

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

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 enzimskog postupka za sintezu askorbil-estara masnih kiselina

koju je predložila Marija Stojanović, dipl. inž. Na osnovu pregleda dokumentacije koju je dostavio kandidat Komisija podnosi sledeći

I Z V E Š T A J

1. PODACI O KANDIDATU

Marija Stojanović rođena je u Kruševcu gde je završila osnovnu školu Dositej Obradović i Kruševačku gimnaziju. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2004/2005. godine. Diplomirala je na TMF-u na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju 24.09.2010. sa ocenom na diplomskom radu 10 (deset) i prosečnom ocenom u toku studija 9,69. Po završetku redovnih studija, upisala je doktorske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju (mentor dr Dejan Bezbradica, docent). Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,82, uključujući i završni ispit:

Predmet	ESPB	Ocena
1. Odabrana poglavlja matematičke analize	5	10
2. Hemijska kinetika	5	10
3. Odabrana poglavlja biohemije - vitamini	5	8
4. Biohemijska kinetika	5	10
5. Industrijska mikrobiologija	5	10
6. Hemija fiziološki aktivnih jedinjenja	5	10
7. Strukturna analiza organskih molekula	6	10
8. Imobilisani biokatalizatori: tehnike imobilizacije, bioreaktori i primena	6	10
9. Površinski aktivne materije	4	10
10. Bioaktivne materije u kozmetičkim proizvodima	4	10
11. Engleski jezik		10
12. Završni ispit	30	10

Od 1.02.2011. godine, Marija Stojanović je zaposlena kao istraživač pripravnik na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 2013. godine. U tekućem projektnom ciklusu (od 2011. godine) angažovana 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. Koautor je tri rada u međunarodnim časopisima (jedan M21, jedan M22 i jedan M23) i dvanaest saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima (jedno M33, šest M34, četiri M63 i jedno M64).

Objavljeni naučni radovi i saopštenja

Naučni radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M₂₁)

1. D. Bezbradica, **M. Stojanović**, D. Veličković, A. Dimitrijević, M. Carević, M. Mihailović, N. Milosavić „Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester“, Biochemical Engineering Journal, 71 (2013) 89-96, ISSN 1369-703X; IF(2011)=2,645; IF(2012)=2,579.

Naučni radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M₂₂)

2. **M. Stojanović**, D. Veličković, A. Dimitrijević, N. Milosavić, Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica „Lipase-Catalyzed Synthesis of Ascorbyl Oleate in Acetone: Optimization of Reaction Conditions and Lipase Reusability“, Journal of Oleo Science, 62 (2013) 591-603, ISSN 1345-8957, IF(2011)=1,417; IF(2012)=1,242.

Naučni radovi u međunarodnim časopisima (M₂₃)

3. **M. Stojanović**, M. Carević, M. Mihailović, Z. Knežević-Jugović, S. Petrović, D. Bezbradica „Enzimaska sinteza i primena askorbil-estara masnih kiselina“, Hemijska Industrija, 67 (2013) 239-247, ISSN 2217-7426; IF(2011)=0,205; IF(2012)=0,463.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M₃₃)

4. **M. Stojanović**, D. Veličković, A. Dimitrijević, N. Milosavić, Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica „Study of lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl oleate using response surface methodology“, 6th Central European Congress on Food - CEFood2012, 23-26. maj 2012, Novi Sad, Proceedings of 6th Central European Congress on Food, ISBN: 978-86-7994-027-8, str. 807-813.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M₃₄)

