

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ
35/305
(Број захтева)

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ НАУКА
(Назив већа научне области и коме се захтев упућује)

12.10.2017.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“, број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

АНА (Драгослав) МИЛИВОЈЕВИЋ (рођена Милисављевић), мастер инжењер технологије

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање: Универзитет у Београду, технолошко-металуршки факултет.

3. Година дипломирања: 2012.

4. Назив и седиште факултета на коме је стекао мастер образовање: Универзитет у Београду, технолошко-металуршки факултет.

5. Година одбране мастер рада: 2013.

Обавештавамо Вас да је Наставно-научно веће, на седници одржаној 21.09.2017. године размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем
2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације
3. Подаци о ментору.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата Ана Миливојевић

Име и презиме ментора: Дејан Безбрадица

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Bezbradica D.**, Stojanović M., Veličković D., Dimitrijević A., Carević M., Mihailović M., Milosavić N. (2013) Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester. *Biochemical Engineering Journal* 71: 89-96. (ISSN: 1369-703X; IF=2,645)
2. **Bezbradica D.**, Mateo C., Guisan J.M. (2014) Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 102: 218-224. (ISSN: 1381-1177; IF=2,745)
3. **Bezbradica D.**, Mijin D., Šiler-Marinković S., Knežević Z. (2007) The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45: 97–101. (ISSN: 1381-1177; IF=2,149)
4. Ćorović M., Mihailović M., Banjanac K., Carević M., Milivojević A., Milosavić N., **Bezbradica D.** (2017) Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto Purolite® MN102 and its application in solvent-free and organic media esterification. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40: 23-34. (ISSN 1615-7591; IF=1,997).
5. **Bezbradica D.**, Ćorović M., Jakovetić Tanasković S., Luković N., Carević M., Milivojević A., Knezević-Jugović Z. (2017) Enzymatic Syntheses of Esters-Green Chemistry for Valuable Food, Fuel and Fine Chemicals. *Current Organic Chemistry* 21: 104-138. (ISSN 1385-2728; IF=1,949).

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је

Министарство за науку класификовало као М24 и додатну листу часописа коју ће, на предлог универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као М11, М12, М13, М14, М41 и М51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски назив магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односне дисертације.

Г) У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Датум: 11.09.2017.

М.П.

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

За кандидата Ана Миливојевић

Име и презиме ментора: Др Рада Пјановић

Звање: Ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Rada Pjanović, Nevenka Bošković-Vragolović, Jelena Veljković-Giga, Radmila Garić-Grulović, Srđan Pejanović and Branko Bugarski, Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers, J.Chem.Technol.Biotechnol, 85 (5), 2010, pp. 693–698, ISSN: 0268-2575, IF 2010=1.818.
2. Bojana Balanč, Kata Trifković, Verica Đorđević, Smilja Marković, Rada Pjanović, Viktor Nedović, Branko Bugarski, Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes, Food Hydrocolloids, Volume 61, December 2016, pp. 832-842, ISSN:0268-005X, IF 2016=4.747.
3. Bošković-Vragolović N, Garić-Grulović R, Pjanović R, Grbavčić Ž, Mass transfer and fluid flow visualization for single cylinder by the adsorption method, International Journal of Heat and Mass Transfer, 59, 2013, pp. 155–160, ISSN: 0017-9310, IF 2013=2.522R.
4. S. J. Veličković, M. T. Kalagasidis – Krušić, R.V. Pjanović, N. M. Bošković – Vragolović, P.C. Griffiths, I.G. Popović, The Diffusion of Water in Poly (Ditetrahydrofurfurylitaconate), Polymer, 46 (19), 2005, pp. 7982–7988, ISSN: 0032-3861, IF 2005=2.849.
5. Spasojević, P., Stamenković, D., Pjanović, R., Bošković-Vragolović, N., Dolić, J., Grujić, S., Veličković, S., Diffusion and solubility of commercial poly(methyl methacrylate) denture base material modified with dimethyl itaconate and di-n-butyl itaconate during water absorption/desorption cycles, Polymer International, 61 (8), 2012, pp. 1272–1278, ISSN: 0959-8103, IF 2012=2.125.

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа коју ће, на предлог универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41 и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски назив магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односне дисертације.

Г) У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Датум: 14.09.2017.

М.П.

Проф. др Ђорђе Јанаковић

ДП

На основу чл. 30. став 3. Закона о високом образовању, чл. 40. Статута ТМФ-а и чл. 32. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 21.09.2017. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата
за израду докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације **Ани Миливојевић**, мастер инжењеру технологије, под називом: „**Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација**“.

Одлуку о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације доноси Универзитет у Београду.

