

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Predmet: Podobnost teme kandidata Sonje Jakovetić dipl.inž. za izradu doktorske disertacije

Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 26.09.2013.godine, određeni smo za članove Komisije za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije pod naslovom:

„Razvoj enzimskih procesa za proizvodnju estara fenolnih kiselina“

koju je predložila Sonja Jakovetić, dipl. inž. Na osnovu materijala priloženog uz zahtev kandidata, komisija Nastavno–naučnom veću podnosi sledeći

IZVEŠTAJ

1. Podaci o kandidatu

1.1. Biografski podaci

Sonja Jakovetić rođena je 11.12.1984. godine u Kraljevu, gde je završila osnovnu školu Dimitrije Tucović i gimnaziju Mirko Luković, i za uspehe tokom školovanja nagrađena Vukovom diplomom. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2003/2004. Tokom studiranja tri puta je nagrađena diplomom Panta S. Tutundžić za izuzetan uspeh na studijama u redovnom roku. Diplomirala je na TMF-u na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju 30.12.2008. sa ocenom 10 na diplomskom radu i prosečnom ocenom 9,72 u toku studija. Dobitnik je priznanja Srpskog hemijskog društva za ukupan izuzetan uspeh u toku studiranja. Doktorske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju pod mentorstvom dr Zorice Knežević-Jugović, van. prof, upisala je 2009. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 10,0, uključujući i završni ispit:

Predmet	Ocena	ESPB
1.Odabrana poglavlja matematičke analize	10	5
2. Hemijska kinetika	10	5
3. Odabrana poglavlja biohemije - vitamini	10	5
4. Biohemijska kinetika	10	5
5. Industrijska mikrobiologija	10	5
6. Sanitarna mikrobiologija	10	4
7.Viši kurs elektrohemijskog inženjerstva	10	6
8.Imobilisani biokatalizatori: tehnike imobilizacije, bioreaktori i primena	10	6

9. Elektrohemijski i alternativni izvori električne energije	10	4
10. Bioaktivne materije u kozmetičkim proizvodima	10	4
11. Engleski jezik	10	
12. Završni ispit	10	30

Od januara 2010. godine do februara 2011. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj u okviru projekta „Razvoj biotehnoloških postupaka za proizvodnju aditiva i novih formulacija za prehrambenu industriju“ ev. Broj 20064 koji je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od februara 2011. zaposlena je na projektu „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ ev. br.III 46010, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj. Od jula 2013. godine angažovana je na bilateralnom naučnoistraživačkom projekatu između Republike Srbije i Narodne Republike Kine, pod nazivom „Primena poljoprivrednog otpada za proizvodnju enzima“.

Koautor je šest (6) radova u međunarodnim časopisima (oznaka grupe M20: 1 rad M21, 1 rad M22, 3 rada M23 i 1 rad M24 odlukom matičnog odbora), i 12 saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima (3 rada M33, 4 rada M34, 4 rada M63 i 1 rad M64). Uradila je i jednu recenziju za časopis Hemijska industrija.

Spisak objavljenih i saopštenih naučnih i stručnih radova

Naučni rad objavljen u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M₂₁)

1. **Jakovetić S**, Luković N, Bošković-Vragolović N, Bezbradica D, Picazo-Espinosa R & Knežević-Jugović Z (2013) Comparative study of batch and fluidized bed bioreactors for lipase-catalyzed ethyl cinnamate synthesis. Industrial and Engineering Chemistry Research, Accepted for publication, **DOI:** 10.1021/ie402069c, ISSN 0888-5885, IF (2011) 2,237; 30/133, oblast: Engineering/Chemical.

Naučni rad objavljen u istaknutim časopisima međunarodnog značaja (M₂₂)

1. Bezbradica D, Jugović B, Gvozdenović M, **Jakovetić S** & Knežević-Jugović Z (2011) Electrochemically synthesized polyaniline as support for lipase immobilization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 70 (1-2), 55-60. ISSN 1381-1177; IF (2011) 2,823; 48/135, oblast: Chemistry, Physical.

Naučni rad objavljen u časopisima međunarodnog značaja (M₂₃)

1. **Jakovetić S**, Jugović B, Gvozdenović M, Bezbradica D, Antov M, Mijin D & Knežević-Jugović Z (2013) Synthesis of Aliphatic Esters of Cinnamic Acid as Potential Lipophilic Antioxidants Catalyzed by Lipase B from *Candida antarctica*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 170 (7), 1560-1573. ISSN: 0273-2289, IF (2011) 1,943, 84/158, oblast: Biotechnology & Applied Microbiology

2. **Jakovetić S**, Knežević-Jugović Z, Grbavčić S, Avramović N & Karadžić I (2013) Rhamnolipid and lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* strain: the process comparison analysis by statistical approach. *Hemijska industrija*, 67 (4), 677-685. ISSN 0367-598X, IF (2012) 0,463, 104/133, oblast: Engineering, Chemical.
3. Moftah O, Grbavčić S, Moftah W, Luković N, Prodanović O, **Jakovetić S** & Knežević-Jugović Z (2013) Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78 (6), 781-794. ISSN 0352-5139, IF (2012) 0,912, 100/152, oblast: Chemistry, Multidisciplinary.

