

NIKOLA Z. MILAŠINOVIĆ  
MELINA T.  
KALAGASIDIS KRUŠIĆ  
ZORICA D.  
KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ  
JOVANKA M. FILIPOVIĆ

Tehnološko-metalurški fakultet,  
Beograd, Srbija

NAUČNI RAD

UDK 678.744.32:577.15:66.097.8

DOI: 10.2298/HEMIND0806339M

## UTICAJ SASTAVA POLI(*N*-IZOPROPILAKRILAMIDA-KO-ITAKONSKA KISELINA) HIDROGELA NA AKTIVNOST IMOBILISANE LIPAZE IZ *Candida rugosa*

U radu je ispitana imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* u pH- i temperaturno-osetljive hidrogelove *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline različitog sastava i pod različitim uslovima. Aktivnost imobilisanog enzima je ispitana standardnom metodom na emulziji maslinovog ulja. Praćena je kinetika otpuštanja enzima iz hidrogelova. Utvrđeno je da na aktivnost imobilisane lipaze utiče način imobilizacije i sastav hidrogelova. Značajan uticaj ima i temperatura na kojoj se izvodi imobilizacija, tako da se sa promenom temperature menja i masa imobilisane lipaze kao i njena specifična aktivnost. Ispitana su mehanička svojstva i morfologija sintetisanih hidrogelova.

Enzimi imaju velike mogućnosti primene u različitim granama industrije zahvaljujući svojstvu da selektivno katalizuju mnoge reakcije pod blagim uslovima, dajući proizvod dobrog kvaliteta i u velikom prinosu. Upotreba nativnih enzima ima brojne nedostatke (jednokratna upotreba, nestabilnost, teško izdvajanje enzima iz reakcione smeše i od proizvoda reakcije, zaostajanje enzima u finalnom proizvodu, denaturacija enzima prilikom uklanjanja viška enzima iz reakcione smeše) zbog čega su enzimski procesi još uvek neekonomični u poređenju sa hemijskim. Velika specifičnost, brzina reakcije, netoksičnost i rastvorljivost u vodi su glavne prednosti u odnosu na neorganske katalizatore, ali je njihova upotreba ograničena zbog uskog intervala pH i temperature u kojima su enzimi stabilni i aktivni [1].

Mogućnost primene enzima se može povećati i unaprediti imobilizacijom enzima pre upotrebe pri čemu se dobija stereospecifičan katalizator koji može da se upotrebi više puta, a po završenoj reakciji izoluje iz smeše filtracijom ili centrifugiranjem [2]. Enzimi se mogu imobilisati na više načina pri čemu se uspostavljaju hemijske veze ili nekovalentne interakcije između molekula enzima i čvrstog nosača [3].

Savremena istraživanja su orijentisana ka imobilizaciji enzima u prirodne i sintetske hidrogelove čime su obezbeđeni blagi uslovi imobilizacije i zaštita enzima unutar hidrogela od štetnih uticaja iz spoljašnje sredine. Pri imobilizaciji enzim se smešta u hidrogel čije pore moraju biti dovoljno velike da se omogući difuzija molekula supstrata i proizvoda reakcije, a da pri tome enzim ostane u mreži gela. Imobilizaciju često prate promene u enzimskoj aktivnosti, pH optimumu, stabilnosti enzima, itd. Upravo te promene zavise od kombinacije enzima i nosača kao i uslova imobilizacije [4]. Kada se enzim imobilisuje na temperaturno osetljiv polimer promene u konformaciji polimera znatno utiču na aktivnost enzima kao i njegove dostupnosti supstratu [5].

Mogućnosti primene imobilisanih enzima se stalno uvećavaju. Eksperimentalna istraživanja otkrivaju nečekivane rezultate, bilo da je u pitanju izuzetan pad ili čak porast aktivnosti enzima u poređenju sa nativnim enzimom [6]. Poroznost, kao i ostala svojstva hidrogelova se lako mogu kontrolisati odgovarajućim izborom monomera i uslova sinteze [7].

Tema ovog rada je imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* u pH- i temperaturno-osetljive hidrogelove *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline različitog sastava. Imobilizacija je izvedena na dva načina, i to mešanjem enzima sa komponentama reakcione smeše pre izvođenja reakcije polimerizacije, pri čemu se enzim direktno imobilisuje u toku formiranja hidrogela (*in situ* polimerizacija) i bubrenjem prethodno sintetisanih hidrogelova u rastvoru lipaze na 5 i 25 °C. Ispitan je uticaj sastava hidrogelova, postupka i uslova imobilizacije na aktivnost imobilisanog enzima i kinetiku otpuštanja enzima iz hidrogela. Pored toga, kako su za primenu imobilisanih enzima u reaktoru sa pakovanim slojem veoma važna mehanička svojstva nosača, u radu je ispitan uticaj sastava i različitih uslova sinteze na morfologiju i mehanička svojstva hidrogelova. Poroznost hidrogelova dozvoljava smeštanje enzima unutar gela, ali i njegovo potencijalno otpuštanje brzinom koja zavisi od veličine pora i koeficijenta difuzije enzima kroz mrežu gela [8].

### EKSPERIMENTALNI DEO

#### Reaktanti

Itakonska kiselina, IK, (Fluka), *N*-izopropilakrilamid, NIPAM, (Acros), umreživač *N,N'*-metilenbisakrilamid, MBA, (Serva), inicijator kalijum-persulfat, KPS, (Merck), ubrzivač kalijum-pirosulfat, KPyS (Merck), lipaza iz *Candida rugosa* (Sigma). *N*-Izopropilakrilamid je pre upotrebe prečišćen u smeši benzen/*n*-heksan (35/75). Ostali reaktanti su korišćeni bez prečišćavanja.

#### Sinteza kopolimera

Hidrogelovi poli(*N*-izopropilakrilamida-ko-itakonske kiseline) (PNIPAM/IK) sa 4 mas% umreživača različitog sastava: 100/0, 95/5, 90/10 i 85/15 sintetisani su ko-

Autor za prepisku: N. Z. Milašinović, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd.

E-pošta: nikolla3@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 15. oktobar 2008.

Rad prihvaćen: 5. decembar 2008.

polimerizacijom preko slobodnih radikala na 25 °C u atmosferi azota. Prvi broj u nazivu uzorka označava sadržaj NIPAM-a, a drugi sadržaj IK. Koncentracija inicijatora i ubrzivača bila je 1 mas% računato na početnu smešu monomera. Nakon sinteze hidrogelovi su isečeni u diskove i potopljeni u destilovanu vodu kako bi se uklonile neproreagovale materije. Voda je svakodnevno menjana tokom četiri dana. Diskovi su osušeni u vakuumu na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Iz sadržaja neproreagovanih materija utvrđeno je da je konverzija skoro kompletna.

### Imobilizacija enzima bubrenjem kserogelova u rastvoru lipaze

Prethodno sintetisani hidrogelovi su potopljeni u rastvor lipaze (1 mg lipaze na 1 ml rastvora čija je pH vrednost bila 6,00±0,01) i ostavljeni da bubre do ravnoteže na 5 i 25 °C. Zapremina rastvora enzima po jednom uzorku je iznosila 20 cm<sup>3</sup>. Nakon dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja rastvor je odliven u posebnu čašu kako bi se odredio sadržaj enzima, a uzorci su ostavljeni da se suše na 25 °C do konstantne mase. Suvim uzorcima je izmerena masa da bi se odredio sadržaj imobilisanog enzima iz razlike masa kserogelova pre i nakon bubrenja u rastvoru enzima. Vrednosti masa imobilisanog enzima date su u tabeli 1.

### Sinteza kopolimera sa lipazom (*in situ* polimerizacija)

Sinteza uzoraka sa lipazom je izvedena pod istim uslovima kao i sinteza uzoraka bez lipaze. Sadržaj lipaze u svim reakcijama polimerizacije bio je 20 mas% računato na smešu monomera. Na osnovu sadržaja neproreagovanih materija utvrđeno je da je konverzija skoro kompletna.

### Karakterizacija

#### Bubrenje hidrogelova

Bubrenje hidrogelova sa i bez lipaze praćeno je gravimetrijski u destilovanoj vodi na 25 °C, a stepen bubrenja je računat prema sledećoj jednačini [9]:

$$q = W_t/W_0 \quad (1)$$

gde je  $W_0$  masa suvog uzorka, a  $W_t$  masa nabubrela hidrogela u trenutku  $t$ .

Veličina pora je izračunata iz rezultata bubrenja primenom teorije ravnotežnog bubrenja [9]:

$$\xi = v_{2,s}^{-1/3} \left( \frac{2C_n \bar{M}_c}{M_r} \right)^{1/2} l \quad (2)$$

gde je  $v_{2,s}$  zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju,  $M_r$  molska masa osnovnih jedinica od kojih je polimerni lanac sastavljen,  $\bar{M}_c$  molska masa polimernih lanaca između dve tačke umreženja,  $C_n = 11,7$  je karakterističan odnos koji definiše konformaciju polimera i kon-

stantan je za dati sistem polimer-rastvarač,  $l$  dužina C–C veze ( $1,54 \text{ \AA} = 1,54 \times 10^{-10} \text{ m}$ ).

#### Aktivnost enzima

Lipolitička aktivnost enzima je određena po Sigma proceduri na emulziji maslinovog ulja i izražena u internacionalnim jedinicama. Jedna IU jedinica se definiše kao količina enzima koja je potrebna da pod određenim uslovima (pH 7,77 i 37 °C) oslobodi 1 μmol slobodnih masnih kiselina u minuti. Aktivnost imobilisane lipaze je izražena po jedinici mase imobilizata (IU/g suvog sprasenog uzorka) ili kao specifična aktivnost,  $SA_{IE}$  (IU/mg enzima) koja se izračunava prema jednačini:

$$SA_{IE} = \frac{A_{IE}}{m_{enz}} \quad (3)$$

gde je  $A_{IE}$  aktivnost imobilisanog enzima,  $m_{enz}$  masa vezanog enzima po gramu suvog sprasenog uzorka (mg<sub>enz</sub>/g).

#### Ispitivanje mehaničkih svojstava hidrogelova

Mehanička svojstva hidrogelova ispitivana su na mehaničkom spektrometru Rheometrics 605. Korišćena je geometrija paralelnih ploča prečnika 25 mm. Hidrogelovi su izloženi konstantnom naponu na smicanje od 20% pri promeni frekvencije u intervalu od 0,1 do 100 rad/s. Određivana su mehanička svojstva hidrogelova nabubrelih do stanja ravnoteže u destilovanoj vodi na 25 °C.

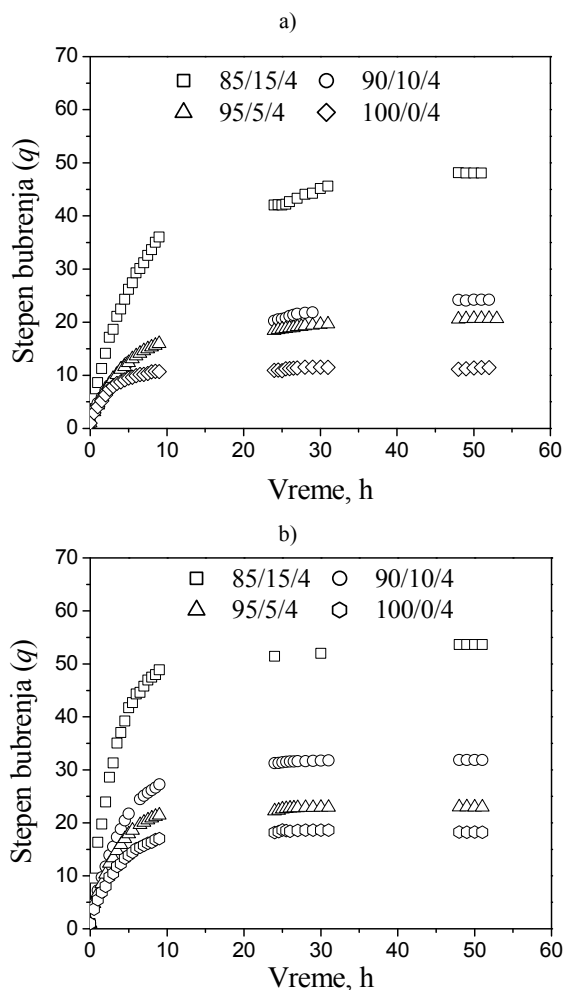
#### Skenirajuća elektronska mikroskopija

Ispitivanja su izvedena na elektronskom mikroskopu JEOL JSM-T20 Scanning Microscope. Pre SEM analize izvedena je liofilizacija hidrogelova. Kako bi se izbegle deformacije prilikom loma uzoraka, liofiliziran uzorak je potopljen u tečni azot. Nakon toga na uzorak je raspršena legura zlato/platina (15/85) pod vakuumom koristeći JEOL JEE-SS vakuum evaporator.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Poli(*N*-izopropilakrilamid), PNIPAM, je temperaturno-osetljiv hidrogel koji poseduje donju kritičnu temperaturu rastvora (LCST) u vodi oko 34 °C. Na temperaturama ispod LCST, PNIPAM hidrogelovi ispoljavaju hidrofилnu prirodu jer dominiraju interakcije polimernih lanaca sa molekulima vode, pa se usled hidratacije grupa polimernog lanca uspostavljaju vodonične veze i hidrogelovi bubre. Sa porastom temperature iznad LCST dolazi do raskidanja uspostavljenih vodoničnih veza, polimerni lanci se skupljaju, voda se istiskuje iz gela, tako da se gel kontrahuje, a stepen bubrenja opada. S druge strane, na stepen bubrenja kopolimernih hidrogelova PNIPAM/IK pored temperature utiče i sadržaj itakonske kiseline. Dodatak malih količina itakonske kiseline u PNIPAM hidrogel povećava hidrofилnost mreže i bubrenje. Na slici 1 prikazan je uticaj sadržaja itakonske kiseline na bubrenje ispitivanih hidrogelova sintetisanih

sa i bez lipaze. Poređenjem dobijenih rezultata utvrđeno je da sa porastom sadržaja itakonske kiseline raste stepen bubrenja usled hidrofilnosti karboksilnih grupa iz itakonske kiseline. Dodatak lipaze u reakcionu smešu povećava stepen bubrenja jer je lipaza makromolekul koji se ugrađuje u gel gradeći vodonične i jonske veze. Stepjen umreženja u ovom slučaju je manji, pa gel ima veću sposobnost bubrenja.



Slika 1. Uticaj sadržaja itakonske kiseline na stepen bubrenja hidrogelova sintetisanih a) bez lipaze i b) hidrogelova sintetisanih u prisustvu lipaze.

Figure 1. The effect of the itaconic acid content on the swelling degree of the synthesized hydrogels (a) without lipase and (b) hydrogels being synthesized in the presence of lipase.

Sadržaj lipaze utiče i na veličinu obrazovanih pora u hidrogelovima. Prisustvo lipaze u reakcionooj smeši pre reakcije polimerizacije utiče na formiranje većih pora u odnosu na hidrogelove sintetisane bez lipaze što je posledica formiranja manje pravilne mreže u prisustvu lipaze. Takođe, dodatak itakonske kiseline utiče na veličinu formiranih pora. Sa porastom sadržaja itakonske ki-

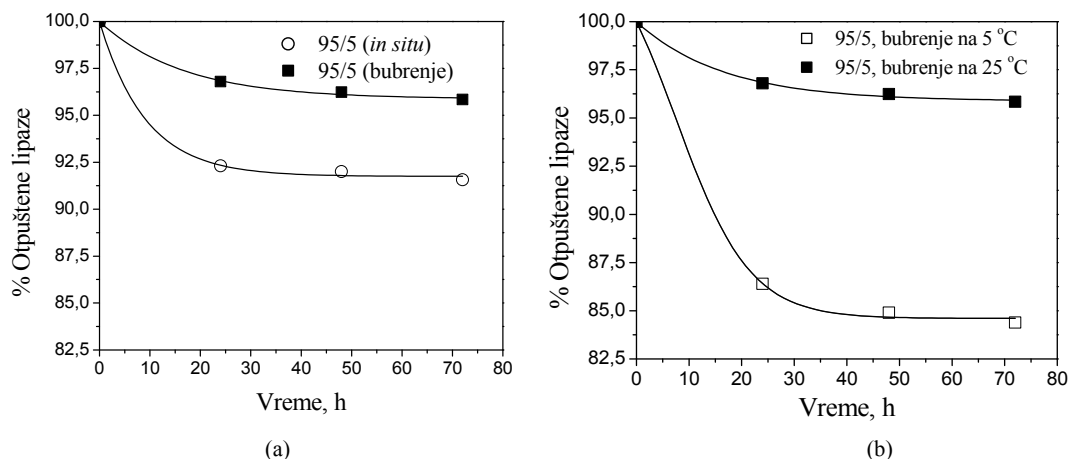
seline raste i ravnotežni stepen bubrenja, odnosno raste veličina pora hidrogela, usled uspostavljanja vodoničnih veza između itakonske kiseline i NIPAM-a – fizičko umreženje [10]. U tabeli 1 dat je ravnotežni stepen bubrenja, veličina pora, količina imobilisane lipaze i specifična aktivnost imobilisane lipaze u ispitivanim hidrogelovima. Radi poređenja data je i specifična aktivnost slobodne lipaze.

Poređenjem količina imobilisane lipaze utvrđeno je da se više enzima imobilise ukoliko se imobilizacija odvija bubrenjem uzorka u rastvoru lipaze. Takođe je uočeno da količina imobilisane lipaze zavisi od sadržaja itakonske kiseline. Sa porastom sadržaja kiseline raste količina lipaze imobilisane u hidrogelu što je u saglasnosti sa veličinom pora hidrogelova. Sa druge strane, prikazani rezultati ukazuju da je najveća specifična aktivnost imobilisane lipaze postignuta za uzorak sa 10 mas% kiseline.

Postojanje optimalnog sadržaja itakonske kiseline sa aspekta aktivnosti imobilisanog enzima može da bude posledica različite veličine pora hidrogelova pri različitim sadržajima kiseline. Pri nekoj optimalnoj veličini pora enzimaska reakcija će se odvijati uz najmanja difuziona ograničenja i sterne smetnje. Isto tako, pri većim sadržajima itakonske kiseline od optimalnog moguće je da dolazi do stvaranja interakcija između hidrofilnih grupa kiseline i enzima što može da utiče na konformaciju enzima, odnosno na njegovu aktivnost.

Međutim, iako je veća količina imobilisane lipaze ukoliko se imobilizacija izvodi bubrenjem hidrogela u rastvoru lipaze, imobilisana lipaza sporije otpušta ukoliko se imobilizacija odvija *in situ* polimerizacijom (slika 2a).

Ispitan je i uticaj temperature na imobilizaciju lipaze bubrenjem hidrogela u rastvoru lipaze na 5 i 25 °C (tabela 1). Poređenjem količina imobilisane lipaze u hidrogelu istog sastava, uočeno je da je manje lipaze imobilisano ukoliko se imobilizacija odvija na višoj temperaturi. Takođe je utvrđeno i da je specifična aktivnost imobilisane lipaze manja na 5 °C nego na 25 °C za uzorke bez itakonske kiseline i uzorke sa malim sadržajem itakonske kiseline, što jasno pokazuje da i temperatura na kojoj se imobilise enzim, ali i maseni udeo monomera u reakcionoj smeši pri sintezi kopolimera ima velikog uticaja na krajnju specifičnu aktivnost enzima. Na slici 2b prikazana je kinetika otpuštanja lipaze sa vremenom za uzorke 95/5 imobilisane metodom bubrenja prethodno sintetisanog hidrogela u rastvoru lipaze na 5 i 25 °C. Kako se iz prikazanih rezultata može uočiti, temperatura imobilizacije utiče i na kinetiku otpuštanja lipaze. Ukoliko se imobilizacija izvodi na višoj temperaturi stabilnost imobilisane lipaze će biti veća usled mogućih dodatnih interakcija između enzima i funkcionalnih grupa kopolimera na višim temperaturama. Na 25 °C praktično nema otpuštanja lipaze, što se može videti i iz vrednosti konstante brzine otpuštanja ( $0,0431 \text{ s}^{-1}$ ).



Slika 2. Kinetika otpuštanja lipaze sa vremenom: (a) imobilizacija lipaze za uzorak 95/5/4 izvedena primenom obe metode na 25 °C i (b) imobilizacija lipaze izvedena bubrenjem hidrogelova u rastvoru lipaze na 5 i 25 °C.

Figure 2. The release kinetic of lipase versus time: (a) immobilization of lipase for the sample 95/5/4 performed by both methods at 25 °C and (b) lipase immobilization performed by hydrogel swelling in lipase solution at 5 and 25 °C.

Tabela 1. Uticaj temperature na masu imobilisane lipaze u PNIPAM/IK hidrogelove

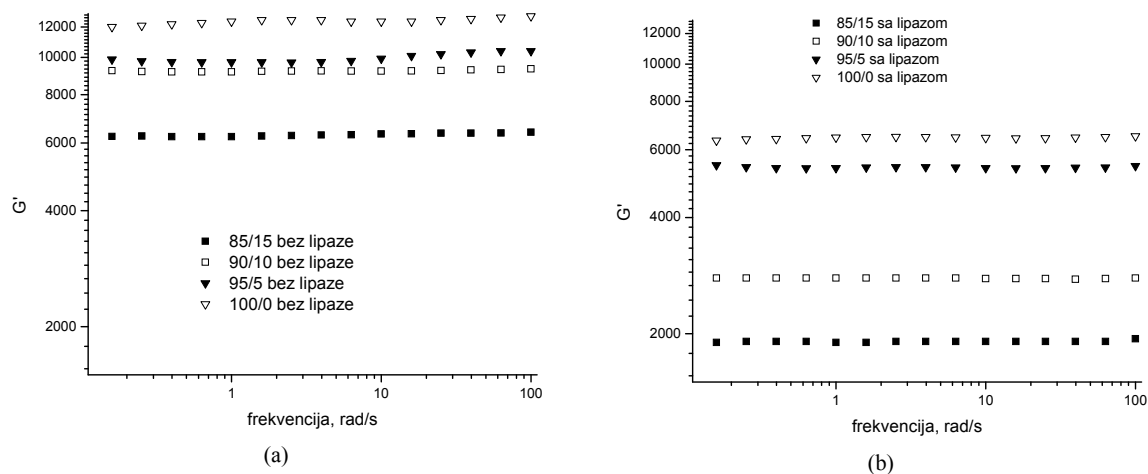
Table 1. The temperature effect on the mass of the immobilized lipase in PNIPAM/IK hydrogels

Uzorak	$m_{\text{sr. kserogel}}, \text{g}$	5 °C		25 °C	
		$m_{\text{sr. imob. lipaze}}, \text{g}$	$SA_{IE}, \text{IU/mg}_{\text{enzim}}$	$m_{\text{sr. imob. lipaze}}, \text{g}$	$SA_{IE}, \text{IU/mg}_{\text{enzim}}$
85/15/4	0,0267	0,0081	0,0430	0,0059	0,0248
90/10/4	0,0275	0,0050	0,0903	0,0065	0,0192
95/5/4	0,0196	0,0056	0,0174	0,0028	0,0336
100/0/4	0,0195	0,0041	0,0192	0,0033	0,0263

### Mehanička analiza

Pri ispitivanju mehaničkih svojstava hidrogelova, praćena je zavisnost modula sačuvane energije u funkciji frekvencije na 25 °C, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 3.

Modul sačuvane energije je nezavisan od frekvencije za sve ispitivane uzorke. Poređenjem vrednosti modula za pojedine uzorke, zapaža se da sa porastom sadržaja itakonske kiseline opada modul sačuvane energije, odnosno hidrogelovi imaju slabija mehanička svojstva.



Slika 3. Modul sačuvane energije u funkciji frekvencije za uzorke sa 4 mas% umreživača bez lipaze (a) i sa 20 mas% lipaze (b) (in situ polimerizacija) u destilovanoj vodi na 25 °C.

Figure 3. The shear storage moduli as a function of frequency for samples with 4 wt.% of the crosslinking agent without lipase (a) and with 20 wt.% of lipase (b) (in situ polymerization) in distilled water at 25 °C.

Ovo je u skladu sa rezultatima bubrenja. Veće vrednosti modula sačuvane energije su uočene kod uzoraka koji imaju niži stepen bubrenja. Isti trend je uočen i kod hidrogelova sa 20 mas% lipaze (slika 3b). Međutim, utvrđeno je da su znatno slabija mehanička svojstva dobijena za uzorke sa lipazom u poređenju sa mehaničkim svojstvima hidrogelova sintetisanih bez lipaze. Takođe je uočeno da su veće razlike u mehaničkim svojstvima sa promenom sadržaja kiseline, odnosno da porast itakonske kiseline iznad 5 mas% slabi u većoj meri mehanička svojstva uzoraka sa lipazom u odnosu na uzorke sintetisane bez lipaze. Najbolja mehanička svojstva su u oba slučaja dobijena za hidrogel bez itakonske kiseline. Uzimajući u obzir aktivnost imobilisane lipaze, stepen bubrenja i mehanička svojstva ispitivanih hidrogelova, može se zaključiti da je najbolje rezultate pokazao uzorak 95/5/4.

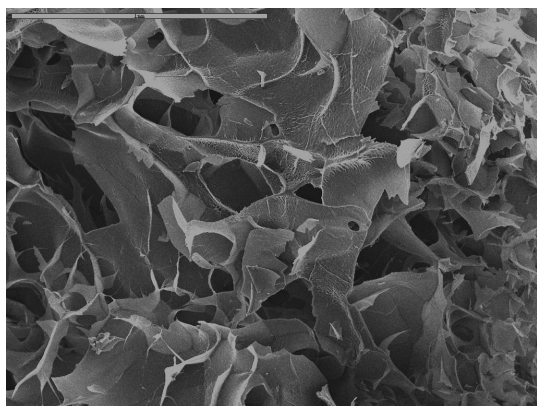
### SEM analiza

Na slici 4 prikazane su SEM mikrografije hidrogelova 95/5 sa i bez lipaze. SEM analiza je potvrdila da ispitivani hidrogelovi imaju poroznu strukturu. Takođe se uočava da postoji razlika u veličini pora, odnosno da su veće pore dobijene za uzorak sa lipazom. Uticaj prisustva lipaze na veličinu pora se može videti u tabeli 2

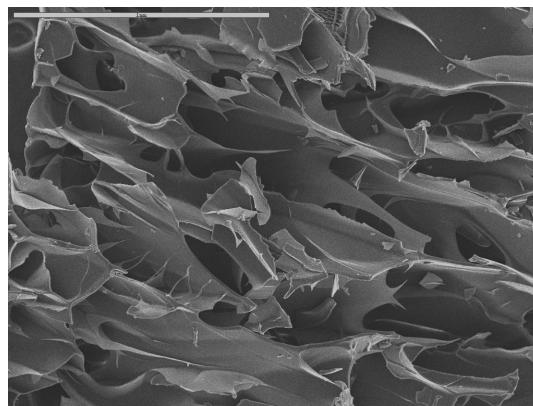
gde su date vrednosti za veličinu pora izračunate primenom teorije ravnotežnog bubrenja.

### ZAKLJUČAK

U radu je ispitana imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* u hidrogelove poli(*N*-izopropilakrilamid-ko-itakonska kiselina). Imobilizacija je izvedena na dva načina, dodatkom enzima u reakcionu smešu pre izvođenja reakcije polimerizacije i bubrenjem prethodno sintetisanog gela u rastvoru lipaze. U oba slučaja određene su mase imobilisanih enzima i njihove specifične aktivnosti. Utvrđeno je da se veća količina lipaze imobilise ukoliko se imobilizacija izvodi bubrenjem hidrogela u rastvoru lipaze, kao i da sadržaj itakonske kiseline utiče na masu imobilisane lipaze. Na imobilizaciju lipaze bubrenjem hidrogela u rastvoru lipaze utiče i temperatura na kojoj se izvodi imobilizacija. Što je veća temperatura, veća je količina imobilisane lipaze, kao i njena specifična aktivnost. Utvrđeno je da specifična aktivnost imobilisane lipaze raste sa porastom sadržaja itakonske kiseline do 10 mas%, a sa daljim porastom sadržaja kiseline opada bez obzira na način izvođenja imobilizacije. Mehanička svojstva hidrogelova slabe sa porastom sadržaja kiseline za sve ispitivane hidrogelove. Hidro-



(a)



(b)

Slika 4. SEM fotografije ispitivanih hidrogelova PNIPAM/IK 95/5 sa 4 mas% umreživača sa 20 mas% lipaze (a) i bez lipaze (b). "Bar" je 1 mm (70 $\times$ ).

Figure 4. SEM photographs of the investigated hydrogels PNIPAM/IK 95/5 with 4 wt% of the crosslinking agent with 20 wt.% of lipase (a) and without lipase (b). Bar is 1 mm (70 $\times$ ).

Tabela 2. Ravnotežni stepen bubrenja, veličina pora i masa imobilisane lipaze na 25 °C. Specifična aktivnost slobodne lipaze je 0,600 IU/mg.

Table 1. The equilibrium swelling degree, the mesh size and the lipase immobilization mass at 25 °C. The specific activity of free lipase is 0,600 IU/mg.

Uzorak	In situ polimerizacija				Bubrenje polimera u rastvoru enzima			
	$q_e$	$\xi$ ( $\mu$ m)	$m_{\text{imob.lip}}$ (g)	$SA_{\text{IE}}$ (IU/mg <sub>enzima</sub> )	$q_e$	$\xi$ ( $\mu$ m)	$m_{\text{imob.lip}}$ (g)	$SA_{\text{IE}}$ (IU/mg <sub>enzima</sub> )
85/15/4	53,6	0,0435	0,0046	0,039	48,1	0,0353	0,0081	0,043
90/10/4	31,9	0,0244	0,0046	0,089	24,2	0,0134	0,0050	0,090
95/5/4	22,9	0,0094	0,0046	0,030	20,6	0,0092	0,0056	0,030
100/0/4	18,2	0,0091	0,0032	0,007	11,3	0,0050	0,0041	0,019

gelovi sa lipazom pokazuju znatno slabija mehanička svojstva u poređenju sa hidrogelovima bez lipaze. SEM analiza je pokazala da hidrogelovi imaju poroznu strukturu. Primenom teorije ravnotežnog bubrenja izračunata je veličina pora i utvrđeno da zavisi od sadržaja itakonske kiseline i lipaze. Na osnovu veličine pora hidrogelovi se mogu svrstati u mikroporozne.

### Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije za finansijsku podršku ovom radu u okviru projekta br. 142023, «Sinteza i karakterizacija polimera i polimernih (nano)kompozita definisane molekulske i nadmolekulske strukture».

### LITERATURA

[1] S. Betigeri, S. Neau, *Biomaterials* **23** (2002) 3627-3636.

- [2] Z. Knežević, Imobilisane lipaze kao katalizatori, Zadužbina Andrejević, Beograd, 2004.
- [3] F. Malcata, H. Reyes, H. Garcia, C. Hill, C. Admunson, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67** (1990) 890-910.
- [4] A. Hamerska-Dudra, J. Bryjak, A. Trochimczuk, *Enzyme Microb. Technol.* **41** (2007) 197-204.
- [5] I.Y. Galaev, B. Mattiasson, *Trends Biotechnol.* **17** (1999) 335-340.
- [6] W. Tischer, F. Wedekind, *Topics Curr. Chem.* **200** (1999) 95-126.
- [7] M. Kalagasidis Krušić, Sinteza i svojstva hidrogelova osetljivih na spoljne stimulanse, Doktorska disertacija, Beograd, 2006.
- [8] T. Hoare, D. Kohane, *Polymer* **49** (2008) 1993-2007.
- [9] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50** (2000) 27-46.
- [10] M. Kalagasidis Krušić, J. Filipović, *Polymer* **47** (2006) 148-155.

### SUMMARY

#### THE INFLUENCE OF COMPOSITION OF POLY(N-ISOPROPYLACRYLAMIDE-CO-ITACONIC ACID) HYDROGEL ON IMMOBILIZED *Candida rugosa* LIPASE ACTIVITY

Nikola Z. Milašinović, Melina T. Kalagasidis Krušić, Zorica D. Knežević-Jugović, Jovanka M. Filipović

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11 000 Belgrade, Serbia

Scientific paper

The application of lipases as catalysts in chemical reactions has been deterred by the high cost of isolation and purification of enzymes, the instability of their structure when they are isolated from their natural environment, contamination of products with residual protein, their sensitivity to process conditions, etc. These problems could be overcome using immobilized lipases. Immobilization is achieved by fixing enzymes to or within solid supports and as a result a heterogeneous system is obtained. The present paper reports on the immobilization of *Candida rugosa* lipase in hydrogels based on *N*-isopropylacrylamide and itaconic acid. Immobilization of lipase is carried out by two different methods. In the first method, lipase is added to the reaction mixture before polymerization and crosslinking (*in situ* polymerization), while in the second method the synthesized hydrogels are immersed in lipase solution and left to reach the equilibrium swelling. The specific activities of the immobilized lipase were determined in both cases and compared. The amount of the immobilized lipase is higher if the immobilization is carried out by immersing hydrogel in lipase solution. It was observed that in both cases lipase activity increases with an increase of the itaconic acid content up to 10 wt% and thereafter decreases. From the measurements of shear storage moduli ( $G'$ ) it was concluded that the increase of the itaconic acid content decreases the mechanical properties of the hydrogels. SEM analysis confirmed the highly porous structure of hydrogels. It was found that greater pores were achieved when the enzyme was immobilized by *in situ* polymerization. When the enzyme was immobilized by *in situ* polymerization the itaconic acid content had not great effect on the mass of the immobilized enzyme, except for the 100/0 sample. On the contrary, for the samples where the enzyme was immobilized by swelling, the increase of the itaconic acid content increases the mass of the immobilized enzyme. Concerning the activity of the immobilized lipase, the swelling degree and mechanical properties of the investigated hydrogels, the best results were performed by the 95/5 hydrogel sample.

Key words: Hydrogels • Release kinetics • Lipase • Lipase immobilization  
 Ključne reči: Hidrogelovi • Kinetika otpuštanja • Lipaza • Imobilizacija lipaze