За менторе се одређују: др Дејан Безбрадица, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Рада Пјановић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Одлуку доставити: Универзитету у Београду на сагласност, кандидату, менторима, Служби за наставно студентске послове и архиви Факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Ане Миливојевић, мастер инж. технологије за израду докторске дисертације

Одлуком Технолошко-металуршког факултета бр. 35/178 од 1.06.2017. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Ане Миливојевић, мастер инж. технологије, за израду докторске дисертације и научне заснованости теме „Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Ана Миливојевић, рођ. Милисављевић, рођена је 16. априла 1989. године у Краљеву где је завршила основну школу „Браћа Вилотијевић“ и Гимназију. За успехе током школовања награђена је Вуковом дипломом. Основне академске студије уписала је 2008. године на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду. За постигнут изузетан успех током студирања четири пута је награђена признањем „Панта С. Тутунџић“. Дипломирала је на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду 4. јула 2012. године са оценом 10 (десет) на завршном раду и просечном оценом током студирања 9,86. У периоду од августа до октобра 2012. године, похађала је IAESTE праксу на Данском техничком универзитету, Национални институт хране, Лингби, Копенхаген. По завршетку основних студија, уписала је мастер академске студије на Технолошко-металуршком факултету на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију. Завршила је мастер студије у јулу 2013. године са просечном оценом 10,00 и одбрала мастер рад са оценом 10 (десет). Докторске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију под менторством др Дејана Безбрадице, ванредног професора, уписала је 2013. године.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Ана Миливојевић уписала је 2013. године докторске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуршког факултета, под менторством др Дејана Безбрадице, ванредног професора. Положила је све испите предвиђене

планом и програмом последипломских студија Технолошко-металуршког факултета у Београду са просечном оценом 10,00 укључујући и завршни испит. Следи списак положених испита са бројем остварених ЕСПБ бодова:

Предмет	ЕСПБ	Оцена
1. Одабрана поглавља нумеричке анализе	5	10
2. Хемијска кинетика	5	10
3. Одабрана поглавља биохемије - витамини	5	10
4. Биохемијска кинетика	5	10
5. Индустриска микробиологија	5	10
6. Биомаса као извор енергије	4	10
7. Хемија физиолошки активних једињења	5	10
8. Имобилизани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена	6	10
9. Нискотемпературни керамички процеси	5	10
10. Биоактивне материје у козметичким производима	4	10
11. Одабрана поглавља пројектовања процеса у биохемијском инжењерству	5	10
12. Енглески језик	0	10
13. Завршни испит	30	10

На седници Наставно-научног већа Технолошко металуршког факултета од 1.6.2017. године именована је Комисија за оцену подобности теме и кандидата Ане Миливојевић за израду докторске дисертације и научне заснованости теме „Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација“.

Ана Миливојевић изабрана је у звање истраживач сарадник у јулу 2015. године на Технолошко-металуршком факултету. Коаутор је осам радова у часописима међународног значаја (један М21а, четири М21, два М22, један М24) и четири саопштења на међународним скуповима (два М33 и два М34).

Објављени научни радови и саопштења

Категорија М21а (Рад у међународном часопису изузетних вредности):

1. Carević M., Bezbradica D., Banjanac K., **Milivojević A.**, Fanuel M., Rogniaux H., Ropartz D., Veličković D.: *Structural Elucidation of Enzymatically Synthesized*

Galacto-oligosaccharides Using Ion-Mobility Spectrometry-Tandem Mass Spectrometry, - Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol 64, No 18, 2016, pp. 3609-3615, (IF(2014)=2,912) (ISSN 0021-8561).

Категорија M21 (Рад у врхунском међународном часопису):

2. **Milisavljević A.**, Stojanović M., Carević M., Mihailović M., Veličković D., Milosavić N., Bezbradica D.: *Lipase-Catalyzed esterification of phloridzin: Acyl donor effect on enzymatic affinity and antioxidant properties of esters*, - Industrial and Engineering Chemistry Research, Vol 53, No 43, 2014, pp. 16644–16651, (IF(2014)=2,857) (ISSN 0888-5885).
3. Stephansen K., Matthebjerg M., Wattjes J., **Milisavljević A.**, Jessen F., Qvortrup K., Goycoolea F. M., Chronakis I.S.: *Design and characterization of self-assembled fish sarcoplasmic protein–alginate nanocomplexes*, - International Journal of Biological Macromolecules, Vol 76, No 1, 2015, pp. 146–152 (IF(2016)=3,671) (ISSN 0141-8130).
4. Carević M., Ćorović M., Mihailović M., Banjanac K., **Milisavljević A.**, Veličković D., Bezbradica D.: *Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin*, - International Dairy Journal, Vol 54, No 1, 2016, pp. 50-57 (IF(2014)=2,008) (ISSN 0958-6946).
5. Banjanac K., Carević M., Ćorović M., **Milivojević A.**, Prlainović N., Marinković A., Bezbradica D.: *Novel β -galactosidase nanobiocatalyst systems for application in the synthesis of bioactive galactosides*, - RSC Advances, Vol 6, No 99, 2016, pp. 97216–97225 (IF(2014)=3,840) (ISSN 2046-2069).