Naučni rad objavljen u međunarodnom časopisu verifikovan odlukom Matičnog odbora (M₂₄)

1. Knežević-Jugović Z, Stefanović A., Žuža M, Milovanović S, **Jakovetić S**, Manojlović V & Bugarški B (2012) Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins. *Acta Periodica Technologica*, 43, 33-41, ISSN 1450-7183

Naučni rad saopšten na skupu međunarodnog značaja štampan u celini (M₃₃)

1. Knežević-Jugović Z, Jugović B, **Jakovetić S**, Bezbradica D, Antov M, Moftah & Gvozdenović M, „Design of a polyaniline based biosensor electrode for glucose: A comparative study of two immobilized systems“, 38th conference of Slovak Society of Chemical Engineering, High Tatras, Slovakia, 23-27. May 2011, CD Proceedings, ISBN 978-80-227-3503-2, pp. 1519–1525.
2. **Jakovetić S**, Knežević-Jugović Z, Jugović B, Gvozdenović M & Bezbradica D, „Synthesis of ethyl cinnamate catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*“, 6th Central European Congress on Food, CEFood2012, Novi Sad, Srbija, 23-26. May 2012, CD Proceedings, ISBN 978-86-7994-027-8, pp. 1110-1114.
3. Knežević-Jugović Z, **Jakovetić S**, Jugović B, Gvozdenović M, Grbavčić S, Bezbradica D & Antov M, „Enzymatic Synthesis of Aliphatic Esters of Phenolic Acids and Evaluation of Their Antioxidant Properties“, 39th conference of Slovak Society of Chemical Engineering, High Tatras, Slovakia, 21-25. May 2012, CD Proceedings, ISBN 978-80-89475-04-9, pp. 1426–1432.

Naučni rad saopšten na skupa od međunarodnog značaja, štampan u izvodu (M₃₄)

1. **Jakovetić S**, Luković N, Grbavčić S, Jugović B, Gvozdenović M, Grgur B & Zorica Knežević-Jugović, „Enzymatic hydrolysis of egg-white proteins in a membrane reactor“, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd, Srbija, 27-29. June 2013, CD Proceedings, ISBN 978-86-7132-053-5.

2. **Jakovetić S**, Luković N, Grbavčić S, Jovanović J, Stefanović A, Carević M & Zorica Knežević-Jugović, „The kinetic study of oleylcinnamate synthesis“, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd, Srbija, 27-29. June 2013, CD Proceedings, ISBN 978-86-7132-053-5
3. Carević M, Vukašinović-Sekulić M, Stojanović M, Mihailović M, **Jakovetić S** Grbavčić S & Bezbradica D, „Production and characterization of extracellular α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* DSM 1862“, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd, Srbija, 27-29. June 2013, CD Proceedings, ISBN 978-86-7132-053-5.
4. Stefanović A, Jovanović J, Gluvić A, **Jakovetić S**, Luković N, Žuža M & Knežević-Jugović Z, „Kinetic model of the hydrolysis of egg white proteins by Alcalase“, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd, Srbija, 27-29. June 2013, CD Proceedings, ISBN 978-86-7132-053-5.

Naučni rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampani u celini (M₆₃)

1. **Jakovetić S**, Picazo-Espinosa R, Manzanera M, Stojanović Ž, Prodanović R, Miladinović R & Knežević-Jugović Z, „Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on supports with epoxy groups via covalent attachment“, 50. savetovanje SHD, Beograd, 14-15. jun 2012., CD radova u celosti, ISBN: 978-86-7132-049-8, str. 203-207.
2. **Jakovetić S**, Carević M, Grbavčić S, Stojanović M, Luković N, Žuža M & Mihailović M, „Esterification of phenolic acids catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*“, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 19-20. oktobar 2012, CD Knjiga radova, ISBN: 978-86-7132-051-1, str. 54-57.
3. Stojanović M, Carević M, **Jakovetić S**, Dimitrijević A, Trbojević J, Mihailović M & Veličković D, „Enzymatic synthesis of L-ascorbyl linoleate“, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 19-20. oktobar 2012, CD Knjiga radova, ISBN: 978-86-7132-051-1, str. 64-67.
4. Mihailović M, Banjanac K, Stojanović M, Prlainović N, **Jakovetić S** & Carević M, „Stabilizacija imobilisane lipaze iz *Candida rugosa* tretmanom imobilizata aminokiselinama“, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 19-20. oktobar 2012, CD Knjiga radova, ISBN: 978-86-7132-051-1, str. 82-85.

Naučni rad saopšten na skupu od nacionalnog značaja, saopšten u izvodu (M₆₄)

1. Carević M, Stojanović M, **Jakovetić S**, Mihailović M, Dimitrijević A, Trbojević J & Veličković D, „Proizvodnja sirovog ćelijskog ekstrakta β -galaktozidaze pomoću bakterija mlečne kiseline“, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 19-20. oktobar 2012, CD Knjiga radova, ISBN: 978-86-7132-050-4, str. 74.