5. **M. Stojanović**, D. Veličković, A. Dimitrijević, N. Milosavić, Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica „The optimization of enzymatic synthesis of ascorbyl oleate in organic solvents“, 1st FCUB ERA Workshop Food Safety and Health Effects of Food, 31. januar – 1. februar 2011, Beograd, P.1.
6. M. Carević, **M. Stojanović**, M. Mihailović, A. Stefanović, S. Grbavčić, Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica „The immobilization of β -galactosidase on chemically modified immobilization supports“, 2nd FCUB Workshop Food Technology and Biotechnology, 18-19. oktobar 2011, Beograd, P-26.
7. A. Milisavljević, **M. Stojanović**, I. Dinić, M. Carević, M. Mihailović, N. Milosavić, D. Bezbradica „Lipase-catalyzed synthesis of phloridzin esters“, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, 27.-29. jun 2013, Beograd, F P21.
8. N. Prlainović, **M. Stojanović**, M. Carević, M. Mihailović, K. Banjanac, A. Marinković, D. Bezbradica „Two-step modification of silica nanoparticles for covalent lipase immobilization“ 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, 27.-29. jun 2013, Beograd, BS-NS P001.
9. M. Mihailović, M. Carević, **M. Stojanović**, N. Prlainović, K. Banjanac, D. Bezbradica „Chemical modification of Purolite A109 for application in lipase immobilization“, 8th

International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, 27.-29. jun 2013, Beograd, F P34.

10. M. Carević, M. Vukašinović-Sekulić, **M. Stojanović**, M. Mihailović, S. Jakovetić, S. Grbavčić, D. Bezbradica „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, 27.-29. jun 2013, Beograd, F P14.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini (M₆₃)

11. **M. Stojanović**, D. Veličković, A. Dimitrijević, N. Milosavić, Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica „Sinteza askorbil-oleata katalizovana imobilisanom lipazom iz *C. antarctica*“, Biotehnologija za održivi razvoj, 24-26. novembar 2010, Beograd, CD radova u celosti, ISBN: 978-86-7401-269-7, str. 21-24.
12. **M. Stojanović**, M. Carević, S. Jakovetić, A. Dimitrijević, J. Trbojević, M. Mihailović, D. Veličković, „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.
13. S. Jakovetić, M. Carević, S. Grbavčić, **M. Stojanović**, N. Luković, M. Žuža, M. Mihailović, „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.
14. M. Mihailović, K. Banjanac, **M. Stojanović**, N. Prlainović, S. Jakovetić, M. Carević, „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.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M₆₄)

15. M. Carević, **M. Stojanović**, S. Jakovetić, M. Mihailović, A. Dimitrijević, J. Trbojević, D. Veličković „Proizvodnja sirovog ćelijskog ekstrakta β -galaktozidaze pomoću bakterija mlečne kiseline“, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 19-20. oktobar 2012, CD Kratki izvodi radova, ISBN: 978-86-7132-051-1, str. 74.

Ocena podobnosti kandidata za rad na predloženoj temi

Na osnovu dosadašnjeg rada i pokazanih rezultata tokom poslediplomskih studija i u okviru naučno-istraživačkog rada na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, III46010 (2011-2014), Marija Stojanović, dipl. inženjer tehnologije, pokazala je sklonost i izrazitu sposobnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom. Takođe, tema doktorske disertacije pripada oblasti iz koje je kandidat koautor 3 naučna rada štampana u međunarodnim časopisima i 4 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima, što ukazuje na to da je kandidat vrlo kompetentan za rad na predloženoj temi doktorske disertacije. Pored toga, kandidat poseduje odlično znanje engleskog jezika i ima iskustva u korišćenju različitih softverskih paketa za statističku obradu rezultata, koja će biti neophodna za obradu eksperimentalnih rezultata.

2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

Predmet i cilj istraživanja ove doktorske disertacije je optimizacija postupka dobijanja askorbil-estara masnih kiselina u reakciji esterifikacije katalizovanoj lipazama. Eksperimentalni rad u okviru doktorske disertacije biće podeljen u nekoliko celina:

optimizacija eksperimentalnih faktora sinteze estara vitamina C pomoću komercijalnih imobilisanih lipaza, izbor najefikasnijeg acil-donora, izbor nosača za imobilizaciju enzima i imobilizacione tehnike i izbor reaktorske konfiguracije.