Категорија M22 (Рад у истакнутом међународном часопису):

6. Ćorović M., Mihailović M., Banjanac K., Carević M., **Milivojević A.**, Milosavić N., Bezbradica D.: *Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto Purolite[®] MN102 and its application in solvent-free and organic media esterification*, - Bioprocess and Biosystems Engineering, Vol 40, No 1, 2017, pp. 23-34 (IF(2014)=1,997) (ISSN 1615-7591).
7. Bezbradica D., Ćorović M., Jakovetić Tanasković S., Luković N., Carević M., **Milivojević A.**, Knezević-Jugović Z.: *Enzymatic Syntheses of Esters-Green Chemistry for Valuable Food, Fuel and Fine Chemicals*, - Current Organic Chemistry, Vol 21, No 2, 2017, pp. 104-138 (IF(2015)=2,157) (ISSN 1385-2728).

Категорија M24 (Рад у националном часопису међународног значаја):

8. Carević M., Banjanac K., Ćorović M., Jakovetić S., **Milivojević A.**, Vukašinović-Sekulić M., Bezbradica D.: *Selection of lactic acid bacteria strain for simultaneous production of α - and β -galactosidases*, - Zaštita materijala, Vol 57, No 2, 2016, pp. 265-273 (IF(2014)= 0,688) (ISSN 0351-9465).

Категорија M33 (Саопштење са међународног скупа штампано у целини):

9. Carević M., Banjanac K., Lukić N., Jakovljević A., Ćorović M., **Milisavljević A.**, Bezbradica D.: *Synthesis of galactitol galactoside using transgalactosylation activity*

of β -galactosidase from Aspergillus oryzae, - Proceedings of the 3rd International congress "Food technology, quality and safety", Novi Sad 2016., pp. 100 (ISBN 978-86-7994-049-0).

10. Ćorović M., Banjanac K., Prlainović N., **Milisavljević A.**, Carević M., Marinković A., Bezbradica D.: *Immobilization of Candida antarctica lipase B onto modified silica nanoparticles and its application for the synthesis of l-ascorbyl oleate*, - Proceedings of the 3rd International congress "Food technology, quality and safety", Novi Sad 2016., pp. 101 (ISBN 978-86-7994-049-0).

Категорија М34 (Саопштење са међународног скупа штампано у изводу):

11. **Milisavljević A.**, Stojanović M., Dinić I., Carević M., Mihailović M., Milosavić N., Bezbradica D.: *Lipase-catalyzed synthesis of phloridzin esters*, Proceedings of the 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd 2013, F P21.
12. Carević M., Banjanac K., Ćorović M., **Milivojević A.**, Prlainović N., Marinković A., Bezbradica D.: *Sorbitol Galactoside Synthesis Using β -Galactosidase Immobilized on Functionalized Silica Nanoparticles*, - Proceedings of the 19th International Conference on Biotechnology, Bioengineering and Nanoengineering, Lisbon 2017, pp. 774 (ISSN 2010-3778).

Категорија М51 (Рад у водећем часопису националног значаја):

13. Carević M., Vukašinović-Sekulić M., Banjanac K., **Milivojević A.**, Ćorović M., Bezbradica D.: *Characterization of β -galactosidase from Lactobacillus acidophilus: stability and kinetic study*, - Advanced Technologies, Vol 6, No 1, 2017, pp. 5-13 (ISSN 2406-2979).

Категорија М52 (Рад у часопису националног значаја):

14. Carević M., Ćorović M., Banjanac K., **Milivojević A.**, Bezbradica D.: *Optimization of galacto-oligosaccharides synthesis using response surface methodology*, - Food and Feed research, Vol 44, No 1, 2017, pp. 1-10 (ISSN 2217-5369).

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током последипломских студија, Ана Миливојевић, мастер инжењер технологије, показала је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Такође, тема докторске дисертације је везана за ензимску синтезу естара флавоноида којом се кандидаткиња бавила и током израде дипломског и мастер рада. Током израде дисертације објавила је као први аутор један рад у врхунском међународном часопису (М21), а као коаутор објавила је један рад у међународном часопису изузетне вредности (М21а), три рада у врхунском међународном часопису (М21) и два рада у истакнутом међународном часопису (М22), што упућује на закључак да је кандидат врло компетентан за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је ензимска синтеза естара флавоноида коришћењем комерцијалних ензимских препарата и нових имобилисаних ензима, као и испитивање примене синтетисаних естара у различитим козметичким формулацијама и одређивање профила отпуштања и брзине дифузије кроз мембрану која симулира трансдермални пренос активне компоненте. Основни циљ је структурна модификација молекула флавоноида у циљу повећања њихове стабилности и растворљивости у козметичким препаратима и храни, уз очување и/или побољшање физиолошке активности самог једињења.

Флавоноиди, секундарни метаболити виших биљака, су велика група полифенолних једињења који се међусобно разликују у хемијској структури и карактеристикама. Поседују неколико значајних физиолошких ефеката, као што су антибактеријско, антивирусно, антиинфламаторно, антиалергијско дејство, затим инхибирају пероксидацију липида, агрегацију тромбоцита, као и активност неких ензимских система. Флавоноиди испољавају ове особине јер уклањају слободне радикале и хелатори су двовалентних катјона.