1.2. Ocena podobnosti kandidata za rad na predloženoj temi

Na osnovu dosadašnjeg rada i rezultata ostvarenih tokom poslediplomskih studija, i u okviru naučno-istraživačkog rada na projektu III46010 (2011-2014) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Sonja Jakovetić dipl.inž. pokazala je interes, sklonost i sposobnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom. To se pre svega ogleda u samostalnom kreiranju i realizaciji istraživanja vezanih za temu doktorske disertacije, kao i u radu u drugim oblastima istraživanja zastupljenim na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Iz oblasti istraživanja, iz koje se predlaže tema doktorske disertacije, do sada je objavila dva naučna rada štampana u časopisima od međunarodnog značaja, kao i više saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Kandidat poseduje i odlično znanje engleskog i nemačkog jezika, a ima i iskustva u korišćenju različitih softverskih paketa za obradu podataka.

Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da Sonja Jakovetić, dipl.inž. ispunjava sve potrebne uslove za rad na predloženoj temi doktorske disertacije.

2. Predmet i cilj istraživanja

Predmet rada ove doktorske disertacije je razvoj i optimizacija enzimskog postupka sinteze estara fenolnih kiselina, biološki aktivnih prirodnih antioksidanasa, u cilju poboljšanja njihovih fizičko-hemijskih karakteristika i/ili funkcionalnosti. Interes za razvoj enzimskih procesa sinteze prirodnih antioksidanasa proizašao je iz sve veće svesti potrošača o neželjenim efektima veštačkih dodataka hrani, kao i sve strožih zakonskih mera koje regulišu njihovu primenu. Implikacije da kao proizvodi razgradnje butil-hidroksi-toluena (BHT) i butil-hidroksi-anizola (BHA), lipofilnih aditiva koji se koriste kao antioksidansi u kozmetici i hrani, nastaju toksične i kancerogene materije, dovele su do potrebe za pronalaskom adekvatne zamene u vidu prirodnih antioksidanasa.

Fenolna jedinjenja su veoma rasprostranjena grupa proizvoda sekundarnog metabolizma biljaka, za čije se prisustvo vezuje antioksidativno delovanje biljnih ekstrakata. U poslednjih nekoliko godina ova jedinjenja zaokupljaju pažnju naučne javnosti, kako zbog niza bioloških dejstava (antimikrobna, antikancerogena, antiinflamatorna, antikoagulaciona), tako i zbog svojih uticaja na kvalitet proizvoda, poput boje i arome. Međutim, i pored niza prednosti fenolnih kiselina u poređenju sa sintetičkim antioksidansima, hidrofilna priroda ih čini nepogodnim za korišćenje u uljanim formulacijama i emulzijama. Uvođenjem alifatičnog bočnog niza, esterifikacijom fenolnih kiselina, povećava se njihova rastvorljivost u nepolarnim sredinama, a samim tim i mogućnost njihove primene u industriji hrane, kao i farmaceutskoj industriji.

Proizvodnja estara na idustrijskom nivou oslanja se na hemijsku sintezu, koja se zasniva na primeni kiselih katalizatora. U manjoj meri estri se proizvode enzimskom sintezom i ekstrakcijom iz biljaka. Sinteza estara hemijskom metodom ima nekoliko značajnih nedostataka: neselektivnost reakcije koja dovodi do stvaranja velikog broja neželjenih proizvoda, toksičnost nekih sporednih proizvoda za životnu sredinu, primena koncentrovanih kiselina komplikuje rukovanje reaktantima i upotreba kiselih katalizatora dovodi do povećanih troškova za opremu zbog korozivnog dejstva. Zahvaljujući velikoj specifičnosti i aktivnosti enzima pod blagim procesnim uslovima, primenom enzimskih procesa mogu se prevazići nedostaci hemijski katalizovane sinteze estara. Estri dobijeni na ovaj način svrstavaju se u prirodne proizvode, a sam postupak sinteze spada u "zelene" postupke. S druge strane, nedovoljna primena enzimskih postupaka posledica je kompleksnosti enzimske sinteze estara koja zavisi od velikog broja

reakcionih uslova, što otežava optimizovanje reakcije, a pored toga i cene samog enzimskog preparata.

