fenske M., Tornow C., Stenzel V., Grunwald I., Functionalization of PDMS modified and plasma activated two-component polyurethane coatings by surface attachment of enzymes, *Appl. Surf. Sci.*, 2013, V. 273, 562-569.
7. Phadtare S., Kumar A., Vinod V. P., Dash C., Palaskar D. V., Rao M., Shukla P. G., Sivaram S., Sastry M., Direct assembly of gold nanoparticle "shells" on polyurethane microsphere "core" and their application as enzyme immobilization templates, *Chem. Mater.*, 2003, V. 15, 1944-1949.
8. Wurtz A., Vokietijos patentas 71326, 1849.
9. Bayer O., Vokietijos patentas 728981, 1937.
10. Rinke H., Schild H., Siefken W. (I.G. Farben), Diol-diisocyanate high molecular polymerization products, 1950, *U.S. patent 2,511,544*.
11. Szycher M., Szycher's handbook of polyurethanes (Second edition), *CRC Press LLC*, Florida, 2013.
12. Schollenberger C. S., Scott H., Moore G. R., *Rubber world*, 1958, V 137, 549.

13. Wurtz A., *Compt. Rend.*, 1848, V. 89, 242.
14. Hentschel W., *Chem. Ber.*, 1884, V. 17, 1284.
15. Staudinger H., Hauser E., *Helv. Chim. Acta*, 1921, V. 4, 861.
16. Vandenablee-Trambouze O., Mion L., Garrelly L., Commeyras A., Reactivity of organic isocyanates with nucleophilic compounds: amines; alcohols; thiols; oximes; and phenols in dilute organic solutions, *Adv. Environ. Res.*, 2001, V. 6, 45-55.
17. Lonescu M., Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes, *Rapra technology*, Shropshire, 2005.
18. Blahak J., Hubner H., Koster J., Meiners H. J., Thomas H., Odorless catalysts for the synthesis of polyurethanes, 1982, *US patent 4,348,536*.
19. Lomolder R., Plogmann F., Speler P., Selectivity of isophorone diisocyanate in the urethane reaction influence of temperature, catalysts and reaction partners, *J. Coat. Technol.*, 1997, V. 69, 51-57.
20. Lapprand A., Boisson F., Delolme F., Mechin F., Pascault J.-P., Reactivity of isocyanates with urethanes: conditions for allophanate formation, *Polym. Degrad. Stab.*, 2005, V. 90, 363-373.
21. Huang S.-L., Chang P.-H., Tsai M.-H., Chang H.-C., Properties and pervaporation performances of crosslinked HTPB-based polyurethane membranes, *Sep. Purif. Technol.*, 2007, V. 56, 63-70.
22. Trenbeath S.L., Feldman A.M., Nummy L.J., Manufacture of isocyanates, 1983, *US patent 4,377,530*.
23. Klatt F., 1912, *Deutsche Reichs patent 281,687*.
24. Klatt F., 1913, *Deutsche Reichs patent 281,688*.
25. Herrmann W. O., Haehnel W., 1926, *Canada patent 265,172*, 1926, 1927, *Deutsche Reichs patent 450,286*.
26. Staudinger H., Frey K., Starck W., *Ber.Dt. Chem. Ges.*, 1927, V. 60B, 1782.
27. Arranz F., Sanchez-Chaves M., Martinez R., Reaction of poly(vinyl alcohol) with n-butyl isocyanate. Chemical hydrolysis of the resulting polymers, *Angew. Makromol. Chem.*, 1987, V. 152, 79-91.
28. Caro JR S. V., Paik Sung C. S., Merrill E. W., Reaction of hexamethylene diisocyanate with poly(vinyl alcohol) films for biomedical applications., *J. Appl. Polym. Sci.*, 1976, V. 20, 3241-3246.

29. Gebelein C. G., Burnfield K. E., Biologically active modification of polyvinyl alcohol: reaction of phenyl isocyanate with polyvinyl alcohol, *ACS Symp. Ser.*, 1980, V. 121, 83-102.
30. Galiatsatos C., Hajizadeh K., Mark J. E., Heineman W. R., A new method for enzyme membrane preparation based on polyurethane technology: electrode modification for sensor development, *Biosensors*, 1989, V. 4, 393-402.
31. Zhu G. Q., Wang F. G., Gao Q. C., Liu Y. Y., Poly(vinyl alcohol) membrane modified by polyurethane, *Polym. Plast. Technol. Eng.*, 2012, V. 51, 386-390.
32. Nechifor C.-D., Ciobanu C. L., Dorohoi D.-O., Ciobanu C., Polymeric films properties of poly(vinyl alcohol) and poly(hydroxyl urethane) in different concentrations, *U. P. B. Sci. Bull. Series A.*, 2009, V. 71, 97-106.
33. Krumova M., Lopez D., Benavente R., Mijangos C., Perena J. M., Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly(vinyl alcohol), *Polymer*, 2000, V. 41, 9265-9272.
34. Yun J.-K., Yoo H.-J., Kim H.-D., Preparation and properties of waterborne polyurethane-urea/poly(vinyl alcohol) blends for high water vapour permeable coating materials, *Macromol. Res.*, 2007, V. 15, 22-30.
35. Han J. H., Taylor J. D., Kim D. S., Kim Y. S., Kim Y. T., Cha G. S., Nam H., Glucose biosensor with a hydrophilic polyurethane (HPU) blended with polyvinyl alcohol/vinyl butyral copolymer (PVAB) outer membrane, *Sens. Actuators, B.*, 2007, V. 123, 384-390.
36. Semsarzadeh M. A., Ghalei B., Preparation, characterization and gas permeation properties of polyurethane-silica/polyvinyl alcohol mixed matrix membranes, *J. Membr. Sci.*, 2013, V. 432, 115-125.
37. Bonakdar S., Emami S. H., Shokrgozar M. A., Farhadi A., Ahmadi S. A. H., Amanzadeh A., Preparation and characterization of polyvinyl alcohol hydrogels crosslinked by biodegradable polyurethane for tissue engineering of cartilage, *Mater. Sci. Eng., C*, 2010, V. 30, 636-643.
38. Shokrgozar M. A., Bonakdar S., Dehghan M. M., Emami S. H., Montazeri L., Azari S., Rabbani M., Biological evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel crosslinked by polyurethane chain for cartilage tissue engineering in rabbit model, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 2013, V. 24, 2449-2460.

39. Romaskevicius T., Viskantiene E., Budriene S., Ramanaviciene A., Denys G., Immobilization of Maltogenase onto polyurethane microparticles from poly(vinyl alcohol) and hexamethylene diisocyanate, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, V. 64, 172-176.
40. McGarr J. J., Method of making polyurethane powder, 1977, *US patent 4,032,516*.
41. Wang X., Ruckenstein E., Preparation of porous polyurethane particles and their use in enzyme immobilization, *Biotechnol. Prog.*, 1993, V. 9, 661-665.
42. Shukla P. G., Sivaram S., Process for the preparation of polyurethane microspheres, 1998, *US patent 5,814,675*.
43. Shukla P. G., Sivaram S., Polyurethanes microspheres, 1999, *US patent 5,859,075*.
44. Ramanathan L. S., Sivaram S., Process for the preparation of polyurethane spherical particle, 2000, *US patent 6,123,988*.
45. Ramanathan L. S., Shukla P. G., Sivaram S., Synthesis and characterization of polyurethane microspheres, *Pure&Appl. Chem.*, 1998, V. 70, 1295-1299.
46. Ramanathan L. S., Baskaran D., Shukla P. G., Sivaram S., Preparation of polyurethane microspheres via dispersion polycondensation using poly(1,4-isoprene) block poly(ethylene oxide) as steric stabilizer, *Macromol. Chem. Pys.* 2002, V. 203, 998-1002.
47. Herrmann C., Crespy D., Landsfester K., Synthesis of hydrophilic polyurethane particles in non-aqueous inverse miniemulsions, *Colloid. Polym. Sci.*, 2011, V. 289, 1111-1117.
48. Budriene S., Romaskevicius T., Pielichowski K., Pielichowski J., Synthesis and characterization of polyurethane microspheres and their application for immobilization of Maltogenase, *Polym. Adv. Technol.*, 2007, V. 18, 67-71.
49. Tiarks F., Landfester K., Antonietti M., One-step preparation of polyurethane dispersions by miniemulsion polyaddition, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2001, V. 39, 2520-2524.
50. Jabbari E., Khakpour M., Morphology of and release behavior from porous polyurethane microspheres, *Biomaterials*, 2000, V. 21, 2073-2079.