L-askorbinska kiselina (vitamin C), kao jedan od najefikasnijih prirodnih antioksidanata, u širokoj je upotrebi u kozmetičkim i prehrambenim proizvodima u kojima ima ulogu u vitaminiziranju i produžavanju roka upotrebe proizvoda. Iako je njena efikasnost dokazana, u proizvodima sa većim sadržajem masti i ulja nije je moguće koristiti, pošto je ovaj hidrosolubilni vitamin slabo rastvoran u lipidima. U isto vreme, u pojedinim istraživanjima ustanovljeno je da jedinjenja koja se u ovom trenutku koriste kao aditivi u lipofilnoj kozmetici i hrani (butil-hidroksi-toluen (BHT), butil-hidroksi-anizol (BHA), propil-galat (PG) i *tert*-butil-hidrohinon (TBHQ)) daju toksične proizvode razgradnje, pa je rad na pronalaženju adekvatne zamene neophodan. Pored osnovnog zahteva o netoksičnosti i liposolubilnosti, antioksidanti namenjeni upotrebi u lipofilnim proizvodima moraju biti efikasni pri niskim koncentracijama, stabilni u toku dužeg vremenskog perioda i na povišenim temperaturama i ne smeju proizvoditi u koji se dodaju davati dodatni miris, ukus i boju. Estri vitamina C i masnih kiselina predstavljaju efikasnu zamenu pošto se formiranjem estarske veze između karboksilne grupe masne kiseline i primarne hidroksilne grupe vitamina dobija molekul koji poseduje drastično veću rastvorljivost u lipofilnim medijumima od vitamina C i podjednaku antioksidativnu aktivnost. Poslednjih deceniju i po objavljeni su rezultati brojnih istraživanja posvećenih dobijanju estara vitamina C sa masnim kiselinama, koji zadovoljavaju sve navedene uslove neophodne za ovu vrstu primene. Ova jedinjenja, pored osnovne funkcije koju imaju kao antioksidanti, spadaju u amfifilne molekule, pa se mogu upotrebljavati i kao obnovljivi nejonski biosurfaktanti.

Estri vitamina C i masnih kiselina su derivati prirodnih jedinjenja koji mogu biti dobijeni u hemijski katalizovanim postupcima ili enzimskim sintezama. U ovom trenutku, pojedini askorбил-estri masnih kiselina (askorбил-palmitat, askorбил-laurat) se dobijaju na industrijskom nivou, ali isključivo hemijskim postupcima. Ovakav način proizvodnje ima više nedostataka, a najvažniji su mala selektivnost neorganskih katalizatora i štetan uticaj na životnu sredinu. U ovakvim postupcima, utrošci energije i cena opreme su veliki, s obzirom na to da se koriste agresivne hemikalije i visoke temperature (često i visoki pritisci), a stvaraju se i nusprodukti, pa je postupak separacije finalnog proizvoda otežan. Nasuprot tome, enzimsku sintezu moguće je izvoditi pod znatno blažim reakcionim uslovima, pri čemu se dobijaju više koncentracije proizvoda boljeg kvaliteta koji, zbog činjenice da su enzimi katalizatori biološkog porekla, može da dobije etiketu prirodnog proizvoda što značajno proširuje oblast primene finalnog proizvoda i povećava cenu. Stoga je fokus velikog broja aktuelnih istraživanja usmeren upravo na razvijanje efikasnih i ekonomičnih postupaka biosinteze askorбил-estara masnih kiselina. Međutim, iako je veliki potencijal enzimске tehnologije evidentan, postoji više faktora koji je čine nekonkurentnom u industrijskim razmerama. Osnovni problem je visoka cena lipaza, ali se taj problem može prevladati korišćenjem imobilisanih lipaza čime je omogućena ponovljena upotreba enzima u konsektivnim reakcionim ciklusima što proizvodnju čini ekonomičnijom, a postupak prečišćavanja jednostavnijim. Temeljna optimizacija svih značajnih reakcionih parametara sa aspekta konverzije supstrata, prinosa proizvoda, ali i produktivnosti procesa predstavlja još jedan neophodan preduslov za prelazak sa laboratorijskog nivoa u reaktore većih dimenzija, kao i za praćenje i automatizaciju procesa. U te svrhe, potrebno je odrediti i kinetički model koji adekvatno opisuje reakcioni tok. U do sada opisanim postupcima sinteze, uglavnom su veliku katalitičku efikasnost i operacionu stabilnost pokazali komercijalni imobilisani enzimski preparati, čija je cena visoka, pa je rad na pronalaženju efikasnih, stabilnih i jeftinijih imobilisanih lipaza neophodan.