U ovoj disertaciji izvršiće se optimizacija sinteze alifatičnih estara fenolnih kiselina. U početnim fazama fokus će biti na sintezi estara cimetne kiseline, koja će se zbog najjednostavnije strukture koristiti kao model sistem. U tom cilju ispitaće se katalitičko dejstvo nekoliko lipaza iz različitih izvora, pre svega lipaze tipa B iz *Candida antarctica*, lipaze iz *Rhizomucor miehe* i lipaze iz *Thermomyces lanuginosus*. U početnim eksperimentima biće korišćeni komercijalni preparati sa imobilisanim lipazama: Novozyme 435, preparat koji sadrži lipazu iz *C. antarctica* (tip B) imobilisanu na makroporozni poliakrilni nosač, Lipozyme IM 20 preparat sa lipazom iz *R. miehei* imobilisanom na Duolite ES 562 i Lipozyme TLIM preparat sa lipazom iz *T. lanuginosus* imobilisanom na silika gel, dok će se u daljem radu raditi na razvijanju sopstvenih imobilizata s ciljem povećanja ekonomičnosti procesa. Ispitaće se uticaj acil-akceptora različite dužine ugljeničnog niza (C2-C18) na brzinu enzimske reakcije sinteze estara cimetne kiseline, kao i na antioksidativne i antimikrobne karakteristike dobijenih estara. Nakon toga će se na odabranim model sistemima, sintezi etil-, butil- i oleil-cinamata, izvršiti optimizacija reakcionih parametara s ciljem povećanja koncentracija estara, za šta će biti korišćen eksperimentalni dizajn (centralni kompozitni rotabilni dizajn CCRD), dok će se za analizu dobijenih rezultata koristiti metoda odzivnih površina (RSM). Ispitaće se uticaji temperature, molskog odnosa supstrata, intenziteta mešanja, koncentracije biokatalizatora i vrste organskog rastvarača na brzinu enzimske sinteze alifatičnih estara cimetne kiseline. Nakon dobijanja optimalnih parametara za sintezu estara cimetne kiseline ispitaće se i uticaj različitih supstituenata na aromatičnom prstenu acil-donora na brzinu enzimske reakcije, kao i na biološka i funkcionalna svojstva dobijenih estara.

Pored sinteze estara fenolnih kiselina u šaržnom reaktoru, ispitaće se mogućnost sinteze estara fenolnih kiselina u protočnim reaktorima: reaktoru sa fluidizovanim i reaktoru sa pakovanim slojem, koristeći sintezu etil-cinamata kao model reakciju. Protočni reaktori omogućavaju veću produktivnost sistema po masi primenjenog biokatalizatora, pa će se u ovoj fazi istraživanja vršiti optimizacija procesnih parametara sinteze etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim i reaktoru sa pakovanim slojem. To će uključiti ispitivanje uticaja različitih protoka reakcione smeše, kao i uticaja koncentracije enzima i koncentracije limitirajućeg supstrata na prinos etil-cinamata. Ispitaće se i uticaj različitih koncentracija etanola i cimetne kiseline na početnu brzinu sinteze etil-cinamata u šaržnom i u reaktoru sa fluidizovanim slojem, s ciljem dobijanja kinetičkih modela neophodnih za povećanje razmera procesa.

Problem visoke cene enzima u industrijskim enzimskim procesima najefikasnije se rešava primenom imobilisanih enzima koji omogućuju višestruku primenu i razvoj kontinualnih postupaka proizvodnje. Stoga će drugi deo rada biti fokusiran na imobilizaciju lipaze tipa B iz *C. antarctica* i *R. miehei* s ciljem dobijanja jeftinijih biokatalizatora kako bi se doprinelo povećanju ekonomičnosti procesa. Ispitaće se mogućnost imobilizacije lipaze adsorpcijom na neorganski nosač, kaolin, i rezultati će se uporediti sa adsorpcijom na komercijalni hidrofobni nosač Diaion. Ispitaće se kinetika i mehanizam vezivanja lipaze na nosače primenom različitih modela adsorpcionih izoterma i na osnovu utvrđenih kinetičkih i termodinamičkih parametara upoređiću se uticaji površine navedenih čvrstih nosača na vezivanje lipaze.

Pored adsorpcije, biće ispitana i mogućnost kovalentne imobilizacije lipaze na nosače sa epoksidnim grupama, poput komercijalnog Eupergit C 250, ali i sintetisanih makroporoznih nosača. S ciljem povećanja efikasnosti procesa, nosači će se hemijski modifikovati sa 1,2-dietanolaminom i glutaraldehidom, radi uvođenja novih funkcionalnih grupa na nosač što će doprineti vezivanju enzima preko većeg broja aminokiselinskih ostataka i time omogućiti

dobijanje stabilnijih biokatalizatora. Ispitaće se i mogućnost povećanja prinosa imobilizacije lipaze primenom perjodadne metode, koja se zasniva na prethodnoj oksidaciji ugljeno-hidratne frakcije enzima i imobilizaciji preko karbonilnih grupa. Svi imobilisani sistemi biće upoređeni sa aspekta specifične aktivnosti imobilizata, procenta vezivanja i prinosa imobilizacije. Dobijeni imobilizati će takođe biti okarakterisani u pogledu pH optimuma, termostabilnost, a biće ispitana i njihova specifičnost i upoređena sa nativnim enzimom.