51. Sugano S., Chinwanitcharoen C., Kanoh S., Yamada T., Hayashi S., Tada K., Preparation of aqueous polyurethane dispersions using aromatic diisocyanate, *Macromol. Symp.* 2006, V. 239, 51-57.
52. Yang C.-H., Yang H.-J., Wen T.-C., Wu M.-S., Chang J.-S., Mixture design approaches to IPDI-H6XDI-XDI ternary diisocyanate-based waterborne polyurethanes, *Polymer*, 1999, V. 40, 871-885.
53. Lahtinen M., Price C., Aqueous poly(urethane-urea) dispersions and cast films based on m-TXMDL. 1. Structure-property relationships, *Polym. Int.*, 2002, V. 51, 353-361.
54. Lahtinen M., Pinfield R., Price C., The chain extension of anionic prepolymers in the preparation of aqueous poly(urethane-urea) dispersions, *Polym. Int.* 2003, V. 52, 1027-1034.
55. Cheong I. W., Kong H. C., An J. H., Kim J. H., Synthesis and characterization of polyurethane-urea nanoparticles containing methylenedi-phenyl diisocyanate and isophorone diisocyanate, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2004, V. 42, 4353-4369.
56. Kwak Y.-S., Park S.-W., Kim H.-D., Preparation and properties of waterborne polyurethane-urea anionomers - influences of type of neutralizing agent and chain extender, *Colloid Polym. Sci.*, 2003, V. 281, 957963.
57. Yang J.-E., Lee Y.-H., Koo Y.-S., Jung Y.-J., Kim H.-D., Preparation and properties of waterborne poly(urethane-urea) ionomers - effect of the type of neutralizing agent, *Fibers Polym.*, 2002, V. 3, 97102.
58. Durrieu V., Gandini A., Belgacem M. N., Blayo A., Eisele G., Putaux J.-L., Preparation of aqueous anionic poly-(urethane-urea) dispersions: influence of the nature and proportion of the urethane groups on the dispersion and polymer properties, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2004, V. 94, 700-710.
59. Huh J. H., Kim H. I., Rahman M. M., Kim H. D., Preparation and properties of MDI/H12MDI-based water - borne poly(urethane-urea)s - effects of MDI content and radiant exposure, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, V. 110, 3655-3663.
60. Hirose M., Zhou J., Kadowaki F., UV curable polyurethane-based microspheres, *Colloids Surf., A*, 1999, V. 153, 481-485.

61. Fang Z. H., Shang J. J., Huang Y. X., Wang J., Li D. Q., Liu Z. Y., Preparation and characterization of the heat-resistant UV curable waterborne polyurethane coating modified by bisphenol A, *eXPRESS Polym. Lett.*, 2010, V. 4, 704-711.
62. Yuyama H., Yamamoto K., Shirafuji K., Nagai M., Ma G.-H., Omi S., Preparation of polyurethaneurea (PUU) uniform spheres by SPG membrane emulsification technique, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2000, V. 77, 2237-2245.
63. Hu Q., Liu D., Zeng S., Yi C., Xu Z., Preparation and properties of highly branched waterborne poly(urethane-urea) via A2 + B3 approach, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2010, V. 116, 817-824.
64. Florian P., Jena K. K., Allauddin S., Narayan R., Raju K. V. S. N., Preparation and characterization of waterborne hyperbranched polyurethane-urea and their hybrid coatings, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2010, V. 49, 4517-4527.
65. Zanetti-Ramos B. G., Lemos-Senna E., Soldi V., Borsali R., Cloutet E., Cramail H., Polyurethane nanoparticles from a natural polyol via miniemulsion technique, *Polymer*, 2006, V. 47, 8080-8087.
66. Baruch-Teblum E., Mastai Y., Landfester K., Miniemulsion polymerization of cyclodextrin nanospheres for water purification from organic pollutants, *Eur. Polym. J.*, 2010, V. 46, 1671-1678.
67. Lewandowski K., Krepski L. R., Mickus D. E., Roberts R. R., Heilmann S. M., Larson W. K., Purgett M. D., Koecher S. D., Johnson S. A., McGurran D. J., Rueb C. J., Pathre S. V., Thakur K. A. M., Synthesis and properties of waterborne self crosslinkable sulfo-urethane silanol dispersions, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2002, V. 40, 3037-3045.
68. Turri S., Levi M., Trombetta T., waterborne anionomeric polyurethane-ureas from functionalized fluoropolyethers, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2004, V. 93, 136-144.
69. Wang Z., Hou Z., Wang Y., Fluorinated waterborne shape memory polyurethane urea for potential medical implant application, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2013, V. 127, 710-716.
70. Wu D., Xu F., Sun B., Fu R., He H., Matyjaszewski K., Design and preparation of porous polymers, *Chem. Rev.*, 2012, V. 112, 3959-4015.
71. Dawson R., Cooper A. I., Adams D. J., Nanoporous organic polymer networks, *Prog. Polym. Sci.*, 2012, V. 37, 530-563.

72. Talha Gokmen M., Du Prez F. E., Porous polymer particles-A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications, *Prog. Polym. Sci.*, 2012, V. 37, 365-405.
73. Thomas A., Goetmann F., Antonietti M., Hard templates for soft materials: creating nanostructured organic materials, *M. Chem. Mater.*, 2008, V. 20, 738-755.
74. Lu A. H., Schuth F., Nanocasting: a versatile strategy for creating nanostructured porous materials, *Adv. Mater.*, 2006, V. 18, 1793-1805.
75. Olson D. A., Cheng L., Hillmeyer M. A., Templating nanoporous polymers with ordered block copolymers, *Chem. Mater.*, 2008, V. 20, 869-890.
76. Kim J. K., Yang S. Y., Lee Y., Kim Y., Functional nanomaterials based on block copolymer self-assembly, *Prog. Polym. Sci.*, 2010, V. 35, 1325-1349.
77. Buchmeiser M. R., New ways to porous monolithic materials with uniform pore size distribution, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, V. 40, 3795-3797.
78. Cheng L., Honsho Y., Seki S., Jiang D., light-harvesting conjugated microporous polymers: rapid and highly efficient flow of light energy with a porous polyphenylene framework as antenna, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, V. 132, 6742-6748.
79. Ben T., Ren H., Ma S., Cao D., Lan J., Jing X., Wang W., Xu J., Deng F., Simmons J. M., Qiu S., Zhu G., Targeted synthesis of a porous aromatic framework with high stability and exceptionally high surface area, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, V. 48, 9457-9460.
80. Holst J. R., Stockel E., Adams D. J., Cooper A. I., High surface area networks from tetrahedral monomers: metal catalyzed coupling, thermal polymerization, and „click“ chemistry, *Macromolecules*, 2010, V. 43, 8531-8538.
81. Wood C. D., Tan B., Trewin A., Su F., Rosseinsky M. J., Bradshaw D., Sun Y., Zhou L., Cooper A. I., Microporous organic polymers for methane storage, *Adv. Mater.*, 2008, V. 20, 1916-1921.
82. Jiang J. X., Trewin A., Su F., Wood C. D., Niu H., Jones J. T. A., Khimyak Y. Z., Cooper A. I., Microporous poly(tri(4-ethynylphenyl)amine) networks: synthesis, properties and atomistic simulation, *Macromolecules*, 2009, V. 42, 2658-2666.