Иако поседују низ значајних биолошких својстава, ширу комерцијалну примену ових једињења ограничава њихова слаба растворљивост, како у хидрофилној, тако и у липофилној средини, као и недовољна стабилност. Имајући ово у виду, у новије време све се више примењују дериватизације ових једињења (гликозиловање и ациловање) јер је примећено да деривати могу имати већу стабилност од полазног флавоноида, а врло често долази и до побољшања биолошке активности у односу на полазни молекул. Ради побољшања растворљивости ових једињења у липофилној средини изводи се реакција ациловања, веома значајан поступак за структурну и функционалну модификацију флавоноида. Естерификацију флавоноида је могуће извести на два начина: хемијским и ензимским поступком. Хемијски поступак ациловања флавоноида је патентиран, али је показано да овај метод није довољно ефикасан, с обзиром да ова реакција није региоселективна, те долази до нежељене функционализације фенолних хидроксилних група које су одговорне за антиоксидативну активност ових једињења. Поред тога, да би се обезбедила селективна функционализација, употреба хемијског поступка захтева извођење реакције под драстичним оперативним условима и много корака јер је пре саме реакције неопходна и заштита одређених група, а после уклањање заштитних група, што додатно компликује овај поступак. Због свега наведеног, ензимски поступак, који укључује употребу хидролитичких ензима (липаза и естераза) као биокатализатора реакције ациловања флавоноида је несумњиво повољнији метод, имајући у виду доступност, ниску цену, хемо-, регио- и енантиселективност ових ензима, као и благе услове извођења реакције. Употреба ензима као катализатора доводи до већих приноса, бољег квалитета производа, а само извођење реакције под благим условима температуре и притиска, доводи до нижих трошкова целокупног поступка.

У оквиру ове докторске дисертације биће испитана синтеза естара флавоноида катализована имобилисаним липазама, како комерцијалним препаратима, тако и новим имобилисаним ензимима који ће у току истраживања бити добијени ковалентном имобилизацијом или адсорпцијом на различитим носачима. У почетној фази истраживања утицај кључних експерименталних фактора (температура, концентрација ензима, врста органског растварача, концентрација супстрата) на реакцију естерификације флоридзина, као модел флавоноида, са олеинском киселином катализовану комерцијалним ензимским препаратом Novozym® 435 (липазом типа Б из квасца *Candida antarctica*) у шаржном систему ће бити испитан и реакција ће бити

оптимизована методом одзивних површина (RSM). Принос производа реакције (флоридзин-олеата) биће одређен реверзно-фазном хроматографијом високих перформанси (RP-HPLC), а производ ће бити окарактерисан применом NMR спектроскопије и MS/MS спектометрије. Након тога, биће изведена ензимска естерификација флоридзина са великим бројем засићених масних киселина врло широког опсега дужине ланца (од 2 до 18 угљеникових атома). Након утврђивања утицаја дужине ланца биће испитано и неколико незасићених масних киселина ради испитивања утицаја присуства двоструке везе у молекулу на ефикасност естерификације. Физиолошка активност синтетисаних естара ће такође бити испитана, пре свега антиоксидативна активност, и упоређена са активношћу полазног флавоноида. На овај начин биће одређене најпогодније масне киселине из аспекта ефикасности ензимске естерификације, али и физиолошког дејства добијених естара. У оптималним условима. Поред флоридзина у реакцијама естерификације биће испитани и други флавоноиди; ескулин и нарингин због признатог физиолошког дејства и чињенице да поседују угљенохидратну фракцију преко чијих се примарних хидроксилних група успоставља веза између киселине и флавоноида. Поређење резултата експеримената са ова три флавоноида као супстратима ће дати увид у утицај агликона на ефикасност ензимске естерификације.

У наредној фази истраживања фокус ће бити на примени алтернативних ацил-донора који обезбеђују већу економичност производног поступка и/или повећану ефикасност. Тако ће у реакцији синтезе флавоноид-ацетата бити испитани анхидрид сирћетне киселине и триацетин као алтернативни ацил-донори јер ове супстанце обезбеђују високу концентрацију ацетил-донора уз мању киселост у околини ензима него када се користи сирћетна киселина што би могло позитивно утицати на активност и стабилност ензима, уз могућност развоја поступка без органског растварача који је много прихватљивији из аспекта заштите животне средине. С друге стране, као супстрати за добијање естара виших масних киселина биће испитана различита биљна уља. Ова уља садрже смеше масних киселина па се као производ очекују смеше различитих естара флавоноида, али то не смањује квалитет потенцијалног производа јер је у претходним истраживањима установљено да естри ових киселина имају подједнаке физиолошке активности. Поред тога, коришћењем уља драстично се смањује цена производње јер су она много јефтинији супстрати од чистих масних киселина, а представљају богат извор, нарочито полинезасићених масних киселина. При избору уља ће се водити рачуна да, осим по маснокиселинском саставу, уље и по својим органолептичким карактеристикама буде погодно за употребу у козметичким препаратима.