Osnovni cilj ove disertacije je da se doprinese razvoju enzimskog procesa sinteze alifatičnih estara fenolnih kiselina. Ciljevi istraživanja obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom mogu se podeliti u nekoliko celina:

1. Pronalaženje lipaze iz prirodnih izvora, koja će u visokom prinosu sintetisati estre fenolnih kiselina, i određivanje njene specifičnosti prema različitim acil-akceptorima na primeru sinteze estrara cimetine kiseline;
2. Određivanje uticaja dužine uvedenog bočnog niza na biološka svojstva dobijenih estara i to antioksidativnu aktivnost u vodenim rastvorima i emulzijama, antimikrobnu i antikoagulacionu aktivnost;
3. Utvrđivanje optimalnih procesnih parametara enzimski katalizovane sinteze selektovanih fenolnih estara i odgovarajućih kinetičkih parametara u sistemima sa komercijalnom imobilisanom lipazom;
4. Ispitivanje specifičnosti primenjene lipaze prema različitim acil-donorima i određivanje antioksidativnih osobina dobijenih estara;
5. Razvoj originalnih metoda i postupaka imobilizacije nativnih lipaza na netoksičnim i dostupnim nosačima, koje su se pokazale kao efikasne u sintezi bioaktivnih estara fenolnih kiselina.
6. Optimizacija konfiguracije i operativnog režima rada bioreaktora sa imobilisanom lipazom u cilju efikasne sinteze nekoliko odabranih bioaktivnih estara fenolnih kiselina.

U poslednjih 15 godina publikovan je niz radova koji se bavi tematikom enzimske sinteze estara fenolnih kiselina, koji sa različitih aspekata tretiraju datu problematiku. Ovde su navedeni samo neki radovi koji su povezani sa enzimskom sintezom estara fenolnih kiselina, kao i imobilizacijom lipaza, a koji predstavljaju polaznu osnovu za dalje istraživanje u ovoj disertaciji:

Rice-Evans CA, Miller NJ & Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7), 933-956.

Guyot B, Bosquette B, Pina M & Graille J (1997) Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnology Letters*. 19(6), 529-532.

Buisman GJH, van Helteren CTW, Kramer GFH, Veldsink JW, Derksen JTP & Cuperus FP (1998) Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnology Letters*. 20(2), 131-136.

Natella F, Nardini M, Di Felice M & Scaccini C (1999) Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: □ Structure–Activity Relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(4), 1453-1459.

Stamatis H, Sereti V & Kolisis FN (1999) Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76(12), 1505-1510.

Stamatis H, Sereti V & Kolisis FN (2001) Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11(4–6), 323-328.

Lue B-M, Karboune S, Yeboah FK & Kermasha S (2005) Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 80(4), 462-468.

Robbins RJ (2003) Phenolic Acids in Foods: □ An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(10), 2866-2887.

Chen B, Liu H, Guo Z, Huang J, Wang M, Xu X & Zheng L (2011) Lipase-Catalyzed Esterification of Ferulic Acid with Oleyl Alcohol in Ionic Liquid/Isooctane Binary Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(4), 1256-1263.

Chigorimbo-Murefu NTL, Riva S & Burton SG (2009) Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 56(4), 277-282.

Figueroa-Espinoza M-C & Villeneuve P (2005) Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(8), 2779-2787.

Lee G-S, Widjaja A & Ju Y-H (2006) Enzymatic Synthesis of Cinnamic Acid Derivatives. *Biotechnology Letters*. 28(8), 581-585.

Yadav GD & Devendran S (2012) Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium. *Process Biochemistry*. 47(3), 496-502.

Menezes JCJMDS, Kamat SP, Cavaleiro JAS, Gaspar A, Garrido J & Borges F (2011) Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates. *Eur J MedChem*. 46(2), 773-777.

Abdul Rahman MB, Tajudin SM, Hussein MZ, Abdul Rahman RNZR, Salleh AB & Basri M (2005) Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. *Applied Clay Science* 29(2), 111-116.

Gruber CC & Pleiss J (2012) Lipase B from *Candida antarctica* binds to hydrophobic substrate–water interfaces via hydrophobic anchors surrounding the active site entrance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 84(0), 48-54.

Knežević Z, Milosavić N, Bezbradica D, Jakovljević Ž & Prodanović R (2006) Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. *Biochemical Engineering Journal*, 30(3), 269-278.

3. Polazne hipoteze

Sve veća primena enzima u biotehnološkim procesima i razvoj novih komercijalnih enzimskih procesa u svetu nedvosmisleno pokazuje da su enzimi biokatalizatori izuzetnih osobina i da u svetlu razvijanja novih tehnoloških postupaka baziranih na strogim principima vezanim za očuvanje životne sredine oni postaju nezamenljivi. Na osnovu pregleda velikog broja radova i patenata može se zaključiti da se enzimi, danas uspešno koriste kao katalizatori u farmaceutskoj, prehrambenoj, industriji kože, kao i u bioremedijaciji.

Rad na ovoj doktorskoj disertaciji osmišljen je pod pretpostavkom da se lipaze mogu uspešno implementirati kao biokatalizatori u procesima sinteze lipofilnih antioksidanasa, pre svega alifatičnih estara fenolnih kiselina zahvaljujući činjenici da pored reakcija hidrolize mogu efikasno katalizovati i reakcije esterifikacije pod blagim procesnim uslovima. Pretpostavka je da se pomoću lipaze mogu ostvariti visoki prinosi estara u energetski manje zahtevnim procesima u odnosu na hemijski katalizovane. U radu će se uzeti u obzir i mogućnost izvođenja reakcije sinteze etil-cinamata u više bioreaktorskih sistema, kao i pronalaženje adekvatnih kinetičkih modela neophodnih za povećanje razmera procesa.