U ovoj disertaciji biće sintetisani askorbil-estri širokog opsega polarnosti, upotrebom sirćetne, kapronske, kaprinske, miristinske, stearinske, oleinske i linolne kiseline kao donora acil ostatka. Za sve dobijene estre, biće određena antioksidativna aktivnost primenom difenilpikrilhidrazil (DPPH) metode, a za pojedine i dodatna fiziološka dejstva (antimikrobno, antiinflamatorno). U cilju izbora najpogodnijeg reakcionog medijuma, biće ispitano više rastvarača, širokog opsega log P vrednosti (logaritam raspodele nejonizovanog jedinjenja između oktanola i vode). Kao model reakcija za optimizaciju i ispitivanje kinetike, biće korišćena sinteza askorbil-oleata katalizovana komercijalnim enzimskim preparatom *Candida antarctica* tipa B (Novozym[®] 435) u šaržnom sistemu. Biće optimizovano pet reakcionih faktora (temperatura, sadržaj vode, koncentracija limitirajućeg supstrata, molski odnos supstrata i koncentracija enzima) i to primenom statističkih metoda planiranja eksperimenta (centralni kompozitni rotabilni dizajn - CCRD) i analize dobijenih rezultata metodom odzivnih površina (RSM). Kao odzivi čija vrednost treba biti maksimalno povećana, biće ispitane sledeće veličine: molarna konverzija, prinos proizvoda i specifični prinos po masi enzima. Biće analizirana sva tri dobijena modela, kako sa aspekta pojedinačnih uticaja ispitivanih faktora, tako i njihovih interakcija. Takođe će biti ispitana efekat dodavanja molekulskih sita u cilju odvođenja vode iz mikrookoline enzima i pomeranja položaja ravnoteže ka reakciji esterifikaciji. Za komercijalni enzimski preparat Novozym[®] 435, koji će u ovoj fazi eksperimentalnog rada biti korišćen, biće utvrđena operativna stabilnost i ispitana mogućnost reaktivacije. Za reakciju esterifikacije vitamina C oleinskom kiselinom, biće ispitivane i početne brzine pri različitim koncentracijama oba supstrata, i to u cilju utvrđivanja najpogodnijeg kinetičkog modela sa svim karakterističnim konstantama.

U narednoj fazi istraživanja, biće ispitana mogućnost imobilizacije lipaze tipa B iz *C. antarctica* na nekoliko nosača različitim tehnikama. Biće primenjene metode kovalentnog vezivanja na nosače sa epoksidnim grupama (komercijalni i nosači dobijeni uvođenjem funkcionalnih grupa modifikacijom sa epihlorhidrinom ili glutaraldehidom), adsorpcija na hidrofobne nosače (Purolite[®] MN102), imobilizacija na nanočestice silike modifikovane uvođenjem različitih funkcionalnih grupa, a aktivnost dobijenih imobilizata biće ispitana u reakciji sinteze askorbil-oleata, pod prethodno optimizovanim uslovima. S obzirom na to da je u protočnim reaktorskim sistemima moguće postići veću produktivnost po masi upotrebljenog enzima, u poslednjem delu istraživanja biće optimizovan reaktorski sistem (reakcija će biti izvođena u protočnim reaktorima sa pakovanim i fluidizovanim slojem) i operativni uslovi za izvođenje reakcije esterifikacije. Kao biokatalizator, biće korišćen dobijen imobilisani enzimski preparat koji pokaže najveću aktivnost u šaržnom reaktoru. Produktivnost imobilisanog sistema biće ispitana pri različitim režimima rada bioreaktora i upoređena sa performansama šaržnog postupka.

Poslednjih petnaestak godina objavljeni su rezultati brojnih istraživanja koja se sa različitih aspekata bave problematikom enzimске sinteze askorbil-estara masnih kiselina. U daljem tekstu navedeni su samo neki od njih, koji su predstavljali osnovu za istraživanja i eksperimente izvedene u okviru izrade ove doktorske disertacije:

1. S.K. Karmee „Biocatalytic synthesis of ascorbyl esters and their biotechnological applications“, Applied Microbiology and Biotechnology, 81 (2009) 1013-1022.
2. C. Humeau, M. Girardin, B. Rovel, A. Miclo „Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters“, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 5 (1998) 19-23.
3. Y. Yan, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmid „Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters“, Biotechnology Letters, 21 (1999) 1051-1054.
4. F. Viklund, J. Alander, K. Hult „Antioxidative properties and enzymatic synthesis of ascorbyl FA esters“, Journal of the American Oil Chemists' Society, 80 (2003) 795-799.

5. Q.X. Song, D.Z. Wei „Study of vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp.“ *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18 (2002) 261-266.
6. M. Adamczak, U.T. Bornscheuer, W. Bednarski „Synthesis of ascorbyl oleate by immobilized *Candida antarctica* lipases“, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 3177-3180.
7. Q.X. Song, Y. Zhao, W.Q. Xu, W.Y. Zhou, D.Z. Wei „Enzymatic synthesis of L-ascorbyl linoleate in organic media“, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28 (2006) 211–215.
8. S.W. Chang, C.J. Yang, F.Y. Chen, C.C. Akoh, C.J. Shief „Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-ascorbyl laurate by Novozym[®] 435“, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56 (2009) 7-12.
9. D. Reyes-Duarte, N. Lopez-Cortes, P. Torres, F. Comelles, J.L. Parra, S. Peña, A. Ugidos, A. Ballesteros, F.J. Plou „Synthesis and properties of ascorbyl esters catalyzed by lipozyme TL IM using triglycerides as acyl donors“, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (2011) 57-64.
10. H. Burham, R.A.G.A. Rasheed, N.M. Noor, S. Badruddin, H. Sidek „Enzymatic synthesis of palm-based ascorbyl esters“, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58 (2009) 153-157.
11. H. Zhao, Y. Zhang, F. Lu, X. Bie, Z. Lu, H. Ning „Optimized enzymatic synthesis of ascorbyl esters from lard using Novozym 435 in co-solvent mixtures“ *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69 (2011) 107–111.
12. K. Kuwabara, Y. Watanabe, S. Adachi, K. Nakanishi, R. Matsuno „Synthesis of 6-*O*-unsaturated acyl l-ascorbates by immobilized lipase in acetone in the presence of molecular sieve“, *Biochemical Engineering Journal*, 16 (2003) 17–22.
13. Z. Yang, L. Schultz, Z. Guo, C. Jacobsen, X. Xu „System development from organic solvents to ionic liquids for synthesizing ascorbyl esters with conjugated linoleic acids“, *The Open Biotechnology Journal*, 6 (2012) 5-12.
14. S. Park, F. Viklund, K.M. Hult, R.J. Kazlauskas „Vacuum-driven lipase-catalyzed direct condensation of L-ascorbic acid and fatty acids in ionic liquids: synthesis of a natural surface active antioxidant“, *Green Chemistry*, 5 (2003) 715-719.
15. S. Bradoo, R.K. Saxena, R. Gupta „High yields of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification“, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (1999) 1291-1295.
16. H.J. Hsieh, J.W. Chen, R. Giridhar, W.T. Wu „Synthesis of mixed esters of ascorbic acid using methyl esters of palm and soybean oils“, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35 (2005) 113–118.

3. POLAZNE HIPOTEZE

Pregledom aktuelne naučne periodike ustanovljeno je da se enzimskim postupcima katalizovanim lipazama mogu pod blagim reakcionim uslovima i u visokom prinosu dobiti askorbil-estri masnih kiselina koji poseduju antioksidativnu aktivnost. Većina dosadašnjih istraživanja bila je fokusirana na sintezu askorbil-palmitata, dok je svega nekoliko istraživanja posvećeno sintezi askorbil-oleata ili sintezi estara vitamina C i masnih kiselina kraćeg lanca, iako ovi estri mogu, zbog bolje rastvorljivosti u uljima i emulzijama, da se primene i u proizvodima u kojima askorbil-palmitat nije rastvorljiv. Uticaj ključnih eksperimentalnih faktora (koncentracije enzima, koncentracije vode, temperature, molarnog odnosa supstrata i

koncentracije vitamina C) na prinos proizvoda i međusobna interakcija ovih faktora nisu detaljno ispitani. Kinetika enzimske sinteze estara vitamina C i inhibitorno dejstvo supstrata su u prethodnim istraživanjima nedovoljno ispitani, pri čemu nije predložen adekvatan integralni kinetički model koji bi opisao ceo tok reakcije i olakšao projektovanje bioreaktora. U enzimskoj sintezi estara vitamina C korišćeni su uglavnom šaržni bioreaktori i primenjivani su isključivo komercijalni preparati imobilisanih lipaza Novozyme[®] 435, Lipozyme[®] TL IM i Lipozyme[®] TL IM, koji sadrže lipaze iz mikroorganizama *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* i *Rhizomucor miehei*, redom.

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

- Askorbil-estri masnih kiselina su vredni derivati prirodnih jedinjenja koji se uspešno mogu primenjivati kao antioksidanti i biosurfaktanti u lipofilnim farmaceutskim, kozmetičkim i prehrambenim proizvodima. U ovom trenutku, na industrijskom nivou zastupljena je isključivo proizvodnja askorbil-estara zasićenih masnih kiselina (palmitinske i laurinske) i to u procesima katalizovanim hemijskim sredstvima. Ukoliko su dobro optimizovani, biokatalizovani postupci mogu biti konkurentni klasičnim hemijskim metodama, s obzirom na to da spadaju u zelene tehnologije koje poseduju i veliki ekonomski potencijal. U cilju optimizacije najznačajnijih reakcionih parametara u okviru ove disertacije biće primenjeni CCRD i RSM, s obzirom na to da rezultati dobijeni na ovaj način pružaju uvid ne samo u uticaj pojedinačnih faktora na odabrni odziv, već ukazuju i na interakcije među njima (njihovu prirodu i intenzitet). Posebna pažnja biće posvećena analizi optimalnih vrednosti ispitivanih faktora sa aspekta tri odabrana odziva (molarne konverzije limitirajućeg supstrata, prinosa proizvoda i koncentracije estera po masi enzima) da bi se odredili eksperimentalni uslovi koji pogoduju najvećoj produktivnosti i ekonomičnosti enzimskog procesa.
- Askorbil-estri masnih kiselina, u zavisnosti od prirode acil-ostatka, poseduju različite karakteristike kao antioksidanti i surfaktanti, te ih je moguće upotrebljavati u veoma raznovrsnim sistemima. Zbog toga će specifičnost primenjene lipaze tipa B iz *C. antarctica* prema acil donorima različite dužine lanca i stepena nezasićenosti, biti takode utvrđena. Kao donori acil ostatka biće korišćene sirćetna, kapronska, kaprinska, miristinska, stearinska, oleinska i linolna kiselina, čijom će esterifikacijom pomoću vitamina C biti dobijen veliki broj proizvoda koji, svaki u skladu sa svojom log P i HLB (eng. „hydrophilic-lipophilic balance“) vrednošću, mogu biti korišćeni kao antioksidanti i surfaktanti u različitim sistemima. Za svaki od sintetisanih proizvoda, biće određena antioksidativna svojstva, kroz kapacitet za vezivanje slobodnih radikala, a za pojedine i dodatna fiziološka dejstva. Ovaj deo istraživanja može dovesti do otvaranja novih oblasti primene estara vitamina C, kao i do sinteze novih liposolubilnih antioksidanata jer je u ovom trenutku svega nekoliko estara vitamina C dostupno na tržištu.
- Lipaze koje je moguće koristiti u reakcijama dobijanja askorbil-estara masnih kiselina su malobrojne, a samo je nekoliko skupih komercijalnih imobilisanih preparata pokazalo zadovoljavajuću aktivnost i stabilnost. Stoga je sledeći korak primena nekoliko različitih tehnika imobilizacije enzima na pogodne nosače u cilju dobijanja jeftinijih imobilizata koji katalizuju reakciju esterifikacije sa nesmanjenom efikasnošću. Mogućnost dodatnog povećanja produktivnosti procesa, biće istražena određivanjem operativne stabilnosti lipaze i mogućnosti njene delimične reaktivacije. Biće ispitano i uticaj količine i vremena dodavanja molekulskih sita u reakcioni sistem u cilju povećanja prinosa estera.
- Dosadašnja istraživanja u oblasti sinteze estara vitamina C bila su uglavnom ograničena na enzimске postupke u klasičnim šaržnim reaktorima. Primena drugačijih reaktorskih sistema (sa fluidizovanim ili pakovanim slojem) omogućiće razvoj kontinualnih

procesa u kojima je moguće postizanje veće produktivnosti procesa. Pored toga, u okviru ove disertacije biće postavljeni kinetički modeli, koji uključuju i efekte inhibicije supstratima, čime će biti dat značajan doprinos u projektovanju enzimskog procesa i uvećanju razmere procesa.

4. NAUČNE METODE ISTRAŽIVANJA

Praćenje toka reakcije sinteze različitih estara vitamina C, izolovanje proizvoda i karakterizacija proizvoda biće vršeno savremenim instrumentalnim metodama. Koncentracija proizvoda biće kvantifikovana primenom reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi (RP-HPLC) pomoću analitičke C₁₈ kolone, a kao mobilna faza biće korišćena smeša metanol/voda. Ista metoda biće upotrebljena i u cilju izolovanja i prečišćavanja proizvoda, i to primenom semi-preparativne RP-HPLC sa kolektorom. U oba slučaja proizvod će biti detektovan pomoću UV detektora. U cilju dokazivanja strukture prečišćenih proizvoda biće primenjena NMR spektroskopija. Za planiranje eksperimenta, statističku analizu i interpretaciju dobijenih rezultata će biti korišćen softverski paket Stat Ease Design Expert, dok će za određivanje integralnog kinetičkog modela biti primenjen MATLAB. U cilju određivanja antioksidativne aktivnosti proizvedenih estara, primenjivaće se DPPH metoda, dok će za utvrđivanje antimikrobnog dejstva biti korišćena metoda merenja zone inhibitornog dejstva. Prilikom dobijanja i karakterizacije imobilisanih enzimskih preparata, biće korišćena FTIR spektroskopska analiza i elektronska mikroskopija. Tok imobilizacije i hidrolitička aktivnost imobilizata biće određivane spektrofotometrijskim metodama određivanja koncentracije proteina i hidrolize *p*-nitrofenil-butarata, a nejefikasniji imobilizati biće testirani i u reakcijama esterifikacije u šaržnom i protočnom sistemu.