У наредној фази ове докторске дисертације фокус истраживања биће на проналажењу ефикасног имобилисаног ензима чиме би се могло позитивно утицати на економичност ензимског процеса синтезе естара флавоноида, пошто висока цена комерцијалног имобилисаног ензима чини значајну ставку у укупним трошковима. Пошто се испитивани флавоноиди (флоридзин, ескулин и нарингин) значајно разликују по молекулским масама и хидрофилности, биће анализиран утицај врсте флавоноида на ефикасност синтезе помоћу различитих имобилисаних ензима и избор агенса и методе хемијске модификације носача за имобилизацију.

У завршној фази докторске дисертације биће оптимизована примена естара флавоноида у козметичким производима. Из тог разлога биће праћена брзина дифузије естара флавоноида у стандардној Францовој ћелији, како из смеше естара добијене упаравањем растварача, тако и дифузија естара из различитих козметичких формулација - стандардних емулзија, гел емулзија и гел емулзија са липозомима. Први део истраживања биће изведен са целулоза-ацетатном мембраном да би се идентификовале разлике у профилима отпуштања различитих естара флавоноида, као и

разлике у профилима естара из различитих формулација. Циљ је да се дефинише утицај врсте масне киселине, врсте флавоноида и коришћене формулације на дифузионе карактеристике ензимски синтетисаног естра. Касније ће дифузија одабраних естара у најпогоднијим козметичким препаратима бити испитана у систему са синтетском мембраном која представља модел систем за трансдермални пренос масе. Резултати дифузионих експеримента ће, поред претходно добијених резултата о утицају кључних фактора на принос ензимске реакције, пресудно утицати на финални избор најпогоднијих естара за ензимску синтезу и примену у козметичким формулацијама јер ће омогућити да се процени ефикасност примене естара флавоноида као активних супстанци у козметичким производима.

Последњих година објављени су резултати бројних истраживања која се, са различитих аспеката, баве проблематиком ациловања флавоноида, њиховом применом у козметичким формулацијама и испитивањем дифузије активних супстанци из козметичких формулација. У даљем тексту наведени су само најважнији од њих, који су представљали основу за истраживања и експерименте изведене у оквиру израде ове докторске дисертације:

1. Chebil L., Humeau C., Falcimaigne A., Engasser J-M, Ghoul M.: Enzymatic acylation of flavonoids, - *Process Biochemistry*, Vol 41, No 11, 2006, pp. 2237-2251.
2. Viskupicova J, Ondrejovic M and Maliar T, *Enzyme-Mediated Preparation of Flavonoid Esters and Their Applications*, in *Biochemistry*, 2012, ed by Ekinici D. InTech
3. Ziaullah and Rupasinghe HPV.: *An efficient microwave-assisted enzyme-catalyzed regioselective synthesis of long chain acylated derivatives of flavonoid glycosides*, - *Tetrahedron Letters*, Vol 54, No 15, 2013, pp. 1933-1937.
4. Céliz G. and Daz M.: *Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside prunin in organic media*, - *Process Biochemistry*, Vol. 46, No 1, 2011, pp. 94-100.
5. De Araújo M., Franco Y., Messias M., Longato G., Pamphile J., Carvalho P.: *Biocatalytic Synthesis of Flavonoid Esters by Lipases and Their Biological Benefits*, - *Planta Medica*, Vol. 83, No 1-2, 2017, pp. 7-22.
6. Enaud E., Humeau C., Piffaut B., Girardin M.: *Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin*, - *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol 27, No 1, 2004, pp. 1-6.
7. Baldisserotto A., Malisardi G., Scalambra E., Andreotti E., Romagnoli C., Vicentini CB., Manfredini S., Vertuani S.: *Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of a new phloridzin derivative for dermo-cosmetic applications*, - *Molecules*, Vol 17, No 11, 2012, pp. 13275-13289.
8. Mellou F., Loutrari H., Stamatis H., Roussos C., Kolisis FN.: *Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells*, - *Process Biochemistry*, Vol 41, No 9, 2006, pp. 2029-2034.
9. Danieli B., Luisetti M., Sampognaro G., Carrea G. and Riva S.: *Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by Candida Antarctica lipase B (Novozym 435) in organic solvents*, - *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol 3, No 1-4, 1997, pp. 193-201.
10. Kontogianni A., Skouridou V., Sereti V., Stamatis H., Kolisis FN.: *Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain*, - *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol 21, No, 2003, pp. 59-62.

11. Ardhaoui M., Falcimaigne A., Engasser J.-M., Moussou P., Pauly G., Ghoul M., *Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst*, - Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol 29, No 1-2, 2004, pp. 63-67.
12. Mellou F., Lazari D., Skaltsa H., Tselepis A. D., Kolisis, F. N., Stamatis, H.: *Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity*, - Journal of Biotechnology, Vol. 11, No 3, 2005, pp. 295-304.
13. Katsoura M. H., Polydera A. C., Tsironis L., Tselepis A. D., Stamatis H.: *Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency*, - Journal of Biotechnology, Vol 123, No 4, 2006, pp. 491-503.
14. Ghoul M., Engasser J.M., Moussou P., Pauly G., Ardhaoui M., Falcimaigne A., *Enzymatic production of acyl flavonoid derivatives*, - US Patent 2006/0115880 A1, 2006.
15. Moussou P., Falcimaigne A., Ghoul M., Danoux L., Pauly G.: *Esters of flavonoids with w-substituted C6-C22 fatty acids*, - US 2007/0184098 A1, 2007.
16. Pjanović R., Bosković-Vragolović N., Veljković-Giga J., Garić-Grulović R., Pejanović S., Bugarski B., *Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers*, - Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol 85, No 5, 2010, pp. 693-698.

3. Полазне хипотезе

Прегледом актуелне научне периодике установљено је да се ензимским поступком, коришћењем најчешће липаза као биокатализатора, може извршити реакција ациловања флавоноида, чиме се повећава њихова растворљивост и стабилност у хидрофобној средини, а врло често долази и до побољшања њихове физиолошке активности. Овај поступак се одвија под благим реакционим условима, реакција је регио- и стереоспецифична и производ се добија у високом приносу. Већина досадашњих истраживања је била фокусирана на синтезу естара флавоноида коришћењем чистих карбоксилних киселина средњег или дугог ланца, док је свега неколико истраживања посвећено синтези естара са киселинама краћег ланца. Поред тога, у литератури нису доступни подаци о употреби неког јефтинијег алтернативног ацил-донора за естерификацију флавоноида. Утицај кључних експерименталних фактора (концентрације ензима, температуре, моларног односа супстрата, концентрације флавоноида и времена трајања реакције) на принос производа и међусобна интеракција ових фактора нису детаљно испитани. Као катализатори у реакцији естерификације, углавном су примењивани комерцијални препарати имобилисаних липаза Novozyme[®] 435, Lipozyme[®] TL IM и Lipozyme[®] RML који садрже липазе из микроорганизама *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* и *Rhizomucor miehei*, редом. Примена синтетисаних естара и њихова карактеризација као биоактивних компоненти у козметичким формулацијама није детаљно испитана.

Основне хипотезе које се могу издвојити као полазна основа за започињање научно-истраживачког рада у оквиру ове дисертације су следеће:

- Флавоноиди су физиолошки активна једињења чија је примена у хидрофобним срединама ограничена због ниске стабилности и растворљивости. Естерификацијом ових једињења добијају се деривати који показују различита биолошка својства и могу се успешно примењивати у фармацеутским, козметичким и прехранбеним производима. До сада се углавном примењивала хемијска синтеза катализована неорганским катализаторима, међутим такав метод је замeтан и све више се примењују ензимски поступци синтезе јер је такав поступак много ефикаснији због позиционе специфичности и при томе не

долази до естерификације фенолних група које су одговорне за антиоксидативну активност ових једињења. Уколико су добро оптимизовани, биокатализовани поступци могу бити конкурентни, с обзиром на то да спадају у зелене технологије које поседују и велики економски потенцијал јер такви производи имају ознаку природног производа. За почетна испитивања у оквиру ове дисертације изабран је флоридзин као модел флавоноид. У циљу оптимизације најзначајнијих реакционих параметара за реакцију синтезе флоридзин-олеата у оквиру ове дисертације биће примењени CCRD (eng. Central Composite Rotatable Design) и RSM (eng. Response Surface Methodology), с обзиром на то да резултати добијени на овај начин пружају увид не само у утицај појединачних фактора на одабрани одзив, већ указују и на интеракције међу њима (њихову природу и интензитет). Посебна пажња биће посвећена одређивању оптималних вредности испитиваних фактора из аспекта три одабрана одзива (моларне конверзије лимитирајућег супстрата, приноса производа и концентрације естра по маси ензима) да би се одредили експериментални услови који погодују највећој продуктивности и економичности ензимског процеса.

- Биохемијска активност флавоноида као и њихових метаболита зависи од њихове хемијске структуре и релативне оријентације делова молекула. Флавоноид-естри карбоксилних киселина, у зависности од коришћеног флавоноида као и природе ацил-остатка, поседују различите карактеристике, те их је могуће употребљавати у веома разноврсним системима. Због тога ће специфичност примењене липазе типа Б из *C. antarctica* према ацил-донорима различите дужине ланца и степена незасићености, бити такође утврђена. Као донори ацил-остатка у реакцији естерификације флоридзина као модел флавоноида, биће коришћене сирћетна, капронска, капринска, миристинска, палмитинска, стеаринска, олеинска и линолна киселина где ће бити добијен велики број производа који, сваки у складу са својом $\log P$ вредношћу, могу бити коришћени као физиолошки активна једињења у различитим системима. Са друге стране, као ацил-акцептори биће испитани и ескулин и нарингин због признатог физиолошког дејства и чињенице да поседују угљенохидратну фракцију преко чијих се примарних хидроксилних група успоставља веза између киселине и флавоноида. Антиоксидативна својства свих синтетисаних производа биће упоређена одређивањем капацитета за везивање слободних радикала, а за поједине и додатна физиолошка дејства. Овај део истраживања може довести до отварања нових области примене естара флавоноида, као и до синтезе нових липосолубилних антиоксиданата.
- Пошто је један од циљева истраживања добијање исплативијег производног поступка, део истраживања у овој дисертацији биће посвећен проналажењу алтернативних ацил-донора који обезбеђују већу економичност производног поступка и/или повећану ефикасност. Тако ће у реакцији синтезе флавоноид-ацетата бити испитани анхидрид сирћетне киселине и триацетин као алтернативни ацил-донори, чија употреба пружа и могућност развијања еколошки прихватљивијег поступка применом реакције естерификације у систему без растварача (eng. „solvent-free“), избегавајући примену органских растварача. С друге стране, за добијање естара виших масних киселина различита биљна уља ће бити испитана као супстрати. Ова уља садрже смеше масних киселина па се као производ очекују смеше различитих естара флавоноида. Коришћењем уља драстично се смањује цена производње јер су она много јефтинији супстрати од чистих масних киселина, нарочито полинезасићених масних киселина.

- Липазе које је могуће користити у реакцијама добијања естара флавоноида су малобројне, а само је неколико скупих комерцијалних имобилисаних препарата показало задовољавајућу активност и стабилност. Стога је следећи корак истраживања посвећен примени неколико различитих техника имобилизације ензима на погодне носаче у циљу добијања јефтинијих имобилисаних ензима који катализују реакцију естерификације са несмањеном ефикасношћу. Могућност додатног повећања продуктивности процеса, биће истражена одређивањем оперативне стабилности липазе и могућности њене делимичне реактивације. Поред тога у оквиру ове докторске дисертације, биће постављени и кинетички модели одабраних реакција и одређени сви кинетички параметри, чиме ће бити дат значајан допринос у пројектовању ензимског процеса.
- У оквиру ове дисертације посебан акценат биће стављен и на испитивање примене синтетисаних биоактивних естара у различитим козметичким формулацијама. У оквиру тога биће испитана могућност инкорпорације смеше синтетисаних естара у различите врсте емулзија (класичне емулзије типа уље у води и гел емулзије), као и инкапсулација у различите врсте липозома као система за контролисано отпуштање. Након тога, биће испитана брзина отпуштања активних компоненти (естара) из различитих система, у којима су претходно успешно инкорпорирани. На основу дифузионих експеримената изведених кроз целулозно-ацетатну мембрану, а касније и применом Strat-M мембране која симулира трансдермални пренос, биће представљене криве отпуштања различитих биоактивних молекула, а применом модела и израчунати ефективни коефицијенти дифузије.

4. Научне методе истраживања

Праћење тока реакције синтезе различитих естара флавоноида, изоловање производа и карактеризација производа биће вршено савременим инструменталним методама. Концентрација производа биће квантификована применом реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (RP-HPLC) помоћу аналитичке C18 колоне, а у зависности од синтетисаног производа, као мобилна фаза биће коришћена смеша метанол/вода, метанол/вода/изопропанол. Иста метода биће употребљена и у циљу изоловања и пречишћавања производа, и то применом семи-препаративне RP-HPLC са колектором. У оба случаја производ ће бити детектован и квантификован помоћу UV детектора. У циљу доказивања структуре одређених производа биће примењена MS/MS спектрометрија и NMR спектроскопија. За планирање експеримента, статистичку анализу и интерпретацију добијених резултата биће коришћен софтверски пакет Stat Ease Design Expert као и програмски пакет MATLAB. За одређивање кинетичког модела одабраних реакција естерификације биће коришћен софтверски пакет COPASI. У циљу одређивања антиоксидативне активности произведених естара, примењиваће се DPPH метода. Ток имобилизације и хидролитичка активност имобилизата биће одређиване спектрофотометријским методама одређивања концентрације протеина и хидролизе *p*-нитрофенил-бутирата, а најефикаснији имобилисани ензими биће тестирани и у реакцијама естерификације у шаржном систему. Дифузија биоактивних компоненти из козметичких формулација и липозома биће праћена коришћењем стандардне Францове ћелије и целулозно-ацетатне мембране у почетним експериментима, а касније и синтетске мембране Strat-M која представља модел систем за трансдермални пренос масе.

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће резултати до којих се дође у оквиру ове дисертације дати значајан научни допринос на пољу примене липаза као биокатализатора у реакцијама добијања нетоксичних и ефикасних липосолубилних биоактивних компоненти – флавоноид-естара масних киселина – у зеленом, еколошки прихватљивом поступку. У оквиру истраживања може се очекивати неколико основних доприноса, и то:

- Развој оригиналног ензимског поступка добијања естара флавоноида и масних киселина, што подразумева неколико појединачних доприноса:
 - Избор погодног реакционог медијума,
 - Избор најпогоднијих масних киселина као ацил-донора,
 - Испитивање и одабир погодних алтернативних ацил-донора (уља, масти, синтетских триглицерида и анхидрида) ради смањења укупних трошкова синтезе и развоја поступка без органског растварача,
 - Оптимизација најбитнијих процесних параметара и одређивање кинетичког модела,
 - Одређивање физиолошких дејстава синтетисаних естара и
 - Развој имобилисаних ензима који се могу применити у синтези естара флавоноида.
- Развој козметичких формулација са инкорпорираним естрима флавоноида, што подразумева:
 - Инкорпорацију различитих естара у класичне емулзије типа вода у уљу, гел емулзије и емулзије вода у уљу на бази природних емулгатора и испитивање стабилности добијених емулзија,
 - Инкапсулацију естара у липозоме чија је мембрана изграђена од различитих засићених и незасићених фосфолипида и карактеризација добијених честица
 - Инкорпорацију липозома са инкапсулираним естрима у гел емулзије,
 - Одређивање брзине дифузије и могућности трансдермалног преноса естара из наведених козметичких формулација,
 - Избор најпогоднијег система за контролисано отпуштање синтетисаних естара из козметичких формулација.

Поред набројаног, резултати ове дисертације ће дати значајан научни допринос у проналажењу корелације између структуре флавоноида и ефикасности ензимске синтезе естара, физиолошке активности естара и брзине трансдермалне дифузије ових компоненти.

6. План истраживања и структура рада

Предмет истраживања ове дисертације је развој ензимског поступка синтезе естара флавоноида и карбоксилних киселина различите дужине угљоводоничног ланца и степена незасићености помоћу имобилисаних липаза микробног порекла, као и испитивање примене синтетисаних естара у различитим козметичким формулацијама и одређивање њихових профила отпуштања кроз мембрану која симулира трансдермални пренос. Током израде дисертације биће испитан утицај врсте примењене карбоксилне киселине на физиолошку активност добијеног производа, биће испитани различити алтернативни ацил-донори попут различитих уља, постављени кинетички модели одабраних реакција, испитане различите технике имобилизације ензима и носачи за имобилизацију. Биће испитана дифузија различитих естара флавоноида из козметичких формулација и липозома кроз мембрану која представља модел систем за трансдермални пренос.

Предвиђа се да ће у докторској дисертацији бити обрађена следећа поглавља: *Увод*, *Теоријски део*, *Експериментални део*, *Резултати и дискусија*, *Закључак*, *Литература*.

У поглављу *Увод* биће дефинисани основни циљеви и предмет истраживања, као и допринос дисертације.

Теоријски део докторске дисертације обухватиће преглед и анализу доступне литературе која се односи на:

- Ензимске поступке синтезе естара,
- Својства липаза од значаја за производњу естара флавоноида карбоксилних киселина и методе њихове имобилизације,
- Ензимско добијање естара флавоноида масних киселина (утицај реакционих фактора),
- Ензимску кинетику бисупстратних ензимских реакција,
- Примену естара флавоноида масних киселина,
- Опис различитих козметичких формулација и система за контролисано отпуштање: емулзије, гел емулзије, липозоми - поделе и методе добијања.
- Модели којима се описује дифузија активних компоненти из течних и получврстих форми.

У *Експерименталном делу* биће наведени примењени материјали и методе, конкретније:

- Хемикалије и материјали употребљени у раду,
- Опис експерименталних техника,
- Услови биосинтезе,
- Поступци имобилизације липазе,
- Добивање различитих врста емулзија,
- Добивање липозома,
- Дифузиони експерименти.

У поглављу *Резултати и дискусија* биће представљени и дискутовани резултати експеримената:

- Селекција реакционог медијума,
- Оптимизација процесних параметара и статистичка обрада података,
- Избор најпогоднијег масних киселина као ацил-донора,
- Избор најпогоднијих уља и масти као алтернативних ацил-донора,
- Кинетичка студија,
- Избор носача и метода имобилизације липазе,
- Дифузија естара флавоноида из различитих козметичких формулација.
- Избор најпогоднијег система за контролисано отпуштање синтетисаних естара.

У *Закључку* ће резултати добијени у току истраживања бити сумирани уз стављање акцента на њихове основне доприносе.

Литература ће садржати наводе цитиране у дисертацији и публикације проистекле из истраживачког рада у оквиру ове дисертације.

7. Закључак и предлог

На основу изложеног Комисија сматра да је тема докторске дисертације коју је предложила Ана Миливојевић, дипл. инж., научно заснована и да представља значајан допринос научној области Технолошко инжењерство за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидату Ани Миливојевић одобри израду докторске дисертације под насловом „ЕНЗИМСКА СИНТЕЗА ЕСТАРА ФЛАВОНОИДА И КОНТРОЛИСАНО ОТПУШТАЊЕ ИЗ КОЗМЕТИЧКИХ ФОРМУЛАЦИЈА”. За менторе докторске дисертације Комисија предлаже ванредне професоре Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду др Дејана Безбрадицу, чија је ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, и др Раду Пјановић, чија је ужа научна област Хемијско инжењерство.

У Београду, 03.07.2017.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

.....
Др Дејан Безбрадица,
Ванредни професор
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Рада Пјановић
Ванредни професор
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Зорица Кнежевић-Југовић
Редовни професор
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Марија Ћоровић
Научни сарадник
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Мирјана Антов
Редовни професор
Универзитет у Новом Саду,
Технолошки факултет