Da bi se postigao efikasan sistem, koji bi omogućio dobijanje lipofilnih antioksidanasa u visokim prinosima, enzimski katalizovana reakcija sinteze estara mora biti pažljivo optimizovana. Pre svega treba izvršiti selekciju odgovarajućeg biokatalizatora koji može efikasno da sintetiše ove potencijalne lipofilne antioksidanse. Iz literature je poznato da samo nekoliko lipaza (lipaza tipa B iz *C. antarctica*, lipaza iz *R. miehei* i lipaza iz *T. lanuginosus*) ima mogućnost da koristi fenolne kiseline kao supstrate, pa će pažnja biti usmerena prvenstveno na pomenute enzime, ali će se ispitati i nekoliko lipaza izolovanih iz prirodnih izvora na katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju.

Nakon odabira odgovarajućeg biokatalizatora pristupiće se optimizaciji procesa s ciljem poboljšanja efikasnosti esterifikacije fenolnih kiselina s aspekta dobijanja većeg prinosa, ali i produktivnosti celog procesa. Za optimizovanje će biti primenjeni višefaktorni eksperimentalni planovi i metod odzivnih površina, koji omogućavaju detektovanje interaktivnih efekata između faktora. Biće ispitan uticaj različitih acil-akceptora na esterifikaciju cimetne kiseline, a zatim i odabir odgovarajuće reakcione sredine, koncentracije limitirajućeg supstrata, molskog odnosa supstrata, kao i odabir najboljeg reaktorskog sistema. Nakon toga će se pristupiti optimizaciji operativnih parametara za primenjenje reaktorske sisteme, poput pronalaženja odgovarajućeg protoka reakcione smeše, visine pakovanog sloja, temperature, brzine mešanja i koncentracije biokatalizatora. Antioksidativna aktivnost dobijenih estara biće ispitana standardnom spektrofotometrijskom difenilpikrilhidrazil (DPPH) metodom, ali i savremenim metodama ciklične voltametrije. Za neke estre će se ispitati i dodatna fiziološka dejstva, kao što su antimikrobna i antikoagulaciona aktivnost. U nastavku će biti ispitana mogućnost primene drugih fiziološki aktivnih acil-donora kao što su ferulna, *p*-metoksi cimetna, *p*-kumarinska kiselina, s ciljem dobijanja lipofilnih estara poboljšanih fizioloških svojstava.

Primena imobilisanih lipaza može da doprinese poboljšanju ukupnih tehnoloških performansi i ekonomičnosti procesa, jer se omogućava višekratna upotreba enzima, stabilizacija enzima i kontinualno izvođenje reakcije u protočnim reaktorima. S druge strane, neophodno je dobiti

biokatalizator koji bi bio aktivan i stabilan u dovoljno dugom periodu skladištenja, da bi imobilizacija enzima bila tehnološki i ekonomski opravdana. Polazeći od ove hipoteze pristupiće se pronalasku imobilisanih enzima, superiornih karakteristika, koji će omogućiti snižavanje ukupnih procesnih troškova u odnosu na procese sa komercijalnim enzimima. Zbog toga će se, pre svega, ispitati mogućnost imobilizacije lipaze adsorpcijom na kaolinu, s obzirom da se radi o jednostavnoj tehnici i pristupačnom, netoksičnom materijalu, koji se može koristiti u prehrambenoj industriji. Ispitaće se i mogućnost kovalentne imobilizacije enzima na druge komercijalne nosače primenom različitih postupaka.

Osnovne hipoteze koje se mogu izdvojiti kao polazna osnova za započinjanje naučno-istraživačkog rada u okviru ove disertacije su sledeće:

- Estri fenolnih kiselina su prirodni lipofilni antioksidansi koji mogu da se koriste kao suplementi hrani, jer pored poboljšanja funkcionalnih karakteristika hrane utiču i na kvalitet hrane dajući joj boju, ukus i aromu. Estri fenolnih kiselina se dobijaju konvencionalnim hemijskim sintezama koje podrazumevaju rad sa agresivnim kiselinama, čineći ih nepoželjnim za ljudsku upotrebu. Enzimska sinteza bi omogućila dobijanje ovih estara u većem prinosu pod blagim reakcionim uslovima, olakšavajući na taj način prečišćavanje finalnog proizvoda, što bi uz veliku specifičnost enzima doprinelo poboljšanju ekonomičnosti ove tehnologije.
- Fiziološka svojstva estara fenolnih kiselina u mnogome zavise od strukture same fenolne kiseline, tj. od prirode supstituenata na aromatičnom prstenu, dok uvođenje alifatičnog bočnog niza najviše utiče na promenu rastvorljivosti ovih kiselina u nepolarnim sredinama. Zbog toga će se prvo pristupiti određivanju specifičnosti primenjenj lipaze prema različitim acil-akceptorima, a kasnije će biti ispitan i uticaj različitih supstituenata na aromatičnom prstenu na specifičnost primenjene lipaze u reakciji sa različitim acil-donorima. Pretpostavka je da će lipofilni estri fenolnih kiselina sintetisani u velikom prinosu zadržati, ili čak imati poboljšanu biološku aktivnost, u poređenju sa neesterifikovanim fenolnim kiselinama.
- Primena savremenih statističkih metoda planiranih eksperimenata bi omogućila optimizaciju procesnih parametara i uvide u međusobni odnos između ispitivanih parametara, što bi dovelo do poboljšanja produktivnosti procesa, što bi kasnije i bilo verifikovano eksperimentom izvedenim pod optimalnim uslovima.
- Izvođenje reakcije sinteze bioaktivnog estra u reaktorima sa pakovanim i fluidizovanim slojem imobilisanog biokatalizatora pri odgovarajućem režimu rada i procesnim uslovima bi omogućilo veće prostorno-vremenske prinose reaktora.
- Utvrđeni kinetički modeli enzimskih dvosupstratnih reakcija u odabranim bioreaktorima bi ukazali na mehanizme odvijanja enzimskih reakcija sa različitim acil-donorima i potencijalnu inhibiciju nekim od supstrata na osnovu čega bi se predložilo unapređenje sistema i načina izvođenja reakcije.
- Kako cena komercijalnih imobilisanih enzimskih preparata značajno utiče na ekonomičnost celokupne proizvodnje, značajan istraživački rad će se usmeriti na razvoj imobilisanih lipaza na pristupačnim, jeftinim nosačima, koji će omogućiti sintezu estara sa nepromenjenom efikasnošću.