83. Dawson R., Su F., Niu H., Wood C. D., Jones J. T. A., Khimyak Y. Z., Cooper A. I., Mesoporous poly(phenylenevinylene) networks, *Macromolecules*, 2008, V. 41, 1591-1593.
84. Yuan S., Dorney B., White D., Kirklin S., Zapol P., Yu L., Liu D.-J., Microporous polyphenylenes with tunable size for hydrogen storage, *Chem. Commun.*, 2010, V. 46, 4547-4549.
85. Rose M., Klein N., Senkovska I., Schrage C., Wollmann P., Bohlmann W., Bohringer B., Fichtner S., Kaskel S., A new route to porous monolithic organic frameworks via cyclotrimerization, *J. Mater. Chem.*, 2011, V. 21, 711-716.
86. Schwab M. G., Fassbender B., Spiess H. W., Thomas A., Feng X., Mullen K., Catalyst-free preparation of melamine-based microporous polymer networks through schiff base chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, V. 131, 7216-7217.
87. Dubinsky S., Petukhova A., Gourevich I., Kumacheva E., Hybrid porous material produced by polymerization-induced phase separation, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 2578-2580.
88. Gao H., Matyjaszewski K., synthesis of functional polymers with controlled architecture by CRP of monomers in the presence of cross-linkers: from stars to gels, *Prog. Polym. Sci.*, 2009, V. 34, 317-350.
89. Al-Muhtaseb S. A., Ritter J. A., Preparation and properties of resorcinol-formaldehyde organic and carbon gels, *Adv. Mater.*, 2003, V. 15, 101-114.
90. Pekala R. W., Schaefer D. W., Structure of organic aerogels. 1. Morphology and scaling, *Macromolecules*, 1993, V. 26, 5487-5493.
91. Cameron N. R., Sherrington D. C., High Internal phase emulsions (HIPEs) – structure, properties and use in polymer preparation, *Adv. Polym. Sci.*, 1996, V. 126, 163-214.
92. Pierre S. J., Thies J. C., Dureault A., Cameron N. R., van Hest J. C. M., Carrete N., Michon T., Weberskirch R., covalent enzyme immobilization onto photoopolymerized highly porous monoliths, *Adv. Mater.*, 2006, V. 18, 1822-1826.
93. Kimmins S. D., Cameron N. R., Functional porous polymers by emulsijon templating: recent advances, *Adv. Funct. Mater.*, 2011, V. 21, 211-225.
94. Zhang H., Cooper A. I., Synthesis and applications of emulsijon-templated porous materials, *Soft Matter.*, 2005, V. 1, 107-113.

95. M. J. Benes, D. Horak, Svec F., Methacrylate-based chromatographic media, *J. Sep. Sci.*, 2005, V. 28, 1855-1875.
96. Garcia-Diego C., Cuellar J., Synthesis of macroporous poly(styrene-co-divinylbenzene) microparticles using n-heptane as the porogen: quantitative effects of the DVB concentration and the fraction on their structural characteristics, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2005, V. 44, 8237-8247.
97. Horak D., Labsky J., Pilar J., Bleha M., Pelzbauer Z., Svec F., The effect of polymeric porogen on the properties of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene domethacrylate), *Polymer*, 1993, V. 34, 3481-3489.
98. Macintyre F. S., Sherrington D. C., Control of porous morphology in suspensijon polymerized poly(divinylbenzene) resins using oligomeric porogens, *Macromolecules*, 2004, V. 37, 7628-7636.
99. Zhou W. Q., Gu T. Y., Su Z. G., Ma G. H., Synthesis of macroporous poly(styrene-divinyl benzene) microspheres by surfactant reverse micles swelling method, *Polymer*, 2007, V. 48, 1981-1988.
100. Gao F., Su Z.-G., Wang P., Ma G.-H., Double emulsijon templated microcapsules with single hollow cavities and thickness-controllable shells, *Langmuir*, 2009, V. 25, 3832-3838.
101. Wu L., Pang G.-C., High-speed large scale chromatographic purification pf plasmid DNA with a novel giant-pore stationary phase, *Chromatographia*, 2007, V. 66, 151-157.
102. Wu L., Bai S., Sun Y., Development of rigid bidisperse porous microspheres for high-speed protein chromatography, *Biotechnol. Prog.*, 2003, V. 19, 1300-1306.
103. Ugelstad J., Kaggerud K. H., Hansen F. K., Berge A., Absorption of low molecular weight compounds in aqueous dispersions of polymer-oligomer particles, 2. A two step swelling process of polymer particles giving an enormous increase in absorption capacity, *Makromol. Chem.*, 1979, V. 180, 737-740.
104. Nakashima T., Shimizu M., Kukizaki M., Membrane emulsification by microporous glas, *Key Eng. Mater.*, 1991, V. 61, 513-516.

105. Kukizaki M., microbubble formation using asymmetric Shirasu porous glass (SPG) membranes and porous ceramic membranes – A comparative study, *Colloids Surf. A.*, 2009, V. 340, 20-32.
106. Choi C. H., Jung J. H., Hwang T. S., Lee C. S., In situ microfluidic synthesis of monodisperse PEG microspheres, *Macromol. Res.*, 2009, V. 17, 163-167.
107. Hyuk Im S., Jeong U., Xia Y., Polymer hollow particles with controllable holes in their surfaces, *Nat. Mater.*, 2005, V. 4, 671-675.
108. Schappacher M., Deffieux A., Synthesis of macrocyclic copolymer brushes and their self-assembly into supramolecular tubes, *Science*, 2008, V. 319, 1512-1515.
109. Hang J., Song G., Guo R., Fabrication of polymer hollow nanospheres by a swelling-evaporation strategy, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 2007, V. 45, 2638-2645.
110. Fan C., Qiu H., Ruan J., Terasaki O., Yan Y., Wei Z., Che S., Formation of chiral mesopores in conducting polymers by chiral-lipid-ribbon templating and „seeding“ route, *Adv. Funct. Mater.*, 2008, V. 18, 2699-2707.
111. Silverstein M. S., Cameron N. R., Hillmayer M. A., Eds. Porous Polymers, *Wiley, Hoboken, NJ*, 2011.
112. Dubinsky S., Zhang H., Nie Z., Gourevich I., Voicu D., Deetz M., Kumacheva E., Microfluidic synthesis of macroporous copolymer particles, *Macromolecules*, 2008, V. 1, 3555-3561.
113. Karnik R., Gu F., Basto P., Cannizzaro C., Dean L., Kyei-Manu W., Langer R., Farokhzad O. C., Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles, *Nano Lett.*, 2008, V. 8, 2906-2912.
114. Linbo W., Dong A., Jie D., Zhengmin Z., Bo-Geng L., Shiping Z., Preparation and SO₂ absorption/desorption properties of crosslinked poly(1,1,3,3-tetramethylguanidine) porous particles, *Macromol. Rapid Commun.*, 2006, V. 27, 1949-1954.
115. Huxman I. M., Tetley L., Rowatt B., Sherrington D. C., Comparison of porosity characteristics of macroporous poly(styrene-divinylbenzene) resins determined from mercury intrusion data and image analysis of transmission electron micrographs, *J. Mater. Chem.*, 1994, V. 4, 253-255.

116. Barrande M., Beurroies I., Denoyel R., Tatarova I., Gramblicka M., Polakovic M., Joehnck M., Schutle M., Characterisation of porous materials for bioseparation. *J. Chromatogr. A*, 2009, V. 1216, 6906-6916.
117. Sing K. S. W., Reporting physisorption data for gas/solid systems, *Pure&Appl. Chem.*, 1982, V. 54, 2201-2218.
118. Okay O., Macroporous copolymer networks, *Prog. Polym. Sci.*, 2000, V. 25, 711-779.
119. David D., Silverstein M. S., Porous polyurethane synthesized within high internal phase emulsions, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2009, V. 47, 5806-5814.
120. Zu Y., Zang S., Hua Y., Cheng J., Pu Hu C., Hydrophilic porous polymers based on high internal phase emulsions solely stabilized by poly(urethane urea) nanoparticles, *Polymer*, 2010, V. 51, 3612-3617.
121. Spanns C. J., Belgraver V. W., Rienstra O., de Groot J. H., Veth R. P. H., Pennings A. J., Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus, *Biomaterials*, 2000, V. 21, 2453-2460.
122. Moreira Dias R. C., Goes A. M., Serakides R., Ayres E., Orefice R. L., Porous biodegradable polyurethane nanocomposites: preparation, characterization, and biocompatibility tests, *Mater. Res.*, 2010, V. 13, 211-218.
123. Haugen H., Ried V., Brunner M., Will J., Wintermantel E., Water as foaming agent for open cell polyurethane structures, *J. Mater. Sci. - Mater. Med.*, 2004, V. 15, 343-346.
124. Gorna K., Gogolewski S., Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2006, V. 79, 128-138.
125. Haugen H., Will J., Fuchs W., Wintermantel E., A novel processing method for injection-molded polyether-urethane scaffolds. Part 1:processing, *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 2006, V. 77, 65-72.
126. Sharifpoor S., Labow R. S., Santerre J. P., Synthesis and characterization of degradable polar hydrophobic ionic polyurethane scaffolds for vascular tissue engineering applications, *Biomacromolecules*, 2009, V. 10, 2729-2739.

127. Jovanovic D., Engels G. E., Plantinga J. A., Bruinsma M., van Oeveren W., Schouten A. J., van Luyn M. J. A., Harmsen M. C., Novel polyurethanes with interconnected porous structure induce in vivo tissue remodeling and accompanied vascularization, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2010, V. 95A, 198-208.
128. Eglin D., Grad S., Gogolewski S., Alini M., Farsenol-modified biodegradable polyurethanes for cartilage tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2010, V. 92, 393-408.
129. Dubey G., Mequanint K., Conjugation of fibronectin onto three-dimensional porous scaffolds for vascular tissue engineering applications, *Acta Biomater.*, 2011, V. 7, 1114-1125.
130. Dong Z., Li Y., Zou Q., Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering, *Appl. Surf. Sci.*, 2009, V. 255, 6087-6091.
131. Guan J., Fujimoto K. L., Sacks M. S., Wagner W. R., Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications, *Biomaterials*, 2005, V. 26, 3961-3971.
132. Das S., Banthia A. K., Adhikari B., Porous polyurethane urea membranes for pervaporation separation of phenol and chlorophenols from water, *Chem. Eng. J.*, 2008, V. 138, 215-223.
133. Ke G.-Z., Xie H.-F., Ruan R.-P., Yu W.-D., Preparation and performance of porous phase change polyethylene glycol/polyurethane membrane, *Energy Convers. Manage.*, 2010, V. 51, 2294-2298.
134. Kuranska M., Prociak A., Porous polyurethane composites with natural fibres, *Compos. Sci. Technol.*, 2012, V. 72, 299-304.
135. Kuranska M., Prociak A., Mikelis K., Ugis C., Porous polyurethane composites based on bio-components, *Compos. Sci. Technol.*, 2013, V. 75, 70-76.
136. Atta A. M., Brostow W., Datashvili T., El-Ghazawy R. A., Lobland H. E., Hasan A.-R. M., Perez J. M., *Polym. Int.*, 2013, V. 62, 116-126.
137. Dong K., Qiu F., Guo X., Xu J., Yang D., He K., Polyurethane-attapulgitic porous material: preparation, characterization, and application for dye adsorption, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2013, V. 129, 1697-1706.

138. Takeichi T., Yamazaki Y., Zuo M., Ito A., Matsumoto A., Inagaki M., Preparation of porous carbon films by the pyrolysis of poly(urethane-imide) films and their pore characterizations, *Carbon*, 2001, V. 39, 257-265.
139. Krajewska B., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, V. 35, 126-139.
140. Amine A., Mohammadi H., Bourais I., Palleschi G., Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, V. 21, 1405-1423.
141. Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, V. 40, 1451-1463.
142. Sheldon R. A., Enzyme immobilization: the quest for optimum performance, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, V. 349, 1289-1307.
143. Miletic N., Nastasovic A., Loos K., Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications, *Bioresour. Technol.*, 2012, V. 115, 126-135.
144. Zhang Y., Xu J., Yuan Z., Xu H., Yu Q., Artificial neural network-genetic algorithm based optimization for the immobilization of cellulase on the smart polymer Eudragit L-100, *Bioresour. Technol.*, 2010, V. 101, 3153-3158.
145. Krenkova J., Forest F., Immobilized microfluidic enzymatic reactors, *Electrophoresis*, 2004, V. 25, 3550-3563.
146. Mateo C., Grazu V., Pessela B. C. C., Montes T., Palomo J. M., Torres R., Lopez-Gallego F., Fernandez-Lafuente R., Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, V. 35, 1593-1601.
147. Quiocho F. A., Richards F. M., the enzymes behaviour of carboxypeptidase-A, *Biochemistry*, 1966, V. 5, 4062-4076.
148. Quiocho F. A., Richards F. M., Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase A, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1964, V. 52, 833-839.
149. Brown D. L., Glatz C. E., Aggregate breakage in protein precipitation, *Chem. Eng. Sci.*, 1987, V. 42, 1831-1839.

150. Talekar S., Pandharbale A., Ladole M., Nadar S., Mulla M., Japhalekar K., Pattankude K., Arage D., Carrier free co-immobilization of alpha amylase, glucomylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLE-As): a tri-enzyme biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity, *Bioresour. Technol.*, 2013, V. 147, 269-275.
151. Braun S., Rappoport S., Zusman R., Avnir D., Ottolenghi M., Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes, *Matter. Lett.*, 1990, V. 10, 1-5.
152. Bakker M., van de Velde F., van Rantwijk F., Sheldon R. A., Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams, *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, V. 70, 342-348.
153. van de Velde F., Bakker M., van Rantwijk F., Sheldon R. A., Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidations in hydrophobic organic media, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, V. 72, 523-529.
154. LeJeune K. E., Russell A. J., Covalent binding of a nerve agent hydrolyzing enzyme within polyurethane foams, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, V. 51, 450-457.
155. Drevon G. F., Russell A. J., Irreversible immobilization of diisopropylfluorophosphatase in polyurethane polymers, *Biomacromolecules*, 2000, V. 1, 571-576.
156. Budriene S., Gorochovceva N., Romaskevicius T., Yugova L. V., Miezeliene A., Denys G., Zubriene A., β -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization, *Cent. Eur. J. Chem.*, 2005, V. 3, 95-105.
157. Ozdemir E., Biomimetic CO₂ sequestration: 1. Immobilization of carbonic anhydrase within polyurethane foam, *Energy Fuels*, 2009, V. 23, 5725-5730.
158. Kanbar B., Ozdemir E., Thermal stability of carbonic anhydrase immobilized within polyurethane foam, *Biotechnol. Prog.*, 2010, V. 26, 1474-1480.
159. Cadena P. G., Jeronimo R. A. S., Melo J. M., Silva R. A., Lima Filho J. L., Pimentel M. C. B., Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film, and ferromagnetic Dacron, *Bioresour. Technol.*, 2010, V. 101, 1595-1602.
160. Guncheva M., Tashev E., Zhiryakova D., Tosheva T., Tzokova N., Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novelphosphorous-containing polyurethanes: application in wax ester synthesis, *Process Biochem.*, 2011, V. 46, 923-930.

161. Kakoti A., Kumar A. K., Goswami P., Microsome-bound alcohol oxidase catalysed production of carbonyl compounds from alcohol substrates, *J. Mol. Catal. B:Enzym.*, 2012, V. 78, 98-104.
162. Kayrak-Talay D., Akman U., Hortacsu O., Supercritical carbon dioxide immobilization of glucose oxidase on polyurethane/polypyrrole composite, *J. Supercrit. Fluids*, 2008, V. 44, 457-465.
163. Inoglu N., Kayrak-Talay D., Hortacsu O., Glucose oxidase immobilization by polyurethane film/foam in dense CO₂ environment, *Process Biochem.*, 2008, V. 43, 271-279.
164. Pujari N. S., Vaidya B. K., Bagalkote S., Ponrathnam S., Nene S., Poly(urethane methacrylate-co-glycidyl methacrylate)-supported-polypropylene biphasic membrane for lipase immobilization, *J. Membr. Sci.*, 2006, V. 285, 395-403.
165. Cui C., Tao Y., Li L., Chen B., Tan T., Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2013, V. 91, 59-66.
166. Drevon G. F., Danielmeier K., Federspiel W., Stolz D. B., Wicks D. A., Yu P. C., Russell A. J., High-activity enzyme - polyurethane coatings, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, V. 79, 785-794.
167. Kreider A., Richter K., Sell S., Fenske M., Tornow C., Stenzel V., Grunwald I., Functionalization of PDMS modified and plasma activated two-component polyurethane coatings by surface attachment of enzymes, *Appl. Surf. Sci.*, 2013, V. 273, 562-569.
168. Phadtare S., Vyas S., Palaskar D. V., Lachke A., Shukla P. G., Sivaram S., Sastry M., Enhancing the reusability of endoglucanase-gold nanoparticle bioconjugates by tethering to polyurethane microspheres, *Biotechnol. Prog.*, 2004, V. 20, 1840-1846.
169. van der Maarel M. J. E. C., van der Veen B., Uitdehaag J. C. M., Leemhuis H., Dijkhuizen L., Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *J. Biotechnol.*, 2002, V. 94, 137-155.
170. Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. Y., Singh D., Mohan R., Advances in microbial amylases, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2000, V. 31, 135-152.

171. Diderichsen B., Christiansen L., Cloning of a maltogenic alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *FEMS. Microbiol. Lett.*, 1988, V. 56, 53-60.
172. MacGregor A. W., Thompson R. G., Meredith W. O. S., α -amylase from immature barley: purification and properties, *J. Inst. Brew.*, 1974, V. 80, 181-187.
173. Schwermann B., Pfau K., Liliensiek B., Schleyer M., Fisher T., Bakker E. P., Purification, properties and structural aspects of thermoacidophilic α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* atcc 27009, *Eur. J. Biochem.*, 1994, V. 226, 981-991.
174. Satoh E., Uchimura T., Kudo T., Komagata K., Purification, characterization and nucleotide sequence of an intracellular maltotriose-producing α -amylase from *Streptococcus bovis* 148, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, V. 63, 4941-4944.
175. Tripathi P., Leggio L. L., Mansfeld J., Ulbrich-Hofmann R., Kayastha A. M., α -amylase from mung beads (*Vigna Radiata*) – correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modelling, *Phytochemistry*, 2007, V. 68, 1623-1631.
176. Noman A. S. M., Hoque M. A., Sen P. K., Karim M. R., Purification and some properties of α -amylase from post-harvest *Pachyrhizus erosus* L. tuber, *Food Chem.*, 2006, V. 99, 444-449.
177. Yang C.-H., Liu W.-H., Purification and properties of maltotriose-producing α -amylase from *Thermobifida fusca*, *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, V. 35, 254-260.
178. Yang S.-J., Lee H.-S., Park C.-S., Kim Y.-R., Moon T.-W., Park K.-H., Enzymatic analysis of an amylolytic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* reveals its novel catalytic properties as both an α -amylase and a cyclodextrin-hydrolyzing enzyme, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, V. 70, 5988-5995.
179. Liu X. D., Xu Y., A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus sp.* YX-1: purification and characterization, *Bioresour. Technol.*, 2008, V. 99, 4315-4320.

180. Bozic N., Ruiz J., Santin L., Vujcic Z., Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a, *Biochem. Eng. J.*, 2011, V. 53, 203-209.
181. Pelegrini P. B., Murad A. M., Grossi-de-Sa M. F., Mello L. V., Romeiro L. A. S., Noronha E. F., Caldas R. A., Franco O. L., Structure and enzyme properties of *Zabrotes subfasciatus* α -amylase, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2006, V. 61, 77-86.
182. Dojnov B., Bozic N., Nenadovic V., Ivanovic J., Vujcic Z., Purification and properties of midgut α -amylase isolated from *Morimus funereus* (Coleoptera: cerambycidae) larvae, *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 2008, V. 149, 153-160.
183. Kumagai Y., Satoh T., Inoue A., Ojima T., Enzymatic properties and primary structures of two α -amylase isozymes from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*, *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 2013, V. 164, 80-88.
184. Raviyan P., Tang J., Orellana L., Rasco B., Physicochemical properties of a time-temperature indicator based on immobilization of *Aspergillus oryzae* α -amylase in polyacrylamide gel as affected by degree of cross-linking agent and salt content, *J. Food Sci.*, 2003, V. 68, 2302-2308.
185. Raviyan P., Tang J., Rasco B. A., Thermal stability of α -amylase from *Aspergillus oryzae* entrapped in polyacrylamide gel, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, V. 51, 5462-5466.
186. Swarnalatha V., Esther R. A., Dhamodharan R., Immobilization of α -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles, an easily recoverable and reusable support, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2013, V. 96, 6-13.
187. Abd El-Ghaffar M. A., Hashem M. S., Immobilization of α -amylase onto chitosan and its amino acid condensation adducts, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2009, V. 112, 805-814.
188. Bryjak J., Glucoamylase, α -amylase, and β -amylase immobilization on acrylic carriers, *Biochem. Eng. J.*, 2003, V. 16, 347-355.
189. Basturk E., Demir S., Danis O., Kahraman M. V., Covalent immobilization of α -amylase onto thermally crosslinked electrospun PVA/PAA nanofibrous hybrid membranes, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2013, V. 127, 349-355.

190. Yazar U., Kahraman M. V., Covalent immobilization of α -amylase onto UV-curable coating, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2009, V. 114, 3716-3722.
191. Turunc O., Kahraman M. V., Akdemir Z. S., Kayaman-Apohan N., Gungor A., Immobilization of α -amylase onto cyclic carbonate bearing hybrid material, *Food Chem.*, 2009, V. 112, 992-997.
192. Demir S., Gok S. B., Kahraman M. V., α -amylase immobilization on functionalized nano CaCO₃ by covalent attachment, *Starch/Starke*, 2012, V. 64, 3-9.
193. Cordeiro A. L., Lenk T., Werner C., Immobilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase onto reactive polymer films, *J. Biotechnol.*, 2011, V. 154, 216-221.
194. Kumari A., Kayastha A. M., Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto chitosan and amberlito MB-150 beads: optimization and characterization, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2011, V. 69, 8-14.
195. Jaiswai N., Prakash, O., Talat M., Hasan S. H., Pandey R. K., α -Amylase immobilization on gelatin: optimization of process variables, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2012, V. 10, 161-167.
196. Konieczna-Molenda A., Kochanowski A., Walaszek A., Bortel E., Tomasik P., Immobilization of α -amylase on poly(vinylamine) and poly(vinylformamide) supports and its performance, *Chem. Eng. J.*, 2009, V. 146, 515-519.
197. Tee B. L., Kaletunc G., Immobilization of a thermostable α -amylase by covalent binding to an alginate matrix increases high temperature usability, *Biotechnol. Prog.*, 2009, V. 25, 436-445.
198. Rajagopalan G., Krishnan C., Immobilization of malto-oligosaccharide forming α -amylase from *Bacillus Subtilis* KCC103: properties and application in starch hydrolysis, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2008, V. 83, 1511-1517.
199. Baysal Z., Bulut Y., Yavuz M., Aytekin C., Immobilization of α -amylase via adsorption onto bentonite/chitosan composite: determination of equilibrium, kinetics and thermodynamic parameters, *Starch/Starke*, 2013, V. 65, 1-7.
200. Soleimani M., Khani A., Najafzadeh K., α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2012, V. 74, 1-5.

201. Tuzmen N., Kalburcu T., Denizli A., α -Amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: optimization and characterization, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2012, V. 78, 16-23.
202. Wu Z., Qi W., Wang M., Wang Y., Su R., He Z., Chelate immobilization of amylase on metal ceramic powder: preparation, characterization and application, *Biochem. Eng. J.*, 2013, V. 77, 190-197.
203. Singh V., Singh D., Poliviny alcohol-silica nanohybrids: an efficient carrier matrix for amylase immobilization, *Process Biochem.*, 2013, V. 48, 96-102.
204. Bayramoglu G., Yilmaz M., Arica M. Y., Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis, *Food Chem.*, 2004, V. 84, 591-599.
205. Pandya P. H., Jasra R. V., Newalkar B. L., Bhatt P. N., Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2005, V. 77, 67-77.
206. Reshmi R., Sanjay G., Sugunan S., Enhanced activity and stability of α -amylase immobilized on alumina, *Catal. Commun.*, 2006, V. 7, 460-465.
207. Shewale S. D., Pandit A. B., Hydrolysis of soluble starch using *Bacillus licheniformis* α -amylase immobilized on superporous CELBEADS, *Carbohydr. Res.*, 2007, V. 342, 997-1008.
208. Caldwell M. L., Purification and characterization of β -amylase from sweet potatoes tuber, *Science*, 1931, V. 74, 37.
209. Dreier K., Schnarrenberger C., Borner T., Light and stress-dependent enhancement of amylolytic activities in white and green barley leaves: β -amylases are stress-induced proteins, *J. Plant Physiol.*, 1995, V. 145, 342-348.
210. Laberge D. E., Meredith W. O. S., The β -amylase enzymes of barley and malt I. Purification of the malt enzymes, *J. Inst. Brew.*, 1971, V. 77, 436-442.
211. Lizotte P.A., Henson C. A., Duke S. H., Purification and characterization of pea epicotyl β -amylase, *Plant Physiol.*, 1990, V. 92, 615-621.
212. Vikso-Nielsen A., Christensen T. M. I. E., Bojko M., Marcussen J., Purification and characterization of β -amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*), *Physiol. Plant.*, 1997, V. 99, 190-196.

213. Monroe J. D., Preiss J., Purification of a β -amylase that accumulates in *Arabidopsis thaliana* mutants defective in starch metabolism, *Plant. Physiol.*, 1990, V. 94, 1033-1039.
214. Serafimova F., Franz A., Werries E., Detection, purification and partial characterization of β -amylase from trophozoites of *Entamoeba invadens*, *Mol. Biochem. Parasit.*, 1996, V. 83, 175-181.
215. Dicko M. H., Searle-van Leeuwen M. J. F., Hilhorst R., Traore A. S., Extraction, partial purification and characterization of β -amylase from the bulbs of *G. klattianus*, *Bioresour. Technol.*, 2000, V. 73, 183-185.
216. Van Damme E. J. M., Hu J., Barre A., Hause B., Baggerman G., Rouge P., Peumans W. J., Purification, characterization, immunolocalization and structural analysis of the abundant cytoplasmic β -amylase from *Calystegia sepium* (hedge bindweed) rhizomes, *Eur. J. Biochem.*, 2001, V. 268, 6363-6273.
217. Yamasaki Y., β -Amylase in germinating milled seeds, *Phytochemistry*, 2003, V. 64, 935-939.
218. Kolawole A. O., Ajele J. O., Sirdeshmukh R., Purification and characterization of alkaline-stable β -amylase in malted African finger millet (*Eleusine coracana*) seed, *Process Biochem.*, 2011, V. 46, 2178-2186.
219. Oyefuga O. H., Adeyanju M. M., Adebawo O. O., Agboola F. K., Purification and some properties of β -amylase from the nodes of sugari cane, *Saccharium officinacium*, *Int. J. Plant Physiol. Biochem.*, 2011, V. 3, 117-124.
220. Reddy P. R. M., Ramesh B., Mrudula S., Reddy G., Seenayya G., Production of thermostable β -amylase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation: optimization of nutrient levels using response surface methodology, *Process Biochem.*, 2003, V. 39, 267-277.
221. Li X., Yu H.-Y., Purification and characterization of novel organic solvent-tolerant β -amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012, V. 329, 204-2011.
222. Femi-Ola T. O., Oshokoya A. H., Bamidele O. S., Kinetic properties of beta-amylase from *Bacillus subtilis*, *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.*, 2013, V. 2, 19-23.

223. Daba T., Kojima K., Inouye K., Characterization and solvent engineering of wheat β -amylase for enhancing its activity and stability, *Enzyme Microb. Technol.*, 2012, V. 51, 245-251.
224. Daba T., Kojima K., Inouye K., Chemical modification of wheat β -amylase by trinitrobenzenesulfonic acid, methoxypolyethylene glycol, and glutaraldehyde to improve its thermal stability and activity, *Enzyme Microb. Technol.*, 2013, V. 53, 420-426.
225. Hirata A., Adachi M., Utsumi S., Mikami B., Engineering of the pH optimum of *Bacillus cereus* β -amylase: conversion of the pH optimum from bacterial type to a higher-plant type, *Biochemistry*, 2004, V. 43, 12523-12531.
226. Vretblad P., Axen R., Preparation and properties of an immobilized barley β -amylase, *Biotechnol. Bioeng.*, 1973, V. 15, 783-794.
227. Martensson K., Preparation of an immobilized two-enzyme system, β -amylase-pullulanase, to an acrylic copolymer for the conversion of starch to maltose. I. Preparation and stability of immobilized β -amylase, *Biotechnol. Bioeng.*, 1974, V. 16, 567-577.
228. Ray R. R., Chandra S., Nanda G., Biochemical approaches of increasing thermostability of β -amylase from *Bacillus megaterium* B6, *FEBS Letters*, 1994, V. 356, 30-32.
229. Ray R. R., Jana S. C., Nanda G., Immobilization of β -amylase from *Bacillus megaterium* B6 into gelatin film by cross-linking, *J. Appl. Microbiol.*, 1995, V. 79, 157-162.
230. Tia K. S., Ismail S. A., Dessouki A. M., Immobilization of β -amylase using polyacrylamide polymer derivatives, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2003, V. 78, 891-898.
231. Manta C., Ferraz N., Betancor L., Antunes G., Batista-Viera F., Carlsson J., Caldwell K., Polyethylene glycol as a spacer for solid-phase enzyme immobilization, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, V. 33, 890-898.
232. Bryjak J., Glucoamylase, α -amylase, β -amylase immobilization on acrylic carriers, *Biochem. Eng. J.*, 2003, V. 16, 347-355.
233. Tavano O. L., Fernandez-Lafuente R., Goulart A. J., Monti R., Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose

- support. Characterization of the immobilized enzyme, *Process Biochem.*, 2013, V. 48, 1054-1058.
234. Hon C. C., Reilly P. J., properties of β -amylase immobilized on alkylamine porous silica, *Biotechnol. Bioeng.*, 1979, V. 21, 505-512.
235. Roy F., Hegde M. V., immobilization of β -amylase on polystyrene cation exchange resin equilibrated with Al^{3+} ions (IR-120 Al^{3+}), *Enzyme Microb. Technol.*, 1987, V. 9, 550-552.
236. Deleyn F., Stouffs R., Immobilised β -amylase in the production of maltose syrups, *Starch/Starke*, 1990, V. 42, 158-160.
237. Noda T., Furuta S., Suda I., Sweet potato β -amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose, *Carbohydr. Polym.*, 2001, V. 44, 189-195.
238. van der Maarel M. J. E. C., van der Veen B., Uitdehaag J. C. M., Leemhuis H., Dijkhuizen L., Properties and applications of starch-converting enzymes of α -amylase family, *J. Biotechnol.*, 2002, V. 94, 137-155.
239. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/133.html>. Žiūrėta 2015.06.23.
240. Kwon K. S., Auh J. H., Choi S. K., Kang G. J., Kim J. W., Park K. H., Characterization of branched oligosaccharides produced by *Bacillus licheniformis* maltogenic amylase, *J. Food Sci.*, 1999, V. 64, 258-261.
241. Kim I.-C., Cha J.-H., Kim J.-R., Jang S.-Y., Seo B.-C., Cheong T.-K., Lee D. S., Choi Y. D., Park K.-H., Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*, *J. Biol. Chem.*, 1992, V. 267, 22108-22114.
242. Doyle E. M., Noone A. M., Kelly C. T., Quigley T. A., Fogarty W. M., Mechanisms of action of the maltogenic α -amylase of *Byssoschlamys fulva*, *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, V. 22, 612-616.
243. Kim T.-J., Kim M.-J., Kim B.-C., Kim J.-C., Cheong T.-K., Kim J.-W., Park K.-H., Modes of action of acarbose hydrolysis and transglycosylation catalysed by thermostable maltogenic amylase, the gene for which was cloned from a *Thermus* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, V. 65, 1644-1651.
244. Ammar Y. B., Matsubara T., Ito K., Iizuka M., Limpaseni T., Pongsawasdi P., Minamiura N., New action pattern of Maltogenase from α -amylase from

- Streptomyces sp.* And its possible application in bakery, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2002, V. 35, 568-575.
245. Oh K.-W., Kim M.-J., Kim H.-Y., Kim B.-Y., Baik M.-Y., Auh J.-H., Park C.-S., Enzymatic characterization of maltogenic amylase from *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 expressed in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, V. 252, 175-181.
246. Uma Maheswar Rao J. L., Satyanarayana T., Purification and characterization of a hyperthermostable and high maltogenic α -amylase of an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2007, V. 142, 179-193.
247. Robyt J. F., French D., The action pattern of porcine pancreatic α -amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme, *J. Biol. Chem.*, 1970, V. 245, 3917-3927.
248. G. Satheesh kumar, M. S. Chandra, K. V. Mallaiah, P. Sreenivasulu, Y.-L. Choi, Purification and characterization of highly thermostable α -amylase from thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2010, V. 15, 1-6.
249. Khemakhen B., Fendri I., Dahech I., Belguith K., Kammoun R., Mejdoub H., Purification and characterization of a maltogenic amylase from fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds using the box design (BBD), *Ind. Crops Prod.*, 2013, V. 43, 334-339.
250. Paquet V., Croux C., Goma G., Soucaille P., Purification and characterization of the extracellular α -amylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, V. 57, 212-218.
251. Fogarty W. M., Collins B. S., Doyle E. M., Kelly C. T., The high maltose-forming α -amylase of *Saccharomonospora viridis*: mechanisms of action, *J. Ind. Microbiol.*, 1993, V. 11, 199-204.
252. Kelly C. T., Collins B. S., Fogarty W. M., Doyle E. M., Mechanisms of action of the α -amylase of *Micromonospora melanosporea*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, V. 39, 599-603.
253. Tang S.-Y., Le Q.-T., Shim J.-H., Yang S.-J., Auh J.-H., Park C., Park K.-H., Enhancing thermostability of maltogenic amylase from *Bacillus thermoalkaphilus* ET2 by DNA shuffling, *FEBS J.*, 2006, V. 273, 3335-3345.

254. Herale R., Sukumaran U. K., Kadeppagari R.-K., Evidence for the improvement of thermostability of the maltogenic α -amylase of *Aspergillus niger* by negative pressure, *Starch/Starke*, 2012, V. 64, 646-651.
255. Manning G. B., Cambell L., Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*, *J. Biol. Chem.*, 1961, V. 236, 2952-2957.
256. Sharron L. P., Elliott W. H., The extracellular α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*, *J. Biol. Chem.*, 1969, V. 244, 48-54.
257. Outtrup H., Norman B. E., Properties and application of a thermostable maltogenic amylase produced by a strain of *Bacillus* modified by recombinant-DNA techniques, *Starch/Starke*, 1984, V. 36, 405-411.
258. Nanmori T., Shinke R., 1993, US patent 5,188,956.
259. Cha H.-J., Yoon H.-G., Kim Y.-W., Lee H.-S., Kim J.-W., Kweon K.-S., Oh B.-H., Park K.-H., Molecular and enzymatic characterization of maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose, *Eur. J. Biochem.*, 1998, V. 253, 251-262.
260. Mabrouk S. B., Messaoud E. B., Ayadi D., Jemli S., Roy A., Mezghani M., Bejar S., *Mol. Biotechnol.*, 2008, V. 38, 211-219.
261. Jones A., Lamsa M., Frandsen T. P., Spendler T., Harris P., Sloma A., Xu F., Nielsen J. B., Cherry J. R., Directed evolution of a maltogenic α -amylase from *Bacillus* sp. TS-25, *J. Biotechnol.*, 2008, V. 134, 325-333.
262. Lee H.-S., Auh J.-H., Yoon H.-G., Kim M.-J., Park J.-H., Hong S.-S., Kang M.-H., Kim T.-J., Moon T.-W., Kim J.-W., Park K.-H., Cooperative action of α -glucanotransferase and maltogenic amylase for an improved process of isomaltooligosaccharide (IMO) production, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, V. 50, 2812-2817.
263. Lee S. J., Kim J.-C., Kim M. J., Kitaoka M., Park C. S., Lee S. Y., Ra M.-J., Moon T. W., Robyt J. F., Park K. H., Transglycosylation of naringin by *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase to give glycosylated naringin, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, V. 47, 3669-3674.
264. Kang G.-J., Kim M.-J., Kim J.-W., Park K. H., Immobilization of thermostable maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus* for continuous production of branched oligosaccharides, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, V. 45, 4168-4172.

265. Outtrup H., Diderichsen B. K., Christiansen L., Maltogenic amylase enzyme product, preparation and use thereof, 1984, Europe 0120693 A1.
266. Outtrup H., Diderichsen B. K., Christiansen L., Maltogenic amylase enzyme product, preparation and use thereof, 1989, Europe patent 0120693 B1.
267. Diderichsen B. K., Christiansen L., Preparation of a maltogenic amylase enzyme, 1986, US patent 4,598,048.
268. Diderichsen B., Christiansen L., Cloning of a maltogenic alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1988, V. 56, 53-60.
269. Christophersen C., Otzen D. E., Norman B. E., Christensen S., Schafer T., Enzymatic characterization of NOVAMYL a thermostable α -amylase, *Starch/Starke*, 1998, V. 50, 39-45.
270. Dauter Z., Dauter M., Brzozowski A. M., Christensen S., Borchert T. V., Beier L., Wilson K. S., Davies G. J., X-ray structure of NOVAMYL, the five-domain "maltogenic" α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1,7 Å resolution, *Biochemistry*, 1999, V. 38, 8385-8392.
271. Gaouar O., Aymard C., Zakhia N., Rios G. M., Kinetic studies on the hydrolysis of soluble and cassava starches by maltogenase, *Starch/Starke*, 1997, V. 49, 231-237.
272. Li D., Park S.-H., Shim J.-H., Lee H.-S., Tang S.-Y., Park C.-S., Park K.-H., In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase, *Carbohydr. Res.*, 2004, V. 339, 2789-2797.
273. Leman P., Goesaert H., Vandeputte G. E., Lagrain B., Delcour J. A., Maltogenic amylase has a non typical impact on the molecular and rheological properties of starch, *Carbohydr. Polym.*, 2005, V. 62, 205-213.
274. Leman P., Goesaert H., Delcour J. A., Residual amylopectin structures of amylase-treated wheat starch slurries reflect amylase mode of action, *Food Hydrocolloids*, 2009, V. 23, 153-164.
275. Goesaert H., Bijttebier A., Delcour J. A., Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: level of inner chain attack as an important analytical differentiation criterion, *Carbohydr. Res.*, 2010, V. 345, 397-401.
276. van Steertegem B., Pareyt B., Brijs K., Delcour J. A., Combined impact of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic α -amylase and surfactants on starch pasting and gelation properties, *Food Chem.*, 2013, V. 139, 1113-1120.

277. Cherry J., Svendsen A., Andersen C., Beier L., Frandsen T. P., Maltogenic α -amylase variants, 2000, US patent 6,612,628.
278. Cherry J., Svendsen A., Andersen C., Beier L., Frandsen T. P., Maltogenic α -amylase variants, 2005, US patent 6,876,932.
279. Dufлот P., C. Fouache, immobilized maltogenic α amylase and its use in the manufacture of a maltose rich syrup, 2001, US patent 6,274,355 B1.
280. Romackevic T., Budriene S., Liubartiene A., Gerasimcik I., Zubriene A., Denys G., Synthesis of chitosan-graft-poly(ethylene glycol) methylether methacrylate copolymer and its application for immobilization of maltogenase, *Chemija*, 2007, V. 18, 33-38.
281. Makuska R. (ed.), Synthesis and Characterization of polymers (In Lithuania), 2006, *University Press*, Vilnius.
282. Bittner D. L., Manning J., Automated neocuproine glucose method: critical factors and normal values, *Technicon Symposia 1966*, In *Automation in Analytical Chemistry*, 1967, 33-36.
283. Bagdonienė L., Bendikienė V., Kadziauskas J., Labeikytė D., Makuckas A., Sabaliauskienė V., Sasnauskienė Z., Šeputienė V., Biochemijos laboratoriniai darbai, 2006, *University Press*, Vilnius.
284. Randall D., Lee S., The Polyurethane Book, 2002, *John Wiley&Son*, New York,.
285. Simons D.M., Arnold R.G., Relative reactivity of the isocyanate groups in toluene-2,4-diisocyanate, *Am. Chem. Soc.*, 1956, V. 78, 1658-1659.
286. Ajithkumar S., Kansara S. S., Patel N. K., Kinetics of castroil oil based polyol-toluene diisocyanate reactions, *Eur. Polym. J.*, 1998, V. 34, 1273-1276.
287. Moravek S. J., Storey R. F., Reaction kinetics of dicyclohexylmethane-4,4'-diisocyanate with 1- and 2-butanol: A model study for polyurethane formation, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, V. 109, 3101-3107.
288. Zhang S., Ren Z., He S., Zu Y., Zhu C., FTIR spectroscopic characterization of polyurethane-urea model hard segments (PUUMHS) based on three diamine chain extenders, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2007, V. 66, 188-193.
289. Mansur H. S., Sadahira C. M., Souza A. N., Mansur A. P., FTIR spectroscopy characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel with different degree and

- chemically crosslinked with glutaraldehyde, *Mater. Sci. Eng. C*, 2008, V. 28, 539-548.
290. Nig L., De-Ning W., Sheng-Kang Y., Hydrogen-bonding of segmented polyether poly(urethane urea) copolymer, *Macromolecules*, 1997, V. 30, 4405-4409.
291. Lewandowska K., Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures, *Thermochim. Acta*, 2009, V. 493, 42-48.
292. Coutinho F.M.B., Delpech M.C., Alves T. L., Ferreira A.A., Degradation profiles of cast films of polyurethane and poly(urethane-urea) aqueous dispersions based on hydroxyterminated polybutadiene and different diisocyanates, *Polym. Degrad. Stab.*, 2003, V. 81, 19-27.
293. Web P.A., Orr C., Analytical Methods in Fine Particle Technology, *Micromeritics*, 1997, 60-63, Norcross, USA,.
294. Hanefeld U., Gardosi L., Magner E., Understanding enzyme immobilization, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, V. 38, 453-468.
295. Cao L., Carrier-bound immobilized enzymes, 2005, *Wiley-VCH Verlag*, Weinheim,.
296. Tischer W., Wedekind F., Immobilized enzymes: methods and applications, *Top. Curr. Chem.*, 1999, V. 200, 96-126.
297. de Lathouder K. M., van Benthem D. T. J., Wallin S. A., Mateo C., Lafuente R. F., Guisan J. M., Kapteijn F., Moulijn J. A., Polyethyleneimine (PEI) functionalized ceramic monoliths as enzyme carriers: preparation and performance, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2008, V. 50, 20-27.
298. Eslamipour F., Hejazi P., Effects of surface modification and activation of magnetic nanoparticles on the formation of amylase immobilization bonds under different ionic strength conditions, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2015, V. 119, 1-11.
299. Nasrollahi S., Golalizadeh L., Sajedi R. H., Taghdir M., Asghari S. M., Rassa M. Substrate preference of a *Geibacillus* maltogenic amylase: a kinetic and thermodynamic analysis, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, V. 60, 1-9.
300. Tuzmen N., Kalburcu T., Denizli A., α -amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: Optimization and characterization, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2012, V. 78, 16-23.

301. Maltogenase TM. Gamybinis aprašas. Novo Nordisk, Danija.
302. Razumiene, J., Sakinyte, I., Kochane, T., Maciulyte, S., Straksys, A., Budriene, S, Barkauskas, J. Carbon electrode based urea sensor modification of graphite and new polymeric carriers for enzyme immobilization, *BIODEVICES 2013 - International Conference on Biomedical Electronics and Devices 2013*. 2013, 197-201, Barselona, Spain.