5. OČEKIVANI NAUČNI DOPRINOS

Očekuje se da će rezultati do kojih se dođe u okviru ove disertacije dati značajan naučni doprinos na polju primene lipaza kao biokatalizatora u reakcijama dobijanja netoksičnih i efikasnih liposolubilnih antioksidanata – askorbil-estara masnih kiselina. U okviru istraživanja može se očekivati nekoliko osnovnih doprinosa, i to:

Razvoj originalnog enzimskog postupka dobijanja askorbil-estara masnih kiselina, što podrazumeva nekoliko pojedinačnih doprinosa:

- Izbor pogodnog reakcionog medijuma,
- Izbor najpogodnijeg acil-donora,
- Optimizacija najbitnijih procesnih parametara i određivanje kinetičkog modela,
- Određivanje antioksidativnog i drugih fizioloških dejstava sintetisanih estara,
- Razvoj nekoliko imobilisanih sistema koji se mogu primeniti u sintezi estara vitamina C.

Pored nabrojanog, rezultati ove disertacije će dati značajan naučni doprinos u rasvetljavanju mehanizma enzimske sinteze estara vitamina C, uticaja polarnosti medijuma na ovu reakciju i međusobne interakcije polarnosti medijuma i vrste acil-donora na efikasnost ove reakcije i fiziološku aktivnost proizvoda.

6. PLAN ISTRAŽIVANJA I STRUKTURA RADA

Predmet istraživanja ove disertacije je razvoj enzimskog postupka dobijanja askorбил-estara karboksilnih kiselina različite dužine ugljovodoničnog lanca i stepena nezasićenosti pomoću imobilisanih lipaza mikrobnog porekla. Tokom izrade disertacije biće ispitan uticaj vrste primenjene karboksilne kiseline na fiziološku aktivnost dobijenog proizvoda, postavljeni kinetički modeli reakcije, ispitane različite tehnike imobilizacije enzima i nosači za imobilizaciju, kao i reaktorski sistemi za enzimsku esterifikaciju.

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 definisani osnovni ciljevi i predmet istraživanja, kao i doprinos disertacije.

Teorijski deo doktorske disertacije obuhvatiće pregled i analizu dostupne literature koja se odnosi na:

- Enzimске postupke sinteze estara
- Svojstva lipaza od značaja za proizvodnju askorбил-estara masnih kiselina i metode njihove imobilizacije
- Enzimsko dobijanje askorбил-estara masnih kiselina (uticaj reakcionih faktora)
- Enzimsku kinetiku bisupstratnih enzimskih reakcija
- Primenu askorбил-estara masnih kiselina

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

- Hemikalije i materijali upotrebljeni u radu
- Opis eksperimentalnih tehnika
- Uslovi biosinteze
- Postupci imobilizacije lipaze

U poglavlju *Rezultati i diskusija* biće predstavljeni i diskutovani rezultati eksperimenata:

- Selekcija reakcionog medijuma
- Izbor najpogodnijeg acil donora
- Optimizacija procesnih parametara i statistička obrada podataka
- Operaciona stabilnost i reaktivacija biokatalizatora
- Kinetička studija
- Imobilizacija lipaze na modifikovane i nemodifikovane nosače
- Optimizacija režima rada i konfiguracije reaktorskog sistema

U *Zaključku* će rezultati dobijeni u toku istraživanja biti sumirani uz stavljanje akcenta na njihove osnovne doprinose.

Literatura će sadržati navode citirane u disertaciji i publikacije proistekle iz istraživačkog rada u okviru ove disertacije.

7. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu izloženog Komisija smatra da je tema predložene doktorske disertacije pod naslovom „Razvoj enzimskog postupka za sintezu askorbil-estara masnih kiselina” koju je predložila Marija Stojanović, dipl. inž., naučno zasnovana i da predstavlja značajan doprinos naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, za koju je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova.

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da kandidatu Mariji Stojanović odobri izradu doktorske disertacije pod navedenim naslovom. Za mentora doktorske disertacije Komisija predlaže dr Dejana Bezbradicu, docenta Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 12.11. 2013.

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Dr Dejan Bezbradica, docent
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd
2. Dr Zorica Knežević-Jugović, van. prof.
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd
3. Dr Dušan Mijin, red. prof.
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd
4. Dr Nenad Milosavić, naučni saradnik
Hemijski fakultet, Beograd