4. Naučne metode istraživanja

Za određivanje koncentracije, prečišćavanje i karakterizaciju dobijenih estara fenolnih kiselina koriste se savremene instrumentalne metode, kao što su metode reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi (RP-HPLC), NMR spektralne analize i druge.

Antioksidativna svojstva dobijenih estara određivaće se pomoću DPPH metode, zasnovane na sposobnosti jedinjenja da redukuje stabilan organski DPPH radikal. Rezultati dobijeni DPPH metodom biće provereni elektrohemijski, metodom ciklične voltametrije. Eksperimenti će se izvoditi u elektrohemijskoj ćeliji na sobnoj temperaturi. Kao radna elektroda koristiće se staklena ugljenična elektroda, kao kontra elektroda koristiće se elektroda od platine, dok će se kao referentna elektroda koristiti zasićena kalomel elektroda.

Za dobijanje i karakterizaciju imobilisanih enzima koristiće se savremene hemijske i instrumentalne metode. Svi postupci hemijske modifikacije enzima kao i nosača izvodice se prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature. Dobijeni imobilisani enzimi će se okarakterisati prema standardnim metodama za određivanje termostabilnosti i operativne stabilnosti, pH i temperaturnog profila, dok će se obrazovanje hemijskih veza između enzima i nosača potvrditi FT-IR spektroskopijom. Standardna aktivnost lipaza će se određivati spektrofotometrijskom metodom pri čemu će se kao koristiti *p*-nitrofenil-butirat kao supstrat, dok će se sadržaj proteina određivati standardnom spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu. Hidrolitička aktivnost imobilizata određivaće se i titrimetrijski, korišćenjem emulzije maslinovog ulja kao supstrata. Imobilizati sa najvećom hidrolitičkom aktivnošću biće ispitani i u reakciji sinteze estara fenolnih kiselina prema već određenim optimalnim uslovima za odgovarajuće estre.

5. Očekivani naučni doprinos

Rezultati dobijeni u toku rada na ovoj doktorskoj disertaciji mogu predstavljati značajan naučni doprinos na polju primene lipaza kao biokatalizatora u reakcijama dobijanja netoksičnih i efikasnih liposolubilnih antioksidanasa – alifatičnih estara fenolnih kiselina, koji bi kao bioaktivne komponente mogli da se koriste u različitim formulacijama hrane kao funkcionalni dodaci. U okviru istraživanja potencijalno se očekuju nekoliko osnovnih doprinosa, i to:

Razvoj originalnog biotehnološkog postupka dobijanja alifatičnih estara fenolnih kiselina, što podrazumeva nekoliko pojedinačnih naučnih i stručnih doprinosa:

- doprinos razumevanju uticaja vrste i položaja supstituenta u aromatičnom prstenu cimetne kiseline na biološku aktivnost i specifičnost odabranih lipaza;
- doprinos razumevanju uticaja vrste i dužine lanca acil-donora na biološku aktivnost dobijenih fenolnih estara na model reakciji sa cimetnom kiselinom kao i na brzinu enzimske reakcije esterifikacije;
- optimizacija procesnih parametara u reakciji sinteze nekoliko biološki aktivnih estara fenolnih kiselina u sistemima sa slobodnom i imobilisanom lipazom;
- doprinos razumevanju mehanizama i kinetike enzimske sinteze estara cimetne i drugih fenolnih kiselina u različitim sistemima sa slobodnom i imobilisanom lipazom čime bi se omogućili uvidi u prisustvo i/ili jačinu inhibicije enzima supstratima u ovim sistemima;

- razvoj originalnih imobilisanih sistema sa lipazama koje su se pokazale kao efikasne u sintezi bioaktivnih estara čija bi upotreba dovela do smanjenja troškova procesa;
- izbor odgovarajućeg bioreaktorskog sistema i optimalnog operativnog režima rada za primenjeni sistem;
- utvrđivanje kinetičkih modela za opisivanje reakcije sinteze nekoliko odabranih estara fenolnih kiselina pod prethodno optimizovanim reakcionim uslovima i konfiguracijama reaktora, čime bi se dobile projektne jednačine neophodne za predviđanje toka reakcije u dužem vremenskom periodu i za uvećanje razmera procesa.

