

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET**

Nikola Z. Milašinović

**SINTEZA pH- I TEMPERATURNO-OSETLJIVIH HIDROGELOVA  
ITAKONSKE KISELINE KAO NOSAČA ZA IMOBILIZACIJU  
LIPAZE IZ *CANDIDA RUGOSA***

Doktorska disertacija



Beograd, 2011.



UNIVERZITET U BEOGRADU

TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

**Nikola Z. Milašinović**

*Sinteza pH- i temperaturno-osetljivih hidrogelova  
itakonske kiseline kao nosača za imobilizaciju  
lipaze iz Candida rugosa*

Doktorska disertacija



Beograd, februar 2011.

**Mentor:**

---

Docent, dr Melina Kalagasidis Krušić, TMF

**Članovi Komisije:**

---

Van. prof., dr Zorica Knežević-Jugović, TMF

---

Naučni savetnik, dr Jovanka Filipović, IHTM

**Datum odbrane: 25. februar 2011. godine**

*„The important thing in science is not so much to obtain new facts  
as to discover new ways of thinking about them“*

*Sir William Bragg  
(1862-1942)*

*Zahvaljujem se docentu dr Melini Kalagasidis Krušić na korisnim savetima i sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije, primedbama, nesebičnom zalaganju i idejama koje su omogućile da disertacija poprimi konačan oblik.*

*Neizmerno hvala i prof. dr Zorici Knežević-Jugović na strpljenju, predlozima, pomoći i podršci u istraživanju i izradi ove doktorske disertacije.*

*Voleo bih da izrazim svoju iskrenu zahvalnost prof. dr Jovanki Filipović za ogromno i nesebično zalaganje u svim fazama izrade ove disertacije i celokupni doprinos mom radu.*

*Zahvalnost dugujem i kolegama i diplomcima koji su mi pomagali tokom izrade disertacije, kao i nenastavnom osoblju fakulteta.*

*Najveću zahvalnost dugujem onima koji sve vreme stoje uz mene – mojim prijateljima i  
**mojoj porodici.***

## SADRŽAJ

<b>IZVOD .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>SPISAK SLIKA I TABELA .....</b>	<b>X</b>
<b>SPISAK SKRAĆENICA I SIMBOLA .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>I Teorijski deo .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Lipaze.....</b>	<b>4</b>
1.1. Struktura i mehanizam delovanja lipaza.....	5
1.2. Primena lipaza .....	7
1.3. Lipaza iz <i>Candida rugosa</i> .....	9
1.4. Imobilizacija lipaze .....	12
1.5. Imobilizacija enzima u polimerne hidrogelove .....	15
<b>2. Hidrogelovi.....</b>	<b>18</b>
2.1. Dobijanje hidrogelova .....	20
2.2. Struktura hidrogelova i parametri mreže.....	20
2.3. Hidrogelovi osetljivi na spoljne stimulanse .....	22
2.3.1. Temperaturno-osetljivi hidrogelovi.....	22
2.3.2. pH-osetljivi hidrogelovi.....	25
2.3.3. Hidrogelovi osetljivi na promenu temperature i pH vrednosti .....	27
2.4. Primena hidrogelova.....	28
2.5. Dosadašnja istraživanja pH- i temperaturno-osetljivih hidrogelova itakonske kiseline i <i>N</i> -izopropilakrilamida .....	30
<b>II Eksperimentalni deo .....</b>	<b>32</b>
3.1. Reaktanti.....	33
3.1.1. <i>N</i> -izopropilakrilamid .....	34
3.1.2. Itakonska kiselina .....	34
3.1.3. <i>N,N'</i> -metilenbisakrilamid .....	35

3.1.4.	Kalijum-persulfat.....	36
3.1.5.	Kalijum-pirosulfat .....	36
3.1.6.	Lipaza iz <i>Candida rugosa</i> .....	37
3.1.7.	Polietilen glikol <i>p</i> -(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil etar .....	37
3.2.	Sinteza hidrogelova .....	38
3.3.	Karakterizacija hidrogelova.....	40
3.3.1.	Ispitivanje procesa bubrenja .....	40
3.3.2.	Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	41
3.3.3.	Mehanička svojstva hidrogelova .....	41
3.3.4.	Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija.....	41
3.3.5.	Mikroskopija atomskih sila .....	42
3.4.	Efikasnost imobilizacije i aktivnost imobilisane lipaze u hidrogelovima.....	42
3.4.1.	Reagensi za određivanje aktivnosti lipaze po Sigma proceduri .....	43
3.4.2.	pH i temperaturni optimum lipaze.....	44
3.5.	Ispitivanje stabilnosti imobilisane lipaze pri skladištenju.....	44
3.6.	Sinteza estra <i>n</i> -amil-izobutirata.....	44
3.6.1.	Optimizacija enzimski katalizovane reakcije esterifikacije.....	45
3.6.2.	Višestruka upotreba imobilisane lipaze.....	46
3.7.	Otpuštanje lipaze iz hidrogelova .....	46
<b>III</b>	<b>Rezultati i diskusija .....</b>	<b>48</b>
<b>4.</b>	<b>Sinteza i karakterizacija hidrogelova <i>N</i>-izopropilakrilamida i itakonske kiseline za imobilizaciju lipaze iz <i>Candida rugosa</i>.....</b>	<b>49</b>
4.1.	Karakterizacija hidrogelova.....	49
4.1.1.	FT-IR analiza hidrogelova bez lipaze.....	50
4.1.2.	Umetanje lipaze iz <i>Candida rugosa</i> u hidrogelove <i>N</i> -izopropilakrilamida i itakonske kiseline .....	53
4.1.3.	FT-IR analiza imobilisanih sistema.....	53
4.2.	Bubrenje hidrogelova .....	55
4.2.1.	Ispitivanje kinetike bubrenja hidrogelova .....	55

4.2.2.	„Overshooting“ efekat .....	58
4.2.3.	Uticaj pH i temperature na bubrenje.....	61
4.3.	Određivanje parametara mreže.....	64
4.4.	SEM analiza.....	68
4.5.	Mehanička svojstva hidrogelova .....	71
4.6.	AFM analiza .....	73
	Zaključak .....	79
<b>5.</b>	<b>Aktivnost lipaze imobilisane u hidrogelove <i>N</i>-izopropilakrilamida i itakonske kiseline .....</b>	<b>80</b>
5.1.	Metoda I – „ <i>In situ</i> “ imobilizacija lipaze .....	81
5.2.	Enzimski svojstva imobilisane lipaze .....	83
5.2.1.	Uticaj početne koncentracije lipaze na masu i specifičnu aktivnost imobilisanog enzima.....	83
5.2.2.	pH i temperaturni optimum lipaze imobilisane Metodom I .....	85
5.2.2.1.	Uticaj temperature na prinos aktivnosti biokatalizatora.....	85
5.2.2.2.	Uticaj pH na prinos aktivnosti biokatalizatora.....	87
5.3.	Metoda II – Imobilizacije lipaze bubrenjem .....	88
5.4.	Ispitivanje stabilnosti imobilisane lipaze pri skladištenju .....	92
	Zaključak .....	95
<b>6.</b>	<b>Modifikacija i optimizacija biokatalizatora .....</b>	<b>96</b>
6.1.	Aktivnost imobilisane lipaze .....	97
6.2.	Karakterizacija hidrogelova.....	98
6.2.1.	FT-IR analiza.....	98
6.2.2.	SEM analiza.....	99
	Zaključak .....	101
<b>7.</b>	<b>Sinteza estra <i>n</i>-amil-izobutirata katalizovana imobilisanom lipazom iz <i>Candida rugosa</i>.....</b>	<b>102</b>
7.1.	Optimizacija parametara reakcije sinteze estra katalizovane lipazom iz <i>Candida rugosa</i> .....	103
7.1.1.	Esterifikaciona sposobnost imobilisane lipaze iz <i>Candida rugosa</i> .....	103

7.1.2.	Uticaj temperature i pH na katalitičku aktivnost lipaze i sintezu estra .....	103
7.1.3.	Bubrenje hidrogelova u <i>n</i> -heksanu na 45 °C .....	106
7.1.4.	Uticaj sadržaja vode na sintezu <i>n</i> -amil-izobutirata katalizovanu imobilisanom lipazom.....	107
7.1.5.	Uticaj početne koncentracije lipaze na sintezu <i>n</i> -amil-izobutirata.....	108
7.2.	Ispitivanje ponovne primene biokatalizatora.....	110
	Zaključak .....	113
<b>8.</b>	<b>Ispitivanje mogućnosti primene hidrogelova <i>N</i>-izopropilakrilamida i itakonske kiseline za kontrolisano otpuštanje terapijskih proteina .....</b>	<b>114</b>
8.1.	Umetanje lipaze u hidrogelove .....	115
8.2.	Ispitivanje bubrenja simulacijom pH vrednosti u gastrointestinalnom traktu.....	116
8.3.	Kinetika otpuštanja lipaze iz hidrogelova .....	117
8.3.1.	Otpuštanje „ <i>in situ</i> “ umetnute lipaze .....	118
8.3.2.	Otpuštanje lipaze umetnute bubrenjem hidrogelova u rastvoru .....	120
	Zaključak .....	124
<b>IV</b>	<b>Zaključna razmatranja .....</b>	<b>125</b>
<b>9.</b>	<b>Zaključak.....</b>	<b>126</b>
	<b>LITERATURA .....</b>	<b>128</b>
	<b>PRILOG .....</b>	<b>P1</b>



## IZVOD

U ovom radu su, kopolimerizacijom preko slobodnih radikala, sintetisani temperaturno- i pH-osetljivi hidrogelovi na bazi *N*-izopropilakrilamida (NiPAAm) i itakonske kiseline (IK) različitog sastava i stepena umreženja. Karakterizacija sintetisanih uzoraka je izvedena bubrenjem, ispitivanjem mehaničkih svojstava, skenirajućom elektronskom mikroskopijom, Furijeovom transformacijskom infracrvenom analizom i mikroskopijom atomskih sila. Potvrđeno je da su sadržaj umreživača i sastav reakcione smeše uticali na strukturu hidrogela, mehanička svojstva, morfologiju i kinetiku bubrenja.

U drugom delu rada izvedena je imobilizacija enzima, a kao model jedinjenje korišćena je lipaza iz *Candida rugosa* (CRL). Imobilizacija lipaze je izvedena na dva načina, „*in situ*“ polimerizacijom (Metoda I), i bubrenjem prethodno sintetisanih suvih uzoraka u rastvoru lipaze (Metoda II), uz variranje sadržaja lipaze. Pokazano je da prisustvo itakonske kiseline i lipaze u nosaču utiče na bubrenje i mehanička svojstva hidrogela i na aktivnost enzima. Utvrđene su optimalne vrednosti pH i temperature za imobilisanu lipazu. Ispitana je i stabilnost imobilisane lipaze pri skladištenju tokom 60 dana na različitim temperaturama. Poređenjem složenosti izvođenja imobilizacije, aktivnosti imobilisane lipaze, kao i ekonomičnosti i efikasnosti primene, utvrđeno je da Metoda I ima prednost nad Metodom II.

Na osnovu dobijenih rezultata, hidrogel sa imobilisanom lipazom koji je pokazao najbolja svojstva, je primenjen kao biokatalizator u reakciji sinteze *n*-amil-izobutirata. Sinteza je izvedena esterifikacijom izobuterne kiseline i *n*-amil alkohola u *n*-heksanu. Ispitani su i optimizovani parametri reakcije i studija ponovnog iskorišćenja biokatalizatora.

Takođe, ispitana je mogućnost potencijalne primene ovih hidrogelova za kontrolisano otpuštanje lekovitih supstanci. Spektrofotometrijskom analizom je utvrđeno da profil i kinetika otpuštanja lipaze mnogo zavise od strukture hidrogela i pH vrednosti okoline. Potvrđeno je da sve formulacije hidrogelova omogućuju očuvanje visoke aktivnosti lipaze i nakon otpuštanja u uslovima koji bi izazvali denaturaciju enzima koji nije zaštićen u gelu.

Podešavanjem sastava kopolimera P(NiPAAm/IK) i stepena umreženja ovi hidrogelovi se mogu koristiti kao pogodne matrice za imobilizaciju enzima i njihovu primenu kao biokatalizatora u enzimskim reakcijama. Takođe, moguća je njihova primena kao nosača za kontrolisano otpuštanje proteina u biološki aktivnom obliku.

**Ključne reči:** Temperaturno- i pH-osetljivi hidrogelovi, *N*-Izopropilakrilamid, itakonska kiselina, lipaza iz *Candida rugosa*, imobilizacija enzima, aktivnost enzima, sinteza estra *n*-amil-izobutirata, kontrolisano otpuštanje proteina, kinetika otpuštanja

## ABSTRACT

Temperature- and pH-sensitive hydrogels, based on *N*-isopropylacrylamide (NiPAAm) and itaconic acid (IA) were synthesized by free radical crosslinking copolymerization by varying comonomer and crosslinking agent content. Characterization of the samples was performed by the swelling studies, testing mechanical properties, Scanning Electron Microscopy, Fourier transform Infrared Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. It was confirmed that the degree of crosslinking and hydrogel composition had impacts on the hydrogel structure, mechanical properties, morphology and swelling kinetics.

In order to immobilize enzyme, lipase from *Candida rugosa* (CRL) was used as a model compound. Immobilization of lipase was performed by „*in situ*“ polymerization (Method I), and by swelling of previously synthesized xerogels in lipase solution (Method II), with lipase content variation. It has been shown that itaconic acid and lipase presence in the hydrogel affect the swelling and mechanical properties of hydrogel and enzyme activity. The optimal pH and temperature values for immobilized lipase were defined. The stability of the immobilized lipase at different temperatures was determined during 60 days. It was confirmed that Method I was preferable than Method II, concerning lipase ease of immobilization, its activity, economical and efficiency aspects of its application.

Based on these criteria, the hydrogel with immobilized lipase, showing the best properties, was selected and used as biocatalyst in ester synthesis reactions. Synthesis of *n*-amyl isobutyrate is carried out by esterification of isobutyric acid and *n*-amyl alcohol in *n*-hexane. Reaction parameters and the reusability study of the biocatalyst have been evaluated and optimized.

The possibility of potential application of these hydrogels in drug controlled release systems was tested. Spectrophotometric analysis showed that the lipase release kinetics depended on hydrogel structure and environmental pH. It was confirmed that all formulations of hydrogels enable the preservation of high activity of lipase even after release conditions that would provoke denaturation of the enzyme if it was not protected in the gel.

It was concluded that by adjusting the P(NiPAAm/IA) copolymer composition and the crosslinking degree these hydrogels can be used as a suitable matrix for the enzyme immobilization and their application as biocatalyst in enzyme reactions. It was also possible to use them as carriers for protein controlled release in a biologically active form, as well.

**Keywords:** Temperature- and pH-sensitive hydrogels, *N*-Isopropylacrylamide, Itaconic acid, *Candida rugosa* lipase, Enzyme immobilization, Enzyme activity, *n*-amyl isobutyrate ester synthesis, Controlled protein release, Release kinetics

## SPISAK SLIKA I TABELA

### I Slike

Slika 1.1. Shematski prikaz enzima u vodenom rastvoru i njegova aktivacija usled adsorpcije na graničnu površinu. ....	6
Slika 1.2. Shematski prikaz mogućnosti primene lipaze iz <i>Candida rugosa</i> u industriji.....	9
Slika 1.3. Površina molekula lipaze iz <i>Candida rugosa</i> prikazana u dve konformacije. ....	10
Slika 1.4. Slika aktivne i neaktivne konformacije lipaze iz <i>Candida rugosa</i> .....	11
Slika 1.5. Metode imobilizacije enzima na različite nosače.....	13
Slika 2.1. Negativno temperaturno-osetljiv hidrogel koji ima LCST a), fazni dijagram hidrogela koji ima LCST b), fazni dijagram hidrogela koji ima UCST c). ....	23
Slika 2.2. Uticaj pH na zapreminu hidrogelova sa jonskim grupama; □ hidrogelovi koji sadrže kisele grupe, Δ hidrogelovi koji sadrže i kisele i bazne grupe, ○ hidrogelovi koji sadrže bazne grupe. ....	26
Slika 2.3. Shematski prikaz oslobađanja aktivne supstance iz hidrogela (sistem tipa rezervoara).....	29
Slika 2.4. Shematski prikaz oslobađanja lekovite supstance iz hidrogela (sistem tipa matrice). ....	29
Slika 3.1. Strukturna formula <i>N</i> -izopropilakrilamida.....	34
Slika 3.2. Strukturna formula itakonske kiseline.....	35
Slika 3.3. Strukturna formula <i>N,N'</i> -metilenbisakrilamida. ....	35
Slika 3.4. Strukturna formula kalijum-persulfata. ....	36
Slika 3.5. Strukturna formula kalijum-pirosulfata.....	37
Slika 3.6. 3-D formula lipaze iz <i>Candida rugosa</i> .....	37
Slika 3.7. Strukturna formula Triton X-100. ....	38
Slika 3.8. Shema procesa sinteze hidrogelova.....	40

Slika 4.1. FT-IR spektri sintetisanih hidrogelova sa a) 2,0 mas% MBA ((A) 85/15/2/0; (B) 90/10/2/0; (C) 95/5/2/0 i (D) 100/0/2/0) i b) 4,0 mas% MBA ((E) 85/15/4/0; (F) 90/10/4/0; (G) 95/5/4/0 i (H) 100/0/4/0). .....	52
Slika 4.2. FT-IR spektri slobodne lipaze (A), hidrogelova bez lipaze: 90/10/2/0 (B) i 90/10/4/0 (C); i hidrogelova sa lipazom: 90/10/2/2 (D), 90/10/4/2 (E), 90/10/2/20 (F), 90/10/4/20 (G). Spektri ostalih hidrogelova su dati u Prilogu. ....	55
Slika 4.3. Uticaj stepena umreženja, sadržaja itakonske kiseline i pH rastvora na stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova sintetisanih bez lipaze: a) 2,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH=2,20) i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20). ....	56
Slika 4.4. Uticaj stepena umreženja, sadržaja itakonske kiseline i pH rastvora na stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova sintetisanih sa 2,0 mas% lipaze: a) 2,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20) i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20). ....	56
Slika 4.5. Uticaj stepena umreženja, sadržaja itakonske kiseline i pH rastvora na stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova sintetisanih sa 20,0 mas% lipaze: a) 2,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20) i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20). ....	57
Slika 4.6. „Overshooting“ efekat kod hidrogelova sintetisanih bez lipaze sa a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača, pri pH = 2,20 ± 0,01 i temperaturi od 37 °C. ....	58
Slika 4.7. „Overshooting“ efekat za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 2,0 mas% umreživača i a) 2,0 mas% i b) 20,0 mas% lipaze na pH = 2,20 ± 0,01 i temperaturi od 37 °C. ....	59
Slika 4.8. „Overshooting“ efekat za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 4,0 mas% umreživača i a) 2,0 mas% i b) 20,0 mas% lipaze na pH = 2,20 ± 0,01 i temperaturi od 37 °C. ....	59
Slika 4.9. Ravnotežni stepen bubrenja ispitivanih hidrogelova bez lipaze sa a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C u puferima različitih pH vrednosti. ....	61
Slika 4.10. Ravnotežni stepen bubrenja ispitivanih hidrogelova sa 20,0 mas% lipaze i a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C u puferima različitih pH vrednosti. ....	62
Slika 4.11. Ravnotežni stepen bubrenja ispitivanih hidrogelova bez lipaze sa a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača na različitim temperaturama u pH = 6,80 ± 0,01. ....	62
Slika 4.12. Ravnotežni stepen bubrenja ispitivanih hidrogelova sa 20,0 mas% lipaze i a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača na različitim temperaturama u pH = 6,80 ± 0,01. ....	63
Slika 4.13. Ravnotežni stepen bubrenja za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 i b) 4,0 mas% umreživača na pH = 2,20 ± 0,01 i 6,80 ± 0,01. ....	65

Slika 4.14. Veličina pora za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 i b) 4,0 mas% umreživača i različitim sadržajem CRL na pH = $2,20 \pm 0,01$ i $6,80 \pm 0,01$ .....	65
Slika 4.15. Parametar interakcije polimer-rastvarač za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 i b) 4,0 mas% umreživača na pH = $2,20 \pm 0,01$ i $6,80 \pm 0,01$ .....	66
Slika 4.16. Molekulska masa polimernih lanaca između dve tačke umreženja za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 i b) 4,0 mas% umreživača na pH = $2,20 \pm 0,01$ i $6,80 \pm 0,01$ .....	66
Slika 4.17. SEM mikrofografije hidrogelova a) 90/10/2/0 (levo) i 90/10/4/0 (desno); b) 85/15/2/0 (levo) i 100/0/2/0 (desno) bubrenih do ravnoteže u pH $6,80 \pm 0,01$ na 37 °C ('bar' 500 $\mu\text{m}$ , 70 x).....	68
Slika 4.18. SEM mikrofografije kopolimernih hidrogelova a) 90/10/2/2 (levo) i 90/10/2/20 (desno); i b) 90/10/4/2 (levo) i 90/10/4/20 (desno), bubreni do ravnoteže u pH $6,80 \pm 0,01$ na 37 °C ('bar' 500 $\mu\text{m}$ , 70 x). ....	69
Slika 4.19. SEM mikrofografije hidrogelova sa 4,0 mas% umreživača, 20,0 mas% lipaze i a) 15,0 mas% IK (85/15/4/20) i b) 0,0 mas% IK (100/0/4/20) bubrenih do ravnoteže u pH $6,80 \pm 0,01$ na 37 °C ('bar' 1mm, 70 x). ....	70
Slika 4.20. SEM mikrofografije hidrogelova sa 10,0 mas% IK, 20,0 mas% lipaze i a) 2,0 mas% (90/10/2/20) i b) 4,0 mas% (90/10/4/20) umreživača bubrenih do ravnoteže u pH $6,80 \pm 0,01$ na 37 °C ('bar' 1 mm, 70 x). ....	70
Slika 4.21. Modul sačuvane energije, $G'$ u funkciji ugaone brzine za P(NiPAAm/IK) hidrogelove različitog sastava sa a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača, bubrenih do ravnoteže u pH $6,80 \pm 0,01$ na 37 °C. ....	71
Slika 4.22. Modul sačuvane energije, $G'$ u funkciji ugaone brzine za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a) 90/10/2 i (b) 90/10/4 sa različitim sadržajem lipaze; (c) sa 2,0 mas% i (d) 4,0 mas% umreživača i 20 mas% lipaze, bubreni do ravnoteže u pH $6,80 \pm 0,01$ na 37 °C. ....	73
Slika 4.23. AFM analiza za uzorak 85/15/2/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine. ....	74
Slika 4.24. AFM analiza za uzorak 90/10/2/0: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine. ....	74
Slika 4.25. AFM analiza za uzorak 90/10/2/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine. ....	75
Slika 4.26. AFM analiza za uzorak 90/10/4/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine. ....	75

Slika 4.27. AFM analiza za uzorak 95/5/2/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine. ....	76
Slika 4.28. AFM analiza za uzorak 100/0/2/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine. ....	76
Slika 5.1. Prosečna specifična aktivnost lipaze imobilisane u P(NiPAAm/IK) hidrogelove za različito vreme trajanja reakcije. ....	81
Slika 5.2. Specifična aktivnost lipaze iz filtrata, nakon otpuštanja iz P(NiPAAm/IK) hidrogelova, za različito vreme trajanja reakcije. ....	82
Slika 5.3. Prinos aktivnosti lipaze imobilisane u P(NiPAAm/IK) hidrogelove za različito vreme trajanja reakcije. ....	82
Slika 5.4. Uticaj koncentracije lipaze u reakcionoj smeši za polimerizaciju na masu imobilisane lipaze i njenu specifičnu aktivnost za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 2,0 mas% MBA (Masa imobilisane lipaze je prikazana isprekidanom linijom: □: 100/0, ○: 95/5, △90/10, ◇: 85/15). ....	84
Slika 5.5. Uticaj koncentracije lipaze u reakcionoj smeši za polimerizaciju na masu imobilisane lipaze i njenu specifičnu aktivnost za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 4,0 mas% MBA (Masa imobilisane lipaze je prikazana isprekidanom linijom: □: 100/0, ○: 95/5, △90/10, ◇: 85/15). ....	84
Slika 5.6. Aktivnost imobilisane lipaze u funkciji temperature za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 mas%, b) 4,0 mas% umreživača i c) za uzorke 90/10/2/20, 90/10/4/20. Radi poređenja prikazana je i aktivnost slobodne lipaze. ....	86
Slika 5.7. Aktivnost imobilisane lipaze u funkciji pH vrednosti rastvora za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 mas%, b) 4,0 mas% umreživača i c) 90/10/2/20, 90/10/4/20. Radi poređenja prikazana je i aktivnost slobodne lipaze. ....	87
Slika 5.8. Relativna aktivnost (%) slobodne i imobilisane lipaze u 90/10/2/20 hidrogel (Metoda I) nakon skladištenja na različitim temperaturama tokom 60 dana. Reakcije su izvedene na emulziji maslinovog ulja standardnom procedurom, na 37 °C i na pH 7 u trajanju od 3 h. ....	93
Slika 5.9. Relativna aktivnost (%) slobodne i imobilisane lipaze u 90/10/2/20 (Metoda I), kao i lipaze imobilisane Metodom II u hidrogel 90/10/2/0 nakon skladištenja na 4 °C tokom 60 dana. Reakcije su izvedene na emulziji maslinovog ulja standardnom Sigma procedurom, na 37 °C i na pH 7,0 u trajanju od 3 h. ....	94

Slika 6.1. FT-IR spektri hidrogelova; (a) P(NiPAAm/IK)–1, (b) P(NiPAAm/IK)–2, (c) P(NiPAAm/IK)–3, (d) P(NiPAAm/IK)–4 and (e) P(NiPAAm/IK)–5.....	99
Slika 6.2. SEM mikrografije ispitivanih hidrogelova 90/10/2 a) bez dodatog Triton X-100, P(NiPAAm/IK)–1 i b) sa 0,5 mas% Triton X-100, P(NiPAAm/IK)–4, bubrenih do ravnoteže na 37 °C (‘bar’ 500 μm, 70 x).....	100
Slika 7.1. Uticaj a) temperature i b) pH na reakciju esterifikacije izobuterne kiseline <i>n</i> -amil alkoholom u <i>n</i> -heksanu katalizovane CRL imobilisanom u P(NiPAAm/IK)–1 hidrogel Metodom I.....	104
Slika 7.2. Uticaj a) temperature (200 μL pufera pH 8,00; 0,2000 g biokatalizatora; trajanje ciklusa 24 h) i b) pH (45 °C; trajanje ciklusa 24 h; 0,2000 g biokatalizatora; 200 μL puferskog rastvora) na reakciju esterifikacije izobuterne kiseline <i>n</i> -amil alkoholom u <i>n</i> -heksanu katalizovanu CRL imobilisanom Metodom II.....	105
Slika 7.3. Uticaj početne koncentracije lipaze u rastvoru za bubrenje na prinos estera u reakciji esterifikacije izobuterne kiseline <i>n</i> -amil alkoholom u <i>n</i> -heksanu katalizovanu CRL (45 °C; trajanje ciklusa 24 h; 200 μL destilovane vode i puferskog rastvora pH 8,00). .....	105
Slika 7.4. Bubrenje hidrogelova u <i>n</i> -heksanu na 45 °C.....	106
Slika 7.5. Proces aktivacije lipaze. ....	107
Slika 7.6. Uticaj zapremine dodate vode na reakciju esterifikacije izobuterne kiseline sa <i>n</i> -amil alkoholom u <i>n</i> -heksanu katalizovanu CRL imobilisanom a) Metodom I i b) Metodom II u 1,0 i 5,0 mg <sub>enz</sub> /mL rastvora na 45 °C (vreme trajanja ciklusa 48 h; 0,2000 g biokatalizatora).....	108
Slika 7.7. Uticaj mase biokatalizatora na reakciju esterifikacije izobuterne kiseline sa <i>n</i> -amil alkoholom u <i>n</i> -heksanu katalizovanu CRL imobilisanom a) Metodom I i b) Metodom II u rastvorima različitih koncentracija lipaze a) 1,0 i b) 5,0 mg <sub>enz</sub> /mL rastvora.....	109
Slika 7.8. Sinteza <i>n</i> -amil-izobutirata uz lipazu iz <i>Candida rugosa</i> imobilisanu u P(NiPAAm/IK)–1 hidrogel a) Metodom I i b) Metodom II u funkciji vremena na 45 °C pri brzini mešanja od 150 obr/min. Koncentracija izobuterne kiseline i <i>n</i> -amil alkohola bila je 0,1 M; reakcija je izvedena u <i>n</i> -heksanu pri molarnim odnosom izobuterne kiseline i <i>n</i> -amil alkohola 230:270 (μL).....	110
Slika 7.9. Sinteza <i>n</i> -amil-izobutirata uz lipazu iz <i>Candida rugosa</i> imobilisanu a) Metodom I i b) Metodom II na 45 °C pri brzini mešanja od 150 obr/min. Trajanje ciklusa je bilo 48 h za Metodu I, odnosno 24 h za Metodu II. Koncentracija izobuterne kiseline i <i>n</i> -	

amil alkohola bila je 0,1 M; reakcija je izvedena u <i>n</i> -heksanu sa molarnim odnosom izobuterne kiseline i <i>n</i> -amil alkohola 230:270 (μL).....	111
Slika 8.1. Zavisnost stepena bubrenja od vremena za 95/5/2/20 i 95/5/4/20 hidrogelove (Metoda I) i 95/5/2/0 i 95/5/4/0 (Metoda II) bubrenih u rastvorima lipaze različitih koncentracija na 37 °C. ....	117
Slika 8.2. Srednje normalizovane kumulativne vrednosti otpuštene lipaze ( $M_t/M_\infty$ ) u funkciji vremena za hidrogelove P(NiPAAm/IK) sa 20 mas% lipaze i 2,0 mas% umreživača na 37 °C. Rezultati su prikazani za prvih 60 % procesa otpuštanja (85/15 —; 90/10 – –; 95/5 ...; 100/0 ——).....	118
Slika 8.3. Srednje normalizovane kumulativne vrednosti otpuštene lipaze ( $M_t/M_\infty$ ) u funkciji vremena za hidrogelove P(NiPAAm/IK) sa 20 mas% lipaze i 4,0 mas% umreživača na 37 °C. Rezultati su prikazani za prvih 60 % procesa otpuštanja (85/15 —; 90/10 – –; 95/5 ...; 100/0 ——).....	119
Slika 8.4. Srednje normalizovane kumulativne vrednosti otpuštene lipaze ( $M_t/M_\infty$ ) u funkciji vremena na 37 °C za hidrogelove P(NiPAAm/IK) sa 2,0 mas% umreživača kod kojih je lipaza umetnuta bubrenjem. ....	120
Slika 8.5. Srednje normalizovane kumulativne vrednosti otpuštene lipaze ( $M_t/M_\infty$ ) u funkciji vremena na 37 °C za hidrogelove P(NiPAAm/IK) sa 4,0 mas% umreživača kod kojih je lipaza umetnuta bubrenjem. ....	121



## II Tabele

Tabela 1.1. Primena lipaza u industriji.....	7
Tabela 1.2. Prirodni polimeri i sintetski monomeri najčešće korišćeni u izradi hidrogelova. .....	16
Tabela 2.1. Prikaz polimera koji imaju LCST, njihovih strukturnih formula i LCST vrednosti.....	24
Tabela 4.1. Karakteristične apsorpcione trake homopolimera, poli( <i>N</i> -izopropilakrilamida), poli(itakonske kiseline) i kopolimera, poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid-ko-itakonska kiselina) sastava 90/10/2/0 <sup>176-180</sup> .....	50
Tabela 4.2. Ravnotežni stepen bubrenja, parametri mreže i parametar interakcije za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 2,0 i 4,0 mas% umreživača na 37 °C.....	64
Tabela 4.3. Veličina pora P(NiPAAm/IK) hidrogelova sa 20,0 mas% lipaze na različitim temperaturama.....	67
Tabela 4.4. Srednja vrednost hrapavosti površine P(NiPAAm/IK) hidrogelova. ....	77
Tabela 5.1. Uticaj temperature na aktivnost lipaze nakon imobilizacije po Metodi II (bubrenje kserogelova u rastvoru lipaze koncentracije 1,0 mg <sub>enz</sub> /mL pufera pH 7,00 ± 0,01.....	89
Tabela 5.2. Uticaj pH rastvora na aktivnost imobilisane lipaze nakon imobilizacije po Metodi II (bubrenje kserogelova na 5 °C u rastvoru lipaze koncentracije 1,0 mg <sub>enz</sub> /mL pufera pH 7,00 ± 0,01. ....	90
Tabela 5.3. Uticaj koncentracije lipaze u rastvoru na aktivnost imobilisane lipaze nakon imobilizacije po Metodi II (bubrenje kserogelova na 5 °C u rastvoru pH vrednosti 7,00 ± 0,01). ....	91
Tabela 6.1. Efikasnost P(NiPAAm/IK) kopolimera kao nosača za imobilizaciju CRL.....	98
Tabela 8.1. Masa ugrađene lipaze i efikasnost umetanja u P(NiPAAm/IK) hidrogelove. ....	115

Tabela 8.2. Masa umetnute lipaze i efikasnost umetanja Metodom II za uzorke 95/5/2/0 i 95/5/4/0 bubrene do ravnoteže u rastvorima različitih početnih koncentracija lipaze (C). .....	116
Tabela 8.3. Konstanta bubrenja, difuzioni eksponent i veličina pora za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 20 mas% lipaze umetnute „ <i>in situ</i> “ polimerizacijom. ....	122

## SPISAK SKRAĆENICA I SIMBOLA

### I Skraćenice

#### *Spisak skraćenica*

AFM	Mikroskopija atomskih sila
FT-IR	Furijeova transformacijska infracrvena (spektroskopija)
GI trakt	Gastrointestinalni trakt
HIV	Humano imunodeficijenti virus
HPM	Hibridna polimerna mreža
IPM	Interpenetrirajuća polimerna mreža
LCST	Donja kritična temperatura rastvora (eng. Lower Critical Solution Temperature)
Lip1-Lip7	Izoenzimi lipaze
Metoda I	„ <i>In situ</i> “ imobilizacija lipaze
Metoda II	Umetanje lipaze bubrežjem
PNiPAAm	Poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid)
P(NiPAAm/IK)	Poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid- <i>ko</i> -itakonska kiselina)
PHEMA	Poli(hidroksietil metakrilat)
PLGA	Poli(mlečna kiselina- <i>ko</i> -glikolna kiselina)
PVC	Poli(vinil hlorid)
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija
UCST	Gornja kritična temperatura rastvora (eng. Upper Critical Solution Temperature)
UV	Ultraljubičasta spektroskopija
UV/Vis	Ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija

Spisak hemikalija

CRL	Lipaza iz <i>Candida rugosa</i>
HEMA	Hidroksietil metakrilat
HCl	Hlorovodonična kiselina
IK	Itakonska kiselina
KCl	Kalijum hlorid
KPS	Kalijum-persulfat
KPyS	Kalijum-pirosulfat
MBA	<i>N,N'</i> -metilenbisakrilamid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (×12H <sub>2</sub> O)	Dinatrijum hidrogen fosfat (dodeka hidrat)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (×2H <sub>2</sub> O)	Natrijum dihidrogen fosfat (dihidrat)
NaOH	Natrijum hidroksid
NiPAAm	<i>N</i> -izopropilakrilamid
PVA	Poli(vinil alkohol)
PVP	Poli( <i>N</i> -vinil-2-pirolidon)
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
Triton X-100	Polietilen glikol <i>p</i> -(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil etar

## II Simboli

### DEO I – TEORIJSKI DEO

#### *Poglavlje 1.*

(E+S)	Kompleks enzim-supstrat
CRLc	Zatvorena konformacija lipaze iz <i>Candida rugosa</i>
CRLo	Otvorena konformacija lipaze iz <i>Candida rugosa</i>
E	Molekul enzima u rastvoru
S	Molekul supstrata

**Poglavlje 2.**

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$	Slobodna energija procesa (rastvaranja) (J)
$\Delta H$	Promena entalpije (rastvaranja) (J)
T	Temperatura (K)
$\Delta S$	Promena entropije (formiranja veze) (J/K)
COOH	Karboksilna grupa
$C_n$	Florijev karakterističan odnos
I	Jonska jačina medijuma ( $\text{mol/dm}^3$ )
$K_{a1}$	Prva konstanta disocijacije kiseline sa dve COOH grupe
$K_{a2}$	Druga konstanta disocijacije kiseline sa dve COOH grupe
l	Dužina C–C veze u osnovnom lancu (m)
$M_c$	Srednja molekulska masa polimernog lanca između dve susedne tačke umrežanja (g/mol)
$M_r$	Molekulska masa osnovne strukturne jedinice koja čini polimerni lanac (g/mol)
NH <sub>2</sub>	Amino grupa
OH	Hidroksilna grupa
pK <sub>a</sub>	Konstanta disocijacije kiseline
pK <sub>b</sub>	Konstanta disocijacije baze
q <sub>e</sub>	Ravnotežni stepen bubrenja
$(\bar{r}^2)^{1/2}$	Kvadratni koren srednjeg kvadrata rastojanja neporemećenog lanca između dva susedna mesta umreženja
t	Temperatura (°C)
V <sub>1</sub>	Molarna zapremina medijuma za bubrenje ( $\text{m}^3/\text{mol}$ )
X	Maseni udeo dikarbonske kiseline

*Grčki simboli*

$\alpha$	Stepen izduženja polimernog lanca u bilo kom pravcu
$v_{2,r}$	Zapreminski udeo polimera u stanju relaksacije
$v_{2,s}$	Zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju
$\xi$	Veličina pora
$\phi$	Funkcionalnost umreživača
$\chi$	Parametar interakcije polimer-rastvarač
$\bar{v}$	Specifična zapremina polimera

## DEO II – EKSPERIMENTALNI DEO

### Poglavlje 3.

<i>p.a.</i>	Pro analysi
Å	Angstrom
$C = 144 \times (\text{Abs}_{215} / \text{Abs}_{225})$	Koncentracija otpuštenog proteina ( $\mu\text{g/mL}$ )
Abs215	Apsorbancija na talasnoj dužini od 215 nm
Abs225	Apsorbancija na talasnoj dužini od 225 nm
IU	Internacionalna jedinica
obr/min	Obrtaja po minutu
$q = m_t / m_0$	Stepen bubrenja
$m_t$	Masa nabubrelog hidrogela u trenutku $t$ (g)
$m_0$	Masa kserogela (g)

## DEO III – REZULTATI I DISKUSIJA

### Poglavlje 4.

$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Izopropil grupa
CONH	Amido grupa
$\text{COO}^-$	Karboksilni anjon
$G'$	Modul sačuvane energije
STD	Standardna devijacija
$\Delta G = \Delta G_m + \Delta G_{el} + \Delta G_j$	Gibsova slobodna energija (J)
$\Delta G_m$	Gibsova energija spontanog mešanja molekula fluida sa polimernim lancima (J)
$\Delta G_{el}$	Doprinos Gibsovoj energiji usled elastične sile otpora unutar hidrogela (J)
$\Delta G_j$	Doprinos Gibsovoj energiji usled prisustva jonskih grupa, koji se javlja kod jonskih hidrogelova (J)



**Poglavlje 5.**

Y	Prinos aktivnosti (%)
---	-----------------------

**Poglavlje 8.**

t	Vreme trajanja reakcije polimerizacije (h)
$t_{1/2}$	Poluvreme reakcije otpuštanja lipaze (h)
k	Konstanta bubrenja
$M_{\infty}$	Ukupna kumulativna masa oslobođene lipaze u stanju ravnoteže
$M_t$	Ukupna kumulativna masa oslobođene lipaze u vremenu $t$
n	Difuzioni eksponent
$P_g$	Masa umetnute lipaze (mg/g <sub>kserogela</sub> )

*Grčki simboli*

$\eta$	Efikasnost umetanja lipaze (%)
--------	--------------------------------

## UVOD

Jedna od prvih primena hidrogelova u medicini bila je za izradu kontaktnih sočiva zbog zadovoljavajućih mehaničkih svojstava, dobrog indeksa refrakcije i visoke propustljivosti kiseonika. Zahvaljujući specifičnim svojstvima danas su hidrogelovi postali veoma atraktivni za primenu u biomedicinske i farmaceutske svrhe, kao i u poljoprivredi, biologiji, ekologiji, itd. Posebno su interesantni hidrogelovi osetljivi na spoljne stimulanse koji pružaju velike mogućnosti za različite primene jer se njihova fizičko-hemijska i mehanička svojstva mogu kontrolisati promenama fizioloških uslova (pH vrednost, temperatura, jonska jačina, promena koncentracije biološki aktivnih supstanci, itd.).

Hidrogelovi su polimerne mreže, koje mogu da upiju veliku zapreminu okolnog fluida. Zahvaljujući fizičkom i/ili hemijskom umreženju, nerastvorni su u njima, odnosno bubre. Na postizanje željenih svojstava i ponašanje hidrogelova pri bubrenju, njihovu stabilnost, biodegradabilnost, jačinu i biokompatibilnost moguće je uticati izborom monomera i uslova sinteze <sup>1</sup>.

Primena enzima kao katalizatora hemijskih reakcija u industrijskim procesima do nedavno je bila vrlo ograničena usled njihove nedovoljne stabilnosti uzrokovane osetljivošću enzima na promene u spoljašnjoj sredini, visoke cene i neekonomičnog načina njihove upotrebe. Savremena istraživanja su orijentisana ka imobilizaciji enzima u prirodne i sintetske hidrogelove. Vezivanjem enzima (fizičko ili hemijsko) za čvrstu podlogu, se omogućava separacija enzima iz reakcione smeše i višekratna upotreba u šaržnim i kontinualnim procesima čime je prevaziđen problem upotrebe nativnih enzima <sup>2</sup>. Aktivnost imobilisanog enzima u mnogome zavisi od strukture samog hidrogela, metode i uslova imobilizacije, tipa enzima, njegovog sadržaja i reakcionih parametara.

S druge strane, jedan od najvećih izazova istraživačima predstavlja mogućnost primene hidrogelova za kontrolisano otpuštanje terapijskih proteina jer se na taj način može sprečiti inaktivacija enzima do mesta primene i poboljšati njegova permeabilnost. Zahvaljujući „protein-friendly“ okruženju, usled velikog sadržaja vode, kao i relativno jednostavne proizvodnje hidrogelova, kontrolisano otpuštanje terapijskih proteina privlači sve veću pažnju <sup>3</sup>. Glavna istraživanja u farmaceutskoj industriji su fokusirana na razvijanje sistema, za kontrolisano otpuštanje lekovitih i bioaktivnih supstanci koji omogućuju difuziju molekula različitih veličina u i izvan njih, pri čemu se povećava efikasnost lekovitih supstanci i smanjuju neželjeni efekti <sup>4,5</sup>.

## CILJ RADA

Predmet ovog rada je imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* u temperaturno- i pH-osetljiv hidrogel *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline, biokompatibilan i amfifilan nosač, nenedenaturišući za mnoge proteine<sup>6,7</sup>. Iako u literaturi postoji veliki broj radova na temu imobilizacije lipaza u prirodne hidrogelove kao što su alginati, hitozani i drugi, imobilizacija lipaze u hidrogelove na bazi itakonske kiseline nije dovoljno ispitana<sup>8,9</sup>, a po prvi put je ispitana imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* u ovu matricu.

U radu je izvedena imobilizacija enzima na dva načina, „*in situ*“ polimerizacijom, tj. dodatkom enzima u reakcionu smešu pre početka reakcije polimerizacije i umrežavanja (Metoda I), i bubrenjem prethodno sintetisanog hidrogela u rastvoru enzima (Metoda II). Efikasnosti metoda imobilizacije upoređene su na osnovu mase vezanog enzima po jedinici mase nosača kao i specifične aktivnosti dobijenih biokatalizatora. Ispitan je uticaj sastava hidrogelova na masu, specifičnu aktivnost i stabilnost imobilisanog enzima praćenjem kinetike otpuštanja imobilisane lipaze iz hidrogelova<sup>10,11</sup>.

Osnovni cilj je bio da se ispita uticaj sastava hidrogelova sa aspekta odnosa monomera i koncentracije umreživača, kao i načina imobilizacije lipaze u hidrogelove, na specifičnu aktivnost i stabilnost biokatalizatora. Kako je stabilnost imobilisanog enzima veoma važno svojstvo za njegovu praktičnu primenu, ispitana je i mogućnost reciklacije enzima i ponovne upotrebe. Optimizovani su reakcioni uslovi na sintezu estra *n*-amil-izobutirata i stabilnost pri skladištenju imobilisanog enzima.

Takođe, cilj je bio i da se ispita mogućnost modifikacije dobijenog hidrogela kako bi mogao da se koristi kao nosač za kontrolisano otpuštanje terapijskih proteina. Ispitan je uticaj strukture hidrogela i okolnog medijuma na *in vitro* otpuštanje terapijskog proteina, u funkciji sastava hidrogela i pH, na 37 °C.



# DEO I

---

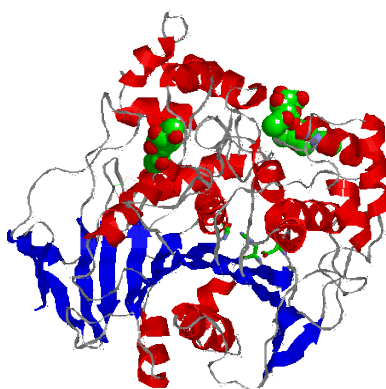
*Teorijski deo*

## POGLAVLJE 1

*Lipaze*

## POGLAVLJE 2

*Hidrogelovi*



## 1. Lipaze

Lipaze su enzimi koji katalizuju veliki broj reakcija pod blagim uslovima: hidrolizu masti i ulja, hidrolizu estara karboksilnih kiselina od najjednostavnijih estara monohidroksilnih alkohola do najsloženijih tricikličnih acetata, reakcije aminolize, acidolize i dr. Prirodni supstrat lipaza su triacilgliceroli čija se hidroliza odvija do slobodnih masnih kiselina, diacilglicerola, monoacilglicerola i glicerola <sup>12</sup>. Zahvaljujući mogućnosti katalize velikog broja reakcija, jedinstvenoj strukturi i mehanizmu reakcije lipaze spadaju u red najviše proučavanih enzima u literaturi. One igraju važnu ulogu u ćelijskom metabolizmu i vanćelijskoj razgradnji lipida. Osim hidrolize, katalizuju i druge reakcije kao što su sinteze estara i transesterifikacije, i to uglavnom uz visoku regio- i enantioselektivnost, što ih čini posebno važnim biokatalizatorima.

Mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobiološkog porekla. Lipaze su veoma rasprostranjene u prirodi i mogu se naći pretežno u semenju, plodovima i podzemnim delovima biljaka, u životinjskim organizmima, naročito u pankreasu i crevima. Veliki broj mikroorganizama ih sintetiše, uglavnom *Pseudomonas*, *Achromobacter* i *Staphylococcus*. Utvrđeno je da preko 90 % mikroorganizama pokazuje lipolitičku aktivnost. Pored bakterija i veliki broj kvasaca (*Candida*, *Torulopsis*) i plesni (*Rhizopus*, *Penicilium*, *Aspergillus* i dr.)

sintetišu lipaze. Zbog pristupačnosti i niske cene, lipaze proizvedene iz kvasaca i plesni su najčešće korišćene lipaze<sup>12</sup>. Najpoznatija animalna lipaza je pankreasna lipaza koja je prvi put izolovana iz pankreasnog soka još 1956. godine.

Najvažnija svojstva lipaza su specifičnost/selektivnost prema određenim supstratima, termostabilnost, pH i temperaturni optimum. Ova svojstva prvenstveno zavise od njihovog porekla, odnosno od toga da li su u pitanju biljne, animalne ili mikrobne lipaze, iako se u okviru svake grupe ispoljavaju znatne razlike.

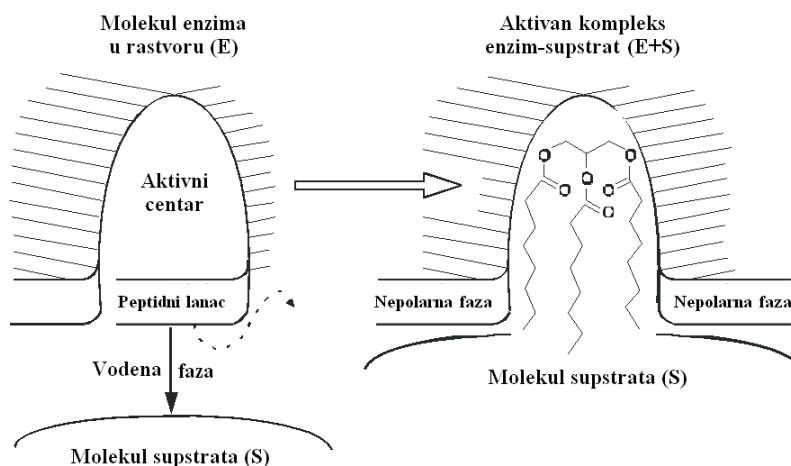
Veoma važno svojstvo lipaza je njihova selektivnost koja je ključna za praktičnu primenu lipaza. Pravilnim izborom lipaza omogućava se dobijanje željenog proizvoda u velikom prinosu. Lipaze pokazuju različite vrste specifičnosti u zavisnosti od porekla. Tako pokazuju specifičnost prema estru, što znači da postoji razlika u brzini hidrolize različitih estara. Druga vrsta specifičnosti koju mogu da imaju je poziciona specifičnost koja se odnosi na različitu brzinu hidrolize primarnih i sekundarnih estarskih veza u molekulu triacilglicerola. Ukoliko je brzina hidrolize ovih veza približno jednaka lipaze koje katalizuju tu reakciju su poziciono nespecifične. Neke lipaze mogu da pokazuju specifičnost prema masnim kiselinama na koje deluju, pri čemu se smatra da dužina lanca masne kiseline najviše utiče na brzinu reakcije. Osim ovih, moguće je i postojanje stereohemijske ili optičke specifičnosti. Važno je napomenuti i to da ispoljavanje određene specifičnosti u okviru pomenutih grupa specifičnosti nije u istoj meri izraženo kod lipaza različitog porekla. Neke od njih ispoljavaju izrazitu, a neke vrlo slabu specifičnost<sup>12</sup>.

### 1.1. Struktura i mehanizam delovanja lipaza

Lipaza je enzim rastvoran u vodi koji katališe hidrolizu hemijskih veza u estrima u lipidne supstrate nerastvorne u vodi<sup>13,14</sup>. Lipaze su aktivne samo na granici polarne i nepolarne faze u heterogenim sistemima (ulje/voda), dok su u organskim rastvaračima prilično inertne, a na supstrate u vodi gotovo da ne reaguju. Aktivacija lipaze na granici faza ulje/voda je prikazana na Slici 1.1. Na brzinu lipolitičke reakcije najviše utiče sama površina dvofaznog sistema, a znatno manje koncentracija supstrata na granici faza. Takođe je dokazano da je brzina reakcije obrnuto proporcionalna zapremini sistema.

U vodenoj sredini aktivni centar lipaze se nalazi u unutrašnjosti enzima zaklonjen peptidnim lancem. Tada molekuli supstrata ne mogu da dođu do aktivnog centra enzima, zbog čega su lipaze neaktivne u vodenim rastvorima. Međutim, ako se enzim adsorbuje na graničnoj površini između vodene i nepolarne faze, dolazi do promene prostornog rasporeda

molekula – enzim prelazi u „otvorenu konformaciju“ u kojoj je aktivni centar dostupan supstratu, tako da se kompleks enzim-supstrat može formirati <sup>12</sup>. Promena konformacije molekula lipaze je prvi put potvrđena 1990. godine ispitivanjem kristalne strukture malog molekula lipaze iz *Rhizomucor miehei*. Ovo svojstvo pokazuju i lipaze iz *Candida rugosa* i *Geotrichum candidum*. Aktivni centar lipaza čine ostaci tri amino kiseline: serina, histidina i asparagina, ili serina, histidina i glutamina <sup>12</sup>. U oba slučaja, u „trijadi“ aminokiselina serin predstavlja nukleofil za supstrat.



**Slika 1.1.** Shematski prikaz enzima u vodenom rastvoru i njegova aktivacija usled adsorpcije na graničnu površinu.

pH optimum predstavlja pH vrednost sredine na kojoj je aktivnost određenog enzima maksimalna, a iznad i ispod te vrednosti aktivnost opada. Kako su enzimi po hemijskoj strukturi polipeptidi, njihova tercijarna struktura, koja je odgovorna za katalitička svojstva, stabilisana je vodoničnim vezama, disulfidnim vezama i hidrofobnim interakcijama. Svaka promena pH vrednosti sredine utiče na jačinu ovih interakcija, pa samim tim i na njihove katalitičke sposobnosti. Vrednost pH optimuma zavisi od korišćenog supstrata, reakcionog sistema, prisustva soli i dr., tako da se ova vrednost za određeni enzim može menjati.

Većina mikrobnih lipaza pokazuje maksimalnu aktivnost pri pH vrednosti između 5,6 i 8,5 i na temperaturi od 30 °C do 40 °C. Animalne i biljne lipaze su termostabilnije od mikrobnih. Termostabilnost lipaza zavisi od sadržaja vode u sistemu na taj način što je stabilnost lipaza veća u sistemima sa manjim sadržajem vode, kao posledica uticaja sadržaja vode na energiju aktivacije potrebnu za inaktivaciju lipaze <sup>15</sup>.

Temperatura na kojoj enzim pokazuje maksimalnu aktivnost predstavlja temperaturni optimum. Za mikrobne lipaze ova temperatura je od 30 do 40 °C, dok su kod lipaza biljnog i životinjskog porekla ove temperature više, i mogu da iznose i do 100 °C <sup>12</sup>.

## 1.2. Primena lipaza

Zbog selektivnosti i mogućnosti da katalizuju veliki broj hemijskih reakcija, lipaze imaju veliku mogućnost primene u industriji. Primena lipaza u industrijskim postrojenjima je realizovana samo u par slučajeva. Danas su to uglavnom postrojenja za proizvodnju sapuna. U Tabeli 1.1 je dat pregled primene lipaza u industriji <sup>16</sup>.

**Tabela 1.1.** Primena lipaza u industriji.

<i>Grana industrije</i>	<i>Željeni efekat</i>	<i>Proizvod</i>
Pekarska	Poboljšanje arome	Pekarski proizvodi
Pića	Poboljšanje arome	Pića
Hemijska	Enantioselektivnost	Optički čista jedinjenja
Kozmetička	Sinteza	Emulzije
Mlečna	Hidroliza mlečnih masti	Aromatični sastojci
	Zrenje sira	Sir
	Modifikacija masti butera	Buter
Masti i ulja	Transesterifikacija	Kakao buter
	Hidroliza	Margarin
Kožna	Hidroliza	Kožni proizvodi
Meso i riba	Razvoj arome	Proizvodi od mesa i ribe
	Uklanjanje masti	
Papirna	Hidroliza	Papirni proizvodi
Farmaceutska	Transesterifikacija	Specifični lipidi
	Hidroliza	Digestivne kiseline
Preliivi za hranu	Poboljšanje kvaliteta	Majonez, preliivi, kremovi

Lipaze pripadaju porodici hidrolaza, enzima koji katalizuju hidrolizu estara karboksilnih kiselina. Fiziološka uloga lipaza je hidroliza triacilglicerola do diacilglicerola,



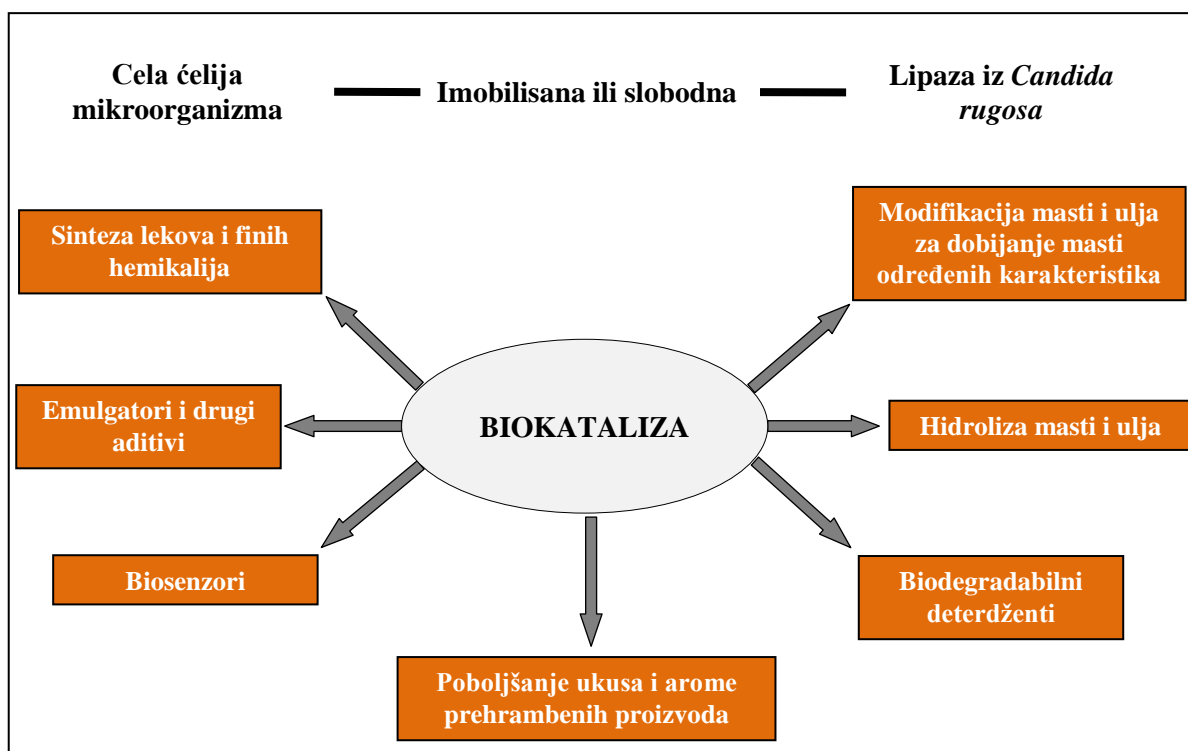
monoacilglicerola, masnih kiselina i glicerola. Osim toga, lipaze katalizuju esterifikaciju, transesterifikaciju i interesterifikaciju u nevodnim sistemima. Raznolikost reakcija koje katalizuju čini lipaze vrlo pogodnim za primenu u proizvodnji hrane, deterdženata, lekovitih supstanci, kože, tekstila, kozmetike, papira, pesticida, biosenzora, biodizela, itd. <sup>17</sup>. Podešavanjem uslova hidrolize reakcija se može voditi tako da se favorizuje nastanak željenog proizvoda i na taj način se postiže povećanje ukupnog prinosa.

Lipaze mogu da katalizuju reakcije transesterifikacije. Na ovaj način se može modifikovati sastav masti, odnosno mogu se dobiti masti tačno određenih karakteristika (npr. masti vrlo slične buteru). Kao katalizator u reakciji transesterifikacije, lipaze se koriste i u preradi etarskih ulja. Zatim, slobodna lipaza se može koristiti za poboljšanje ukusa mlečnih proizvoda, jer selektivno katalizuje hidrolizu nižih, isparljivih, razgranatih masnih kiselina iz mlečnih masti. Najviše korišćeni izvori lipaza koji se koriste u mlečnoj industriji su tkiva životinja, a takođe i lipaze mikrobnog porekla. Lipaze se koriste i za dobijanje i poboljšanje ukusa sladoleda, peciva, sokova, fermentisanog povrća i hrane.

Estri su komercijalno vrlo značajna jedinjenja zbog široke primene u mnogim granama industrije. Na industrijskom nivou estri se pretežno proizvode klasičnom hemijskom sintezom koja se zasniva na primeni kiselih katalizatora, uz pojavu određenih nedostataka kao što su neselektivnost reakcije i stvaranje velikog broja neželjenih proizvoda, toksičnost nekih sporednih proizvoda za životnu sredinu, primena koncentrovanih kiselina koja komplikuje rukovanje reaktantima i gde upotreba kiselih katalizatora dovodi do povećanih troškova za opremu zbog korozivnog dejstva. U novije vreme, ali još uvek u nešto manjoj meri, estri se proizvode enzimskom sintezom i ekstrakcijom iz biljaka. Estri ekstrahovani iz biljnih materijala se mogu dobiti u ograničenim količinama a iziskuju upotrebu kompleksnih metoda za separaciju proizvoda, pa su još uvek suviše skupi za komercijalnu upotrebu. Enzimski („green“) postupak sinteze estara omogućava prevazilaženje navedenih nedostataka, a visoke cene industrijskih enzimskih postupaka se mogu rešiti imobilizacijom enzima i njegovom višestrukou upotrebom, uz razvoj kontinualnih postupaka proizvodnje.

Termostabilne lipaze se koriste u proizvodnji deterdženata zahvaljujući svojstvu da mogu biti aktivne i po nekoliko časova na veoma visokim temperaturama <sup>12</sup>. Lipaza iz *Candida rugosa* ima velike mogućnosti primene u industriji, od kojih su najvažnije proizvodnja lekovitih supstanci i finih hemikalija, emulgatora i drugih aditiva, biosenzora, deterdženata, hidroliza masti i ulja, itd.

Iako su mogućnosti primene lipaze kao katalizatora u industriji veoma velike (Slika 1.2), one još uvek nisu iskorišćene. Lipaze su još uvek mnogo manje zastupljene u industrijskoj proizvodnji od ostalih enzima zbog njihove nedovoljne stabilnosti, niske ekonomičnosti i visoke cene <sup>12</sup>. Na svetskom tržištu samo 4 % od ukupne proizvodnje enzima odnosi se na lipaze.



**Slika 1.2.** Shematski prikaz mogućnosti primene lipaze iz *Candida rugosa* u industriji.

Osnovni nedostaci ovih postupaka su male brzine reakcija, mala stabilnost biokatalizatora i to što je potrebno dosta vremena za postizanje ravnotežnog stepena hidrolize. Da bi enzimski postupci zamenili hemijske, potrebno je postići optimalne reakcione uslove i postići veliku brzinu reakcija. Na promenu uslova reakcije u najvećoj meri utiču izbor nosača i način imobilizacije (detaljnije opisan u Poglavlju 1.4.), koji obezbeđuju veliku aktivnost i stabilnost enzima. Emulgatori na bazi estara ugljenih hidrata i sorbitola imaju mnogo bolja svojstva ako su dobijeni prirodnim putem, a inače se koriste u prehrambenoj industriji i za dobijanje ekoloških deterdženata.

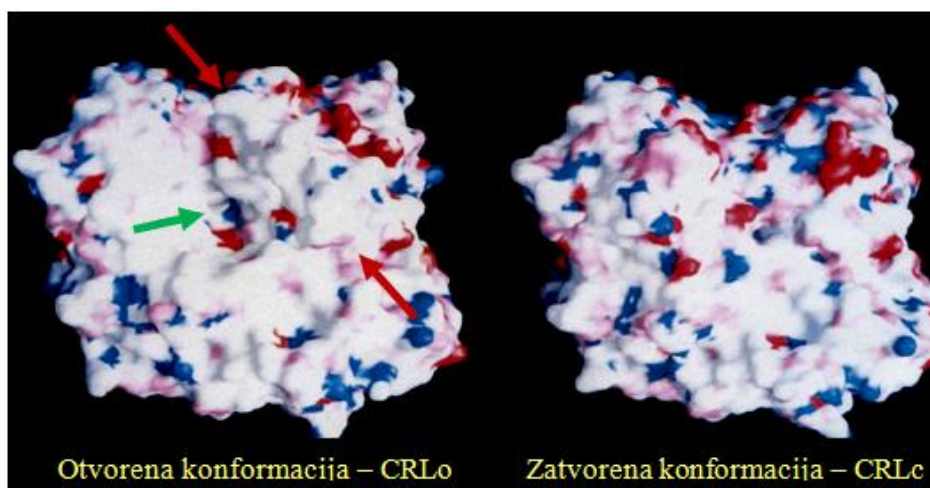
### 1.3. Lipaza iz *Candida rugosa*

Lipaza iz *Candida rugosa* je jedna od najviše korišćenih lipaza, kako u reakcijama hidrolize masti i ulja, tako i u ostalim reakcijama. To je ekstracelularni enzim, što znači da se izlučuje iz mikroorganizma u njegovu okolinu. Proizvodi je jednoćelijski mikroorganizam *Candida rugosa* iz grupe nesporogenih, nepatogenih kvasaca. Pri tome, eksperimentalno je

utvrđeno da *Candida rugosa* ne proizvodi jednu lipazu, već smešu izoenzima lipaze koji imaju različitu aktivnost, pH i temperaturni optimum.

Do sada je, analizom genoma kvasca *Candida rugosa*, ustanovljeno da postoji najmanje sedam gena za produkciju lipaza (Lip1-Lip7), od kojih je njih pet, predstavljeno smešom izoenzima (Lip1-Lip5) čiji odnos zavisi od uslova uzgoja mikroorganizama, potpuno biohemijski okarakterisano<sup>18-24</sup>. Ovi enzimi imaju sličnu primarnu strukturu, a razlikuju se po sadržaju šećera, hidrofobnosti i određenim specifičnostima.

Ovaj enzim je, po hemijskoj strukturi, glikoprotein koji sadrži veliki broj hidrofobnih aminokiselinskih ostataka, kao i određen broj hidroksilnih grupa koje potiču iz ugljenohidratnog dela molekula. Aktivni centar enzima čine ostaci histidina, serina i glutamina, a kada se enzim nalazi u vodi prekriven je peptidnim lancem izgrađenim od trideset jedne aminokiseline. Izoenzimi lipaze se razlikuju po aminokiselinskom sastavu ovog peptidnog lanca što je osnovni uzrok njihovih različitih svojstava. Na Slici 1.3 prikazana je površina molekula lipaze iz *Candida rugosa* (CRL) u dve konformacije sa pogledom iznad aktivnog mesta<sup>25</sup>.

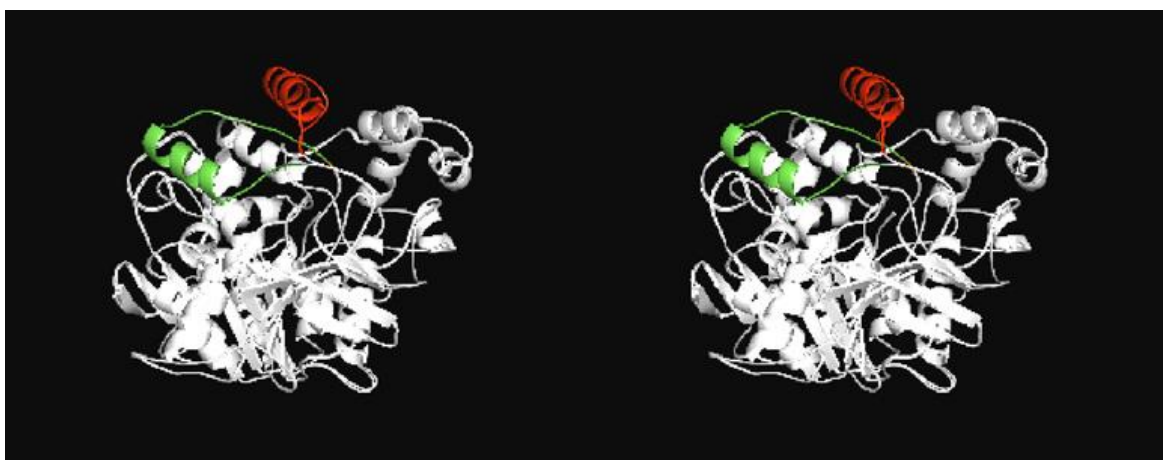


**Slika 1.3.** Površina molekula lipaze iz *Candida rugosa* prikazana u dve konformacije.

Površina obojena plavo odgovara atomima azota, karbonilni kiseonik je obojen u roze, dok su drugi atomi kiseonika obojeni u crveno. Zelena strelica pokazuje položaj aktivnog mesta u otvorenoj konformaciji (Slika 1.3). Aktivni centar lipaze je smešten u otvoru koji ima oblik tunela, čije dimenzije uslovljavaju i specifičnost lipaze prema masnim kiselinama, sa aspekta dužine molekula. Površina oko aktivnog mesta je hidrofobnija (površina obojena belom bojom) nego ostali delovi proteina. U otvorenoj konformaciji lipaze (CRL0) jezičak je lociran između dve crvene strelice tako da se vidi tunel, dok je kod

zatvorene konformacije (CRLc) (Slika 1.3) jezičak promenio svoj položaj i zatvorio tunel. Pri tome površina proteina postaje hidrofilnija.

Kristalografska istraživanja su pokazala da lipaze pokrivaju aktivno mesto po principu poklopac/jezičak (eng. lip/flap) <sup>25,26</sup>. Jezičak lipaze se sastoji od  $\alpha$ -heliksa koji se drži za svoju osnovu disulfidnom vezom i ovaj jezičak štiti hidrofobno aktivno mesto od okolnog okruženja. Na granici ulje/voda ovaj jezičak je zaklonjen kako bi se omogućio ulazak i vezivanje hidrofobnih supstrata. Ovaj fenomen je nazvan „interfacijalna aktivacija“. Kristalna struktura lipaze iz *Candida rugosa* u zatvorenim i otvorenim konformacijama pokazuje da su glavne strukturne deformacije ograničene na jezičak (Slika 1.4) <sup>25,27</sup>.



**Slika 1.4.** Slika aktivne i neaktivne konformacije lipaze iz *Candida rugosa*.

Što se tiče specifičnosti, ovaj enzim je poziciono nespecifičan i katalizuje hidrolizu primarnih i sekundarnih veza u molekulu triacilglicerola. Ispitivanjem reakcije esterifikacije je utvrđeno da enzim ima veći afinitet prema masnim kiselinama i alkoholima sa manjim brojem ugljenikovih atoma. Ovo su Janssen i Halling <sup>28</sup> potvrdili ispitivanjem kinetike reakcije esterifikacije. Osada i saradnici <sup>29</sup> su ispitivali uticaj stepena nezasićenosti masne kiseline na aktivnost enzima. Pri tome je utvrđeno da aktivnost enzima opada sa brojem dvostrukih veza.

U određenim uslovima lipaza pokazuje specifičnost prema masnim kiselinama, ali to zavisi od tipa reakcije koju katalizuje i njenog smera, odnosno da li je u pitanju direktna ili povratna reakcija. Veoma važno svojstvo lipaze je stereohemijska specifičnost, odnosno sposobnost da katalizuje hidrolizu ili esterifikaciju samo jednog enantiomera iz racemske smeše, pri čemu se dobijaju optički čisti proizvodi. Ova karakteristika je upotrebljena za dobijanje mnogih važnih supstanci, kao što su ibuprofen, suprofen, naproksen, mentol,  $\beta$ -blokatori.

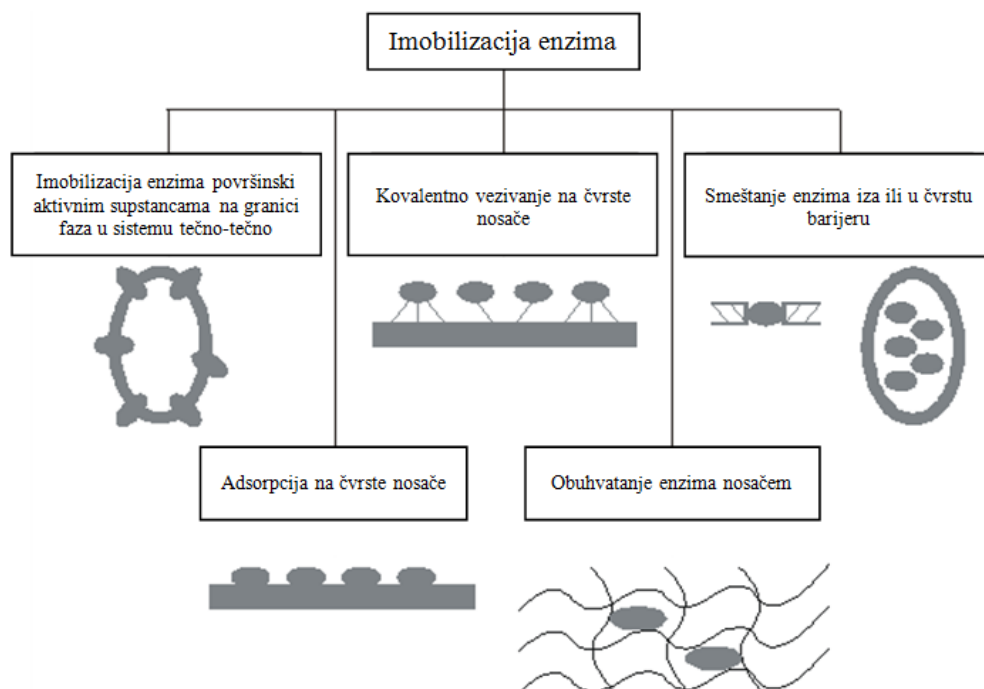
U većini slučajeva pH optimum, odnosno maksimalna aktivnost enzima je između pH vrednosti 7 i 9, dok je temperaturni optimum od 35 °C do 45 °C <sup>12</sup>. Treba imati u vidu da ova svojstva zavise od mnogih faktora, kao što su vrsta supstrata, reakcioni sistem, prisustvo soli i dr.

#### 1.4. Imobilizacija lipaze

Imobilizacija predstavlja proces kojim se enzim fizički ili hemijski lokalizuje ili vezuje u određenom prostoru pri čemu on zadržava svoju katalitičku aktivnost. Imobilizacija podrazumeva svako ograničavanje slobode kretanja molekula enzima u prostoru. U najširem smislu metode imobilizacije enzima se mogu klasifikovati u dve grupe: hemijske i fizičke metode. Hemijske metode se zasnivaju na stvaranju najmanje jedne hemijske veze između molekula enzima i nosača i one su u najvećem broju slučajeva ireverzibilne. Fizičke metode imobilizacije se zasnivaju na nekovalentnim interakcijama između molekula enzima i nosača, kao što su dipol-dipol interakcije, elektrostatičke interakcije, vodonične veze, ili mehaničko smeštanje enzima u određeni deo prostora <sup>12</sup>.

Imobilizacija enzima omogućava njihovu višestruku upotrebu. Slika 1.5 daje prikaz različitih metoda imobilizacije enzima na nosače <sup>30</sup>. Pri tome, enzim, koji je fizički i/ili hemijski vezan ili vezan u određenom prostoru, ne gubi svoju katalitičku sposobnost, već se samo prevodi iz oblika rastvornog u vodi u nerastvoran oblik. Treba imati u vidu da se imobilizacijom enzima u velikoj meri rešava problem njegove stabilnosti, ali dolazi i do promene njegove aktivnosti zbog uticaja površine nosača, prisustva supstrata i ostalih komponenata u sistemu (inhibitora, aktivatora, vodonikovih jona), konformacionih promena enzima, sternih smetnji, hemijskih promena i promena konformacione fleksibilnosti enzima, ograničene mogućnosti difuzije) <sup>31</sup>. U većini slučajeva ova promena podrazumeva smanjenje aktivnosti, dok su slučajevi kod kojih dolazi do povećanja aktivnosti mnogo ređi. Koliko će se aktivnost smanjiti zavisi od tipa enzima i postupka koji se koristi za imobilizaciju. Kada se tome dodaju i troškovi same imobilizacije, u slučaju pojedinih enzima imobilizacija nema ekonomsku i tehnološku opravdanost.

Važno je razumeti fizičke i hemijske promene kroz koje enzim prolazi nakon vezivanja za podlogu da bi se odabrala najbolja od raspoloživih tehnika njegove imobilizacije. Samo imobilisani enzim koji je stabilan u toku dovoljno dugog vremena skladištenja i upotrebe može da nadoknadi gubitke usled smanjenja aktivnosti i troškova imobilizacije. Većina istraživanja je usmerena u cilju optimizacije tehnika i protokola imobilizacije, a sve u cilju razvoja efikasnih sistema imobilizacije i primene lipaze <sup>32,33</sup>.



Slika 1.5. Metode imobilizacije enzima na različite nosače.

Postoji veliki broj razloga za imobilizaciju enzima, među kojima su sledeći:

- Višestruka upotreba biokatalizatora, što smanjuje cenu procesa;
- Veća stabilnost biokatalizatora u toku katalitičkog procesa i tokom skladištenja (enzim je uglavnom otporniji na uticaje temperature i pH i može se duže vremena skladištiti, a da pri tome zadrži veći deo svoje aktivnosti);
- Mogućnost kontinualnog vođenja procesa u različitim reaktorima, što omogućava automatsku kontrolu procesa;
- Biokatalizator se može ukloniti u bilo kom trenutku i na taj način zaustaviti reakciju što olakšava kontrolu procesa;
- Po završenoj reakciji imobilisani enzim se lakše izdvaja iz reakcione smeše (filtracijom ili centrifugiranjem), tako da nema kontaminacije proizvoda;
- Smanjenje cene koštanja enzima i celog tehnološkog postupka.

Nedostaci imobilisanih enzima su:

- Troškovi nosača i imobilizacije;

- Gubitak aktivnosti u toku imobilizacije;
- Promene svojstava biokatalizatora (promena specifičnosti enzima);
- Difuziona ograničenja.

Prema tome, ne postoji univerzalni metod za imobilizaciju enzima. Za dobro izvođenje imobilizacije enzima potrebno je odabrati pogodan nosač, uslove imobilizacije (pH, temperatura, priroda medijuma) i sam enzim (izvor, priroda i čistoća). Na odabir metode utiče kako katalitička priroda (produktivnost, prinos, stabilnost i selektivnost) tako i nekatalitička potreba procesa (separacija, kontrola procesa, itd.)<sup>34</sup>.

U užem smislu razlikuju se sledeće metode imobilizacije enzima<sup>12</sup>:

*Kovalentno vezivanje enzima na čvrstim nosačima* – zasniva se na formiranju najmanje jedne hemijske veze između molekula enzima i nosača; uključuje različite neorganske nosače<sup>35-37</sup>, prirodne<sup>38-41</sup> i sintetske polimere<sup>36,42-46</sup>.

*Adsorpcija enzima na čvrstim nosačima* – zasniva se na slabim privlačnim silama između molekula enzima i čvrstog nosača koji nije prethodno tretiran;

*Obuhvatanje enzima nosačem* – razlikuju se dva oblika:

- *Smeštanje enzima u polimerne gelove* – enzim se smešta u gel, pri čemu mreža treba da bude dovoljno porozna da kroz nju mogu da prolaze molekuli supstrata i proizvoda reakcije, dok se enzim zadržava u gelu;
- *Umrežavanje enzima* – zasniva se na intramolekulskom i intermolekulskom vezivanju molekula enzima i bifunkcionalnih agenasa (molekuli enzima se vezuju ili međusobno ili sa drugim proteinima preko bifunkcionalnog agensa i grade agregate koji su nerastvorni u vodi);

*Smeštanjem enzima iza ili u polupropustljivu membranu* – enzim se smešta iza čvrste polupropustljive barijere, odnosno unutar kapsula sfernog oblika koje propuštaju supstrat i proizvode reakcije, a zadržavaju enzim (inkapsulacija) ili je enzim mehanički zarobljen, adsorbovan ili kovalentno vezan u porama membrane (imobilizacija enzima u membranama)<sup>12</sup>;

*Imobilizacija enzima u reverzne micelle* koje čine vodene kapljice, obuhvaćene hidrofilnim delom molekula površinski aktivne materije, dispergovane u nepolarnom rastvaraču; imaju mnogo veću graničnu površinu u odnosu na dvofazni sistem voda-organski rastvarač, pa je aktivnost enzima u ovim sistemima veća<sup>47</sup>.

U novije vreme se uspešno primenjuje imobilizacija enzima u hidrogelove. Razvijene su brojne metode za imobilizaciju enzima u kojima su kao nosači korišćeni različiti prirodni i sintetski polimeri <sup>48-51</sup>. Međutim, utvrđeno je da ovi nosači poseduju određena ograničenja kao što su heterogenost, osetljivost na toplotu, hemijska, fizička i mikrobiološka otpornost.

### 1.5. Imobilizacija enzima u polimerne hidrogelove

Imobilizacija enzima u polimerne matrice podrazumeva smeštanje enzima i njegovo raspoređivanje u trodimenzionalnu mrežu, pri čemu je omogućena neometana difuzija molekula supstrata i proizvoda reakcije u okolni rastvor, dok enzim ostaje unutar hidrogela <sup>12</sup>. Enzim se za polimerne lance u matrici, optimalne veličine pora, vezuje jonskim i/ili vodoničnim vezama.

Postoje dva glavna postupka za imobilizaciju enzima u polimerne gelove <sup>52</sup>. U prvom postupku enzim se u reakcionu smešu dodaje pre reakcije polimerizacije i umrežavanja, tzv. „*in situ*“ polimerizacija. Do formiranja polimernog gela dolazi tokom reakcije polimerizacije i umrežavanja, iniciranjem polimerizacije hemijskim agensima, povećanjem temperature, dejstvom mikrotalasa ili UV zračenja u prisustvu odgovarajućih inicijatora reakcije, a enzim ostaje unutar gela. U drugom postupku se izvodi bubrenje sintetisanog hidrogela u rastvoru enzima.

Za „*in situ*“ polimerizaciju veoma je važan pravilan odabir monomera koji polimerizuje u uslovima koji neće značajno uticati na smanjenje aktivnosti enzima. U nekim slučajevima kod lipaza je uočen značajan porast aktivnosti dobijenog biokatalizatora uvođenjem hidrofobnih supstituenata u osnovni monomer <sup>53</sup>.

Hidrogelovi mogu biti prirodnog ili sintetskog porekla <sup>54</sup>. Mada, hidrogelovi izrađeni od prirodnih polimera ne mogu pružiti dovoljno dobra mehanička svojstva, a mogu sadržati i patogene i/ili da izazovu imunološki odgovor, oni ipak poseduju nekoliko korisnih svojstava kao što su biokompatibilnost, biorazgradivost, i biološki prepoznatljive delove koji pogoduju aktivnostima ćelija. Sintetski hidrogelovi, sa druge strane, ne poseduju bioaktivna svojstva, ali obično imaju dobro definisane strukture koje se mogu menjati na željeni način, čime se utiče i na (bio)razgradivost i funkcionalnost. U Tabeli 1.2 je dat prikaz prirodnih polimera i sintetskih monomera koji se najčešće koriste za dobijanje hidrogelova različitih namena <sup>1,54,55</sup>.



**Tabela 1.2.** Prirodni polimeri i sintetski monomeri najčešće korišćeni u izradi hidrogelova.

<i>Prirodni polimeri</i>	<i>Sintetski monomeri</i>
Hitozan	Hidroksietil metakrilat
Alginat	<i>N</i> -(2-hidroksipropil)metakrilat
Želatin	<i>N</i> -vinil-2-pirolidon
Dekstran	Akrilna kiselina
	Vinil acetat

Imobilizacija lipaze u sintetske hidrogelove različitog sastava je tema velikog broja istraživanja. Za imobilizaciju enzima su naročito interesantni mehanički jaki sintetski hidrogelovi. Ispitivanja su usmerena ka određivanju aktivnosti i stabilnosti imobilisane lipaze, efikasnosti obnavljanja i ponovne upotrebe enzima. Aktivnost imobilisanog enzima u polimernim gelovima uglavnom zavisi od uslova formiranja gela, sadržaja enzima u gelu, hemijske strukture i morfologije gela i veličine čestica gela<sup>12,31</sup>, pa lipaze imobilisane na različitim polimerima poseduju različite hidrolitičke i esterifikacione aktivnosti.

Važno je ispitati i otpornost, kako na operativne tako i na uslove pri njihovom skladištenju, u cilju sprečavanja denaturacije uzrokovane toplotom, organskim rastvaračima ili autolizom<sup>2,56</sup>. Jedan deo istraživanja je usmeren ka ispitivanju mogućnosti njihove upotrebe kao potencijalnih matrica za kontrolisano otpuštanje lekovitih supstanci sličnih molekulskih masa<sup>2,55,57</sup>.

Veliki broj istraživanja posvećen je gelovima na bazi poli(akrilamida) čije veličine pora je moguće podesiti tako da pogoduju smeštanju molekula enzima. Ustanovljeno je da se podešavanjem početne koncentracije monomera, umreživača i uslova polimerizacije može značajno uticati na strukturu dobijenog gela i aktivnost dobijenog imobilisanog enzima. Gelovi sa manjim porama otežavaju ispiranje enzima iz gela, pa i njegova specifična aktivnost tada raste. U optimalnim uslovima aktivnost imobilisanog enzima iznosi oko 60 % aktivnosti nativnog enzima, što je posledica štetnog uticaja monomera i/ili inicijatora, kao i uslova izvođenja reakcije. To ukazuje da je i ispiranje gela nakon sinteze radi uklanjanja neproreagovanih supstanci veoma bitan korak pri imobilizaciji. Takođe, i slobodni radikali koji nastaju u toku procesa polimerizacije mogu uticati na pad aktivnosti enzima. Inaktivaciju je moguće umanjiti dodatkom inertnih polimera, kao što su poli(etilen glikol) ili poli(vinil alkohol). Kod enzima koji deluju na hidrofobne supstrate kao što su lipaze, aktivnost imobilisanog enzima zavisi u velikoj meri od stepena hidrofobnosti gela, gde sa porastom hidrofobnosti raste i aktivnost lipaze usled olakšane difuzije supstrata do

enzima unutar gela. Dobar primer su polimeri na bazi poli(propilen glikola) i poli(etilen glikola). Prednost lipaza imobilisanih u hidrofobne gelove je i u tome što se oni dobro disperguju u organskim rastvaračima u kojima se uglavnom odvijaju reakcije katalizovane lipazama<sup>53</sup>. Ispitana je i mogućnost modifikacije svojstava kopolimera na bazi akrilamida i imobilizacije enzima u ovakve sisteme, uz istovremeno povećanje njegove aktivnosti i stabilnosti. Takođe se sve više ispituje i mogućnost imobilizacije enzima u silikagel, kao i njegove derivate<sup>58</sup>.

Za imobilizaciju enzima se često koriste alginati i čestice alginata. Alginati su su po hemijskom sastavu negativno naelektrisani linearni kopolimeri  $\beta$ -D-manuronske kiseline i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline povezani 1,4-vezama. Na fizičko-hemijska svojstva alginata i njihovih rastvora, poroznost, dimenzije i čvrstinu dobijenih čestica u velikoj meri utiče odnos monomera u polimeru<sup>59</sup>. Blagi uslovi geliranja, netoksičnost i biokompatibilnost su samo neke od prednosti upotrebe alginata kao nosača za imobilizaciju različitih enzima.

Hidrogelovi na bazi proteina, kao i hibridne polimerne mreže (HPM), predstavljaju novine u proizvodnji hidrogelova<sup>60</sup>. Činjenica da enzimi mogu biti aktivni kao biokatalizatori u organskom rastvaraču, sa dodatkom vrlo male zapremine vode, je dodatno povećala mogućnost primene imobilisanih enzima i proširila istraživanja enzimskih tehnologija. Nizak sadržaj vode u reakcionim sistemima je pogodan za stabilnost enzima i prenos mase sa hidrofobnih supstrata do biokatalizatora a pogoduje termodinamičkoj ravnoteži u povratnim hidrolitičkim reakcijama. Sadržaj vode prisutne u sistemima obično utiče na aktivnost biokatalizatora u pretežno organskim reakcionim sistemima. Kada je biokatalizator imobilisan, uticaj nosača na dostupnost vode, koja je potrebna za održavanje katalitičke aktivnosti biokatalizatora, postaje presudan<sup>48-51</sup>.

Može se očekivati da će se stabilnost enzima povećati ili smanjiti nakon vezivanja za nosač, u zavisnosti od toga da li nosač obezbeđuje mikrookruženje koje stabilizuje protein ili ga denaturiše. Tako je moguće umanjiti inaktivaciju usled autodigestije proteolitičkih enzima izolacijom molekula enzima imobilizacijom na pogodnu matricu. Utvrđeno je da su enzimi koji su vezani na neorganske nosače generalno stabilniji od onih vezanih na organske polimere kada se čuvaju na 4 ili 23 °C. Stabilnost na agense za denaturisanje se takođe može promeniti nakon vezivanja (insolubilizacije). Stabilizacija enzima imobilizacijom u hidrogelove takođe utiče na sadržaj vezanog enzima u hidrogelovima, pH i temperaturni optimum imobilisanog enzima, enzimske reakcije, reciklizaciju enzima itd.



## 2. Hidrogelovi

Hidrogelovi predstavljaju elastične polimerne mreže koje sadrže hidrofilne grupe, ali se ne rastvaraju u okolnom fluidu usled prisustva hemijskog ili fizičkog umreženja <sup>1</sup>. Međutim, ako se hidrogelovi potope u rastvarač oni, ulaskom rastvarača u prostor između polimernih lanaca (pora gela), bubre sve dok se sile koje dovode do istežanja makromolekulskih lanaca između dva mesta umrežavanja ne izjednače sa silama koje teže da delove istegnutih makromolekula vrata u prvobitno ravnotežno stanje. Pogonska sila bubrenja je sila osmotskog pritiska rastvarača koja izaziva istežanje i širenje polimernih lanaca. Kao odgovor na narušavanje stanja polimera sa najmanjim sadržajem energije javlja se sila otpora elastičnom širenju lanaca. Izjednačavanjem ovih sila se uspostavlja ravnotežno stanje.

Usled sposobnosti da bubre u uslovima koji vladaju u biološkim sistemima, hidrogelovi predstavljaju idealan materijal za primenu u otpuštanju lekovitih supstanci i za imobilizaciju proteina, enzima, peptida i drugih bioloških jedinjenja <sup>61-62</sup>. Mnogi hidrogelovi poseduju inertne površine na kojima dolazi do nespecifične adsorpcije proteina. Biomolekuli, kao što su enzimi, se mogu nizom hemijskih postupaka ugraditi u njihovu strukturu <sup>63</sup>. Hidrogelovi mogu da upiju i preko 90 mas% vode, pri čemu postaju vrlo slični živim tkivima, čime se postiže povećana biokompatibilnost, pa je danas njihova primena sve

veća u medicini i u inženjerstvu tkiva<sup>63-66</sup>. Biokompatibilnost je sposobnost materijala da koegzistira sa živim tkivima bez mogućnosti da ih ošteti ili im naudi<sup>67</sup>.

Prva primena hidrogelova u medicini datira iz 1961. godine kada su Wichterle i Lim objavili upotrebu hidrogela poli(hidroksietil metakrilata) PHEMA za izradu kontaktnih sočiva koji je dobijen umrežavanjem HEMA monomera. Od tada interes za hidrogelove počinje da raste da bi u prethodnoj deceniji zabeležio eksponencijalan rast o čemu svedoče brojni radovi objavljeni na ovu temu<sup>1,68,69</sup>.

Hidrogelovi koji se koriste u medicini i farmaciji kao biomaterijali, osim biokompatibilnosti, moraju biti netoksični i ne smeju pokazivati neimunogene reakcije. Sintetski homo- i kopolimeri pružaju mogućnost dobijanja velikog broja različitih hidrogelova čija se svojstva i primena mogu podesiti izborom komponenata koje ulaze u njihov sastav<sup>3,70-73</sup>. Takođe je bitna i biodegradabilnost sintetisanih proizvoda, odnosno mogućnost razlaganja pod dejstvom mikroorganizama.

Veoma je važno da tokom primene nebiodegradabilnih hidrogelova polimerna mreža kao nosač zadrži fizičku i mehaničku jačinu, pa je pri dizajnu hidrogela za određenu namenu potrebno obezbediti dobru mehaničku jačinu. Jačina materijala se može podešavati promenom stepena umreženja ili ugradnjom komonomera sa boljim mehaničkim svojstvima. Međutim, mora se voditi računa o optimalnom stepenu umreženja jer kada je suviše veliki stepen umreženja gelovi postaju kruti i manje elastični. Time se smanjuje fleksibilnost polimernih lanaca između tačaka umreženja što otežava difuziju bioaktivnih agenasa u gel ili iz njega. Stoga se mora postići kompromis između elastičnosti i mehaničke jačine hidrogelova.

Osim već pomenutih podela na prirodne i sintetske hidrogelove, kao i na homo- i kopolimerne, postoji i niz drugih. Prema prirodi bočnih grupa u polimernim lancima hidrogelovi se dele na neutralne i jonske, pri čemu jonski mogu biti anjonski, katjonski ili amfifilni. Jonski hidrogelovi sadrže hidrofilne grupe, kao napr. karboksilne grupe, koje u vodi mogu da disosuju na jone što omogućava upijanje veće zapremine vode zbog povećane hidrofilnosti<sup>74,75</sup>. Važna klasa hidrogelova su hidrogelovi osetljivi na stimulanse iz okoline koji mogu drastično da menjaju zapreminu, odnosno da bubre i kontrahuju, ili da pokazuju sol/gel prelaz, kao odgovor na promenu pH, temperature, jonske jačine, električnog/magnetnog polja, svetlosti ili na prisustvo malih (bio)molekula kao i na njihovu koncentraciju<sup>76-80</sup>.

## 2.1. Dobijanje hidrogelova

Trodimenzionalna, umrežena, struktura hidrogelova može se postići različitim hemijskim i fizičkim metodama umreženja. Hemijske, kovalentne, veze se formiraju kada se koriste mali molekuli umreživača ili se umrežavanje dešava između lanaca polimera reakcijom komplementarnih funkcionalnih grupa (najčešće OH, COOH, NH<sub>2</sub>) dodatkom agensa za umrežavanje. Ove veze su jake ali se za njihovo obrazovanje koriste jedinjenja koja mogu biti toksična. Hemijske veze se najčešće obrazuju pri radikalnoj polimerizaciji ili kopolimerizaciji, u prisustvu monomera, inicijatora i agensa za umrežavanje, pri čemu je rastvarač najčešće voda. Kovalentne veze mogu nastati i pod dejstvom zračenja velike energije (UV, gama itd.). U novije vreme se koristi i umrežavanje dejstvom enzima<sup>81</sup>.

Fizički umreženi hidrogelovi su interesantni jer se pri umrežavanju ne koriste toksične materije, već se umrežavanje postiže jonskim, hidrofobnim interakcijama, obrazovanjem vodoničnih veza, stereokompleksiranjem (interakcijama koje se javljaju između polimernih lanaca istog hemijskog sastava ali različite stereohemije) ili umrežavanjem multiblok kopolimera ili kalemljenih kopolimera<sup>81,82</sup>.

Strukturu i svojstva hidrogelova bitno određuje vrsta monomera koji se koriste za njihovu sintezu. U zavisnosti od primene, monomeri se biraju prema svojstvima, ceni i dostupnosti. U medicini i farmaciji se mnogo koriste hidrofилni monomeri kao akrilna kiselina, metakrilna kiselina, etilen glikol i polimeri nastali funkcionalizovanjem poli(etilen glikola) sa akrilatima i metakrilatima, kao i poli(vinil alkohol) (PVA) i poli(*N*-vinil-2-pirolidon) (PVP). Za otpuštanje proteina se danas koriste biodegradabilni kopolimeri mlečne i glikolne kiseline (PLGA), koji se razlažu na male molekule i metaboličkim putem izbacuju iz organizma. Veliku primenu su našli i akrilamid i njegovi derivati, od kojih se najviše primenjuje poli(*N*-izopropilakrilamid) (PNiPAAm), koji je temperaturno-osetljiv polimer i pokazuje zapreminski fazni prelaz na 32 °C.

## 2.2. Struktura hidrogelova i parametri mreže

Struktura hidrogela ima veliki uticaj na njegove fizičko-hemijske i mehaničke karakteristike. Podešavanjem sastava, kao i parametara mreže, mogu se dobiti hidrogelovi odgovarajućih svojstava za željenu primenu. Najvažniji parametri koji se koriste za karakterizaciju hidrogelova su zapreminski udeo polimera u nabubreloom stanju,  $v_{2,s}$ , srednja

molekulska masa polimernog lanca između dve susedne tačke umrežanja,  $M_c$ , veličina pora tj. prostor između polimernih lanaca u koje difunduju molekuli tečnosti,  $\xi$ , kao i parametar interakcije polimer-rastvarač. Zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju je mera zapremine fluida koja je apsorbovana u hidrogelu, a molekulska masa između dve tačke umreženja je mera stepena umreženja polimera. Svi ovi parametri su međusobno zavisni i mogu se izračunati teorijski ili na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata bubrenja <sup>1</sup>.

Hidrogelovi nemaju homogenu strukturu. Oni poseduju područja koja su gusto umrežena i upijaju malu zapreminu vode, često zvana klasteri ili grozdovi, a dispergovana su unutar područja sa malom gustinom umreženja koja upijaju veliku zapreminu vode <sup>68,83</sup>.

Zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju se izračunava kao recipročna vrednost ravnotežnog stepena bubrenja ( $q_e$ ):

$$v_{2,s} = \frac{1}{q_e} \quad (1)$$

Za izračunavanje molekulske mase između dve tačke umreženja za nejonski hidrogel, u ovom radu za hidrogel poli(*N*-izopropilakrilamid)-a, koristi se sledeća jednačina:

$$\overline{M}_c = \frac{(1 - 2/\phi) V_1 v_{2,r}^{2/3} v_{2,s}^{1/3}}{\bar{v} [\ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi v_{2,s}^2]} \quad (2)$$

gde je  $\phi$  funkcionalnost umreživača,  $V_1$  molarna zapremina medijuma za bubrenje,  $v_{2,r}$  zapreminski udeo polimera u stanju relaksacije (stanje polimera odmah nakon sinteze, ali pre bubrenja),  $\bar{v}$  specifična zapremina polimera, a  $\chi$  parametar interakcije polimer-rastvarač.

Parametar interakcije polimer-rastvarač računa se po sledećoj jednačini:

$$\chi = \frac{\ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s}}{v_{2,s}^2} \quad (3)$$

Za izračunavanje molekulske mase između dve tačke umreženja za jonski hidrogel sa dve karboksilne grupe koristi se jednačina <sup>1</sup>:

$$\left[ \frac{(2K_{a1}K_{a2} + 10^{-pH} K_{a1})}{2(10^{-pH})^2 + 10^{-pH} K_{a1} + K_{a1}K_{a2}} \right]^2 \left( \frac{V_1 v_{2,s}^2 X^2}{4I\bar{v}^2} \right) = \ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi v_{2,s}^2 + \frac{(1 - 2/\phi) V_1 v_{2,r}^{2/3} v_{2,s}^{1/3}}{\bar{v} \overline{M}_c} \quad (4)$$

gde su  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$  prva i druga konstanta disocijacije,  $X$  maseni udeo dikarbonske kiseline (u ovom slučaju itakonske) i  $I$  jonska jačina medijuma.

Veličina pora se računa pomoću sledeće jednačine:

$$\xi = \alpha(\bar{r}^2)^{1/2} \quad (5)$$

gde je  $\alpha$  stepen izduženja polimernog lanca u bilo kom pravcu, a  $(\bar{r}^2)^{1/2}$  kvadratni koren srednjeg kvadrata rastojanja neporemećenog lanca između dva susedna mesta umreženja.

Stepen izduženja polimeranog lanca se dobija iz izraza:

$$\alpha = v_{2,s}^{-1/3} \quad (6)$$

dok se za određivanje kvadratnog korena srednjeg kvadrata rastojanja koristi jednačina:

$$(\bar{r}_0^2)^{1/2} = l \left( \frac{2C_n \bar{M}_c}{M_r} \right)^{1/2} \quad (7)$$

gde je  $C_n$  Florijev karakterističan odnos ( $C_{n, IA} = 4,63$ <sup>84</sup> i  $C_{n, NiPAAm} = 11,7$ <sup>85</sup>,  $l$  dužina C–C veze u osnovnom lancu (za vinilne polimere  $l = 1,54 \cdot 10^{-10}$  m),  $M_r$  molekulska masa osnovne strukturne jedinice koja čini polimerni lanac.

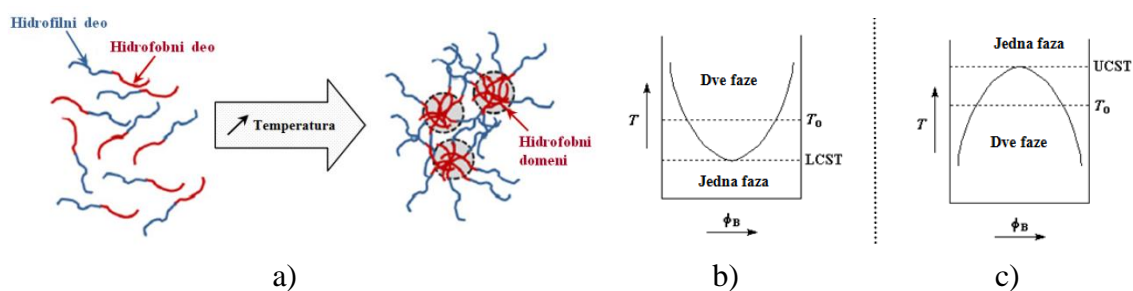
### 2.3. Hidrogelovi osetljivi na spoljne stimulanse

U hidrogelove osetljive na spoljne stimulanse ubrajaju se pored temperaturno- i pH-osetljivih hidrogelova, hidrogelovi osetljivi na svetlost, na glukozu, elektro-osetljivi hidrogelovi, hidrogelovi osetljivi na pritisak kao i hidrogelovi osetljivi na prisustvo trombina, određene jone, antigene, itd.<sup>1</sup> Hidrogelovi P(NiPAAm/IK), koji su tema ovog rada, spadaju u grupu temperaturno- i pH-osetljivih hidrogelova, pa će ove dve grupe hidrogelova biti detaljnije objašnjene.

#### 2.3.1. Temperaturno-osetljivi hidrogelovi

Pri proučavanju ponašanja polimera i hidrogelova u vodi ili vodenim rastvorima, temperatura je jedan od stimulansa koji se najčešće ispituje. Temperaturno-osetljivi hidrogelovi imaju kritičnu temperaturu rastvora, odnosno pokazuju značajnu promenu zapremine sa malom promenom temperature. Suprotno od ponašanja većine polimera, čija rastvorljivost u vodi raste sa porastom temperature, temperaturno-osetljivi polimeri uglavnom pokazuju smanjenu rastvorljivost u vodi sa povećanjem temperature. To su polimeri koji imaju donju kritičnu temperaturu rastvora (Lower Critical Solution Temperature – LCST). Na temperaturi ispod LCST oni se rastvaraju u vodi, dok se iznad

LCST talože iz rastvora. Umreženi polimeri bubre na temperaturi ispod LCST, dok pri porastu temperature iznad LCST dolazi do njihove kontrakcije <sup>86</sup>. U slučaju kada hidrogelovi pokazuju ponašanje suprotno pomenutom, odnosno ako se kontrahuju pri sniženju temperature ispod određene vrednosti, radi se o gornjoj kritičnoj temperaturi rastvora (Upper Critical Solution Temperature – UCST) <sup>3</sup>. Prema tome, na osnovu ponašanja koje ispoljavaju pri promeni temperature, temperaturno-osetljivi hidrogelovi se mogu podeliti na pozitivno temperaturno-osetljive hidrogelove (imaju UCST), negativno temperaturno-osetljive hidrogelove (imaju LCST) i termoreverzibilne hidrogelove <sup>87</sup>.



**Slika 2.1.** Negativno temperaturno-osetljiv hidrogel koji ima LCST a), fazni dijagram hidrogela koji ima LCST b), fazni dijagram hidrogela koji ima UCST c).

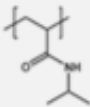
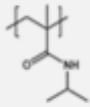
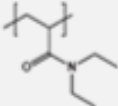
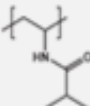

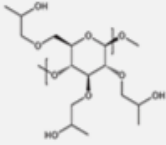
Ova temperatura odgovara oblasti u faznom dijagramu u kojoj je doprinos entalpije za vodu vezanu vodoničnim vezama za lanac polimera manji od porasta entropije za ceo sistem. Slobodna energija procesa rastvaranja je jednaka razlici  $\Delta H - T\Delta S$ , a može da se menja od negativne (povoljne) do pozitivne (nepovoljne) sa porastom temperature. Prema tome, polimeri imaju LCST prelaz u rastvaračima sa kojima imaju vrlo jaku interakciju, kao što je voda. Važno je istaći da se u sintetskim polimerima vrednost LCST može podešavati promenom sastava polimera, odnosno dodatkom odgovarajućeg komonomera. Na taj način se reguliše odnos hidrofobnih i hidrofilnih segmenata, kao i interakcija usled obrazovanja vodoničnih veza, što utiče na vrednost LCST.

Najvažniji parametar koji definiše osetljivo ili „inteligentno“ ponašanje polimera je nelinearni odgovor na spoljni signal. Odgovor temperaturno-osetljivog polimera se javlja obično usled raskidanja vodoničnih veza, koje su pojedinačno slabe, ali zbirno dovode do bitnih promena u strukturi polimernog materijala.

Polimeri sa LCST prelazom koji se najčešće koriste za sintezu hidrogelova su prikazani u Tabeli 2.1. Za primenu su naročito interesantni polimeri koji imaju temperaturu prelaza blisku temperaturi tela, jer mogu da se koriste za otpuštanje lekovitih supstanci <sup>88</sup>.



**Tabela 2.1.** Prikaz polimera koji imaju LCST, njihovih strukturnih formula i LCST vrednosti.

<i>Polimer</i>	<i>Strukturna formula</i>	<i>LCST, °C</i>	<i>Literatura</i>
Poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid)		32	89
Poli( <i>N</i> -izopropilmetakrilamid)		40	90
Poli( <i>N,N</i> -dietilakrilamid)		32	91
Poli(vinilizobutiro amid)		35	92
Poli(metilviniletar)		36	93
Hidroksipropil celuloza		44	94

Manji broj hidrogelova su pozitivno temperaturno-osetljivi, tj. imaju gornju kritičnu temperaturu rastvora (UCST). Pretpostavlja se da kod hidrogelova sa UCST pri zagrevanju dolazi do disocijacije kompleksa, formiranih između molekula polimera, uz hidrataciju<sup>95</sup>. Primeri polimera koji pokazuju ovakvo ponašanje su kopolimeri akrilamida i butilmetakrilata, hidrogel poli(akrilne kiseline), poli(akrilamida) i poli(*N*-acetilakrilamida)<sup>96</sup>.

Kao posebna grupa izdvajaju se termoreverzibilni hidrogelovi. Ovi hidrogelovi ispoljavaju sol-gel promenu faza, a koja će faza preovladati pri porastu temperature zavisi od toga da li poseduju LCST ili UCST. Ukoliko hidrogel ima UCST na povišenim temperaturama biće prisutna gel faza. Za hidrogelove sa LCST važi obrnuto<sup>87</sup>. Primer za ovo su blok kopolimeri poli(propilen oksida) i poli(etilen oksida), tzv. „Pluronic“ hidrogelovi.

Jedan od najviše korišćenih i proučavanih temperaturno-osetljivih polimera je poli(*N*-izopropilakrilamid), koji ima LCST oko 32 °C<sup>9,80,97-107</sup>. Fazni prelaz se dešava usled raskidanja vodoničnih veza sa molekulima vode i uspostavljanja intramolekulskih vodoničnih veza između polimernih lanaca NiPAAm-a<sup>89,108,109</sup>. Iznad LCST polimer prelazi iz konformacije klupka u globularnu, pri čemu se hidrogel kontrahuje. Na temperaturu faznog prelaza, kao i na stepen promene zapremine, može da se utiče u izvesnoj meri kopolimerizacijom ili kalemljenjem sa drugim monomerima i umrežavanjem<sup>110-114</sup>. Međutim, PNiPAAm gubi svojstvo temperaturne-osetljivosti ako se u sintezi koristi previše komonomera<sup>115-120</sup>.

U primeni temperaturno-osetljivih hidrogelova postoje određena ograničenja koja se pre svega odnose na biokompatibilnost i toksičnost monomera i umreživača upotrebljenih za njihovu sintezu, koja nije dovoljno ispitana<sup>70</sup>. To je naročito važno za hidrogelove na bazi *N*-izopropilakrilamida i njegovih derivata koji se često koriste za sintezu temperaturno-osetljivih hidrogelova.

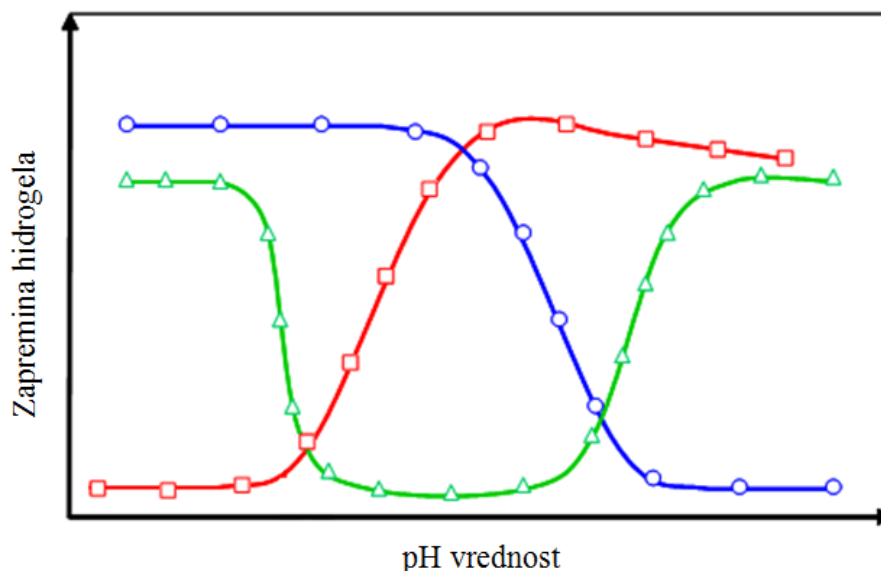
### 2.3.2. pH-osetljivi hidrogelovi

pH-osetljivi hidrogelovi pokazuju promenu zapremine pri maloj promeni pH vrednosti okolnog medijuma. Svi pH-osetljivi hidrogelovi sadrže kisele ili bazne bočne grupe sposobne da otpuste ili prime proton pri promeni pH vrednosti, a u ovu grupu se ubrajaju i polielektroliti, polimeri koji sadrže jonizujuće grupe u osnovnom ili bočnom lancu polimera<sup>87</sup>. Svi polimeri sa jonskim grupama su osetljivi na promenu pH i jonske jačine. U rastvoru odgovarajućeg pH i jonske jačine, bočne grupe mogu da jonizuju pri čemu nastaju fiksna naelektrisanja na hidrogelu i usled odbijanja istoimenog naelektrisanja dolazi do porasta stepena bubrenja<sup>121-124</sup>.

Promena stepena bubrenja hidrogelova koji sadrže jonske grupe u bočnom lancu se dešava blizu pK vrednosti kiselih, odnosno baznih grupa. Katjonski hidrogelovi bubre u kiseloj sredini, dok u baznoj sredini dolazi do njihove kontrakcije. Takvo ponašanje je karakteristično za hidrogelove koji sadrže amino grupe, koje pri  $\text{pH} < \text{pK}_b$  jonizuju usled vezivanja protona i usled odbijanja istoimenih naelektrisanja hidrogel bubri. U baznoj sredini, na  $\text{pH} > \text{pK}_b$ , dolazi do otpuštanja protona, a hidrogel se kontrahuje. Anjonski hidrogelovi sadrže kisele bočne grupe (npr. karboksilne ili sulfonske), čija se jonizacija odigrava otpuštanjem protona u baznoj sredini, odakle sledi da hidrogel bubri na  $\text{pH} > \text{pK}_a$ , dok za  $\text{pH} < \text{pK}_a$  dolazi do njegove kontrakcije<sup>1</sup>. U slučaju da je hidrogel izgrađen od polimera sa amfifilnim grupama (npr. proteini) stepen bubrenja će zavisiti od odnosa

katjonskih i anjonskih grupa u polimernom lancu. Stepen bubrenja hidrogelova je najmanji na izoelektričnoj tački koja predstavlja pH vrednost na kojoj je ukupno naelektrisanje proteina jednako nuli <sup>125</sup>. Ispod izoelektrične tačke ukupno naelektrisanje za protein je pozitivno, a iznad nje negativno. S obzirom na pojavu nešto većeg broja slabo kiselih ostataka kod skoro svih proteina, oni su skoro svi negativno naelektrisani pri neutralnim pH vrednostima. Ponašanje pH-osetljivih hidrogelova predstavljeno je na Slici 2.2 <sup>126</sup>. Što se tiče polielektrolita, oni bubre ili na vrlo visokim ili na vrlo niskim pH vrednostima sredine. Polikatjonski hidrogelovi bubre na niskim pH vrednostima, a polianjonski na visokim pH vrednostima sredine. Stoga se polikatjonski hidrogelovi mogu koristiti za kontrolisano otpuštanje lekovitih supstanci u želucu, gde se pH kreće u intervalu 1-3, a polianjonski hidrogelovi za otpuštanje lekovitih supstanci u neutralnoj ili slabo baznoj sredini, odnosno donjem delu gastrointestinalnog trakta.

Zahvaljujući ovim svojstvima, pH-osetljivi hidrogelovi su našli veliku primenu kao nosači u sistemima za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci. Jedno od ograničenja za ovu primenu je njihova slaba biodegradabilnost, te se ovi hidrogelovi moraju hirurški ukloniti iz organizma nakon prestanka otpuštanja lekovite supstance. Dalji razvoj pH-osetljivih hidrogelova usmeren je na razvijanje biodegradabilnih sistema. pH-osetljivi hidrogelovi se koriste još i za izradu kontaktnih sočiva, membrana za biosenzore, obloga za veštačka tkiva, materijala za veštačku kožu, itd. <sup>1,3</sup>.



**Slika 2.2.** Uticaj pH na zapreminu hidrogelova sa jonskim grupama; □ hidrogelovi koji sadrže kisele grupe, △ hidrogelovi koji sadrže i kisele i bazne grupe, ○ hidrogelovi koji sadrže bazne grupe.

### 2.3.3. Hidrogelovi osetljivi na promenu temperature i pH vrednosti

Uvođenjem slabo kiselih ili baznih grupa u temperaturno-osetljiv hidrogel postiže se pH-osetljivost. Sposobnost hidrogela da reaguje na promene i pH i temperature pruža veliku mogućnost kontrole bubrenja hidrogelova.

Nosači za otpuštanje lekovitih supstanci na bazi čistog PNiPAAm-a se mogu sintetisati tako da reaguju na promenu temperature u fiziološkim uslovima, koja se odigrava oko 37 °C. Ovaj interval fiziološke temperature je vrlo uzan u poređenju sa intervalom fizioloških pH vrednosti, koje se kreću u opsegu od 1,2 do 7,4, a osim toga različiti delovi tela mogu imati specifično pH okruženje. Tako je u želucu prosečno pH oko 2,0 dok je u crevima pH oko 7,4. Zbog toga se LCST prelaz hidrogelova na bazi PNiPAAm-a mnogo lakše podešava promenom pH vrednosti rastvora.

Utvrđeno je da se LCST PNiPAAm-a lako može kontrolisati preko pH vrednosti sredine ako se u lanac ugradi mali broj ostataka monomera sa jonskim grupama, kao npr. karboksilne ili amino grupe (akrilna, metakrilna, maleinska ili itakonska kiselina)<sup>68,123,127-138</sup>. Dodatkom jonskih grupa menja se odnos hidrofilnih i hidrofobnih segmenata, usled čega dolazi do pomeranja LCST temperature, obično ka višim vrednostima. Kopolimerizacijom NiPAAm-a i odgovarajućeg anjonskog monomera se ugrađuje mali udeo pH osetljivih strukturnih jedinica u lanac NiPAAm-a. Na taj način LCST homopolimernog PNiPAAm-a može da se pomeri ka višim temperaturama usled prelaza jonizovani/nejonizovani oblik<sup>68,123,127-132,139</sup> što se postiže odgovarajućom promenom pH vrednosti sredine. Ovaj fenomen se naziva pH-indukovana temperaturna osetljivost hidrogelova<sup>140</sup>.

Povećana hidrofilnost i elektrostatičko odbijanje jonizovanih grupa iz kiseline će oslabiti hidrofobne interakcije PNiPAAm-a. Stoga, u slučaju statističkih kopolimera udeo kiselinskog komonomera se ne može mnogo povećati, jer to može dovesti do nestanka LCST prelaza. Obrazovanje vodoničnih veza karboksilnih grupa kiseline sa amidnim grupama PNiPAAm-a ima značajnu ulogu u slučaju pH-indukovane temperaturne osetljivosti hidrogelova. Ova pojava dovodi do dodatnih interakcija između lanaca polimera, pri čemu se smanjuje mogućnost obrazovanja vodoničnih veza između lanaca PNiPAAm-a. Ako se ima u vidu da sve karboksilne grupe u kiselini nisu trenutno jonizovane, pri povišenju pH sredine iznad  $pK_a$  kiseline, već postoje i stanja kada je jonizacija parcijalna, elektrostatičko odbijanje jonizovanih grupa biće umanjeno usled privlačnog dejstva vodoničnih veza koje postoje sa nejonizovanim karboksilnim grupama kiseline. Kao rezultat se mogu očekivati dva tipa pH prelaza. U opsegu niskih pH vrednosti LCST će opadati sa povećanjem udela

kiselih grupa, dok u oblasti viših pH u kome je veći deo kiselinskih grupa jonizovano, LCST će rasti sa porastom udela kiselih grupa <sup>141</sup>.

Na vrednost LCST utiče pH vrednost sredine i sadržaj kiselinske komponente. Za svaki komonomer postoji kritična vrednost stepena jonizacije iznad koje hidrofilni efekat karboksilnih grupa ima dominantan uticaj, što dovodi do povećanja LCST prelaza. Nasuprot, za vrednosti stepena jonizacije ispod kritične vrednosti, hidrofilni efekat karboksilnih grupa nije dovoljan da savlada hidrofobni efekat amidnih grupa iz PNiPAAm-a, što dovodi do opadanja LCST sa povećanjem udela kiseline kao komonomera <sup>142</sup>. Od hidrogelova osetljivih na temperaturu i pH u literaturi su najviše proučavani kopolimerni hidrogelovi PNiPAAm sa akrilnom kiselinom, ali i sa propil akrilnom i maleinskom kiselinom <sup>68,123,127-132,143,144</sup>.

Hidrogelovi osetljivi na pH i temperaturu pružaju interesantne mogućnosti za otpuštanje antitrombocita, heparina (antikoagulans) i streptokinaze (fibrinolitik) <sup>145</sup>. Interpenetrirajuće polimerne mreže (IPM) su pogodne za podešavanje otpuštanja lekovitih supstanci usled malih promena pH i temperature koje prate obrazovanje tromba. IPM na bazi hitozana i NiPAAm-a omogućili su otpuštanje diklofenaka u zavisnosti od promene pH i temperature <sup>146</sup>. Slično, hidrogelovi na bazi NiPAAm-a, butilmetakrilata i akrilne kiseline su dizajnirani za otpuštanje anti HIV mikrobiocida kao odgovor na promenu pH <sup>147,148</sup>.

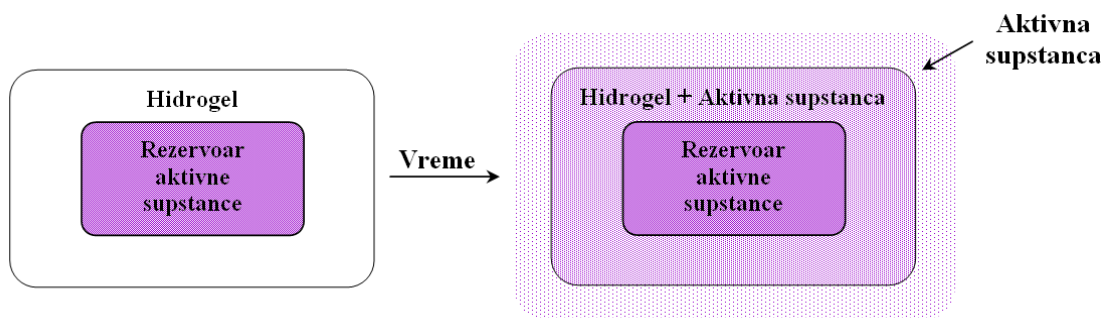
## 2.4. Primena hidrogelova

Zahvaljujući specifičnim svojstvima, pre svega mogućnosti upijanja velike zapremine vode i drugih bioloških fluida, kao i sličnosti sa živim tkivima, hidrogelovi su našli veliku primenu u medicini i farmaciji <sup>1,149</sup>.

S obzirom da se za sintezu hidrogelova mogu upotrebiti skoro svi hidrofilni monomeri, njihova hemijska i fizička svojstva mogu se varirati u veoma širokom opsegu. Takođe, mogu se proizvoditi u različitim oblicima kao što su tanke ploče, mikročestice, nanočestice, premazi, tečnosti koji na mestu primene geliraju i filmovi. Iz toga i proističe njihova široka primena u medicini, uključujući i regenerativnu medicinu, dijagnostiku, imobilizaciju ćelija, separaciju biomolekula ili ćelija, itd. <sup>82</sup>.

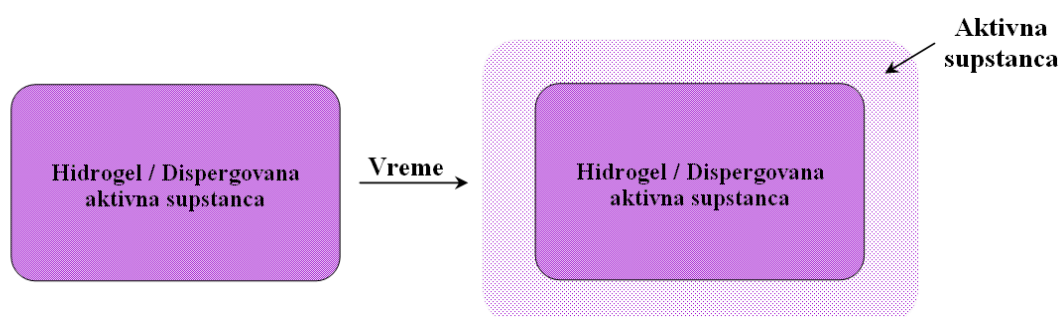
Hidrogelovi su postali vrlo interesantni za primenu u farmaciji kao nosači za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci. Za te svrhe su veoma značajni hidrogelovi koji su osetljivi na spoljašnje uticaje, najviše pH- i temperaturno-osetljivi hidrogelovi, a poželjno je da, uz odgovarajuću hidrofilnost i elastičnost, budu biodegradabilni, kao i da njihovo

razlaganje daje netoksične proizvode. Aktivna supstanca se u hidrogel može inkorporirati bubrenjem hidrogela do ravnoteže u rastvoru aktivne supstance ili dodatkom u mrežu hidrogela prilikom njegove sinteze, odnosno pre otpočinjanja reakcije polimerizacije i umrežavanja. Hidrogel se može dizajnirati tako da u sredini u kojoj se aktivna supstanca otpušta, zavisno od uslova (pH, jonska jačina rastvora, temperatura, itd.) bubri uz njeno oslobađanje. Kao nosači aktivnih supstanci, hidrogelovi su pogodni za različite načine primene: nazalnu, peroralnu, bukalnu, vaginalnu, rektalnu, transdermalnu, parenteralnu i oftalmološku<sup>1,3</sup>. Razvijeni su visoko specijalizovani hidrogelovi za otpuštanje aktivnih supstanci na tačno određena, željena, mesta u organizmu<sup>48</sup>. Na Slikama 2.3 i 2.4 prikazana su dva glavna tipa sistema za kontrolisano otpuštanje difuzijom, s obzirom da je difuzija najčešće mehanizam koji preovlađuje pri oslobađanju aktivne supstance. Na Slici 2.3 je prikazan sistem tipa rezervoara, a na Slici 2.4 sistem tipa matrice. U oba slučaja do oslobađanja aktivne supstance dolazi usled difuzije kroz pore ispunjene okolnim fluidom.



**Slika 2.3.** Shematski prikaz oslobađanja aktivne supstance iz hidrogela (sistem tipa rezervoara).

Veliki nedostatak sistema tipa rezervoara je mogućnost pucanja hidrogela i momentalnog oslobađanja aktivne supstance, pa je neophodno voditi računa da ne postoje defekti u strukturi nakon sinteze hidrogela<sup>150</sup>.



**Slika 2.4.** Shematski prikaz oslobađanja lekovite supstance iz hidrogela (sistem tipa matrice).

Iako je u ovom slučaju jednostavno sintetisati sistem određene, željene geometrije, teško je postići kontrolisano oslobađanje aktivne supstance. Bubrenje hidrogelova do ravnoteže se koristi za inkorporaciju jako osetljivih molekula kao što su peptidi ili proteini koji lako mogu da se inaktiviraju tokom procesa polimerizacije.

Hidrogelovi će se svakako u budućnosti i dalje primenjivati u brojnim medicinskim i farmaceutskim sistemima. Hidrogelovi se sve više koriste za inženjerstvo tkiva, za izradu materijala za previjanje rana, imunoizolaciju, otpuštanje lekovitih supstanci, itd. S druge strane nelinearni odziv, na primer „on/off“, „pametnih“ polimera je ono što ih čini tako jedinstvenim i efikasnim, a značajna promena u svojstvima se može postići vrlo malom promenom okolnih uslova. „Pametni“ polimeri mogu promeniti konformaciju, adhezivnost ili svojstva zadržavanja vode, usled neznatnih promena spoljnih stimulansa.

Još jedan faktor koji utiče na efikasnost „pametnih“ polimera leži u inherentnoj prirodi polimera, odnosno činjenici da je odgovor molekula na promene stimulansa sačinjen od promena pojedinih monomernih jedinica. Odgovori monomernih jedinica, sjedinjeni stotinu ili hiljadu puta, stvaraju znatnu snagu za vođenje bioloških procesa<sup>48-51</sup>. Od ostalih primena, hidrogelovi se koriste za izradu separacionih membrana, biosenzora, u poljoprivredi dr.<sup>3</sup>.

Jedan od ograničavajućih faktora za primenu sintetskih hidrogelova je da većina njih nije biorazgradiva. U slučaju njihovog razlaganja javlja se problem toksičnosti dobijenih proizvoda. Zbog toga se sve više istražuju polimeri koji su biokompatibilni i biorazgradivi<sup>151-154</sup>. Pored toga, nedostatak hidrogelova osetljivih na spoljašnje uticaje je njihova spora reakcija na brzi stimulans. Ovo se može prevazići izradom hidrogelova manjih dimenzija, ali se mora voditi računa o tome da se smanjenjem dimenzija ne poveća njihova krtoš i lomljivost<sup>3,155-159</sup>.

## **2.5. Dosadašnja istraživanja pH- i temperaturno-osetljivih hidrogelova itakonske kiseline i *N*-izopropilakrilamida**

Primenom akrilne i metakrilne kiseline, koje se najčešće koriste za sintezu hidrogelova, ograničen je opseg pH vrednosti u kojima se pH- i temperaturno-osetljivi hidrogelovi mogu koristiti. Zamenom ovih kiselina sa itakonskom kiselinom, koja ima dve COOH grupe sa različitim  $pK_a$  vrednostima, dobijaju se hidrogelovi veće pH-osetljivosti, a time se širi i opseg pH vrednosti u kojima se mogu primenjivati. Pored toga, itakonska kiselina je odabrana za ovaj rad i zbog mogućnosti dobijanja iz nepetrohemijskih izvora

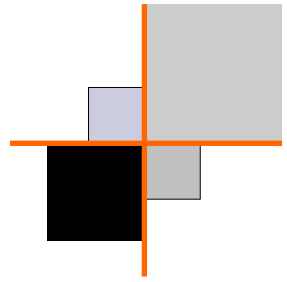
72,82,153,160-163. Porast interesovanja za biotehnološku proizvodnju IK<sup>160-162</sup> doveo je do sve veće upotrebe IK u sintezi hidrogelova koji ispoljavaju pH i temperaturnu osetljivost<sup>9,164,165</sup>.

Erbil i Uyanik<sup>164</sup> su objavili prve radove o P(NiPAAm/IK) hidrogelovima i pokazali da bubrenje i srednja molekulska masa između dve susedne tačke umreženja rastu sa porastom sadržaja hidrofilne komponente, što je objašnjeno smanjenjem parametra interakcije polimer-voda i povećanjem njihove kompatibilnosti. Utvrđeno je da na stepen bubrenja utiče broj karboksilnih grupa ovih monomera, kao i  $pK_a$  vrednost kiseline. Erbil i saradnici<sup>166</sup> pokazuju da je veći odnos sadržaja ugrađenog NiPAAm-a u P(NiPAAm/IK) hidrogel nego njihov odnos u početnoj reakcionoj smeši. Güven i saradnici<sup>9,165</sup> su izučavali P(NiPAAm/IK) hidrogelove sintetisane  $\gamma$ -zračenjem. Kod ovih kopolimera sa porastom sadržaja IK i pH vrednosti okoline stepen bubrenja raste, dok se efektivna gustina umrežavanja smanjuje. Krušić i saradnici su ispitivali uticaj jonizacije COOH grupa itakonske kiseline na stepen bubrenja hidrogelova. Svojstva hidrogelova *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline zavise od sastava, pH sredine, odnosa komonomera i rastvarača, sadržaja umreživača kao i temperature kopolimerizacije. Poslednjih godina veliki broj istraživanja je usmeren upravo na izučavanje uticaja pomenutih faktora na svojstva pH- i temperaturno-osetljivih hidrogelova. Pokazano je da bubrenje kopolimernih hidrogelova u velikoj meri zavisi od pH vrednosti okolnog medijuma<sup>167</sup>. Ling i Lu<sup>168</sup> su proučavali kinetiku bubrenja ovih hidrogelova u ponovljenim ciklusima u cilju smanjenja količine hidrogela potrebnog za oslobađanje lekovite supstance u odnosu na tradicionalne sisteme. Taşdelen i saradnici su proučavali hidrogel NiPAAm-a i itakonske kiseline za inkapsulaciju 5-Fluorouracila i utvrdili da je inkapsulacija ove supstance poboljšana jer je dodatak kiseline povećao stepen bubrenja, a time i kapacitet upijanja lekovite supstance<sup>169</sup>.

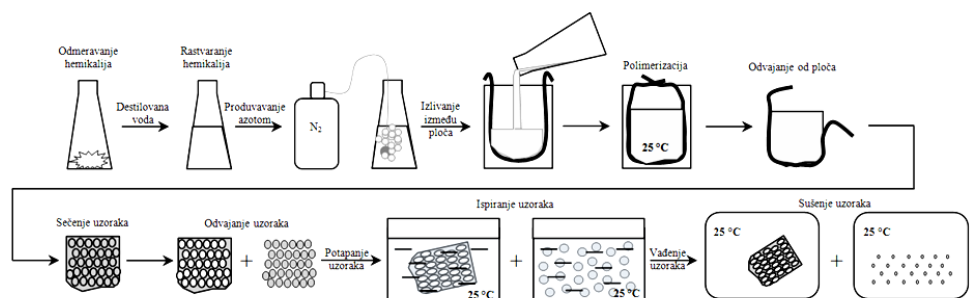
Relativno mali broj radova se bavi proučavanjem pH- i temperaturno-osetljivih hidrogelova na bazi NiPAAm-a i itakonske kiseline, i to uglavnom radi njihove potencijalne primene za kontrolisano otpuštanje lekovitih supstanci, dok njihova primena za imobilizaciju enzima nije do sada proučavana.



# DEO II



## *Ekperimentalni deo*





### 3.1. Reaktanti

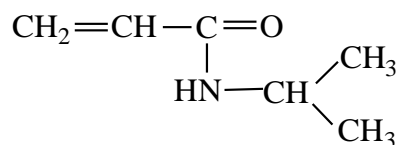
U sintezama kopolimernih hidrogelova na bazi *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline upotrebljeni su sledeći reaktanti:

- Monomeri, *N*-izopropilakrilamid, NiPAAm (Acros Organics, Belgija) i itakonska kiselina, IK (Fluka)
- Umreživač, *N,N'*-metilenbisakrilamid, MBA (SERVA-Feinbiochemica, Nemačka),
- Inicijator, kalijum-persulfat, KPS (SERVA-Feinbiochemica, Nemačka),
- Ubrzivač, kalijum-pirosulfat, KPyS (SERVA-Feinbiochemica, Nemačka),
- Lipaza iz *Candida rugosa*, CRL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) i
- Polietilen glikol *p*-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil etar, Triton X-100 (Dow Surfactants, SAD).

### 3.1.1. *N*-izopropilakrilamid

*N*-izopropilakrilamid, kao derivat akrilamida, pokazuje ponašanje veoma slično ovom monomeru. U vodenim rastvorima vrlo brzo otpočinje polimerizaciju preko slobodnih radikala pri čemu se dobija proizvod velike molekulske mase. Slično akrilamidu, za *N*-izopropilakrilamid se pretpostavlja da je kancerogen i neurotoksičan, ali za razliku od njega ima jak miris zbog čega ga je lako detektovati<sup>170</sup>. Karakteristike NiPAAm-a su:

- bela, kristalna supstanca, rastvorljiva u vodi
- bruto formula: C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO
- molekulska masa: 113,16 g/mol
- temperatura topljenja: 33,18 °C
- čistoća 99 %



**Slika 3.1.** Strukturna formula *N*-izopropilakrilamida.

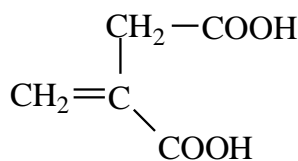
Prvi hidrogel na bazi *N*-izopropilakrilamida sintetisao je Chibante 1978. godine, a od tada je do danas objavljen veliki broj radova u kojima je opisana sinteza, karakterizacija i primena ovih hidrogelova<sup>170</sup>.

Pre upotrebe NiPAAm je prekrystalisan u smeši *n*-heksan/benzen (75/35), a zatim osušen u vakuumu do konstantne mase. Prinos monomera bio je 74 ± 5 %.

### 3.1.2. Itakonska kiselina

Itakonska kiselina je nezasićena dikarbonska organska kiselina, rastvorna u vodi, a stabilna u kiseljoj, neutralnoj i slabo baznoj sredini. Industrijski se dobija fermentacijom ugljenih hidrata. Karakteristike itakonske kiseline su:

- bela, kristalna supstanca rastvorljiva u vodi
- bruto formula:  $C_5H_6O_4$
- molekulska masa: 130,10 g/mol
- temperatura topljenja: 167-168 °C
- temperatura paljenja: 177,94 °C
- konstante disocijacije:  $pK_{a1}=3,85$  и  $pK_{a2}= 5,44$ ,
- čistoća: *p.a.*

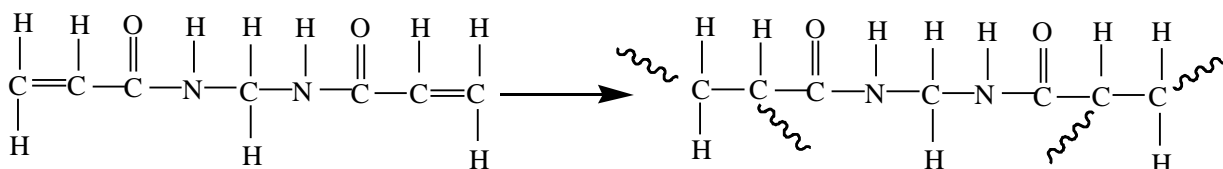


**Slika 3.2.** Strukturna formula itakonske kiseline.

### 3.1.3. *N,N'*-metilenbisakrilamid

Kao agens za umrežavanje pri sintezi hidrogelova korišćen je *N,N'*-metilenbisakrilamid sledećih karakteristika:

- bela, kristalna supstanca, rastvorna u vodi
- bruto formula:  $C_7H_{10}N_2O_2$
- molekulska masa: 154,07 g/mol
- temperatura topljenja: 223,9 °C
- čistoća: *p.a.*



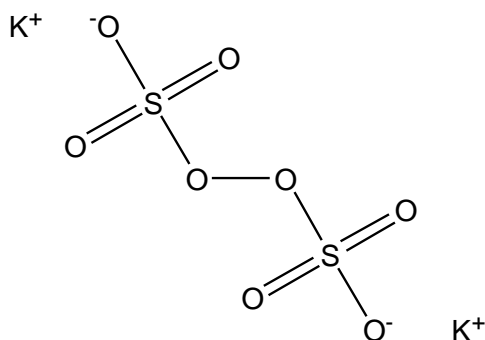
**Slika 3.3.** Strukturna formula *N,N'*-metilenbisakrilamida.

U sintezama MBA je korišćen bez prečišćavanja.

### 3.1.4. Kalijum-persulfat

Kao inicijator reakcije polimerizacije pri sintezi hidrogelova korišćen je kalijum-persulfat sledećih karakteristika:

- bela, kristalna supstanca, rastvorljiva u vodi
- bruto formula:  $K_2S_2O_8$
- molekulska masa: 270,32 g/mol
- temperatura topljenja: 325 °C
- čistoća: *p.a.*

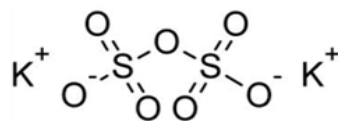


Slika 3.4. Strukturna formula kalijum-persulfata.

### 3.1.5. Kalijum-pirosulfat

Kao ubrzivač reakcije polimerizacije pri sintezi hidrogelova korišćen je kalijum-pirosulfat sledećih karakteristika:

- beli igličasti kristali, rastvoran u vodi, stabilan na normalnim uslovima
- bruto formula:  $K_2S_2O_7$
- molekulska masa: 254,33 g/mol
- temperatura topljenja: 325 °C
- čistoća: *p.a.*

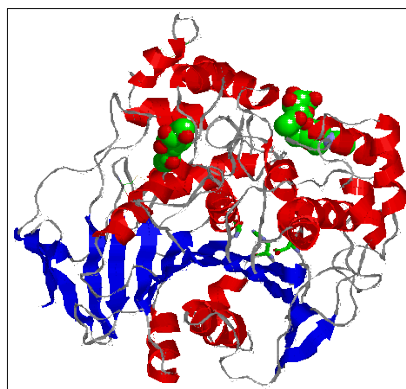


**Slika 3.5.** Strukturna formula kalijum-pirosulfata.

### 3.1.6. Lipaza iz *Candida rugosa*

Korišćena je lipaza iz *Candida rugosa* (E.C. 3.1.1.3) firme *Sigma Aldrich*, Tip VII, nominalne lipolitičke specifične aktivnosti 1468 jedinica/mg čvrste supstance. Sadrži laktozu kao stabilizator, ne sadrži slobodnu alfa amilazu niti proteazu.

Na Slici 3.6 dat je prikaz lipaze iz *Candida rugosa* snimljen metodom difrakcije X-zraka, rezolucije 2,06 Å (1 Å = 0,1 nm).



**Slika 3.6.** 3-D formula lipaze iz *Candida rugosa*.

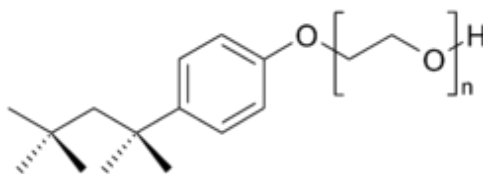
Destilovana voda je korišćena u svim kopolimerizacijama i za pripremanje pufera.

### 3.1.7. Polietilen glikol *p*-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil etar

Polietilen glikol *p*-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil etar (Triton X-100) je nejonska površinski aktivna materija sledećih karakteristika:

- viskozna supstanca, rastvorna u vodi, mešljiva sa većinom polarnih organskih rastvarača i aromatskim ugljovodonicima, hemijski stabilna u većini kiselih i baznih rastvora.
- bruto formula:  $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ , ( $n = 9-10$  jedinica etilen oksida)
- molekulska masa: 647 g/mol, za  $n = 10$
- stabilnost: na temperaturama od 2 do 8 °C, zaštićen od svetlosti
- kritična koncentracija micela: približno  $0,2 \times 10^{-3}$  M (25 °C)
- tačka zamućenja: 65 °C
- biodegradabilan
- čistoća 99 %

Triton X-100 je nejonska površinski aktivna materija koja se koristi za solubilizaciju membrana proteina tokom izolacije iz njihovih kompleksa. U sintezama hidrogelova je korišćen da bi se zadržala otvorena konformacija lipaze i time povećala njena aktivnost nakon imobilizacije.



Slika 3.7. Strukturna formula Triton X-100.

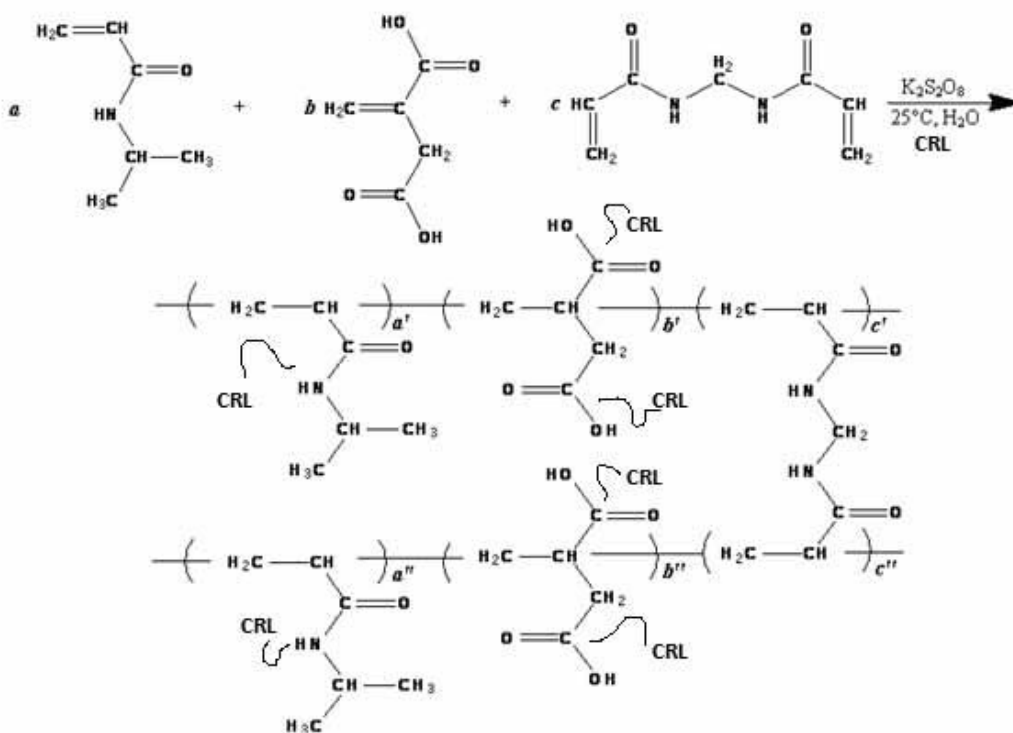
### 3.2. Sinteza hidrogelova

Polimerizacijom preko slobodnih radikala na 25 °C, u vodi, sintetisani su homo- i kopolimerni hidrogelovi *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline. Vreme reakcije se kreće u opsegu od 12 do 48 sati i zavisi od koncentracije lipaze i umreživača, kao i od odnosa komonomera NiPAAm/IK u početnoj smeši. Pri sintezama je variran sadržaj monomera, umreživača i lipaze, dok je koncentracija inicijatora i ubrzivača bila konstantna, 1 mas%, računato na smešu monomera. Lipaza iz *Candida rugosa* je imobilisana „*in situ*“ polimerizacijom, odnosno dodavanje enzima u reakcionu smešu pre početka reakcije polimerizacije i umrežavanja (Metoda I), koja predstavlja uobičajen način vezivanja enzima

u hidrogelove <sup>5</sup>. Sadržaj lipaze u hidrogelovima je variran od 2, 5, 10 i 20 mas%, a umreživača od 2 i 4 mas% računato na smešu monomera.

Odmerene mase reaktanata su rastvorene u odgovarajućoj zapremini destilovane vode. Svaki od reaktanata je rastvaran posebno. Rastvori su prođuvavani azotom 20 minuta, a zatim pomešani. Nakon toga je reakciona smeša izlivena u kalup koji se sastoji od dve staklene ploče odvojene PVC crevom i ostavljena na 25 °C da polimerizuje. Po završetku reakcije, staklene ploče su odvojene, a gel je isečen na diskove koji su zatim potapani u destilovanu vodu da bi se odstranile neporeagovale materije. Voda je menjana svakodnevno tokom četiri dana. Uzorci su osušeni na sobnoj temperaturi. Suvi uzorci su bili debljine 0,10 ± 0,01 cm i prečnika 0,70 ± 0,10 cm.

U nazivu uzorka NiPAAm/IK/MBA/CRL prvi broj označava maseni udeo *N*-izopropilakrilamida, drugi maseni udeo itakonske kiseline, treći maseni udeo umreživača, a četvrti maseni udeo lipaze u hidrogelu. Na Shemi je prikazana „*in situ*“ imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* u kopolimerni hidrogel *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline.



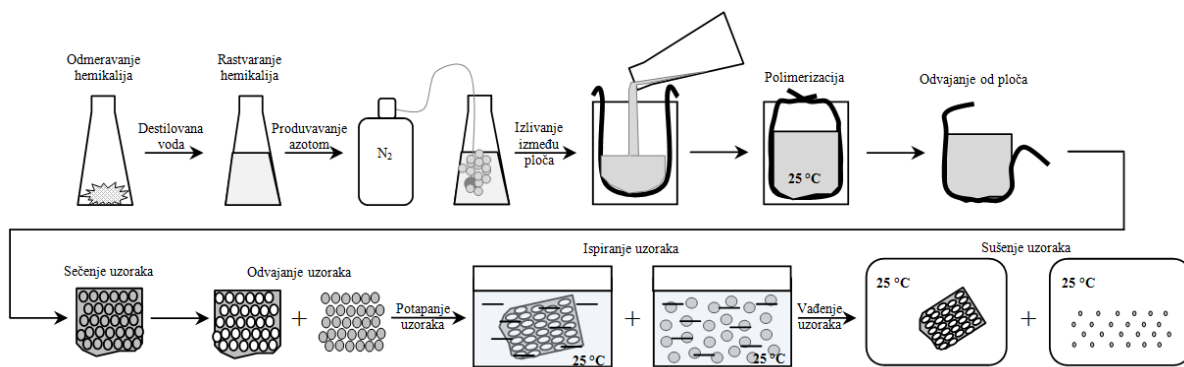
Takođe, lipaza je imobilisana metodom bubrenja, odnosno potapanjem suvih uzoraka (kserogelova) u 10 mL puferkog rastvora određene pH vrednosti (6,04; 7,00; 8,00; i 8,99) i koncentracije lipaze (0,2; 1,0; 5,0; 10,0; i 20,0 mg<sub>enz</sub>/mL rastvora). Uzorci su ostavljeni da bubre do ravnoteže uz povremeno mešanje, kako bi se obezbedili uslovi maksimalnog



upijanja lipaze iz rastvora. Da bi se ispitao uticaj temperature na imobilizaciju lipaze, eksperimenti su izvedeni na tri temperature: 5, 25 i 37 °C.

*Određivanje ekstrahovanih materija* (Tabela T1, Prilog). Nakon sinteze, isečeni diskovi sintetisanih gelova i ostatak od sečenja, su potpuno potopljeni u vodu na 25 °C radi određivanja neproreagovanih materija. Voda u čašama je menjana četiri dana i odlivana u odgovarajuće erlenmajere čije su mase pre toga zabeležene. Nakon toga, gelovi su izvađeni da se suše na 25 °C, a erlenmajeri su odneti na uparavanje do suva na 60 °C. Posle uparavanja, izmerene su mase erlenmajera i iz razlike masa dobijen sadržaj neproreagovanih ekstrahovanih materija.

Na Slici 3.8. je dat shematski prikaz procesa sinteze hidrogelova.



**Slika 3.8.** Shema procesa sinteze hidrogelova.

### 3.3. Karakterizacija hidrogelova

#### 3.3.1. Ispitivanje procesa bubrenja

Bubrenje hidrogelova sa lipazom je praćeno u puferskim rastvorima pH = 2,20 (KCl/HCl, Zorka Pharma, Srbija) i pH = 6,80 ( $NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4$ , Analytika Ltd., Češka Republika) i na temperaturi od 37 °C. Takođe, ispitano je i bubrenje hidrogelova sintetisanih bez prisustva lipaze.

Nakon potapanja kserogelova u odgovarajući puffer na 37 °C, merena je masa u određenim vremenskim intervalima. Step en bubrenja je računat po jednačini (8).

$$q = \frac{m_t}{m_0} \quad (8)$$

gde je  $m_0$  masa kserogela, a  $m_t$  masa nabubrelog hidrogela u trenutku  $t$ .

### 3.3.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfologija hidrogelova je ispitana na JEOL JMS-5800 skenirajućem elektronskom mikroskopu. Pre izvođenja eksperimenata uzorci hidrogelova su liofilizovani. Da bi se izbegle deformacije pri lomljenju uzoraka, liofilizovani uzorci su potopljeni u tečni azot, a zatim isečeni. Nakon toga, na uzorke je raspršena platina pod vakuumom pomoću Polaron SC502 raspršivača.

### 3.3.3. Mehanička svojstva 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 25 % pri promeni frekvencije u intervalu od 0,1 do 100 rad/s. Određivana su mehanička svojstva hidrogelova nabubrelih do stanja ravnoteže u puferu pH = 6,80 ± 0,01 na 37 °C.

### 3.3.4. Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija

Urađena je FT-IR analiza slobodne i imobilisane lipaze iz *Candida rugosa* korišćenjem Bomem MB 100 FT-IR spektrofotometra. Oko 10 mg uzorka se pomeša i sprai sa 100 mg kalijum-bromida (Sigma-Aldrich, Nemačka) i komprimuje u tablete pod pritiskom od 11 t, u trajanju oko jedan minut, pomoću Graseby Specac Model: 15,011. Spektri su dobijeni u rasponu talasnog broja od 400-4000 cm<sup>-1</sup>, na 25 °C i na 4 cm<sup>-1</sup> rezolucije spektra. (KBr : Uzorak = 50 : 1).

### 3.3.5. Mikroskopija atomskih sila

Mikroskopija atomskih sila (AFM) uzoraka bez lipaze kao i uzoraka sa „*in situ*“ imobilisanom lipazom je izvedena primenom „suvog“ moda na Veeco CP-II instrumentu. Konzole su korišćene bez prethodnog hemijskog tretmana. Standardni tačkasti („tapping“) mod omogućava upotrebu minimalne sile u cilju sprečavanja nastanka dodatnih neravnina kao posledica korišćenja špica. Ta sila je osigurana održavanjem minimalne amplitude kontakta sa površinom.

Instrument korišćen u studiji zahteva da uzorak bude relativno ravan i čvrste površine, tako da vrh može da skenira preko nje, a da ne postoji mogućnost kontaminiranja ili deformacije.

AFM analiza je izvedena na uzorcima u suvom stanju. Analiza površine uzoraka u nabubrelom stanju moguća je primenom manje invazivne tehnike slikanja površine, ali bi se u tom slučaju dobila „mutna“ topografija. Vrh konzole može da penetrira u nabubreli hidrogel čak i pri upotrebi relativno malih sila reda veličine 1 nN i tako ošteti površinu hidrogela, pa ga je u tom slučaju potrebno osigurati upotrebom dodatnih staklenih kapsula koje povećavaju površinu špica, što utiče na pravilan, precizniji i detaljniji prikaz površine uzorka. Ovo je razlog zašto nije rađeno sa nabubrelim uzorcima, već sa uzorcima u suvom stanju. Ovo razmatranje je u saglasnosti sa skoro objavljenim rezultatima ispitivanjem na nabubrelim česticama mikrogelova<sup>171</sup>.

### 3.4. Efikasnost imobilizacije i aktivnost imobilisane lipaze u hidrogelovima

Aktivnost lipaze je određena po standardnoj Sigma proceduri na emulziji maslinovog ulja koja prati nastanak masnih kiselina u sistemu<sup>172</sup>. U epruvete je mikropipetom odmereno po 3 mL Sigma emulzije (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 1 mL 0,05 M Tris/HCl (Tris(hidroksimetil)aminometan/HCl) pufera<sup>173</sup> i 2,5 mL destilovane vode. Sadržaji epruveta su mešani na Vortex mešalici, a zatim stavljeni u termostat na 37 °C da se termostatiraju 20 minuta. Nakon toga, u epruvete su dodate odgovarajuće mase samlevenih uzoraka kojima je potrebno odrediti aktivnost lipaze, a zatim su sadržaji epruveta ponovo izmešani i vraćeni u termostat na istu temperaturu. Posle 180 minuta epruvete su izvađene, njihov sadržaj prebačen u erlenmajere u kojima se nalazi po 3 mL metanola (Zorka Pharma, Srbija) sa indikatorom fenoltaleinom (Merck, Nemačka). Formiranje masnih kiselina

kvantifikovano je titracijom 0,1M rastvorom NaOH (Zorka Pharma, Srbija), sve do pojave blede ružičaste boje, pri čemu je zabeležena zapremina utrošenog rastvora za titraciju. Paralelno sa testom se radi i slepa proba. U tom slučaju u epruvete se sipaju sve supstance kao i za ispitivanje uzorka, osim samog uzorka. Odrađene su još dve serije eksperimenata u kojima je modifikovano vreme trajanja reakcije formiranja masnih kiselina i skraćeno na 45, odnosno 100 minuta, u cilju ispitivanja (i uštede) vremena na formiranje masnih kiselina.

Aktivnost imobilisane lipaze je izražena u internacionalnim jedinicama po jedinici mase imobilizata (IU/g) ili kao specifična aktivnost, koja predstavlja odnos aktivnosti imobilisanog enzima i mase vezanog enzima (u mg) po gramu suvog spraćenog uzorka. Pod jednom internacionalnom jedinicom se podrazumeva ona količina enzima koja, pod strogo određenim uslovima (pH = 7,70 i temperatura od 37 °C), katalizuje transformaciju 1  $\mu$ mol masne kiseline po minuti.

#### 3.4.1. Reagensi za određivanje aktivnosti lipaze po Sigma proceduri

- Sveže pripremljen Sigma supstrat (Sigma emulzija),
- 0,05 M Tris/HCl pufer,
- 0,1 M volumetrijski rastvor NaOH.

*Priprema Sigma supstrata:* Odmeri se 20 g poli(vinil alkohola) (PVA, srednje molekulske mase, 86-89 % hidrolizovan, Alfa Aesar, Nemačka) i postepeno dodaje uz neprestano mešanje u 750 mL destilovane vode koja je prethodno zagrejana na 80-90 °C. Mešanje se vrši sve dok se sva masa PVA ne rastvori. Posebno se odmeri 250 mL maslinovog ulja i postepeno se dodaje, kap po kap, u vodeni rastvor PVA, uz intenzivno mešanje na mikseru (Yellow line DI 25 basic).

*Priprema Tris/HCl pufera:* U mernom sudu se odmeri 1,2116 g Tris-a (Acros Organics, SAD) i dopuni do 50 mL destilovanom vodom. Od toga se, nakon potpunog rastvaranja, odmeri 25,0 mL i prebaci u drugi merni sud kome se doda 35,0 mL 0,1 M HCl i dopuni do 100 mL destilovanom vodom. Tako pripremljen rastvor Tris/HCl pufera ima pH vrednost 7,77.

*Priprema uzoraka za Sigma proceduru:* Uzorci su samleveni do finog praha u avanu sa tučkom i odloženi u prethodno obeležene posudice. Zatim je od svakog sastava odmerena odgovarajuća masa i pripremljena za dalju analizu.

### 3.4.2. pH i temperaturni optimum lipaze

pH stabilnost slobodne i imobilisane lipaze u P(NiPAAm/IK) hidrogelove je određena nakon termostatiranja enzima na 45 °C u puferima različitih pH vrednosti u opsegu od 4 do 10, u vremenskom intervalu od 180 minuta.

Termička stabilnost slobodne i imobilisane lipaze na P(NiPAAm/IK) hidrogelove je određena nakon termostatiranja enzima na različitim temperaturama u opsegu od 5 do 65 °C na pH = 7,00, u trajanju od 180 minuta.

Katalitička aktivnost uzoraka u oba slučaja je određena na način opisan u Poglavlju 3.4..

### 3.5. Ispitivanje stabilnosti imobilisane lipaze pri skladištenju

Osušeni, samleveni uzorci biokatalizatora su inkubirani u laboratorijskom frižideru na -20 °C, 4 °C i na sobnoj temperaturi, 25 °C. Stabilnost na skladištenje je određena preko aktivnosti slobodne i imobilisane lipaze u odgovarajućim vremenskim intervalima (do 60 dana za imobilisane uzorke), po Sigma proceduri, a rezultati su predstavljeni kao procenat od ostatka aktivnosti u odnosu na početne aktivnosti biokatalizatora izmerene za „nulti“ dan (relativna aktivnost biokatalizatora).

### 3.6. Sinteza estra *n*-amil-izobutirata

Esterifikacija je izvedena u erlenmajerima sa šlifovanim grlom. Različite mase sprášenih uzoraka su pomešane sa smešom od 230 µL izobuterne kiseline (Carlo Erba Reagents, Italija), 270 µL *n*-amil alkohola (Carlo Erba Reagents, Italija) i različitim zapreminama rastvarača (voda ili puferski rastvor). Bezvodni *n*-heksan (Carlo Erba Reagents, Italija) je dodat u reakcionu smešu do ukupne zapremine od 10 mL. Reakciona smeša se stavlja u termostat-tresilicu (WB Memmert 22, Nemačka) do završetka odigravanja enzimske reakcije, na 150 obr/min. Temperatura odigravanja enzimske reakcije je za svaki pojedinačni sistem bila konstantna.

Reakcija se zaustavlja dodatkom 10 mL smeše metanol/fenolftalein, a uzorci se titrišu sa 0,1M rastvorom NaOH do promene boje kako bi se odredile preostale slobodne masne kiseline u reakcionoj smeši.

Sposobnost polimernog nosača da veže lipazu i održavanje njene aktivnosti je prikazano kao prinos aktivnosti lipaze, u procentima (%). Za „*in situ*“ metodu, uzorci su obeleženi na sledeći način:

- 90/10/2/20 (P(NiPAAm/IK)–1)
- 90/10/2/20 u fosfatnom puferu pH 7,0 kao rastvaraču (P(NiPAAm/IK)–2)
- 90/10/2/20 u fosfatnom puferu pH 7,0 kao rastvaraču (pH vrednost smeše IA/KPS/KPyS pre reakcije polimerizacije je podešena na pH 7,20) (P(NiPAAm/IK)–3)
- 90/10/2/20 sintetisa sa 0,5 mas% Triton X-100 (P(NiPAAm/IK)–4)
- 90/10/2/20 sintetisan sa 0,5 mas% Triton X-100 u pH 7,0 (P(NiPAAm/IK)–5)

### 3.6.1. Optimizacija enzimski katalizovane reakcije esterifikacije

*Temperatura reakcije.* Reakciona smeša se termostatira na različitim temperaturama, u rasponu između 32 i 50 °C u trajanju od 48 sati uz stalno mešanje brzinom od 150 obr/min u termostat-tresilici. Konverzija je utvrđena na način opisan u Poglavlju 2.5.

*Uticao vode.* Različite zapremine vode (10, 50, 100 i 200 µL, odnosno 10, 50, 100, 200 i 300 µL) korišćene su da bi se utvrdilo da li dodavanje vode, kao i zapremina dodate vode, utiču na sintezu i formiranje estra.

*pH reakcionog medija.* Puferi različitih pH vrednosti (pH 6, 7, 8, 9 i 10) su korišćeni za određivanje uticaja pH na proizvodnju estra.

*Sadržaj biokatalizatora (enzim/nosač).* Različiti sadržaji (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 i 0,8 g) biokatalizatora su korišćeni za određivanje uticaja sadržaja lipaze na sintezu estra.

### 3.6.2. Višestruka upotreba imobilisane lipaze

S ekonomskog gledišta, ponovno korišćenje enzima predstavlja glavnu prednost imobilizacije biokatalizatora. Nakon prvog korišćenja imobilisane lipaze u reakciji esterifikacije, biokatalizator je filtriran, temeljno ispran sa 50 mL *n*-heksana, i osušen na 25 °C u trajanju od 24 sata pre nego što je podvrgnut ponovnom korišćenju. Proces pranja i ponovne upotrebe imobilisanog enzima je izveden 20 puta.

### 3.7. Otpuštanje lipaze iz hidrogelova

*In vitro* eksperimenti otpuštanja su izvedeni potapanjem uzoraka u posudu napunjenu sa 10 mL pufera na 37 °C, čija je pH vrednost podešena tako da se simuliraju uslovi u GI traktu. Prosečna zapremina kserogela pre praćenja kinetike otpuštanja bila je  $0,039 \pm 0,004$  cm<sup>3</sup>. Uzorci su prvo potopljeni u pufer pH  $2,20 \pm 0,01$  i ostavljeni da bubre naredna dva sata, a koncentracija rastvora je merena na sat vremena. Nakon toga su svi uzorci prebačeni u posudu sa puferom pH vrednosti  $6,80 \pm 0,01$ , a merenja su nastavljena u odgovarajućim vremenskim intervalima do završetka eksperimenta, odnosno do isteka 48 sati. U odgovarajućim razmacima, uzima se 2 mL rastvora i meri koncentracija oslobođene lipaze, a zatim se vraća natrag u posudu kako bi se održala konstantna zapremina tokom eksperimenta. Uzorci su za sve vreme eksperimenta bili potpuno potopljeni u rastvor i smešteni u inkubator sa blagim mešanjem (50 obr/min). Sterilni uslovi su održavani tokom trajanja eksperimenta.

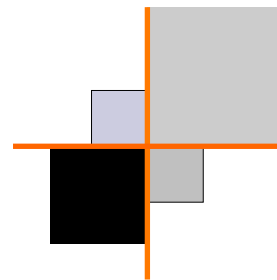
Otpuštanje lipaze je praćeno spektrofotometrijski (Ultrospec 3300 *pro* UV/Visible Spectrophotometer, Biochrom Ltd.) na 225 nm uz goveđi serum albumin kao standard. Koncentracija enzima određivana je iz standardne krive koja je urađena za svako merenje. Srednja i standardna devijacija tri nezavisna merenja su izračunate upotrebom Microsoft Excel (Redmond, WA, USA) softvera. Svi podaci su ponovljivi unutar  $\pm 5\%$  tačnosti. Rezultati su predstavljeni kao kumulativne vrednosti otpuštanja u funkciji vremena.

Enzimaska aktivnost uzoraka je takođe analizirana pomoću standardne Sigma procedure kao što je opisano ranije<sup>174</sup>. Radi poređenja, stabilnost native lipaze je takođe analizirana na pH 2,20 i 6,80. Alikvoti lipaze (10 mg, što odgovara masi imobilisane lipaze) su termostatirani na 37 °C u puferu pH 2,20 ili 6,80. U unapred određenim vremenskim intervalima se uzimaju uzorci, a aktivnost enzima se određuje po standardnoj Sigma

proceduri. Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbancije izračunata je koncentracija otpuštene lipaze u rastvorima svih uzoraka pomoću sledeće jednačine <sup>175</sup>:

$$C_{\text{proteina}} (\mu\text{g/mL}) = 144 \times (\text{Abs}215 / \text{Abs}225) \quad (9)$$





## *Rezultati i diskusija*

### **POGLAVLJE 4**

*Sinteza i karakterizacija hidrogelova  
N-izopropilakrilamida i itakonske kiseline  
za imobilizaciju lipaze iz *Candida rugosa**

### **POGLAVLJE 5**

*Aktivnost lipaze imobilisane u hidrogelove  
N-izopropilakrilamida i itakonske kiseline*

### **POGLAVLJE 6**

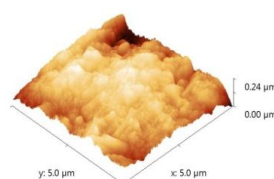
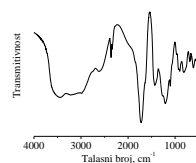
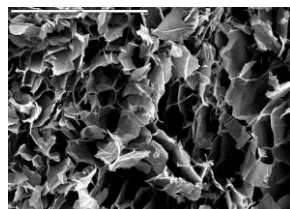
*Modifikacija i optimizacija biokatalizatora*

### **POGLAVLJE 7**

*Sinteza estera n-amil-izobutirata katalizovana  
imobilisanom lipazom iz *Candida rugosa**

### **POGLAVLJE 8**

*Ispitivanje mogućnosti primene hidrogelova  
N-izopropilakrilamida i itakonske kiseline  
za kontrolisano otpuštanje terapijskih proteina*



#### 4. Sinteza i karakterizacija hidrogelova *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline za imobilizaciju lipaze iz *Candida rugosa*

Polimerizacijom preko slobodnih radikala na 25 °C, u vodi, sintetisane su sve serije homo- i kopolimernih hidrogelova *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline. Pri sintezama je koncentracija inicijatora i ubrzivača bila konstantna i iznosila je 1 mas%, računato na smešu monomera, a variran je sadržaj monomera, umreživača i enzima kod sinteza u kojima je lipaza „*in situ*“ imobilisana – Metoda I, odnosno monomera i umreživača za sintezu uzoraka kod kojih je lipaza imobilisana bubrenjem – Metoda II. Sadržaj umreživača u hidrogelovima je bio 2,0 i 4,0 mas%, a lipaze 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 mas%, računato na smešu monomera.

##### 4.1. Karakterizacija hidrogelova

Nakon reakcije polimerizacije i umrežavanja, određena je masa neproreagovanih materija i stepen reagovanja hidrogelova sintetisanih bez enzima. Masa neproreagovanih

materija je bila od 0,118 g za uzorak 100/0/4/0 (1,11 % početne mase reakcione smeše) i stepenom reagovanja od 98,9 % do 0,0269 g za uzorak 90/10/2/0 (2,59 % početne mase reakcione smeše) i stepenom reagovanja od 97,4 %. Prosečan stepen reagovanja za sve hidrogelove sintetisane bez enzima iznosio je  $98,2 \pm 0,6$  %. Na osnovu dobijenih rezultata za stepen reagovanja može se izvesti zaključak da prisustvo itakonske kiseline u reakcionoj smeši malo utiče na stepen reagovanja. Uočava se takođe da porast stepena umreženja utiče na stepen reagovanja jer sa porastom sadržaja umreživača raste i stepen reagovanja, što je i očekivano.

#### 4.1.1. FT-IR analiza hidrogelova bez lipaze

Karakteristične apsorpcione trake za homopolimere *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline, kao i za hidrogel poli(*N*-izopropilakrilamid-ko-itakonska kiselina) sastava 90/10/2/0 prikazani su u Tabeli 4.1.

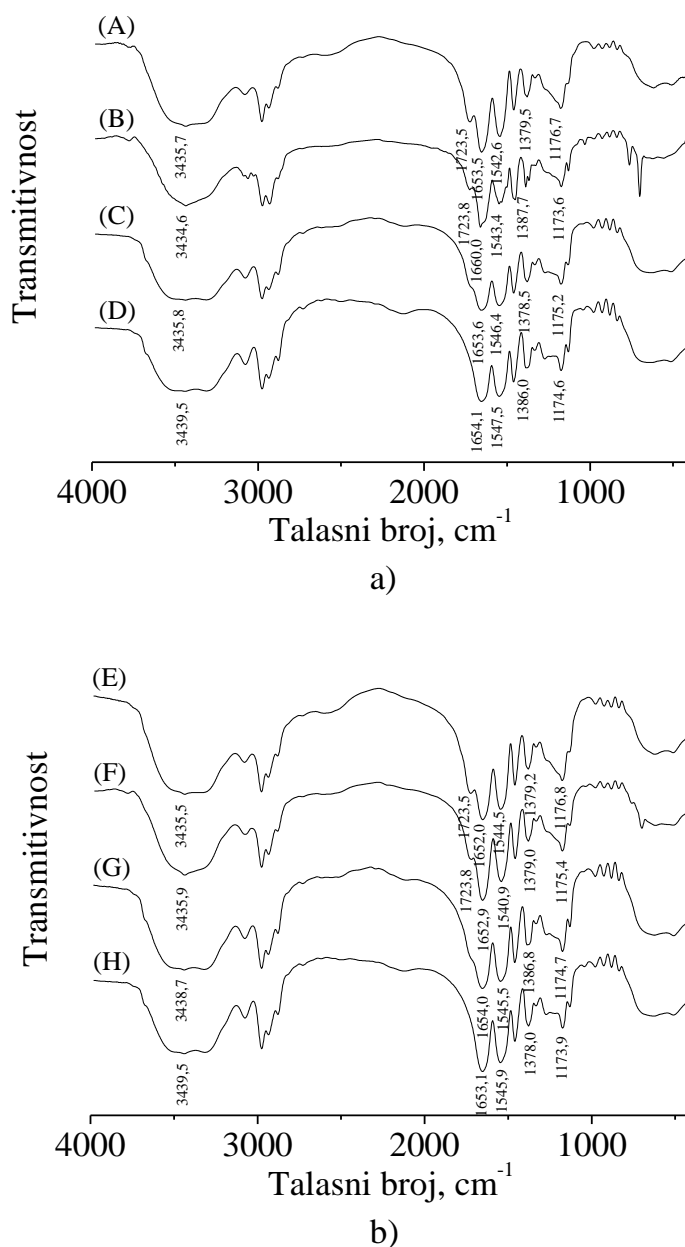
**Tabela 4.1.** Karakteristične apsorpcione trake homopolimera, poli(*N*-izopropilakrilamida), poli(itakonske kiseline) i kopolimera, poli(*N*-izopropilakrilamid-ko-itakonska kiselina) sastava 90/10/2/0 <sup>176-180</sup>.

<i>Talasni broj, cm<sup>-1</sup></i> (Literaturni podatak)	<i>Talasni broj, cm<sup>-1</sup></i> (Eksperimentalni podatak)	<i>Napomena</i>
Poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid)		
3000-2850	2974,5	Asimetrične i simetrične C–H vibracije i vibracije istezanja N–H grupe
3000-2850	2876,6	Asimetrične i simetrične C–H vibracije istezanja izopropil grupe
1650	1654,1	Amidna traka I, Vibracije istezanja karbonilne grupe
1550	1547,5	Amidna traka II, N–H vibracije savijanja
1380	1386,0	C–H vibracije i traka simetrične izopropil grupe

Tabela 4.1. (nastavak)

Poli(itakonska kiselina)		
3200-2800	2972,0	Vibracije istezanja O–H grupe intramolekulske vodonične veze
1760-1690	1703,3	Vibracije istezanja karbonilne grupe
1420	1400,0	C–O–H savijanje u ravni
1300-1200	1206,7	C–O istezanje karboksilne grupe
Poli( <i>N</i> -izopropilakrilamid-ko-itakonska kiselina)		
3700-3100	3441,7	Vibracije istezanja O–H grupe iz kiseline i N–H grupe iz NiPAAm-a
3200-2800	2975,9	C–H istezanje iz PNiPAAm-a
1760-1690	1720,0	Vibracije istezanja karbonilne grupe
1650	1660,0	Amidna traka I iz NiPAAm-a
1577	1543,0	Amidna traka II iz NiPAAm-a
1380	1387,1	Vibracije istezanja C–H veze iz izopropil grupe
1177	1174,0	Amidna traka III iz NiPAAm-a

FT-IR spektri homo- i kopolimernih hidrogelova različitog sastava i stepena umreženja su prikazani na Slikama 4.1 a) i b).



**Slika 4.1.** FT-IR spektri sintetisanih hidrogelova sa a) 2,0 mas% MBA ((A) 85/15/2/0; (B) 90/10/2/0; (C) 95/5/2/0 i (D) 100/0/2/0) i b) 4,0 mas% MBA ((E) 85/15/4/0; (F) 90/10/4/0; (G) 95/5/4/0 i (H) 100/0/4/0).

FT-IR spektri svih hidrogelova su međusobno slični. Svaki spektar pokazuje široku traku u oblasti od  $3700\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$  što odgovara O–H vibracijama istežanja grupa karboksilne kiseline iz itakonske kiseline i N–H vibraciji istežanja NiPAAm-a. Pik na  $1720\text{ cm}^{-1}$  potiče od tipične vibracije karbonilne grupe iz itakonske kiseline<sup>181</sup>. Karakteristična amidna traka I i amidna traka II NiPAAm-a se javljaju oko  $1650\text{ cm}^{-1}$  i  $1540\text{ cm}^{-1}$ , redom.

Dve tipične trake C–H vibracija skoro istih intenziteta oko 1386 i 1379 cm<sup>-1</sup> potiču od vibracija istezanja C–H veze iz CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> grupe. Traka oko 1174 cm<sup>-1</sup> potiče od amidne trake III iz PNiPAAm-a<sup>182</sup>. Karakteristične trake u FT-IR spektrima hidrogelova odgovaraju apsorpcionim trakama karakterističnim za homopolimere poli(itakonske kiseline) i poli(*N*-izopropilakrilamida), ali su pomerene u odnosu na talasne brojeve čistih polimera zbog reakcije umrežavanja i obrazovanja hidrogela.

#### 4.1.2. Umetanje lipaze iz *Candida rugosa* u hidrogelove *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline

Imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* je izvedena na dva načina. Prvi način je imobilizacija dodavanjem lipaze u reakcionu smešu pre izvođenja reakcije polimerizacije i umrežavanja („*in situ*“ polimerizacija – Metoda I). Drugi način imobilizacije je izveden bubrenjem do ravnoteže prethodno sintetisanih suvih gelova (kserogelova) u rastvoru lipaze određene koncentracije, pri određenoj pH vrednosti i temperaturi („imobilizacija bubrenjem“ – Metoda II).

U oba slučaja je određena masa neproreagovalih materija i stepen reagovanja. Masa neproreagovalih materija je bila od 0,0155 g za uzorak 100/0/2/20 (1,25 % početne mase reakcione smeše) i stepenom reagovanja od 98,8 % do 0,0995 g za uzorak 90/10/4/20 (7,90 % početne reakcione smeše) i stepenom reagovanja 92,1 %. Prosečan stepen reagovanja za sve hidrogelove sintetisane sa enzimom iznosio je  $94,94 \pm 2,16$  %.

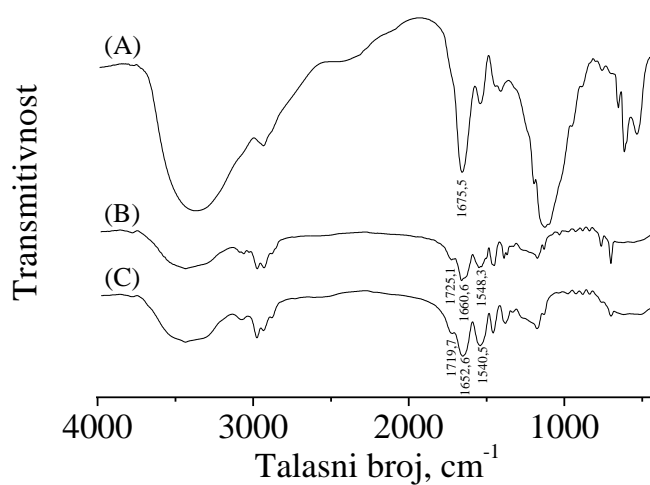
Prisustvo lipaze u reakcionoj smeši utiče na stepen reagovanja, jer se u prisustvu lipaze dobijaju nešto niži stepeni reagovanja nego kada se sinteza izvodi bez lipaze. Na osnovu toga se može zaključiti da lipaza u maloj meri ometa reakciju polimerizacije/umrežavanja (Tabela T1, Prilog). Uočava se takođe da porast stepena umreženja utiče na stepen reagovanja, tako da sa porastom sadržaja umreživača raste i stepen reagovanja, što je i očekivano.

#### 4.1.3. FT-IR analiza imobilisanih sistema

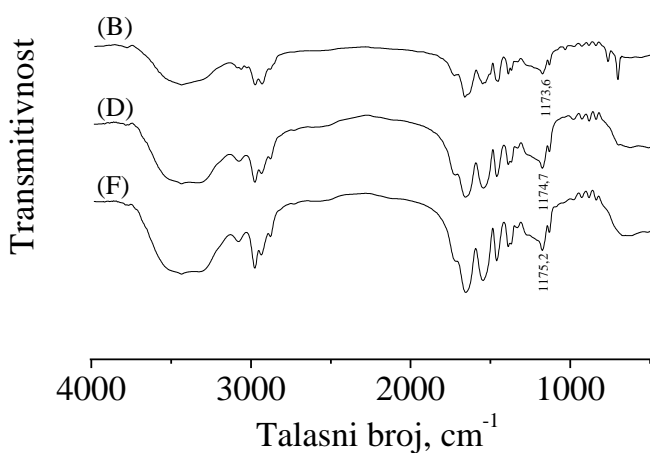
Na Slikama 4.2 prikazani su FT-IR spektri slobodne lipaze i hidrogelova sa imobilisanom lipazom koji su takođe slični. Glavne trake usled vibracije peptidne grupe se

javljaju u opsegu  $1900-1200\text{ cm}^{-1}$  <sup>183</sup>: amidna traka I ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) potiče od C=O vibracija istezanja ( $1657,5\text{ cm}^{-1}$ ) i amidna traka II ( $1580-1510\text{ cm}^{-1}$ ) usled N–H savijanja zajedno sa doprinosom C–N vibracija istezanja, nešto slabijeg intenziteta. Amidna traka III se javlja na  $1400-1200\text{ cm}^{-1}$ , usled N–H savijanja, C–C $\alpha$  i C–N vibracija istezanja <sup>184</sup>.

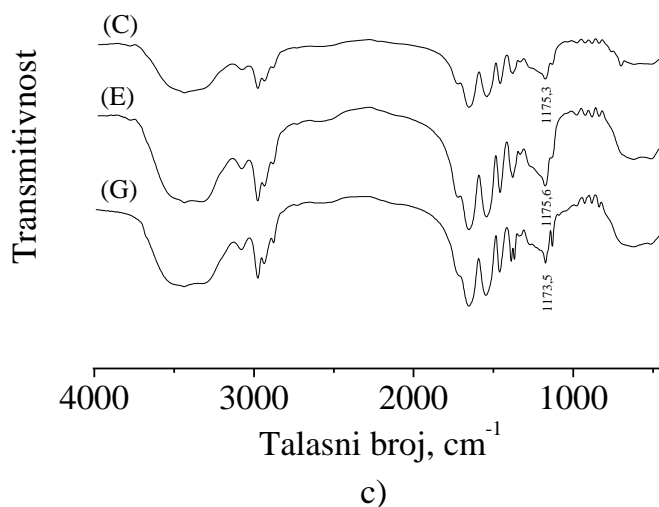
U spektrima hidrogelova sa imobilisanom lipazom se javlja amidna traka III, karakteristična za lipazu, ali je slabijeg intenziteta i pomerena ka nižim talasnim dužinama nego u spektru slobodne lipaze (pik na  $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ ), što je posledica imobilizacije lipaze u hidrogel. Takođe, u svim spektrima hidrogelova sa imobilisanom lipazom uočene su karakteristične trake koje potiču iz itakonske kiseline i NiPAAm-a <sup>181,185,186</sup>.



a)



b)



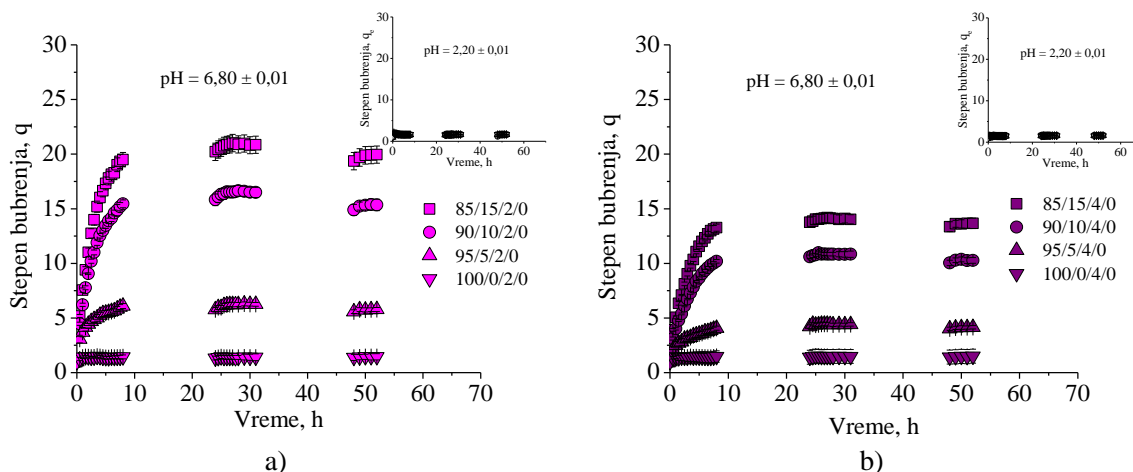
**Slika 4.2.** FT-IR spektri slobodne lipaze (A), hidrogelova bez lipaze: 90/10/2/0 (B) i 90/10/4/0 (C); i hidrogelova sa lipazom: 90/10/2/2 (D), 90/10/4/2 (E), 90/10/2/20 (F), 90/10/4/20 (G). Spektri ostalih hidrogelova su dati u Prilogu.

## 4.2. Bubrenje hidrogelova

### 4.2.1. Ispitivanje kinetike bubrenja hidrogelova

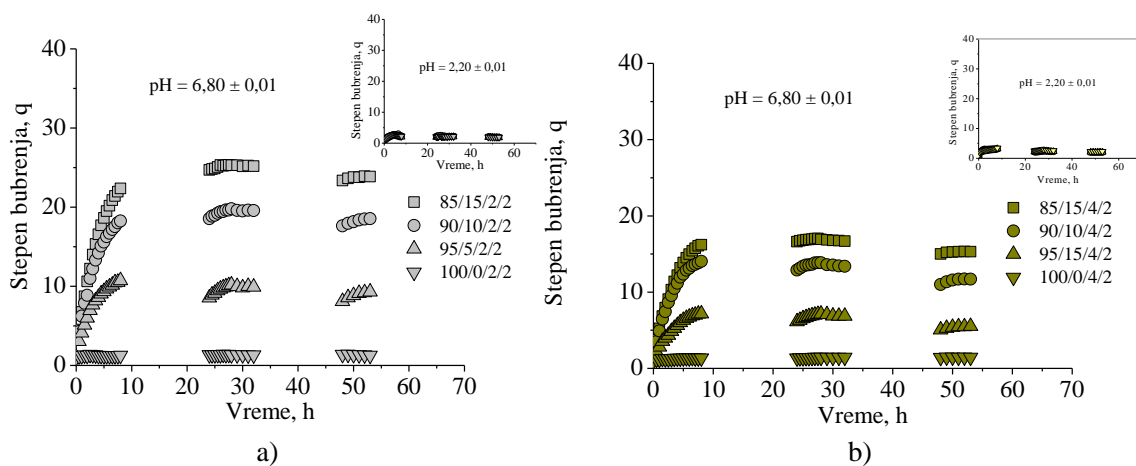
Bubrenje uzoraka praćeno je na 37 °C u rastvorima čija je pH vrednost iznosila  $2,20 \pm 0,01$  i  $6,80 \pm 0,01$  da bi se utvrdio uticaj pH na kinetiku bubrenja. Svi rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja (Slika 4.3). Standardna devijacija svih merenja je bila  $\pm 10\%$  od srednjih vrednosti, što ukazuje na veoma dobru reproduktivnost rezultata. Merena je masa hidrogelova do uspostavljanja ravnoteže kada prestaje upijanje rastvora, a zatim je određen ravnotežni stepen bubrenja (Tabela 4.2).



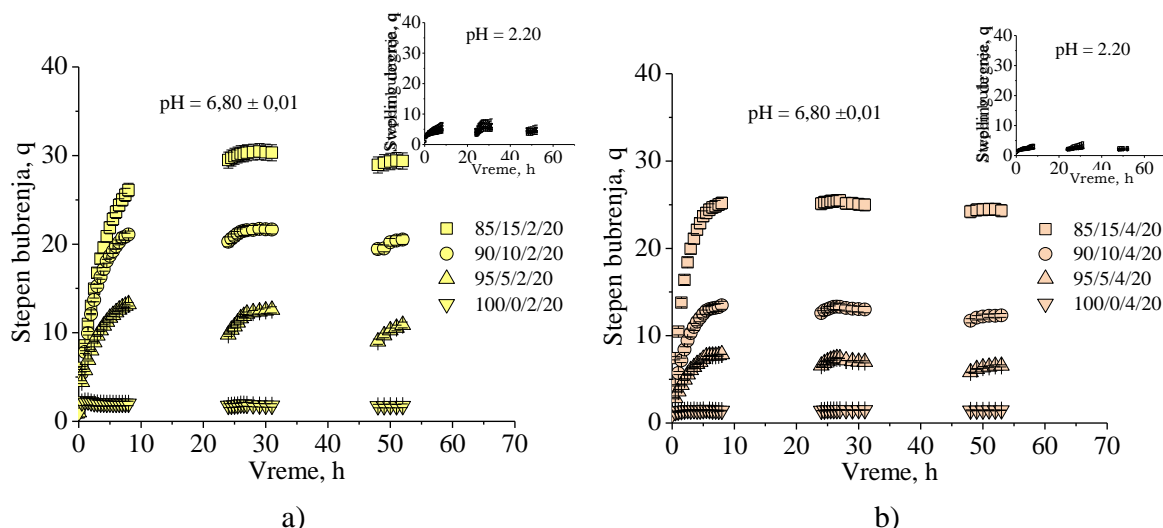


**Slika 4.3.** Uticaj stepena umreženja, sadržaja itakonske kiseline i pH rastvora na stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova sintetisanih bez lipaze: a) 2,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH=2,20) i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20).

Na Slici 4.4 su prikazani rezultati bubrenja uzoraka sa 2,0 mas% lipaze, a na Slici 4.5 rezultati bubrenja uzoraka sa 20,0 mas% lipaze.



**Slika 4.4.** Uticaj stepena umreženja, sadržaja itakonske kiseline i pH rastvora na stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova sintetisanih sa 2,0 mas% lipaze: a) 2,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20) i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20).



**Slika 4.5.** Uticaj stepena umreženja, sadržaja itakonske kiseline i pH rastvora na stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova sintetisanih sa 20,0 mas% lipaze: a) 2,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20) i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C: pH = 6,80 (mali dijagram u pH = 2,20).

Rezultati sa Slika 4.3-4.5 pokazuju izuzetno veliku pH-osetljivost P(NiPAAm/IK) hidrogelova. Pri niskim pH vrednostima (pH 2,20), stepen bubrenja ovih hidrogelova je mali i praktično ne zavisi od sadržaja itakonske kiseline.

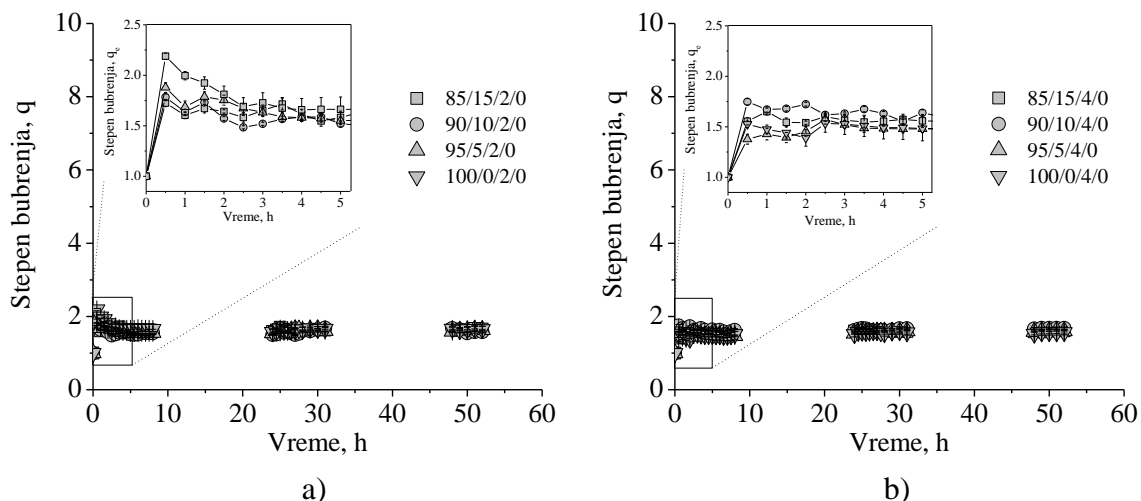
S obzirom da je ispitivanje bubrenja izvedeno na temperaturi koja je viša od LCST za poli(*N*-izopropilakrilamid), ova komponenta hidrogela je potpuno kontrahovana. Sa druge strane, pH vrednost od 2,20, na kojoj je praćeno bubrenje, je niža od obe  $pK_a$  vrednosti itakonske kiseline što takođe doprinosi smanjenju stepena bubrenja, koje ima skoro istu vrednost kod svih ispitivanih uzoraka. Uzrok tome je prisustvo nejonzovanih karboksilnih grupa itakonske kiseline sposobnih da stvaraju vodonične veze sa amidnim grupama iz NiPAAm-a koje deluju kao dodatno, fizičko, umreženje<sup>187,188</sup>. Pošto su interakcije preko vodoničnih veza u čistom hidrogelu poli(*N*-izopropilakrilamid)-a (100/0/4/0) manje zastupljene od vodoničnih veza u kopolimernim hidrogelovima, očekivano je da najviše bubre uzorci čistog poli(*N*-izopropilakrilamid)-a, što se vidi na Slikama 4.3 i 4.13.

Prisustvo lipaze utiče na stepen bubrenja tako da je kod uzoraka sa većim procentom lipaze bubrenje izraženije, a ravnotežni stepen bubrenja veći (Slike 4.7 i 4.8). To se može objasniti činjenicom da su molekuli lipaze veliki i da pri sintezi ometaju formiranje pravilne polimerne mreže u onoj meri u kojoj bi se mreža bez lipaze formirala. Samim tim što je stepen umreženja manji, veća je mogućnost bubrenja.

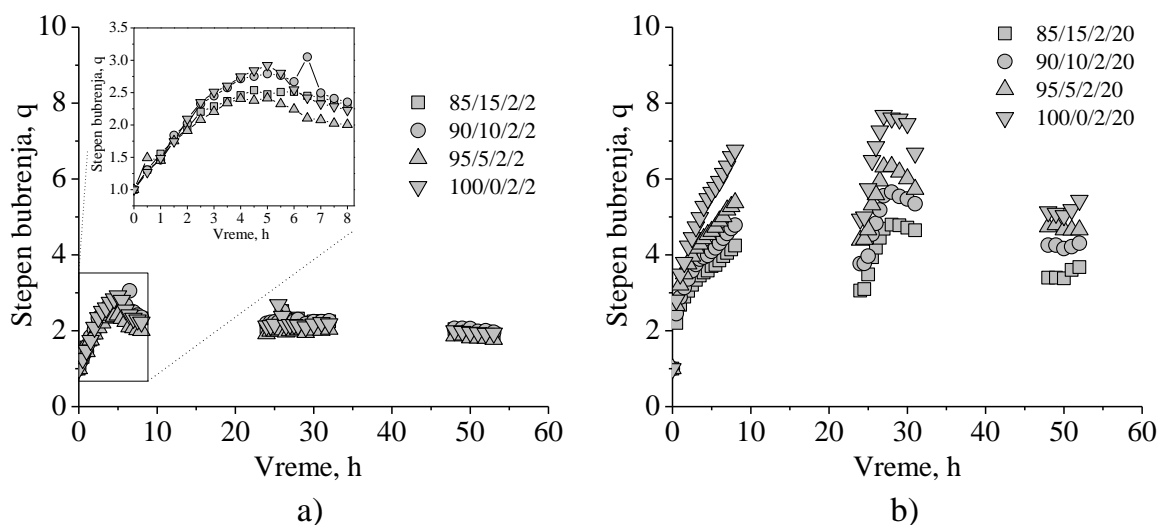
Poređenjem prikazanih rezultata uočeno je da kod polimera sa istim sadržajem lipaze, najmanje bubre uzorci bez itakonske kiseline, a da ravnotežni stepen bubrenja raste sa povećanjem sadržaja itakonske kiseline (Slike 4.6-4.8). Ovo se objašnjava činjenicom da je bubrenje ispitivano na pH vrednosti koja je veća od  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$  itakonske kiseline ( $pK_{a1}=3,85$  i  $pK_{a2}=5,45$ )<sup>189</sup> tako da su obe karboksilne grupe jonizovane, pa je i hidrofilnost polimerne mreže veća. Sa druge strane, jonizacija ovih grupa povećava gustinu naelektrisanja i dolazi do odbijanja istoimeno naelektrisanih  $COO^-$  jona što dovodi do povećanja zapremine hidrogela.

#### 4.2.2. „Overshooting“ efekat

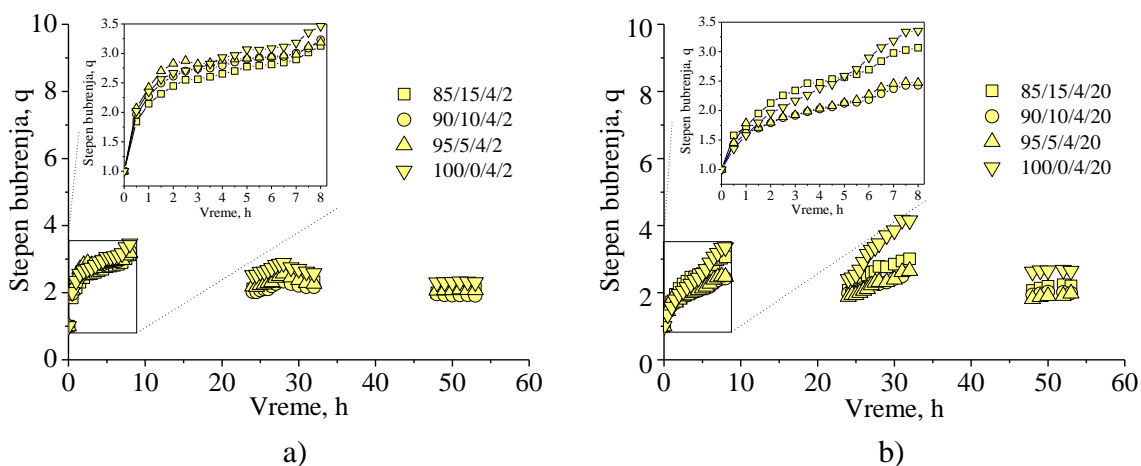
Pri bubrenju na pH 2,20 (Slika 4.3 a) i b) (mali dijagram) i Slike 4.6-4.8) dolazi do pojave tzv. „overshooting“ efekta. Na početku procesa, stepen bubrenja za kratko vreme dostiže maksimalnu vrednost, a zatim opada do ravnotežne vrednosti. „Overshooting“ efekat je opisan u velikom broju naučnih radova, ali ne postoji sveobuhvatno objašnjenje zbog velikog broja faktora koji utiču na ovu pojavu.



**Slika 4.6.** „Overshooting“ efekat kod hidrogelova sintetisanih bez lipaze sa a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača, pri  $pH = 2,20 \pm 0,01$  i temperaturi od  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .



**Slika 4.7.** „Overshooting“ efekat za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 2,0 mas% umreživača i a) 2,0 mas% i b) 20,0 mas% lipaze na  $\text{pH} = 2,20 \pm 0,01$  i temperaturi od  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Slika 4.8.** „Overshooting“ efekat za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 4,0 mas% umreživača i a) 2,0 mas% i b) 20,0 mas% lipaze na  $\text{pH} = 2,20 \pm 0,01$  i temperaturi od  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Jedno od mogućih objašnjenja „overshooting“ efekta dala je teorija ravnotežnog bubrenja. Na osnovu ove teorije proces bubrenja hidrogelova se može izraziti preko Gibsove slobodne energije koja je jednaka zbiru doprinosa Gibsovoj energiji koji potiču od spontanog mešanja molekula fluida sa polimernim lancima,  $\Delta G_m$ , doprinosa elastične sile otpora unutar hidrogela,  $\Delta G_{el}$ , i doprinosa usled prisustva jonskih grupa, koji se javlja kod jonskih hidrogelova,  $\Delta G_j$ <sup>187</sup>:

$$\Delta G = \Delta G_m + \Delta G_{el} + \Delta G_j \quad (10)$$

Kod nejonskih hidrogelova, na početku procesa bubrenja broj molekula rastvarača u gelu je mali, a njihov doprinos članu  $\Delta G_m$  je značajan jer je to pogonska sila za bubrenje, pa se bubrenje odvija normalno. Sa povećanjem broja molekula rastvarača u hidrogelu član  $\Delta G_m$  raste, ali se smanjuje mogućnost bubrenja zbog mešanja fluida sa polimernim lancima. Kada broj molekula rastvarača dostigne kritičnu vrednost, prestaje bubrenje, a stepen bubrenja opada do ravnotežne vrednosti koja zavisi od člana  $\Delta G_{el}$ <sup>187</sup>.

Objašnjenje bubrenja jonskih hidrogelova je znatno složenije zbog uticaja člana  $\Delta G_j$  koji zavisi od udela jonskog monomera u hidrogelu i pH vrednosti rastvora.

Drugo moguće objašnjenje „overshooting“ efekta je obrazovanje interpolimernih kompleksa između monomera koji grade hidrogel preko vodoničnih veza. Stabilnošću ovih veza u kiseloj sredini objašnjava se pojava „overshooting“ efekta na nižim pH vrednostima, a raskidanjem vodoničnih veza njegovo nestajanje na višim pH vrednostima<sup>187</sup>.

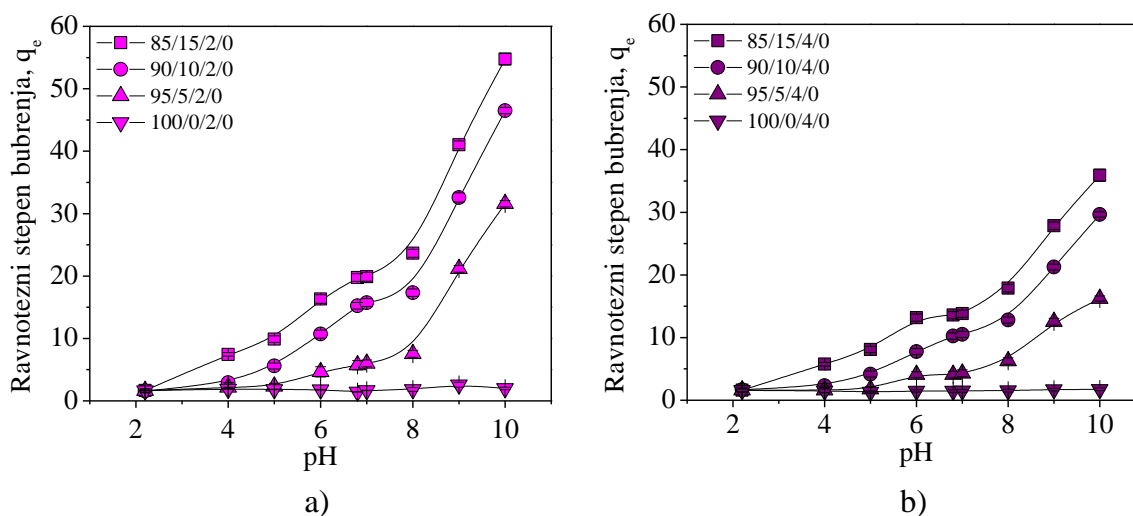
Na pH 6,80 jonizacija obe karboksilne grupe itakonske kiseline je skoro potpuna ( $pK_a$  vrednosti itakonske kiseline su 3,85 i 5,45<sup>189</sup>), pa dolazi do raskidanja vodoničnih veza. Karboksilatne grupe daju hidrogelu anjonski karakter i tako utiču na stepen bubrenja, koji se znatno povećava usled elektrostatičkog odbijanja nastalih  $COO^-$  grupa. Osim toga, pri jonizaciji  $COOH$  grupa dolazi i do porasta hidrofilitnosti sistema, jer su  $COO^-$  grupe hidrofiličnije od  $COOH$  grupa. Kao posledica ova tri efekta javlja se značajno povećanje stepena bubrenja u odnosu na vrednosti dobijene pri bubrenju u rastvoru pH 2,20, pa se na osnovu toga može zaključiti da su P(NiPAAm/IK) hidrogelovi pH-osetljivi. Razlika u stepenu bubrenja na pH 2,2 i 6,80 je najviše izražena kod uzoraka sa najvećim sadržajem itakonske kiseline, što pokazuje da sa povećanjem sadržaja IK raste stepen bubrenja. Dalje, pri pH 6,80 najveći stepen bubrenja imaju uzorci sa najvećim sadržajem lipaze (Slike 4.10 a) i 4.12 a)). Prisustvo lipaze utiče na stepen bubrenja tako da je kod uzoraka sa većim procentom lipaze bubrenje izraženije, a ravnotežni stepen bubrenja veći. To se može objasniti činjenicom da su molekuli lipaze veliki i da pri sintezi ometaju formiranje polimerne mreže u onoj meri u kojoj bi se mreža bez lipaze formirala, tako da je slobodna zapremina u gelu veća, kao i zapremina rastvarača koju gel može da upije.

Razlike u bubrenju su izraženije kod uzoraka sa 2,0 mas% umreživača, što ukazuje da i stepen umreženja utiče na kinetiku i stepen bubrenja P(NiPAAm/IK) hidrogelova. To je i očekivano jer je zbog veće gustine umreženja manja fleksibilnost lanaca, kao i slobodna zapremina u polimernoj mreži.

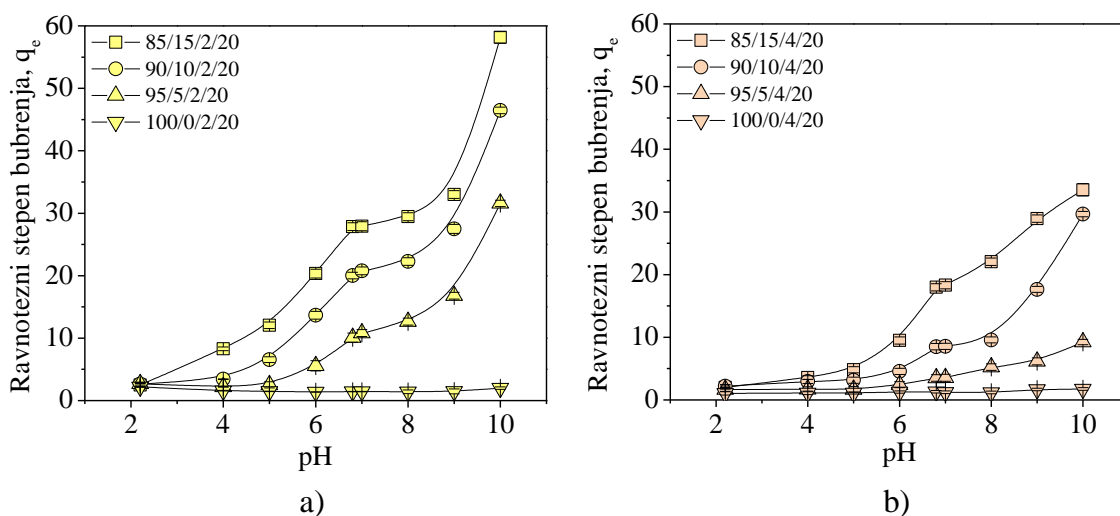
### 4.2.3. Uticaj pH i temperature na bubrenje

U cilju ispitivanja osetljivosti hidrogelova na promenu temperature i pH okolnog medijuma, stepen bubrenja u funkciji pH vrednosti okolnog rastvora (u opsegu od 2,20 do 10,0) na 37 °C, je prikazan na Slici 4.9, a na Slici 4.11 stepen bubrenja u funkciji temperature (u opsegu od 5 do 65 °C), na pH  $6,80 \pm 0,01$ . Takođe, stepen bubrenja u funkciji pH vrednosti okolnog rastvora na 37 °C za uzorke sa 20,0 mas% lipaze, je prikazan na Slici 4.10, a u funkciji temperature, pH  $6,80 \pm 0,01$ , na Slici 4.12.

Vrednosti za pH, od 2,20 do 10,0 su odabrane tako da pokrivaju pH vrednosti ispod i iznad  $pK_a$  vrednosti itakonske kiseline ( $pK_{a1} = 3,85$ ,  $pK_{a2} = 5,45$ ). Ravnotežni stepeni bubrenja ( $q_e$ ) prikazani su u Tabeli 4.2 (za uzorke bez lipaze) i u Tabeli 4.3 (za uzorke sa lipazom). Kako je temperatura bubrenja (37 °C) iznad LCST vrednost PNiPAAM-a (32 °C)<sup>142</sup>, ova komponenta je kontrahovana u svim uzorcima. Sa Slika 4.9-4.12 se jasno vidi da promena pH i temperature bitno utiču na stepen bubrenja hidrogelova, kako je i očekivano.

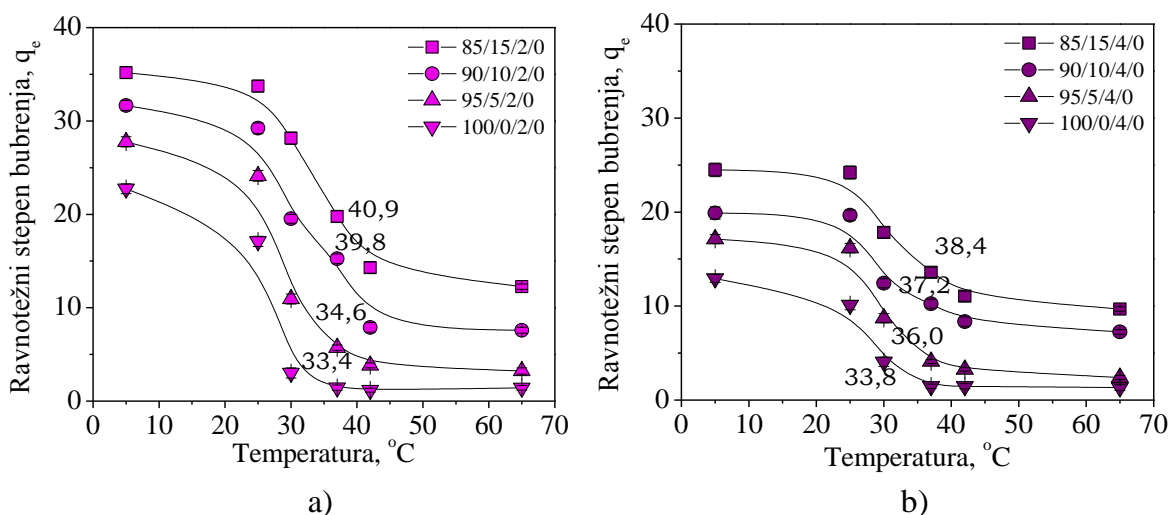


**Slika 4.9.** Ravnotežni stepen bubrenja ispitivanih hidrogelova bez lipaze sa a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C u puferima različitih pH vrednosti.

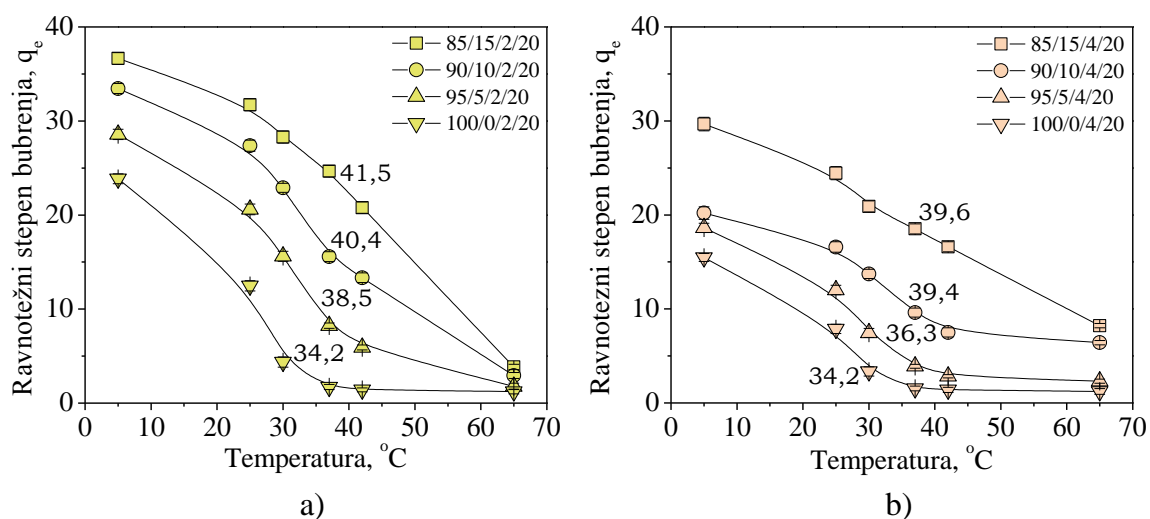


**Slika 4.10.** Ravnotežni stepen bubrenja ispitivanih hidrogelova sa 20,0 mas% lipaze i a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača na 37 °C u puferima različitih pH vrednosti.

pH osetljivost hidrogelova sa manjim sadržajem umreživača, 2,0 mas%, (Slike 4.9 i 4.10) je jako izražena, kako kod uzoraka bez lipaze, tako i kod uzoraka sa 20,0 mas% lipaze. Uzorci sintetisani sa većim udelom umreživača (4,0 mas%) imaju manji stepen bubrenja, pa je i pH osetljivost ovih hidrogelova slabije izražena. LCST prelaz se može odrediti iz prevojne tačke krive bubrenja. Dodatak malog sadržaja itakonske kiseline u PNiPAAM lanac pomera LCST vrednosti usled jonizacije karboksilne grupe. Na Slikama 4.9 i 4.10 se može zapaziti da dodatak itakonske kiseline pomera fazni prelaz ka višim vrednostima pH, kao i da je jasnije izražen u uzorcima sa većim udelom IK.



**Slika 4.11.** Ravnotežni stepen bubrenja ispitivanih hidrogelova bez lipaze sa a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača na različitim temperaturama u pH = 6,80 ± 0,01.



**Slika 4.12.** Ravnotežni stepen bubrenja ispitivanih hidrogelova sa 20,0 mas% lipaze i a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača na različitim temperaturama u  $\text{pH} = 6,80 \pm 0,01$ .

Što se tiče temperaturne osetljivosti, vidi se da je mnogo bolje izražena u uzorcima bez lipaze, bez obzira na sadržaj umreživača i IK. Kod uzoraka sa 20,0 mas% lipaze temperaturna osetljivost stepena bubrenja postoji za oba sadržaja umreživača, ali je nešto slabije izražena nego kod uzoraka sintetisanih bez lipaze. To je naročito uočljivo kod uzoraka sa većim sadržajem itakonske kiseline, dok su stepeni bubrenja niži u slučaju uzoraka sintetisanih sa većim udelom umreživača (4,0 mas%). Takođe je očigledno da dodatak itakonske kiseline pomera LCST ka višim temperaturama što je i očekivano pri  $\text{pH} 6,80$ , i da je opseg faznog prelaza širi u odnosu na fazni prelaz kod homopolimera (Slike 4.11 i 4.12).

Na niskim temperaturama (Slika 4.11 i 4.12), ispod LCST PNiPAAm-a, stepena bubrenja je veliki što je rezultat dva efekta: vodoničnih veza između molekula vode i PNiPAAm ostataka u hidrogelovima koji ih čine hidrofilnim, i elektrostatičkog odbijanja  $\text{COO}^-$  grupa itakonske kiseline, koje je više izraženo za uzorke sa većim sadržajem itakonske kiseline. Kako temperatura okruženja raste iznad LCST vrednosti za PNiPAAm, vodonične veze između vode i PNiPAAm-a se raskidaju, PNiPAAm komponenta u hidrogelovima postaje hidrofobna i kontrahuje se, što snižava vrednosti za  $q_e$ . Ovaj efekat je najviše izražen u uzorcima homopolimera. Imajući u vidu da je PNiPAAm-a dominantna komponenta u kopolimernim hidrogelovima, od 95,0 do 85,0 mas%, na temperaturama iznad LCST ovi hidrogelovi su hidrofobni i apsorbuju manje vode, što je u skladu sa podacima iz literature<sup>3,142,190,191</sup>.

$\text{pH}$ /temperaturna osetljivost P(NiPAAm/IK) hidrogelova se pripisuje uticaju koji jonizacija karboksilne grupe (koja zavisi od  $\text{pH}$ ) ima na LCST prelaz PNiPAAm-a (Slika



4.12). Sa Slika 4.10 i 4.12 jasno se vidi da promena pH i temperature bitno utiču na stepen bubrenja hidrogelova, što je i očekivano.

### 4.3. Određivanje parametara mreže

Parametri mreže, zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju,  $v_{2,s}$  (Tabela T2, Prilog), molekulska masa polimernih lanaca između dve tačke umreženja,  $M_c$ , veličina pora,  $\xi$ , i parametar interakcije polimer-rastvarač,  $\chi$ , su određeni primenom teorije ravnotežnog bubrenja. Dobijeni rezultati za hidrogelove bez lipaze su prikazani u Tabeli 4.2.

**Tabela 4.2.** Ravnotežni stepen bubrenja, parametri mreže i parametar interakcije za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 2,0 i 4,0 mas% umreživača na 37 °C.

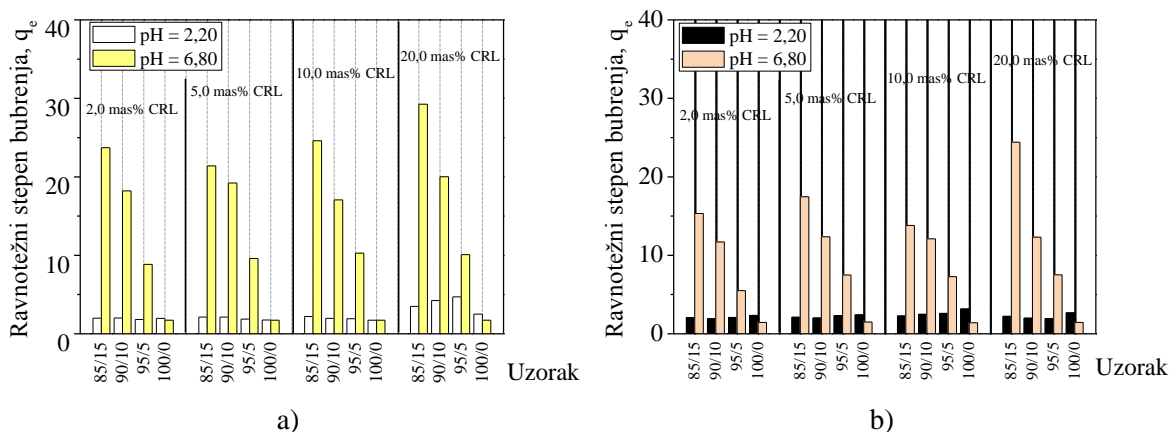
Uzorak	<i>pH = 2,20 ± 0,01</i>				<i>pH = 6,80 ± 0,01</i>			
	$q_e$	$M_c$ , g/mol	$\xi$ , nm	$\chi$	$q_e$	$M_c$ , g/mol	$\xi$ , nm	$\chi$
85/15/2/0	1,64	5,19	0,18	0,889	19,8	113,72	1,90	0,518
90/10/2/0	1,50	3,85	0,15	0,969	15,2	85,82	1,55	0,523
95/5/2/0	1,62	4,82	0,18	0,900	5,72	30,06	0,67	0,567
100/0/2/0	1,65	4,19	0,17	0,887	1,44	4,40	0,17	1,022
85/15/4/0	1,59	5,03	0,17	0,917	13,6	76,91	1,48	0,526
90/10/4/0	1,68	5,52	0,19	0,873	10,2	56,39	1,10	0,535
95/5/4/0	1,60	5,19	0,18	0,911	4,10	20,39	0,53	0,600
100/0/4/0	1,56	4,40	0,19	0,935	1,47	4,61	0,17	0,997

Na osnovu rezultata iz Tabele 4.2 jasno se uočava da postoji velika razlika u parametrima mreže sa promenom sastava hidrogelova i pH vrednosti okolnog rastvora. Pri pH vrednosti sredine od 2,20 vrednosti za  $M_c$  i veličinu pora su uglavnom slične bez obzira na sadržaj IK unutar serija, što je naročito izraženo kod uzoraka sa većim sadržajem umreživača. Vrednosti parametara interakcije polimer-rastvarač su visoke i nema velikih

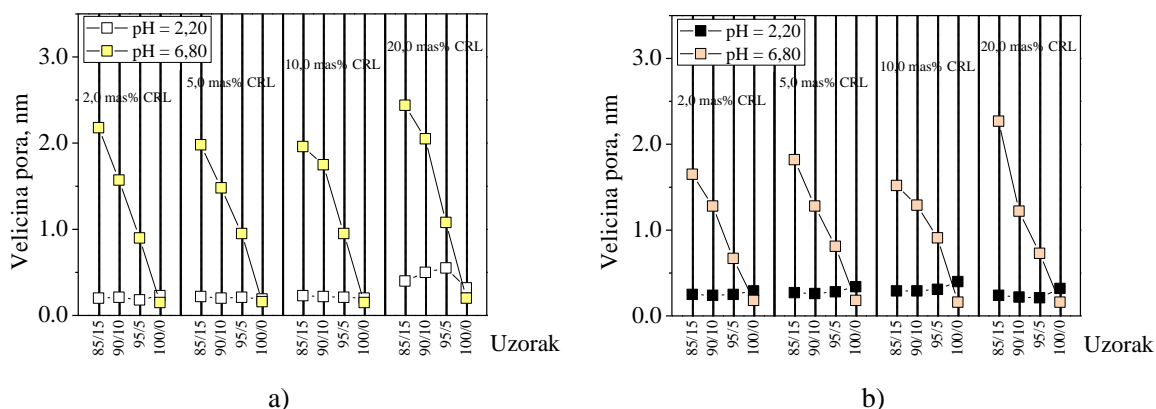
razlika između njihovih vrednosti za kopolimere i homopolimere. To je posledica velike hidrofobnosti svih uzoraka, što se ogleda i u niskim vrednostima za stepen bubrenja.

Pri pH vrednosti 6,80 je situacija drugačija. Veličina pora i  $M_c$  su znatno veće u poređenju sa vrednostima u puferu pH vrednosti 2,20 i rastu sa porastom sadržaja itakonske kiseline, što je objašnjeno u poglavlju o bubrenju (Poglavlje 4.2.1.). Dalje, uočeno je da su vrednosti za parametar interakcije polimer-rastvarač u svim slučajevima znatno niže u poređenju sa vrednostima dobijenim u puferu pH vrednosti 2,20, što ukazuje da je stepen bubrenja hidrogelova veći. Takođe, vrednosti  $\chi$  su mnogo veće za homopolimere nego za kopolimerne hidrogelove zbog hidrofobnog karaktera PNiPAAm-a. Parametar interakcije polimer-rastvarač opada kako raste sadržaj itakonske kiseline.

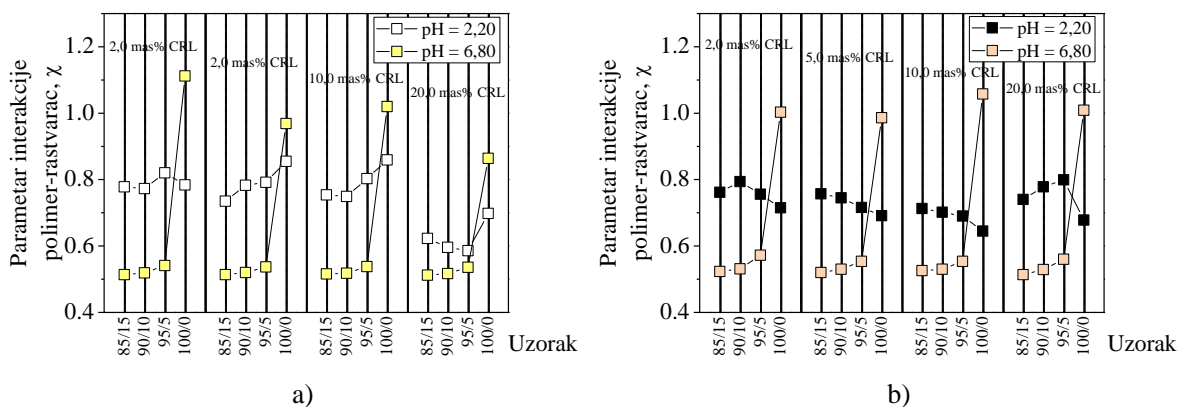
Rezultati parametara mreže za hidrogelove sa lipazom su prikazani na Slikama 4.13-4.16.



**Slika 4.13.** Ravnotežni stepen bubrenja za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 i b) 4,0 mas% umreživača na  $\text{pH} = 2,20 \pm 0,01$  i  $6,80 \pm 0,01$ .

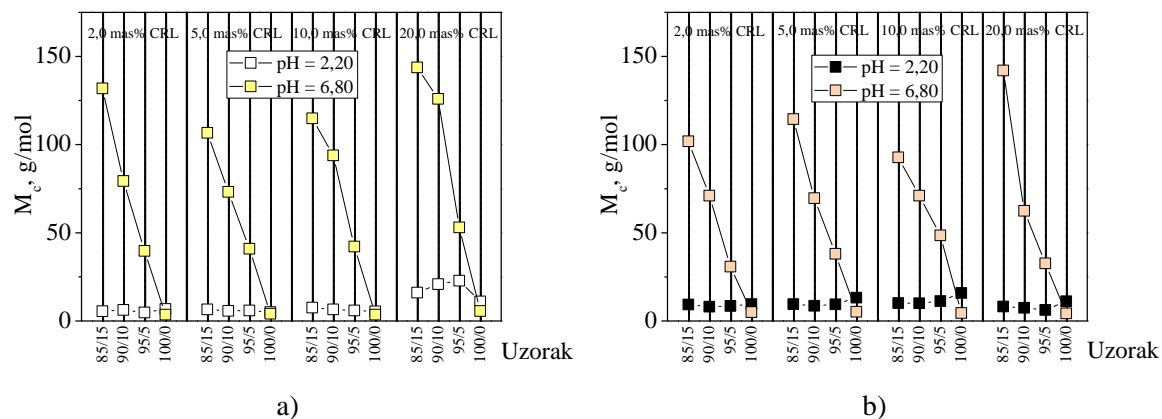


**Slika 4.14.** Veličina pora za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 i b) 4,0 mas% umreživača i različitim sadržajem CRL na  $\text{pH} = 2,20 \pm 0,01$  i  $6,80 \pm 0,01$ .



**Slika 4.15.** Parametar interakcije polimer-rastvarač za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 i b) 4,0 mas% umreživača na pH = 2,20 ± 0,01 i 6,80 ± 0,01.

Na osnovu rezultata sa Slike 4.15 može se zaključiti da porast sadržaja lipaze slabi interakcije polimer-rastvarač za uzorke sa 2,0, 5,0 i 10,0 mas% lipaze. Uzorci sa 20,0 mas% lipaze imaju veće vrednosti parametra interakcije. Najmanje vrednosti parametra interakcije imaju uzorci homopolimera, u okviru serija sa istim sadržajem enzima. Kao što se i očekuje, vrednosti parametra interakcije su niže kada uzorak više bubri.



**Slika 4.16.** Molekulska masa polimernih lanaca između dve tačke umreženja za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 i b) 4,0 mas% umreživača na pH = 2,20 ± 0,01 i 6,80 ± 0,01.

U puferu pH vrednosti 2,20, vrednosti za zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju rastu sa porastom sadržaja lipaze i umreživača u svim uzorcima. Sa porastom sadržaja itakonske kiseline  $v_{2,s}$  se smanjuje, osim za homopolimerne uzorke, što je i očekivano (Tabela T2, Prilog).

Prikazani rezultati na Slikama 4.13-4.16 pokazuju da je uticaj lipaze na ponašanje hidrogelova u puferima pH vrednosti 6,80 kompleksan. Sa promenom sadržaja lipaze  $M_c$  vrednosti se menjaju u skladu sa bubrenjem, kao posledica uticaja veličine molekula lipaze na strukturu hidrogela. Glomazan, globularan molekul lipaze se ponaša kao fizička smetnja pravilnom formiranju mreže što dovodi do formiranja većih pora unutar mreže tokom procesa polimerizacije i/ili umrežavanja. Takođe, sa porastom sadržaja kiseline  $M_c$  raste za uzorke sa istim sadržajem lipaze, što je u skladu sa rezultatima bubrenja. Razlike u  $\chi$  usled promena u sadržaju lipaze su praktično zanemarive za sve kopolimere ( $STD \leq 3\%$ ). Parametar interakcije polimer-rastvarač opada kako raste sadržaj itakonske kiseline.

Poređenjem rezultata parametara mreže na pH 2,20 i 6,80 vidi se da su  $M_c$  vrednosti svih kopolimera značajno veće na višim pH vrednostima. Za homopolimere rezultat je suprotan. To pokazuje uticaj strukture i sastava nosača, odnosno njegovog naelektrisanja, na vrednosti za  $M_c$ <sup>8</sup>. Kao rezultat, vrednosti veličine pora kopolimera na višim pH vrednostima su jako velike, dok za homopolimere važi suprotno. Ovi rezultati su takođe potvrđeni i preko parametra interakcije polimer-rastvarač čije vrednosti su za kopolimerne hidrogelove niže pri pH vrednosti 6,80, dok za homopolimerne hidrogelove važi suprotno.

U Tabeli 4.3 je prikazan uticaj temperature na veličinu pora. Veličina pora PNiPAAm hidrogela se smanjuje sa porastom temperature od 5 °C do 65 °C. Kako temperatura raste iznad LCST, PNiPAAm mreža se kontrahuje, a hidrofobne interakcije prevlađuju i smanjuju veličinu pora.

**Tabela 4.3.** Veličina pora P(NiPAAm/IK) hidrogelova sa 20,0 mas% lipaze na različitim temperaturama.

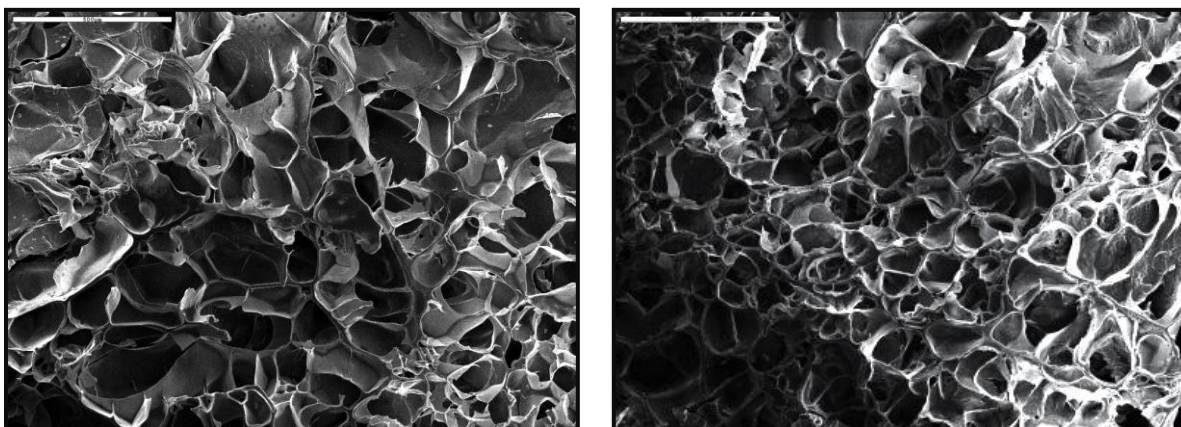
Temperatura, °C	$\xi$ , nm (2,0 mas% umreživača)				$\xi$ , nm (4,0 mas% umreživača)			
	85/15	90/10	95/5	100/0	85/15	90/10	95/5	100/0
	5	2,84	3,11	2,69	2,15	2,61	2,01	1,91
25	2,68	2,61	1,95	1,40	2,34	1,46	1,23	0,92
30	2,58	2,26	1,48	0,51	2,31	1,44	0,80	0,44
37	2,44	2,05	1,10	0,20	2,27	1,22	0,73	0,16
42	1,99	1,38	0,69	0,14	1,59	0,64	0,36	0,16
65	0,45	0,36	0,20	0,12	0,95	0,63	0,27	0,14

Prema veličini pora, svi hidrogelovi su podjeljeni u nekoliko kategorija: mikroporozni, makroporozni, neporozni i superporozni <sup>1</sup>. Hidrogelovi sintetisani u ovom radu pripadaju grupi neporoznih hidrogelova (od 1 do 100 nm).

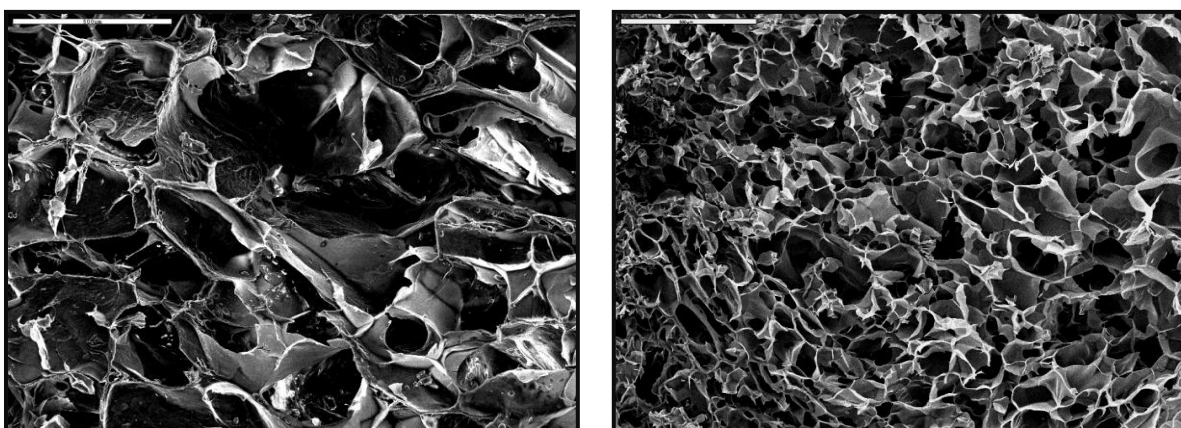
#### 4.4. SEM analiza

Slika 4.17 prikazuje morfologiju P(NiPAAm/IK) kopolimernih hidrogelova bez lipaze. Očigledno je da hidrogelovi imaju poroznu strukturu i da veličina pora zavisi od sastava hidrogela. Uticaj umreživača se može videti na Slici 4.17 a) koja prikazuje morfologiju uzoraka sa istim sadržajem monomera. Takođe, jasno se vidi i da dodatak itakonske kiseline utiče na veličinu pora sintetisanih hidrogelova jer su veće pore uočene za uzorke sa većim sadržajem kiseline a istog sadržaja umreživača (Slika 4.17 b)).

a)



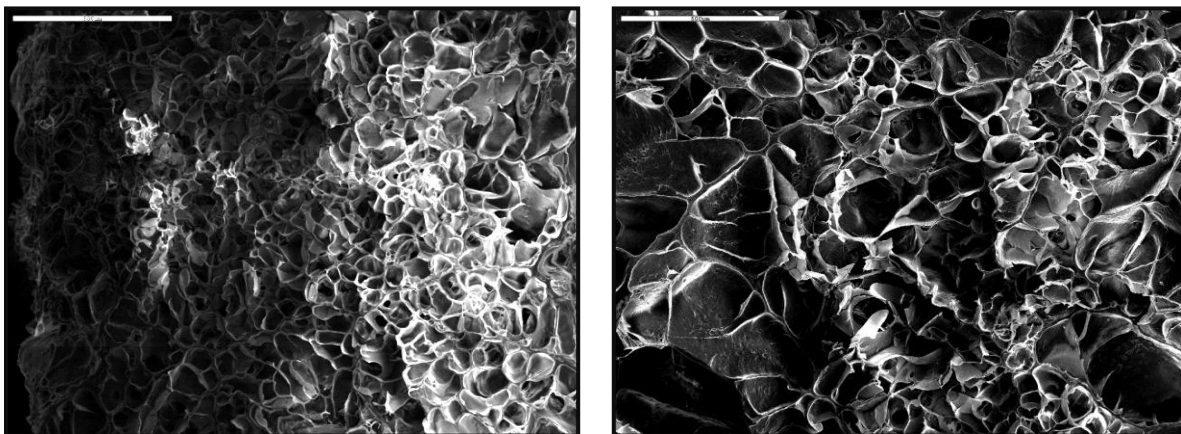
b)



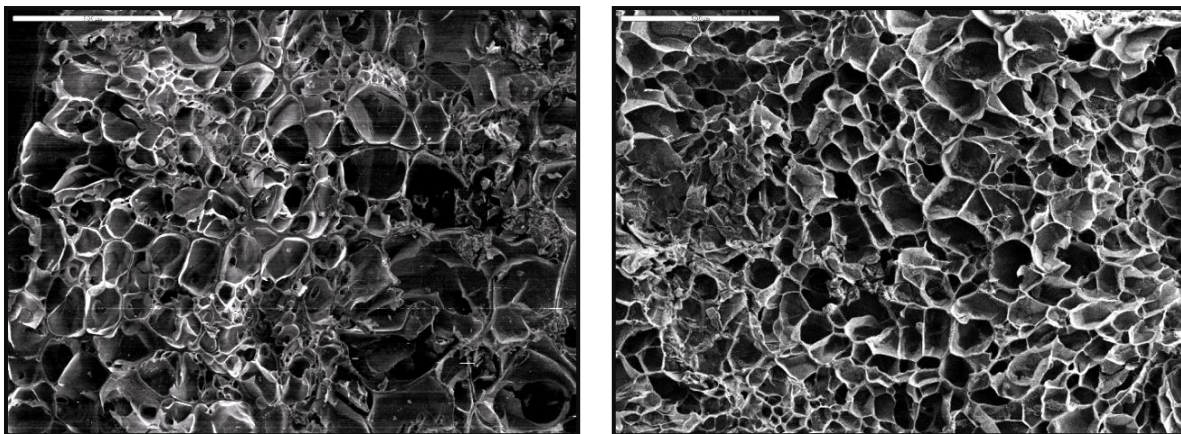
**Slika 4.17.** SEM mikrografije hidrogelova a) 90/10/2/0 (levo) i 90/10/4/0 (desno); b) 85/15/2/0 (levo) i 100/0/2/0 (desno) bubrenih do ravnoteže u pH  $6,80 \pm 0,01$  na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ('bar'  $500\text{ }\mu\text{m}$ , 70 x).

Slika 4.18 prikazuje morfologiju P(NiPAAm/IK) (90/10) kopolimernih hidrogelova sa lipazom, i to: 90/10/2/2 (Slika 4.18 a), levo), 90/10/2/20 (Slika 4.18 a), desno), 90/10/4/2 (Slika 4.18 b), levo) i 90/10/4/20 (Slika 4.18 b), desno) kod kojih se takođe vidi jasna razlika u veličini pora između uzoraka sa različitim stepenom umreženja (90/10/2/2 i 90/10/4/2). Razlika se javlja i između uzoraka koji imaju isti odnos komonomera i sadržaj umreživača, a različit sadržaj lipaze (90/10/2/2 i 90/10/2/20, odnosno 90/10/4/2 i 90/10/4/20). Hidrogelovi koji sadrže lipazu imaju veće pore, u odnosu na hidrogelove bez lipaze, što se jasno vidi ako se porede Slike 4.18-4.20 sa Slikom 4.17. Najveće pore su uočene kod uzorka sa nižim stepenom umreženja (2,0 mas%) i većim sadržajem lipaze (20,0 mas%), što je u skladu sa rezultatima bubrenja i sa podacima iz literature<sup>191</sup>.

a)

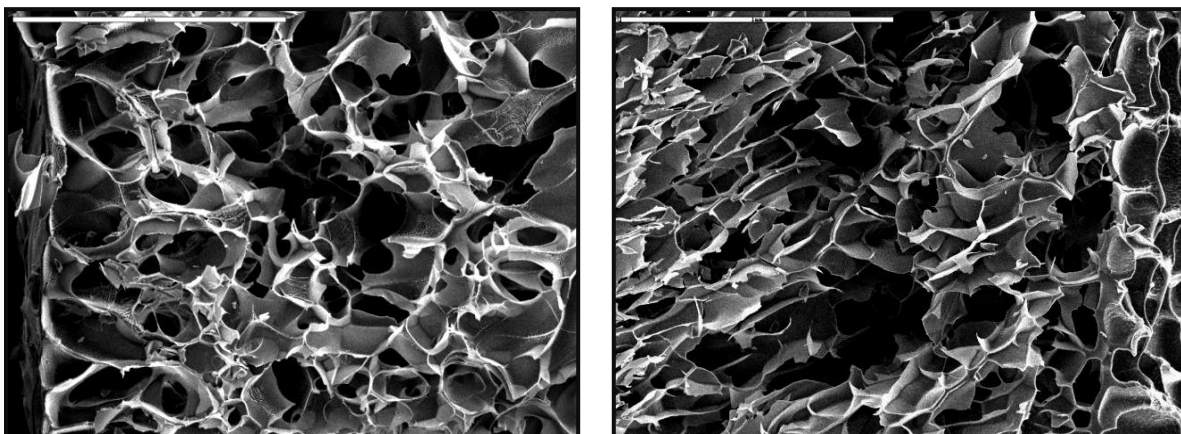


b)



**Slika 4.18.** SEM mikrografije kopolimernih hidrogelova a) 90/10/2/2 (levo) i 90/10/2/20 (desno); i b) 90/10/4/2 (levo) i 90/10/4/20 (desno), bubreni do ravnoteže u pH  $6,80 \pm 0,01$  na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ('bar'  $500\text{ }\mu\text{m}$ ,  $70\text{ x}$ ).

Dalje, Slike 4.19 a) i b) prikazuju morfologiju P(NiPAAm/IK) kopolimernih hidrogelova sa istim sadržajem lipaze (20,0 mas%) i sadržajem umreživača (4,0 mas%), ali sa različitim sadržajem itakonske kiseline od 0,0 i 15,0 mas% IK bubrenih do ravnoteže u pH 6,80.

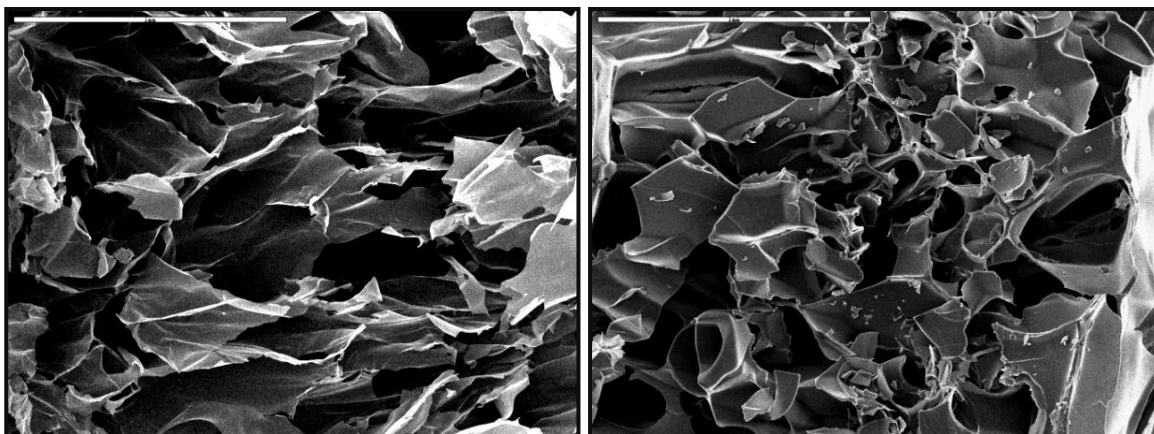


a)

b)

**Slika 4.19.** SEM mikrografije hidrogelova sa 4,0 mas% umreživača, 20,0 mas% lipaze i a) 15,0 mas% IK (85/15/4/20) i b) 0,0 mas% IK (100/0/4/20) bubrenih do ravnoteže u pH 6,80  $\pm$  0,01 na 37 °C ('bar' 1mm, 70 x).

Slike 4.20 a) i b) prikazuju morfologiju P(NiPAAm/IK) kopolimernih hidrogelova sa 10,0 mas% IK, 20,0 mas% lipaze i sa različitim sadržajem umreživača (2,0 i 4,0 mas%) uzoraka bubrenih pri pH 6,80.



a)

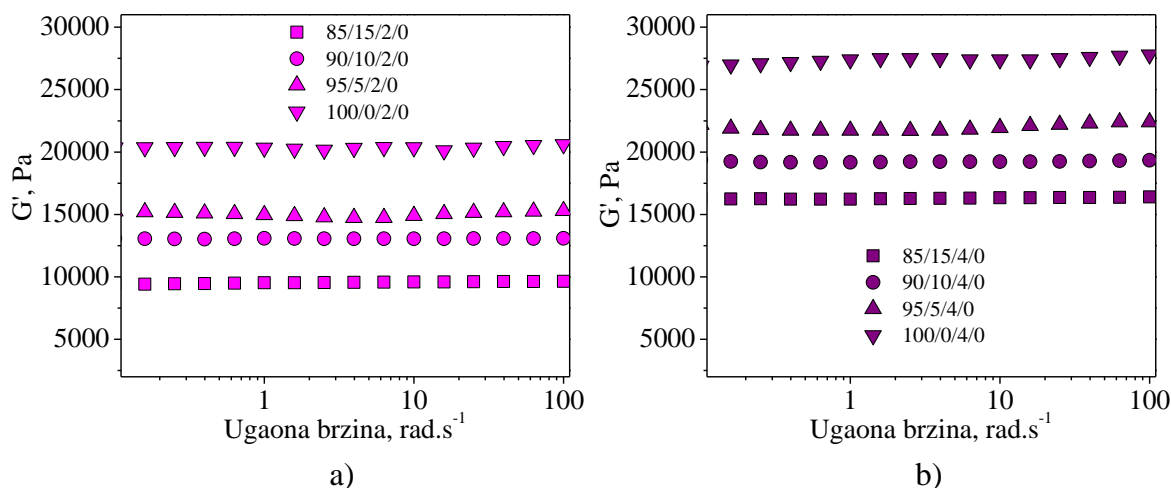
b)

**Slika 4.20.** SEM mikrografije hidrogelova sa 10,0 mas% IK, 20,0 mas% lipaze i a) 2,0 mas% (90/10/2/20) i b) 4,0 mas% (90/10/4/20) umreživača bubrenih do ravnoteže u pH 6,80  $\pm$  0,01 na 37 °C ('bar' 1 mm, 70 x).

#### 4.5. Mehanička svojstva hidrogelova

Mehanička svojstva hidrogelova, odnosno zavisnost modula sačuvane energije ( $G'$ ) u funkciji ugaone brzine, su prikazana na Slici 4.21 (uzorci bez lipaze) i Slici 4.22 (uzorci sa lipazom). Merenja su izvedena na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  nakon bubrenja hidrogelova u puferu pH vrednosti  $6,80 \pm 0,01$ . Cilj je bio da se ispita ponašanje hidrogelova u uslovima koji preovlađuju u donjem delu GI trakta, odnosno njihova mehanička svojstva u potencijalnim radnim uslovima. Takođe, pri pH vrednosti od 6,80 obe karboksilne grupe iz kiseline su jonizovane, pa je i bubrenje više izraženo, što utiče na krajnja mehanička svojstva hidrogela. Iz prikazanih rezultata je utvrđeno da odnos komonomera, kao i koncentracija umreživača, utiče na mehanička svojstva hidrogelova. Kao što se očekuje, sa porastom stepena umreženja formira se jača mreža pa su bolja mehanička svojstva, ali se smanjuje sposobnost upijanja okolnog fluida.

Sa porastom stepena umreženja od 2,0 do 4,0 mas%, mehanička svojstva hidrogelova se poboljšavaju, što se jasno vidi na Slikama 4.21 i 4.22. Modul sačuvane energije opada kako raste sadržaj itakonske kiseline u početnoj reakcionoj smeši, dajući slabija mehanička svojstva hidrogelovima. Veće vrednosti modula sačuvane energije su dobijene kod hidrogelova koji manje bubre.

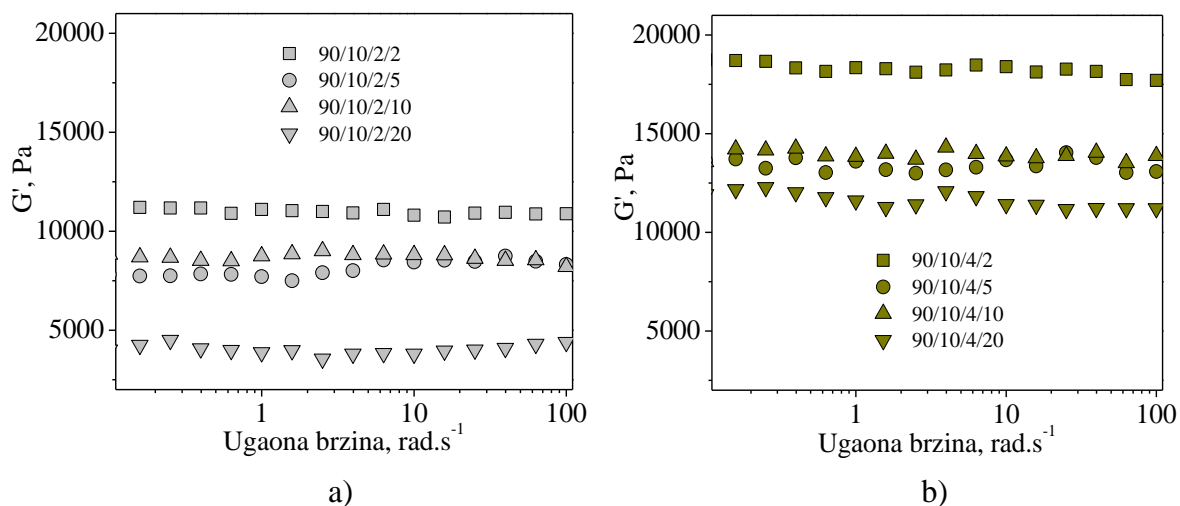


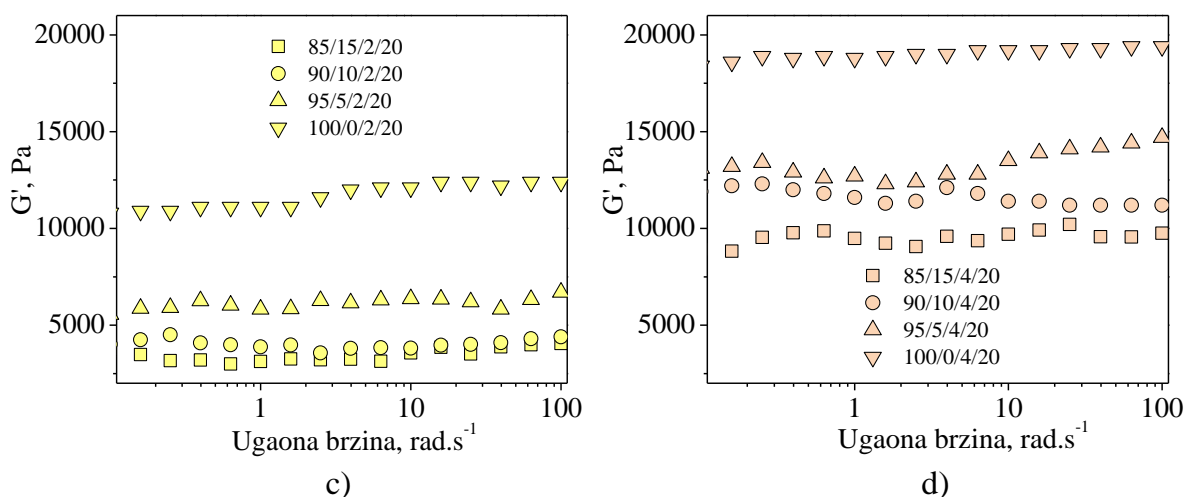
**Slika 4.21.** Modul sačuvane energije,  $G'$  u funkciji ugaone brzine za P(NiPAAm/IK) hidrogelove različitog sastava sa a) 2,0 mas% i b) 4,0 mas% umreživača, bubrenih do ravnoteže u pH  $6,80 \pm 0,01$  na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Sa Slike 4.21 se može zaključiti da je uticaj sadržaja umreživača i itakonske kiseline dosta izražen. Najveći modul sačuvane energije ima uzorak koji ne sadrži itakonsku kiselinu, a najmanji uzorak sa najvećim sadržajem itakonske kiseline, što je u skladu sa rezultatima bubrenja (Slika 4.3, 4.22 c) i d)). Modul sačuvane energije,  $G'$ , je nezavistan od ugaone brzine za sve uzorke.

Moduli sačuvane energije, u funkciji ugaone brzine hidrogelova sa 10,0 mas% itakonske kiseline i različitim sadržajem lipaze su prikazani na Slici 4.22 a) i b). Na Slici 4.22 c) i d) prikazana je zavisnost modula sačuvane energije u funkciji ugaone brzine hidrogelova sa različitim sastavom komonomera i stepena umreženja, a istim sadržajem lipaze imobilisane „*in situ*“ polimerizacijom. Sa ovih slika se vidi da sastav komonomera, koncentracija umreživača, kao i sadržaj lipaze, imaju znatan uticaj na mehanička svojstva svih uzoraka. U slučaju kada je lipaza „*in situ*“ imobilisana u hidrogelove veća gustina umreženja daje jači hidrogel, ali niži stepen bubrenja, pa je smanjena mogućnost difuzije supstrata i proizvoda reakcije. Poželjno je postići optimalni sadržaj umreživača, odnosno onu koncentraciju umreživača koja će obezbediti dobru jačinu hidrogela i da molekuli supstrata i proizvoda istovremeno mogu da difunduju u i van hidrogela.



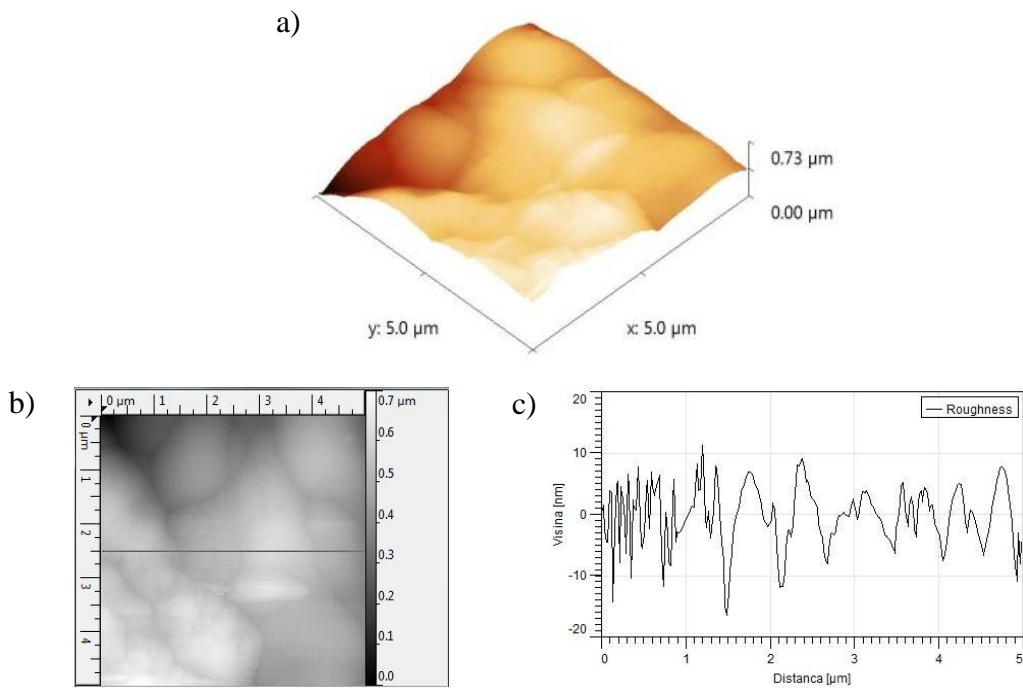


**Slika 4.22.** Modul sačuvane energije,  $G'$  u funkciji ugaone brzine za P(NiPAAm/IK) hidrogelove (a) 90/10/2 i (b) 90/10/4 sa različitim sadržajem lipaze; (c) sa 2,0 mas% i (d) 4,0 mas% umreživača i 20 mas% lipaze, bubreni do ravnoteže u pH  $6,80 \pm 0,01$  na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

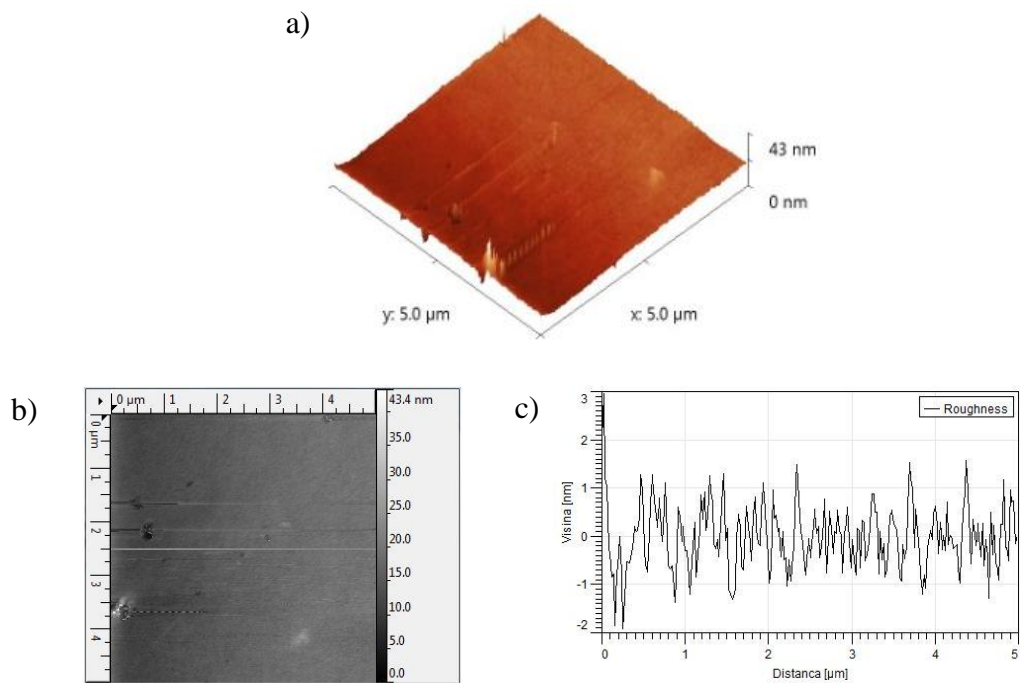
Sa Slike 4.22 se može zaključiti da je uticaj umreživača i lipaze na mehanička svojstva hidrogelova izraženiji nego uticaj itakonske kiseline. Porast sadržaja lipaze ima suprotan efekat od porasta stepena umreženja što znači da smanjuje vrednost modula sačuvane energije (Slika 4.22 a) i b)). To sugeriše da lipaza ima značajan uticaj na strukturu i mehanička svojstva hidrogela. Struktura hidrogelova bez lipaze je kompaktnija od strukture hidrogelova sa lipazom, što je potvrđeno i rezultatima bubrenja, i u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora<sup>191</sup>.

#### 4.6. AFM analiza

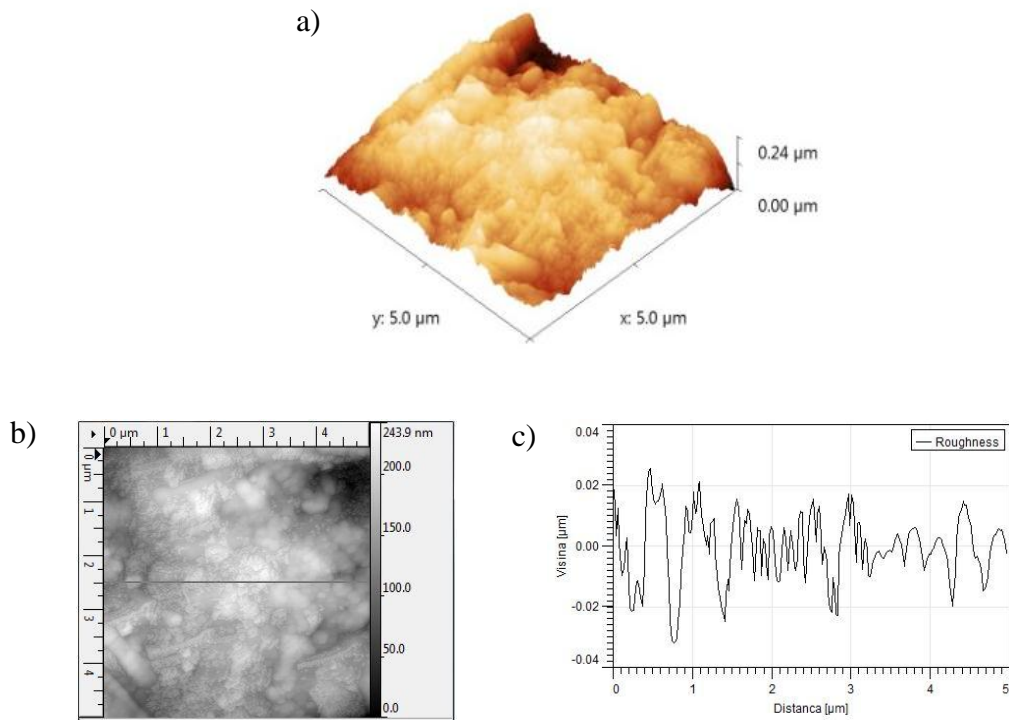
Slike 4.23-4.28 prikazuju AFM topografije površine uzoraka dimenzija  $(5,0 \times 5,0)\ \mu\text{m}^2$ , i to: (Slika 4.23) 85/15/2/20, (Slika 4.24) 90/10/2/0, (Slika 4.25) 90/10/2/20, (Slika 4.26) 90/10/4/20, (Slika 4.27) 95/5/2/20 i (Slika 4.28) 100/0/2/20 na sobnoj temperaturi, pod „suvim“ uslovima. Iz AFM slika je dobijena visina ispupčenja koja varira od 43 nm do  $0,73\ \mu\text{m}$  što ukazuje na postojanje regiona sa visokom gustinom polimera. Na Slikama 4.23-4.28 prikazana je površina uzoraka (3D i 2D), kao i hrapavost površine za ispitivane uzorke.



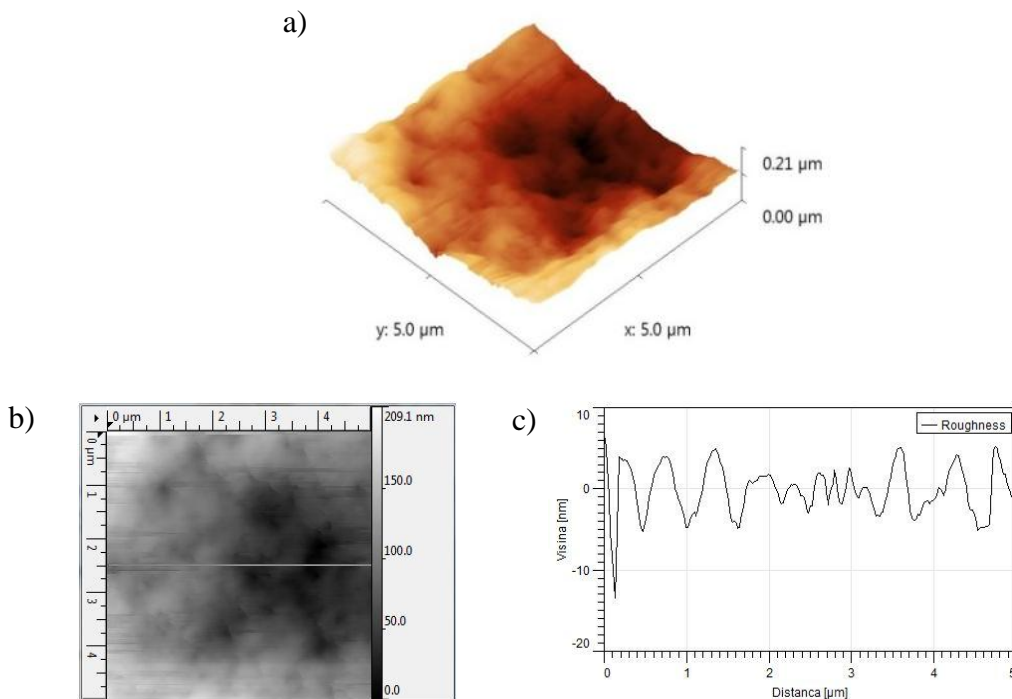
**Slika 4.23.** AFM analiza za uzorak 85/15/2/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine.



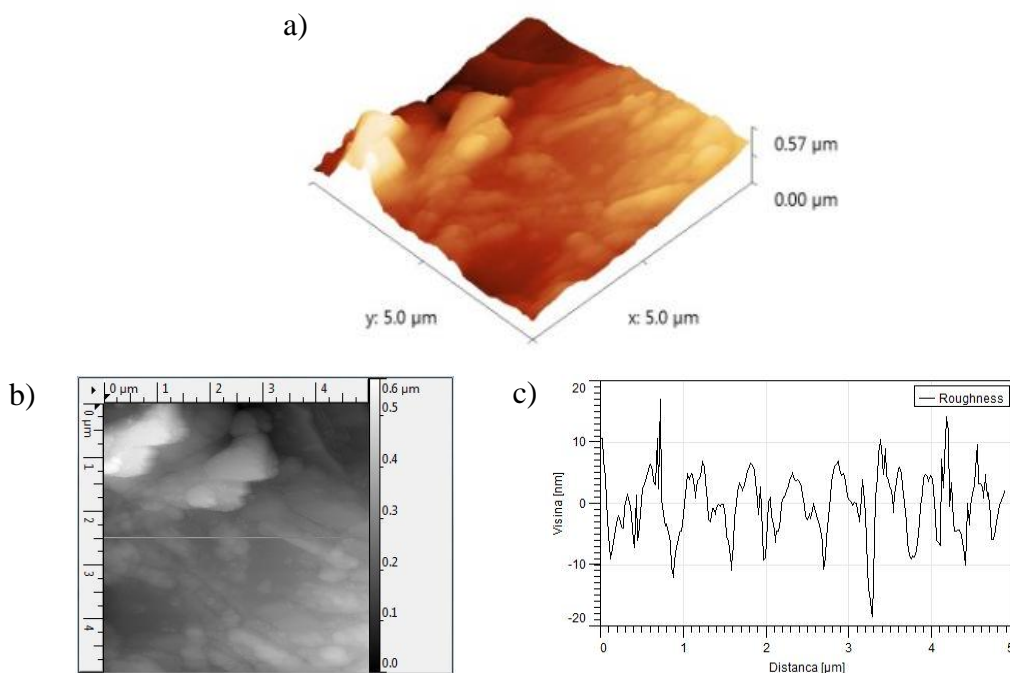
**Slika 4.24.** AFM analiza za uzorak 90/10/2/0: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine.



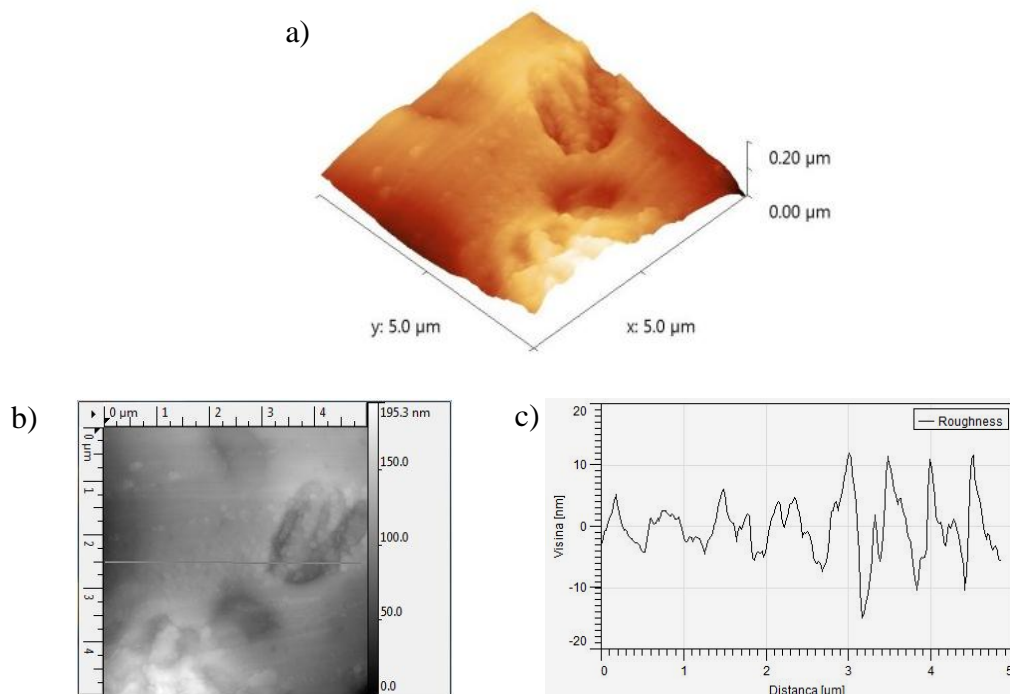
**Slika 4.25.** AFM analiza za uzorak 90/10/2/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine.



**Slika 4.26.** AFM analiza za uzorak 90/10/4/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine.



**Slika 4.27.** AFM analiza za uzorak 95/5/2/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine.



**Slika 4.28.** AFM analiza za uzorak 100/0/2/20: a) 3-D površina, b) 2-D površina i c) hrapavost površine.

AFM analiza je pokazala da površina homo- i kopolimernih hidrogelova ima konkavno-konveksnu strukturu na šta ukazuju tamna i svetla polja na Slikama 4.23 b) - 4.28 b). Poređenjem Slika 4.23 c) - 4.28 c) vidi se da dodatak IK/MBA/CRL utiče na površinu ispitivanih uzoraka. Analizom prikazanih topografija uočeni su regioni sa maksimalnom visinom od 730 nm i prosečnom hrapavošću od 8,7 nm. Takođe, utvrđeno je da postoje defekti sa maksimalnom deformacijom od 32 nm, dobijenom za uzorak 90/10/2/20.

Na homogenost površine hidrogelova značajno utiče sadržaj umreživača, kao i lipaze za uzorke sa „*in situ*“ imobilisanom lipazom. Najveću homogenost površine ima uzorak bez lipaze, kao što se i očekivalo na osnovu rezultata bubrenja i SEM analize. Površina homopolimernog gela sa lipazom, 100/0/2/20, je homogenija u odnosu na kopolimerne hidrogelove, što se vidi iz niskih vrednosti za hrapavost površine od 2,7 nm (Slike 4.23 - 4.28) u odnosu na druge uzorke sa lipazom. Kod ostalih uzoraka sa imobilisanom lipazom homogenost površine se smanjuje sa porastom sadržaja lipaze, što je i očekivano.

Vreme polimerizacije je bilo isto za sve uzorke, tako da nije uticalo na heterogenost površine sintetisanih uzoraka. Blagi porast hrapavosti površine je uočen sa porastom sadržaja itakonske kiseline (do 10 mas%), u iznosu od 3,7 nm do 8,7 nm, dok se smanjuje sa porastom sadržaja umreživača (od 8,7 nm do 2,4 nm) (Slike 4.25 i 4.26). Vrednosti hrapavosti površine za sve uzorke su prikazane u Tabeli 4.4.

**Tabela 4.4.** Srednja vrednost hrapavosti površine P(NiPAAm/IK) hidrogelova.

<i>Uzorak</i>	<i>Hrapavost površine, nm</i>
85/15/2/20	3,9
90/10/2/20	8,7
95/5/2/20	4,2
100/0/2/20	3,7
90/10/2/0	0,52
90/10/4/20	2,4

Sa porastom sadržaja lipaze u uzorku razlika u hrapavosti površine postaje izraženija, i za uzorke 90/10/2/0 i 90/10/2/20 iznosi 0,52 i 8,7 nm, redom (Slike 4.24 i 4.25). To govori

da dodatak MBA poboljšava homogenost površine, dok dodatak lipaze značajno utiče na njeno smanjenje.

## Zaključak

U ovom poglavlju je prikazana karakterizacija P(NiPAAm/IK) kopolimernih hidrogelova bez i sa umetnutom lipazom iz *Candida rugosa*. Hidrogelovi su karakterisani određivanjem stepena bubrenja, ispitivanjem morfologije, mehaničkih svojstava, kao i FT-IR i AFM analizom. FT-IR analizom je potvrđeno da je uspešno izvedena imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* na P(NiPAAm/IK) hidrogelove i da umetanje lipaze utiče na fizičko-hemijske karakteristike sintetisanog hidrogela. Utvrđeno je da na stepen bubrenja utiče sadržaj itakonske kiseline, stepen umreženja, prisustvo lipaze, kao i pH vrednost okolnog medijuma. Sa porastom sadržaja kiseline i lipaze se povećava stepen bubrenja, ali se smanjuje mehanička jačina hidrogela. Takođe, utvrđeno je da pri bubrenju na pH 2,20 dolazi do pojave „overshooting“ efekta.

Imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* je izvedena na dva načina (Metoda I i II). Zaključeno je da prisustvo lipaze u reakcionoj smeši u maloj meri ometa reakciju polimerizacije/umrežavanja. Vezivanje lipaze zavisi od metode po kojoj se izvodi imobilizacija, početne koncentracije lipaze, sastava hidrogelova i stepena umreženja. Utvrđeno je da je bolje i lakše vezivanje lipaze po Metodi I, odnosno „*in situ*“ polimerizacijom.





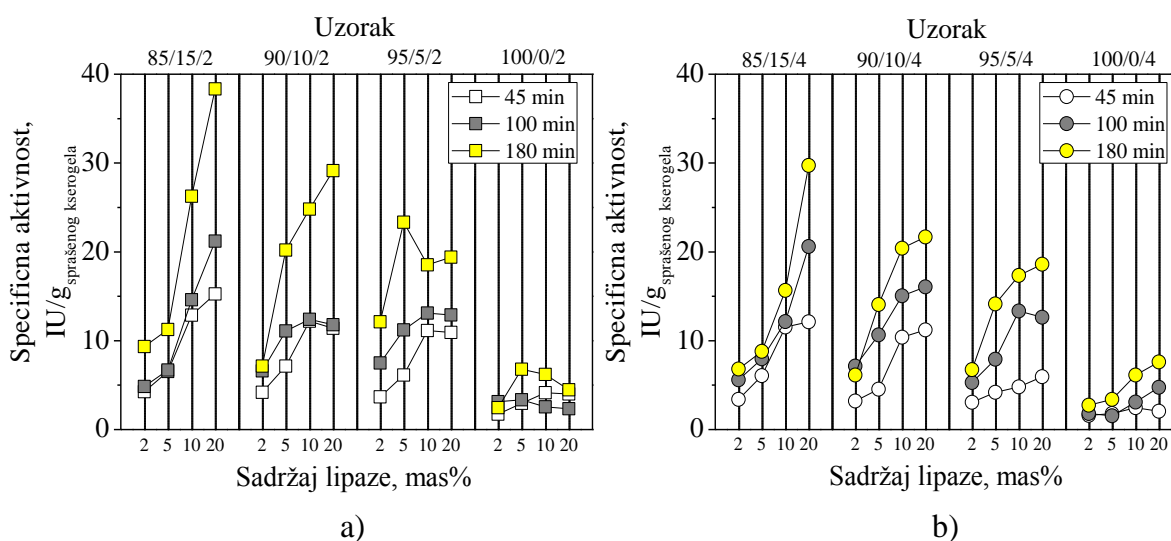
## 5. Aktivnost lipaze imobilisane u hidrogelove *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline

Izvedena je imobilizacija lipaze u P(NiPAAm/IK) hidrogelove umetanjem enzima u hidrogelove na dva načina. Prvi način je „*in situ*“ imobilizacija enzima u hidrogelove kada je enzim dodat u reakcionu smešu, a zatim je izvedena reakcija polimerizacije/umrežavanja (Metoda I), a drugi način je imobilizacija enzima u prethodno sintetisane hidrogelove, bubrenjem kserogelova u rastvorima lipaze odgovarajuće koncentracije, pH vrednosti i temperature (Metoda II). Nakon izvedene imobilizacije određena je aktivnost lipaze. Rezultati su zatim upoređeni da bi se izabrala bolja metoda imobilizacije.

Prinos aktivnosti imobilisane lipaze je određen za sve sintetisane uzorke, pri čemu je praćen uticaj sastava hidrogelova i sadržaja lipaze. Hidrogel je termostatiran sa supstratom na temperaturi od 37 °C i pri pH = 7,77 tokom 3 h (standardna Sigma procedura). Nakon toga je reakcija prekinuta dodatkom metanola u kome je rastvoren fenolftalein. Zatim je izvedena titracija 0,1 M rastvorom NaOH do potpune promene boje.

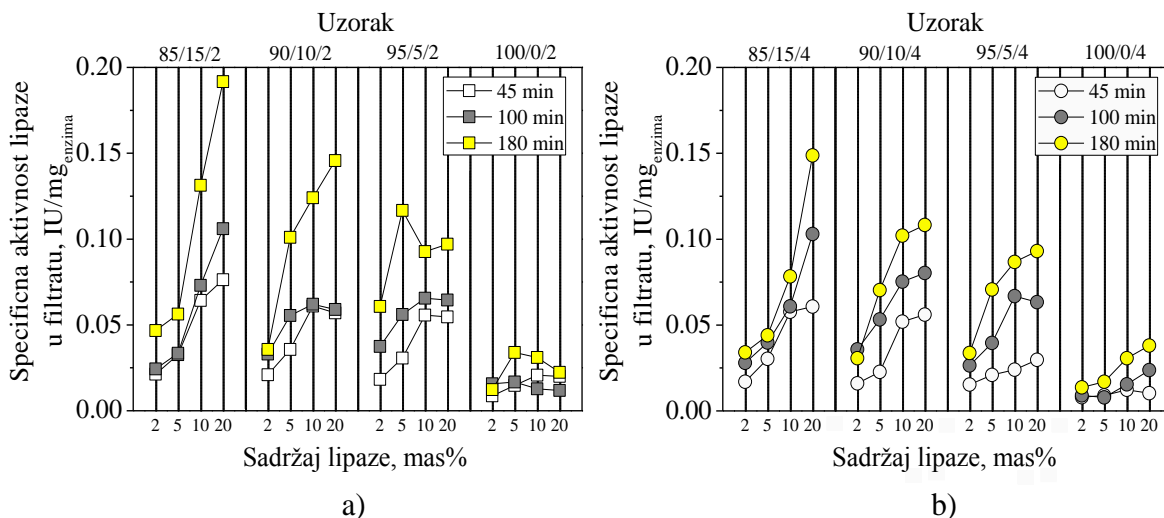
### 5.1. Metoda I – „In situ“ imobilizacija lipaze

U cilju ispitivanja uticaja vremena reakcije na prinos aktivnosti imobilisane lipaze, vreme termostatiranja uzoraka zajedno sa supstratom je bilo 45, 100, odnosno 180 minuta. Dobijeni rezultati za sve ispitivane uzorke su prikazani na Slikama 5.1-5.3.

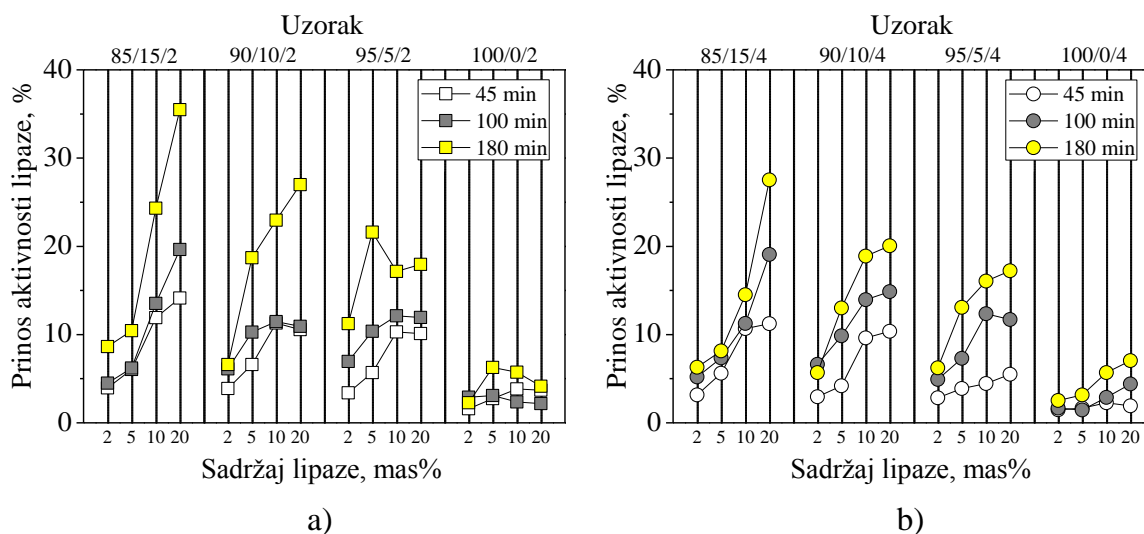


**Slika 5.1.** Prosečna specifična aktivnost lipaze imobilisane u P(NiPAAm/IK) hidrogelove za različito vreme trajanja reakcije.

Za primenu imobilisane lipaze kao katalizatora veoma je bitno ne dođe do otpuštanja lipaze iz hidrogela nakon imobilizacije. Međutim, ako dođe do otpuštanja, takođe je bitno da ona zadrži deo svoje aktivnosti u uslovima koji vladaju u okolnom medijumu, pa je u tom cilju urađeno i ispitivanje aktivnosti otpuštene lipaze. Vrednosti za specifičnu aktivnost lipaze u filtratu su prikazane na Slikama 5.2 a) i b).



**Slika 5.2.** Specifična aktivnost lipaze iz filtrata, nakon otpuštanja iz P(NiPAAm/IK) hidrogelova, za različito vreme trajanja reakcije.



**Slika 5.3.** Prinos aktivnosti lipaze imobilisane u P(NiPAAm/IK) hidrogelove za različito vreme trajanja reakcije.

Jasno se uočava uticaj vremena na sve tri ispitane veličine, tj. da sa povećanjem vremena raste i aktivnost imobilisane lipaze. Usvojeno vreme odigravanja reakcije je 180 minuta, što ujedno predstavlja i standardnu proceduru.

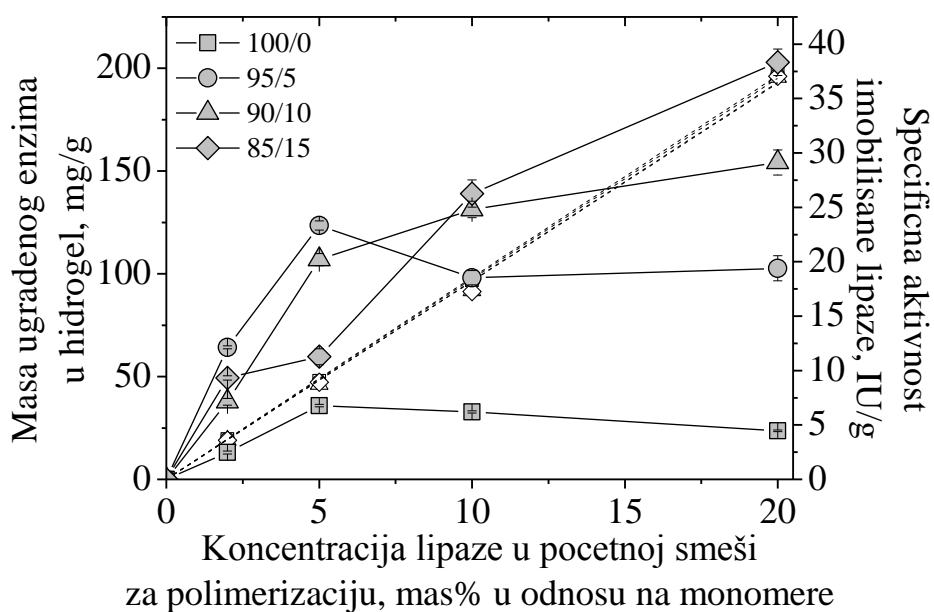
Prinos aktivnosti raste sa povećanjem udela itakonske kiseline u hidrogelovima. Hidrogel bez itakonske kiseline ima najniži prinos aktivnosti, a najveći hidrogel sa najviše itakonske kiseline. Jedno od objašnjenja može biti da dodatak itakonske kiseline utiče na porast broja grupa na nosaču sposobnih da vežu lipazu. Takođe, u slučaju Metode I, pH vrednost reakcione smeše pre otpočinjanja reakcije polimerizacije/umrežavanja je veoma slično vrednosti izoelektrične tačke za lipazu iz *Candida rugosa*. Poredeći uzorke sa istim sadržajem lipaze očigledno je da lipaza u uzorku 100/0/4 zadržava najmanji stepen svoje aktivnosti. Najbolju aktivnost pokazuju uzorci sa 20,0 mas% lipaze kod kojih je uočeno da porast sadržaja itakonske kiseline utiče na porast prinosa aktivnosti lipaze do vrednosti od oko 35 % (za vreme trajanja reakcije od 3 h).

## **5.2. Enzimska svojstva imobilisane lipaze**

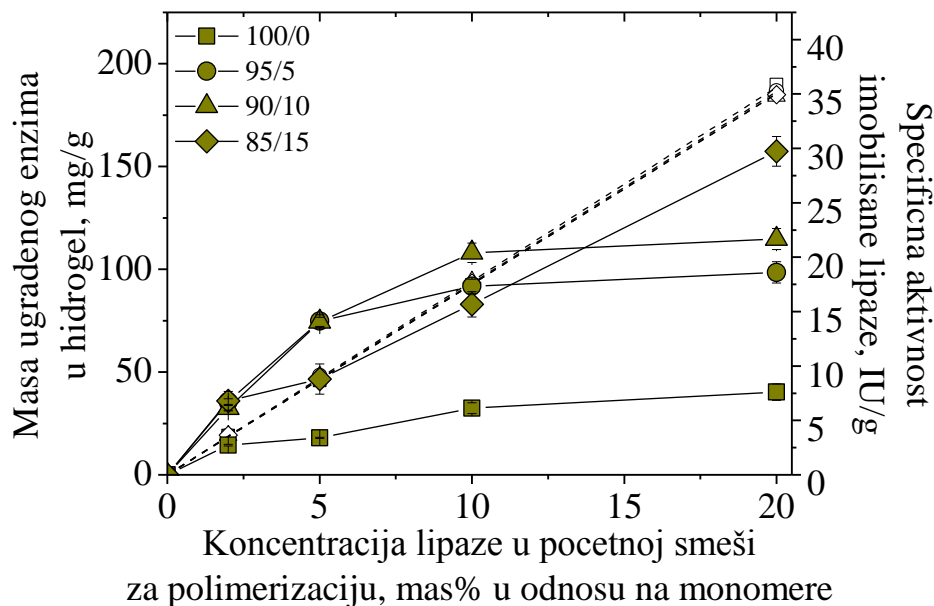
U okviru dalje karakterizacije sistema na bazi hidrogelova P(NiPAAm/IK) sa imobilisanom CRL, ispitani su masa ugrađenog enzima, specifična aktivnost, kao i temperaturni i pH optimum kao vrlo važni podaci za dizajn imobilisanih sistema za industrijsku primenu, a dobijeni rezultati su prikazani na Slikama 5.4-5.6.

### **5.2.1. Uticaj početne koncentracije lipaze na masu i specifičnu aktivnost imobilisanog enzima**

Na Slikama 5.4 i 5.5 prikazan je uticaj koncentracije lipaze u rastvoru na masu i specifičnu aktivnost imobilisane lipaze. Masa imobilisanog enzima raste proporcionalno sa porastom koncentracije lipaze u početnoj smeši. Više lipaze se ugradi u hidrogelove s nižom koncentracijom umreživača (2,0 mas%) usled postojanja većih pora unutar mreže, što je očekivano.



**Slika 5.4.** Uticaj koncentracije lipaze u reakcionoj smeši za polimerizaciju na masu imobilisane lipaze i njenu specifičnu aktivnost za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 2,0 mas% MBA (Masa imobilisane lipaze je prikazana isprekidanom linijom: □: 100/0, ○: 95/5, Δ90/10, ◇: 85/15).



**Slika 5.5.** Uticaj koncentracije lipaze u reakcionoj smeši za polimerizaciju na masu imobilisane lipaze i njenu specifičnu aktivnost za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 4,0 mas% MBA (Masa imobilisane lipaze je prikazana isprekidanom linijom: □: 100/0, ○: 95/5, Δ90/10, ◇: 85/15).

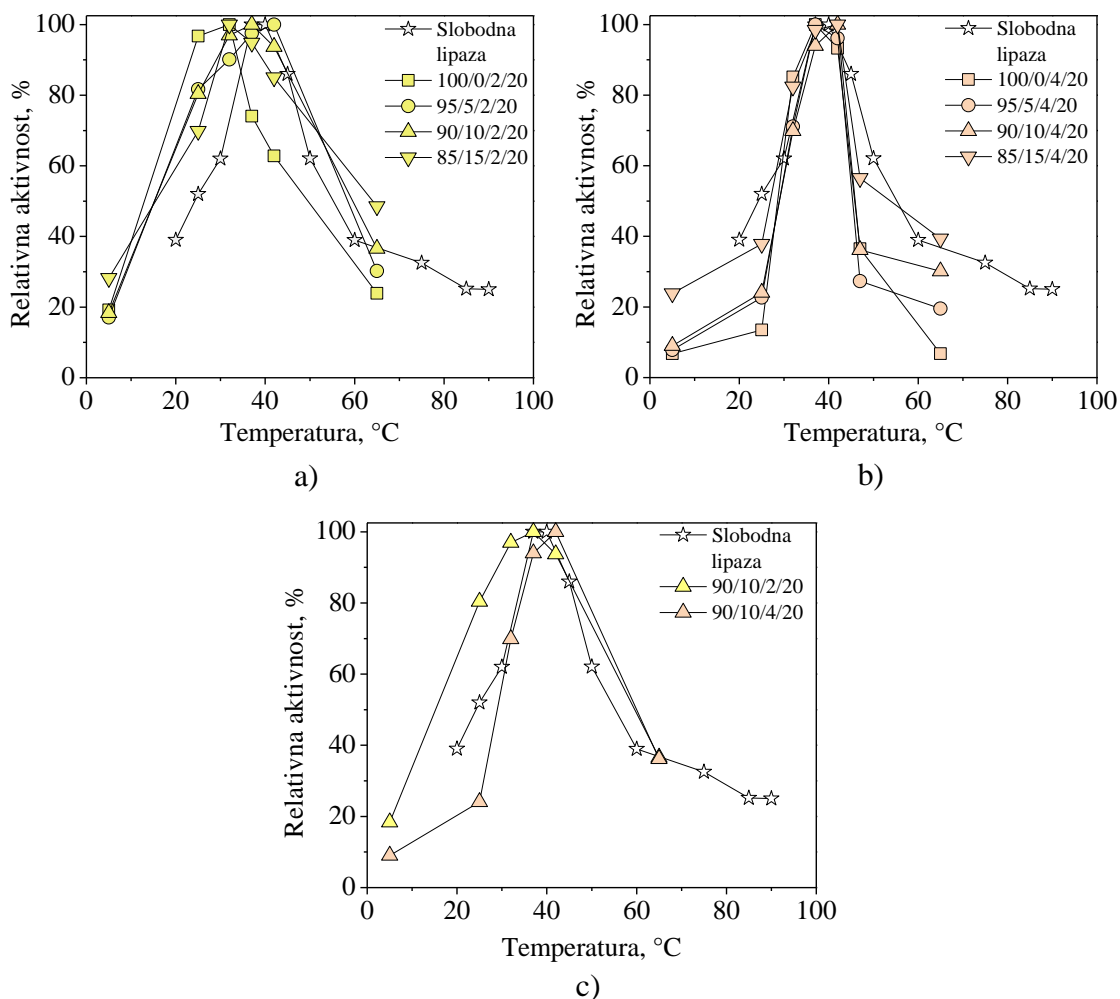
Aktivnost imobilisanih sistema raste sa povećanjem sadržaja IK, što je posledica interakcija između lipaze i hidrogela, kao i različite veličine pora u gelu, pa su najveće vrednosti specifične aktivnosti dobijene za hidrogelove 85/15 sa 2,0 mas% MBA i 20,0 mas% lipaze. Imobilizacijom lipaza gubi značajan deo svoje aktivnosti. Uzorak 85/15/2/20 ima najveću specifičnu aktivnost od 38,3 IU/g pri ugradnji enzima od 196,1 mg/g nosača, što predstavlja 48 % od specifične aktivnosti slobodne lipaze. Na Slikama 5.4 i 5.5 je prikazano kako u slučaju uzorka P(NiPAAm/IK) 85/15 specifična aktivnost stalno raste sa povećanjem koncentracije lipaze. Za sve druge sastave hidrogelova specifična aktivnost raste sa porastom sadržaja lipaze sve dok se ne dostigne optimalna vrednost sadržaja lipaze za dati sastav hidrogela, nakon čega je konstantan ili opada. Iz literature je poznato da se katalitička efikasnost imobilisanih sistema smanjuje kada vrednost imobilisanog enzima dostigne određenu kritičnu vrednost <sup>192</sup>. Dakle, trebalo bi izabrati optimalnu masu imobilisanog enzima. Homopolimeri imaju najnižu specifičnu aktivnost, oko 5 IU/g, tj. oko 6 % specifične aktivnosti određene za slobodnu lipazu.

## **5.2.2. pH i temperaturni optimum lipaze imobilisane Metodom I**

S obzirom da su pokazali najveću aktivnost lipaze nakon imobilizacije, uzorci sa 20,0 mas% lipaze su odabrani za određivanje pH i temperaturnog optimuma imobilisane lipaze.

### **5.2.2.1. Uticaj temperature na prinos aktivnosti biokatalizatora**

Temperaturni optimum predstavlja temperaturu na kojoj je prinos aktivnosti najveći. Ispitivanja su izvedena na šest različitih temperatura: 5, 25, 32, 37, 42 i 65 °C sa hidrogelovima različitog sadržaja itakonske kiseline i stepena umreženja, dok je sadržaj lipaze u svim uzorcima bio 20,0 mas%. Za svaku temperaturu je određena aktivnost imobilisane lipaze, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 5.6.



**Slika 5.6.** Aktivnost imobilisane lipaze u funkciji temperature za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 mas%, b) 4,0 mas% umreživača i c) za uzorke 90/10/2/20, 90/10/4/20. Radi poređenja prikazana je i aktivnost slobodne lipaze.

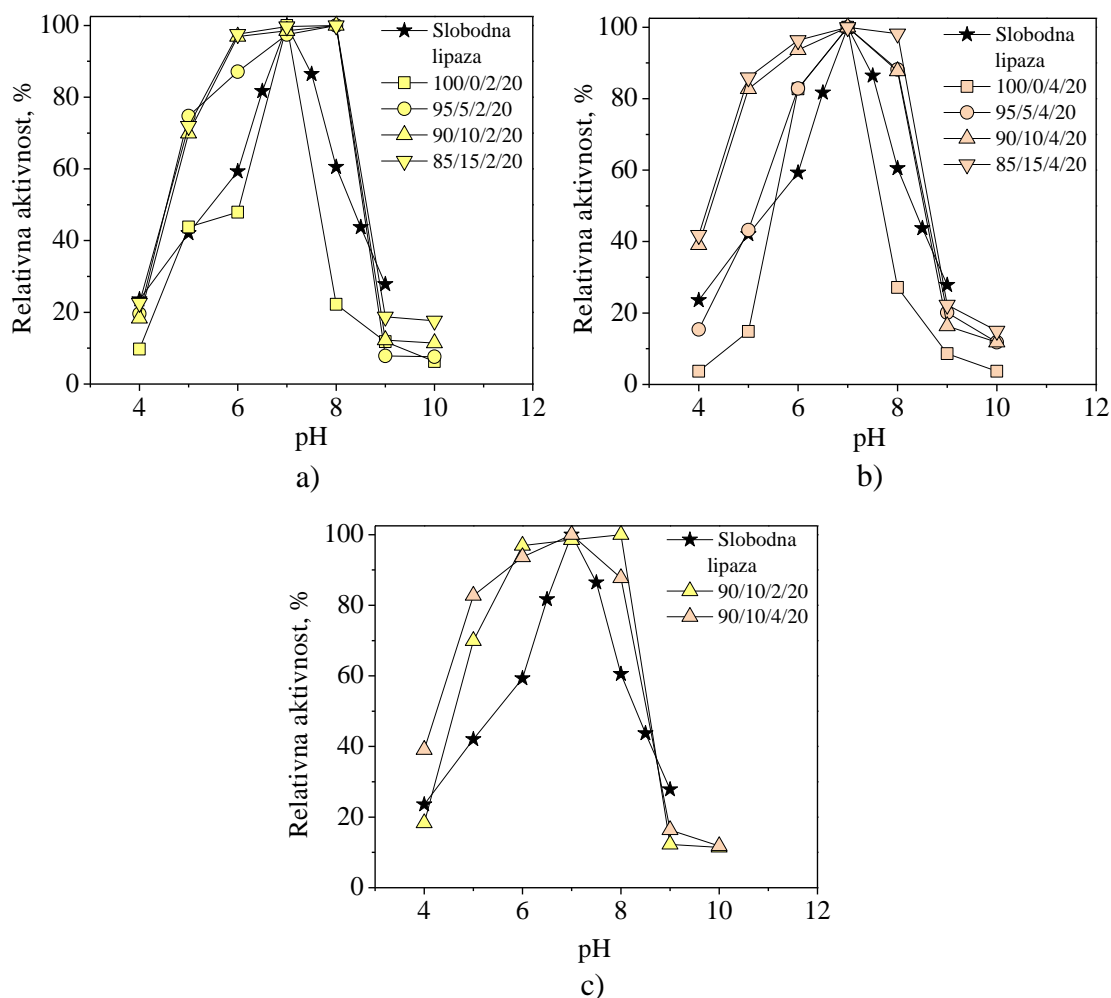
Uočeno je da aktivnost lipaze raste do određene temperature, a zatim opada. Temperatura na kojoj se javlja maksimalna aktivnost za sve ispitivane hidrogelove se kreće od 32 °C (za homopolimerni hidrogel) do 42 °C (za hidrogelove sa 5,0 mas% itakonske kiseline), dok se za slobodnu lipazu maksimalna aktivnost javlja oko 40 °C.

Za sve hidrogelove krive relativne aktivnosti u funkciji temperature za imobilisanu lipazu su šire nego krive za slobodnu lipazu. To je verovatno posledica očuvanja aktivnosti lipaze zahvaljujući stabilizaciji molekula lipaze imobilizacijom. Dalje, maksimum je malo pomeren ka nižim temperaturama<sup>193</sup> (Slike 5.6 a) i b)) što ukazuje na strukturne promene u enzimu, višestruke jonske interakcije, koje utiču na porast aktivacione energije enzima i zauzimanje konformacije pogodne za interakciju sa supstratom (kao posledica naelektrisanja

nosača)<sup>194,195</sup>. Takođe, šire krive za temperaturni optimum su dobijene za uzorak sa nižim sadržajem MBA (Slika 5.6 c).

### 5.2.2.2. Uticaj pH na prinos aktivnosti biokatalizatora

pH optimum je vrednost pH rastvora na kojoj je prinos aktivnosti enzima najveći. Ispitivano je ponašanje P(NiPAAm/IK) hidrogelova sa 2,0 i 4,0 mas% MBA i 20,0 mas% lipaze. Uzorci su pomešani sa supstratom i ostavljeni u rastvorima različitih pH vrednosti: 4, 5, 6, 7, 8, 9 i 10, na temperaturi od 37 °C. Posle 3 h, reakcija je prekinuta dodatkom 10 mL metanola u kome je rastvoren fenolftalein. Zatim je izvedena titracija 0,1 M rastvorom NaOH do promene boje, a rezultati su prikazani na Slici 5.7.



**Slika 5.7.** Aktivnost imobilisane lipaze u funkciji pH vrednosti rastvora za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa a) 2,0 mas%, b) 4,0 mas% umreživača i c) 90/10/2/20, 90/10/4/20. Radi poređenja prikazana je i aktivnost slobodne lipaze.



Slika 5.7 prikazuje pH profil svih uzoraka sa 20,0 mas% lipaze, kao i slobodne lipaze. Sa grafika se vidi da aktivnost imobilisane lipaze dostiže maksimalne vrednosti između pH 7,0 i 8,0, a zatim naglo opada za sve uzorke. Sa povećanjem pH iznad optimalne vrednosti dolazi do konformacionih i strukturnih promena u enzimu koje dovode do smanjenja njegovog afiniteta ka supstratu, čime se aktivnost enzima smanjuje<sup>196,197</sup>. Uzorak bez itakonske kiseline ima najmanju vrednost aktivnosti i njegov pH optimum je pomeren na pH 7, dok uzorak sa najvećim sadržajem itakonske kiseline ima najveću aktivnost. Optimalna pH vrednost je oko pH 7,5 za sve ispitivane uzorke koji sadrže itakonsku kiselinu, dok se pH optimum za slobodan enzim dostiže pri pH 7,0, što je u skladu sa rezultatima iz literature<sup>198-200</sup>.

Iz prikazanih rezultata je utvrđeno da se pH optimum lipaze pri imobilizaciji pomera za 1,0 ka alkalnoj oblasti bez obzira na sastav hidrogelova. Karboksilne grupe u IK prouzrokuju smanjenje pH u mikrokruženju lipaze u hidrogelu, pa je lipaza izložena nižoj pH vrednosti od one eksperimentalno utvrđene u početnoj reakcionoj smeši, usled čega se pH optimum pomera ka višim vrednostima<sup>195</sup>.

Osim toga, pH profil imobilisane lipaze je širi od pH profila slobodne lipaze, što ukazuje da je imobilizacijom poboljšana pH stabilnost lipaze. Poboljšana pH stabilnost je najverovatnije posledica stabilizacije molekula lipaze usled uspostavljanja jonskih interakcija lipaze sa nosačem<sup>195,201</sup>. Zbog toga svi kopolimerni hidrogelovi pokazuju sličan, široki pH profil, osim homopolimera (100/0/2/20 i 100/0/4/20) koji pokazuju nešto užu profil, posebno pri alkalnim pH vrednostima. Najbolja enzimaska aktivnost je utvrđena za hidrogelove sa najvišim sadržajem itakonske kiseline (85/15/2/20 i 85/15/4/20). Prema literaturi, nakon imobilizacije CRL na P(NiPAAm/IK) hidrogelove različitog sastava, pH optimum biokatalizatora može postati veći od onog kod slobodne lipaze<sup>202,203</sup>, što zavisi od načina imobilizacije, kao i od strukture i naelektrisanja matrice.

### 5.3. Metoda II – Imobilizacije lipaze bubrenjem

Praćen je uticaj temperature, pH i koncentracije lipaze u rastvoru na masu i aktivnost imobilisane lipaze, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabelama 5.1-5.3, redom. Na osnovu prethodnih istraživanja usvojeno optimalno vreme vođenja reakcije bilo je 3 h.

Prethodno sintetisani hidrogelovi (kserogelovi) bez enzima ostavljeni su da bubre u rastvoru pH vrednosti  $7,00 \pm 0,01$  i koncentracije enzima  $1,0 \text{ mg}_{\text{enz}}/\text{mL}$  rastvora, na

različitim temperaturama: 5, 25 i 37 °C. Da bi se osiguralo maksimalno moguće vezivanje enzima za nosač uzorci su ostavljeni da bubre u rastvorima do ravnoteže.

**Tabela 5.1.** Uticaj temperature na aktivnost lipaze nakon imobilizacije po Metodi II (bubrenje kserogelova u rastvoru lipaze koncentracije 1,0 mg<sub>enz</sub>/mL pufera pH 7,00 ± 0,01).

Uzorak	t = 5 °C			t = 25 °C			t = 37 °C		
	IU/g <sub>spraš.</sub> kserogela	IU/mg <sub>enz</sub>	Y, %	IU/g <sub>spraš.</sub> kserogela	IU/mg <sub>enz</sub>	Y, %	IU/g <sub>spraš.</sub> kserogela	IU/mg <sub>enz</sub>	Y, %
85/15/2/0	34,20	0,171	28,5	30,60	0,153	25,5	21,20	0,106	17,7
90/10/2/0	29,40	0,147	24,2	25,80	0,129	21,5	10,60	0,053	8,8
95/5/2/0	24,20	0,121	20,7	16,20	0,081	13,5	5,20	0,026	4,3
100/0/2/0	23,60	0,118	19,7	10,80	0,054	9,0	2,00	0,010	1,7
85/15/4/0	31,40	0,157	26,2	24,80	0,124	20,7	15,60	0,078	13,0
90/10/4/0	28,60	0,143	23,8	17,20	0,086	14,3	8,20	0,041	6,8
95/5/4/0	21,20	0,106	17,7	10,80	0,054	9,0	3,60	0,018	3,0
100/04/0	9,80	0,049	8,2	5,40	0,027	4,5	0,60	0,003	0,5

Vrednosti iz Tabele 5.1 pokazuju da najveći procenat specifične aktivnosti i prinosa aktivnosti pokazuje uzorak sa najvećim sadržajem itakonske kiseline (15,0 mas%) i manjeg sadržaja umreživača (2,0 mas%). Takođe, snižavanje temperature na kojoj se izvodi reakcija umetanja lipaze u hidrogelove utiče na porast ovih vrednosti, koje su najveće na temperaturi umetanja od 5 °C (verovatno kao posledica povećanog bubrenja hidrogelova na 5 °C i mogućnosti lakšeg umetanja lipaze u hidrogel). Na osnovu ranije ispitanih mehaničkih karakteristika hidrogelova pokazano je da je uzorak sa najvećim sadržajem itakonske kiseline pokazao nešto slabija mehanička svojstva. Takođe, na osnovu rezultata prinosa aktivnosti i kinetike otpuštanja imobilisane lipaze Metodom II (Tabela 5.1) i poređenjem sa rezultatima dobijenim imobilizacijom lipaze Metodom I (Poglavlje 5.1), kao najbolji izabrani su:

- Uzorak 90/10/2/0 za ispitivanje mogućnosti primene dobijenog biokatalizatora u reakcijama sinteze estera.

- Uzorci 95/5/2/0 i 95/5/4/0 za ispitivanje mogućnosti primene hidrogelova za kontrolisano otpuštanje terapeutskih proteina.

Na osnovu rezultata iz Tabele 5.1, i prinosa aktivnosti, usvojena je optimalna temperatura od 5 °C za dalji rad. Nakon toga ispitano je bubrenje uzoraka u puferima različitih pH vrednosti (pH 6,00 ± 0,01, 8,00 ± 0,01 i 9,00 ± 0,01). Cilj je bio da se nađe optimalna pH vrednost rastvora pufera, gde je prinos aktivnosti najbolji, a što je važno za potencijalnu primenu kao biokatalizatora u reakcijama esterifikacije. Takođe, cilj je bio i optimizacija kinetike otpuštanja proteina iz hidrogelova određenih sastava. U tu svrhu je ispitana i mogućnost otpuštanja lipaze iz hidrogelova određivanjem aktivnosti filtrata, odnosno, aktivnosti otpuštene lipaze iz hidrogelova.

**Tabela 5.2.** Uticaj pH rastvora na aktivnost imobilisane lipaze nakon imobilizacije po Metodi II (bubrenje kserogelova na 5 °C u rastvoru lipaze koncentracije 1,0 mg<sub>enz</sub>/mL pufera pH 7,00 ± 0,01).

<i>pH</i>	<i>Uzorak</i>	<i>IU/g<sub>spraš.</sub></i> <i>kserogela</i>	<i>IU/mg<sub>enz</sub></i>	<i>Y, %</i>
6,04	90/10/2/0	13,60	0,068	11,3
	95/5/2/0	6,40	0,032	5,3
	95/5/4/0	3,40	0,017	2,8
7,00	90/10/2/0	29,00	0,145	24,2
	95/5/2/0	24,80	0,124	20,7
	95/5/4/0	21,40	0,107	17,8
8,00	90/10/2/0	22,00	0,110	18,3
	95/5/2/0	20,00	0,100	16,7
	95/5/4/0	8,60	0,043	7,2
8,99	90/10/2/0	/	/	< 1,0
	95/5/2/0	/	/	< 1,0
	95/5/4/0	/	/	< 1,0

Na osnovu rezultata iz Tabele 5.2 uočava se da pH vrednost rastvora u kome se izvodi umetanje lipaze utiče na prinos njene aktivnosti. Sa porastom pH vrednosti rastvora do 7,00 prinos aktivnosti lipaze raste, a potom opada. Nakon usvajanja optimalne temperature, usvojena je i optimalna pH vrednost:  $7,00 \pm 0,01$ . Zatim je izveden set eksperimenata u kojima je varirana koncentracija lipaze u rastvoru: 1,0, 5,0, 10,0 i 20,0  $\text{mg}_{\text{enz}}/\text{mL}$  rastvora. Rezultati ovih eksperimenata su prikazani u Tabeli 5.3.

**Tabela 5.3.** Uticaj koncentracije lipaze u rastvoru na aktivnost imobilisane lipaze nakon imobilizacije po Metodi II (bubrenje kserogelova na  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  u rastvoru pH vrednosti  $7,00 \pm 0,01$ ).

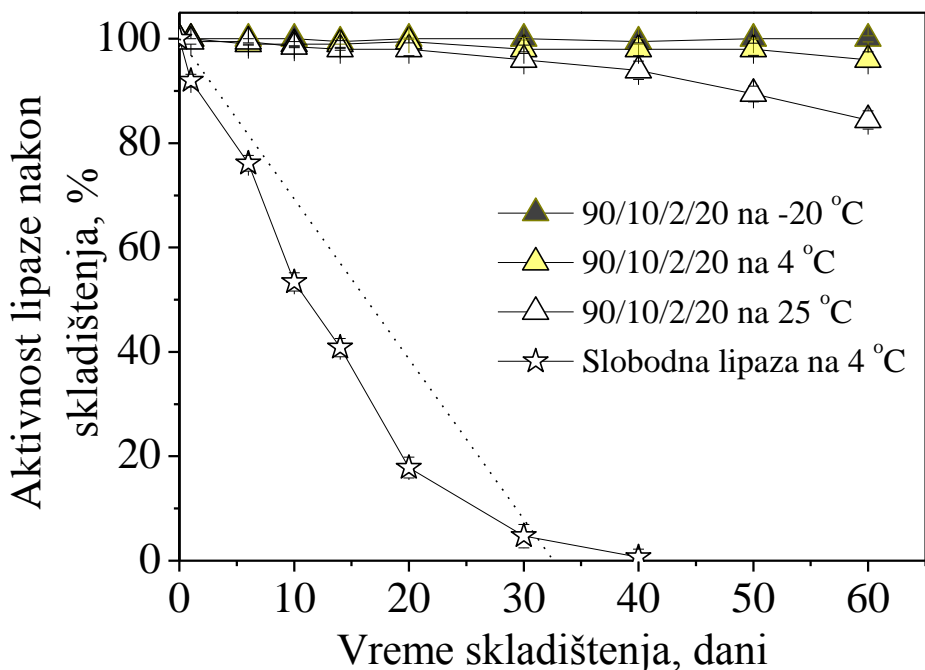
<i>Koncentracija rastvora, <math>\text{mg}/\text{mL}</math></i>	<i>Uzorak</i>	<i><math>\text{IU}/\text{g}_{\text{spraš.}}</math> <i>kserogela</i></i>	<i><math>\text{IU}/\text{mg}_{\text{enz}}</math></i>	<i>Y, %</i>
0,2	90/10/2/0	12,20	0,061	10,2
	95/5/2/0	10,80	0,054	9,0
	95/5/4/0	5,80	0,029	4,8
1,0	90/10/2/0	29,00	0,145	24,2
	95/5/2/0	24,80	0,124	20,7
	95/5/4/0	21,40	0,107	17,8
5,0	90/10/2/0	63,20	0,316	52,7
	95/5/2/0	39,60	0,198	33,0
	95/5/4/0	27,80	0,139	23,2
10,0	90/10/2/0	65,00	0,325	54,2
	95/5/2/0	46,00	0,230	38,3
	95/5/4/0	39,20	0,196	32,7
20,0	90/10/2/0	62,80	0,314	52,3
	95/5/2/0	45,40	0,227	37,8
	95/5/4/0	39,00	0,195	32,5

Sa porastom koncentracije lipaze u rastvoru do 10,0 mg/mL vrednosti prinosa aktivnosti rastu, a potom blago opadaju. Međutim, pri koncentraciji lipaze od 10 mg/mL i više dolazi do taloženja proteina čime se smanjuje masa lipaze koju hidrogel može da upije. S druge strane, koncentracija rastvora od 1,0 mg<sub>enz</sub>/mL rastvora odgovara rastvoru koji je korišćen za „*in situ*“ umetanje lipaze, a u kome je sadržaj lipaze bio 20,0 mas%. Zbog toga je ova koncentracija odabrana za dalji rad kako bi mogle da se uporede efikasnosti imobilizacije po Metodi I i II.

Pored koncentracije rastvora lipaze, mora se optimizovati i odnos monomera i umreživača pošto on određuje poroznost polimerne mreže i stoga utiče na imobilizaciju lipaze. U ovom radu je pokazano da se sa povećanjem koncentracije umreživača od 2,0 do 4,0 mas% smanjuje prinos aktivnosti lipaze. Na primer, 90/10/2/20 hidrogel je pokazao 27,0 % u odnosu na 20,1 % prinosa aktivnosti kod uzorka sa 4,0 mas% umreživača, dok je prinos aktivnosti uzorka 90/10/2/0 bubrenog pod optimizovanim uslovima iznosio 30,0 %, primenom standardne procedure na emulziji maslinovog ulja<sup>204</sup>. Porast koncentracije umreživača smanjuje broj amidnih grupa koje nakon procesa polimerizacije, ostaju slobodne za vezivanje lipaze.

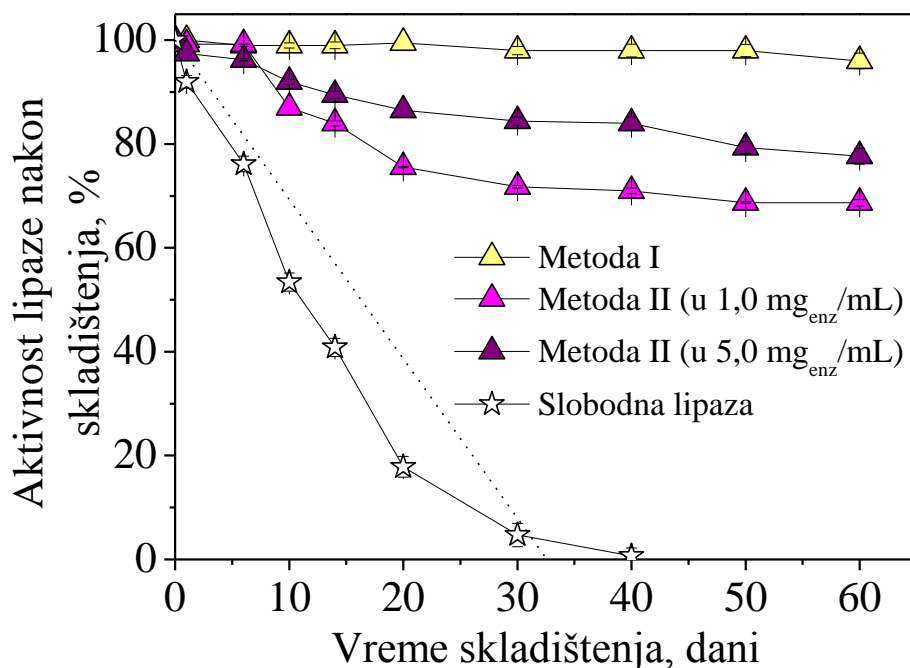
#### **5.4. Ispitivanje stabilnosti imobilisane lipaze pri skladištenju**

Stabilnost imobilisane lipaze, odnosno otpornost pri stajanju bez velikog gubitka enzimске aktivnosti, je važna zbog ekonomske isplativosti i održivosti procesa biosinteze estara<sup>205,206</sup>. Ispitivanje stabilnosti lipaze na skladištenje za nativnu i imobilisanu lipazu po Metodi I je izvedeno u periodu od 60 dana na različitim temperaturama (Slika 5.8). Imobilisana lipaza je pokazala značajno bolju stabilnost na skladištenje u odnosu na nativnu lipazu. Takođe, imobilisana lipaza je pokazala punu katalitičku aktivnost pri čuvanju na -20 °C u laboratorijskom zamrzivaču, dok je pri porastu temperature skladištenja zabeležen pad stabilnosti. Nakon skladištenja na 4 °C, lipaza imobilisana Metodom I zadržava nešto više od 95 % svoje početne aktivnosti.



**Slika 5.8.** Relativna aktivnost (%) slobodne i imobilisane lipaze u 90/10/2/20 hidrogel (Metoda I) nakon skladištenja na različitim temperaturama tokom 60 dana. Reakcije su izvedene na emulziji maslinovog ulja standardnom procedurom, na 37 °C i na pH 7 u trajanju od 3 h.

Potom je ispitana stabilnost lipaze imobilisane Metodom II, bubrenjem na 4 °C i upoređena sa stabilnošću lipaze imobilisane Metodom I, a rezultati su prikazani na Slici 5.9. Utvrđeno je da se imobilizacijom povećava stabilnost lipaze u odnosu na nativnu bez obzira na metodu imobilizacije. U oba slučaja temperatura od 4 °C se pokazala kao pogodna za skladištenje imobilisane lipaze. Stajanjem na toj temperaturi lipaza zadržava oko 95 % svoje aktivnosti ako se imobilise po Metodi I, odnosno 68,7 % (bubrenje u 1,0 mg<sub>enz</sub>/mL) i 77,0 % (bubrenje u 5,0 mg<sub>enz</sub>/mL), ako se imobilise po Metodi II. S druge strane, slobodna lipaza je zadržala oko 41 % svoje katalitičke aktivnosti nakon 14 dana i samo 5 % nakon 30 dana skladištenja na 4 °C. Takođe, utvrđeno je da se znatno bolja stabilnost imobilisane lipaze postiže ako se lipaza imobilise Metodom I, odnosno „*in situ*“ polimerizacijom.



**Slika 5.9.** Relativna aktivnost (%) slobodne i imobilisane lipaze u 90/10/2/20 (Metoda I), kao i lipaze imobilisane Metodom II u hidrogel 90/10/2/0 nakon skladištenja na 4 °C tokom 60 dana. Reakcije su izvedene na emulziji maslinovog ulja standardnom Sigma procedurom, na 37 °C i na pH 7,0 u trajanju od 3 h.

Niža temperatura skladištenja (-20 °C) omogućava dugoročno očuvanje aktivnosti imobilisane lipaze, pri čemu je mogućnost degradacije vrlo mala. Porast temperature skladištenja lipaze do sobne temperature dovodi do smanjenja aktivnosti, najčešće kao rezultat kontaminacije mikroorganizmima. Povlačenjem trend linije (Slika 5.8) određeno je da je poluvreme skladištenja slobodne lipaze oko 16 dana.

## Zaključak

Imobilizacija lipaze na P(NiPAAm/IK) kopolimerne hidrogelove je izvedena na dva načina. Poređenjem metoda imobilizacije, kao i aktivnosti imobilisane lipaze, utvrđeno je da je imobilizacija po Metodi I, odnosno *in situ* imobilizacija, bolja metoda za imobilizaciju lipaze na P(NiPAAm/IK) hidrogelove.

Utvrđeno je da imobilizacija lipaze utiče na fizičko-hemijske karakteristike rezultujućeg hidrogela. Sa druge strane, struktura hidrogela ima znatan uticaj na ponašanje imobilisane lipaze.

Tokom imobilizacije lipaza se bolje veže za kopolimerne hidrogelove nego za homopolimerne. Specifična aktivnost imobilisane lipaze raste sa porastom sadržaja itakonske kiseline i lipaze u hidrogelu. Time je pokazano da struktura hidrogela ima značajan uticaj na ponašanje imobilisane lipaze. Najveću aktivnost je pokazao uzorak sa najvećim sadržajem lipaze i itakonske kiseline, gde je specifična aktivnost imobilisane lipaze iznosila oko 38 IU/g. Imobilisana lipaza je pokazala bolju stabilnost na skladištenje u odnosu na nativnu lipazu bez obzira na metodu imobilizacije, pri čemu je zadržana visoka katalitička aktivnost pri skladištenju na -20 °C, dok je sa porastom temperature zabeležen pad stabilnosti. Temperatura na kojoj se javlja maksimalna aktivnost za sve ispitivane hidrogelove se kreće od 32 °C do 42 °C. Utvrđen je pH optimum za imobilisanu lipazu koji se za sve ispitivane uzorke kretao u intervalu od 7,0 do 8,0.

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da je za primenu imobilisane lipaze, kao biokatalizatora za sintezu estara, najbolja svojstva pokazao hidrogel 90/10/2/20. Rezultati sinteze estra *n*-amil-izobutirata su prikazani u Poglavlju 7.





## 6. Modifikacija i optimizacija biokatalizatora

U dosadašnjim istraživanjima kao nosači za imobilizaciju su se koristili dvoslojni hidroksidi (slojeviti materijali sa pozitivno naelektrisanim slojevima kojima se suprotstavljaju negativno naelektrisani anjoni koji se nalaze u međusloju) <sup>207</sup> Eupergit® C, aktivni ugalj i molekulska sita <sup>208</sup>. Poređenjem tih rezultata, u kojima se procenat vezanog enzima kreće od 19 do 71 %, sa rezultatima dobijenim u ovom radu, može se zaključiti da P(NiPAAm/IK) hidrogel vezuje znatno veću masu enzima.

Ranija ispitivanja imobilizacije enzima u hidrogelove su pokazala da se aktivnost imobilisanog enzima može povećati ukoliko se pri sintezi hidrogela doda površinski aktivna materija. Takođe, pokazano je da se lipaza najbolje vezuje za nosač ukoliko se imobilizacija izvodi u rastvoru čija je pH vrednost bliska izoelektričnoj tački lipaze <sup>22,205,209-211</sup>. Zbog toga su izvedene nove sinteze hidrogela 90/10/2/20, koji je u prethodnim ispitivanjima pokazao najbolja svojstva, tako što je u reakcionu smešu dodata površinski aktivna materija, Triton X-100 <sup>212; 213; 214</sup>, a umesto destilovane vode reakcija je izvedena u rastvoru čija je pH vrednost bila 7,0. Triton X-100 je dodat u reakcionu smešu kako bi se zadržala otvorena

konformacija lipaze dostupna supstratu. Dobijeni uzorci su karakterisani određivanjem aktivnosti imobilisane lipaze, FT-IR i SEM analizom.

Sinteza prvog uzorka P(NiPAAm/IK)–1 je izvedena u destilovanoj vodi bez dodatka površinski aktivne materije u destilovanoj vodi. Drugi i treći uzorak su sintetisani u puferu pH vrednosti 7,0 (uzorci P(NiPAAm/IK)–2 i P(NiPAAm/IK)–3). Sinteza četvrtog i petog uzorka je izvedena u prisustvu površinski aktivne materije, Triton X-100, a kao reakcioni medijum korišćena je destilovana voda (uzorak P(NiPAAm/IK)–4) i pufer pH vrednosti 7,0 (uzorak P(NiPAAm/IK)–5):

- 90/10/2/20 (P(NiPAAm/IK)–1)
- 90/10/2/20 u fosfatnom puferu, pH 7,0, kao rastvaraču (P(NiPAAm/IK)–2)
- 90/10/2/20 u u fosfatnom puferu, pH 7,0, kao rastvaraču (pH vrednost IA/KPS/KPyS pre reakcije polimerizacije je podešena na pH 7,20) (P(NiPAAm/IK)–3)
- 90/10/2/20 sintetisan sa 0,5 mas% Triton X-100 (P(NiPAAm/IK)–4)
- 90/10/2/20 sintetisan sa 0,5 mas% Triton X-100 u pH 7,0 (P(NiPAAm/IK)–5)

### 6.1. Aktivnost imobilisane lipaze

Određena je masa lipaze koja je umetnuta u hidrogel. Prema rezultatima prikazanim u Tabeli 6.1 utvrđeno je da je najviše lipaze umetnuto u uzorak P(NiPAAm/IK)–1 (97,8 % od ukupne mase lipaze dodate u reakcionu smešu), a najmanje u uzorak P(NiPAAm/IK)–3 (81,2 % od ukupne mase lipaze dodate u reakcionu smešu), što se slaže sa podacima koje su dobili Vaidya i saradnici <sup>44</sup>.

Utvrđeno je da uzorak P(NiPAAm/IK)–1 bolje vezuje CRL nego isti kopolimer sa dodatim Tritonom X-100 (Tabela 6.1). Ovakvo ponašanje nije očekivano jer su ranija istraživanja pokazala da dodatak površinski aktivne materije uglavnom povećava aktivnost imobilisanog enzima <sup>215</sup>. Dobijeni rezultat može da bude posledica niskog sadržaja i/ili vrste površinski aktivne materije koja je odabrana za sintezu.

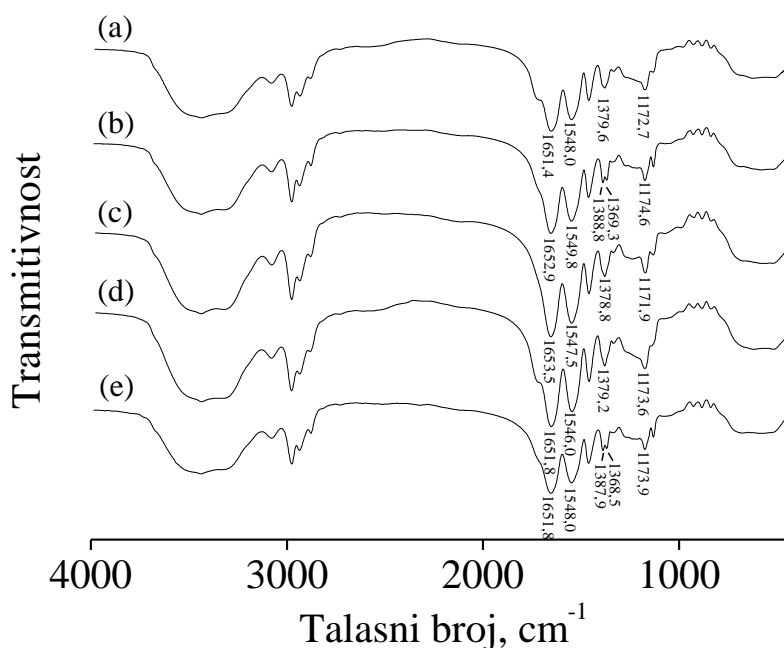
**Tabela 6.1.** Efikasnost P(NiPAAm/IK) kopolimera kao nosača za imobilizaciju CRL.

<i>Uzorak</i>	<i>Y (%)</i>
P(NiPAAm/IK)–1	30,0
P(NiPAAm/IK)–2	13,8
P(NiPAAm/IK)–3	12,1
P(NiPAAm/IK)–4	25,9
P(NiPAAm/IK)–5	19,5

## 6.2. Karakterizacija hidrogelova

### 6.2.1. FT-IR analiza

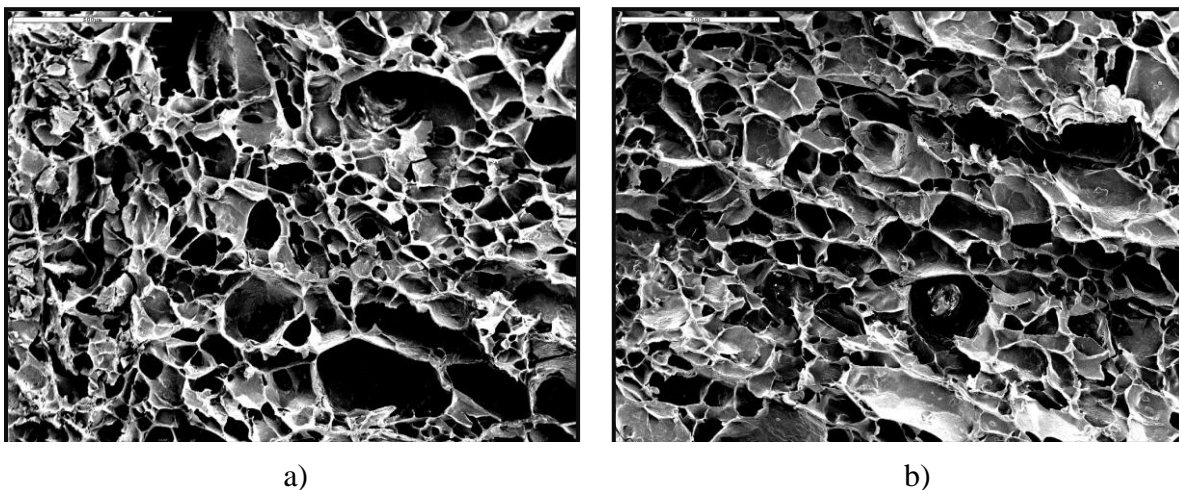
FT-IR spektri za sintetisane uzorke, od P(NiPAAm/IK)–1 do P(NiPAAm/IK)–5, su prikazani na Slici 6.1. U prikazanim spektrima je uočena karakteristična široka traka od 3700-3100  $\text{cm}^{-1}$  koja odgovara vibracijama istezanja OH grupa iz itakonske kiseline i NH grupe iz NiPAAm-a. Pik oko 1720  $\text{cm}^{-1}$  potiče od vibracija karbonilne grupe iz itakonske kiseline<sup>181</sup>. Karakteristične trake u spektru PNiPAAm-a komponente se javljaju na 1650  $\text{cm}^{-1}$  usled C=O vibracija istezanja i C–N vibracija istezanja (amidna traka I) i na 1550  $\text{cm}^{-1}$  usled N–H savijanja uz doprinos C–N vibracija istezanja slabijeg intenziteta (amidna traka II) i 1550  $\text{cm}^{-1}$  usled N–H savijanja uz doprinos C–N vibracija istezanja slabijeg intenziteta, redom<sup>184</sup>. Glavne trake karakteristične za protein, a koje potiču od vibracija peptidnih grupa se javljaju u području 1900-1200  $\text{cm}^{-1}$ <sup>183</sup>.



**Slika 6.1.** FT-IR spektri hidrogelova; (a) P(NiPAAm/IK)–1, (b) P(NiPAAm/IK)–2, (c) P(NiPAAm/IK)–3, (d) P(NiPAAm/IK)–4 and (e) P(NiPAAm/IK)–5.

### 6.2.2. SEM analiza

Na Slici 6.2 prikazane su mikrofografije uzorka P(NiPAAm/IK)–1 i uzorka P(NiPAAm/IK)–4, modifikovanog dodatkom 0,5 mas% Triton X-100 u reakcionu smešu. Prema ovim mikrofografijama, može se zaključiti da se reakcija umrežavanja nije ostvarila uniformno unutar hidrogelova. Veće pore su vidljive kod uzorka sintetisanog bez Tritona X-100. Očigledno, budući da su koncentracije umreživača, lipaze i IK bile konstantne tokom eksperimenta i da su imale uticaja na morfologiju hidrogelova na isti način za sve ispitivane uzorke, njihov uticaj je zanemaren, tako da je dodatak Triton X-100 uzrok razlika u uzorcima. Međutim, iako je očekivano, u ovom slučaju, dodatak Triton X-100 nije značajno uticao na aktivnost enzima.

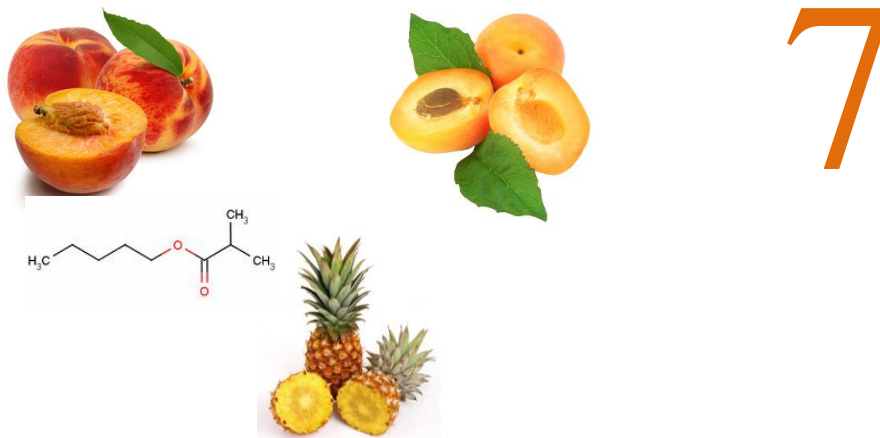


**Slika 6.2.** SEM mikrografije ispitivanih hidrogelova 90/10/2 a) bez dodatog Triton X-100, P(NiPAAm/IK)–1 i b) sa 0,5 mas% Triton X-100, P(NiPAAm/IK)–4, bubrenih do ravnoteže na 37 °C ('bar' 500  $\mu$ m, 70 x).

Na osnovu svih prikazanih rezultata, veličine pora, aktivnosti biokatalizatora i mehaničkih svojstava (Poglavlje 4.5), za sintezu estera odabran je uzorak P(NiPAAm/IK)–1 jer je pokazao najbolja svojstva sa aspekta primene kao biokatalizatora. Zbog toga je za dalji rad odabran uzorak sastava 90/10/2.

## **Zaključak**

Ispitana je modifikacija uslova sinteze biokatalizatora, dodatkom površinski aktivne materije, Triton X-100, i promenom rastvarača u kome se izvodi sinteza po Metodi I. Nasuprot očekivanjima, dodatak Triton X-100 nije povećao aktivnost imobilisane lipaze. Pokazano je da se lipaza najbolje vezuje za nosač ukoliko se imobilizacija izvodi u rastvoru čija je pH vrednost bliska njenoj izoelektričnoj tački. Utvrđeno je da je najbolja svojstva, kao biokatalizator, pokazao uzorak 90/10/2/20.



## 7. Sinteza estra *n*-amil-izobutirata katalizovana imobilisanom lipazom iz *Candida rugosa*

Da bi se ispitala mogućnost primene imobilisane lipaze kao katalizatora, izvedena je sinteza estra *n*-amil-izobutirata esterifikacijom izobuterne kiseline i *n*-amil alkohola u *n*-heksanu. U sintezi estra je kao katalizator korišćena „*in situ*“ imobilisana lipaza, a zatim je izvedena i esterifikacija sa lipazom imobilisanom po Metodi II. Metoda I dala je visok prinos vezane lipaze u iznosu od 98 %, dok je taj prinos za Metodu II iznosio 68 %. Ispitan je uticaj temperature, pH sredine, sadržaj dodate vode i mase biokatalizatora na prinos estra, kao i mogućnost ponovne upotrebe biokatalizatora.

## 7.1. Optimizacija parametara reakcije sinteze estra katalizovane lipazom iz *Candida rugosa*

### 7.1.1. Esterifikaciona sposobnost imobilisane lipaze iz *Candida rugosa*

Optimizovano je vreme potrebno za imobilizaciju lipaze za P(NiPAAm/IK) hidrogelove. Utvrđeno je da je % prinos aktivnosti imobilisane lipaze gotovo konstantan nakon 24 h, kada je u pitanju „*in situ*“ metoda imobilizacije. Takođe je utvrđeno da je aktivnost imobilisane lipaze nakon 48 h bila gotovo ista kao i posle 24 h, što ukazuje da je ukupna masa imobilisane lipaze ugrađena u hidrogel nakon 24 h.

Sposobnost lipaze imobilisane u P(NiPAAm/IK) hidrogel da katalizuje sintezu estra je ispitana u reakciji sinteze *n*-amil-izobutirata, u *n*-heksanu na 45 °C. Ispitan je uticaj različitih parametara kao što su pH, temperatura, sadržaj vode i sadržaj biokatalizatora, dok je molarni odnos kiselina/alkohol u reakciji esterifikacije bio konstantan (230 µL/270 µL). Vreme trajanja reakcije sinteze estra je bilo 48 h za lipazu imobilisanu Metodom I, a za lipazu imobilisanu Metodom II vreme reakcije je bilo 24 h.

### 7.1.2. Uticaj temperature i pH na katalitičku aktivnost lipaze i sintezu estra

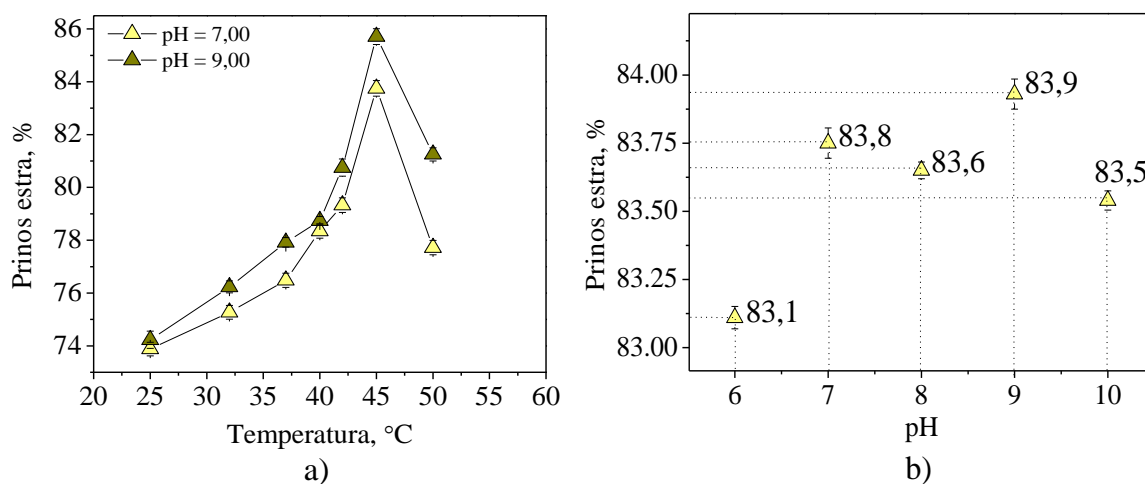
Kao što je poznato, na aktivnost lipaze, a time i na prinos estra, se može uticati promenom pH medijuma u kome se izvodi reakcija. Uticaj pH na sintezu estra je ispitivan u pH opsegu od 6,0 do 10,0 (Slika 7.1 b) i 7.2 b)) na 45 °C. Ranija istraživanja imobilizacije lipaze na različitim nosačima su pokazala da na 45 °C lipaza ima zadovoljavajuću aktivnost i daje zadovoljavajući prinos estra<sup>216-219</sup>. Kao što se može videti sa slike, promena pH okolnog medijuma ne utiče značajno na prinos estra kada se koristi imobilisana lipaza po Metodi I. Prinos se povećava s porastom pH od 6,0 do 7,0, nakon čega blago opada do 8,0 pH, a onda opet raste i dostiže maksimum na pH 9,0. Prinosi na svim posmatranim pH vrednostima bili su iznad 83 %, a maksimalna vrednost je 83,9 % na pH 9,0, ponovo pokazujući povećanu stabilnost imobilisane lipaze. Kada se koristi lipaza imobilisana Metodom II, prinos estra je bio 33,0 % i 55,0%, za pH 6,0 i 8,0, a potom lagano opada. Poredeći prinose estra, očigledno je da se znatno veći prinos postiže ukoliko se reakcija izvodi sa lipazom imobilisanom po Metodi I. Na osnovu prikazanih rezultata utvrđeno je sledeće:



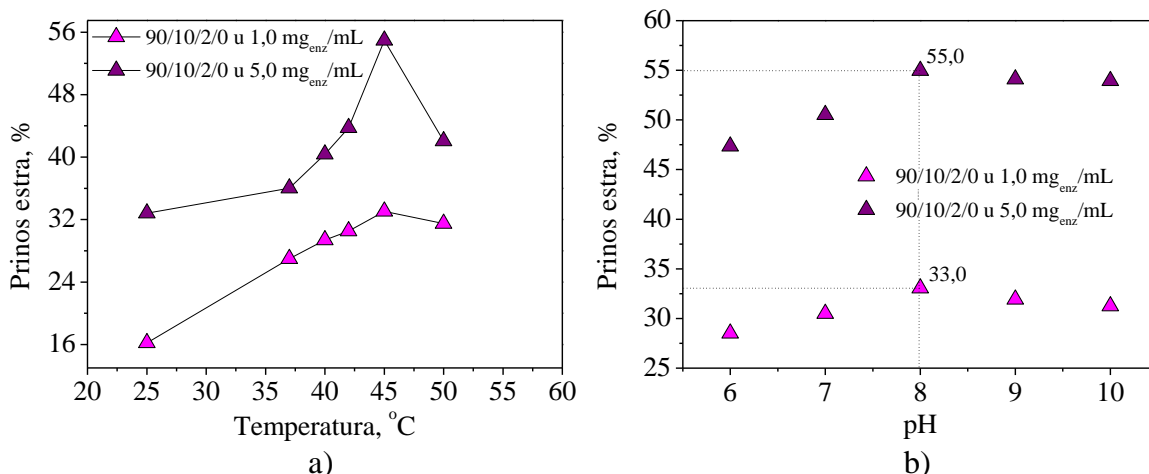
- ukoliko se koristi imobilisana lipaza po Metodi I, dobar prinos estra se dobija za pH 7,0 i 9,0.
- ukoliko se koristi imobilisana lipaza po Metodi II, dobar prinos estra se dobija za pH 8,0.

Ranija istraživanja su pokazala da se promenom temperature reakcije može uticati na aktivnost lipaze, a time i na prinos estra <sup>220</sup>. Zbog toga je ispitan i uticaj temperature na prinos estra. Temperatura je varirana u intervalu od 25 do 50 °C, pri čemu su, za lipazu imobilisanu po Metodi I, ispitivanja izvedena na pH 7,0 i 9,0, a za lipazu imobilisanu po Metodi II, na pH 8,0. Sastav reakcionog sistema je bio sledeći: biokatalizator / pufer određene pH vrednosti / *n*-amil alkohol / izobuterna kiselina / *n*-heksan. Masa biokatalizatora je bila 0,30 g za Metodu I, odnosno 0,20 g za Metodu II.

Slika 7.1 a) i 7.2 a) prikazuje uticaj temperature na reakciju esterifikacije, za obe primenjene metode. Prinos estra je u pH 7,00 bio iznad 84 %, dok je u pH 9,00 bio 85,7 % za Metodu I, odnosno 33,0 % i 55,0% za Metodu II, za uzorke bubrene u 1,0 odnosno 5,0 mg<sub>enz</sub>/mL rastvora, pokazujući dobru stabilnost imobilisane lipaze. Mnogo bolja stabilnost lipaze je postignuta za uzorke imobilisane Metodom I nego Metodom II. Povećanjem temperature iznad 45 °C, prinos estra se smanjuje verovatno usled termičke deaktivacije enzima. Dobra termička stabilnost enzima nakon procesa imobilizacije svakako proširuje njegovu potencijalnu primenu kao biokatalizatora. Dakle, radna temperatura ne bi trebalo da bude veća od 45 °C. Optimalno pH za uzorke kod kojih je lipaza imobilisana Metodom I je oko pH 9, dok je kod uzoraka kod kojih je lipaza imobilisana Metodom II ta vrednost oko 8,00.

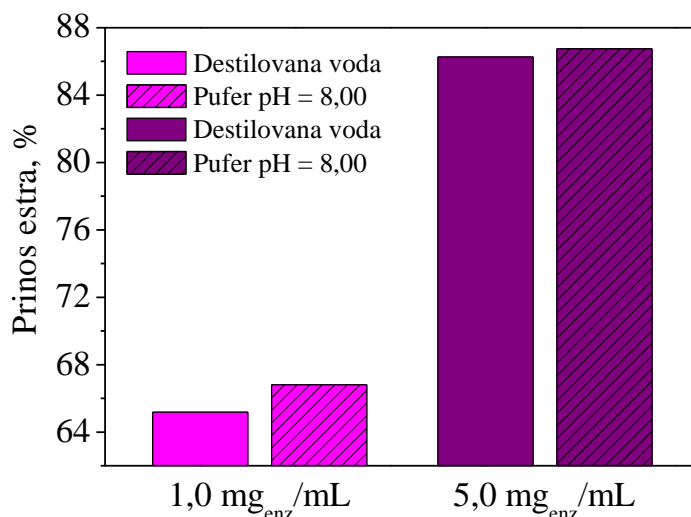


**Slika 7.1.** Uticaj a) temperature i b) pH na reakciju esterifikacije izobuterne kiseline *n*-amil alkoholom u *n*-heksanu katalizovane CRL imobilisanom u P(NiPAAm/IK)–1 hidrogel Metodom I.



**Slika 7.2.** Uticaj a) temperature (200 μL pufera pH 8,00; 0,2000 g biokatalizatora; trajanje ciklusa 24 h) i b) pH (45 °C; trajanje ciklusa 24 h; 0,2000 g biokatalizatora; 200 μL puferskog rastvora) na reakciju esterifikacije izobuterne kiseline *n*-amil alkoholom u *n*-heksanu katalizovanu CRL imobilisanom Metodom II.

Na slici 7.3 je prikazan uticaj početne koncentracije lipaze u rastvoru za bubrenje na prinos estra iz koje se jasno vidi da veća početna koncentracija lipaze daje veći prinos estra, što je i očekivano. Vreme sinteze estra je skraćeno na 24 h, u odnosu na 48 h kod „*in situ*“ metode, ali se prinosi jako mnogo razlikuju kao i ukupna potrošnja biokatalizatora potrebna za postizanje određenog prinosa.

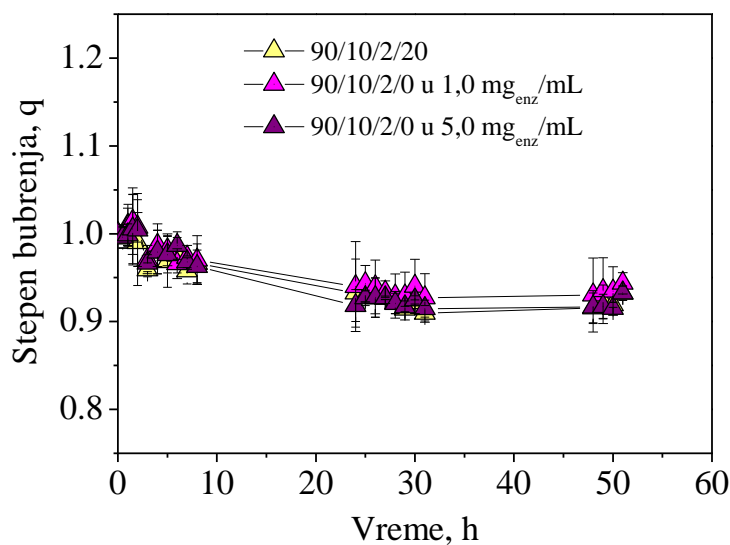


**Slika 7.3.** Uticaj početne koncentracije lipaze u rastvoru za bubrenje na prinos estra u reakciji esterifikacije izobuterne kiseline *n*-amil alkoholom u *n*-heksanu katalizovanu CRL (45 °C; trajanje ciklusa 24 h; 200 μL destilovane vode i puferskog rastvora pH 8,00).

Na kraju se može zaključiti da je optimalna temperatura, za reakciju esterifikacije izobuterne kiseline *n*-amil alkoholom u *n*-heksanu katalizovanu CRL, 45 °C bez obzira na način imobilizacije lipaze. Ukoliko je lipaza imobilisana Metodom I, optimalno pH za reakciju je 9,00, dok za lipazu imobilisanu Metodom II, ta vrednost iznosi 8,00.

### 7.1.3. Bubrenje hidrogelova u *n*-heksanu na 45 °C

Temperatura od 45 °C je odabrana za bubrenje pošto je prethodno utvrđeno da je to optimalna temperatura za sintezu estra. S obzirom da se reakcija esterifikacije izvodi u *n*-heksanu, bilo je neophodno ispitati bubrenje odabranih uzoraka (90/10/2/20 i 90/10/2/0) u ovom rastvaraču na 45 °C (Slika 7.4). Kao što je i očekivano, bubrenje P(NiPAAm/IK) hidrogelova je zanemarljivo u hidrofobnom rastvaraču kao što je *n*-heksan i na temperaturi koja je iznad LCST vrednosti za PNiPAAm hidrogel.



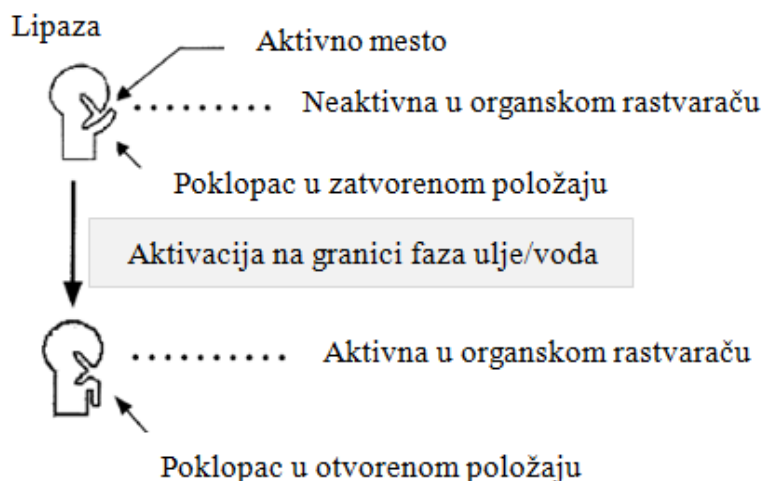
Slika 7.4. Bubrenje hidrogelova u *n*-heksanu na 45 °C

Ispitivanje bubrenja u čistom *n*-heksanu ukazuje da je mali sadržaj vode neophodan za reakciju esterifikacije. Voda ima ulogu „okidača“, odnosno „inicijatora“ reakcije esterifikacije za koje je poznato da se odigravaju na granici faza.

#### 7.1.4. Uticaj sadržaja vode na sintezu *n*-amil-izobutirata katalizovanu imobilisanom lipazom

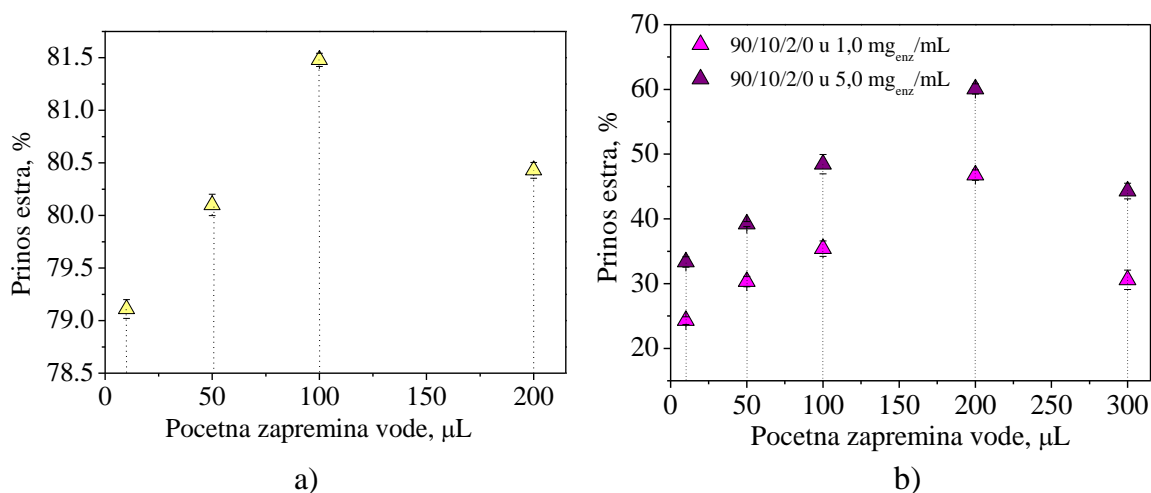
Kao što je poznato, voda ima ključnu ulogu u reakcijama esterifikacije katalizovane lipazama. Voda učestvuje u svim nekovalentnim interakcijama koje zadržavaju otvorenu konformaciju katalitičkog centra lipaze, a sa druge strane, sadržaj vode utiče na konverziju reakcije <sup>221</sup>. Za reakcije esterifikacije posebno važi da se sa povećanjem sadržaja vode dobijaju niže ravnotežne konverzije <sup>222</sup>. Zbog toga je neophodno odrediti optimalan sadržaj vode, odnosno sadržaj vode koji daje dobre prinose. Na zapreminu vode koja se dodaje u reakciju utiče više faktora, kao što su tip nosača, vrsta organskog rastvarača i sadržaj biokatalizatora. U literaturi su dati podaci za slične reakcije u kojima se sadržaj vode kretao u opsegu od 0,2 do 3,0 vol% u odnosu na suvi enzim <sup>223</sup>.

Na Slici 7.5 je prikazan proces aktivacije lipaze. Smatra se da su poklopci („lids“) nativne i imobilisane lipaze zatvoreni usled odsustva granice faza ulje/voda što doprinosi da je aktivno mesto nedostupno supstratu u organskom rastvaraču. Tako, neaktivirana lipaza pokazuje izuzetno malu esterifikacionu aktivnost u *n*-heksanu. U slučaju aktivirane lipaze, poklopci su otvoreni usled prisustva granice faza ulje/voda i u *n*-heksanu, a onemogućeno im je lako zatvaranje usled stabilizacije proteina na koje utiče voda, ali i polarni rastvarač <sup>224</sup>. Aktivno mesto postaje dostupno supstratu u *n*-heksanu, a aktivirana lipaza pokazuje visoku esterifikacionu aktivnost.



**Slika 7.5.** Proces aktivacije lipaze.

U ovom radu je izvedena reakcija esterifikacije sa različitim zapreminama vode u opsegu 0,1 do 2,0 vol%, za lipazu imobilisanu Metodom I, odnosno od 0,1 do 3,0 vol%, za lipazu imobilisanu Metodom II. Prema rezultatima prikazanim na Slikama 7.6 a) i b), uočeno je da dodatak vode u reakcionu smešu aktivira reakciju esterifikacije, kao i da, u oba slučaja, postoji optimalan sadržaj vode koji daje najveći prinos estera. Najveći prinos estera, za biokatalizator dobijen Metodom I, se dobija kada je zapremina dodate vode 1,0 vol%, a u slučaju biokatalizatora dobijenog Metodom II, kada je zapremina dodate vode 2,0 vol%.



**Slika 7.6.** Uticaj zapremine dodate vode na reakciju esterifikacije izobuterne kiseline sa *n*-amil alkoholom u *n*-heksanu katalizovanu CRL imobilisanom a) Metodom I i b) Metodom II u 1,0 i 5,0 mg<sub>enz</sub>/mL rastvora na 45 °C (vreme trajanja ciklusa 48 h; 0,2000 g biokatalizatora).

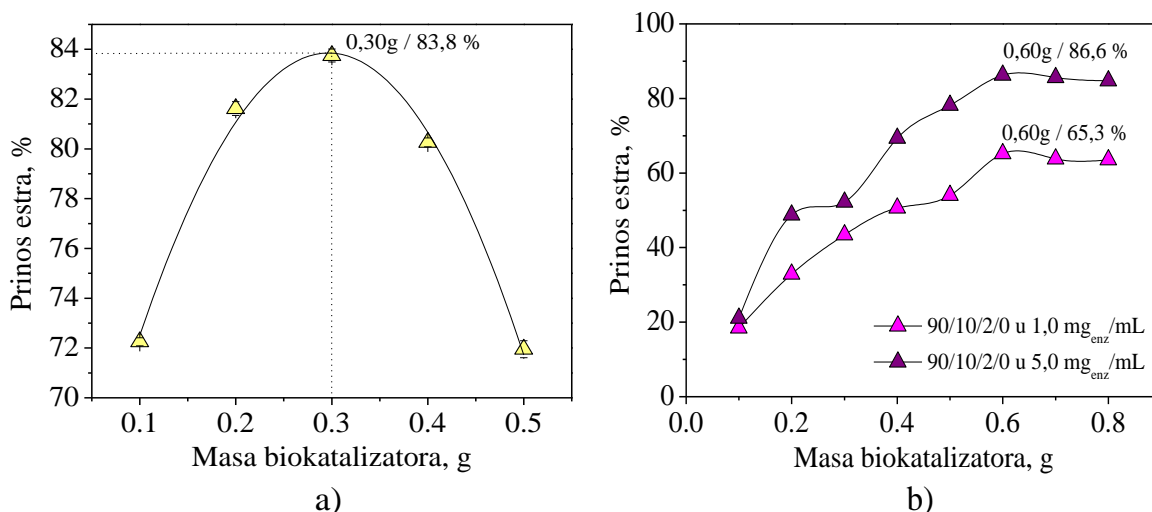
Reakcija esterifikacije je izvedena na 45 °C jer je to optimalna temperatura za prinos estera. Sa druge strane, kapacitet bubrenja hidrogela na toj temperaturi je mali. Kada je zapremina dodate vode veća od 1,0 vol% (Metoda I), odnosno 2,0 vol% (Metoda II), pada prinos estera jer voda direktno učestvuje u reakciji, odnosno inhibira ili kiselinu ili alkohol

#### 7.1.5. Uticaj početne koncentracije lipaze na sintezu *n*-amil-izobutirata

Uticaj mase imobilisane lipaze na reakciju esterifikacije je ispitan za različite sadržaje biokatalizatora, od 0,10 do 0,50 g, (ekivalent masi enzima od 0,0182 do 0,0908 g)

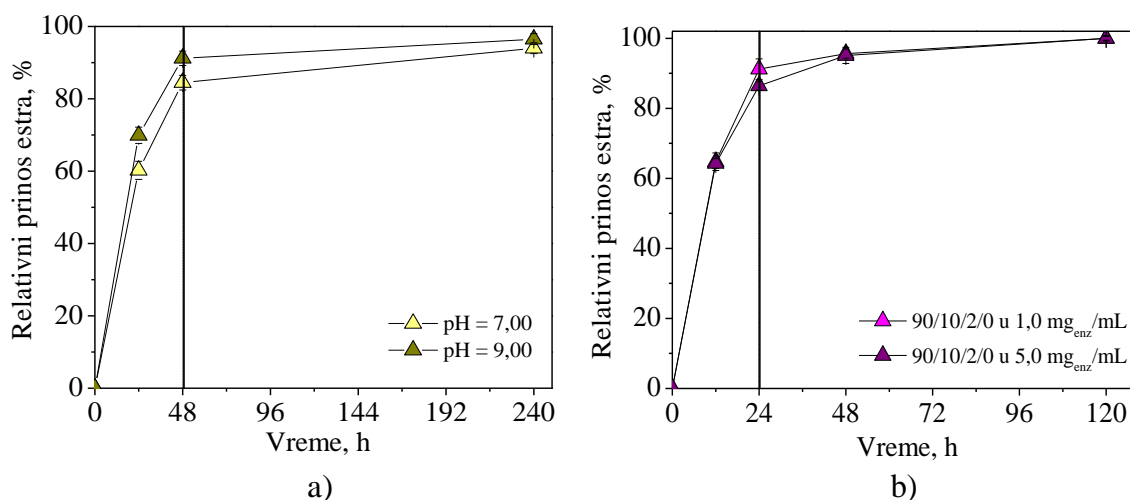
za Metodu I, odnosno od 0,10 do 0,80 g (ekvivalentni masi enzima od 0,0353 do 0,2822 g, za bubrenje u 1,0 mg<sub>enz</sub>/mL pufera pH 7,0 i na 5 °C, odnosno ekvivalentni masi enzima od 0,0230 do 0,1842 g, za bubrenje u 5,0 mg<sub>enz</sub>/mL pufera pH 7,0 i na 5 °C) za Metodu II. Masa ugrađene lipaze je bila konstantna u svim eksperimentima, 20,0 mas% u odnosu na početnu smešu – Metoda I, odnosno 5,0 mg<sub>enz</sub>/mL po Metodi II. Zapremina dodate vode ili puferskog rastvora je bila konstantna (100 µL – Metoda I i 200 µL – Metoda II).

Očigledno je da prinos estra u reakciji esterifikacije raste sa povećanjem mase biokatalizatora 0,10 do 0,30 g (Metoda I), odnosno od 0,1 do 0,6 (Metoda II), a sa daljim porastom opada. Slika 7.7 a) pokazuje da je najveći prinos dobijen kada je masa biokatalizatora pre početka reakcije iznosila 0,30 g za Metodu I, a za Metodu II kada je masa katalizatora na početku reakcije iznosila 0,6 g (Slika 7.7 b)).



**Slika 7.7.** Uticaj mase biokatalizatora na reakciju esterifikacije izobuterne kiseline sa *n*-amil alkoholom u *n*-heksanu katalizovanu CRL imobilisanom a) Metodom I i b) Metodom II u rastvorima različitih koncentracija lipaze a) 1,0 i b) 5,0 mg<sub>enz</sub>/mL rastvora.

Optimalno vreme izvođenja reakcije je 48 sati (Metoda I), odnosno 24 h (Metoda II), a nakon tog vremena prinos estra je praktično konstantan (Slika 7.8 a) i b)). Pokazano je da i brzina reakcije esterifikacije i stepen konverzije rastu sa povećanjem mase imobilisanog enzima.



**Slika 7.8.** Sinteza *n*-amil-izobutirata uz lipazu iz *Candida rugosa* imobilisanu u P(NiPAAm/IK)–1 hidrogel a) Metodom I i b) Metodom II u funkciji vremena na 45 °C pri brzini mešanja od 150 obr/min. Koncentracija izobuterne kiseline i *n*-amil alkohola bila je 0,1 M; reakcija je izvedena u *n*-heksanu pri molarnim odnosom izobuterne kiseline i *n*-amil alkohola 230:270 (μL).

Slika 7.8 a) pokazuje prinos estera u reakciji esterifikacije izobuterne kiseline sa *n*-amil alkoholom u *n*-heksanu na 45 °C u funkciji vremena, katalizovanu lipazom imobilisanom Metodom I. Vidi se da je poluvreme reakcije u puferu pH 7,00 oko 20 sati, dok je za reakcije koje se odvijaju u puferu pH vrednosti 9,00 to vreme nešto manje i iznosi 17 sati, a potpuno iskorišćenje biokatalizatora se javlja nakon skoro 120 h na obe pH vrednosti.

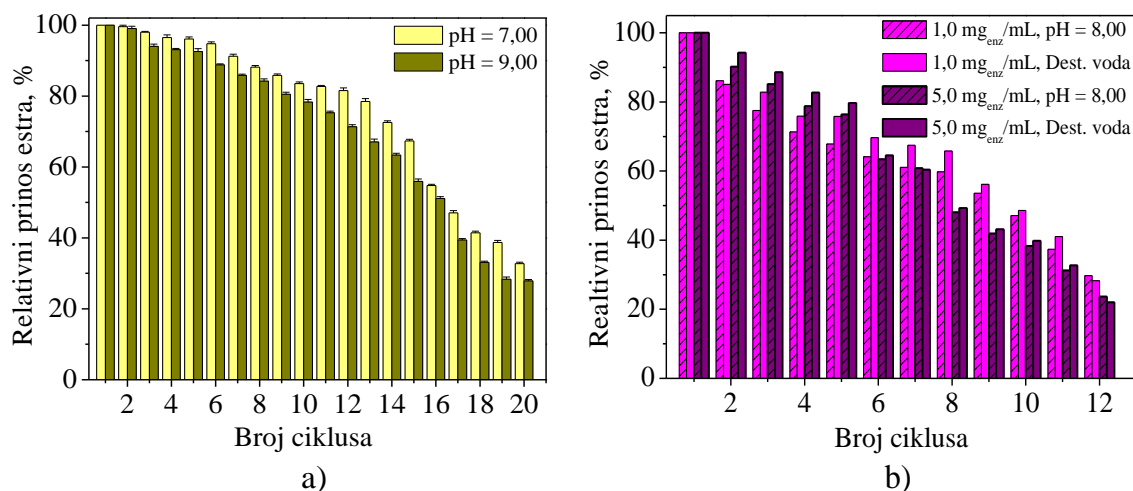
Slika 7.8 b) pokazuje prinos estera u reakciji esterifikacije izobuterne kiseline sa *n*-amil alkoholom u *n*-heksanu na 45 °C u funkciji vremena, katalizovanu lipazom imobilisanom Metodom II pri različitim koncentracijama lipaze. Poluvreme reakcije za hidrogelove bubrene u 1,0 mg<sub>enz</sub>/mL rastvora je oko 9,5 h, a za hidrogelove bubrene u 5,0 mg<sub>enz</sub>/mL rastvora oko 9 sati, dok se potpuna potrošnja biokatalizatora se javlja nakon skoro 72 h na obe koncentracije.

## 7.2. Ispitivanje ponovne primene biokatalizatora

Mogućnost regeneracije enzima kao katalizatora i njegova ponovna upotreba je izuzetno važna za primenu imobilisanih enzima u industriji <sup>213</sup> jer ponovno iskorišćenje

imobilisanih enzima pomaže u snižavanju cene proizvoda i čini enzimski proces ekonomski isplativim.

Reakcija esterifikacije katalizovana lipazom imobilisanom na P(NiPAAm/IK)–1 hidrogel je ponovljena 20 puta. Svaki ciklus je trajao 48 h, a između svakog ciklusa uzorci su sušeni u sušnici do konstantne mase. Kao što je naznačeno na Slici 7.9, nakon prvog ciklusa nije bilo značajnog gubitka u prinosu estera. U narednim ciklusima prinos estera je počeo polako da opada, dok je veći gubitak (40 %) u prinosu estera uočen tek nakon 18. ciklusa najverovatnije usled gubitka materijala uzrokovanog stalnim ispiranje uzorka i/ili mogućnosti da sušenjem voda nije u potpunosti uklonjena iz uzorka.



**Slika 7.9.** Sinteza *n*-amil-izobutirata uz lipazu iz *Candida rugosa* imobilisanu a) Metodom I i b) Metodom II na 45 °C pri brzini mešanja od 150 obr/min. Trajanje ciklusa je bilo 48 h za Metodu I, odnosno 24 h za Metodu II. Koncentracija izobuterne kiseline i *n*-amil alkohola bila je 0,1 M; reakcija je izvedena u *n*-heksanu sa molarnim odnosom izobuterne kiseline i *n*-amil alkohola 230:270 (μL).

Reakcija esterifikacije katalizovana lipazom imobilisanom u hidrogelove Metodom II je ponovljena 12 puta. Svaki ciklus je trajao 24 h, a između svakog ciklusa uzorci su sušeni u sušnici do konstantne mase. Kao što je naznačeno na Slici 7.9, već nakon prvog ciklusa dolazi do značajnijeg gubitka prinosa estera u poređenju sa Metodom I. Esterifikaciona aktivnost uzorka je zadržana do 12. ciklusa. Nakon 9. ciklusa prinos estera opada do 50 %, takođe usled gubitka materijala uzrokovanog stalnim ispiranje uzorka i/ili nemogućnosti da se sušenjem voda u potpunosti ukloni iz uzorka.

Prinos *n*-amil-izobutirata je bio veći od 85 % do 13. ciklusa za prvu metodu imobilizacije, a za drugu metodu do 2. ciklusa. Opadanje prinosa nakon nekoliko ciklusa je verovatno posledica gubitka biokatalizatora tokom filtracije i procesa sušenja, a pri tome se



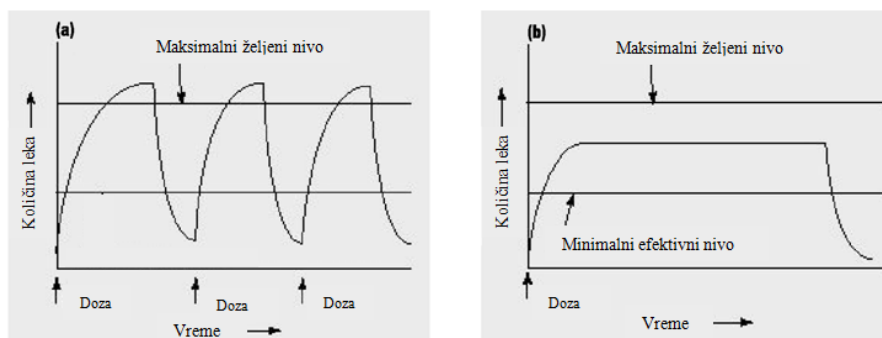
proizvodi veća količina sporednog proizvoda, odnosno vode <sup>207</sup>. Pokazano je da P(NiPAAm/IK)-1 hidrogel može da se koristi kao vrlo stabilan nosač za imobilizaciju CRL i primeni kao biokatalizator, koji i posle 13 ciklusa omogućava prinosa estra veći od 75 %.

Kao što se vidi, lipaza imobilisana Metodom II se pokazala kao lošiji katalizator u odnosu na lipazu koja je imobilisana Metodom I. Pri imobilizaciji Metodom II lipaza se verovatno više veže površinski, pa je zbog toga dostupnija supstratu što smanjuje vreme reakcije esterifikacije. Međutim, zbog toga je bilo i lakše njeno odvajanje od površine ispiranjem, što smanjuje mogućnost ponovne upotrebe katalizatora. To verovatno objašnjava i slabiju stabilnost na skladištenje lipaze imobilisane Metodom II u odnosu na lipazu imobilisanu Metodom I.

## Zaključak

U poglavlju je prikazana sinteza estra *n*-amil-izobutirata u kojoj je P(NiPAAm/IK)–1 hidrogel bio katalizator. Ispitan je uticaj promene reakcionih uslova, kao što su temperatura, pH, sadržaj dodate vode i masa biokatalizatora, jer su to najčešći faktori koji utiču na tok reakcije esterifikacije i prinos estra. Potvrđeno je da se imobilisana lipaza na kopolimerni hidrogel poli(*N*-izopropilakrilamid-*ko*-itakonska kiselina) može koristiti kao katalizator u reakciji sinteze estra *n*-amil-izobutirata. Pri se dobijaju relativno visoki prinosi estra, čak i nakon više ponovljenih ciklusa.

Nakon ispitivanja obe metode imobilizacije enzima utvrđeno je da je Metoda I ekonomičnija i efikasnija od Metode II. Jedini nedostatak Metode I jeste produženo vreme reakcije (48 h) u poređenju sa vremenom trajanja reakcije sinteze estra u kojoj se koristi imobilisana lipaza Metodom II (24 h).



## 8. Ispitivanje mogućnosti primene hidrogelova *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline za kontrolisano otpuštanje terapeutskih proteina

Jedan od najvećih izazova istraživačima predstavlja peroralna primena proteina koja je ograničena zbog enzimske inaktivacije u gastrointestinalnom traktu i slabe permeabilnosti ovih supstanci. Međutim, upotrebom odgovarajućih hidrogelova ovi problemi se mogu prevazići.

Kao što je pokazano u Poglavlju 4, kopolimerni hidrogelovi P(NiPAAm/IK) malo bubrenje na 37 °C pri pH  $2,20 \pm 0,01$ , dok je na istoj temperaturi i pH  $6,80 \pm 0,01$  stepen bubrenja mnogo veći. Zbog toga je ispitana i mogućnost primene P(NiPAAm/IK) hidrogelova kao nosača za otpuštanje terapeutskih proteina u donjem delu GI trakta. Mali stepen bubrenja hidrogelova obezbeđuje da protein bude zaštićen u unutrašnjosti gela od dejstva kiseline u želucu. U neutralnoj i slabo baznoj sredini, kao što je u donjem delu GI trakta, protein se lako otpušta usled bubrenja gela.

### 8.1. Umetanje lipaze u hidrogelove

Lipaza je umetnuta u hidrogelove P(NiPAAm/IK) na dva ranije opisana načina.

Iznos lipaze ugrađene u hidrogelove različitog odnosa P(NiPAAm/IK) Metodom I kada je sadržaj lipaze u početnoj smeši bio konstantan, i iznosio je 20 mas%, prikazan je u Tabeli 8.1. Prosečna standardna devijacija ugrađene lipaze je 0,5 i 7,2 % za 2,0 i 4,0 mas% umreživača, redom, ukazujući da sastav hidrogela nema značajan uticaj na efikasnost ugradnje lipaze. Rezultati pokazuju da je za veći stepen umreženja nešto niža ugradnja enzima, odnosno da se masa umetnute lipaze praktično ne razlikuje kod uzoraka sa 2,0 mas% umreživača, dok je ta razlika nešto veća kod uzoraka sa 4,0 mas% MBA. Efikasnost umetanja proteina je izračunata pomoću sledeće jednačine:

$$\text{Efikasnost umetanja proteina (\%)} = \frac{(\text{Masa vezanog proteina})}{(\text{Početna masa proteina})} \times 100 \quad (11)$$

Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 8.1. Određeno je da se efikasnost umetanja lipaze kreće u opsegu od 77,6 do 95,2 %, što ukazuje da je Metoda I pogodna za umetanje proteina. Ove vrednosti su veće od vrednosti ranije objavljenih u literaturi, za proteine inkorporirane u različite hidrogelove na bazi prirodnih polimera, kao što su alginati<sup>226-228</sup> ili hitozan<sup>10</sup>.

Prilikom umetanja i uklanjanja neproreagovalih materija nakon sinteze, dolazi do gubitka proteina (22,4-4,8 %) u zavisnosti od sastava hidrogela. Moguće je da tokom procesa pranja dolazi do difuzije lipaze iz sistema, usled bubrenja gela u destilovanoj vodi na sobnoj temperaturi<sup>229</sup>.

**Tabela 8.1.** Masa ugrađene lipaze i efikasnost umetanja u P(NiPAAm/IK) hidrogelove.

Uzorak	2,0 mas% umreživača			4,0 mas% umreživača		
	t, h	P <sub>g</sub> , mg/g <sub>ksrogela</sub>	η, %	t, h	P <sub>g</sub> , mg/g <sub>ksrogela</sub>	η, %
85/15	48	188,6	94,3	24	174,5	87,2
90/10	48	188,1	94,1	24	155,3	77,6
95/5	48	189,3	94,6	24	157,0	78,5
100/0	24	190,4	95,2	12	178,7	89,3

t – vreme trajanja polimerizacije; P<sub>g</sub> – masa umetnute lipaze; η – efikasnost umetanja

Efikasnost umetanja lipaze po Metodi II se kretala u opsegu od 3,1 do 96,7 %, u zavisnosti od početne koncentracije rastvora. Sa porastom koncentracije lipaze u rastvoru za bubrenje od 0,2 do 1,0 mg<sub>enz</sub>/mL raste masa umetnute lipaze, ali efikasnost opada. Uočeno ponašanje je rezultat zasićenja površine jer se lipaza, prilikom umetanja ovom tehnikom, više vezuje površinski za hidrogel<sup>230-237</sup>. Dalje, postoje i difuziona ograničenja usled veličine molekula lipaze što ometa da lipaza u većoj meri prodre unutar polimerne matrice tokom procesa bubrenja. Takođe, vezivanje lipaze za površinu nosača olakšava spiranje sa nosača. Takođe, tokom polimerizacije i uklanjanja neproreagovanih materija nakon sinteze hidrogela, dolazi do gubitka proteina.

**Tabela 8.2.** Masa umetnute lipaze i efikasnost umetanja Metodom II za uzorke 95/5/2/0 i 95/5/4/0 bubrene do ravnoteže u rastvorima različitih početnih koncentracija lipaze (C).

C, mg/mL	95/5/2/0			95/5/4/0		
	t, h	P <sub>g</sub> , mg/g <sub>ksrogela</sub>	η, %	t, h	P <sub>g</sub> , mg/g <sub>ksrogela</sub>	η, %
0,2	48	97,9	96,7	24	74,7	95,0
1,0	48	337,8	84,0	24	202,8	43,0
5,0	48	335,6	14,5	24	217,6	11,1
10,0	48	321,0	8,4	24	215,2	6,1
20,0	48	365,7	4,4	24	264,3	3,1

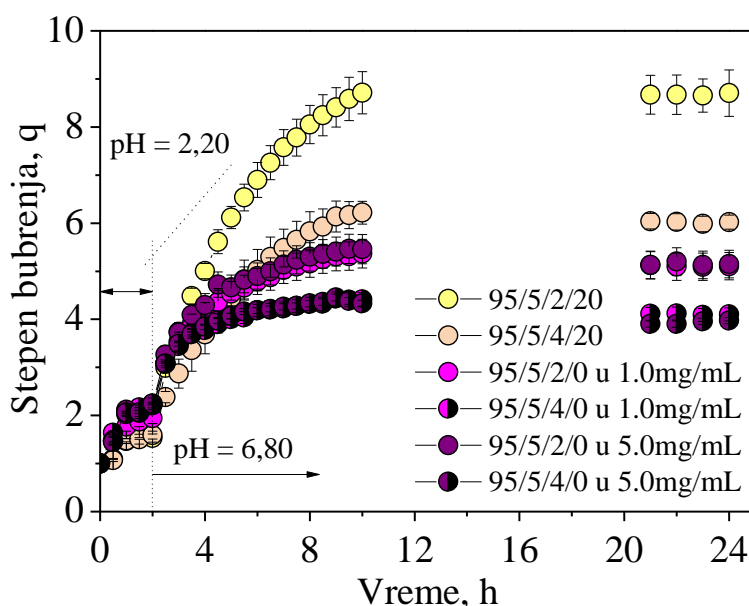
t – vreme trajanja polimerizacije; P<sub>g</sub> – masa umetnute lipaze; η – efikasnost umetanja

Vreme polimerizacije za ove uzorke bilo je 48 h za uzorak sa 2 mas% MBA, odnosno 24 h, za uzorak sa 4 mas% MBA. Uzorci 95/5/2/0 i 95/5/4/0 su korišćeni radi poređenja sa uzorcima kod kojih je lipaza umetnuta „*in situ*“ metodom u cilju ispitivanja efikasnosti umetanja i kontrolisanog otpuštanja lipaze.

## 8.2. Ispitivanje bubrenja simulacijom pH vrednosti u gastrointestinalnom traktu

Ispitana je kinetika bubrenja za različite uzorke P(NiPAAm/IK) hidrogelova kod kojih je lipaza umetnuta pomoću dve različite metode (Metode I i II). S obzirom da je cilj

bio da se ispita potencijalna primena ovih hidrogelova za kontrolisano otpuštanje lekovite supstance, ispitivanja su izvedena simulacijom uslova u GI traktu. Bubrenje uzoraka je praćeno na 37 °C u rastvorima čija je pH vrednost iznosila  $2,20 \pm 0,01$  i  $6,80 \pm 0,01$  jer simuliraju uslove u želucu i u donjem delu GI trakta (Slika 8.1). Bubrenje ovih uzoraka je izvedeno tako što su uzorci potopljeni u pufer pH  $2,20 \pm 0,01$  tokom 2 h, a potom prebaćeni u pufer pH  $6,80 \pm 0,01$  da bubre naredna 22 sata, tako da je ukupno vreme bubrenja bilo 24 h. Cilj je bio da se simulira ukupno vreme boravka proteina u GI traktu. Kinetika bubrenja uzoraka praćena je na svakih pola sata prvih 10 h, a tokom poslednja 4 sata na svakih sat vremena.



**Slika 8.1.** Zavisnost stepena bubrenja od vremena za 95/5/2/20 i 95/5/4/20 hidrogelove (Metoda I) i 95/5/2/0 i 95/5/4/0 (Metoda II) bubrenih u rastvorima lipaze različitih koncentracija na 37 °C.

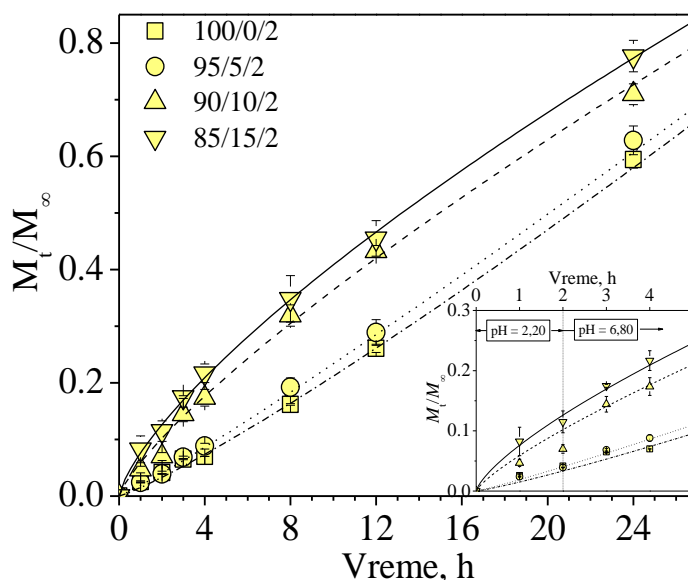
### 8.3. Kinetika otpuštanja lipaze iz hidrogelova

U cilju ispitivanja primene P(NiPAAm/IK) hidrogelova kao matrica za kontrolisano otpuštanje terapijskih proteina, praćeno je otpuštanje lipaze, umetnute Metodom I i II, iz hidrogelova različitog sastava. Srednje vrednosti otpuštene lipaze su predstavljene normalizovanim krivama sa standardnim devijacijama, koje su za sve ispitivane uzorke bile manje od  $\pm 5 \%$ , računato na srednje vrednosti merenja (Slike 8.2-8.5).

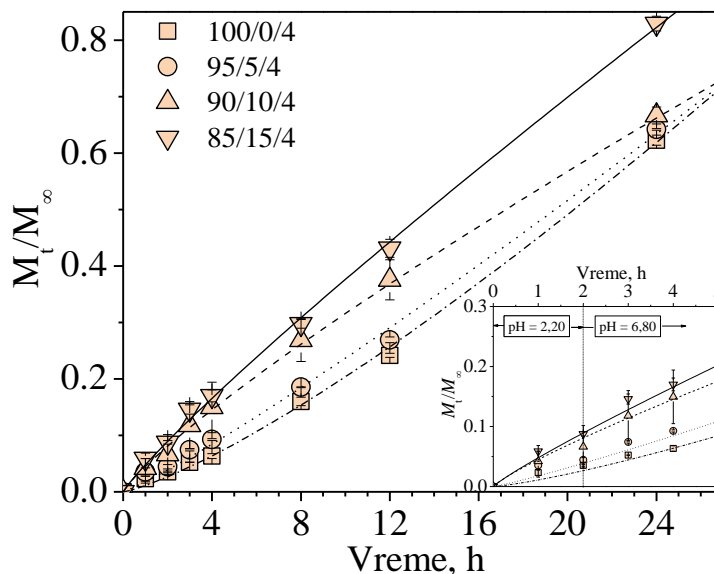
### 8.3.1. Otpuštanje „in situ“ umetnute lipaze

Rezultati otpuštanja lipaze, „in situ“ umetnute u P(NiPAAm/IK) hidrogelove, su prikazani na Slikama 8.2 i 8.3. Do 3,5 % lipaze se otpusti na pH 2,20 što je posledica malog bubrenja hidrogelova, dok na pH 6,8 taj procenat ide do 26 % za prvih 24 h i zavisi od koncentracije itakonske kiseline u uzorcima. Hidrogelovi sa manjim sadržajem IK generalno sporije otpuštaju lipazu. Naime, svega 16,7 % lipaze se oslobodi nakon 24 h iz uzorka 100/0/4/20, dok se 25,7 % otpusti iz hidrogela 90/10/4/20, što potvrđuje da prisustvo itakonske kiseline, čak i u malom procentu, utiče na porast sadržaja otpuštene lipaze jer raste stepen bubrenja.

Na osnovu dobijenih rezultata određeno je vreme otpuštanja lipaze i ukupna masa otpuštene lipaze. Procenat lipaze koji je otpušten iz hidrogelova za 7 dana bio je u rasponu od 21,3 % do 34,1 %, u zavisnosti od sastava hidrogela. Iz prikazanih rezultata se vidi da je samo jedan deo od ukupno umetnute lipaze otpušten što može biti posledica relativno malog stepena bubrenja hidrogela na 37 °C tako da lipaza ostaje zarobljena u polimernoj mreži <sup>226</sup>. Na Slikama 8.2 i 8.3 se može videti da kopolimeri sa 2 mas% i 4 mas% umreživača i najnižeg sadržaja IK, 95/5/2 i 95/5/4, pokazuju sporije otpuštanje nego kopolimeri sa višim sadržajima IK, bez obzira na koncentraciju umreživača.



**Slika 8.2.** Srednje normalizovane kumulativne vrednosti otpuštene lipaze ( $M_t/M_{\infty}$ ) u funkciji vremena za hidrogelove P(NiPAAm/IK) sa 20 mas% lipaze i 2,0 mas% umreživača na 37 °C. Rezultati su prikazani za prvih 60 % procesa otpuštanja (85/15 —; 90/10 - -; 95/5 ...; 100/0 -.-).



**Slika 8.3.** Srednje normalizovane kumulativne vrednosti otpuštene lipaze ( $M_t/M_{\infty}$ ) u funkciji vremena za hidrogelove P(NiPAAm/IK) sa 20 mas% lipaze i 4,0 mas% umreživača na 37 °C. Rezultati su prikazani za prvih 60 % procesa otpuštanja (85/15 —; 90/10 - -; 95/5 ...; 100/0 -.-).

Ponašanje ovih hidrogelova pri otpuštanju lipaze je veoma složeno. Na temperaturi od 37 °C njihovo ponašanje zavisi od sastava i pH, na koje utiču kako polimer-polimer interakcije, tako i interakcije polimer-rastvarač. Svi ispitivani hidrogelovi, 90/10/2/20, 85/15/2/20, 90/10/4/20 i 85/15/4/20, pokazuju bifazni profil otpuštanja lipaze, kao i sporije otpuštanje na pH 2,20 u prvih 2 h, a brže na pH 6,80, usled pH osetljive prirode uzoraka (Slike 8.2 i 8.3, mali dijagrami). S druge strane, kod homopolimera 100/0/2/20 i 100/0/4/20 i uzoraka sa najnižim sadržajem itakonske kiseline, 95/5/2/20 i 95/5/4/20, ovakva razlika u brzinama otpuštanja nije izražena.

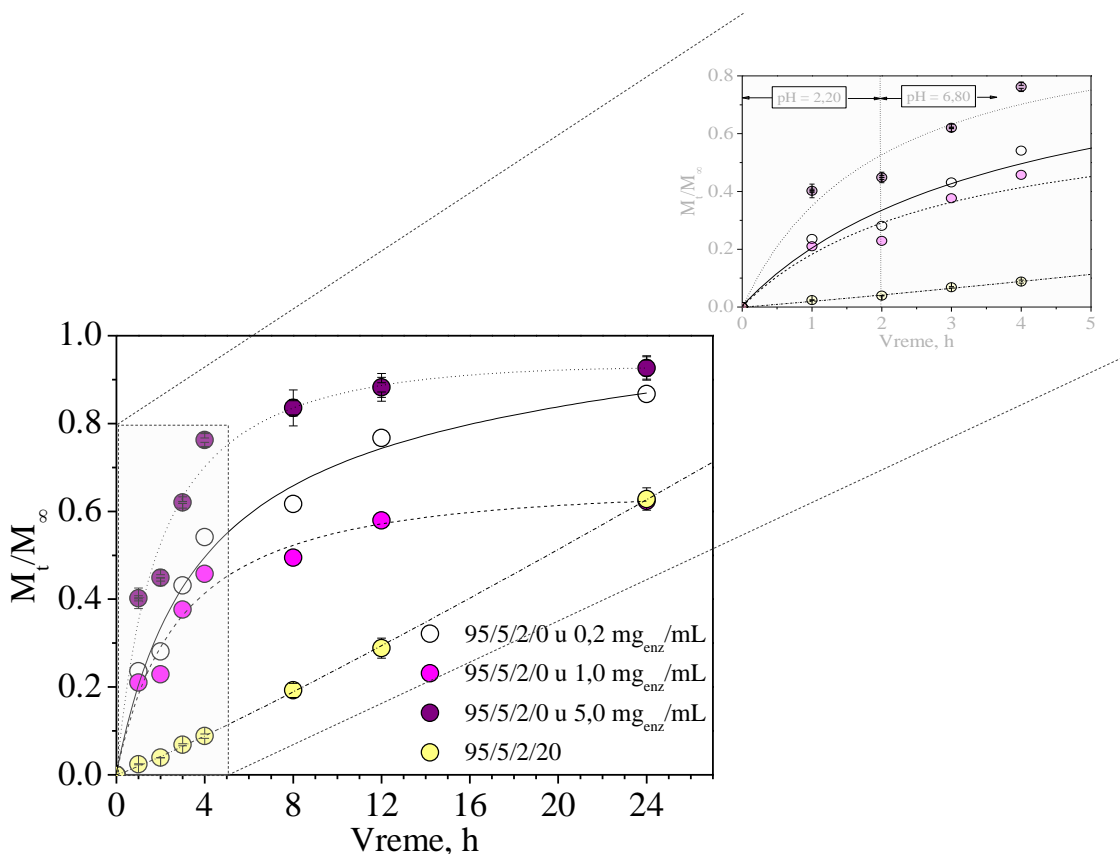
*In vitro* ispitivanja otpuštanja lipaze su pokazala da ne postoji inicijalni „efekat pucanja“, odnosno da ne dolazi do inicijalnog otpuštanja lipaze i da nema naglog porasta u koncentraciji otpuštene lipaze, što sugeriše da su kod umetanja Metodom I svi molekuli lipaze smešteni uglavnom u unutrašnjosti hidrogela. Svi uzorci pokazuju produženo otpuštanje, gde je procenat otpuštene lipaze u toku 24 h bio u opsegu od 54,2 do 82,9 %, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima za otpuštanje proteinskih lekova 226,238



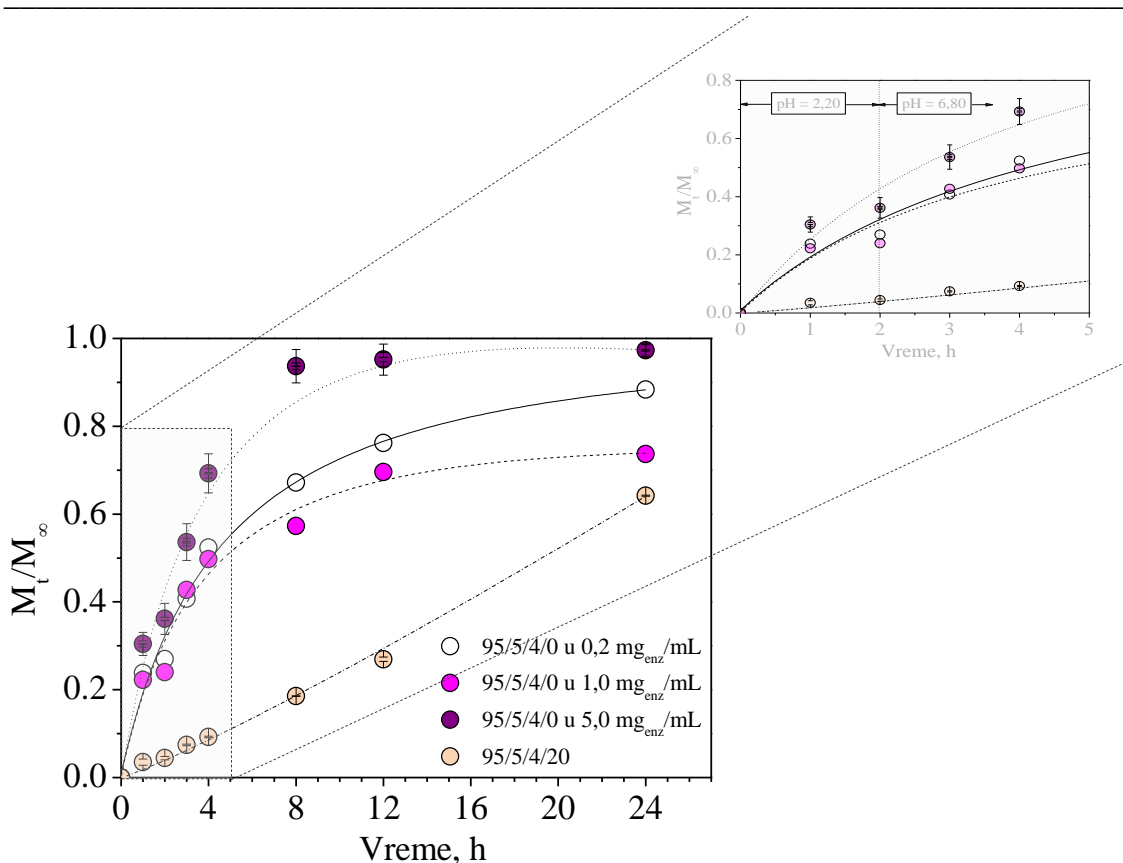
### 8.3.2. Otpuštanje lipaze umetnute bubrenjem hidrogelova u rastvoru

U slučaju umetanja lipaze Metodom II, na pH 2,20 se otpusti između 22 i 55 % lipaze, za uzorak 95/5/2/0 i između 25 i 35 % lipaze za uzorak 95/5/4/0. Pri porastu pH taj procenat dostiže skoro maksimum za prvih 24 h. Za uzorke sa većim stepenom umreženja se vezalo manje lipaze iz rastvora (Tabela 8.2), pa se manje i otpušta. Međutim, otpuštanje lipaze je još uvek jako brzo u odnosu na Metodu I.

Ispitivanja na ovim hidrogelovima su pokazala da oni sa manjim sadržajem MBA generalno brže otpuštaju lipazu. Naime, od 62 do 93 % lipaze se oslobodi nakon 24 h iz uzorka sa 2 mas% MBA, dok se od 73 do preko 97 % otpusti iz hidrogela sa 4 mas% MBA, što potvrđuje da i prisustvo umreživača, utiče na brzinu otpuštanja proteina. Dodatak umreživača smanjuje mogućnost vezivanja proteina iz rastvora, pa je manje otpuštanje lipaze na obe ispitivane pH vrednosti (Slike 8.4 i 8.5).



**Slika 8.4.** Srednje normalizovane kumulativne vrednosti otpuštene lipaze ( $M_t/M_{\infty}$ ) u funkciji vremena na 37 °C za hidrogelove P(NiPAAm/IK) sa 2,0 mas% umreživača kod kojih je lipaza umetnuta bubrenjem.



**Slika 8.5.** Srednje normalizovane kumulativne vrednosti otpuštene lipaze ( $M_t/M_\infty$ ) u funkciji vremena na 37 °C za hidrogelove P(NiPAAm/IK) sa 4,0 mas% umreživača kod kojih je lipaza umetnuta bubrenjem.

I u ovom slučaju je utvrđen bifazni profil otpuštanja lipaze<sup>239</sup>, odnosno da se javlja inicijalna faza brzog otpuštanja na pH 2,20 u prvih 2 h, a potom sledi sporije otpuštanje na pH 6,80. Rezultati *in vitro* ispitivanja kinetike otpuštanja ukazuju da je većina molekula lipaze vezana na površini hidrogela, a manji broj njih unutar matrice. Procenat otpuštene lipaze u toku 24 h kretao se u opsegu od 60,2 do čak 97,4 %, tako da nema produženog otpuštanja. Kinetika otpuštanja lipaze je analizirana pomoću Pepasovog matematičkog modela za prvih 60 % procesa otpuštanja lipaze<sup>240,241</sup>:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (12)$$

gde je  $M_t$  ukupna kumulativna masa oslobođene lipaze u vremenu  $t$ ,  $M_\infty$  ukupna kumulativna masa oslobođene lipaze u stanju ravnoteže,  $k$  je konstanta bubrenja, a  $n$  je difuzioni eksponent na osnovu koga se može odrediti mehanizam transporta<sup>102</sup>. Kada  $n$  ima vrednost 1, otpuštanje lekovite supstance je nezavisno od koncentracije i vremena, što odgovara kinetici otpuštanja nultog reda. Ukoliko je  $n$  manje od 0,5 difuzija se odvija prema Fikovom zakonu, a ako je  $n$  između 0,5 i 1, na otpuštanje utiču difuzija i relaksacija polimera.

Logaritmovanjem jednačine (12) i primenom modela za prvih 60 % procesa oslobađanja lipaze <sup>240</sup> izračunate su konstante  $k$  i  $n$  i prikazane u Tabeli 8.3, a dato je i poluvreme reakcije otpuštanja  $M_t/M_\infty = 0,5$ . Kinetički parametri za uzorke sa 10 i 15 mas% itakonske kiseline nisu prikazani jer zavisnost otpuštene lipaze od vremena za prvih 60 % procesa nije bila linearna, tako da nije bilo moguće izračunati parametre  $k$  i  $n$  primenom ovog modela. Izračunate vrednosti za  $n$  su niže od 0,5 što ukazuje da se transport lipaze odvija prema Fikovom zakonu, tj. difuzijom kroz hidrogel <sup>240</sup>.

Kad je u pitanju umetanje proteina po Metodi I, hidrogelovi sa većim sadržajem itakonske kiseline i/ili nižeg stepena umreženja poseduju veće brzine otpuštanja, ukazujući da je sa porastom bubrenja manji otpor difuziji. Tako, za date uzorke,  $t_{1/2}$  varira od 13,2 do 20,8 h. Takođe je važno reći da hidrogelovi sa 20 mas% lipaze, 95/5/2/20 i 95/5/4/20, prate kinetiku otpuštanja koja je vrlo bliska kinetici nultog reda, što je u skladu sa podacima iz literature <sup>242</sup>. U slučaju kada je lipaza umetnuta bubrenjem, hidrogelovi nižeg stepena umreženja pokazuju veće brzine otpuštanja, što je posledica manjeg otpora difuziji sa porastom bubrenja. Tako, za date uzorke,  $t_{1/2}$  varira od 1,8 do 6,6 h.

Poređenjem ove dve metode došlo se do zaključka da otpuštanje lipaze prati kinetiku blisku nultom redu <sup>242</sup> kada je lipaza umetnuta u hidrogel „*in situ*“ metodom. Rezultati pokazuju da je uticaj pH vrednosti okolnog medijuma na kinetiku otpuštanja lipaze manje izražen nego način vezivanja lipaze za nosač.

**Tabela 8.3.** Konstanta bubrenja, difuzioni eksponent i veličina pora za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sa 20 mas% lipaze umetnute „*in situ*“ polimerizacijom.

Uzorak	$pH = 2,20 \pm 0,01 (2h) \rightarrow pH = 6,80 \pm 0,01 (24h) \text{ at } 37^\circ C$				SA, IU/mg $\times 10^2$
	$k, h^{-1}$	$n$	$t_{1/2}, h$	$\xi, nm$	
85/15/2	-	-	13,23	2,686	48,4
90/10/2	-	-	15,15	1,876	43,2
95/5/2	0,019	1,02	19,51	1,095	41,0
100/0/2	0,015	1,09	20,75	0,205	36,5
85/15/4	-	-	13,75	2,268	43,9
90/10/4	-	-	17,22	1,223	42,5
95/5/4	0,018	1,05	19,44	0,726	40,0
100/0/4	0,011	1,12	20,29	0,164	35,4

Za praktičnu primenu je veoma važno da protein zadrži biološku aktivnost nakon otpuštanja. Zbog toga je nakon 96 h ispitana aktivnost otpuštene lipaze standardnom metodom na emulziji maslinovog ulja, a rezultati su prikazani u Tabeli 8.3. Utvrđeno je da je aktivnost lipaze, umetnute „*in situ*“ metodom, očuvana za sve ispitane hidrogelove, naročito pri pH 2,20 u kom bi inače došlo do potpune inaktivacije nativnog enzima nakon vrlo kratkog vremena. Veće vrednosti specifične aktivnosti su dobijene za hidrogelove u kojima je sadžaj itakonske kiseline bio veći. Najveću vrednost zadržane enzimske aktivnosti otpuštene lipaze omogućio je uzorak 85/15/2/20, u iznosu od oko 0,5 IU/mg. Neznatno niže vrednosti specifične aktivnosti su dobijene za ostale uzorke (STD = 10,1 %).

Za umetanje lipaze metodom bubrenja je utvrđeno da je mala aktivnost otpuštene lipaze, svega 1,2 IU/mg<sub>enz</sub> (za uzorak 95/5/4/0 u 1,0 mg<sub>enz</sub>/mL) i 2,1 IU/mg<sub>enz</sub>, (za uzorak 95/5/2/0 u 5,0 mg<sub>enz</sub>/mL), verovatno usled naglog otpuštanja lipaze i njene brze deaktivacije. To ukazuje da primenjena metoda nije dobar način za umetanje proteina i njegovo otpuštanje iz hidrogela.

## Zaključak

U ovom Poglavlju je ispitana potencijalna primena P(NiPAAm/IK) kopolimernih hidrogelova za kontrolisano otpuštanje lipaze u donjem delu GI trakta. Umetanje lipaze je izvedeno na dva načina, „*in situ*“ polimerizacijom i bubrenjem hidrogelova u rastvoru lipaze određene koncentracije, pH vrednosti i temperature.

Ispitano je bubrenje ovih uzoraka simulacijom pH vrednosti u GI traktu, efikasnost ugradnje lipaze u hidrogelove i njen profil otpuštanja. Ustanovljeno je da se podešavanjem sastava i stepena umreženja mogu podesiti uslovi kako bi se sintetisali hidrogelovi pogodni za kontrolisano otpuštanje lipaze i molekula slične molekulske mase sa visokim očuvanjem enzimske aktivnosti otpuštenog proteina.

Utvrđeno je da profil i kinetika otpuštanja lipaze zavise od pH okruženja i sastava hidrogela. Otpuštanje lipaze je znatno brže ukoliko je lipaza umetnuta Metodom II. Ukoliko se želi da se postigne nešto sporije otpuštanje, lipazu bi trebalo umetati Metodom I, koja se ujedno pokazala kao efikasnija za vezivanje lipaze. Sastav P(NiPAAm/IK) hidrogelova se može podesiti tako da zaštiti lekovitu supstancu tokom njenog boravka u kiseloj sredini kao što je želudac i da je otpustiti u donjem delu GI trakta.



# DEO IV

---

## *Zaključna razmatranja*

### POGLAVLJE 9

*Zaključak*



## 9. Zaključak

U radu su sintetisani P(NiPAAm/IK) homo- i kopolimerni hidrogelovi i primenjeni kao nosači za imobilizaciju lipaze iz *Candida rugosa*. Imobilizacija lipaze je izvedena na dva načina: bubrenjem prethodno sintetisanih hidrogelova u rastvoru enzima i „*in situ*“ polimerizacijom, odnosno dodatkom lipaze u reakcionu smešu pre početka reakcije polimerizacije i umrežavanja. Hidrogelovi, sintetisani bez i u prisustvu lipaze, su karakterisani bubrenjem u puferima različitih pH vrednosti, ispitivanjem mehaničkih svojstava, FT-IR, SEM, UV/Vis i AFM analizom. Ispitana je primena imobilisane lipaze kao katalizatora u reakciji sinteze mirisnog estera, *n*-amil-izobutirata, u *n*-heksanu. U radu je takođe ispitana i mogućnost primene sintetisanih hidrogelova za kontrolisano otpuštanje terapijskih proteina simulacijom pH vrednosti u GI traktu.

Na osnovu dobijenih rezultata došlo se do sledećih zaključaka:

- Na stepen bubrenja, veličinu pora i mehanička svojstva P(NiPAAm/IK) hidrogelova utiče odnos monomera, stepen umreženja, sadržaj lipaze, pH i temperatura okolnog medijuma.

- Imobilizacija enzima utiče na fizičko-hemijske karakteristike rezultujućeg hidrogela. S druge strane, struktura hidrogela ima značajan uticaj na ponašanje imobilisanog enzima.

- Masa i aktivnost imobilisane lipaze zavise od metode imobilizacije, početne koncentracije lipaze, temperature i pH vrednosti na kojoj se izvodi imobilizacija, kao i od sastava hidrogela.

- „*In situ*“ imobilizacija lipaze se pokazala kao bolja metoda sa aspekta složenosti izvođenja, veće aktivnosti imobilisane lipaze, ekonomičnosti i efikasnosti.

- Imobilisana lipaza, bez obzira na metodu imobilizacije, je pokazala bolju stabilnost pri skladištenju u odnosu na nativnu lipazu. Visoka katalitička aktivnost se zadržava pri skladištenju na -20 °C, dok je sa porastom temperature zabeležen pad stabilnosti.

- Promena reakcionih uslova, temperature, pH, sadržaja dodate vode i mase biokatalizatora, utiče na tok reakcije esterifikacije i prinos estra. Visoki prinosi estra se dobijaju i nakon više ponovljenih ciklusa. Utvrđeno je da je “*in situ*” imobilisana lipaza (Metoda I) ekonomičnija i efikasnija od metode bubrenja kserogelova u rastvoru lipaze (Metoda II). Jedini nedostatak Metode I je produženo vreme reakcije u poređenju sa vremenom trajanja ciklusa po Metodi II. Za primenu imobilisane lipaze kao biokatalizatora za sintezu estra, najbolja svojstva pokazao je hidrogel 90/10/2/20 (Metoda I).

- Nasuprot očekivanjima, dodatak površinski aktivne materije, Triton X-100, nije značajno uticao na aktivnost imobilisane lipaze.

- Profil i kinetika otpuštanja lipaze zavise od pH okruženja i sastava hidrogela. Otpuštanje lipaze je znatno brže ukoliko se lipaza imobilisuje Metodom II.

- Sastav P(NiPAAm/IK) hidrogelova se može podesiti tako da zaštiti lekovitu supstancu tokom njenog boravka u kiseloj sredini kao što je želudac i da je otpustiti u donjem delu GI trakta.

Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da se P(NiPAAm/IK) hidrogelovi mogu koristiti kao matrice za imobilizaciju enzima i kao nosači za kontrolisano otpuštanje proteina. Koju će od ove dve uloge imati P(NiPAAm/IK) hidrogel zavisi od odnosa komonomera i stepena umreženja. Za imobilizaciju lipaze i primenu kao biokatalizatora u reakciji sinteze estra optimalni sastav hidrogela je 90/10/2. S druge strane, za kontrolisano otpuštanje lipaze u donjem delu GI trakta zadovoljavajuća svojstva pokazao je hidrogel sastava 95/5/4.



## LITERATURA

1. *Hydrogels in pharmaceutical formulations.* Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. 2000, Eur. J. Pharm. Biopharm., Vol. 50, pp. 27-46.
2. *Enzyme immobilization: The quest for optimum performance.* Sheldon, R.A. 2007, Adv. Synth. Catal., Vol. 349, pp. 1289-1307.
3. *Environment-sensitive hydrogels for drug delivery.* Qiu, Y., Park, K. 2001, Adv. Drug Deliver. Rev., Vol. 53, pp. 321-339.
4. *Biodegradable and biocompatible thermosensitive polymer based injectable implant for controlled release of protein.* Tang, Y., Singh, J. 2009, Int. J. Pharm., Vol. 365, pp. 34-43.
5. *Synthesis of a chemically-crosslinked thermo-sensitive hydrogel film and in situ encapsulation of model protein drugs.* Wang, B., Zhu, W., Zhang, Y., Yang, Z., Ding, J. 2006, React. Funct. Polym., Vol. 66, pp. 509-518.
6. *Immobilization of lipase on hydrogels: Structural aspects of polymeric matrices as determinants of enzyme activity in different physical environments.* Chauhan, G.S., Mahajan, S., Siddiqui, K.M., Gupta, R. 2004, J. Appl. Polym. Sci., Vol. 92, pp. 3135-3143.
7. *Simple method for preparation of ultra-thin poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel layers and characterization of their thermo-responsive properties.* Hirata, I., Okazaki, M., Iwata, H. 2004, Polymer, Vol. 45, pp. 5569-5578.
8. *New hydrogels based on N-isopropylacrylamide copolymers crosslinked with polylysine: membrane immobilization systems.* Percot, A., Lafleur M., Zhu X.X. 2000, Polymer, Vol. 41, pp. 7231-7239.
9. *Preparation of poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels and their drug release behavior.* Taşdelen, B., Kayaman-Apohan, N., Güven, O., Baysal, B.M. 2004, Int. J. Pharm., Vol. 278, pp. 343-351.
10. *Effects of preparative parameters on the properties of chitosan hydrogel beads containing Candida rugosa lipase.* Alsarra, I.A., Neau, S.H., Howard, M.A. 2004, Biomaterials, Vol. 25, pp. 2645-2655.
11. *Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications.* Rzaev, Z.M.O., Dinçer, S., Pişkin, E. 2007, Prog. Polym. Sci., Vol. 32, pp. 534-595.

12. **Knezević, Z.** *Imobilisane lipaze kao katalizatori, Monografija Zadružbine Andrejević.* Beograd : Zadružbina Andrejević, 2004.
13. *What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach.* **Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T. and Petersen, S.B.** 2000, *Biochimie*, Vol. 82, pp. 1033-1041.
14. *Production, purification, characterization, and applications of lipases.* **Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U.C.** 19, 2001, *Biotechnol. Adv.*, pp. 627-662.
15. *Enzyme-catalyzed processes in organic solvents.* **Zaks, A., Klibanov, A.M.** 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 82, pp. 3192-3196.
16. *Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry.* **Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S., Gulati, R.** 1999, *Curr. Sci.*, Vol. 77, pp. 101-115.
17. *Industrial applications of microbial lipases.* **Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A.** 2006, *Enzyme Microb. Tech.*, Vol. 39, pp. 235-251.
18. *Influence of the conformational flexibility on the kinetics and dimerisation process of two Candida rugosa lipase isoenzymes.* **Pernas, M.A., Lopez, C., Luisa Rua, M., Hermoso, J.** 2001, *FEBS Letters*, Vol. 501, pp. 87-91.
19. **Lotti, M., Brocca, S., Fusetti, F., Alberghina, L.** *Expression of recombinant Candida rugosa lipase.* Gent : Med. Fac. Landbouww, University of Gent, 1994. pp. 2313-2319. Vol. 59.
20. *Variability within the Candida rugosa lipases family.* **Lotti, M., Tramontano, A., Longhi, S., Fusetti, F., Brocca, S., Pizzi, E.** 1994, *Protein Eng.*, Vol. 7, pp. 531-537.
21. *Localization of lipase genes on Candida rugosa chromosomes.* **Brocca, S., Grandori, R., Breviario, D., Lotti, M.** 1995, *Curr. Genet.*, Vol. 28, pp. 454-457.
22. **Lotti, M., Alberghina, L.** *Candida rugosa lipase isoenzymes: cloning, sequencing, analysis of the substrate binding pocket.* [book auth.] F.X. Malcata. [ed.] F.X. Malcata. *Engineering of/with lipases.* Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1996, pp. 115-127.
23. *Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from Candida sp.* **Fu, D., Yu, M., Tan, T., Zhou, X.** 2009, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, Vol. 56, pp. 115-121.

24. *Understanding Candida rugosa lipases: An overview* . **de María, P.D., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Alcántara, A.R.** 2006, *Biotechnol. Adv.*, Vol. 24, pp. 180-196.
25. *Two conformational states of Candida rugosa lipase*. **Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Cygler, M.** 1994, *Protein Sci.*, Vol. 3, pp. 82-91.
26. *Understanding lipase stereoselectivity*. **Muralitharan, R.V., Chirumamilla, R.R., Marchant, R., Ramachandran, V.V., Ward, P.P., Nigam, P.** 2002, *World J. Microb. Biot.*, Vol. 18, pp. 81-97.
27. *Activation of Candida rugosa lipase at alkane-aqueous interfaces: A molecular dynamics study*. **James, J.J., Lakshmi, B.S., Seshasayee, A.S.N., Gautam, P.** 2007, *FEBS Letters*, Vol. 581, pp. 4377-4383.
28. *Specificities of enzyme corrected for salvation depend on the choice of the standard state*. **Janssen, A.E.M., Halling, P.J.** 1994, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 116, pp. 9827-9830.
29. *Polyunsaturated fatty acids glyceride preparation by microbial lipases*. **Osada, K., Takahashi, K., Hatano, M.** 1990, *J. Am. Oil Chem. Soc.* , Vol. 67, pp. 921-922.
30. *Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends*. **Hartmann, M., Jung, D.** 2010, *J. Mater. Chem.*, Vol. 20, pp. 844-857.
31. **Knežević, Z.** *Enzimske tehnologije*. Beograd : Tehnološko-metalurški fakultet, 2007.
32. *Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - a review*. **Malcata, F.H., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G., Amudson, C.H.** 1990, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Vol. 67, pp. 890-909.
33. *Bioreactors with immobilized lipases: state of the art*. **Balcao, V.M., Paiva, A.L., Malcata, F.X.** 1996, *Enzyme Microb. Tech.*, Vol. 18, pp. 392-416.
34. *Immobilized enzymes: science or art?* **Cao, L.** 2005, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, Vol. 9, pp. 217-226.
35. *Immobilization of lipase from Candida cylindracea on inorganic supports*. **Moreno, J.M., Sinisterra, J.V.** 1994, *J. Mol. Catal.*, Vol. 93, pp. 357-369.
36. *Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis*. **Ivanov, A.E., Schneider, M.P.** 1997, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, Vol. 3, pp. 303-309.

37. *Stability analysis of Bacillus stearothermophilus L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels.* **Hwang, S., Lee, K.T., Park, J.W., Min, B.R., Haam, S., Ahn, I.S., Jung, J.K.** 2004, *Biochem. Eng. J.*, Vol. 17, pp. 85-90.
38. *Immobilization/stabilization on different hydroxylic supports of lipase from Candida rugosa.* **Arroyo, M., Moreno, J.M., Sinisterra, J.V.** 1993, *J. Mol. Catal.*, Vol. 83, pp. 261-271.
39. *Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials.* **Shaw, J.F., Chang, R.C., Wang, F.F., Wang, Y.J.** 1990, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 35, pp. 132-137.
40. *Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis.* **Gomes, F.M., Pereira, E.B., Castro, H.F.** 2004, *Biomacromolecules*, Vol. 5, pp. 17-23.
41. *Immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan with activation of the hydroxyl group.* **Chiou, S.H., Wu, W.T.** 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 197-204.
42. *Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase.* **Carta, G., Gainer, J.L., Benton, A.H.** 1991, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 37, pp. 1004-1009.
43. *Immobilization of Candida rugosa lipase to nylon fibers using its carbohydrate groups as the chemical link.* **Braun, B., Klein, E.** 1996, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 51, pp. 327-341.
44. *Immobilization of Candida rugosa lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles.* **Vaidya, B.K., Ingavle, G.C., Ponrathnam, S., Kulkarni, B.D., Nene, S.N.** 2008, *Bioresour. Technol.*, Vol. 99, pp. 3623-3629.
45. *Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)- $\kappa$ -Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase.* **Tümtürk, H., Karaca, N., Demirel, G., Sahin, F.** 2007, *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 40, pp. 281-285.
46. *Studies of optimum conditions for covalent immobilization of Candida rugosa lipase on poly(gama-glutamic acid) by RSM.* **Chang, S.W., Shaw, J.F., Yang, K.H., Chang, S.F., Shieh, C.J.** 2008, *Bioresour. Technol.*, Vol. 99, pp. 2800-2805.
47. *Reverse micelles as reaction media for lipases.* **Carvalho, C.M.L., Carbal, J.M.S.** 2000, *Biochimie*, Vol. 82, pp. 1063-1085.

48. *Smart Polymer-Streptavidin Conjugates*. **Stayton, P.S., Ding, Z., Hoffman, A.S.** 2004, *Methods Mol. Biol.*, Vol. 283, pp. 37-44.
49. *pH/Temperature-Responsive Polymer Composed of Poly-((N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate-co-ethylacrylamide)*. **Yuk, S.H., Cho, S.H., Lee, S.H.** 1997, *Macromolecules*, Vol. 33, pp. 6856-6859.
50. *Smart Polymers are in the Biotech Future*. **Patil, N.V.** 2006, *Bioprocess Int.*, Vol. 4, pp. 42-46.
51. *Insulin Delivery Systems for Controlling Diabetes*. **Varshosaz, J.** 2007, *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery*, Vol. 1, pp. 25-40.
52. *The chemistry of immobilizing enzymes*. **Stanley, W.L., Olson, A.C.** 1974, *J. Food Sci.*, Vol. 39, pp. 660-667.
53. **Knežević, Z.** *Imobilizacija lipaze iz C. rugosa na polimernim nosačima i na vlaknima od regenerisane celuloze, doktorska disertacija*. Beograd : Tehnološko-metalurški fakultet, 2003.
54. *Controlled release from crosslinked degradable networks*. **Davis, K.A., Anseth, K.S.** 2002, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, Vol. 19, pp. 385-423.
55. *Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling*. **Lin, C.-C., Metters, A.T.** 2006, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol. 58, pp. 1379-1408.
56. *Immobilization of Lipase on Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-styrene) Hydrogel*. **Basri, M., Harun, A., Ahmad, M.B., Razak, C.N.A., Salleh, A.B.** 2001, *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 82, pp. 1404-1409.
57. *Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads*. **Betigeri, S.S., Neau, S.H.** 2002, *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 3627-3636.
58. **Bezbradica, D.** *Sinteza estara katalizovana slobodnom lipazom imobilisanom na polimernim nosačima, doktorska disertacija*. Beograd : Tehnološko-metalurški fakultet, 2007.
59. *Alginate as immobilization matrix for cells*. **Smidsrød, O., Skjåk-Braek, G.** 1990, *Trend. Biotech.*, Vol. 8, pp. 71-78.

60. **Renggli, K., Bruns, N.** Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains. [book auth.] H.N., Gross, R.A. Cheng. [ed.] H.N., Gross, R.A. Cheng. New Orleans : ACS Symposium Series, 2010, Vol. 1043, pp. 17-34.
61. *Controlled release of proteins from dextran hydrogels.* **Hennink, W.E., Talsma, H., Borchert, J.C.H., De Smedt, S.C., Demeester, J.** 1996, J. Control. Release, Vol. 39, pp. 47-55.
62. *Dextran hydrogels for the controlled release of proteins.* **Hennink, W.E., Franssen, O., van Dijk-Wolthuis, W.N.E., Talsma, H.** 1997, J. Control. Release, Vol. 48, pp. 107-114.
63. **Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E.** *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.* London : Elsevier/Academic Press, 2004. Vol. 107.
64. *Hydrogels: Wet or let die.* **Zhang, S.** 2004, Nat. Mater., Vol. 3, pp. 7-8.
65. *Synthetic hydrogels VI. Hydrogel composites as wound dressings and implant materials.* **Corkhill, P.H., Hamilton, C.J., Tighe, B.J.** 1989, Biomaterials, Vol. 10, pp. 3-10.
66. *Semi-wet peptide/protein array using supramolecular hydrogel.* **Kiyonaka, S., Sada, K., Yoshimura, I., Shinkai, S., Kato, N., Hamachi, I.** 2004, Nat. Mater., Vol. 3, pp. 58-64.
67. **Li, J.** Polymeric hydrogels. [book auth.] S.H. Teoh. *Engineering materials for biomedical applications.* Singapore : World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2004, pp. 1-17.
68. *Hydrogels for biomedical applications.* **Hoffman, A.S.** 2002, Adv. Drug Deliv. Rev., Vol. 43, pp. 3-12.
69. *Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery.* **Gupta, P., Vermani, K., Garg, S.** 2002, Drug Discov. Today, Vol. 7, pp. 569-579.
70. *Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release.* **Peppas, N.A., Khare, A.R.** 1993, Adv. Drug Deliver. Rev., Vol. 11, pp. 1-35.
71. *pH-thermoreversible hydrogels. I. Synthesis and swelling behaviours of the (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide-co-2-hydroxyethyl methacrylate) copolymeric hydrogels.* **Lee, W.F., Shien, C.H.** 1999, J. Appl. Polym. Sci., Vol. 71, 221-231.
72. *Smart and genetically engineered biomaterials and drug delivery systems.* **Kopeček, J.** 2003, Eur. J. Pharm. Sci., Vol. 16, pp. 1-16.

73. **Kalagasidis Krušić, M.** *Hidrogelovi i kontrolisano otpuštanje lekovitih supstanci. Monografija Zadužbine Andrejević.* Beograd : Zadužbina Andrejević, 2007.
74. *Equilibrium Swelling and Kinetics of pH-Responsive Hydrogels: Models, Experiments, and Simulations.* **De, S.K., Aluru, N.R., Johnson, B., Crone, W.C., Beebe, D.J., Moore, J.** 2002, *J. Microelectromech. S.*, Vol. 11, pp. 544-555.
75. *Equilibrium swelling behavior of pH-sensitive hydrogels.* **Brannon-Peppas, L., Peppas, N.** 1991, *Chem. Eng. Sci.*, Vol. 46, pp. 715-722.
76. *Peptide-based stimuli-responsive biomaterials.* **Mart, R.J., Osborne, R.D., Stevens, M.M., Ulijn, R.V.** 2006, *Soft Matter*, Vol. 2, pp. 822-835.
77. *Stimuli responsive polymers for biomedical applications.* **de las Heras Alarcón, C., Pennadam, S., Alexander, C.** 2005, *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 34, pp. 276-285.
78. *Photo-stabilised microemulsions.* **Eastoe, J., Vesperinas, A.** 2005, *Soft Matter*, Vol. 5, pp. 338-347.
79. *Dynamic Addressing of a Surface Pattern by a Stimuli-Responsive Fusion Protein.* **Frey, W., Meyer, D.E., Chilkoti, A.** 2003, *Adv. Mater.*, Vol. 15, pp. 248-251.
80. *Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates.* **Gil, E.S., Hudson, S.M.** 2004, *Prog. Polym. Sci.*, Vol. 29, pp. 1173-1222.
81. *Novel crosslinking methods to design hydrogels.* **Hennink, W.E., van Nostrum, C.F.** 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol. 54, pp. 13-36.
82. *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges.* **Hoare, T.R., Kohane, D.S.** 2008, *Polymer*, Vol. 49, pp. 1993-2007.
83. *Hydrogels and their medical applications.* **Rosiak, J.M., Yoshii, F.** 1999, *Nucl. Instrum. Meth. B*, Vol. 151, pp. 56-64.
84. *The synthesis and characterization of poly(itaconic) acid.* **Veličković, J., Filipović, J., Petrović-Đakov, D.** 1994, *Polym. Bull.*, Vol. 32, pp. 169-172.
85. *Copolymer hydrogels based on N-isopropylacrylamide and itaconic acid.* **Kalagasidis Krušić, M., Filipović, J.** 2006, *Polymer*, Vol. 47, pp. 148-155.
86. *Thermoreversible swelling behaviour of hydrogels based on N-isopropylacrylamide with a hydrophobic comonomer.* **Xue, W., Hamley, I.W.** 2002, *Polymer*, Vol. 43, pp. 3069-3077.

87. *Stimuli-sensitive hydrogels in controlled and sustained.* **Masteiková, R., Chalupová, Z., Šklubalová, Z.** 2003, *Medicina*, Vol. 39, pp. 19-24.
88. *Molecular complex formation in the system poly(vinyl methyl ether)/water.* **Meeussen, F., Bauwens, Y., Moerkerke, R., Nies, E., Berghmans, H.** 2000, *Polymer*, Vol. 41, pp. 3737-3743.
89. *Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application.* **Schild, H.G.** 1992, *Prog. Polym. Sci.*, Vol. 17, pp. 163-249.
90. *Cloud point of poly(N-isopropylmethacrylamide) solutions in water: is it really a point?* **Netopilík, M., Bohdanecký, M., Chytrý, V., Ulbrich, K.** 1997, *Macromol. Rapid Commun.*, Vol. 18, pp. 107-111.
91. *Thermosensitivity of Aqueous Solutions of Poly(N,N-diethylacrylamide).* **Idziak, I., Avoce, D., Lessard, D., Gravel, D., Zhu, X.X.** 1999, *Macromolecules*, Vol. 32, pp. 1260-1263.
92. *Synthesis of poly(N-vinylisobutyramide) from poly(N-vinylacetamide) and its thermosensitive property.* **Akashi, M., Nakano, S., Kishida, A.** 1996, *J. Polym. Sci. Chem.*, Vol. 34, pp. 301-303.
93. *Thermo-responsive gels.* **Ichijo, H., Hirasa, O., Kishi, R., Oowada, M., Sahara, K., Kokufuta, E., Kohno, S.** 1995, *Radiat. Phys. Chem.*, Vol. 46, pp. 185-190.
94. *Effect of temperature on aqueous solutions of pyrene-labeled (hydroxypropyl)cellulose.* **Winnik, F.M.** 1987, *Macromolecules*, Vol. 20, pp. 2745-2750.
95. *Characterization of the UCST Behavior of Poly(N-acetylacrylamide) in Sugar Solutions.* **Kato, N., Kamai, H., Sekiya, S., Sakai, Y., Uyehara, T.** 2001, *Analytical Sciences*, Vol. 17, pp. i1129-i1130.
96. *Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers.* **Urry, D.W.** 1997, *J. Phys. Chem. B*, Vol. 101, pp. 11007-11028.
97. *Preparation, properties and controlled release behaviors of pH-induced thermosensitive amphiphilic gels.* **Liu, Y.-Y., Shao, Y.-H., Lü, J.** 2006, *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 4016-4024.
98. *Release of model compounds from "plum-pudding"-type gels composed of microgel particles randomly dispersed in a gel matrix.* **Lynch, I., Dawson, K.A.** 2004, *J. Phys. Chem. B*, Vol. 108, pp. 10893-10898.



99. *Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate)*. **Chung, J.E., Yokoyama, M., Yamato, M., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T.** 1999, *J. Control. Release*, Vol. 62, pp. 115-127.
100. *Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release*. **Okano, T., Bae, Y.H., Jacobs, H., Kim, S.W.** 1990, *J. Control. Release*, Vol. 11, pp. 255-265.
101. *A novel approach for preparation of pH-sensitive hydrogels for enteric drug delivery*. **Dong, L.-C., Hoffman, A.S.** 1991, *J. Control. Release*, Vol. 52, pp. 141-152.
102. *Release of Chlorambucil from Poly(N-Isopropylacrylamide) Hydrogels with b-Cyclodextrin Moieties*. **Liu, Y.-Y., Fan, X.-D., Hu, H., Tang, Z.-H.** 2004, *Macromol. Biosci.*, Vol. 4, pp. 729-736.
103. *Poly(N-isopropylacrylamide) copolymers for constant temperature controlled drug delivery*. **Eeckman, F., Moës, A.J., Amighi, K.** 2004, *Int. J. Pharm.*, Vol. 273, pp. 109-119.
104. *Drug releasing characteristics of thermo- and pH-sensitive interpenetrating polymer networks based on poly(N-isopropylacrylamide)*. **Lim, Y.H., Kim, D., Lee, D.S.** 1997, *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 64, pp. 2647-2655.
105. *Synthesis, characterization and controlled drug release of thermosensitive IPN – PNIPAAm hydrogels*. **Zhang, X.-Z., Wu, D.-Q., Chu, C.-C.** 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 3793-3805.
106. *Synthesis and characterization of pH- and temperature-sensitive poly(methacrylic acid)/poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymeric networks*. **Zhang, J., Peppas, N.A.** 2000, *Macromolecules*, Vol. 33, pp. 102-107.
107. *Hydrogel nanoparticle dispersions with inverse thermoreversible gelation*. **Hu, Z.B., Xia, X.H.** 2004, *Adv. Mater.*, Vol. 16, pp. 305-309.
108. *Specific Ion Effects on the Water Solubility of Macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister Series*. **Zhang, Y., Furyk, S., Bergbreiter, D.E., Cremer, P.S.** 2005, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 127, pp. 14505-14510.
109. *“Domain” Coil-Globule Transition in Homopolymers*. **Tiktopulo, E.I., Uversky, V.N., Lushchik, V.B., Klenin, S.I., Bychkova, V.E., Ptitsyn, O.B.** 1995, *Macromolecules*, Vol. 28, pp. 7519-7524.

110. *Volume-phase transitions of ionized N-isopropylacrylamide gels.* **Hirotsu, S., Hirokawa, Y., Tanaka, T.** 1987, *J. Chem. Phys.*, Vol. 87, pp. 1392-1395.
111. *Thermo-sensitive swelling behavior in crosslinked N-isopropylacrylamide networks: Cationic, anionic, and ampholytic hydrogels.* **Yu, H., Grainger, D.W.** 1993, *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 49, pp. 1553-1563.
112. *Photo-Cross-Linkable PNIPAAm Copolymers. 1. Synthesis and Characterization of Constrained Temperature-Responsive Hydrogel Layers.* **Kuckling, D., Harmon, M.E., Frank, C.W.** 2002, *Macromolecules*, Vol. 35, pp. 6377-6383.
113. *Photo-Cross-Linkable PNIPAAm Copolymers. 2. Effects of Constraint on Temperature and pH-Responsive Hydrogel Layers.* **Harmon, M.E., Kuckling, D., Frank, C.W.** 2003, *Macromolecules*, Vol. 36, pp. 162-172.
114. *Photo-Cross-Linkable PNIPAAm Copolymers. 4. Effects of Copolymerization and Cross-Linking on the Volume-Phase Transition in Constrained Hydrogel Layers.* **Harmon, M.E., Kuckling, D., Pareek, P., Frank, C.W.** 2003, *Langmuir*, Vol. 19, pp. 10947-10956.
115. *Rapid swelling and deswelling in cryogels of crosslinked poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid).* **Xue, W., Champ, S., Huglin, M.B., Jones, T.G.J.** 2004, *Eur. Polym. J.*, Vol. 40, pp. 467-476.
116. *Reversible adsorption by a pH- and temperature-sensitive acrylic hydrogel.* **Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A.** 2002, *J. Control. Release*, Vol. 80, pp. 247-257.
117. *pH – Thermoreversible Hydrogels. II. Synthesis and Swelling Behaviors of N-Isopropylacrylamide-co-acrylic acid-cosodium acrylate Hydrogels.* **Lee, W.-F., Shien, C.-H.** 1999, *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 73, pp. 1955-1967.
118. *Investigation of charge effects on drug release behavior for ionic thermosensitive hydrogels.* **Lee, W.-F., Chiu, R.-J.** 2002, *Mater. Sci. Eng. C*, Vol. 20, pp. 161-166.
119. *Synthesis and Characterization of Temperature – and pH – Sensitive Poly(N,N-diethylacrylamide-co-methacrylic acid).* **Liu, S., Liu, M.** 2003, *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 90, pp. 3563-3568.
120. *Analysis of the Swelling Dynamics of Cross-Linked P(N-iPAAm-co-MAA) Copolymers and Their Homopolymers under Acidic Medium. A Kinetics Interpretation of the Overshooting Effect.* **Díez-Peña, E., Quijada-Garrido, I., Barrales-Rienda, J.M.** 2003, *Macromolecules*, Vol. 36, pp. 2475-2483.

121. *Dynamic and equilibrium swelling behaviour of pH-sensitive hydrogels containing 2-hydroxyethyl methacrylate.* **Brannon-Peppas, L., Peppas, N.A.** 1990, *Biomaterials*, Vol. 11, pp. 635-644.
122. *Release behavior of bioactive agents from pH-sensitive hydrogels.* **Khare, A.R., Peppas, N.A.** 3, 1993, *J. Biomater. Sci.-Polym. E.*, Vol. 4, pp. 275-289.
123. *pH-Controlled release from hydrophobic/polyelectrolyte copolymer hydrogels.* **Siegel, R.A., Falamarzian, M., Firestone, B.A., Moxley B.C.** 1988, *J. Control. Release*, Vol. 8, pp. 179-182.
124. *Preparation and Characterization of Freeze-dried Chitosan-Poly(Ethylene Oxide) Hydrogels for Site-Specific Antibiotic Delivery in the Stomach.* **Patel, V.R., Amiji, M.M.** 1996, *Pharmaceut. Res.*, Vol. 13, pp. 588-593.
125. **Boylan, J.C., Swarbrick, J.** Hydrogels. [book auth.] V.A. Stoy. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. s.l. : Marcel Dekker, Inc., 2002, Vol. 18, pp. 91-121.
126. *Review on Hydrogel-based pH Sensors and Microsensors.* **Richter, A., Paschew, G., Klatt, S., Lienig, J., Arndt, K.-F., Adler, H.-J.P.** 2008, *Sensors*, Vol. 8, pp. 561-581.
127. *Effect of polyelectrolyte on the lower critical solution temperature of poly(N-isopropyl acrylamide) in the poly(NIPAAm-co-acrylic acid) hydrogel.* **Yoo, M.K., Sung, Y.K., Lee, Y.M., Cho, C.S.** 2000, *Polymer*, Vol. 41, pp. 5713-5719.
128. *Squeezing hydrogels for controlled oral drug delivery.* **Gutowska, A., Bark, J.S., Kwon, I.C., Bae, Y.H., Cha, Y., Kim, S.W.** 1997, *J. Control. Release*, Vol. 48, pp. 141-148.
129. *Physically bonded nanoparticle networks: a novel drug delivery system.* **Xia, X., Hu, Z., Marquez, M.** 2005, *J. Control. Release*, Vol. 103, pp. 21-30.
130. *Dependence of Shell Thickness on Core Compression in Acrylic Acid Modified Poly(Nisopropylacrylamide) Core/Shell Microgels.* **Jones, C.D., Lyon, L.A.** 2003, *Langmuir*, Vol. 19, pp. 4544-4547.
131. *Temperature-pH sensitivity of bovine serum albumin protein-microgels based on cross-linked poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid).* **Huo, D., Yana L, Qian, Q., Kobayashi, T.** 2006, *Colloid. Surface. B*, Vol. 50, pp. 36-42.

132. *Poly(N-isopropylacrylamide-co -propylacrylic acid) copolymers that respond sharply to temperature and pH.* **Yin, X., Hoffman, A.S., Stayton, P.S.** 2006, *Biomacromolecules*, Vol. 7, pp. 1381-1385.
133. *Independent Control of Lower Critical Solution Temperature and Swelling Behavior with pH for Poly(Nisopropylacrylamide-co-maleic acid).* **Weiss-Malik, R.A., Solis, F.J., Vernon, B.L.** 2004, *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 94, pp. 2110-2116.
134. *Effect of pH on the lower critical solution temperatures of random copolymers of N-isopropylacrylamide and acrylic acid.* **Jones, M.S.** 1999, *Eur. Polym. J.*, Vol. 35, pp. 795-801.
135. *The effect of pH on the LCST of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid).* **Pei, Y., Chen, J., Yang, L., Shi, L., Tao, Q., Hui, B., Li, J.** 2004, *J. Biomat. Sci-Polym. E.*, Vol. 15, pp. 585-594.
136. *Thermoreversible swelling behaviour of hydrogels based on N-isopropylacrylamide with acidic comonomers.* **Huglin, M.B., Liu, Y., Velada, J.L.** 1997, *Polymer*, Vol. 38, pp. 5785-5791.
137. *Investigation of the Effect of Type and Concentration of Ionizable Comonomer on the Collapse Behavior of N-Isopropylacrylamide Copolymer Gels in Water.* **Erbil, C., Aras, S., Uyanik, N.** 1999, *J. Polym. Sci. A1*, Vol. 37, pp. 1847-1855.
138. *Hydrogels of N-isopropylacrylamide copolymers with controlled release of a model protein.* **Milašinović, N., Kalagasidis Krušić, M., Knežević-Jugović, Z., Filipović, J.** 2010, *Int. J. Pharm.*, Vol. 383, pp. 53-61.
139. *Rapid cell sheet detachment from poly(N-isopropylacrylamide)-grafted porous cell culture membranes.* **Kwon, O.H., Kikuchi, A., Yamato, M., Sakurai, Y., Okano, T.** 2000, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 50, pp. 82-89.
140. *A new temperature-and pH-responsive copolymer for possible use in protein conjugation.* **Chen, G., Hoffman, A.** 1995, *Macromol. Chem. Phys.*, Vol. 196, pp. 1251-1259.
141. *Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities.* **Dimitrov, I., Trzebicka, B., Muller, A., Dworak, A., Tsvetanov, C.** 2007, *Prog. Polym. Sci.*, Vol. 32, pp. 1275-1343.

142. *Random copolymers of N-isopropylacrylamide and methacrylic acid monomers with hydrophobic spacers: pH-tunable temperature sensitive materials.* **Salgado-Rodriguez, R., Licea-Claverie, A., Arndt, K.F.** 2004, Eur. Polym. J., Vol. 40, pp. 1931-1946.
143. *pH-thermoreversible hydrogels. I. Synthesis and characterization of poly(N-isopropylacrylamide/maleic acid) copolymeric hydrogels.* **Taşdelen, B., Kayaman-Apohan, N., Güven, O., Baysal, B.M.** 2004, Radiat. Phys. Chem., Vol. 69, pp. 303-310.
144. *Programmable delivery of hydrophilic drug using dually responsive hydrogel.* **Gu, J., Xia, F., Wu, Y., Qu, X., Yang, Z., Jiang, L.** 2007, J. Control. Release, Vol. 117, pp. 396-402.
145. *Temperature- and pH-sensitive terpolymers for modulated delivery of streptokinase.* **Vakkalanka, S.K., Brazel, C.S., Peppas, N.A.** 1996, J. Biomat. Sci. Polym. E, Vol. 8, pp. 119-129.
146. *Temperature-sensitive chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties.* **Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Dubovik, A.S., Grinberg, N.V., Burova, T.V., Grinberg, V.Y.** 2005, J. Control. Release, Vol. 102, pp. 629-641.
147. *Temperature and pH sensitive hydrogels: an approach towards smart semen-triggered vaginal microbicidal vehicles.* **Gupta, K.M., Barnes, S.R., Tangaro, R.A., Roberts, M.C., Owen, D.H., Katz, D.F., Kiser, P.F.** 2006, J. Pharm. Sci., Vol. 96, pp. 670-681.
148. *Contents Intelligent Drug Delivery Systems: Polymeric Micelles and Hydrogels.* **Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A.** 2008, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, Vol. 8, pp. 1065-1074.
149. *Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology.* **Langer, R., Peppas, N.** 2003, ALChE Journal, Vol. 49, pp. 2990-3006.
150. **Lowman, A.M.** Biomaterials in Drug Delivery. [book auth.] D. Shi. [ed.] D. Shi. *Biomedical devices and their applications.* Heidelberg and Berlin : Springer, 2004, pp. 1-32.
151. **Lowman, A. M., Peppas, N.A.** Hydrogels. [book auth.] E. Mathiowitz. [ed.] E. Mathiowitz. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery.* New York : John Wiley & Sons, 1999, Vols. 1-2, pp. 397-418.
152. *Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications.* **Jeong, B., Gutowska, A.** 2002, Trends Biotechnol., Vol. 20, pp. 305-311.

153. *Hydrogels for Tissue Engineering*. **Lee, K.Y., Mooney, D.J.** 2001, Chem. Rev., Vol. 101, pp. 1869-1881.
154. *Synthesis and characterization of partially biodegradable, temperature and pH sensitive Dex-MA/PNIPAAm hydrogels*. **Zhang X., Wu D., Chu C.-C.** 2004, Biomaterials, Vol. 25, pp. 4719-4730.
155. *In situ – forming hydrogels – review of temperature – sensitive system*. **Ruel-Gariépy, E., Leroux J.-C.** 2004, Eur. J. Pharm. Biopharm., Vol. 58, pp. 409-426.
156. *Preparation of fast responsive, thermally sensitive poly(N-isopropylacrylamide) gel*. **Zhang, X.-Z., Zhuo, R.-X.** 2000, Eur. Polym. J., Vol. 36, pp. 2301-2303.
157. *A novel thermo – responsive drug delivery system with positive controlled release*. **Zhang, X.-Z., Zhuo, R.-X., Cui, J.-Z., Zhang, J.-T.** 2002, Int. J. Pharm., Vol. 235, pp. 43-50.
158. *Synthesis and characterization of thermoresponsive isopropylacrylamide – acrylamide hydrogels*. **Yildiz, B., Isik, B., Kis, M.** 2002, Eur. Polym. J., Vol. 38, pp. 1343-1347.
159. *Effect of drug physicochemical properties on swelling/deswelling kinetics and pulsatile drug release from thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels*. **Coughlan, D.C., Quilty, F.P., Corrigan, O.I.** 2004, J. Control. Release, Vol. 98, pp. 97-114.
160. *Breeding of starch – utilizing and itaconic – acid – producing koji molds by interspecific protoplast fusion between Aspergillus terreus and Aspergillus usamii*. **Kirimura, K., Sato, T., Nakanishi, N., Terada, M., Usami, S.** 1997, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 47, pp. 127-131.
161. *Biotechnological production of itaconic acid*. **Willke, Th., Vorlop, K.-D.** 2001, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 56, pp. 289-295.
162. *Itaconic acid production by Aspergillus terreus on raw starchy materials*. **Petruccioli, M., Pulci, V., Federici, F.** 1999, Lett. Appl. Microbiol., Vol. 28, pp. 309-312.
163. *Analysis of the swelling dynamics of crosslinked P(N-iPAAm-co-MAA) copolymers, the corresponding homopolymers and their interpenetrating networks. Kinetics of water penetration into the gel above the pKa of MMA comonomeric units*. **Díez-Peña, E., Quijada-Garrido, I., Frutos, P., Barrales-Rienda, J.M.** 2003, Polym. Int., Vol. 52, pp. 956-965.

164. *Effects of synthesis-solvent composition and initiator concentration on the swelling behaviour of poly(N-isopropylacrylamide) P(NIPAAm), poly(NIPAAm-co-dimethyl itaconate), and poly(NIPAAm-co itaconic acid) gels.* **Erbil, C., Yıldız, Y., Uyanık, N.** 2000, Polym. Int., Vol. 49, pp. 795-800.
165. *Swelling and Diffusion Studies of Poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) Copolymeric Hydrogels in Water and Aqueous Solutions of Drugs.* **Taşdelen, B., Kayaman-Apohan, N., Güven, O., Baysal, B.M.** 2004, J. Appl. Polym. Sci., Vol. 91, pp. 911-915.
166. *Monomer reactivity ratios of N-isopropylacrylamide–itaconic acid copolymers at low and high conversions.* **Erbil, C., Terlan, B., Akdemir, Ö., Gökçeören, A.T.** 2009, Eur. Polym. J., Vol. 45, pp. 1728-1737.
167. *Swelling behaviour and paracetamol release from poly(N-isopropylacrylamide itaconic acid)hydrogels.* **Kalagasidis Krušić, M., Ilić, M., Filipović, J.** 2009, Pol. Bull., Vol. 63, pp. 197-211.
168. *Thermo and pH dual responsive Poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels.* **Ling, Y., Lu, M.** 1, J. Polym. Res., Vol. 16, pp. 29-37.
169. *Anticancer drug release from poly(N isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels.* **Tasdelen, B., Kayaman-Apohan, N., Guven, O., Baysal, B.M.** 2005, Radiat. Phys. Chem., Vol. 73, pp. 340-345.
170. *Temperature-sensitive aqueous microgels.* **Pelton, R.** 2000, Adv. Colloid Interfac., Vol. 85, pp. 1-33.
171. *Review: Hydro-, micro- and nanogels studied by complementary measurements based on SEM and SFM.* **Matzelle, T., Reichelt, R.** 2008, Acta Microscopica, Vol. 17, pp. 45-61.
172. *A specific method for serum lipase determination.* **Tietz, N.W., Fiereck, E.A.** 1966, Clin. Chim. Acta, Vol. 13, pp. 352-358.
173. **Chambers, J.A.A.** Buffers, chelating agents and denaturants. [book auth.] D., Chambers, J. A. A. Rickwood. *Biochemistry*. San Diego : Labfax. Academic Press, Inc., 1993, pp. 1-36.
174. *Immobilization of lipase from Candida rugosa on Eupergit® C supports by covalent attachment.* **Knežević, Z., Milosavić, N., Bezbradica, D., Jakovljević, Z., Prodanović, R.** 2006, Biochem. Eng. J. , Vol. 30, pp. 269-278.

175. *A simple UV spectrophotometric method for the determination.* **Waddell, W.J.** 1956, J. Lab. Clin. Med., Vol. 48, pp. 311-314.
176. *FTIR study on molecular structure of poly(N-isopropylacrylamide) in mixed solvent of methanol and water.* **Liu, M., Bian, F., Sheng, F.** 2005, Eur. Pol. J., Vol. 41, pp. 283-291.
177. *Preparation and Characterization of Fast Responce Macroporous Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels.* **Zhang, X.-Z., Yang, Y.-Y., Chung, T.-S., Ma, K.-X.** 2001, Langmuir, Vol. 17, pp. 6094-6099.
178. *Temperature-responsive characteristics of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with macroporous structure.* **Çaykara, T., Kiper, S., Demirel, G., Demirci, S., Çakanyıldırım, Ç.** 2007, Polzm. Int., Vol. 56, pp. 275-282.
179. *Thermo and pH dual responsive Poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels.* **Ling, Y., Lu, M.** 1, 2009, J. Polym. Res., Vol. 16, pp. 29-37.
180. *Preparation and characterization of pH sensitive poly(N-vinyl-2-pyrrolidone/itaconic acid) copolymer hydrogels.* **Chen, K.-S., Kua, Y.-A., Lin, H.-R., Yan, T.-R., Sheu, D.-C., Chen, T.-M., Lin, F.-H.** 2005, Mater. Chem. Phys., Vol. 91, pp. 484-489.
181. *Dynamic and equilibrium swelling studies: crosslinked pH sensitive methyl methacrylate-co-itaconic acid (MMA-co-IA) hydrogels.* **Mudassir, J., Ranjha, N.M.** 2008, J. Polym. Res., Vol. 15, pp. 195-203.
182. *Synthesis and characterization of thermo-sensitive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogel with fast response rate.* **Aixiang, Q., Mangeng, L.U., Qunfeng, L., Ping, Z.** 2007, Front. Chem. China, Vol. 2, pp. 135-139.
183. *Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant Candida rugosa lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy.* **Natalello, A., Ami, D., Brocca, S., Lotti, M., Doglia, S.M.** 2005, Biochem. J., Vol. 385, pp. 511-517.
184. **Stuart, B., George, W.O., McIntyre, P.S.** *Modern Infrared Spectroscopy.* [ed.] D.J. Ando. London : John Wiley & Sons, 1996. pp. 117-119.
185. *Comparative Performance of Microbial Lipases Immobilized on Magnetic Polysiloxane Polyvinyl Alcohol Particles.* **Laura Maria Bruno, José Luiz de Lima Filho and Heizir Ferreira de Castro.** 2008, Braz. Arch. Biol. Technol., Vol. 51, pp. 889-896.
186. *Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates.* **Kacurakova, M., Wilson, R.H.** 2001, Carbohydr. Polym., Vol. 44, pp. 291-303.



187. **Kalagasidis Krušić, M. T.** *Sinteza i svojstva hidrogelova osetljivih na spoljne stimulanse, doktorska disertacija.* Beograd : Tehnološko-metalurški fakultet, 2006.
188. *Responsive polymers in controlled drug delivery.* **Bajpai, A.K., Shukla, S.K., Bhanu, S., Kankane, S.** 2008, Prog. Polym. Sci., Vol. 33, pp. 1088-1118.
189. **Weast, R.C.** *Handbook of chemistry and physics 55th edition 1974-1975.* Cleveland : CRC Press, 1974.
190. *Lower critical solution temperatures of N-substituted acrylamide copolymers in aqueous solutions.* **Liu, H.Y., Zhu, X.X.** 1999, Polymer, Vol. 40, pp. 6985-6990.
191. *Lipase immobilization into porous chitoxan beads: activities in aqueous and organic media and lipase localization.* **Magnin, D., Dimitriu, S., Magny, P., Chornet, E.** 2001, Biotechnol. Prog., Vol. 17, pp. 734-741.
192. *Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports.* **Al-Duri, B., Yong, Y.P.** 2000, Biochem. Eng. J., Vol. 4, pp. 207-215.
193. *Immobilization of catalase in poly(isopropylacrylamide-co-hydroxyethylmethacrylate) thermally reversible hydrogels.* **Arica, M.Y., Öktem , H.A., Öktem , Z., Tuncel , S.A.** 1999, Polym. Int., Vol. 48, pp. 879-884.
194. *Preparation of poly(glycidylmethacrylate-methylmethacrylate) magnetic beads: Application in lipase immobilization.* **Bayramoglu, G., Arica, M.Y.** 2008, J. Mol. Catal. B-Enzym., Vol. 55, pp. 76-83.
195. *Reversible immobilization of Candida rugosa lipase on fibrous polymer grafted and sulfonated p(HEMA/EGDMA) beads.* **Arica, M.Y., Soydogan, H., Bayramoglu, G.** 2010, Bioprocess Biosyst. Eng., Vol. 33, pp. 227-236.
196. *Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15.* **Abdullah, A.Z., Sulaiman, N.S., Kamaruddin, A.H.** 2009, Biochem. Eng. J., Vol. 44, pp. 263-270.
197. *Charatcerization of Candida rugosa lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity.* **Yong, Y., Bai, Y.-X., Li, Y.-F., Lin, L., Cui, Y.-J., Xia, C.-G.** 2008, Process Biochem., Vol. 43, pp. 1179-1185.

198. *Kinetic studies of lipase from Candida rugosa A comparative study between free and immobilized enzyme onto porous chitosan beads.* **Pereira, E.B., De Castro, H.F., De Moraes, F.F., Zanin, G.M.** 2001, Appl. Biochem. Biotechnol., Vols. 91-93, pp. 739-752.
199. *Activity and flexibility of alcohol dehydrogenase in organic solvents.* **Mark Guinn, R., Skerker, P.S., Kavanaugh, P., Clark, D.S.** 1991, Biotechnol. Bioeng., Vol. 37, pp. 303-308.
200. *Effect of salts on activity, stability and enantioselectivity of Candida rugosa lipase in isooctane.* **Yu, H.W., Chen, H., Yang, Y.Y., Ching, C.B.** 2005, J. Mol. Catal. B-Enzym., Vol. 35, pp. 28-32.
201. *Covalent attachment of Candida rugosa lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane–polyvinyl alcohol with different activating compounds.* **Santos, J.C., Mijone, P.D., Nunes, G.F.M., Perez, V.H., de Castro, H.F.** 2008, Colloid. Surface. B, Vol. 61, pp. 229-236.
202. *Immobilization of lipase from Candida rugosa on electrospun polysulfone nanofibrous membranes by adsorption.* **Wang, Z.-G., Wang, J.-Q., Xu, Z.-K.** 2006, J. Mol. Catal. B-Enzym., Vol. 42, pp. 45-51.
203. *Immobilization of Candida rugosa lipase onto spacer-arm attached poly(GMA-HEMA-EGDMA) microspheres.* **Bayramoğlu, G., Kaya, B., Arıca M.Y.** 2005, Food Chem., Vol. 92, pp. 261-268.
204. *Synthesis, characterization and application of poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels as supports for lipase immobilization.* **Milašinović, N., Milosavljević, N., Filipović, J., Knežević-Jugović, Z., Kalagasidis Krušić, M.** 2010, React. Funct. Polym., Vol. 70, pp. 807-814.
205. *Immobilized lipases as practical catalysts: a review.* **Knežević, Z.D., Šiler-Marinković, S., Mojović, Lj.V.** 2004, APTEF, Vol. 35, pp. 151-164.
206. *Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas.* **Park, E.Y., Sato, M., Kojima, S.** 2006, Enzyme Microb. Technol., Vol. 39, pp. 889-896.
207. *Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using lipase from Candida rugosa immobilised on Mg, Zn and Ni of layered double hydroxides (LDHs).* **Rahman, M.B.A., Zaidan, U.H., Basri, M., Hussein, M.Z., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B.** 2008, J. Mol. Catal. B-Enzym., Vol. 50, pp. 33-39.

208. **Rahman, M.B.A., Yunus, N.M.M., Othman, S.S., Salleh, A.B., Basri, M.** Immobilized Enzymes. [book auth.] A.B., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M. Salleh. [ed.] A.B., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M. Salleh. *New Lipases and Proteases*. New York : Nova Science Publisher Inc., 2006, pp. 111-125.
209. *How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution.* **Petersen, M.T.N., Fojan, P., Petersen, S.B.,** “. 2001, *J. Biotechnol.*, Vol. 85, pp. 115-147.
210. *Reactivity of Candida rugosa lipase in cetyltrimethylammonium bromide microemulsion–gelatin complex organogels.* **Nagayama, K., Katakura, R., Hata, T., Naoe, K., Imai, M.** 2008, *Biochem. Eng. J.*, Vol. 38, pp. 274-276.
211. *Aggregation behavior of Candida rugosa lipase.* **Liou, Y.-C., Marangoni, A.G., Yada, R.Y.** 1998, *Food Res. Int.*, Vol. 31, pp. 243-248.
212. *Influence of surfactants on an extracellular lipase from Pythium ultimum.* **Mozaffar, Z., Weete, J.D., Dute, R.** 1994, *J. Am Oil Chem. Soc.*, Vol. 71, pp. 75-79.
213. *Candida rugosa lipase immobilized in Triton-X100 microemulsion based organogels (MBGs) for ester synthesis.* **Dave, R., Madamwar, D.** 2008, *Process Biochem.*, Vol. 43, pp. 70-75.
214. *Effects of Additives on the Activity and Enantioselectivity of Candida rugosa Lipase in a Biphasic Medium.* **Salgın, S., Takaç, S.** 2007, *Chem. Eng. Technol.*, Vol. 30, pp. 1739-1743.
215. *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.* **Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R.** 2007, *Enzyme Microb. Tech.*, Vol. 40, pp. 1451-1463.
216. *Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes.* **Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., Ottolenghi, M.** 1990, *Mater. Lett.*, Vol. 10, pp. 1-5.
217. *Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts.* **Reetz, M.T., Zonta, A., Vijayakrishnan, V., Schimossek, K.** 1998, *J. Mol. Catal. A-Chem.*, Vol. 134, pp. 251-258.
218. *Properties of trypsin and of acid phosphatase immobilized in sol-gel glass matrices.* **Shtelzer, S., Rappoport, S., Avnir, D., Ottolenghi, M., Braun, S.** 1992, *Biotechnol. Appl. Bioc.*, Vol. 15, pp. 227-235.

219. *Production of Ethyl Butyrate Using Gel-Entrapped Candida cylindracea lipase.* **Chen, J.P.** 1996, *J. Ferment. Bioeng.*, Vol. 82, pp. 404-407.
220. *Adsorptive control of water in esterification with immobilized enzymes: I. Batch reactor behavior.* **Mensah, P., Gainer, J.L., Carta, G.** 1998, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 60, pp. 434-444.
221. *Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents.* **Páez, B.C., Medina, A.R., Rubio, F.C., Moreno, P.G., Grima, E.M.** 2003, *Enzyme Microb. Tech.*, Vol. 33, pp. 845-853.
222. *Physical immobilization of Rhizopus oryzae lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies.* **Karra-Châabouni, M., Bouaziz, I., Boufi, S., do Rego, A.M.B., Gargouri, Y.** 2008, *Colloid. Surface. B*, Vol. 66, pp. 168-177.
223. *Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications.* **Foresti, M.L., Pederneira, M., Bucalá, V., Ferreira, M.L.** 2007, *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 41, pp. 62-70.
224. *Oil—Water Interfacial Activation of Lipase for Interesterification of Triglyceride and Fatty Acid.* **Maruyama, T., Nakajima, M., Ichikawa, S., Nabetani, H., Furusaki, S., Seki, M.** 2000, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Vol. 77, pp. 1121-1127.
225. *Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis.* **Hailing, P.** 1994, *Enzyme Microb. Tech.*, Vol. 16, pp. 178-206.
226. *Triblock copolymers: synthesis, characterization, and delivery of a model protein.* **Chen, S., Pieper, R., Webster, D.C., Singh, J.** 2005, *Int. J. Pharm.*, Vol. 288, pp. 207-218.
227. *In vitro release of bovine serum albumin from alginate/HPMC hydrogel beads.* **Nochos, A., Douroumis, D., Bouropoulos, N.** 2008, *Carbohydr. Polym.*, Vol. 74, pp. 451-457.
228. *Encapsulation of crosslinked subtilisin microcrystals in hydrogel beads for controlled release applications.* **Simi, C.K., Abraham, T.E.** 2007, *Eur. J. Pharm. Sci.*, Vol. 32, pp. 17-23.
229. *Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drug Substance During Nanoprecipitation of Poly(l)lactide Nanoparticles.* **Peltonen, L., Aitta, J., Hyvönen, S., Karjalainen, M., Hirvonen, J.** 2004, *AAPS PharmSciTech.*, Vol. 5, pp. 1-6.

230. *Protein adsorption on solid surfaces.* **Hlady, V.V., Buijs, J.** 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.*, Vol. 7, pp. 72-77.
231. **Draeger, N.A.** *Adsorption of Protein onto a Solid Surface.* Madison : Bjorksten.
232. *The effect of gel composition on the adsorption of invertase on poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels.* **Arslan, F., Tümtürk, H., Çaykara, T., Şen, M., Güven, O.** 2000, *Food Chem.*, Vol. 70, pp. 33-38.
233. *The effect of external stimuli on the invertase adsorption capacity of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-itaconic acid) hydrogels.* **Tümtürk, H., Çaykara, T., Kantoğlu, Ö., Güven, O.** 1999, *Angew. Makromol. Chem.*, Vol. 273, pp. 1-5.
234. *Adsorption of  $\alpha$ -amylase onto poly(N-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels.* **Tümtürk, H., Çaykara, T., Kantoğlu, Ö., Güven, O.** 1999, *Nucl. Instrum. Meth. B*, Vol. 151, pp. 238-241.
235. *Adsorption of  $\alpha$ -amylase onto poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels.* **Tümtürk, H., Çaykara, T., Şen, M., Güven, O.** 1999, *Radiat. Phys. Chem.*, Vol. 55, pp. 713-716.
236. *Protein Density Gradients on Surfaces.* **Caelen, I., Gao, H., Sigrist, H.** 2002, *Langmuir*, Vol. 18, pp. 2463-2467.
237. *The Role of Diffusion in Enzyme Kinetics.* **Schurr, J.M.** 1970, *Biophys. J.*, Vol. 10, pp. 717-727.
238. *Release of model proteins and basic fibroblast growth factor from in situ forming degradable dextran hydrogels.* **Hiemstra, C., Zhong, Z., van Steenberg, M.J., Hennink, W.E., Feijen, J.** 2007, *J. Control Release*, Vol. 121, pp. 71-78.
239. *Delivery of bioactive macromolecules from microporous polymer matrices: Release and activity profiles of lysozyme, collagenase and catalase.* **Wang, Y., Chang, H.-I., Li, X., Alpar, O., Coombes, A.G.A.** 2009, *Eur. J. Pharm. Sci.*, Vol. 37, pp. 387-394.
240. *A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in form of slabs, sphere, cylinders or discs.* **Ritger, P.L., Peppas, N.A.** 1987, *J. Control. Release*, Vol. 5, pp. 23-36.
241. *A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swelling devices.* **Ritger, L.P., Peppas, A.N.** 1987, *J. Control. Release*, Vol. 5, pp. 37-42.

242. *New polymer enables near zero-order release of drugs.* **Landgraf, W., Li, N.-H., Benson, J.R.** 2005, Drug Deliv. Technol., Vol. 5, pp. 48-55.

***“My life is my message”***

*Mahatma Gandhi*

## PRILOG

## DEO II i III – EKSPERIMENTALNI DEO I REZULTATI I DISKUSIJA

*Poglavlje 3 i 4.*

Tabela T1. Mase neproreagovanih materija (MNM) i stepen reagovanja (*p*) nakon sinteze P(NiPAAm/IK) hidrogelova sa 2,0 i 4,0 mas% umreživača, bez lipaze i sa različitim sadržajem lipaze.

Uzorak	0,0 mas%		2,0 mas%		5,0 mas%		10,0 mas%		20,0 mas%	
	CRL		CRL		CRL		CRL		CRL	
	MNM, g	<i>p</i> , %	MNM, g	<i>p</i> , %	MNM, g	<i>p</i> , %	MNM, g	<i>p</i> , %	MNM, g	<i>p</i> , %
85/15/2	0,0242	97,7	0,0527	95,0	0,0602	94,5	0,0985	91,4	0,0242	98,0
90/10/2	0,0269	97,4	0,0485	95,4	0,0816	92,5	0,0941	91,8	0,0269	97,8
95/5/2	0,0226	97,8	0,0364	96,6	0,0593	94,6	0,0457	96,0	0,0226	98,2
100/0/2	0,0155	98,5	0,0238	97,8	0,0443	95,9	0,0357	96,9	0,0155	98,8
85/15/4	0,0133	98,8	0,0381	96,5	0,0617	94,4	0,0775	93,3	0,0948	92,5
90/10/4	0,0248	97,7	0,0441	95,9	0,0425	96,2	0,0665	94,3	0,0995	92,1
95/5/4	0,0154	98,6	0,0449	95,8	0,0387	96,5	0,0961	91,7	0,0832	93,4
100/0/4	0,0118	98,9	0,0523	95,2	0,0907	91,8	0,0897	92,3	0,0640	94,9

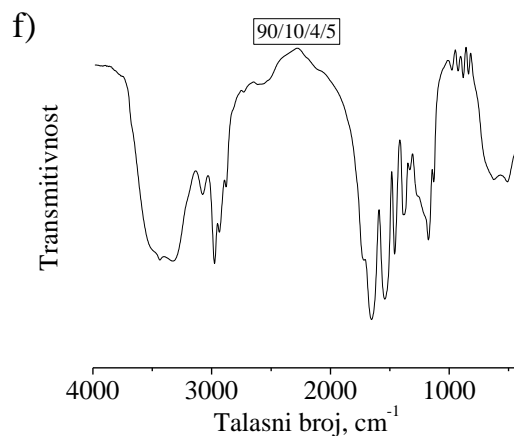
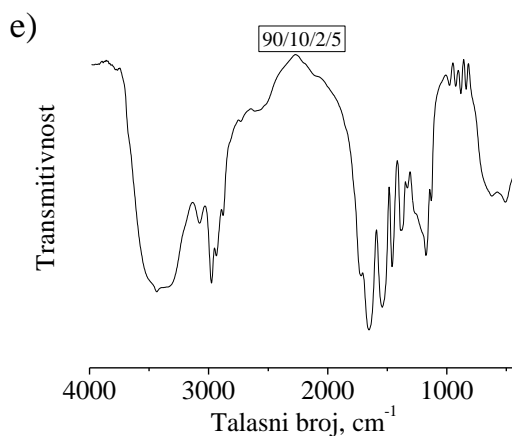
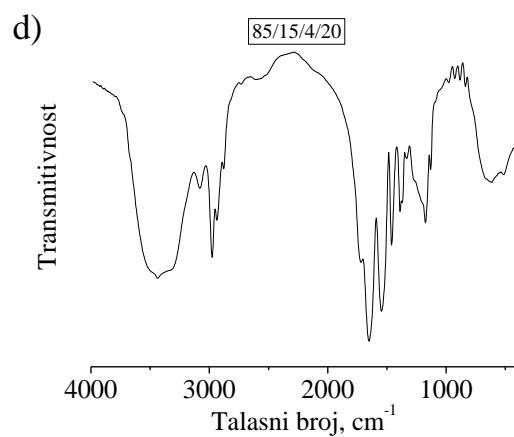
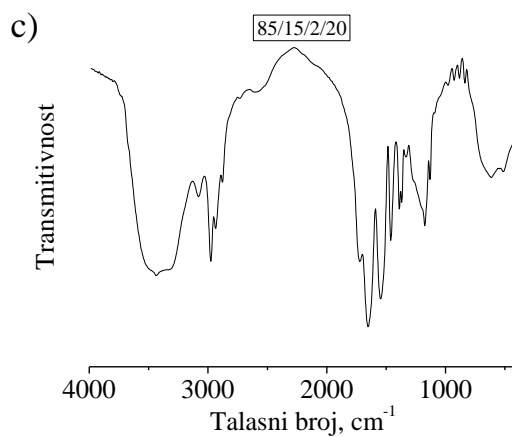
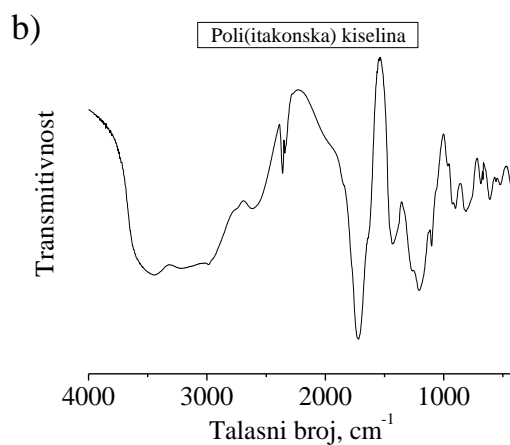
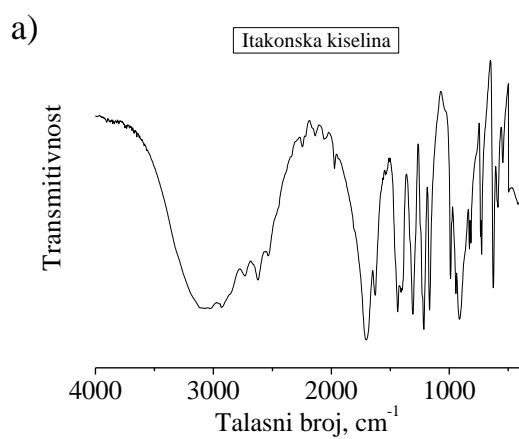


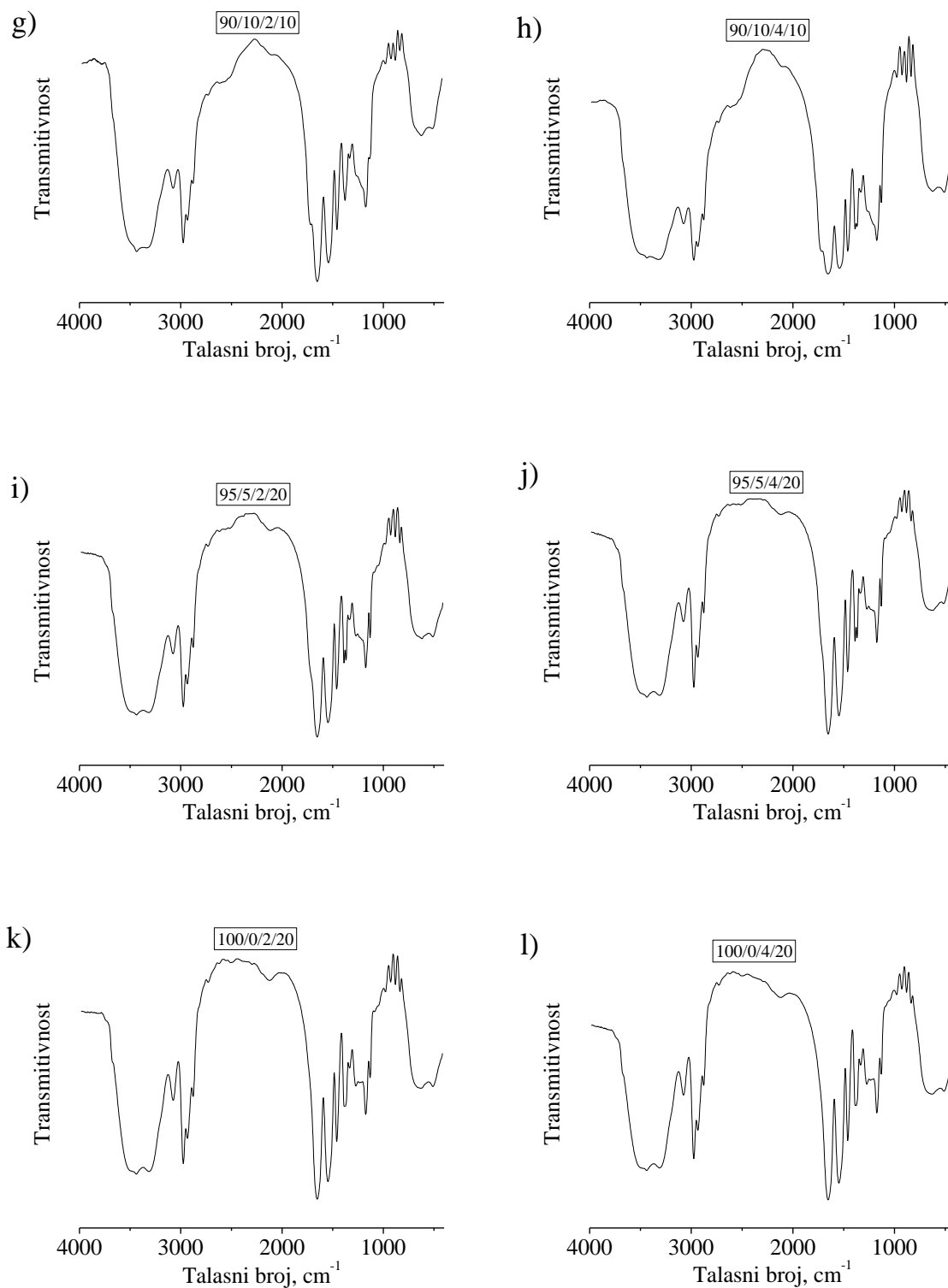
## DEO III – REZULTATI I DISKUSIJA

**Poglavlje 4.**

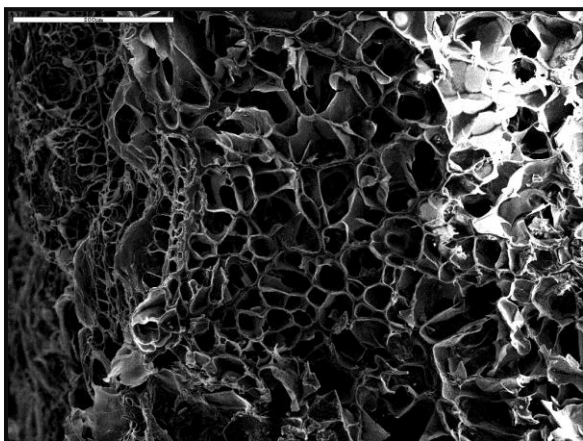
Tabela T2: Zapreminski udeo polimera u nabubreloom stanju ( $v_{2,s}$ ) za P(NiPAAm/IK) hidrogelove sintetisane bez i sa lipazom, sa 2,0 i 4,0 mas% umreživača na  $\text{pH} = 2,20 \pm 0,01$  i  $6,80 \pm 0,01$ .

Uzorak	Sadržaj lipaze, mas%	2,0 mas% umreživača		4,0 mas% umreživača	
		pH = 2,20	pH = 6,80	pH = 2,20	pH = 6,80
85/15	0,0	0,609	0,051	0,628	0,074
90/10		0,665	0,066	0,595	0,098
95/5		0,617	0,175	0,625	0,244
100/0		0,607	0,697	0,642	0,682
85/15	2,0	0,5042	0,0422	0,4879	0,0657
90/10		0,4983	0,0557	0,496	0,0869
95/5		0,5486	0,1130	0,4805	0,1864
100/0		0,5111	0,7408	0,4312	0,6852
85/15	5,0	0,4555	0,0407	0,4813	0,0583
90/10		0,5115	0,0587	0,4648	0,0846
95/5		0,5212	0,1013	0,4321	0,1434
100/0		0,5795	0,6648	0,3960	0,6757
85/15	10,0	0,4755	0,0468	0,4272	0,0736
90/10		0,4711	0,0520	0,4119	0,0845
95/5		0,5313	0,1042	0,3952	0,1450
100/0		0,5776	0,6955	0,3263	0,7142
85/15	20,0	0,2878	0,0351	0,4620	0,0415
90/10		0,2362	0,0500	0,5044	0,0824
95/5		0,2147	0,0993	0,5278	0,1584
100/0		0,4050	0,5818	0,3913	0,6886

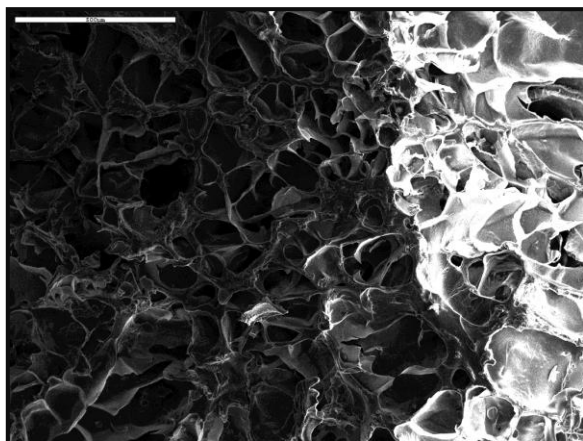




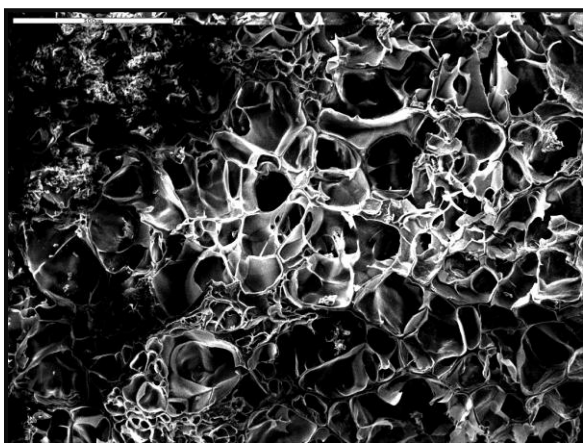
Slika S1. FT-IR spektri sintetisanih hidrogelova: a) itakonske kiseline; b) poli(itakonske) kiseline; c) 85/15/2/20; d) 85/15/4/20); e) 90/10/2/5; f) 90/10/4/5; g) 90/10/2/10; h) 90/10/4/10; i) 95/5/2/20; j) 95/5/4/20; k) 100/0/2/20; l) 100/0/4/20.



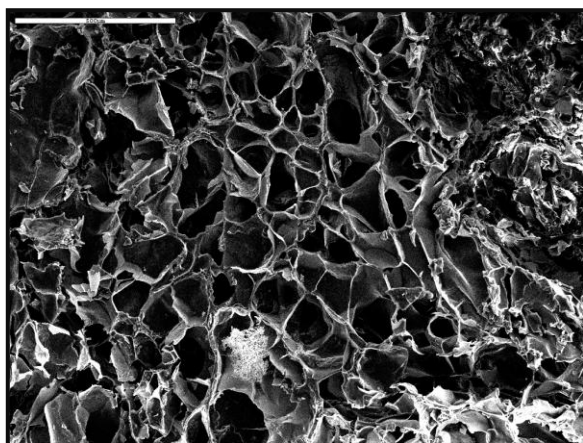
a)



b)

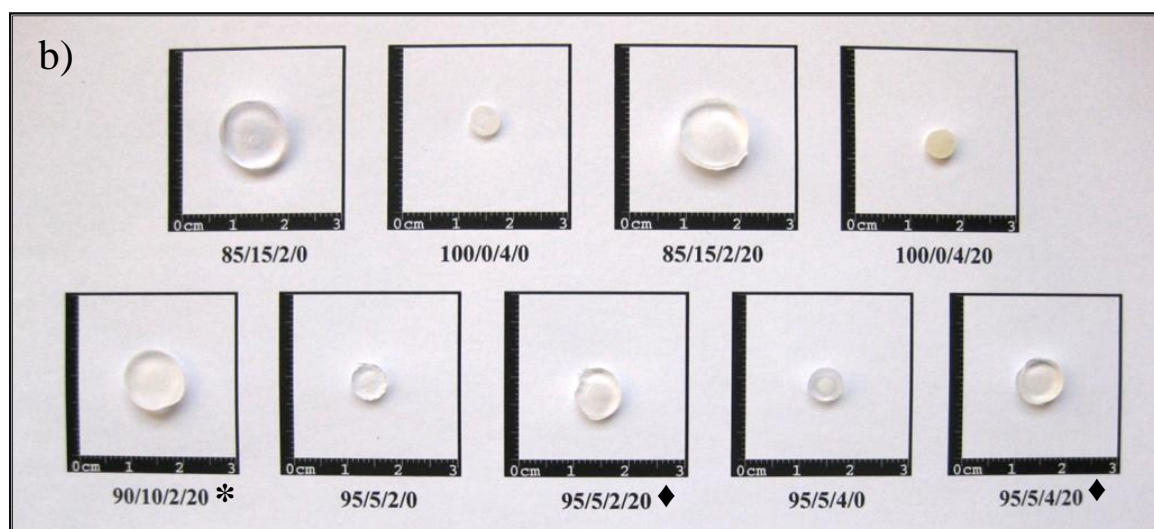
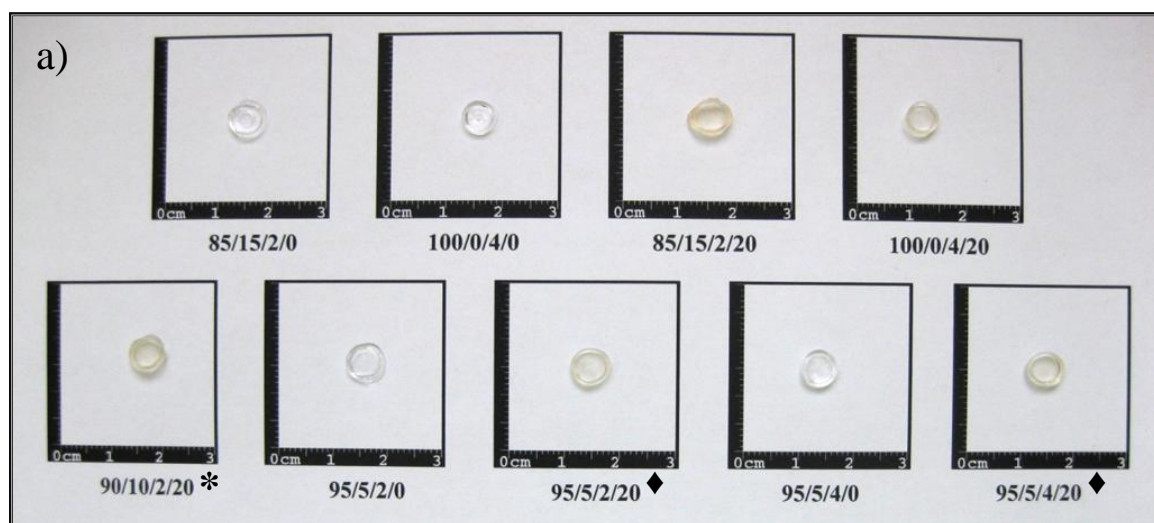


c)



d)

Slika S2. SEM mikrografije P(NiPAAm/IK) hidrogelova: a) 90/10/2/5; b) 90/10/2/10; c) 90/10/4/5; d) 90/10/4/10 ('bar' 500  $\mu\text{m}$ , 70 x).



\* - Uzorak pogodan za reakcije sinteze estra

♦ - Uzorak pogodan za praćenje kinetike otpuštanja proteina

Slika S3. Uzorci P(NiPAAm/IK) hidrogelova u suvom stanju a) i nakon bubrenja do ravnoteže u puferu pH vrednosti  $6,80 \pm 0,01$  na temperaturi  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  b).

## SPISAK INSTRUMENATA

Bomem MB 100

Instrument za FT-IR  
analizu



Graseby Specac Model:  
15,011

Presa za tablete za  
FT-IR analizu



JEOL JMS-5800

Skenirajući  
elektronski  
mikroskop



Polaron SC502

Raspršivač platine



Rheometrics 605

Reometar



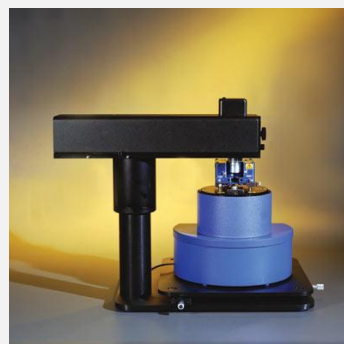
Ultrospec 3300 *pro*  
UV/Visible  
Spectrophotometer

Spektrofotometar



Veeco CP-II

Digitalni instrument -  
kontroler za AFM  
analizu



WB Memmert 22

Termostat-tresilica za  
reakcije sinteze estra



Yellow line DI 25 basic

Mešalica za pripremu  
Sigma supstrata



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

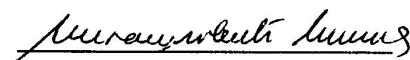
Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

**SINTEZA pH- I TEMPERATURNO-OSETLJIVIH  
HIDROGELOVA  
ITAKONSKE KISELINE KAO NOSAČA ZA IMOBILIZACIJU  
LIPAZE IZ CANDIDA RUGOSA**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 19. 6. 2014.





Прилог 2.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

SINTEZA pH- I TEMPERATURNO-OSETLJIVIH HIDROGELOVA ITAKONSKE  
KISELINE KAO NOSAČA ZA IMOBILIZACIJU LIPAZE IZ *CANDIDA RUGOSA*  
која је моје ауторско дело.

Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис



у Београду, 19. 6. 2014.