6. Plan istraživanja i struktura rada

Predmet rada ove doktorske disertacije je razvoj enzimskog postupka sinteze alifatičnih estara fenolnih kiselina. Ispitaće se uticaj osnovnih parametara na prinos sinteze estara kao što su temperatura, molski odnos supstrata, koncentracija enzima, koncentracija limitirajućeg supstrata, broj obrtaja, pri čemu će biti primenjena metoda planiranog eksperimenta i matematičko-statistička obrada eksperimentalnih podataka. Ispitaće se i mogućnost povećanja ukupne efikasnosti procesa sintezom estara u protočnim reaktorima, i to reaktoru sa fluidizovanim i reaktoru sa pakovanim slojem. Takođe, će se ispitati i procesni parametri i načini izvođenja procesa kao i režimi rada bioreaktora. Odrediće se i kinetički model sinteze etil cinamata u šaržnom i u reaktoru s fluidizovanim slojem, neophodan za povećanje razmera procesa.

U poslednjem delu rada analiziraće se mogućnost primene nekoliko novih i konvencionalnih tehnika imobilizacije lipaza koje se zasnivaju na adsorpciji lipaze kao i na kovalentnoj imobilizaciji na hemijski modifikovane epoksidne nosače u cilju uvođenja novih funkcionalnih grupa na nosač čime bi se omogućilo dobijanje stabilnijih biokatalizatora u procesu sinteze estara fenolnih kiselina.

Predviđa se da će u doktorskoj disertaciji biti obrađena sledeća poglavlja: *Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura*.

U poglavlju *Uvod* biće prikazan kratak osvrt na oblast istraživanja i definisani predmet istraživanja, kao i glavni ciljevi disertacije.

Poglavljje *Teorijski deo* obuhvatiće pregled dosadašnjih istraživanja koji se odnose na:

- Značaj fenolnih kiselina i njihovih estara posmatran kroz njihova fiziološka svojstva;
- Struktura i mehanizam delovanja lipaza koje mogu da katalizuju reakciju sinteze estara fenolnih kiselina i metode njihove imobilizacije;
- Enzimski katalizovane sinteze estara fenolnih kiselina (uticaj reakcionih faktora)
- Enzimsku kinetiku bisupstratnih reakcija;
- Poređenje šaržnih i protočnih reaktora u enzimski katalizovanim reakcijama;

U *Eksperimentalnom delu* biće navedeni materijali i metode primenjeni u eksperimentalnom radu:

- Materijali
- Instrumenti
- Metode

U poglavlju *Rezultati i diskusija* biće prikazani i diskutovani dobijeni rezultati. Ovo poglavlje sadržaće prikaz i diskusiju sledećih eksperimenata:

- Uticaj vrste lipaze na prinos estara fenolnih kiselina
- Uticaj dužine ugljeničnog niza alifatičnih alkohola na prinos enzimske sinteze estara cimetne kiseline katalizovan lipazom tipa B iz *Candida antarctica*
- Optimizacija procesnih parametara sinteze etil i butil i oleil cinamata
- Određivanje specifičnosti lipaze tipa B iz *C.antarctica* i lipaze iz *R.miehei* prema acil-donorima sa različitim supstituentima na aromatičnom prstenu
- Optimizacija režima rada i konfiguracije protočnih reaktorskih sistema u sintezi etil cinamata i poređenje sa šaržnim reaktorom
- Poređenje antioksidativnih svojstava dobijenih estara
- Imobilizacija lipaze adsorpcijom
- Kovalentna imobilizacija lipaze na modifikovane i nemodifikovane nosače

U *Zaključku* će biti sumirani dobijeni rezultati i izvedeni zaključci na osnovu upoređivanja sa literaturnim podacima.

U delu *Literatura* biće navedene reference citirane u disertaciji, uključujući i naučne publikacije proistekle iz istraživanja u okviru ovde disertacije.

7. Zaključak i predlog

Na osnovu svega izloženog, Komisija smatra da je predložena tema doktorske disertacije dipl.inž. Sonje Jakovetić pod naslovom „**RAZVOJ ENZIMSKIH PROCESA ZA SINTEZU ESTARA FENOLNIH KISELINA**” naučno zasnovana, pa predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta da je prihvati. Za mentora se predlaže dr Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Istraživanja u okviru ove disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološkog inženjerstva za koju je Tehnološko-metalurški fakultet, Univerziteta u Beogradu, matična ustanova.

U Beogradu, 11.11.2013. godine

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Dr Dejan Bezbradica, docent
Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Dr Nevenka Bošković-Vragolović, vanredni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Dr Mirjana Antov, redovni profesor
Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu